



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in Medicina Veterinaria

Liosecretoma di cellule stromali mesenchimali per il trattamento dell'osteoartrite nel cavallo: valutazione preliminare della sicurezza dopo applicazione intra-articolare.

Mesenchymal cell lyosecretome for the treatment of osteoarthritis in the horse: preliminary safety evaluation after intra-articular application.

Relatore:

Chiar.mo Prof. **Stefano Grolli**

Correlatori:

Chiar.ma Dott.ssa **Priscilla Berni**

Chiar.mo Dott. **Mario Angelone**

Laureanda:
Benedetta Valletti

RIASSUNTO

Le cellule stromali mesenchimali (MSCs) sono state recentemente proposte come un valido approccio per il trattamento dell'osteoartrite (OA), patologia degenerativa cronica della cartilagine articolare, comunemente diagnosticata nella pratica veterinaria equina. Essendo le convenzionali opzioni terapeutiche soltanto di natura palliativa, si ripone infatti grande aspettativa nella medicina rigenerativa, al fine di individuare un trattamento alternativo che possa invece promuovere la rigenerazione cartilaginea e quindi ristabilire l'omeostasi articolare, in prospettiva di una guarigione a lungo termine. La capacità intrinseca di autorinnovamento e differenziamento multilineare, così come gli importanti effetti immunomodulatori ed antinfiammatori esercitati dalle MSCs, rendono tali cellule le più promettenti in ambito clinico. In particolare è stato attualmente dimostrato come l'effetto terapeutico delle MSCs sia principalmente correlato al rilascio di molecole bioattive, comunemente definite come secretoma. Questo complesso insieme di fattori secreti, sembra rappresentare una valida alternativa come terapia acellulare, offrendo numerosi vantaggi in termini di sicurezza ed efficacia, rispetto all'applicazione diretta di MSCs. Affinchè questo prodotto potesse essere facilmente impiegabile nella pratica veterinaria, sono stati combinati i processi di ultrafiltrazione e liofilizzazione, ottenendo il liosecretoma.

In questo studio è stata condotta una valutazione preliminare della sicurezza *in vivo* dopo applicazione intra-articolare di liosecretoma nel cavallo. A tale scopo quattro animali adulti, affetti da patologia osteoartritica, sono stati sottoposti ad applicazione intra-articolare di liosecretoma derivante da MSCs allogeniche. Con l'obiettivo di testare unicamente la sicurezza del prodotto, ogni cavallo arruolato è stato sottoposto a valutazioni cliniche pre e post trattamento. I risultati ottenuti in fase di follow-up evidenziano l'assenza di reazioni avverse sistemiche o locali clinicamente significative, ponendo i presupposti necessari a procedere con ulteriori studi clinici relativi alla sicurezza e all'efficacia del liosecretoma.

ABSTRACT

Mesenchymal stromal cells (MSCs) have recently been proposed as a viable approach for the treatment of osteoarthritis (OA). OA is a chronic degenerative disease of articular cartilage commonly diagnosed in equine veterinary practice. As conventional therapeutic options are only palliative in nature, great expectation is indeed placed on regenerative medicine in order to identify an alternative treatment. Regenerative medicine can instead promote cartilage regeneration and thus restore joint homeostasis, with a view to long-term healing. The intrinsic capacity for self-renewal and multilinear differentiation, as well as the important immunomodulatory and anti-inflammatory effects exerted by MSCs make these cells the most promising in the clinical setting. In particular, it has currently been shown that the therapeutic effect of MSCs is mainly related to the release of bioactive molecules, commonly referred to as secretomes. This complex set of secreted factors seems to represent a viable alternative as an acellular therapy, offering numerous advantages in terms of safety and efficacy compared to the direct application of MSCs. In order to make this product easily used in veterinary practice, the processes of ultrafiltration and lyophilization were combined resulting in a lyosecretoma.

In this study a preliminary evaluation of *in vivo* safety after intra-articular application of lyosecretoma in horses was conducted. For this purpose, four adult animals with osteoarthritic disease underwent intra-articular application of lyosecretoma derived from allogeneic MSCs. With the aim of testing the safety of the product, each enrolled horse underwent pre- and post-treatment clinical evaluations. Results obtained at follow-up showed the absence of clinically significant systemic or local adverse reactions, setting the stage for proceeding with further clinical studies related to the safety and efficacy of lyosecretoma.

INDICE

1.	INTRODUZIONE	9
1.1.	LE CELLULE STAMINALI (CSs)	9
1.1.1.	L'AUTORINNOVAMENTO ED IL POTENZIALE DIFFERENZIATIVO	9
1.1.2.	LA DIVISIONE CELLULARE ASIMMETRICA	11
1.1.3.	LA CLASSIFICAZIONE DELLE CSs	13
1.2.	LE CELLULE STROMALI MESENCHIMALI (MSCs)	15
1.2.1.	IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DELLE MSCs	15
1.2.2.	LA MULTI-POTENZIALITÀ DELLE MSCs	17
1.2.3.	IL CONCETTO DI NICCHIA E LE FONTI TISSUTALI Di MSCs	20
1.2.4.	LE FUNZIONI BIOLOGICHE DELLE MSCs	22
1.2.4.1.	IL MECCANISMO DI HOMING	22
1.2.4.2.	L'ATTIVITÀ PARACRINA DELLE MSCs	24
1.2.4.3.	L'EFFETTO TROFICO DELLE MSCs	25
1.2.4.4.	L'EFFETTO IMMUNOMODULANTE ED ANTINFIAMMATORIO DELLE MSCs	25
1.3.	IL SECRETOMA DI ORIGINE MSCs (MSCs-CM)	29
1.3.1.	LA DEFINIZIONE DI SECRETOMA	29
1.3.2.	GLI EFFETTI IMMUNOMODULATORI ED ANTINFIAMMATORI DEL MSCs-CM	31
1.3.3.	IL RUOLO DEL MSCs-CM NELLA RIPARAZIONE E RIGENERAZIONE TISSUTALE	33
1.4.	IL LIOSECRETOMA	35
1.4.1.	IL LIOSECRETOMA COME PRODOTTO FARMACEUTICO	35
1.4.2.	LA PRODUZIONE DEL LIOSECRETOMA NEL RISPETTO DELLE LINEE GUIDA GMP	36
1.5.	LA MEDICINA RIGENERATIVA	39
1.5.1.	LE APLICAZIONI CLINICHE DELLE MSCs IN MEDICINA RIGENERATIVA	39
1.5.2.	MSCs AUTOLOGHE E ALLOGENICHE NELLA PRATICA CLINICA	41

1.6.	L'OSTEOARTRITE (OA)	43
1.6.1.	LA PATOFISIOLOGIA DELL'OSTEOARTROPATHIA	43
1.6.2.	L'OSTEOARTRITE NEL CAVALLO	46
1.7.	IL TRATTAMENTO MEDICO DELLE PATOLOGIE ARTICOLARI NEL CAVALLO	47
1.7.1.	LE OPZIONI TERAPEUTICHE CONVENZIONALI	47
1.7.2.	LA MEDICINA RIGENERATIVA PER IL TRATTAMENTO DELL'OA	50
2.	OBIETTIVI DELLA TESI	53
3.	MATERIALI E METODI	55
3.1.	ARRUOLAMENTO E CRITERI D'INCLUSIONE	57
3.2.	ESAMI PRE CLINICI	59
3.3.	TRATTAMENTO	63
3.4.	FOLLOW-UP	65
4.	RISULTATI	67
5.	DISCUSSIONE	73
6.	CONCLUSIONE	77
7.	BIBLIOGRAFIA	79

1. INTRODUZIONE

1.1. Le cellule staminali (CSs)

1.1.1. L'autorinnovamento ed il potenziale differenziativo

Le cellule staminali (CSs) possono essere definite come un'unità biologica, responsabile per lo sviluppo e la rigenerazione dei tessuti e degli organi (Bacakova et al., 2018). Le CSs sono infatti cellule indifferenziate (uncommitted cells), con potenziale clonogenico, capaci di autorinnovamento (self-renewal) e di differenziare in linee cellulari multiple (Weissman, 2000).

L'autorinnovamento rappresenta la capacità delle cellule di compiere un numero illimitato di cicli replicativi, mantenendo lo stesso stadio di differenziazione. Questo processo è reso possibile attraverso una divisione di tipo asimmetrica o simmetrica (**Figura 1**), che permette di generare rispettivamente una o due cellule identiche rispetto alla cellula progenitrice (He Shenghui et al., 2009). In caso di divisione asimmetrica, una delle due cellule figlie andrà incontro ad un processo di differenziazione, assicurando il mantenimento della integrità anatomica e funzionale del tessuto.

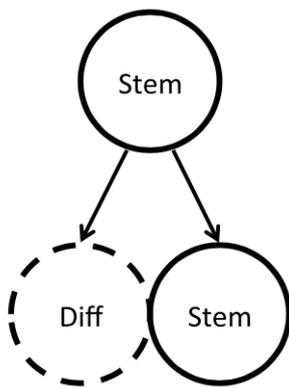
Il programma di autorinnovamento comporta l'azione bilanciata di proto-oncogeni (promotori dell'autorinnovamento) e soppressori tumorali (limitatori dell'autorinnovamento e mantenitori dell'integrità genomica), coinvolti specificamente nel mantenimento delle caratteristiche di staminalità. La regolazione di questi meccanismi cellulari intrinseci avviene attraverso segnali cellulari estrinseci, prodotti a livello delle nicchie staminali (Shenghui He et al., 2009). La nicchia staminale è un vero e proprio microambiente in grado di ospitare una o più CSs (Comoglio, 2012), grazie alla presenza di elementi cellulari e fattori molecolari che, interagiscono con queste, presiedendo al loro mantenimento e regolandone le funzioni in base alle richieste tissutali.

Il processo di differenziamento permette la trasformazione di CSs non differenziate in una tipologia cellulare specializzata, capace di dare origine a tessuti specifici. Lo stato differenziativo delle CSs è il risultato di stimoli di derivazione intracellulare (espressione genica), determinati dallo specifico programma di sviluppo della cellula ed extracellulare, provenienti dal microambiente staminale, che concorrono all'adattamento delle CSs nei confronti delle richieste tissutali dell'organismo.

La differenziazione cellulare avviene attraverso l'attuarsi di una divisione di tipo asimmetrica ed inizia nel momento in cui le CSs recepiscono tali stimoli, per i quali si ha la soppressione dell'espressione dei geni necessari al mantenimento della staminalità e l'espressione dei geni richiesti per la specializzazione.

L'equilibrio tra i processi di autorinnovamento e differenziamento garantisce l'omeostasi tissutale e assicura il corretto turn over cellulare in tutti i tessuti dell'organismo (Morrison e Kimble, 2006).

Divisione asimmetrica



Divisione simmetrica

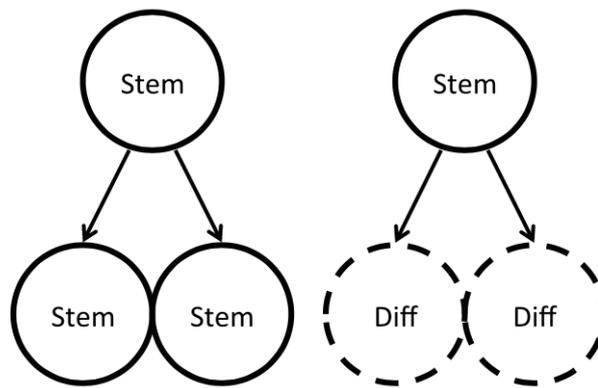


Figura 1. Rappresentazione schematica della divisione cellulare simmetrica e asimmetrica (da Shahriyari e Komarova, 2013).

1.1.2. La divisione cellulare asimmetrica

Il modello di divisione asimmetrica, prevede che una popolazione limitata di CSs provveda al mantenimento del pool cellulare staminale di un tessuto. Ogni cellula progenitrice andrà infatti a produrre una copia di se stessa (clonazione cellulare) e una cellula differenziata (Shahriyari et al., 2013), permettendo quindi di garantire contemporaneamente il processo di autorinnovamento e di differenziamento cellulare.

La divisione cellulare asimmetrica è resa possibile sia da programmi intrinseci alla cellula, che da segnali estrinseci ambientali, provenienti dalla nicchia staminale (Morrison e Kimble 2006).

Il meccanismo intrinseco prevede che alcuni componenti cellulari, implicati nel determinare l'autorinnovamento o il differenziamento cellulare, si localizzino in modo asimmetrico nella cellula. In fase mitotica di divisione cellulare, l'asse del fuso viene infatti orientato in modo tale che detti componenti siano ereditati da una sola cellula figlia (Comoglio, 2012).

Nel caso in cui intervengano i fattori intrinseci sopra citati, la divisione asimmetrica viene denominata pre-divisionale e permette alle cellule di avere due diverse sorti nonostante le cellule restino nello stesso microambiente. Questo è reso possibile attraverso un'inequale ripartizione di mRNA e proteine commissionanti tra le due cellule figlie, facendo sì che con la mitosi avvenga il differenziamento (Lombardi, 2011).

Nella divisione guidata da fattori estrinseci, il meccanismo utilizzato per una divisione asimmetrica risiederebbe in cambiamenti dei segnali intercorrenti tra la cellula e la nicchia staminale (Comoglio, 2012). In quest'ultimo caso il processo divisionale asimmetrico viene denominato post-divisionale e prevede che vengano inizialmente prodotte due cellule figlie identiche, che andranno successivamente a diversificare, perché esposte a segnali estrinseci diversi, forniti da distinti microambienti locali. Alla fine di questo processo avremo perciò una cellula che, rimanendo nella nicchia, mantiene le sue caratteristiche di staminalità ed una seconda cellula che andrà invece incontro a specializzazione. Il fuso mitotico in questo caso sarà posizionato in modo tale che una delle due cellule perda il contatto con le cellule di supporto, costituenti la nicchia staminale stessa.

Mentre la divisione asimmetrica pre-divisionale è spesso osservabile nelle CSs del primo sviluppo embrionale, le quali adottano tale tipologia di divisione con la finalità di incrementare le dimensioni del corpo; la divisione asimmetrica post-divisionale è invece maggiormente riscontrabile nelle CSs permanenti del tardo stadio evolutivo dell'embrione e nelle CSs adulte

che, presumibilmente, originano da queste. In tal caso lo scopo è ovviamente quello di mantenere l'integrità tissutale (Lombardi 2011).

1.1.3. La classificazione delle cellule staminali

La capacità delle cellule di differenziare in linee cellulari più specifiche è definita dal concetto di potenziale differenziativo, ossia dalla possibilità di tali cellule di andare incontro a un processo di differenziamento multilineare differente, sulla base della loro potenza (Lombardi, 2011).

Le CSs, in relazione al loro potenziale differenziativo, possono quindi essere classificate in cinque diversi gruppi: cellule totipotenti, cellule pluripotenti, cellule multipotenti, cellule oligopotenti e cellule unipotenti (Kolios e Moodley, 2013).

Le cellule totipotenti o onnipotenti rappresentano le cellule più indifferenziate, ritrovabili nello stadio di sviluppo precoce dell'organismo. Un ovocita fertilizzato e le cellule delle prime due divisioni sono cellule totipotenti, capaci di differenziare in tessuti embrionali ed extraembrionali (Rossant, 2001).

Le cellule pluripotenti sono rappresentate dalle CSs embrionali, ossia da quelle cellule che costituiscono la massa cellulare interna della blastocisti (Evans e Kaufman, 1981). Queste cellule, mantengono l'abilità di originare ogni tipo cellulare che costituirà i tre foglietti germinativi (ectoderma, mesoderma, endoderma), dai quali derivano tutti gli organi e i tessuti (De Miguel et al., 2010).

Una cellula è invece definita multipotente qualora sia già commissionata (committed), ossia possa dar luogo solo alle cellule che fanno parte del tessuto di appartenenza della cellula stessa. Queste sono le CSs fetali o adulte, le quali assumono la funzione di *turnover* fisiologico e mantenimento dell'omeostasi del tessuto in cui risiedono, ma anche di riparazione in seguito ad insulto, motivo per cui sono quiescenti, ma sempre pronte all'attivazione e alla sostituzione (Lombardi, 2011).

Le cellule stromali mesenchimali (MSCs) sono cellule multipotenti estesamente studiate (Kolios e Moodley, 2013). Queste cellule possono differenziare in tessuti di derivazione mesodermica, quali il tessuto adiposo, osseo, cartilagineo e muscolare. Un altro esempio di cellule multipotenti sono le CSs ematopoietiche (emocitoblasti), in grado di differenziarsi nei vari componenti cellulari del sangue.

Le cellule oligopotenti sono in grado di generare due o più linee cellulari. Le CSs mieloidi e linfoidi rappresentano il tipico esempio di cellule oligopotenti, in quanto in grado differenziare nelle linee cellulari mieloide e linfoide (Marone et al., 2002).

Le cellule unipotenti hanno la capacità di differenziare in un solo tipo cellulare del tessuto specifico di appartenenza. Un esempio può essere disegnato dalle CSs muscolari, le quali danno origine alle cellule muscolari mature (Bentzinger et al., 2012).

Un altro criterio di classificazione comunemente utilizzato per le CSs è basato sulla loro origine, distinguendo quindi CSs embrionali, fetali e adulte.

Le CSs embrionali sono linee cellulari ottenute dalla massa cellulare interna della blastocisti. Sono cellule pluripotenti, in grado di produrre tutti i derivati cellulari specializzati dei tre foglietti germinativi, quindi capaci di generare tutte le successive staminali specifiche per i diversi tessuti dell'organismo e tutte le tipologie di cellule funzionalmente mature che da esse derivano e che troviamo nell'organismo adulto (Conti e Cattaneo, 2011).

Le CSs fetali sono le cellule staminali presenti nel feto dopo la gastrulazione. Sono cellule pluripotenti e multipotenti, in grado di generare un ampio numero di tipi cellulari differenti (Comoglio, 2012).

Le CSs adulte rappresentano una piccola sottopopolazione del compartimento proliferante di un dato tessuto. Sono cellule multipotenti, deputate ad una graduale specializzazione per il ricambio omeostatico di cellule tissutali morte e per la sostituzione di cellule danneggiate in seguito ad insulto. Tale differenziazione cellulare segue uno schema gerarchico che prende origine da una singola cellula staminale, dalla quale deriva prima una popolazione di transizione, che solo a seguito di ulteriori divisioni progressive, assume le caratteristiche funzionali di cellule completamente differenziate (Lombardi, 2011).

Le cellule di transizione o precursori transitori di amplificazione (transit-amplifying cells), rappresentano infine un passaggio intermedio tra le CSs e le cellule post-mitotiche differenziate. Si tratta infatti di cellule che "transitano" dallo stato staminale a quello differenziato e che vengono "amplificate" attraverso cicli successivi di divisioni mitotiche, che danno origine ad una ampia progenie differenziata (Comoglio, 2012).

1.2. Le cellule stromali mesenchimali (MSCs)

1.2.1. Identificazione e caratterizzazione delle MSCs

Le cellule stromali mesenchimali (MSCs) hanno suscitato grande interesse negli ultimi due decenni come potenziale fonte cellulare per strategie terapeutiche basate su cellule e per l'ingegneria tissutale, principalmente per la loro capacità intrinseca di autorinnovamento e differenziamento multilineare (Baksh et al., 2004).

Alcune delle prime prove sperimentali a sostegno dell'esistenza delle cellule stromali mesenchimali (MSCs) hanno avuto origine dal lavoro pionieristico degli anni '70 di Friedenstein (Friedenstein et al., 1974). Essi riscontrarono nella cellularità midollare una rara popolazione di elementi fibroblastoidi allungati, in grado di aderire saldamente a supporti in plastica, crescendo sotto forma di colonie. Tali unità, denominate come CFU-F (unità formanti colonie fibroblastoidi), dimostrarono inoltre di possedere un'elevata capacità proliferativa, ma soprattutto di distinguersi per il loro potenziale differenziativo. In particolare il trapianto di cellule in modelli animali all'interno di supporti in ceramica (camere di diffusione) consentiva il differenziamento in senso osteocondrocitario (Dominici et al., 2004).

Non essendo disponibile uno specifico biomarcatore per l'identificazione delle MSCs, sono stati proposti nel 2006 dall'International Society for Cellular Therapy (ISCT) i criteri minimi per la definizione di una cellula stromale mesenchimale umana.

Il primo criterio prevede la capacità delle MSCs di aderire a supporti in plastica quando mantenute le condizioni standard di coltura.

Il secondo criterio implica l'espressione dei marcatori di superficie CD105, CD73 e CD90, mentre saranno assenti le molecole di superficie CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19 e l'antigene leucocitario umano-DR (HLA-DR).

Il terzo criterio comporta la capacità delle MSCs di differenziare in vitro, dando origine a osteoblasti, condroblasti e adipociti (Dominici et al., 2006).

In assenza di parametri specifici riferibili alla cellula stromale mesenchimale animale, i criteri minimi definiti dall'ISCT, sono stati adottati come riferimento per la caratterizzazione cellulare anche nell'ambito della medicina veterinaria.

I criteri ISCT descrivono le MSCs come un complesso eterogeneo e non clonale di cellule staminali multipotenti, cellule progenitrici (committed progenitor cells) e cellule differenziate (Squillaro et al., 2016). Per riflettere al meglio l'eterogeneità delle MSCs e l'assenza di una popolazione cellulare pura, è stata corretta la precedente nomenclatura da "cellula staminale mesenchimale" a "cellula stromale mesenchimale", sebbene i termini precedentemente citati siano ancora utilizzati in modo intercambiabile (Ullah et al., 2019).

1.2.2. La multi-potenzialità delle MSCs

Una delle principali caratteristiche distintive delle MSCs è la loro capacità di differenziare nei tre principali lignaggi mesenchimali, quali il tessuto osseo, la cartilagine e il tessuto adiposo (**Figura 2**), dopo coltura in specifiche condizioni in vitro (Frenette et al., 2013). L'impegno e la differenziazione delle MSCs in specifici tipi di cellule mature è un processo strettamente e temporalmente controllato, che coinvolge le attività di vari fattori di trascrizione, citochine, fattori di crescita e molecole della matrice extracellulare (Baksh et al., 2004).

Numerosi dati sperimentali supportano la capacità da parte delle MSCs di dare origine a tessuto osseo (Beresford, 1989). L'uso di appropriati medium contenenti acido ascorbico, 2-3 glicerol-fosfato e desametasone, inducono il differenziamento di intere popolazioni di MSCs in osteoblasti: cellule aderenti rettangolari positive per la fosfatasi alcalina, l'osteocalcina ed in grado di dare origine a bottoni di mineralizzazione (Jaiswal et al, 1997). Inoltre, l'utilizzo di specifici fattori di crescita, quale la proteina morfogenetica dell'osso (BMP), induce il rapido differenziamento in osteoblasti da parte di MSCs indifferenziate sia in vivo che in vitro (Chen et al., 1998).

Un'ulteriore indicazione della plasticità MSCs deriva dal fatto che tali cellule possano dare origine a condrociti (Lennon et al., 1995). Il percorso di differenziamento tuttavia non pare essere diretto (cellula stromale mesenchimale - condrocita), ma si ritiene che coinvolga, in fasi intermedie, elementi precursori degli osteoblasti, sottolineando la possibilità di un comune precursore osteocondrocitico (Dominici et al., 2004). Esistono infatti numerose evidenze in vitro secondo le quali linee cellulari di MSCs animali ed umane differenzino nello stesso tempo in condrociti ed osteoblasti nelle medesime condizioni di coltura (Grigoriadis et al., 1988).

Le colture a lungo termine di MSCs danno origine ad adipociti in presenza di corticosteroidi (Chen et al., 1991). Gli adipociti possiedono una grande plasticità nel loro differenziamento, tanto che risulta possibile convertire una cellula adipocitaria in una cellula osteoblastica e viceversa, semplicemente modificando le condizioni colturali (Hughton et al., 1998). Ulteriori evidenze in vivo tendono a confermare l'intercambiabilità del fenotipo tra adipociti ed osteoblasti: adipociti midollari trapiantati in camera di diffusione possono perdere la loro capacità di accumulare lipidi, trasformandosi in cellule aventi potenziale osteogenico (Bennett et al., 1991).

Le MSCs danno inoltre origine alle cellule stromali del midollo osseo (**Figura 2**) che promuovono l'ematopoiesi (Dexter et al., 1977).

La plasticità delle MSCs non deve particolarmente stupire, in quanto la sequenza condrogenesi, osteogenesi, stroma pre-emopoietico, emopoiesi ed adipogenesi rappresenta la naturale evoluzione del tessuto osseo e del midollo dalle fasi embrionali e fetali alla vita adulta. Più impressionanti appaiono i dati pubblicati in letteratura inerenti la capacità delle MSCs di dare origine a cellule non di origine mesodermica (**Figura 2**), come mioblasti e cellule di pertinenza del sistema nervoso centrale (Dominici et al., 2004).

Una somiglianza, almeno per ciò che riguarda il fenotipo tra cellule muscolari e le MSCs era stata già descritta all'inizio degli anni '90: le cellule stromali coltivate in "Dexter-type culture" mostrarono marcatori propri del differenziamento muscolare: α -actina del muscolo liscio, calponina e miosina (Galmiche et al., 1993). Studi più recenti hanno mostrato non solo la presenza di antigeni comuni, ma la possibilità che le MSCs possano produrre miotubuli in presenza di molecole ad azione demetilante, di farmaci antimicotici e del fattore di crescita (bFGF) (Ferrari et al., 1998).

Alcuni studi scientifici riportarono l'esistenza di MSCs in grado di generare cellule non mesenchimali ed in particolare neuroni. Lo sviluppo di un fenotipo caratterizzato dalla positività per antigeni neuro-specifici venne ottenuto grazie a media di coltura contenenti bFGF, β -mercaptoetanololo, dimetilsulfossido e idrossiixanisolato butilato (Woodbury et al., 2000; Sanchez-Ramos et al., 2000). Interessanti dati in un modello murino confermano questo fenomeno: le MSCs iniettate nel ventricolo laterale, raggiungendo l'encefalo, divengono positive per la proteina gliale fibrillare tipica degli astrociti, ovvero possono migrare in regioni ricche di neuroni nella zona corticale, differenziando esse stesse in neuroni (Kopen et al., 1990).

Sebbene vi sia un numero crescente di pubblicazioni che affrontano l'eterogeneità delle MSCs, la differenziazione multidirezionale rimane tuttora materia di studio e di dibattito (Andrzejewska et al., 2019).

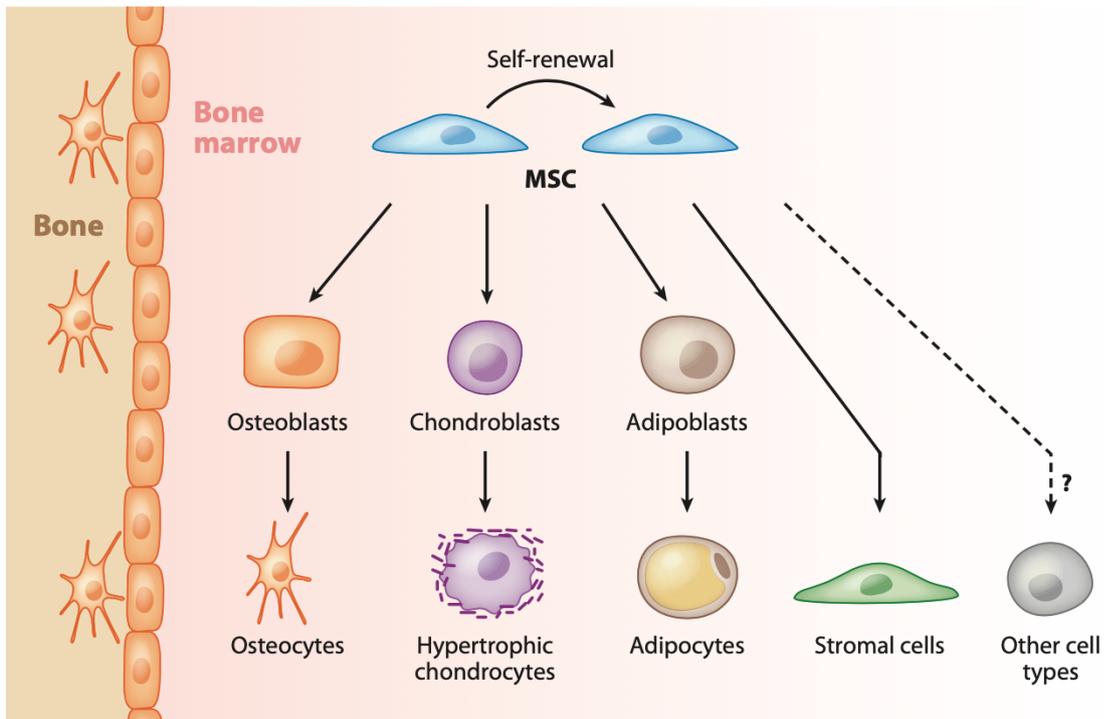


Figura 2. Le cellule staminali mesenchimali del midollo osseo danno origine a cellule identiche attraverso il processo di *self-renewal* e a cellule differenziate verso lignaggi che formano lo scheletro e lo stroma midollare. La differenziazione in altri tipi cellulari è stata segnalata, ma rimane ancora controversa (da Frenette et al., 2013)

1.2.3. Il concetto di nicchia e le fonti tissutali di MSCs

Il concetto di nicchia è stato primariamente proposto da Schoefield e colleghi come un microambiente indispensabile per il mantenimento e il differenziamento delle cellule staminali emopoietiche (HSCs) (Schoefield et al., 1978). La nicchia ematopoietica, costituita dallo stroma e dalle cellule stromali, fornisce un supporto fisico per la maturazione delle cellule del sangue e ospita un'ampia gamma di stimoli e segnali utili alla regolazione dei processi di mantenimento e differenziamento cellulare. Nello specifico, le cellule endoteliali, gli adipociti, i macrofagi, le cellule reticolari, i fibroblasti, gli osteoprogenitori, le cellule staminali emopoietiche e la loro progenie sono i componenti cellulari primari dello stroma midollare (Strobel et al., 1986).

Si può sostenere che le MSCs occupino la stessa nicchia delle cellule staminali emopoietiche, data la stretta vicinanza fisica di questi due tipi cellulari a livello di midollo osseo. Tuttavia, è probabile che i segnali extracellulari e/o intercellulari necessari al mantenimento del programma di sviluppo delle cellule staminali ematopoietiche e mesenchimali nel microambiente del midollo osseo, siano molto diversi (Baksh et al., 2004).

Nonostante il midollo osseo sia considerata una fonte accertata di MSCs, le stesse sono state isolate da altri tessuti tra cui l'osso trabecolare (Nöth et al., 2002), il tessuto adiposo, la sinovia, il muscolo scheletrico, il polmone, i denti decidui (Tuan et al., 2003) e le cellule perivascolari del cordone ombelicale umano derivate dalla gelatina di Wharton (Sarugaser et al., 2005), suggerendo che la nicchia MSCs sia ristretta al solo midollo osseo.

Tradizionalmente, il midollo osseo è stato la principale fonte di MSCs nell'uomo (Pittenger et al., 1999). Tuttavia, mentre il midollo osseo è una ricca fonte di cellule staminali ematopoietiche, contiene solo una rara popolazione di MSCs (Li et al., 2016). Inoltre, a causa della dolorosa procedura, che spesso può richiedere l'anestesia generale, la raccolta di MSCs derivate dal midollo osseo e la loro applicazione nella ricerca e in ambito clinico sono problematiche. Nel corso del tempo, numerosi altri tessuti sono stati identificati come fonti alternative di MSCs. Oggi il tessuto adiposo, il tessuto del cordone ombelicale e il sangue del cordone ombelicale sono considerati fonti rilevanti di MSCs.

Poiché è possibile ottenere un grande numero di MSCs dal tessuto adiposo mediante procedure minimamente invasive, le adMSCs (adipose tissue-derived MSCs) sono diventate un importante candidato per le terapie basate su cellule staminali autologhe e allogeniche e per l'ingegneria

tissutale (Kolaparthi et al., 2015). L'isolamento di MSCs da cordone ombelicale viene invece considerato promettente in ragione della giovane età del donatore (Kwon et al., 2016).

1.2.4. Le funzioni biologiche delle MSCs

1.2.4.1. Il meccanismo di "homing"

Le MSCs sono state ampiamente studiate per il loro potenziale terapeutico nella medicina rigenerativa, grazie alla loro capacità di migrare verso i tessuti danneggiati e fungere da serbatoio di fattori di crescita e molecole rigenerative (Ullah et al., 2019).

Quando i tessuti sono danneggiati, le MSCs vengono rilasciate naturalmente in circolo, migrano verso il sito della lesione e secernono molecole per creare un microambiente che promuova la rigenerazione (Chapel et al., 2003; Caplan, 2009). Pertanto, l'idea alla base del loro potenziale terapeutico è che le MSCs trapiantate possano migrare verso i tessuti danneggiati e agire come un "deposito di farmaci" per favorire il recupero e la rigenerazione dei tessuti (Caplan, 2009). Dopo aver raggiunto il tessuto bersaglio, le MSCs secernono una varietà di fattori con potenti effetti immunomodulanti, angiogenici e anti-apoptotici (Le Blanc e Mougiakakos, 2012; Singer e Caplan, 2011; Bronckaers et al., 2014). Di conseguenza, le MSCs sono state studiate per un'ampia gamma di applicazioni cliniche, come la modulazione immunitaria nelle malattie infiammatorie e autoimmuni, la protezione dei tessuti dopo lesioni e la medicina rigenerativa (Frenette et al., 2013).

Uno dei principali vantaggi delle terapie a base di MSCs è quindi la loro capacità di agire preferenzialmente a livello dei tessuti danneggiati attraverso un processo di "homing".

Nel processo di "homing" non sistemico, le MSCs vengono trapiantate localmente nel tessuto bersaglio e vengono quindi guidate al sito della lesione tramite un gradiente di chemochine.

Nel processo di "homing" sistemico le MSCs vengono somministrate nel flusso sanguigno e dovranno quindi subire un processo in più fasi per uscire dalla circolazione e migrare verso il sito della lesione. Il processo di homing sistemico può essere suddiviso in cinque fasi (**Figura 3**): (1) rotolamento, (2) attivazione, (3) arresto, (4) trasmigrazione o diapedesi e (5) migrazione (Sackstein, 2005).

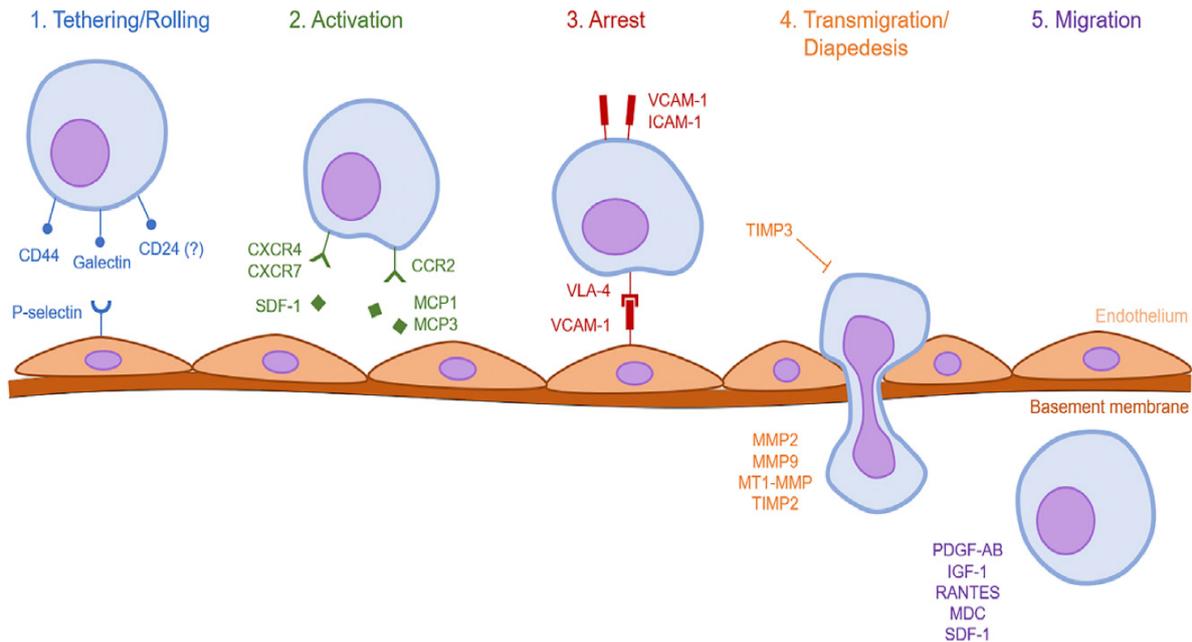


Figura 3. Visione d'insieme schematica dei meccanismi molecolari che regolano ogni fase del processo di "homing" delle cellule stromali mesenchimali (da Ullah et al., 2019).

Il rotolamento iniziale lungo la parete vascolare è facilitato dall'interazione tra le selectine espresse dalle cellule endoteliali e la molecola di superficie CD44 delle MSCs (Sackstein et al., 2008). L'esatta selectina utilizzata dalle MSCs è ancora un'area di indagine attiva, soprattutto perché non esprimono né il ligando E- e L-selectina delle cellule ematopoietiche (HCELL) né il ligando-1 della glicoproteina P-selectina (PSGL-1) (Sackstein et al. , 2008).

La seconda fase di attivazione è facilitata dai recettori delle chemochine accoppiati a proteine G, generalmente in risposta a segnali infiammatori.

L'espressione del fattore derivato dalle cellule stromali -1 (SDF-1) sulle cellule endoteliali è considerata fondamentale per questo passaggio (Lau e Wang, 2011). SDF-1 è il ligando del recettore delle chemochine CXCR4, che si pensa sia espresso dalle MSCs (Wynn et al., 2004; Gao et al., 2009; Honczarenko et al., 2006). In effetti, la sovraespressione di CXCR4 sulle MSCs aumenta l'homing al midollo osseo (Bobis-Wozowicz et al., 2011). Tuttavia, alcuni studi suggeriscono che siano coinvolti ulteriori recettori. In effetti, è stato dimostrato che le MSCs esprimano anche CXCR7, che si lega in modo simile a SDF-1 per facilitare l'homing a vari tessuti (Li et al., 2013; Shao et al., 2019).

La terza fase di arresto è indotta dal legame tra l'integrina VLA-4 (integrina $\alpha 4\beta 1$) e la molecola di adesione cellulare vascolare (VCAM)-1, sotto stimolo delle chemochine (Ullah et al., 2019).

La fase successiva di diapedesi prevede la migrazione transcellulare delle MSCs attraverso le cellule endoteliali e la membrana basale. Le metalloproteasi di matrice (MMP) secrete dalle MSCs sono indispensabili per l'abbattimento della membrana basale (Steingen et al., 2008). La maturazione e l'attività delle MMP sono regolate dagli inibitori tissutali delle metalloproteinasi (TIMP). L'espressione di questi enzimi di rimodellamento è indotta da citochine infiammatorie, che fungono da segnale per la migrazione nel tessuto danneggiato (Ries et al., 2007).

L'ultima fase prevede la migrazione delle MSCs attraverso l'interstizio verso il sito della lesione. Questo processo è guidato da segnali chemiotattici rilasciati in risposta al danno tissutale. Le MSCs migrano verso diversi segnali, inclusi il fattore di crescita derivato dalle piastrine-AB (PDGF), il fattore di crescita insulino-simile -1(IGF-1) e in misura minore, verso le chemochine RANTES, MDC e SDF-1 (Ponte et al. , 2009).

La percentuale di MSCs somministrate per via endovenosa che raggiunge il tessuto bersaglio, risulta tuttavia essere piuttosto bassa, come dimostrato da diversi studi di imaging (Devine et al., 2003; Barbash et al., 2003; Kraitchman et al., 2005). L'efficienza del processo di "homing" è infatti attribuibile a diversi aspetti, quali il numero delle cellule, le condizioni ed il numero di passaggi delle cellule in coltura, il sito e la modalità di somministrazione utilizzati nel trattamento. Sembrano inoltre essere influenti l'età del donatore e le condizioni cliniche del ricevente (Boltze et al., 2015).

Per questo motivo una delle maggiori sfide per le terapie cellulari MSCs, risulta essere l'ottimizzazione del processo di "homing". Per far fronte a questo ostacolo sono state adottate diverse strategie, quali la somministrazione mirata, la guida magnetica, la modifica genetica, l'ingegneria della superficie cellulare, l'innesco in vitro e la modifica del tessuto bersaglio e le tecniche radioterapeutiche (Ullah et al., 2019).

1.2.4.2 L'attività paracrina delle MSCs

Mentre inizialmente si riteneva che le MSCs esercitassero i loro effetti terapeutici attraverso la migrazione nei siti di lesione contribuendo attivamente alla riparazione e rigenerazione tissutale anche mediante il loro processo differenziativo, ora è sempre più riconosciuto il loro scarso attecchimento post trapianto, a causa dei fenomeni di sequestro polmonare e clearance

sistemica (Galleu et al., 2017). Relativamente alle modalità di sviluppo delle loro azioni terapeutiche risulta invece essere sempre più evidente l'importanza della loro attività paracrina, attraverso la secrezione di fattori bioattivi (Caplan e Dennis, 2006).

Gli effetti paracrini delle MSCs, descritti primariamente da Gnecchi e colleghi (Gnecchi et al., 2016), sono dovuti ad elementi bioattivi secreti dalle stesse MSCs, indicati collettivamente come secretoma (Liu et al., 2018). La frazione solubile del secretoma è abbondante in molecole immunomodulatorie, citochine, chemochine e fattori di crescita, mentre la componente vescicolare è costituita da vescicole extracellulari (EVs) (González- González et al., 2020).

Esistono solide evidenze a sostegno del ruolo dei fattori paracrini secreti dalle MSCs nel miglioramento delle condizioni degenerative e infiammatorie, sia in ambito preclinico che clinico (Caplan e Dennis, 2006; Caplan, 2009).

1.2.3.3. L'effetto trofico delle MSCs

Recentemente, si è osservato come l'effetto trofico delle MSCs sia di grande importanza nella rigenerazione dei tessuti. Dopo l'attecchimento, le MSCs potrebbero contribuire alla riparazione tissutale secernendo una serie di molecole trofiche che includono glicoproteine solubili della matrice extracellulare, citochine e fattori di crescita (Ankrum e Karp, 2010), oltre ad esercitare un'azione diretta cellula-cellula (MSCs e tessuti adiacenti) (Plotnikov et al., 2008). È stato verificato che queste molecole trofiche potrebbero non solo ridurre l'infiammazione, l'apoptosi e la fibrosi dei tessuti danneggiati, ma anche stimolare la rigenerazione tissutale (Yi-Ling et al., 2011).

1.2.3.4. L'effetto immunomodulante ed antinfiammatorio delle MSCs

Recentemente sono stati descritti il potenziale immunomodulante e antinfiammatorio delle MSCs. Gli effetti immunoregolatori delle MSCs osservati, rendono tali cellule ottime candidate per un approccio terapeutico cellulare volto ad indurre tolleranza immunitaria.

L'immunomodulazione mediata dalle MSCs opera attraverso una sinergia di meccanismi dipendenti dal contatto cellulare e fattori solubili (Wu et al., 2017; de Witte et al., 2018), nei confronti dell'immunità sia innata che adattiva.

Tra i fattori solubili coinvolti nell'immunomodulazione sono da prendere in considerazione: la prostaglandina E2 (PGE2), l'enzima indolamina 2,3-diossigenasi (IDO), l'ossido nitrico (NO), il fattore di crescita trasformante β 1 (TGF- β 1), l'interleuchina 10 (IL-10), il fattore di crescita

epatocitario (HGF).

La prostaglandina E2 è sintetizzata dalle MSCs, ma la sua produzione viene incrementata dalla presenza di citochine pro-infiammatorie come TNF e IFN- γ (Aggarwal et al., 2005). L'indolamine 2,3-diossigenasi è invece espressa prevalentemente in seguito all'esposizione delle MSCs all'IFN- γ (Krampera et al., 2006). L'ossido nitrico è uno dei principali fattori di soppressione delle cellule T, secreto dalle MSCs (Sato et al., 2007). Inoltre, la citochina pro-infiammatoria interferon- γ , da sola o in associazione al fattore di necrosi tumorale α (TNF- α) e a IL-1 α o IL-1 β , induce da parte delle MSCs la secrezione di enzimi e fattori solubili che mediano l'attività immunosoppressiva, tra cui ciclo-ossigenasi 2 (COX-2), PGE2 e IDO (Krampera et al., 2006).

In aggiunta ai fattori menzionati, numerosi studi suggeriscono che anche IL-6 (Wang et al., 2014) e la galectina (Sioud et al., 2011) possano avere un ruolo nell'attività immunomodulatoria delle MSCs.

Sebbene i meccanismi paracrini che agiscono attraverso la secrezione di diversi fattori solubili svolgano un ruolo importante nella capacità immunomodulatoria delle MSC, numerosi studi hanno dimostrato che l'attività immunosoppressiva delle MSCs aumenta al loro contatto diretto con le cellule immunitarie attivate (Ren et al., 2011).

Gli effetti immunomodulatori su monociti/macrofagi e cellule dendritiche:

L'antagonista del recettore dell'interleuchina 1 (IL1-RA) secreto dalle MSCs, promuove la polarizzazione dei monociti verso il fenotipo di tipo 2, caratterizzato da proprietà antiinfiammatorie e immunoregatorie (Luz-Crawford et al., 2016). I monociti antinfiammatori M2 secernono alti livelli di IL-10 (citochina antinfiammatoria) e riducono l'espressione di IL-12p70, IL-7 (citochine immunoregolatrici) e TNF- α (citochina proinfiammatoria). L'IL-10 secreta dai monociti antinfiammatori, impedisce a sua volta la differenziazione dei monociti in cellule dendritiche, secondo un meccanismo di feedback positivo (Deng et al., 2016). Oltre a IL-10, i monociti innescati dalle MSCs esprimono alti livelli di MHC di classe II, CD45R e CD11b e sembrano essere in grado di sopprimere l'attività delle cellule T effettrici (Ko et al., 2016).

Recentemente è stato rivelato un percorso indipendente dalle citochine per la polarizzazione indotta da MSCs di monociti/macrofagi. In un modello murino asmatico le MSCs sono state fagocitate dai macrofagi polmonari; tale processo ha causato la trasformazione dei monociti in un fenotipo immunosoppressivo di tipo 2 (Braza et al., 2016).

Gli effetti immunomodulatori su cellule T:

Le MSCs sopprimono la proliferazione delle cellule T (sottoinsieme di cellule T CD4+ e CD8+) nelle reazioni linfocitarie miste in modo dose-dipendente (Goncalves et al., 2017; Gieseke et al. 2010; Duffy et al., 2011). L'effetto inibitorio è correlato al numero di MSCs rispetto ai linfociti T effettori; è cioè necessario un rapporto minimo di MSCs/linfociti T per ottenere la soppressione della risposta T-cellulare (Le Blanc et al., 2003).

Il meccanismo responsabile di questa inibizione è il blocco dei linfociti T nella fase G1 del ciclo cellulare (Glennie et al., 2005). Sembra inoltre che l'inibizione della proliferazione delle cellule T, indotta dalle MSCs, comporti una diminuita produzione di IFN- γ , una deviazione delle cellule Th1 pro-infiammatorie a cellule Th2 antinfiammatorie, oltre che un cambiamento nel profilo delle citochine verso l'anti-infiammazione (Ge et al., 2010; Wang et al., 2008).

Inoltre, le MSCs facilitano la formazione di cellule T regolatorie (Treg) in vitro e in vivo (Ge et al., 2010), attraverso un meccanismo indiretto mediato dall'IL-10 rilasciata dalle cellule dendritiche plasmocitoidi (Maccario et al., 2005) ed un meccanismo diretto legato al rilascio di HLA-G5 solubile da parte delle stesse MSCs (Selmani et al., 2008). Le cellule Treg sono essenziali per l'omeostasi immunitaria prevenendo l'autoimmunità (Marson et al., 2007).

Gli effetti immunomodulatori su cellule B:

Le MSCs interagiscono direttamente con le cellule B, riducendo la formazione di plasmacellule e promuovendo l'induzione di cellule B regolatrici (Breg) (Franquesa et al., 2015). Le cellule Breg hanno proprietà immunosoppressive attraverso le quali forniscono tolleranza immunologica (Rosser et al., 2015).

È stata dimostrata la capacità delle cellule Breg produttrici di IL-10, di convertire le cellule T CD4+ effettrici in cellule Treg, capaci di esprimere il fattore di trascrizione forkhead box P3 (FOXP3) (Carter et al., 2011). FOXP3 ha una funzione fisiologica importante nel controllo della risposta immunitaria, garantendo la tolleranza immunologica ed evitando il fenomeno dell'autoimmunità.

L'effetto stimolatorio delle MSCs sulla formazione di cellule Breg e sulla produzione di IL-10 non è mediato da fattori solubili, ma sembra dipendere dal contatto diretto cellula-cellula o almeno da una stretta vicinanza delle cellule corrispondenti (Luk et al. 2017). Tuttavia, è stato dimostrato che l'effetto stimolante delle MSCs sulla formazione di cellule Breg e il loro effetto soppressivo sulla proliferazione delle cellule T, richieda un metabolismo cellulare attivo (Luk et al., 2016).

In presenza di cellule T, le MSCs inibiscono inoltre la proliferazione delle cellule B, che potrebbe essere dovuta all'azione dell'IFN- γ secreto dalle cellule T; le MSCs pretrattate con IFN- γ sono infatti in grado di inibire la proliferazione delle cellule B (Luk et al. 2017).

Gli effetti immunomodulatori su cellule Natural Killer:

Le MSCs sono anche importanti inibitori della proliferazione delle cellule Natural Killer (cellule NK). La proliferazione delle cellule NK è inibita dopo coltura con le MSCs, responsabili inoltre dell'inibizione della loro attività citotossica e della produzione di citochine (Spaggiari et al., 2006). Alcuni studi provano che l'effetto inibitorio delle MSCs sulle cellule NK coinvolge PGE2, IDO, TGF- β 1, IL-6 e l'NO secreto dalle MSCs (Spaggiari et al., 2007).

1.3. Il secretoma di origine MSCs (MSCs-CM)

1.3.1. La definizione di secretoma

Il secretoma delle cellule stromali mesenchimali è un complesso e ricco insieme di molecole bioattive, rilasciate nello spazio extracellulare, che comprende diversi fattori in forma solubile e vescicole extracellulari in forma insolubile (González et al. 2020). Il secretoma di origine MSCs può essere ottenuto dal medium di coltura delle stesse MSCs (Vizoso et al., 2017).

La frazione solubile del secretoma è abbondante in molecole immunomodulatorie, citochine, chemochine e fattori di crescita, mentre la frazione vescicolare è costituita da vescicole extracellulari (EVs) (González et al. 2020), classificate principalmente in base alla loro dimensione (Théry et al., 2018). Rientrano nella definizione di EVs diversi tipi di vescicole, classificabili in base alle loro dimensioni ed alle modalità di formazione. Gli esosomi (nanovesicole), corrispondono a EVs di piccole dimensioni (30-200 nm), provenienti dalla via endocitica. Gli ectosomi (microvescicole) rappresentano EVs di medie dimensioni (200-1000 nm) e derivano dalla membrana plasmatica. Gli oncosomi e i corpi apoptotici sono esempi di EVs di grandi dimensioni (superiori ai 1000 nm); il termine "oncosomi" si riferisce alla loro provenienza da cellule tumorali (Meehan et al., 2016). Tutte le EVs partecipano alla comunicazione intercellulare, ad eccezione dei corpi apoptotici, che tipicamente hanno una funzione nella fagocitosi (Théry et al., 2018).

Prove crescenti indicano che le MSCs siano in grado di produrre enormi quantità di esosomi rispetto ad altre cellule e che molte delle proprietà rigenerative precedentemente attribuite a queste cellule in virtù delle loro caratteristiche di staminalità, siano effettivamente mediate attraverso la loro secrezione e successiva endocitosi da parte di cellule bersaglio (Basu et al., 2016). L'internalizzazione degli esosomi può avvenire attraverso diversi meccanismi: fagocitosi, fusione con membrana cellulare, interazione recettore-ligando. Questo processo permette il rilascio del loro contenuto nel citoplasma della cellula bersaglio e quindi l'espletarsi della loro funzione (Feng et al., 2010; Svensson et al., 2013).

La composizione del secretoma è influenzata dall'ambiente a cui sono esposte le MSCs (Vizoso et al., 2017). Ad esempio, il preconditionamento ipossico è stato associato ad un aumento della produzione di fattori di crescita, tra cui il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), il fattore di crescita dei fibroblasti 2 (FGF-2), il fattore di crescita degli epatociti (HGF) e il fattore di

crescita insulina simile (IGF- 1). È stato dimostrato che l'esposizione a uno stimolo infiammatorio come l'interleuchina 1-beta (IL-1 β), il fattore di necrosi tumorale-alfa (TNF- α) o l'interferone-gamma (IFN- γ) induca la produzione di fattori immunomodulatori. Questi includono il fattore stimolante le colonie di granulociti (G-CSF) (Redondo-Castro et al., 2017), il fattore H che inibisce l'attivazione del complemento (Tu et al., 2010) e la galectina-9 che sopprime la proliferazione delle cellule T (Gieseke et al., 2013).

L'utilizzo del secretoma di origine MSCs, sottoforma di medium condizionato (MSCs-CM), offre numerosi vantaggi nell'ambito della medicina rigenerativa, rispetto alle applicazioni terapeutiche basate sulla somministrazione di popolazioni cellulari viventi e proliferative (Vizoso et al., 2017). Infatti, nonostante i promettenti risultati ottenuti da studi sperimentali e clinici, riguardanti le terapie cellulari a base di MSCs, persistono diverse complicazioni relative a sicurezza ed efficacia (Glassberg et al., 2017).

L'impiego clinico del secretoma risolve importanti complicanze associate alla somministrazione diretta di MSCs, quali l'incompatibilità immunologica, la tumorigenicità, la formazione di emboli e la trasmissione di infezioni (Vizoso et al., 2017). La conservazione del secretoma è tra l'altro effettuabile senza l'applicazione di agenti crioconservanti potenzialmente tossici, garantendo comunque la funzionalità del prodotto (Eiró et al., 2014). È inoltre rilevante il fatto che lo stesso secretoma possa essere valutato in termini di sicurezza, dosaggio e potenza, analogamente agli agenti farmaceutici convenzionali (Vizoso et al., 2017).

Oltre agli importanti aspetti relativi alla sicurezza, sono da considerare anche alcuni vantaggi riguardanti la praticità clinica del secretoma, che evita procedure invasive di raccolta cellulare (Osugi et al., 2012), oltre alla possibilità di poter ridurre notevolmente i costi e le tempistiche necessarie all'espansione e al mantenimento delle colture cellulari. La produzione di massa del secretoma, rende la terapia immediatamente disponibile per il trattamento di patologie acute, come l'ischemia cerebrale o l'infarto miocardico (Vizoso et al., 2017).

Infine, è da tenere in considerazione la possibilità di poter modulare la composizione del secretoma, al fine di poter indurre gli effetti cellulari specifici desiderati per il trattamento di una specifica patologia. Attraverso l'applicazione di diverse tecniche, il secretoma può essere modificato geneticamente per un'espressione corretta di quei fattori necessari a rendere il prodotto biologico adatto al suo potenziale terapeutico (Daneshmandi et al., 2020).

1.3.2. Gli effetti immunomodulatori ed antiinfiammatori del MSCs-CM

Le MSCs influenzano la proliferazione, l'attivazione e la funzione delle cellule immunitarie. Il meccanismo principale delle azioni immunoregolatrici delle MSCs corrisponde alle interazioni intercellulari e alla segnalazione paracrina (Müzes e Ferenc, 2022). È stato dimostrato che vari costituenti del MSCs-CM regolano le cellule dell'immunità sia innata che adattativa al rilascio di DNA, mRNA, RNA circolari (circRNA) e RNA lunghi non codificanti (lncRNA) (Regmi et al., 2019).

Le applicazioni potenziali più promettenti riguardano il trattamento della malattia del trapianto contro l'ospite, così come delle malattie autoimmuni e infiammatorie (Le Blanc et al., 2004).

Nei confronti dell'immunità innata il MSCs-CM agisce in opposizione ai meccanismi di disregolazione immunitaria (Müzes e Ferenc, 2022). Gli esosomi MSCs promuovono la remissione dell'infiammazione inibendo la produzione di IL-22 e IL-23 (Hyvärinen et al., 2018). Inoltre gli esosomi MSCs stimolano la polarizzazione dei macrofagi verso il fenotipo M2 antinfiammatorio. Questo processo è mediato via miR-223/pKNOX1 (PBX/knotted 1 homeobox 1) (He et al., 2019) e attraverso la cascata di segnalazione TLR4/fattore nucleare (NF)κB/fosfatidilinositolo 3 chinasi (PI3K)/Akt (Xin et al. 2020). È stato inoltre dimostrata la capacità degli esosomi MSCs di derivazione epatica, di inibire la proliferazione, l'attivazione e la citotossicità delle cellule NK attraverso la regolazione del TGFβ (Fan et al., 2019).

Per quanto riguarda la presentazione dell'antigene e l'immunità adattativa, i componenti del MSCs-CM contribuiscono alla tolleranza immunologica (Müzes e Ferenc, 2022). Le EVs derivate dalle MSCs del midollo osseo umano inibiscono la maturazione e la funzione delle cellule dendritiche, aumentando l'espressione di IL-10 e TGFβ e riducendo la produzione di IL-6 e IL-12p70 (Reis et al., 2018). Inoltre, inducendo cellule dendritiche tollerogeniche murine con una bassa espressione di marcatori co-stimolatori, gli esosomi MSCs promuovono la differenziazione delle cellule T regolatorie, aumentando l'espressione di IL-10 e TGFβ e diminuendo la produzione di IL-6 (Shahir et al., 2020). Gli esosomi MSCs aumentano i processi apoptotici a carico delle cellule T e riducono la loro proliferazione, attraverso la produzione di IL-10 e TGFβ (Kim et al., 2020). Secondo alcuni esperimenti effettuati su modelli murini, gli esosomi MSCs sopprimono la differenziazione di Th1 incapsulando miR-23a-3p e controllando post-trascrizionalmente il recettore TGFβ 2 (Lee et al., 2020). La via di segnalazione PI3K/Akt, gli MSC-EV impedisce inoltre l'attivazione delle cellule B (Adamo et al., 2019).

È ben noto che l'effetto antinfiammatorio del MSCs-CM sia almeno in parte mediato da molecole immunoregolatriche solubili. Tra le citochine antinfiammatorie presenti nel secretoma vi sono il

fattore di necrosi tumorale $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) (Zagoura et al., 2012), l'interleuchina (IL) 13 (Zagoura et al., 2012; Bermudez et al., 2016), la proteina legante IL18 (IL18BP), il fattore neurotrofico ciliare (CNTF), la neurotrofina 3 (NT -3) (Bermudez et al., 2016), IL10, IL12p70, IL17E, IL27 o antagonista del recettore IL1 (IL1RA) (Zagoura et al., 2012). È stato anche scoperto che MSC-CM contiene citochine pro-infiammatorie, come IL1b (Zagoura et al., 2012), IL6 (Cantinieux et al., 2013), IL8 e IL9 (Lee et al., 2011). L'equilibrio tra queste citochine antinfiammatorie e proinfiammatorie può determinare l'effetto finale. Tuttavia, è anche notevole che le MSCs inibiscano le citochine proinfiammatorie, come l'interferone (IFN)- γ e il fattore di necrosi tumorale α (TNF α), mentre aumentano il rilascio di IL10 antiinfiammatoria (Yi et al., 2012).

1.3.3. Il ruolo del MSCs-CM nella riparazione e rigenerazione tissutale

Il secretoma di origine MSCs contiene un insieme di fattori di crescita capaci di promuovere la rigenerazione e la riparazione tissutale (Harrell et al., 2019). Alcuni dati provenienti da modelli animali sembrano indicare che gli effetti autocrini o paracrini delle MSCs posano svolgere un ruolo chiave nella guarigione delle ferite, piuttosto che il loro attecchimento diretto o la differenziazione tissutale (Salgado et al., 2010).

Oltre alla presenza dei fattori di crescita, è importante ricordare gli effetti antifibrotici ed angiomodulatori indotti dal MSCs-CM, responsabili di una maggiore guarigione delle ferite e di una ridotta formazione di tessuto cicatriziale. La concentrazione di fattori pro e anti-angiogenici è regolata dalle condizioni infiammatorie e ipossiche a cui sono state esposte le MSCs. In presenza di un'alta concentrazione di citochine pro-infiammatorie si assiste alla produzione di molecole anti-angiogeniche per prevenire la migrazione dei leucociti circolanti nei tessuti infiammati (Vizoso et al., 2017). Un'ampia analisi proteomica di MSCs-CM ha rivelato TIMP-1 come il principale responsabile degli effetti anti-angiogenici del secretoma di origine MSCs (Zanotti et al., 2016). L'ipossia induce invece una maggiore produzione di fattore 1 alfa inducibile dall'ipossia (HIF-1 α), il quale a sua volta promuove la generazione del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), promotore del processo di angiogenesi (Zhang et al., 2019). La formazione di vasi sanguigni è inoltre promossa da ulteriori fattori pro-angiogenici contenuti all'interno del MSCs-CM: fattore di crescita fibroblastico di base (bFGF), TGF- β , fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), angiopoietina-1, fattore di crescita placentare (PGF), IL-6, proteina chemiotattica dei monociti-1 (MCP-1), fattore di crescita epidermico (EGF), fattore di crescita degli epatociti (HGF) (Tao et al., 2016).

Recenti studi riportano inoltre la capacità delle MSCs di regolare l'attività apoptotica in condizioni fisiologiche e patologiche (Harrell et al., 2019). La terapia basata su MSCs-CM riduce infatti significativamente l'espressione di Bax pro-apoptotico e della caspasi-3, mentre aumenta l'espressione di Bcl-2 anti-apoptotico nelle cellule parenchimali, prevenendone la perdita in corso d'infiammazione (Vizoso et al., 2017). È interessante notare che effetti completamente opposti siano stati osservati nelle cellule tumorali trattate con MSCs-CM. Un aumento significativo dell'attività della caspasi-3, -8, -9, -12 è stato notato nelle cellule di carcinoma mammario MDA-MB-231 trattate con MSCs-CM (Eiró et al., 2014). È importante sottolineare che questi risultati sono stati confermati anche in vivo, in un modello di tumore murino. Il trattamento con MSCs-

CM ha comportato una riduzione significativa della crescita del cancro al seno e un aumento della sopravvivenza dei topi portatori di tumore (Eiró et al., 2014).

1.4. Il liosecretoma

1.4.1. Il liosecretoma come prodotto farmaceutico

Il secretoma è un complesso di molecole bioattive secrete dalle MSCs, capace di riprodurre gli effetti terapeutici delle cellule staminali, implementandone al tempo stesso diversi vantaggi relativi a sicurezza ed efficacia (Glassberg et al., 2017). L'impiego in ambito clinico del prodotto biologico rimane tuttavia una sfida, dal momento che i tradizionali metodi di produzione, come l'ultracentrifugazione o la cromatografia, risultano limitarne l'applicabilità, oltre a renderne difficoltosa la valutazione circa la sua sicurezza ed efficacia ad alte dosi (Gimona et al., 2017; Reiner et al., 2017). Affinchè il secretoma possa essere applicabile in terapia è necessario che venga formulato un prodotto standardizzato compatibile con le attuali procedure di buona pratica di fabbricazione (Good Manufacturing Practice, GMP) (Manandhar et al., 2018). Oltre al miglioramento degli standard di sicurezza ed efficacia, risulta fondamentale la produzione di un formato che possa essere facilmente gestibile dalla comunità clinica (Mocchi et al., 2021).

A questo proposito, è stato recentemente proposto da Bari e collaboratori un metodo per trasformare MSCs-CM in un prodotto farmaceutico per la sua produzione su larga scala (Bari et al., 2018). A tale scopo sono stati combinati i processi di ultrafiltrazione e liofilizzazione: il secretoma di origine MSCs è stato purificato dai surnatanti di coltura mediante ultrafiltrazione, concentrato a $0,5 \times 10^6$ equivalenti cellulari per mL, integrato con crioprotettore e liofilizzato. Tutte le fasi di produzione sono state eseguite rispettando le buone pratiche di fabbricazione (GMP) (Bari et al., 2018). Attraverso questa metodica è stato possibile ottenere il liosecretoma, ossia una polvere liofilizzata e pronta all'uso, contenente vescicole e proteine extracellulari (Mocchi et al., 2021).

1.4.2. La produzione del liosecretoma nel rispetto delle linee guida GMP

Il lavoro pubblicato da Bari e collaboratori (Bari et al., 2018) riporta le fasi di produzione del liosecretoma, secondo la procedura brevettata e riportata da Perteghella e colleghi (Perteghella et al., 2016). In breve, il secretoma è stato raccolto con surnatanti di colture cellulari, purificato mediante ultrafiltrazione, integrato al crioprotettore e liofilizzato, ottenendo quindi il liosecretoma (**Figura 4**). Tutte le fasi di produzione sono state eseguite rispettando i principi delle GMP, attraverso la conoscenza di tutti i passaggi critici di produzione, per garantire un prodotto finale di qualità. In particolare, tutte le procedure sono state eseguite in condizioni asettiche in camera bianca di grado B, da operatori qualificati, dotati di indumenti protettivi e monouso; le materie prime sono state introdotte nella sala di produzione separatamente attraverso un pass-box pulito. Sia il processo di coltura cellulare che quello di produzione del liosecretoma hanno seguito un protocollo di qualificazione/validazione, considerando anche strumenti, forniture e reagenti e definendo i ruoli e le responsabilità per ciascuna fase. Infine, poiché l'analisi del controllo qualità e il test di rilascio dei lotti GMP fanno parte del processo di produzione, sul prodotto finito, in considerazione dei requisiti normativi in materia di qualità, sicurezza ed efficacia, è stata eseguita una caratterizzazione (Bari et al., 2018).

La prima fase di produzione del liosecretoma prevede l'isolamento e l'espansione delle MSCs, ottenute in questo studio da tessuto adiposo. Una volta raggiunta la sub-confluenza, le MSCs sono state coltivate in terreno privo di siero, con lo scopo di indurre il rilascio del loro secretoma (Merino et al., 2014). I terreni condizionati sono stati inizialmente centrifugati per eliminare i detriti cellulari e i corpi apoptotici. Quindi, i supernatanti sono stati raccolti e la purificazione del secretoma di origine MSCs è stata eseguita mediante filtrazione a flusso tangenziale. Il secretoma purificato, adiuvato di un crioprotettore, viene prima congelato a -80°C , quindi liofilizzato a 8×10^{-1} mbar e a -50°C . Il prodotto finale, denominato liosecretoma può essere refrigerato a -20°C fino al momento del suo utilizzo. Alla termine del processo di liofilizzazione può essere determinata la resa di produzione e calcolato l'equivalente in cellule per ogni mg di liosecretoma, dividendo il numero totale di cellule usate per la produzione per i mg di liosecretoma ottenuti (Bari et al., 2018). La sterilità del prodotto finale è stata assicurata dall'impiego di materiali con comprovata certificazione di sterilità e da controlli microbiologici sull'output risultante (Villani et al., 2008).

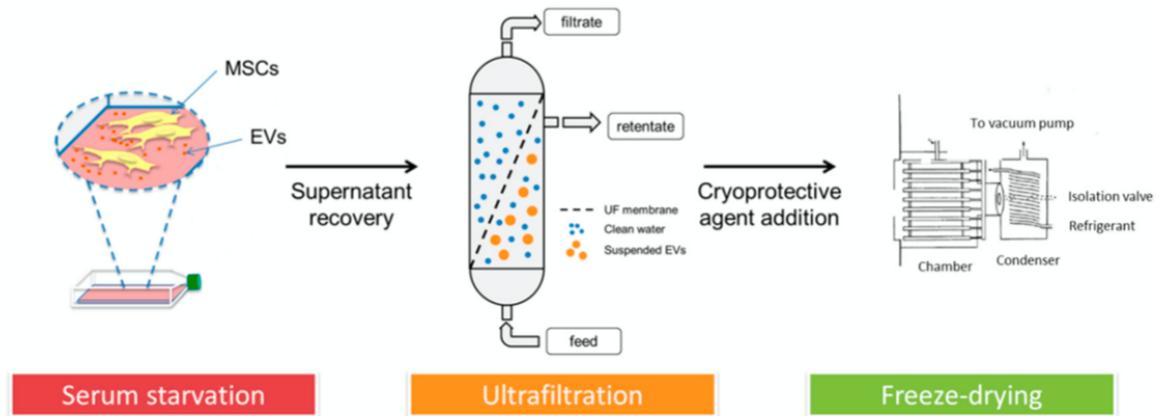


Figura 4. Processo di produzione del liosecretoma di origine MSCs (da Bari et al., 2018).

La caratterizzazione del prodotto finito include la quantificazione del contenuto totale di proteine e fosfolipidi, oltre alla determinazione della curva di distribuzione dimensionale (PSD) e dell'ultrastruttura delle vescicole extracellulari (EVs). Il contenuto proteico è stato determinato mediante kit "micro BCA-Protein Assay", mentre la quantificazione fosfolipidica mediante "Nile red assay". Per quanto riguarda invece la verifica della morfologia delle EVs è stato attuato un monitoraggio delle nanoparticelle al fine di determinare la PDS ed è stato utilizzato un microscopio a trasmissione elettronica (TEM) per verificarne l'ultrastruttura (Bari et al., 2018).

1.5. Medicina rigenerativa

1.5.1. Le applicazioni cliniche delle MSCs in medicina rigenerativa

La medicina rigenerativa rappresenta una branca emergente e in rapida evoluzione della medicina, che mira a sostituire o rigenerare cellule, tessuti o organi, al fine di ripristinarne o ristabilirne la normale funzione (Orlando et al., 2011).

Nell'ambito della terapia cellulare, importante settore della medicina rigenerativa, le cellule stromali mesenchimali (MSCs) sono diventate tra i tipi di cellule più frequentemente utilizzati. Numerosi studi hanno infatti dimostrato gli effetti benefici correlati alle terapie a base di MSCs per il trattamento di diverse patologie, tra cui disturbi neurologici, ischemia cardiaca, diabete, malattie ossee e cartilaginee (Hmadcha et al., 2020). Il potenziale terapeutico delle MSCs è in primo luogo mediato dalla loro intrinseca capacità di migrare verso i tessuti danneggiati e dalla loro abilità di esercitare effetti immunosoppressivi, anti-apoptotici, anti-fibrotici, angiogenici e antinfiammatori, attraverso la secrezione di mediatori bioattivi, come fattori di crescita, citochine e vescicole extracellulari (Salgado et al., 2010).

Ancora più promettente in ambito clinico, sembra essere l'utilizzo del secretoma di origine MSCs, anche descritto come medium condizionato (MSCs-CM). Un gran numero di studi sperimentali ha esplorato il potenziale terapeutico del secretoma di origine MSCs, dimostrandone un effetto terapeutico similare a quello osservato dopo applicazione diretta di MSCs, oltre ad un miglioramento del prodotto biologico in termini di sicurezza ed efficacia (Lou et al., 2017). Numerosi lavori scientifici descrivono infatti i vantaggi correlati all'utilizzo del secretoma e riportano promettenti risultati nel trattamento delle malattie della rigenerazione del muscolo scheletrico (Sandonà et al., 2021), delle alterazioni traumatiche e degenerative del disco intervertebrale (Wangler et al., 2021) dei disturbi dermatologici (Damayanti et al., 2021), delle malattie del fegato (Driscoll et al., 2019), delle malattie cardiovascolari (Praveen Kumar et al., 2019), delle malattie neurologiche degenerative (Praveen Kumar et al., 2019), delle malattie ossee (Praveen Kumar et al., 2019), e delle patologie articolari (Fan et al., 2022).

Affinchè il secretoma potesse essere prodotto su larga scala e applicabile in terapia è stato poi necessario formulare un prodotto standardizzato compatibile con le attuali procedure di buona pratica di fabbricazione (GMP). A tale scopo sono stati combinati i processi di ultrafiltrazione e liofilizzazione, ottenendo il liosecretoma (Manandhar et al., 2018).

Il cane e il cavallo sono attualmente le specie veterinarie più studiate in medicina rigenerativa e l'applicazione terapeutica delle MSCs sembra avere risultati promettenti soprattutto nel trattamento delle patologie muscoloscheletriche (Mocchi et al., 2020).

Nella pratica veterinaria equina risulta essere in particolare molto frequente la diagnosi di zoppia dovuta a malattie muscoloscheletriche (MSDs, dall'inglese musculoskeletal disease). Molti di questi disturbi ortopedici sono problemi cronici, per i quali non esiste un trattamento clinicamente soddisfacente. Pertanto, grandi speranze sono riposte nella medicina rigenerativa (Ribitsch et al., 2021). Tra le terapie rigenerative più utilizzate per il trattamento delle MSDs, sono da considerare il plasma ricco di piastrine (PRP), il siero autologo condizionato (ACS), la soluzione proteica autologa (APS) e l'impiego di cellule stromali mesenchimali (MSCs).

Nonostante i promettenti risultati ottenuti in seguito al trattamento di lesioni tendinee, tendinopatie, lesioni cartilaginee e disturbi degenerativi delle articolazioni, risultano tuttavia evidenti delle importanti discrepanze relative ai risultati ottenuti in vitro e in vivo e per quanto riguarda l'efficacia terapeutica nella pratica clinica (Kornicka et al., 2019).

1.5.2. MSCs autologhe e allogene nella pratica clinica

Le terapie basate su cellule stromali mesenchimali sono già disponibili per il trattamento di diverse malattie o condizioni mediche, ma rimangono ancora inconclusivi i benefici associati all'utilizzo di MSCs autologhe rispetto a MSCs allogene (Li et al., 2021). Per MSCs autologhe si intende cellule derivanti da fonti "self", quindi isolate e utilizzate nello stesso individuo, mentre nel caso delle MSCs allogene si prevede l'isolamento delle cellule da soggetti donatori appartenenti alla stessa specie, quindi derivanti da fonti "non self".

L'utilizzo di MSCs allogene rappresenterebbe un vantaggio importante, offrendo la possibilità di avere un prodotto pronto all'uso, precedentemente già caratterizzato in termini di sicurezza e componenti biologici. Questo approccio ridurrebbe inoltre la variabilità tipica dei prodotti cellulari autologhi, consentendo una maggiore omogeneità dei trattamenti e presumibilmente, dei risultati (Mocchi et al., 2020). Nonostante i rilevanti punti a favore di un prodotto biologico derivante da MSCs allogene, sembra che possa essere più sicuro l'utilizzo di cellule autologhe. Alcuni studi hanno infatti proposto che le MSCs allogene possano effettivamente innescare il rigetto immunitario almeno in alcune applicazioni terapeutiche (Chen et al., 2021; Liesz et al., 2015). Al momento non è chiaro il meccanismo alla base di questo processo, tuttavia alcuni risultati sperimentali hanno dimostrato una sopravvivenza maggiore delle MSCs autologhe rispetto a MSCs allogene iniettate (Liesz et al., 2015).

Nel trials clinico condotto da Carrade e colleghi sono state iniettate MSCs autologhe e allogene, di derivazione placentare, nelle articolazioni controlaterali di 16 cavalli sani. Alla valutazione effettuata nelle ore successive è stato osservato come l'utilizzo di MSCs allogene non avesse provocato alcuna risposta sistemica, mentre è risultata minima la risposta locale e la risposta infiammatoria non è stata significativamente diversa tra i due trattamenti (Carrade et al., 2011).

Un'ulteriore prova della sicurezza relativa alle MSCs allogene è stata riportata da Brandão e collaboratori, i quali hanno analizzato le MSCs autologhe e allogene, derivate da tessuto adiposo, per valutare la risposta infiammatoria nel tendine equino sano. Dopo analisi della risposta tissutale e cellulare, è stato concluso dagli stessi autori, che né le MSCs autologhe né le MSCs allogene abbiano indotto una risposta infiammatoria significativa, sebbene sia stato osservato un numero maggiore di linfociti T nel gruppo trattato con cellule allogene (Brandao et al., 2018)

Sulla base di questi risultati si potrebbe concludere, che attraverso l'utilizzo di MSCs allogeniche, non si evidenzino importanti effetti avversi, rispetto all'uso di cellule autologhe. Questa importante evidenza porta quindi a rafforzare l'ipotesi che le cellule allogeniche possano essere un approccio sicuro ed efficace alle terapie rigenerative (Mocchi et al., 2020).

1.6. L'osteoartrite (OA)

1.6.1. La patofisiologia dell'osteartropatia

La funzione delle articolazioni sinoviali dipende dall'integrità della normale anatomia e dalla corretta funzione cellulare di ciascuno dei suoi componenti. L'osso, la cartilagine articolare, il liquido sinoviale, la membrana sinoviale, la capsula articolare fibrosa e le strutture legamentose ne costituiscono i componenti (**Figura 5**).

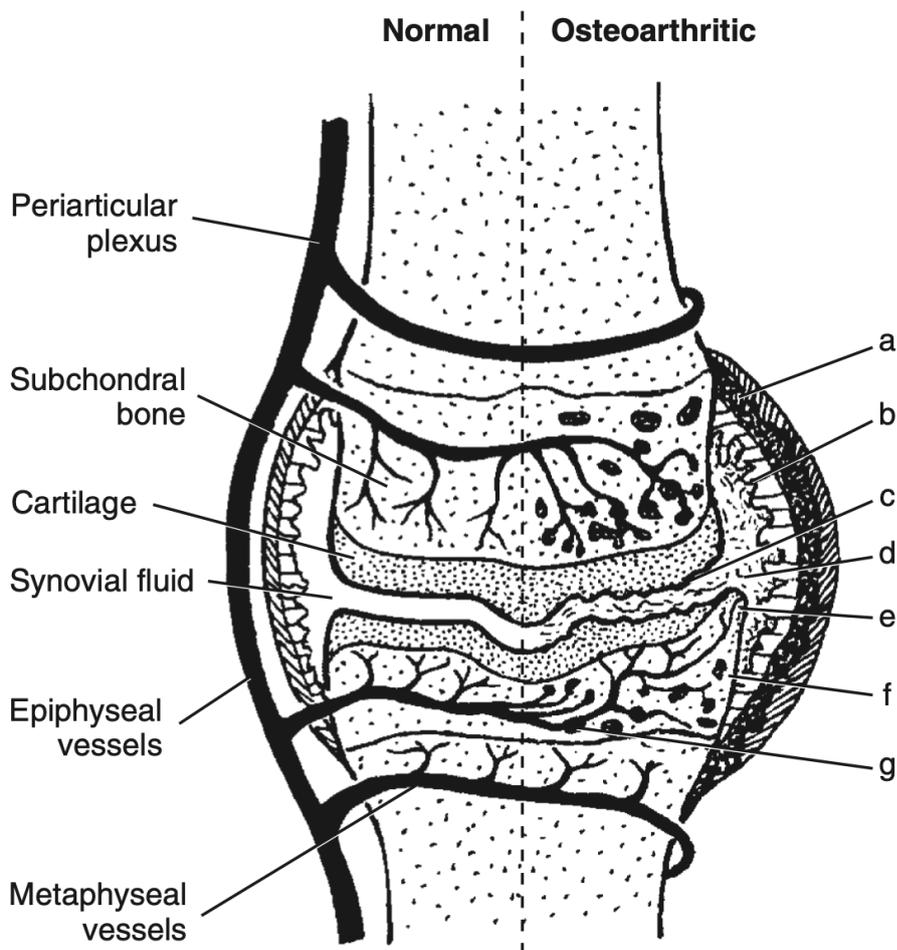


Figura 5. Un'articolazione sinoviale normale (a sinistra), comprendente di cartilagine articolare, liquido sinoviale e membrane sinoviali, insieme ai cambiamenti osservati in un'articolazione affetta da osteoartrosi (a destra).

In un'articolazione osteoartrotica possono essere presenti le seguenti anomalie: a) fibrosi capsulare; b) sinovite; c) deterioramento della cartilagine; d) acido ialuronico depolimerizzato; e) osteofiti; f) cisti subcondrali; g) ingorgo vascolare. (da L. Articular cartilage in health and disease. In: Sambrook P, ed. The Musculoskeletal System. New York: Churchill Livingstone; 2001:86.)

Il termine osteoartrite deriva dal greco *osteo* (osso) e *arthron* (articolazione) e indica nello specifico una patologia delle articolazioni cartilaginee, caratterizzata da degenerazione e perdita della cartilagine articolare. Il suffisso *-ite* potrebbe però non essere del tutto corretto, poiché starebbe a significare la presenza di un processo infiammatorio, che non risulta essere sempre presente in tutte le patologie articolari. Per quanto riguarda invece il termine alternativo di osteoartrosi, questo enfatizza correttamente l'assenza della componente infiammatoria, ma per contro viene definito come un processo cronico, non propriamente sempre corretto nella descrizione della patologia. Nella trattazione di questo elaborato verrà utilizzato il termine di osteoartrite.

In generale l'osteoartrite (OA) è una patologia complessa e dalle molteplici sfaccettature, caratterizzata da degenerazione cartilaginea, infiammazione, invecchiamento (precoce) della cartilagine, senescenza dei condrociti e transizioni fenotipiche. Tuttavia, si tratta di una malattia dell'intera articolazione, che colpisce tutti i tessuti articolari a causa della loro associazione fisica e funzionale (Loeser et al., 2012).

L'OA può insorgere in seguito a una serie di fattori predisponenti come l'età, le lesioni meccaniche, la genetica, il sesso, le disfunzioni metaboliche e l'obesità, che innescano una cascata di eventi fisiopatologici nei tessuti articolari (Goldring et al., 2011). Indipendentemente dai fattori iniziali, la patogenesi dell'OA segue un percorso molecolare comune, orchestrato da un intricato scambio tra condrociti, macrofagi e fibroblasti sinoviali, osteociti e osteoblasti e leucociti infiltranti, nonché dalla matrice extracellulare dei tessuti articolari e del liquido sinoviale (Raman et al., 2018).

Per quanto riguarda la patofisiologia dell'OA molti testi definiscono meccanismi specifici come responsabili della sua patogenesi. Caron e colleghi propongono tre distinti meccanismi alla base dell'OA:

Il primo meccanismo prevede una cartilagine fondamentalmente difettosa con proprietà biomeccaniche anomale (Caron et al., 2011). Nell'uomo è stato ad esempio descritto un difetto genetico, per il quale il collagene di tipo II risulta essere incapace di sopportare il normale carico articolare (Knowlton et al., 1990).

Il secondo meccanismo comporta un cambiamento anomalo dell'osso subcondrale. È noto come esso subisca tipicamente un rimodellamento in risposta all'esercizio fisico o a variazioni del

carico. Si ritiene che in alcuni casi l'osso aumenti la sua densità fino a un livello patologico, che a sua volta si traduce in un'unità osso-cartilaginea più rigida e meno compatta, incline al cedimento.

Il terzo meccanismo proposto, riguarda la cartilagine normale esposta a forze anomale, come quelle che si possono riscontrare in caso di incongruenza articolare dovuta ad uno stiramento del legamento collaterale. Il carico esercitato da forze anormali a livello articolare sovrasta infatti i fisiologici meccanismi di riparazione metabolica della cartilagine articolare, oltre a provocarne il deterioramento (Caron et al., 2011). Anche McIlwraith riporta alcuni meccanismi patogenetici, analoghi a quelli precedentemente descritti da Caron e Colleghi (McIlwraith, 1996).

Gli eventi fisiopatologici sono guidati principalmente da una risposta immunitaria innata precoce che catalizza progressivamente i cambiamenti degenerativi. Gran parte dell'attivazione dell'immunità innata e della produzione di citochine nell'articolazione osteoartritica è attribuita ai macrofagi sinoviali pro-infiammatori. Gli effettori chiave dell'infiammazione sinoviale, così come i sinoviociti e i condrociti simili ai fibroblasti, contribuiscono in modo sostanziale alla patogenesi dell'OA (Kraus et al. 2016). I prodotti di degradazione della matrice extracellulare cartilaginea, rilasciati nel microambiente sinoviale, stimolano ulteriormente la produzione di mediatori catabolici e pro-infiammatori, ma anche di enzimi proteolitici, instaurando in questo modo un circolo vizioso di rottura della cartilagine e infiammazione sinoviale (Mathiessen et al., 2017).

Più recentemente, l'osteoartrite umana è stata ridefinita da diversi istituti medici come "un gruppo di malattie distinte e sovrapposte, che possono avere eziologie diverse, ma con esiti biologici, morfologici e clinici simili" (Anderson et al. 2011). Questa definizione è simile, ma più semplice di una recente definizione di osteoartrite equina che considera il processo "come un gruppo di disturbi caratterizzati da uno stadio finale comune: il progressivo deterioramento della cartilagine articolare accompagnato da cambiamenti nell'osso e nei tessuti molli dell'articolazione" (McIlwraith, 2005).

1.6.2. L'osteoartrite nel cavallo

L'OA, patologia caratterizzata da sinovite persistente e progressiva degradazione della cartilagine, rappresenta una delle patologie più comuni diagnosticata nella pratica veterinaria equina. I fattori causali e stimolanti dell'OA non sono stati ancora completamente identificati, ma si presume che l'eziologia nei cavalli sia principalmente di tipo post-traumatica. Un singolo evento traumatico, causa di una grave lesione articolare, non deve però essere considerato come unica opzione di trauma, in quanto più spesso si potrebbe trattare di un danno cronico dovuto a molteplici e ripetuti insulti traumatici. Quest'ultimo, definito come "trauma da uso", è attribuibile alle "normali" attività quotidiane dell'animale, che possono includere l'allenamento atletico e la competizione (Kidd et al., 2001). A sostegno di questa tesi alcuni autori descrivono come un eccessivo sovraccarico fisico possa instaurare importanti reazioni infiammatorie, risultando nell'interruzione dell'integrità delle strutture articolari. Gli stessi autori riportano come, tuttavia, una corretta frequenza e intensità di esercizio fisico, potrebbe invece stimolare il recupero dell'omeostasi e della funzione articolare, promuovendo la sintesi dei proteoglicani e la circolazione a livello articolare (Te Moller e Van Weeren, 2017).

L'insorgenza dell'OA non è tuttavia unicamente correlata alle alte prestazioni sportive, ma potrebbe frequentemente evidenziarsi spontaneamente con l'avanzare dell'età dei pazienti (Cantley et al., 1999; McIlwraith et al., 2012). È stato infatti dimostrato come nei cavalli di età superiore ai 15 anni, la prevalenza di OA sia superiore al 50% e come negli animali di età superiore ai 30 anni aumenti all'80-90% (Van-Weeren et al., 2016).

Clinicamente la malattia è caratterizzata da versamento sinoviale, tumefazione dei tessuti molli, zoppia e risposta al test di flessione (McIlwraith et al., 2012). La diagnosi di OA è solitamente ottenuta attraverso l'associazione di questi risultati clinici alla diagnostica per immagini (Arantes-Baccarin et al., 2022). L'esame radiografico è sicuramente lo strumento più utilizzato per la valutazione dei cambiamenti ossei articolari (Baxter, 2020), tuttavia risulta essere impossibilitata la valutazione dei tessuti molli o dei cambiamenti ossei sottili (Barrett et al., 2018). Le principali caratteristiche radiologiche includono la presenza di osteofiti, l'aumento della densità ossea subcondrale e in fase terminale, la riduzione dello spazio articolare (McIlwraith et al., 2012).

1.7. Il trattamento medico delle patologie articolari nel cavallo

Gli obiettivi principali del trattamento medico dell'OA nel cavallo sono due: ridurre il dolore (zoppia) e minimizzare la progressione del deterioramento articolare. Nel formulare un piano di trattamento, l'ottimizzazione di questi obiettivi sarà influenzata da una diagnosi accurata e specifica, dallo stadio della malattia, dalla gravità, dalle modalità di trattamento disponibili e dal tempo di riabilitazione.

1.7.1. Le opzioni terapeutiche convenzionali

I farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) rappresentano, ormai da decenni, un pilastro fondamentale per il trattamento delle malattie articolari. I FANS sono tipicamente utilizzati in corso di lesioni acute e sono spesso associabili ad altre terapie farmacologiche.

Il bersaglio dei FANS è rappresentato dall'enzima ciclossigenasi (COX): ostacolandone l'attività, viene infatti impedita la cascata di reazioni che porterà alla sintesi delle prostaglandine pro-infiammatorie a partire dall'acido arachidonico. Questo meccanismo induce una riduzione dell'infiammazione e dei sintomi ad essa associati.

Gli effetti collaterali a livello renale e gastrointestinale associati alla somministrazione di FANS ne limitano l'uso a lungo termine per il trattamento delle malattie articolari.

Tra i prodotti attualmente in commercio, il fenilbutazone rimane uno dei FANS più prescritti per il dolore muscoloscheletrico nei cavalli. Il suo costo, la facilità di somministrazione e i limitati effetti collaterali ad esso associato, lo rendono infatti una buona scelta terapeutica in fase acuta. Keegan e collaboratori riportano una maggiore regressione della zoppia e minori effetti collaterali alla somministrazione del fenilbutazone in associazione alla flunixin meglumina o al ketoprofene. Tuttavia, risulta esserne spesso limitato l'utilizzo a causa del poco vantaggioso rapporto costo/beneficio (Keegan et al., 2008).

Il firoxib, inibitore selettivo della COX-2, è stato inoltre ultimamente approvato per l'utilizzo nei cavalli. Un recente studio ha valutato l'esito della somministrazione orale di firocoxib per la gestione della zoppia associata a OA. È stato evidenziato un miglioramento della zoppia più rapido entro i primi 7 giorni dall'inizio del trattamento e un progresso continuato, anche se a un ritmo più lento, fino a 14 giorni di trattamento (Orsini et al., 2012).

I corticosteroidi sono farmaci antiinfiammatori steroidei, utilizzati da oltre 40 anni nel trattamento delle patologie articolari nel cavallo. È ben documentato come i corticosteroidi

inibiscono la cascata dell'acido arachidonico bloccando la fosfolipasi A2 e quindi la produzione di mediatori dell'inflammatione. È inoltre nota la loro attività inibitoria selettiva nei confronti della COX-2 (Masferrer et al., 1994).

Attualmente sono disponibili tre principali preparati di corticosteroidi: il metilprednisolone acetato (MPA), il triamcinolone acetone (TA o Vetalog) e i preparati a base di betametassone fosfato di sodio e betametassone acetato. Un utilizzo razionale dei corticosteroidi potrebbe rappresentare una buona scelta per il trattamento dell'osteoartrite, grazie ai buoni risultati ottenuti e ai limitati effetti collaterali correlati alla loro somministrazione.

Nonostante i benefici associati all'utilizzo di questa classe di farmaci, il loro utilizzo risulta essere attualmente controverso. Questo è probabilmente correlato ai risultati clinici poco promettenti ottenuti in passato, dove le articolazioni venivano ripetutamente medicate con tali farmaci, senza però trattare la causa primaria di patologia articolare (Clegg e Booth, 2000). Una tale situazione prevede un miglioramento del dolore e di conseguenza la possibilità di potenziare ulteriormente le lesioni (RMTC Paper, 2013). È inoltre da considerare che somministrazioni croniche ripetute ad alte dosi di desametasone potrebbero arrecare più danni che benefici, a causa degli effetti catabolici dei corticosteroidi nei confronti di ossa e cartilagine (Black e Grodzinsky, 2019).

L'acido ialuronico (disaccaride composto da acido D-glucuronico e N-acetil-D-glucosamina) è un componente fisiologico del liquido sinoviale e degli aggregati di proteoglicani (aggregano).

Sebbene non sia noto l'esatto meccanismo attraverso il quale l'acido ialuronico endogeno o esogeno eserciti un effetto, è stato documentato che la sua somministrazione induca un'importante attività antinfiammatoria, attraverso l'inibizione della chemiotassi e della fagocitosi di granulociti e macrofagi, oltre alla riduzione della stimolazione, della proliferazione e della migrazione dei linfociti. È inoltre dimostrato che l'acido ialuronico diminuisca la formazione e il rilascio di prostaglandine da parte dei macrofagi e che eviti la formazione di radicali liberi derivati dall'ossigeno in modo dose-dipendente (Howard et al., 1993).

L'infiltrazione di acido ialuronico risulta quindi utile a ridurre il dolore e il processo infiammatorio causati dall'artrosi, oltre a ristabilire l'equilibrio biologico e a migliorare la meccanica dell'articolazione, attraverso la sua azione lubrificante.

I polisolfati polisaccaridi (PSP) comprendono i glicosamino-glicani polisolfati (PSGAG), il complesso peptidico GAG e il pentosan polisolfato. I PSP hanno un ruolo condroprotettivo e sono

infatti capaci di prevenire, ritardare o invertire la lesione morfologica cartilaginea dell'OA. Dal punto di vista clinico potrebbero essere impiegati nel trattamento dell'OA di grado lieve o in fase iniziale. In particolare sarebbe opportuno utilizzare questi farmaci con un coinvolgimento multiplo delle articolazioni, poiché si tratta di una terapia sistemica (Friesbie e Johnson, 2019).

1.7.2. La medicina rigenerativa per il trattamento dell'OA

Le opzioni terapeutiche convenzionali attualmente disponibili mirano a ridurre le conseguenze cliniche dell'OA, risultando quindi unicamente di natura palliativa. L'aspettativa futura in ambito medico scientifico prevede la ricerca di un trattamento alternativo, che possa invece promuovere la rigenerazione cartilaginea e quindi ristabilire l'omeostasi articolare, in prospettiva di una guarigione a lungo termine. L'applicazione intra-articolare di terapie biologiche derivate da fonti di sangue o cellule dello stroma mesenchimale (MSCs) rappresenta attualmente una valida opzione per il trattamento dell'OA (Mayet et al., 2023). Sebbene questi agenti ortobiologici non siano ad oggi ancora affermati in ambito clinico, è scientificamente noto come tali terapie condividano un potenziale effetto rigenerativo nei confronti dei tessuti articolari (Frisbie et al., 2008; Broeckx et al., 2014).

I prodotti ematici autologhi a base cellulare sfruttano il potenziale rigenerativo associato ai fattori di crescita contenuti all'interno delle piastrine. A seconda del rispettivo numero di piastrine nel sangue e del metodo di lavorazione, la concentrazione piastrinica risulta ampiamente variabile tra i diversi prodotti (Brossi et al., 2015). Il plasma ricco di piastrine (PRP) è uno dei rappresentanti più noti di questo gruppo terapeutico e nella pratica medica equina viene comunemente utilizzato in corso di lesioni tendinee o legamentose (Velloso-Alvarez et al., 2020). L'utilizzo di PRP per il trattamento di patologie articolari risulta essere meno frequente, tuttavia sono stati documentati risultati positivi dopo il suo utilizzo. Garbin e Olver riportano nel loro studio un miglioramento clinico dei sintomi e il ritorno alla prestazione atletica di cavalli osteoartritici trattati con plasma ricco di piastrine o lisato piastrinico (Garbin e Olver, 2020).

Le terapie a base di siero autologo condizionato (ACS) rappresentano un altro gruppo di emoderivati autologhi. La modalità di azione di questi prodotti è per molti aspetti non completamente definita, ma sembra che sia principalmente correlata all'aumento della concentrazione dell'interleuchina 1-Ra (IL-1Ra), antagonista dei recettori dell'interleuchina 1 (IL-1). I risultati ottenuti dopo trattamento dell'OA equina, hanno evidenziato un sensibile miglioramento dei segni clinici, attribuibile all'azione antinfiammatoria dell'ACS, esercitata a livello articolare (Camargo Garbin e Morris, 2021).

Le ricerche scientifiche degli ultimi anni hanno riconosciuto alle MSCs un grande potenziale terapeutico per il trattamento dell'OA. Gli importanti effetti immunomodulatori e antinfiammatori esercitati da queste cellule, così come le loro proprietà rigenerative, sembra possano essere responsabili di un miglioramento clinico dei cavalli trattati (Jammes et al., 2023). Ferris e colleghi riportano una riduzione del dolore e un rallentamento della progressione dell'osteoartrite dopo applicazioni intra-articolari di MSCs, dimostrando tra l'altro un ritorno degli stessi cavalli all'attività sportiva e un miglioramento delle loro prestazioni atletiche (Ferris et al., 2014). Un'ulteriore evidenza scientifica a sostegno dell'efficacia terapeutica delle MSCs viene descritta da Broeckx e collaboratori, i quali allo stesso modo riportano un rilevante miglioramento clinico dei cavalli trattati. Nello specifico viene descritto dagli stessi autori una riduzione dell'effusione articolare, così come del grado di zoppia e della risposta al test di flessione (Broeckx et al., 2019).

Diversi lavori scientifici hanno suggerito come gli effetti benefici delle MSCs per il trattamento dell'OA siano però prevalentemente mediati dal loro secretoma (Zhang et al., 2016; Toh et al., 2017). Tofiño-Vian e collaboratori hanno dimostrato l'incapacità dei condrociti attivati di rilasciare mediatori dell'infiammazione (TNF- α , IL-1, IL-6, NO) in presenza di MSCs-CM o MSCs-EVs. Lo stesso studio riporta inoltre un'aumentata produzione di IL-10 immunosoppressiva, indicando importanti effetti antinfiammatori e condroprotettivi correlati a questo prodotto biologico (Tofiño-Vian et al., 2018). L'aumentata efficacia terapeutica esercitata dal secretoma, associata ad un miglioramento del prodotto in termini di sicurezza, rende l'utilizzo del MSCs-CM ancora più promettente rispetto all'applicazione diretta cellulare. Affinchè questo prodotto potesse essere facilmente impiegabile nella pratica veterinaria equina sono stati combinati i processi di ultrafiltrazione e liofilizzazione, ottenendo il liosecretoma (Bari et al., 2018). L'applicazione intra-articolare di liosecretoma allogeneo, rappresenta ad oggi una promettente terapia rigenerativa per il trattamento dell'osteoartrite nel cavallo.

2. OBIETTIVI DELLA TESI

L'osteoartrite (OA), patologia articolare caratterizzata da degenerazione e perdita cartilaginea, rappresenta una delle cause primarie di zoppia nel cavallo anziano o sottoposto ad un'intensa attività agonistica. Essendo la diagnosi di OA molto frequente nella pratica veterinaria equina e risultando le attuali opzioni terapeutiche solamente di natura palliativa, sembra che l'applicazione intra-articolare di MSCs e prodotti derivati possa dare risultati promettenti nel trattamento dell'OA.

Gli effetti biologici correlati alle MSCs sono principalmente dovuti alla loro attività paracrina, ovvero alla secrezione di molecole bioattive che, nel complesso, prendono il nome di secretoma. Un numero crescente di studi si sta concentrando su questo prodotto "cell-free" di derivazione mesenchimale, tra cui il lavoro pubblicato da Mocchi e collaboratori, che fornisce la validazione del processo di produzione e liofilizzazione di secretoma derivante da MSCs da tessuto adiposo di cavallo, e identifica i parametri critici per il controllo della qualità e il rilascio dei lotti, al fine di fornire un prodotto finale, chiamato liosecretoma, che sia sicuro, efficace e facilmente applicabile in ambito clinico (Mocchi et al., 2021 a).

L'elaborato appena citato fornisce una caratterizzazione quantitativa e qualitativa del prodotto, ne valuta gli effetti biologici *in vitro* e risulta quindi essere propedeutico alle prime valutazioni *in vivo*, relative alla sicurezza e all'efficacia del prodotto biologico, per il trattamento delle patologie muscolo-scheletriche del cavallo.

Per quanto riguarda il cane è stato recentemente proposto il primo protocollo *in vivo*, atto alla valutazione preliminare del principio di sicurezza, dopo iniezione intra-articolare di liosecretoma derivante da MSCs allogeniche, per il trattamento dell'osteoartrite (Mocchi et al., 2021 b). I risultati ottenuti da questo studio riportano l'assenza di reazioni avverse riconducibili all'applicazione intra-articolare di liosecretoma allogenico, aprendo le porte ad ulteriori studi riguardanti l'efficacia del prodotto.

L'obiettivo primario di questo elaborato sarà quello di riproporre in parte gli studi effettuati nel cane e quindi di testare preliminarmente *in vivo* la sicurezza di questo prodotto anche nel cavallo. A tale scopo sono stati arruolati quattro cavalli adulti, affetti da patologia osteoartritica, i quali sono stati sottoposti ad applicazione intra-articolare di liosecretoma derivante da MSCs allogeniche. Al fine di testare la sicurezza del prodotto, ogni soggetto arruolato nello studio clinico, è stato sottoposto a valutazioni cliniche pre e post trattamento con liosecretoma.

Questo studio si riserva quindi di valutare come unico parametro la sicurezza relativa all'applicazione intra-articolare di liosecretoma derivante da MSCs allogeniche nel cavallo. Si specifica inoltre che si tratta di uno studio preliminare, condotto su un numero limitato di soggetti, fondamentale per procedere in futuro con un trial clinico che coinvolga un numero più elevato di animali e che permetta di determinare la concentrazione ottimale di liosecretoma da utilizzare.

3. MATERIALI E METODI

Lo studio clinico in oggetto prevede l'arruolamento di 4 cavalli adulti di proprietà, affetti da osteoartrite metacarpo-falangea, trattati con due iniezioni intra-articolari di liosecretoma a distanza di 40 giorni. Al fine dell'arruolamento ogni animale è stato sottoposto ad un esame obiettivo generale seguito da un esame ortopedico, completo di esami radiografici ed analisi del fluido sinoviale. Le stesse valutazioni cliniche sono state effettuate dopo il trattamento con liosecretoma, con lo scopo di valutare preliminarmente la sicurezza del prodotto.

Il protocollo terapeutico è stato sottoposto ad approvazione da parte del Ministero della Salute (Prot. n. 0000778 del 15/01/2020 7.1.2.0.0.0/17/2019-AGD 809) e dal comitato etico dell'Istituto Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna (IZSLER, n. 1/2019, 21 marzo 2019).

3.1 Arruolamento e criteri d'inclusione

Nel presente studio clinico sono stati arruolati quattro cavalli adulti di proprietà, affetti da osteoartrite metacarpo-falangea.

Le specifiche relative ad ogni animale arruolato sono riportate schematicamente nella **Tabella 1**.

Per ogni paziente coinvolto nello studio clinico è stato sottoscritto il consenso informato da parte del proprietario.

Caso	Razza	Sesso	Età (anni)	Articolazione trattata
1	Trottare italiano	Femmina	16	Nodello anteriore destro
2	Trottatore italiano	Femmina	21	Nodello anteriore destro
3	Trottaore italiano	Femmina	26	Nodello anteriore sinistro
4	Trottare italiano	Femmina	18	Nodello anteriore sinistro

Tabella 1. Sintesi dei casi inclusi in questo studio per quanto riguarda la razza, il sesso, l'età e l'articolazione trattata.

Gli animali coinvolti nel presente studio clinico sono stati selezionati nel rispetto dei seguenti criteri d'inclusione: cavallo adulto, presentante osteoartrite metcarpo-falangea, esente da ulteriori stati patologici, che potessero influenzare e potenzialmente falsare i risultati ottenuti dalle valutazioni cliniche effettuate pre e post trattamento con liosecretoma.

3.2 Esami pre clinici

Ogni animale è stato sottoposto ad un esame obiettivo generale preliminare al trattamento, al fine di valutarne le condizioni generali di salute ed escludere la presenza di ulteriori patologie, come previsto dal primo criterio di inclusione. I parametri soggetti a valutazione clinica comprendono la temperatura rettale, la frequenza cardiaca, la frequenza respiratoria, l'esame delle mucose esplorabili, il tempo di riempimento capillare, lo stato del sensorio e la presenza di appetito. Tutti i parametri considerati sono risultati nella norma per ogni cavallo coinvolto nello studio.

Il secondo criterio di inclusione prevede che i cavalli coinvolti siano affetti da osteoartrite. Per valutare la presenza di osteoartrite, ogni animale è stato sottoposto ad una visita ortopedica, completa di esami radiografici ed analisi del fluido sinoviale.

L'esame obiettivo particolare ortopedico prevede una prima valutazione statica del soggetto, seguita da una valutazione dinamica in andatura.

La valutazione statica consiste in un esame locale delle articolazioni metacarpo-falangee per verificare l'eventuale presenza di infiammazione articolare. Gli indicatori di infiammazione considerati in questo studio comprendono la presenza di: gonfiore associato ad effusione articolare, calore, dolore alla palpazione e ridotta mobilità articolare (range of motion - ROM).

La visita dinamica ortopedica valuta l'animale in movimento per verificare eventuali irregolarità di andatura, comunemente definite come zoppia, secondo i parametri indicati nella **Tabella 2**. Ogni animale è stato esaminato alle due andature del passo e del trotto, su terreno duro e terreno morbido, sia in dirittura che in circolo.

GRADO	DESCRIZIONE
0	zoppia non percettibile in nessuna circostanza
1	zoppia difficile da osservare e non costantemente apparente, in base alle circostanze
2	zoppia difficile da osservare al passo o al trotto in linea retta, ma costantemente apparente in alcune circostanze
3	zoppia costantemente osservabile al trotto in tutte le condizioni
4	zoppia evidente al passo
5	minimo sbilanciamento del peso in movimento e/o in stazione, oppure completa inabilità al movimento,

Tabella 2. Sistema di gradazione della zoppia nel cavallo secondo le linee guida AAEPs (American Association of Equine Practitioners).

Al fine di evidenziare l'eventuale presenza di dolorabilità articolare subclinica o escludere ulteriori cause di zoppia già precedentemente conclamata, sono stati condotti i test di flessione sui quattro arti su terreno duro. Le principali valutazioni precliniche di ciascun paziente arruolato sono riassunte nella **Tabella 3**.

Caso	Articolazione interessata	Dolore alla flessione passiva	Grado di zoppia			Test di flessione
			In linea su terreno duro	In circolo su terreno duro	In circolo su terreno morbido	
1	nodello anteriore destro	moderato	2/5	2/5	2/5	positivo
2	nodello anteriore destro	severo	2/5	1/5	2/5	positivo
3	nodello anteriore sinistro	moderato	2/5	2/5	2/5	positivo
4	nodello anteriore sinistro	severo	2/5	2/5	2/5	positivo

Tabella 3. Tabella riportante i principali dati ottenuti durante l'esame ortopedico pre clinico.

A seguito dell'esame ortopedico statico e dinamico sono state effettuate immagini radiografiche delle articolazioni interessate come conferma diagnostica.

Come ultima procedura precedente al trattamento è stata eseguita un'artrocentesi per il campionamento di fluido sinoviale, da sottoporre ad esame chimico-fisico e microscopico con conta cellulare per escludere la presenza di un'artrosinovite di natura infettiva (**Tabella 4**).

Caso	Colore	Trasparenza	Aspetto	Proteine totali	Eritrociti	Leucociti
1	giallo paglierino	presente	limipido	1,10 g/dl	1000 mcL	123 mcL
2	giallo paglierino	presente	limipido	0,50 g/dl	0,005 mcL	125 mcL
3	giallo paglierino	presente	limipido	0,70 g/dl	0,005 mcL	297 mcL
4	giallo arancio	scarsa	viscoso	1,00 g/dl	29.000 mcL	142 mcL

Tabella 4. Risultati ottenuti dall'esame del versamento sinoviale di ogni cavallo arruolato nello studio clinico.

Al tempo zero tutti i parametri considerati sono risultati nella norma rispetto ai valori di riferimento, ad eccezione del valore elevato di eritrociti di due animali, attribuibile a contaminazione iatrogena dovuta alla centesi articolare (**Tabella 5**).

	Trasparenza	Aspetto	Proteine totali	Eritrociti	Leucociti
Valori di riferimento	presente	limipido	< 2,5 g/dl	< 1 mcL	2000 mcL

Tabella 5. Valori di riferimento dei parametri considerati in corso di esame del versamento sinoviale (da Cornell University College of Veterinary Medicine).

3.3 Trattamento

I lotti di liosecretoma di cavallo sono stati preparati in collaborazione con il Reparto substrati cellulari dell'Istituto Zooprofilattico della Lombardia ed Emilia-Romagna (IZSLER), sede di Brescia. La liofilizzazione e la determinazione delle caratteristiche chimico-fisiche del prodotto sono state fatte dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Marina Torre (Dipartimento di farmacologia, Università di Pavia). Il liosecretoma è stato caratterizzato in termini di proteine totali e contenuto lipidico. Inoltre, presso la sede di Brescia dell'IZSLER, è stato eseguito il controllo qualità per prodotti farmacologici iniettabili da parte del gruppo della Dott.ssa Silvia Dotti, tramite test di sterilità e controllo microbiologico (Mycoplasma e endotossine batteriche), in accordo con la Farmacopea Europea (EuPh 2.6.27).

Previa sedazione è stata eseguita la tricotomia della regione del nodello e la disinfezione chirurgica della parte secondo protocollo standard (passaggi alternati di clorexidina saponosa e clorexidina alcolica al 2%). A seguire è stata effettuata la centesi sterile dell'articolazione metacarpo-falangea e l'infiltrazione articolare di prodotto stabilito e risospeso. Nel dettaglio è stato introdotto nello spazio articolare un ago di calibro 18 gauge, è stato aspirato il fluido sinoviale con una siringa da 10 ml ed è stato infine iniettato con lo stesso ago mantenuto in sede e una siringa da 5 ml il prodotto corrispondente a liosecretoma risospeso in 2,5 ml di acido ialuronico (2% 100mg/5ml ad uso veterinario) e in 1 ml di ringer lattato.

Per il trattamento sono state preparate tre crescenti concentrazioni di liosecretoma da applicare nelle articolazioni interessate di tre differenti cavalli. Per ogni concentrazione stabilita il prodotto è stato risospeso in 2,5 ml di acido ialuronico e 1 ml di ringer lattato. Il quarto cavallo compreso nello studio clinico ha rappresentato il soggetto controllo e per questo motivo gli è stato riservato un trattamento convenzionale a base di acido ialuronico.

Di seguito vengono riportate schematicamente le specifiche relative al trattamento effettuato nei quattro cavalli arruolati nello studio clinico (**Tabella 6**).

Caso	Articolazione Metacarpo-falangea trattata	Trattamento a base di:		Concentrazione del liosecretoma
		Acido ialuronico	Liosecretoma	
Caso 1	anteriore destra		x	800.000 cellule equivalenti
Caso 2	anteriore destra		X	500.000 cellule equivalenti
Caso 3	anteriore sinistra	x		-
Caso 4	anteriore sinistra		X	1.200.000 cellule equivalenti

Tabella 6. Sintesi delle procedure d'infiltrazione effettuate su ogni cavallo. Definizione dell'articolazione trattata, del prodotto iniettato ed eventualmente della concentrazione di liosecretoma utilizzata.

Al termine della procedura è stata applicata una fasciatura protettiva e compressiva e il cavallo è stato riaccompagnato nel suo box. I cavalli trattati sono stati mantenuti a riposo in box per i due giorni successivi, a seguito dei quali hanno ripreso la loro normale attività. L'uso di qualsiasi farmaco antinfiammatorio o antidolorifico è stato evitato per l'intera durata dello studio clinico salvo in circostanze eccezionali e compatibilmente con lo stato clinico del paziente.

Il trattamento è stato nuovamente ripetuto in ogni animale con le stesse modalità a distanza di 40 giorni dalla prima procedura.

3.4 Follow-up

Ogni animale trattato è stato sottoposto a un protocollo di follow-up (**Figura 6**), che permettesse di valutare come unico parametro la sicurezza relativa all'applicazione intra-articolare di liosecretoma allogenico. Nel dettaglio, a distanza di 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 e 72 ore da ciascuna infiltrazione di infiltrazione, è stato effettuato un esame obiettivo generale e una valutazione locale dell'articolazione trattata. Al settimo giorno post trattamento sono stati ripetuti gli stessi esami post clinici ed è stata inoltre effettuata una valutazione dinamica dell'andatura. L'esame obiettivo particolare ortopedico non viene ripetuto al fine di valutare un'eventuale miglioramento della zoppia, ma con lo scopo di verificare che non ci sia stato un peggioramento dell'andatura correlato all'applicazione di liosecretoma intra-articolare. I parametri considerati in questa fase sono stati analoghi a quelli precedentemente elencati in corso di esami pre clinici.

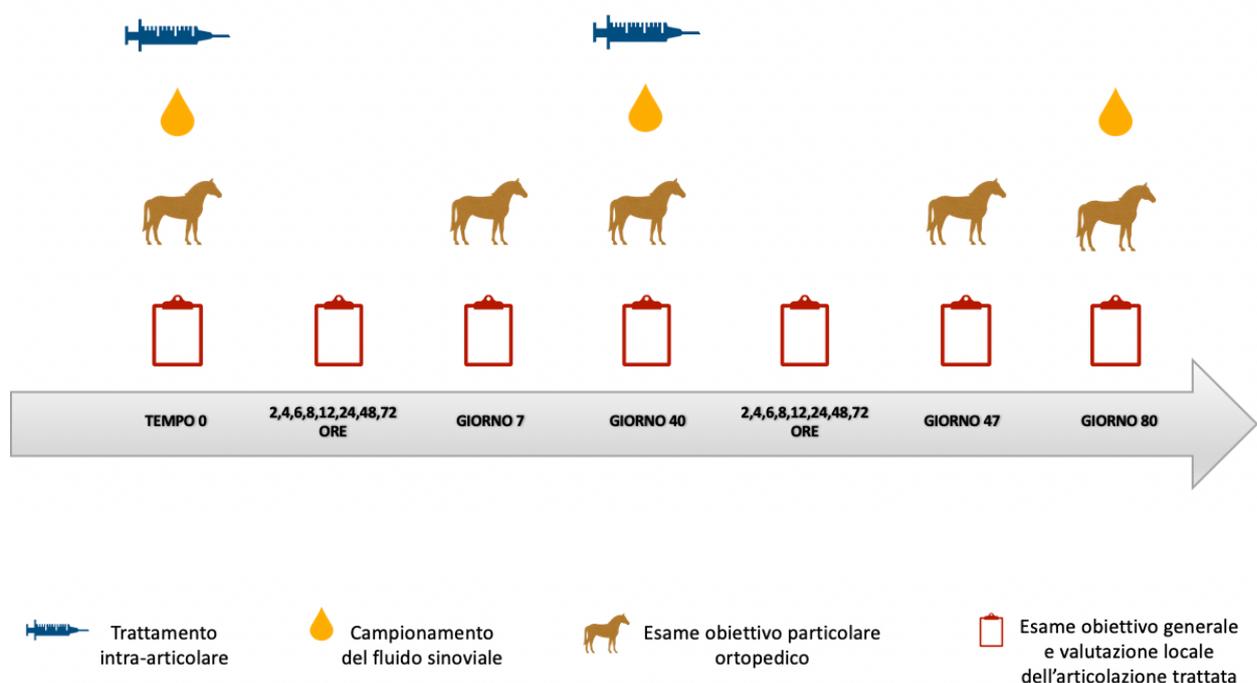


Figura 6. Visione schematica del protocollo di Follow-up.

4. RISULTATI

I risultati ottenuti dall'esame obiettivo generale effettuato sui quattro cavalli trattati, non ha evidenziato alcuna anomalia dei parametri considerati. Per quanto riguarda invece la valutazione locale dell'articolazione trattata, si è evidenziata in ogni animale una lieve reazione infiammatoria risoltasi sempre entro le 48 ore post trattamento. Nel dettaglio nessun animale ha mostrato dolore alla palpazione, mentre è stato rilevato un lieve o moderato gonfiore e dolore in tutti e quattro i cavalli infiltrati, indipendentemente dal trattamento applicato. Non è stato evidenziato un aumento della gravità dei parametri considerati in relazione alla concentrazione crescente di liosecretoma utilizzata, così come non è stata rilevata un'assenza d'infiammazione locale con l'applicazione di un trattamento tradizionale a base di acido ialuronico.

Di seguito vengono riportati dettagliatamente tutti i parametri valutati dopo la prima applicazione di liosecretoma intra-articolare per ogni cavallo arruolato nello studio clinico (Tabella 7-14).

Caso 1.

Tempo	Temperatura rettale	Frequenza cardiaca	Frequenza respiratoria	Esame delle mucose esplorabili	Tempo di riempimento capillare	Stato del sensorio	Appetito
0	37,5	48	12	rosee	< 2	vigile	si
2h	37,3	36	12	rosee	< 2	vigile	si
4h	37,1	32	12	rosee	< 2	vigile	si
6h	37,3	32	18	rosee	< 2	vigile	si
8h	37,1	32	12	rosee	< 2	vigile	si
12h	37,8	32	12	rosee	< 2	vigile	si
24h	37,5	32	16	rosee	< 2	vigile	si
48h	37,3	40	12	rosee	< 2	vigile	si
72h	37,8	36	18	rosee	< 2	vigile	si
7gg	37,5	36	16	rosee	< 2	vigile	si

Tabella 7. Esame obiettivo generale post clinico, Caso 1.

Tempo	Gonfiore	Calore	Dolore
0	lieve	assente	assente
2h	lieve	lieve	assente
4h	moderato	lieve	assente
6h	moderato	moderato	assente
8h	moderato	moderato	assente
12h	lieve	moderato	assente
24h	lieve	lieve	assente
48h	lieve	lieve	assente
72h	lieve	assente	assente
7gg	lieve	assente	assente

Tabella 8. Valutazione locale dell'articolazione trattata, Caso 1.

Caso 2.

Tempo	Temperatura rettale	Frequenza cardiaca	Frequenza respiratoria	Esame delle mucose esplorabili	Tempo di riempimento capillare	Stato del sensorio	Appetito
0	37,6	32	12	rosee	< 2	vigile	si
2h	36,9	36	12	rosee	< 2	vigile	si
4h	37,1	32	12	rosee	< 2	vigile	si
6h	37,3	32	12	rosee	< 2	vigile	si
8h	37,1	32	18	rosee	< 2	vigile	si
12h	37,1	28	16	rosee	< 2	vigile	si
24h	36,9	28	12	rosee	< 2	vigile	si
48h	36,9	32	16	rosee	< 2	vigile	si
72h	37,5	32	16	rosee	< 2	vigile	si
7gg	37,2	32	12	rosee	< 2	vigile	si

Tabella 9. Esame obiettivo generale post clinico, Caso 2.

Tempo	Gonfiore	Calore	Dolore
0	assente	assente	assente
2h	assente	assente	assente
4h	assente	assente	assente
6h	lieve	lieve	assente
8h	lieve	lieve	assente
12h	lieve	lieve	assente
24h	assente	assente	assente
48h	assente	assente	assente
72h	assente	assente	assente
7gg	assente	assente	assente

Tabella 10. Valutazione locale dell'articolazione trattata, Caso 2.

Caso 3.

Tempo	Temperatura rettale	Frequenza cardiaca	Frequenza respiratoria	Esame delle mucose esplorabili	Tempo di riempimento capillare	Stato del sensorio	Appetito
0	36,9	40	16	rosee	< 2	vigile	si
2h	37,1	42	12	rosee	< 2	vigile	si
4h	36,8	40	12	rosee	< 2	vigile	si
6h	36,9	36	12	rosee	< 2	vigile	si
8h	37,1	40	16	rosee	< 2	vigile	si
12h	37,5	36	18	rosee	< 2	vigile	si
24h	36,9	32	12	rosee	< 2	vigile	si
48h	36,9	32	16	rosee	< 2	vigile	si
72h	37,5	40	16	rosee	< 2	vigile	si
7gg	37,1	40	12	rosee	< 2	vigile	si

Tabella 11. Esame obiettivo generale post clinico, Caso 3

Tempo	Gonfiore	Calore	Dolore
0	assente	assente	assente
2h	assente	assente	assente
4h	assente	assente	assente
6h	lieve	lieve	assente
8h	lieve	lieve	assente
12h	lieve	lieve	assente
24h	lieve	lieve	assente
48h	assente	assente	assente
72h	assente	assente	assente
7gg	assente	assente	assente

Tabella 12. Valutazione locale dell'articolazione trattata, Caso 3.

Caso 4.

Tempo	Temperatura rettale	Frequenza cardiaca	Frequenza respiratoria	Esame delle mucose esplorabili	Tempo di riempimento capillare	Stato del sensorio	Appetito
0	36,8	40	12	rosee	< 2	vigile	si
2h	37,2	42	12	rosee	< 2	vigile	si
4h	36,9	40	16	rosee	< 2	vigile	si
6h	36,9	32	12	rosee	< 2	vigile	si
8h	37,2	32	16	rosee	< 2	vigile	si
12h	37,2	36	12	rosee	< 2	vigile	si
24h	36,9	40	12	rosee	< 2	vigile	si
48h	36,9	32	12	rosee	< 2	vigile	si
72h	37,5	40	16	rosee	< 2	vigile	si
7gg	37,2	40	12	rosee	< 2	vigile	si

Tabella 13. Esame obiettivo generale post clinico, Caso 4.

Tempo	Gonfiore	Calore	Dolore
0	assente	assente	assente
2h	assente	assente	assente
4h	assente	assente	assente
6h	lieve	lieve	assente
8h	lieve	lieve	assente
12h	lieve	lieve	assente
24h	lieve	lieve	assente
48h	assente	assente	assente
72h	assente	assente	assente
7gg	assente	assente	assente

Tabella 14. Valutazione locale dell'articolazione trattata, Caso 4.

I risultati ottenuti dopo il secondo trattamento non hanno evidenziato differenze significative dei parametri valutati, i quali sono tutti analogamente rimasti entro i range fisiologici.

5. DISCUSSIONE

L'osteoartrite rappresenta una delle patologie più comuni diagnosticata nella pratica veterinaria equina. Risultando le attuali opzioni terapeutiche soltanto di natura palliativa, emerge la necessità all'interno della comunità scientifica di trovare un trattamento alternativo. Le funzioni biologiche associate alle MSCs rendono tali cellule utilizzabili al fine di prevenire l'avanzamento del danno cartilagineo e di promuovere la rigenerazione del tessuto danneggiato (Zayed et al., 2018). Ancora più promettente in ambito clinico, potrebbe essere l'utilizzo del secretoma di origine MSCs, avendo questo prodotto acellulare un effetto terapeutico similare a quello osservato dopo applicazione diretta cellulare e dimostrando un miglioramento del prodotto biologico in termini di sicurezza ed efficacia (Lou et al., 2017). La combinazione dei processi di ultrafiltrazione e liofilizzazione hanno recentemente permesso di ipotizzarne l'eventuale produzione su larga scala, ottenendo il liosecretoma, formulazione più facilmente gestibile nell'ambito della pratica clinica (Mocchi et al., 2021 a). L'applicazione intra-articolare di liosecretoma allogenico, potrebbe rappresentare ad oggi una promettente terapia rigenerativa per il trattamento dell'osteoartrite nel cavallo. Questo studio ha l'obiettivo di valutarne preliminarmente *in vivo* la sicurezza, attraverso l'analisi dei risultati precedentemente riportati. Nel rispetto di questo obiettivo le valutazioni cliniche effettuate in corso di follow-up hanno previsto unicamente un esame obiettivo generale dell'animale e una valutazione locale dell'articolazione trattata. Non è quindi stata effettuata alcuna valutazione relativamente all'efficacia del prodotto.

All'esame obiettivo generale, tutti gli animali trattati hanno evidenziato l'assenza di una reazione sistemica, avversa all'applicazione intra-articolare di liosecretoma. Relativamente alla valutazione locale dell'articolazione metacarpo-falangea, è stata invece riscontrata una lieve infiammazione in tutti i cavalli infiltrati, indipendentemente dal trattamento applicato o dalla concentrazione di liosecretoma utilizzata. Un processo infiammatorio locale a seguito di un'infiltrazione articolare, è però chiaramente riportato anche in corso di trattamento convenzionale a base di acido ialuronico. Johnston e collaboratori hanno pubblicato uno studio relativamente alla valutazione della risposta infiammatoria indotta dall'infiltrazione di acido ialuronico a livello di articolazioni sane di cavallo. I risultati ottenuti da questo studio, dimostrano l'instaurarsi di un'infiammazione, da lieve a moderata, a seguito dell'applicazione intra-articolare di acido ialuronico. Lo stesso articolo riporta l'assenza di lavori pubblicati sulla gravità o

l'incidenza delle risposte infiammatorie correlate all'infiltrazione di acido ialuronico nelle articolazioni equine, ma evidenzia anche come questa sia una conseguenza comunemente conosciuta dai veterinari e come, tra l'altro, gli stessi effetti avversi vengano inclusi da molti produttori nelle avvertenze del prodotto (Johnston et al., 2019). Analoghe evidenze scientifiche sono state riportate da Niemela e collaboratori dopo l'uso di un singolo trattamento con acido ialuronico in cavalli clinicamente zoppi. Il medesimo studio riporta inoltre l'assenza di differenze significative tra il gruppo di animali trattati con acido ialuronico e il gruppo di controllo trattato con soluzione salina (Niemela et al., 2018). Ancora è stato descritto come addirittura la sola artrocentesi possa indurre un aumento delle proteine totali e della conta cellulare del fluido sinoviale, parametri chiaramente indicativi di un processo infiammatorio locale articolare (Francoz et al., 2007).

Le evidenze scientifiche appena citate supportano la possibilità che la lieve reazione infiammatoria evidenziata in corso di follow-up nel presente studio sia correlata alla procedura d'infiltrazione e di artrocentesi, piuttosto che all'applicazione specifica di liosecretoma. A sostegno di questa tesi, è rimarcabile come effettivamente non sia stato registrato un aumento della gravità dei parametri considerati in corso di valutazione locale dell'articolazione, in relazione all'aumento della concentrazione di liosecretoma utilizzata. Tutti i cavalli hanno infatti mostrato una transitoria e poco ingravescente reazione infiammatoria locale, risoltasi entro le 24-48 ore. L'unico soggetto ad aver mostrato alcuni segni moderati e non lievi di infiammazione, non è infatti stato trattato con la concentrazione massima di liosecretoma utilizzata; inoltre, al tempo zero, lo stesso animale evidenziava segni preesistenti di lieve infiammazione articolare.

L'assenza di importanti anomalie dei parametri considerati in corso di follow-up, rappresenta quindi una prima dimostrazione della sicurezza relativa all'applicazione intra-articolare di liosecretoma nel cavallo, nonostante questi risultati si basino su un campione molto ristretto di animali trattati. A questo proposito, bisogna considerare che il presente studio ha come unico obiettivo quello di effettuare una valutazione di carattere preliminare e unicamente riferibile alla sicurezza del prodotto biologico, al fine di stabilire dei presupposti necessari al prosieguo degli studi clinici. Saranno quindi necessari ulteriori studi clinici con una casistica più importante per poter effettuare una valutazione più critica dei parametri considerati e accertare l'effettiva sicurezza del prodotto, oltre a stabilirne la concentrazione ottimale da utilizzare. Una volta

terminati gli studi per la valutazione della sicurezza, si procederà a verificare l'efficacia del liosecretoma come terapia rigenerativa per il trattamento dell'osteoartrite nel cavallo.

6. CONCLUSIONE

Il liosecretoma di origine MSCs, è stato recentemente proposto come valido approccio per il trattamento dell'osteoartrite nel cavallo. Il presente studio dimostra la fattibilità di due somministrazioni intra-articolari di liosecretoma allogenico, evidenziando l'assenza di rilevanti reazioni avverse. Il numero limitato di soggetti trattati non permette tuttavia di fornire una prova diretta della sicurezza del prodotto biologico dopo applicazione intra-articolare nel cavallo. Pertanto questo elaborato rappresenta il presupposto per procedere con ulteriori studi clinici, relativi alla sicurezza e all'efficacia del liosecretoma, che prevedano l'arruolamento di un numero adeguato di casi.

7. BIBLIOGRAFIA

Adamo A, Brandi J, Caligola S, Delfino P, Bazzoni R, Carusone R, Cecconi D, Giugno R, Manfredi M, Robotti E, Marengo E, Bassi G, Takam Kamga P, Dal Collo G, Gatti A, Mercuri A, Arigoni M, Olivero M, Calogero RA, Krampera M. Extracellular Vesicles Mediate Mesenchymal Stromal Cell-Dependent Regulation of B Cell PI3K-AKT Signaling Pathway and Actin Cytoskeleton. *Front Immunol.* 2019 Mar 12;10:446. doi: 10.3389/fimmu.2019.00446. PMID: 30915084; PMCID: PMC6423067.

Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005 Feb 15;105(4):1815-22. doi: 10.1182/blood-2004-04-1559. Epub 2004 Oct 19. PMID: 15494428.

Anderson DD, Chubinskaya S, Guilak F, et al. Posttraumatic osteoarthritis: improving understanding and opportunities for early intervention. *J Orthop Res.* 2011;29:802–809.

Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *Stem Cells.* 2019 Jul;37(7):855-864. doi: 10.1002/stem.3016. Epub 2019 Apr 30. PMID: 30977255; PMCID: PMC6658105.

Ankrum J, Karp JM. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. *Trends Mol Med.* 2010 May;16(5):203-9. doi: 10.1016/j.molmed.2010.02.005. Epub 2010 Mar 23. PMID: 20335067; PMCID: PMC2881950.

Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, Musilkova J, Pajorova J, Slepicka P, Kasalkova NS, Svorcik V, Kolska Z, Motarjemi H, Molitor M. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review. *Biotechnol Adv.* 2018 Jul-Aug;36(4):1111-1126. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.03.011. Epub 2018 Mar 18. PMID: 29563048.

Baccarin RYA, Seidel SRT, Michelacci YM, Tokawa PKA, Oliveira TM. Osteoarthritis: a common disease that should be avoided in the athletic horse's life. *Anim Front.* 2022 Jun 14;12(3):25-36. doi: 10.1093/af/vfac026. PMID: 35711506; PMCID: PMC9197312.

Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 2004 Jul-Sep;8(3):301-16. doi: 10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.x. PMID: 15491506; PMCID: PMC6740223.

Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, Miller L, Guetta E, Zipori D, Keddes LH, Kloner RA, Leor J. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation.* 2003 Aug 19;108(7):863-8. doi: 10.1161/01.CIR.0000084828.50310.6A. Epub 2003 Aug 4. PMID: 12900340.

Barrett, M. F., K. T. Selberg, S. A. Johnson, J. Hersman, and D. D. Frisbie. 2018. High field magnetic resonance imaging contributes to diagnosis of equine distal tarsus and proximal metatarsus lesions: 103 horses. *Vet. Radiol. Ultrasound* 59:587–596. doi:10.1111/vru.12659.

Bari E, Perteghella S, Di Silvestre D, Sorlini M, Catenacci L, Sorrenti M, Marrubini G, Rossi R, Tripodo G, Mauri P, Marazzi M, Torre ML. Pilot Production of Mesenchymal Stem/Stromal Freeze-Dried Secretome for Cell-Free Regenerative Nanomedicine: A Validated GMP-Compliant Process. *Cells*. 2018 Oct 30;7(11):190. doi: 10.3390/cells7110190. PMID: 30380806; PMCID: PMC6262564.

Basu J, Ludlow JW. Exosomes for repair, regeneration and rejuvenation. *Expert Opin Biol Ther*. 2016;16(4):489-506. doi: 10.1517/14712598.2016.1131976. Epub 2016 Jan 28. PMID: 26817494.

Baxter, G.M. (Ed.). 2020. Adams and Stashak's lameness in horses. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons.

Bennett JH, Joyner CJ, Triffitt JT, Owen ME. Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J Cell Sci*. 1991 May;99 (Pt 1):131-9. doi: 10.1242/jcs.99.1.131. PMID: 1757497.

Bentzinger CF, Wang YX, von Maltzahn J, Rudnicki MA. The emerging biology of muscle stem cells: implications for cell-based therapies. *Bioessays*. 2013 Mar;35(3):231-41. doi: 10.1002/bies.201200063. Epub 2012 Aug 6. PMID: 22886714; PMCID: PMC3594813.

Beresford JN. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop* 1989; 240:270-280.

Bermudez MA, Sendon-Lago J, Seoane S, Eiro N, Gonzalez F, Saa J, Vizoso F, Perez-Fernandez R. Anti-inflammatory effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells in uveitis. *Exp Eye Res*. 2016 Aug;149:84-92. doi: 10.1016/j.exer.2016.06.022. Epub 2016 Jul 2. PMID: 27381329.

Black R, Grodzinsky AJ. Dexamethasone: chondroprotective corticosteroid or catabolic killer? *Eur Cell Mater*. 2019 Nov 22;38:246-263. doi: 10.22203/eCM.v038a17. PMID: 31755076; PMCID: PMC7211090.

Bobis-Wozowicz S, Miekus K, Wybieralska E, Jarocho D, Zawisz A, Madeja Z, Majka M. Genetically modified adipose tissue-derived mesenchymal stem cells overexpressing CXCR4 display increased motility, invasiveness, and homing to bone marrow of NOD/SCID mice. *Exp Hematol*. 2011 Jun;39(6):686-696.e4. doi: 10.1016/j.exphem.2011.03.004. Epub 2011 Mar 21. PMID: 21426925.

Boltze J, Arnold A, Walczak P, Jolkkonen J, Cui L, Wagner DC. The Dark Side of the Force - Constraints and Complications of Cell Therapies for Stroke. *Front Neurol*. 2015 Jul 20;6:155. doi: 10.3389/fneur.2015.00155. PMID: 26257702; PMCID: PMC4507146.

Brandão JS, Alvarenga ML, Pfeifer JPH, Dos Santos VH, Fonseca-Alves CE, Rodrigues M, Laufer-Amorim R, Castillo JAL, Alves ALG. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in healthy equine superficial digital flexor tendon: A study of the local inflammatory response. *Res Vet Sci*. 2018 Jun;118:423-430. doi: 10.1016/j.rvsc.2018.03.012. Epub 2018 Mar 21. PMID: 29715649.

Braza F, Dirou S, Forest V, Sauzeau V, Hassoun D, Chesné J, Cheminant-Muller MA, Sagan C, Magnan A, Lemarchand P. Mesenchymal Stem Cells Induce Suppressive Macrophages Through Phagocytosis in a Mouse Model of Asthma. *Stem Cells*. 2016 Jul;34(7):1836-45. doi: 10.1002/stem.2344. Epub 2016 Mar 14. PMID: 26891455.

Broeckx SY, Seys B, Suls M, Vandenberghe A, Mariën T, Adriaensen E, Declercq J, Van Hecke L, Braun G, Hellmann K, Spaas JH. Equine Allogeneic Chondrogenic Induced Mesenchymal Stem Cells Are an Effective Treatment for Degenerative Joint Disease in Horses. *Stem Cells Dev*. 2019 Mar 15;28(6):410-422. doi: 10.1089/scd.2018.0061. Epub 2019 Feb 13. PMID: 30623737; PMCID: PMC6441287.

Broeckx SY, Suls M, Beerts C, Vandenberghe A, Seys B, Wuertz-Kozak K, Duchateau L, Spaas JH. Allogenic mesenchymal stem cells as a treatment for equine degenerative joint disease: a pilot study. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2014;9(6):497-503. doi: 10.2174/1574888x09666140826110601. PMID: 25175766.

Bronckaers A, Hilkens P, Martens W, Gervois P, Ratajczak J, Struys T, Lambrichts I. Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis. *Pharmacol Ther*. 2014 Aug;143(2):181-96. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.02.013. Epub 2014 Mar 1. PMID: 24594234.

Brossi PM, Moreira JJ, Machado TSL, Baccarin RYA. Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: a comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. *BMC Vet Res*. (2015) 11:98. doi: 10.1186/s12917-015-0403-z

Camargo Garbin L, Morris MJ. A Comparative Review of Autologous Conditioned Serum and Autologous Protein Solution for Treatment of Osteoarthritis in Horses. *Front Vet Sci*. 2021 Feb 19;8:602978. doi: 10.3389/fvets.2021.602978. PMID: 33681323; PMCID: PMC7933025.

Camoglio. Le cellule staminali. Istologia di V.MONESI, sesta edizione, PICCIN. 2019

Cantinieux D, Quertainmont R, Blacher S, Rossi L, Wanet T, Noël A, Brook G, Schoenen J, Franzen R. Conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves recovery after spinal cord injury in rats: an original strategy to avoid cell transplantation. *PLoS One*. 2013 Aug 27;8(8):e69515. doi: 10.1371/journal.pone.0069515. PMID: 24013448; PMCID: PMC3754952.

Cantley CE, Firth EC, Delahunt JW, Pfeiffer DU, Thompson KG. Naturally occurring osteoarthritis in the metacarpophalangeal joints of wild horses. *Equine Vet J*. 1999 Jan;31(1):73-81. doi: 10.1111/j.2042-3306.1999.tb03794.x. PMID: 9952333.

Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*. 2009 Jan;217(2):318-24. doi: 10.1002/path.2469. PMID: 19023885; PMCID: PMC8793150.

Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006 Aug 1;98(5):1076-84. doi: 10.1002/jcb.20886. PMID: 16619257.

Caron JP. Osteoarthritis. In: Ross MW, Dyson SJ, eds. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. Philadelphia: Saunders; 2011:665–668.

Carrade DD, Owens SD, Galuppo LD, Vidal MA, Ferraro GL, Librach F, Buerchler S, Friedman MS, Walker NJ, Borjesson DL. Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses.

Cytotherapy. 2011 Apr;13(4):419-30. doi: 10.3109/14653249.2010.536213. Epub 2010 Nov 25. PMID: 21105841.

Carter NA, Vasconcellos R, Rosser EC, Tulone C, Muñoz-Suano A, Kamanaka M, Ehrenstein MR, Flavell RA, Mauri C. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J Immunol*. 2011 May 15;186(10):5569-79. doi: 10.4049/jimmunol.1100284. Epub 2011 Apr 4. PMID: 21464089.

Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, Fouillard L, Young RG, Frick J, Demarquay C, Cuvelier F, Mathieu E, Trompier F, Dudoignon N, Germain C, Mazurier C, Aigueperse J, Borneman J, Gorin NC, Gourmelon P, Thierry D. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med*. 2003 Dec;5(12):1028-38. doi: 10.1002/jgm.452. PMID: 14661178.

Chen D, Ji X, Harris MA, Feng JQ, Karsenty G, Celeste AJ, Rosen V, Mundy GR, Harris SE. Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. *J Cell Biol*. 1998 Jul 13;142(1):295-305. doi: 10.1083/jcb.142.1.295. PMID: 9660882; PMCID: PMC2133031.

Chen JM, Huang QY, Zhao YX, Chen WH, Lin S, Shi QY. The Latest Developments in Immunomodulation of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Intrauterine Adhesions, Both Allogeneic and Autologous. *Front Immunol*. 2021 Nov 15;12:785717. doi: 10.3389/fimmu.2021.785717. PMID: 34868069; PMCID: PMC8634714.

Chen ZZ, Van Bockstaele DR, Buysens N, Hendrics D, De Meester I, Vanhoof G, Scharpé SL, Peetermans ME, Berneman ZN. Stromal populations and fibrosis in human long-term bone marrow cultures. *Leukemia*. 1991 Sep;5(9):772-81. PMID: 1658497.

Clegg, Booth. Drugs used to treat osteoarthritis in the horse. 2000. <https://doi.org/10.1136/inpract.22.10.594>

Conti e Cattaneo. Il punto sulle staminali. *Le Scienze*. 2011

Damayanti RH, Rusdiana T, Wathoni N. Mesenchymal Stem Cell Secretome for Dermatology Application: A Review. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2021 Oct 5;14:1401-1412. doi: 10.2147/CCID.S331044. PMID: 34675575; PMCID: PMC8502696.

Daneshmandi L, Shah S, Jafari T, Bhattacharjee M, Momah D, Saveh-Shemshaki N, Lo KW, Laurencin CT. Emergence of the Stem Cell Secretome in Regenerative Engineering. *Trends Biotechnol*. 2020 Dec;38(12):1373-1384. doi: 10.1016/j.tibtech.2020.04.013. Epub 2020 Jul 1. PMID: 32622558; PMCID: PMC7666064.

Deng Y, Zhang Y, Ye L, Zhang T, Cheng J, Chen G, Zhang Q, Yang Y. Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells Instruct Monocytes Towards an IL10-producing Phenotype by Secreting IL6 and HGF. *Sci Rep*. 2016 Dec 5;6:37566. doi: 10.1038/srep37566. PMID: 27917866; PMCID: PMC5137158.

De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Alcaina Y. Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction. *Stem Cell Rev Rep*. 2010 Dec;6(4):633-49. doi: 10.1007/s12015-010-9170-1. PMID: 20669057.

De Witte SFH, Luk F, Sierra Parraga JM, Gargasha M, Merino A, Korevaar SS, Shankar AS, O'Flynn L, Elliman SJ, Roy D, Betjes MGH, Newsome PN, Baan CC, Hoogduijn MJ. Immunomodulation By Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells (MSC) Is Triggered Through Phagocytosis of MSC By Monocytic Cells. *Stem Cells*. 2018 Apr;36(4):602-615. doi: 10.1002/stem.2779. Epub 2018 Feb 1. PMID: 29341339.

Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*. 2003 Apr 15;101(8):2999-3001. doi: 10.1182/blood-2002-06-1830. Epub 2002 Dec 12. PMID: 12480709.

Dexter TM, Wright EG, Krizsa F, Lajtha LG. Regulation of haemopoietic stem cell proliferation in long term bone marrow cultures. *Biomedicine*. 1977 Dec;27(9-10):344-9. PMID: 606310.

Dominici M, Guarnieri V, Cafarelli L, et al. Mesenchymal stem cells. Biological features and therapeutic approach. *Trends Med* 2004; 4(4):341-348. 2004 Pharma Project Group srl.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. doi: 10.1080/14653240600855905. PMID: 16923606.

Driscoll J, Patel T. The mesenchymal stem cell secretome as an acellular regenerative therapy for liver disease. *J Gastroenterol*. 2019 Sep;54(9):763-773. doi: 10.1007/s00535-019-01599-1. Epub 2019 Jul 3. PMID: 31270691; PMCID: PMC6698261.

Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther*. 2011 Aug 11;2(4):34. doi: 10.1186/scrt75. PMID: 21861858; PMCID: PMC3219065.

Eiró N, Sendon-Lago J, Seoane S, Bermúdez MA, Lamelas ML, Garcia-Caballero T, Schneider J, Perez-Fernandez R, Vizoso FJ. Potential therapeutic effect of the secretome from human uterine cervical stem cells against both cancer and stromal cells compared with adipose tissue stem cells. *Oncotarget*. 2014 Nov 15;5(21):10692-708. doi: 10.18632/oncotarget.2530. PMID: 25296979; PMCID: PMC4279403.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981 Jul 9;292(5819):154-6. doi: 10.1038/292154a0. PMID: 7242681.

Fan Y, Herr F, Vernochet A, Mennesson B, Oberlin E, Durrbach A. Human Fetal Liver Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Impair Natural Killer Cell Function. *Stem Cells Dev*. 2019 Jan 1;28(1):44-55. doi: 10.1089/scd.2018.0015. PMID: 30328799.

Fan Y, Li Z, He Y. Exosomes in the Pathogenesis, Progression, and Treatment of Osteoarthritis. *Bioengineering (Basel)*. 2022 Feb 27;9(3):99. doi: 10.3390/bioengineering9030099. PMID: 35324788; PMCID: PMC8945849.

Feng D, Zhao WL, Ye YY, Bai XC, Liu RQ, Chang LF, Zhou Q, Sui SF. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic*. 2010 May;11(5):675-87. doi: 10.1111/j.1600-0854.2010.01041.x. PMID: 20136776.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998 Mar 6;279(5356):1528-30. doi: 10.1126/science.279.5356.1528. Erratum in: *Science* 1998 Aug 14;281(5379):923. PMID: 9488650.

Ferris DJ, Frisbie DD, Kisiday JD, McIlwraith CW, Hague BA, Major MD, Schneider RK, Zubrod CJ, Kawcak CE, Goodrich LR. Clinical outcome after intra-articular administration of bone marrow derived mesenchymal stem cells in 33 horses with stifle injury. *Vet Surg*. 2014 Mar;43(3):255-65. doi: 10.1111/j.1532-950X.2014.12100.x. Epub 2014 Jan 16. PMID: 24433318.

Francoz D, Desrochers A, Latouche JS. Effect of repeated arthrocentesis and single joint lavage on cytologic evaluation of synovial fluid in 5 young calves. *Can J Vet Res*. 2007 Apr;71(2):129-34. PMID: 17479776; PMCID: PMC1829182.

Franquesa M, Mensah FK, Huizinga R, Strini T, Boon L, Lombardo E, DelaRosa O, Laman JD, Grinyó JM, Weimar W, Betjes MG, Baan CC, Hoogduijn MJ. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells abrogate plasmablast formation and induce regulatory B cells independently of T helper cells. *Stem Cells*. 2015 Mar;33(3):880-91. doi: 10.1002/stem.1881. PMID: 25376628.

Frenette PS, Pinho S, Lucas D, Scheiermann C. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:285-316. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095919. Epub 2013 Jan 3. PMID: 23298209.

Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, Ruadkow IA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*. 1974;2(2):83-92. PMID: 4455512.

Friesbie, Johnson. *Medical Treatment of Joint Disease - chapter 80. Equine Surgery (Fifth Edition)*, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48420-6.00080-6>.

Frisbie DD, Kawcak CE, McIlwraith CW. 520 evaluation of autologous conditioned serum using an experimental model of equine osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. (2008) 16:S222–3. doi: 10.1016/S1063-4584(08)60559-2.

Galleu A, Riffo-Vasquez Y, Trento C, Lomas C, Dolcetti L, Cheung TS, von Bonin M, Barbieri L, Halai K, Ward S, Weng L, Chakraverty R, Lombardi G, Watt FM, Orchard K, Marks DI, Apperley J, Bornhauser M, Walczak H, Bennett C, Dazzi F. Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces in vivo recipient-mediated immunomodulation. *Sci Transl Med*. 2017 Nov 15;9(416):eaam7828. doi: 10.1126/scitranslmed.aam7828. PMID: 29141887.

Galmiche MC, Koteliansky VE, Brière J, Hervé P, Charbord P. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood*. 1993 Jul 1;82(1):66-76. PMID: 8324235.

Gao H, Priebe W, Glod J, Banerjee D. Activation of signal transducers and activators of transcription 3 and focal adhesion kinase by stromal cell-derived factor 1 is required for migration of human mesenchymal stem cells in response to tumor cell-conditioned medium. *Stem Cells*. 2009 Apr;27(4):857-65. doi: 10.1002/stem.23. PMID: 19350687.

Garbin LC, Olver CS. Platelet-Rich Products and Their Application to Osteoarthritis. *J Equine Vet Sci*. 2020 Mar;86:102820. doi: 10.1016/j.jevs.2019.102820. Epub 2019 Nov 16. PMID: 32067662.

Ge W, Jiang J, Arp J, Liu W, Garcia B, Wang H. Regulatory T-cell generation and kidney allograft tolerance induced by mesenchymal stem cells associated with indoleamine 2,3-dioxygenase expression. *Transplantation*. 2010 Dec 27;90(12):1312-20. doi: 10.1097/TP.0b013e3181fed001. PMID: 21042238.

Gieseke F, Böhringer J, Bussolari R, Dominici M, Handgretinger R, Müller I. Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. *Blood*. 2010 Nov 11;116(19):3770-9. doi: 10.1182/blood-2010-02-270777. Epub 2010 Jul 19. PMID: 20644118.

Gieseke F, Kruchen A, Tzaribachev N, Bentzien F, Dominici M, Müller I. Proinflammatory stimuli induce galectin-9 in human mesenchymal stromal cells to suppress T-cell proliferation. *Eur J Immunol*. 2013 Oct;43(10):2741-9. doi: 10.1002/eji.201343335. Epub 2013 Jul 23. PMID: 23817958.

Gimona M, Pachler K, Laner-Plamberger S, Schallmoser K, Rohde E. Manufacturing of Human Extracellular Vesicle-Based Therapeutics for Clinical Use. *Int J Mol Sci*. 2017 Jun 3;18(6):1190. doi: 10.3390/ijms18061190. PMID: 28587212; PMCID: PMC5486013.

Gnecchi. *Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 1416, DOI 10.1007/978-1-4939-3584-0_1, © Springer Science+Business Media New York 2016

Glassberg MK, Minkiewicz J, Toonkel RL, Simonet ES, Rubio GA, DiFede D, Shafazand S, Khan A, Pujol MV, LaRussa VF, Lancaster LH, Rosen GD, Fishman J, Mageto YN, Mendizabal A, Hare JM. Allogeneic Human Mesenchymal Stem Cells in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis via Intravenous Delivery (AETHER): A Phase I Safety Clinical Trial. *Chest*. 2017 May;151(5):971-981. doi: 10.1016/j.chest.2016.10.061. Epub 2016 Nov 24. PMID: 27890713; PMCID: PMC6026255.

Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2821-7. doi: 10.1182/blood-2004-09-3696. Epub 2004 Dec 9. PMID: 15591115.

Goldring MB, Otero M, Plumb DA, Dragomir C, Favero M, El Hachem K, Hashimoto K, Roach HI, Olivetto E, Borzi RM, Marcu KB. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *Eur Cell Mater*. 2011 Feb 24;21:202-20. doi: 10.22203/ecm.v021a16. PMID: 21351054; PMCID: PMC3937960.

Gonçalves FDC, Luk F, Sorevaar SS, Bouzid R, Paz AH, López-Iglesias C, Baan CC, Merino A, Hoogduijn MJ. Membrane particles generated from mesenchymal stromal cells modulate immune responses by selective targeting of pro-inflammatory monocytes. *Sci Rep*. 2017 Sep 21;7(1):12100. doi: 10.1038/s41598-017-12121-z. PMID: 28935974; PMCID: PMC5608915.

González-González A, García-Sánchez D, Dotta M, Rodríguez-Rey JC, Pérez-Campo FM. Mesenchymal stem cells secretome: The cornerstone of cell-free regenerative medicine. *World J Stem Cells*. 2020 Dec 26;12(12):1529-1552. doi: 10.4252/wjsc.v12.i12.1529. PMID: 33505599; PMCID: PMC7789121.

Grigoriadis AE, Heersche JN, Aubin JE. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol*. 1988 Jun;106(6):2139-51. doi: 10.1083/jcb.106.6.2139. PMID: 3384856; PMCID: PMC2115137.

Harrell CR, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells*. 2019 May 16;8(5):467. doi: 10.3390/cells8050467. PMID: 31100966; PMCID: PMC6562906.

He S, Nakada D, Morrison SJ. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2009;25:377-406. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113248. PMID: 19575646.

He X, Dong Z, Cao Y, Wang H, Liu S, Liao L, Jin Y, Yuan L, Li B. MSC-Derived Exosome Promotes M2 Polarization and Enhances Cutaneous Wound Healing. *Stem Cells Int*. 2019 Sep 9;2019:7132708. doi: 10.1155/2019/7132708. PMID: 31582986; PMCID: PMC6754952.

Hmadcha A, Martin-Montalvo A, Gauthier BR, Soria B, Capilla-Gonzalez V. Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells for Cancer Therapy. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020 Feb 5;8:43. doi: 10.3389/fbioe.2020.00043. PMID: 32117924; PMCID: PMC7013101.

Honzcarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells*. 2006 Apr;24(4):1030-41. doi: 10.1634/stemcells.2005-0319. Epub 2005 Oct 27. PMID: 16253981.

Howard RD, McIlwraith CW. Sodium hyaluronate in the treatment of equine joint disease. *Comp Cont Educ Pract Vet*. 1993;15:473-481.

Hyvärinen K, Holopainen M, Skirdenko V, Ruhanen H, Lehenkari P, Korhonen M, Käkelä R, Laitinen S, Kerkelä E. Mesenchymal Stromal Cells and Their Extracellular Vesicles Enhance the Anti-Inflammatory Phenotype of Regulatory Macrophages by Downregulating the Production of Interleukin (IL)-23 and IL-22. *Front Immunol*. 2018 Apr 12;9:771. doi: 10.3389/fimmu.2018.00771. PMID: 29706969; PMCID: PMC5906545.

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*. 1997 Feb;64(2):295-312. PMID: 9027589.

Keegan KG, Messer NT, Reed SK, et al. Effectiveness of administration of phenylbutazone alone or concurrent administration of phenylbutazone and flunixin meglumine to eliminate lameness in horses. *Am J Vet Res*. 2008;69:167-173.

Kidd, Fuller, Barr. Osteoarthritis in the horse. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.2001.tb00082.x>

Kim H, Lee MJ, Bae EH, Ryu JS, Kaur G, Kim HJ, Kim JY, Barreda H, Jung SY, Choi JM, Shigemoto-Kuroda T, Oh JY, Lee RH. Comprehensive Molecular Profiles of Functionally Effective MSC-Derived Extracellular Vesicles in Immunomodulation. *Mol Ther*. 2020 Jul 8;28(7):1628-1644. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.04.020. Epub 2020 Apr 23. PMID: 32380062; PMCID: PMC7335740.

Knowlton RG, Katsenstein PL, Moskowitz RW, et al. Genetic linkage of a polymorphism in the type II procollagen gene (COL2A1) to primary osteoarthritis associated with mild chondrodysplasia. *N Engl J Med*. 1990;322:526–530.

Ko JH, Lee HJ, Jeong HJ, Kim MK, Wee WR, Yoon SO, Choi H, Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal stem/stromal cells precondition lung monocytes/macrophages to produce tolerance against allo- and autoimmunity in the eye. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Jan 5;113(1):158-63. doi: 10.1073/pnas.1522905113. Epub 2015 Dec 22. PMID: 26699483; PMCID: PMC4711840.

Kolaparthi LK, Sanivarapu S, Moogla S, Kutcham RS. Adipose Tissue - Adequate, Accessible Regenerative Material. *Int J Stem Cells*. 2015 Nov;8(2):121-7. doi: 10.15283/ijsc.2015.8.2.121. PMID: 26634060; PMCID: PMC4651276.

Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*. 2013;85(1):3-10. doi: 10.1159/000345615. Epub 2012 Dec 13. PMID: 23257690. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006 Feb;24(2):386-98. doi: 10.1634/stemcells.2005-0008. Epub 2005 Aug 25. PMID: 16123384.

Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 14;96(19):10711-6. doi: 10.1073/pnas.96.19.10711. PMID: 10485891; PMCID: PMC17948.

Kornicka K, Geburek F, Röcken M, Marycz K. Stem Cells in Equine Veterinary Practice-Current Trends, Risks, and Perspectives. *J Clin Med*. 2019 May 14;8(5):675. doi: 10.3390/jcm8050675. PMID: 31091732; PMCID: PMC6572129.

Kraitchman DL, Tatsumi M, Gilson WD, Ishimori T, Kedziorek D, Walczak P, Segars WP, Chen HH, Fritzges D, Izbudak I, Young RG, Marcelino M, Pittenger MF, Solaiyappan M, Boston RC, Tsui BM, Wahl RL, Bulte JW. Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction. *Circulation*. 2005 Sep 6;112(10):1451-61. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.537480. Epub 2005 Aug 29. PMID: 16129797; PMCID: PMC1456731.

Kraus VB, McDaniel G, Huebner JL, Stabler TV, Pieper CF, Shipes SW, Petry NA, Low PS, Shen J, McNearney TA, Mitchell P. Direct in vivo evidence of activated macrophages in human osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016 Sep;24(9):1613-21. doi: 10.1016/j.joca.2016.04.010. Epub 2016 Apr 12. PMID: 27084348; PMCID: PMC4992586.

Kwon A, Kim Y, Kim M, Kim J, Choi H, Jekarl DW, Lee S, Kim JM, Shin JC, Park IY. Tissue-specific Differentiation Potency of Mesenchymal Stromal Cells from Perinatal Tissues. *Sci Rep.* 2016 Apr 5;6:23544. doi: 10.1038/srep23544. PMID: 27045658; PMCID: PMC4820697.

Lau TT, Wang DA. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1): homing factor for engineered regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther.* 2011 Feb;11(2):189-97. doi: 10.1517/14712598.2011.546338. PMID: 21219236.

Li H, Ghazanfari R, Zacharaki D, Lim HC, Scheduling S. Isolation and characterization of primary bone marrow mesenchymal stromal cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2016 Apr;1370(1):109-18. doi: 10.1111/nyas.13102. PMID: 27270495.

Li Q, Zhang A, Tao C, Li X, Jin P. The role of SDF-1-CXCR4/CXCR7 axis in biological behaviors of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Nov 22;441(3):675-80. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.071. Epub 2013 Oct 30. PMID: 24184476.

Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol.* 2012 Apr 25;12(5):383-96. doi: 10.1038/nri3209. PMID: 22531326.

Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringdén O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol.* 2003 Jan;57(1):11-20. doi: 10.1046/j.1365-3083.2003.01176.x. PMID: 12542793.

Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* 2004 May 1;363(9419):1439-41. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16104-7. PMID: 15121408.

Lee S, Kim S, Chung H, Moon JH, Kang SJ, Park CG. Mesenchymal stem cell-derived exosomes suppress proliferation of T cells by inducing cell cycle arrest through p27kip1/Cdk2 signaling. *Immunol Lett.* 2020 Sep;225:16-22. doi: 10.1016/j.imlet.2020.06.006. Epub 2020 Jun 15. PMID: 32554049.

Lee MJ, Kim J, Lee KI, Shin JM, Chae JI, Chung HM. Enhancement of wound healing by secretory factors of endothelial precursor cells derived from human embryonic stem cells. *Cytotherapy.* 2011 Feb;13(2):165-78. doi: 10.3109/14653249.2010.512632. PMID: 21235296.

Lennon DP, Haynesworth SE, Young RG, Dennis JE, Caplan AI. A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.* 1995 Jul;219(1):211-22. doi: 10.1006/excr.1995.1221. PMID: 7628536.

Li C, Zhao H, Cheng L, Wang B. Allogeneic vs. autologous mesenchymal stem/stromal cells in their medication practice. *Cell Biosci.* 2021 Nov 2;11(1):187. doi: 10.1186/s13578-021-00698-y. PMID: 34727974; PMCID: PMC8561357.

Liesz A, Dalpke A, Mracsko E, Antoine DJ, Roth S, Zhou W, Yang H, Na SY, Akhisaroglu M, Fleming T, Eigenbrod T, Nawroth PP, Tracey KJ, Veltkamp R. DAMP signaling is a key pathway inducing immune modulation after brain injury. *J Neurosci*. 2015 Jan 14;35(2):583-98. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2439-14.2015. Erratum in: *J Neurosci*. 2019 Jul 3;39(27):5419. PMID: 25589753; PMCID: PMC4293412.

Liu Y, Lin L, Zou R, Wen C, Wang Z, Lin F. MSC-derived exosomes promote proliferation and inhibit apoptosis of chondrocytes via lncRNA-KLF3-AS1/miR-206/GIT1 axis in osteoarthritis. *Cell Cycle*. 2018;17(21-22):2411-2422. doi: 10.1080/15384101.2018.1526603. Epub 2018 Nov 11. PMID: 30324848; PMCID: PMC6342066.

Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum*. 2012 Jun;64(6):1697-707. doi: 10.1002/art.34453. Epub 2012 Mar 5. PMID: 22392533; PMCID: PMC3366018.

Lombardi D. Biologia della Cellula Staminal: potenza e differenziazione. *G Clin Nefrol Dial [Internet]*. 24 gennaio 2018 [citato 20 marzo 2023];23(3):73-6. Available at: <https://journals.aboutscience.eu/index.php/gcnd/article/view/1481>

Lou G, Chen Z, Zheng M, Liu Y. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases. *Exp Mol Med*. 2017 Jun 16;49(6):e346. doi: 10.1038/emm.2017.63. PMID: 28620221; PMCID: PMC5519012.

L PK, Kandoi S, Misra R, S V, K R, Verma RS. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2019 Apr;46:1-9. doi: 10.1016/j.cytogfr.2019.04.002. Epub 2019 Apr 2. PMID: 30954374.

Luk F, Carreras-Planella L, Korevaar SS, de Witte SFH, Borràs FE, Betjes MGH, Baan CC, Hoogduijn MJ, Franquesa M. Inflammatory Conditions Dictate the Effect of Mesenchymal Stem or Stromal Cells on B Cell Function. *Front Immunol*. 2017 Aug 28;8:1042. doi: 10.3389/fimmu.2017.01042. PMID: 28894451; PMCID: PMC5581385.

Luk F, de Witte SF, Korevaar SS, Roemeling-van Rhijn M, Franquesa M, Strini T, van den Engel S, Gargasha M, Roy D, Dor FJ, Horwitz EM, de Bruin RW, Betjes MG, Baan CC, Hoogduijn MJ. Inactivated Mesenchymal Stem Cells Maintain Immunomodulatory Capacity. *Stem Cells Dev*. 2016 Sep 15;25(18):1342-54. doi: 10.1089/scd.2016.0068. Epub 2016 Aug 9. PMID: 27349989.

Luz-Crawford P, Djouad F, Toupet K, Bony C, Franquesa M, Hoogduijn MJ, Jorgensen C, Noël D. Mesenchymal Stem Cell-Derived Interleukin 1 Receptor Antagonist Promotes Macrophage Polarization and Inhibits B Cell Differentiation. *Stem Cells*. 2016 Feb;34(2):483-92. doi: 10.1002/stem.2254. Epub 2015 Dec 31. PMID: 26661518.

Maccario R, Podestà M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, Daudt L, Ibatici A, Piaggio G, Pozzi S, Frassoni F, Locatelli F. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*. 2005 Apr;90(4):516-25. PMID: 15820948.

Manandhar, S., Kothandan, V.K., Oh, J. et al. A pharmaceutical investigation into exosomes. *J. Pharm. Investig*. 48, 617–626 (2018). <https://doi.org/10.1007/s40005-018-0391-7>.

Marone M, De Ritis D, Bonanno G, Mozzetti S, Rutella S, Scambia G, Pierelli L. Cell cycle regulation in human hematopoietic stem cells: from isolation to activation. *Leuk Lymphoma*. 2002 Mar;43(3):493-501. doi: 10.1080/10428190290011967. PMID: 12002751.

Masferrer JL, Seibert K. Regulation of prostaglandin synthesis by glucocorticoids. *Receptor*. 1994 Spring;4(1):25-30. PMID: 8038703.

Marson A, Kretschmer K, Frampton GM, Jacobsen ES, Polansky JK, MacIsaac KD, Levine SS, Fraenkel E, von Boehmer H, Young RA. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T- cell stimulation. *Nature*. 2007 Feb 22;445(7130):931-5. doi: 10.1038/nature05478. Epub 2007 Jan 21. PMID: 17237765; PMCID: PMC3008159.

Mathiessen A, Conaghan PG. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications. *Arthritis Res Ther*. 2017 Feb 2;19(1):18. doi: 10.1186/s13075-017-1229-9. PMID: 28148295; PMCID: PMC5289060.

Mayet A, Zablotzki Y, Roth SP, Brehm W, Troillet A. Systematic review and meta-analysis of positive long-term effects after intra-articular administration of orthobiologic therapeutics in horses with naturally occurring osteoarthritis. *Front Vet Sci*. 2023 Feb 23;10:1125695. doi: 10.3389/fvets.2023.1125695. PMID: 36908512; PMCID: PMC9997849.

Mcllwraith CW. General pathobiology of the joint and response to injury. In: Mcllwraith CW, Trotter GW, eds. *Joint Disease in the Horse*. Philadelphia: Saunders; 1996:40–70.

Mcllwraith CW. Frank Milne Lecture: from arthroscopy to gene therapy – 30 years of looking in joints. *Proceedings 51st Annu Am Assoc Equine Pract Conven*. 2005;65-113.

Mcllwraith CW, Frisbie DD, Kawcak CE. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone Joint Res*. 2012 Nov 1;1(11):297-309. doi: 10.1302/2046-3758.111.2000132. PMID: 23610661; PMCID: PMC3626203.

Meehan B, Rak J, Di Vizio D. Oncosomes - large and small: what are they, where they came from? *Journal of Extracellular Vesicles*. 2016;5:33109. DOI: 10.3402/jev.v5.33109. PMID: 27680302; PMCID: PMC5040817.

Merino AM, Hoogduijn MJ, Borrás FE, Franquesa M. Therapeutic potential of extracellular vesicles. *Front Immunol*. 2014 Dec 19;5:658. doi: 10.3389/fimmu.2014.00658. PMID: 25566267; PMCID: PMC4271725.

Mocchi M, Bari E, Dotti S, Villa R, Berni P, Conti V, Del Bue M, Squassino GP, Segale L, Ramoni R, Torre ML, Perteghella S, Grolli S. Canine Mesenchymal Cell Lyosecretome Production and Safety Evaluation after Allogenic Intraarticular Injection in Osteoarthritic Dogs. *Animals (Basel)*. 2021 Nov 15;11(11):3271. doi: 10.3390/ani11113271. PMID: 34828003; PMCID: PMC8614457. b)

Mocchi M, Bari E, Marrubini G, Bonda AF, Perteghella S, Tartara F, Cofano F, Perna GD, Giovannelli L, Mandracchia D, Sorlini M, Garbossa D, Torre ML, Segale L. Freeze-Dried Mesenchymal Stem Cell- Secretome Pharmaceuticalization: Optimization of Formulation and Manufacturing Process Robustness. *Pharmaceutics*. 2021 Jul 23;13(8):1129. doi: 10.3390/pharmaceutics13081129. PMID: 34452088; PMCID: PMC8401234. a)

Mocchi M, Dotti S, Bue MD, Villa R, Bari E, Perteghella S, Torre ML, Grolli S. Veterinary Regenerative Medicine for Musculoskeletal Disorders: Can Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Secretome Be the New Frontier? *Cells*. 2020 Jun 11;9(6):1453. doi: 10.3390/cells9061453. PMID: 32545382; PMCID: PMC7349187.

Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*. 2006 Jun 29;441(7097):1068-74. doi: 10.1038/nature04956. PMID: 16810241.

Múzes G, Sipos F. Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome: A Potential Therapeutic Option for Autoimmune and Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Cells*. 2022 Jul 26;11(15):2300. doi: 10.3390/cells11152300. PMID: 35892597; PMCID: PMC9367576.

Nöth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res*. 2002 Sep;20(5):1060-9. doi: 10.1016/S0736-0266(02)00018-9. PMID: 12382974.

Orlando G, Wood KJ, Stratta RJ, Yoo JJ, Atala A, Soker S. Regenerative medicine and organ transplantation: past, present, and future. *Transplantation*. 2011 Jun 27;91(12):1310-7. doi: 10.1097/TP.0b013e318219ebb5. PMID: 21505379.

Osugi M, Katagiri W, Yoshimi R, Inukai T, Hibi H, Ueda M. Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Tissue Eng Part A*. 2012 Jul;18(13-14):1479-89. doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0325. Epub 2012 Jun 12. PMID: 22443121; PMCID: PMC3397118.

Orsini JA, Ryan WG, Carithers DS, Boston RC. Evaluation of oral administration of firocoxib for the management of musculoskeletal pain and lameness associated with osteoarthritis in horses. *Am J Vet Res*. 2012 May;73(5):664-71. doi: 10.2460/ajvr.73.5.664. PMID: 22533398.

Jammes M, Contentin R, Cassé F, Galéra P. Equine osteoarthritis: Strategies to enhance mesenchymal stromal cell-based acellular therapies. *Front Vet Sci*. 2023 Feb 10;10:1115774. doi: 10.3389/fvets.2023.1115774. PMID: 36846261; PMCID: PMC9950114.

Janet Rossant, Ph.D., Stem Cells from the Mammalian Blastocyst, *Stem Cells*, Volume 19, Issue 6, November 2001, Pages 477–482, <https://doi.org/10.1634/stemcells.19-6-477>

Johnston GCA, Wood KA, Jackson KV, Perkins NR, Zedler ST. Evaluation of the inflammatory response to two intra-articular hyaluronic acid formulations in normal equine joints. *J Vet Pharmacol Ther*. 2020 Jan;43(1):38-49. doi: 10.1111/jvp.12818. Epub 2019 Oct 29. PMID: 31660636.

Perteghella S., Bari E., Chlapanidas T., Sorlini M., De Girolamo L., Perucca Orfei C., Viganò M., Torre M.L. Process for Isolating and Lyophilizing Extracellular Vesicles. *PCT/IB2017/056591*. 2016 Oct 28;

Perteghella S, Crivelli B, Catenacci L, Sorrenti M, Bruni G, Necchi V, Viganò B, Sorlini M, Torre ML, Chlapanidas T. Stem cell-extracellular vesicles as drug delivery systems: New frontiers for silk/curcumin nanoparticles. *Int J Pharm*. 2017 Mar 30;520(1-2):86-97. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.02.005. Epub 2017 Feb 2. PMID: 28163224.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143-7. doi: 10.1126/science.284.5411.143. PMID: 10102814.

Plotnikov EY, Khryapenkova TG, Vasileva AK, Marey MV, Galkina SI, Isaev NK, Sheval EV, Polyakov VY, Sukhikh GT, Zorov DB. Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in co-culture. *J Cell Mol Med*. 2008 Sep-Oct;12(5A):1622-31. doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00205.x. Epub 2007 Dec 14. PMID: 18088382; PMCID: PMC3918078.

Ponte, A.L., Marais, E., Gallay, N., Langonne, A., Delorme, B., Herault, O., Charbord, P., and Domenech, J. (2009). The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 25, 1737–1745.

Raman S, FitzGerald U, Murphy JM. Interplay of Inflammatory Mediators with Epigenetics and Cartilage Modifications in Osteoarthritis. *Front Bioeng Biotechnol*. 2018 Mar 14;6:22. doi: 10.3389/fbioe.2018.00022. PMID: 29594113; PMCID: PMC5861204.

Regmi S, Pathak S, Kim JO, Yong CS, Jeong JH. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of inflammatory diseases: Challenges, opportunities, and future perspectives. *Eur J Cell Biol*. 2019 Dec;98(5-8):151041. doi: 10.1016/j.ejcb.2019.04.002. Epub 2019 Apr 14. PMID: 31023504.

Ren G, Roberts AI, Shi Y. Adhesion molecules: key players in Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Cell Adh Migr*. 2011 Jan-Feb;5(1):20-2. doi: 10.4161/cam.5.1.13491. Epub 2011 Jan 1. PMID: 20935502; PMCID: PMC3038091.

Reiner AT, Witwer KW, van Balkom BWM, de Beer J, Brodie C, Corteling RL, Gabrielsson S, Gimona M, Ibrahim AG, de Kleijn D, Lai CP, Lötval J, Del Portillo HA, Reischl IG, Riazifar M, Salomon C, Tahara H, Toh WS, Wauben MHM, Yang VK, Yang Y, Yeo RWY, Yin H, Giebel B, Rohde E, Lim SK. Concise Review: Developing Best-Practice Models for the Therapeutic Use of Extracellular Vesicles. *Stem Cells Transl Med*. 2017 Aug;6(8):1730-1739. doi: 10.1002/sctm.17-0055. Epub 2017 Jul 17. PMID: 28714557; PMCID: PMC5689784.

Reis M, Mavin E, Nicholson L, Green K, Dickinson AM, Wang XN. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Attenuate Dendritic Cell Maturation and Function. *Front Immunol*. 2018 Nov 9;9:2538. doi: 10.3389/fimmu.2018.02538. PMID: 30473695; PMCID: PMC6237916.

Ribitsch I, Oreff GL, Jenner F. Regenerative Medicine for Equine Musculoskeletal Diseases. *Animals (Basel)*. 2021 Jan 19;11(1):234. doi: 10.3390/ani11010234. PMID: 33477808; PMCID: PMC7832834.

Ries C, Egea V, Karow M, Kolb H, Jochum M, Neth P. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood*. 2007 May 1;109(9):4055-63. doi: 10.1182/blood-2006-10-051060. Epub 2006 Dec 29. PMID: 17197427.

RMTC White Paper: RMTC position statement on corticosteroids. [www.rmtcnet.com/resources/RMTC%20Position%20Paper%20on%20Corticosteroids.pdf],2013.

Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*. 2015 Apr 21;42(4):607-12. doi: 10.1016/j.immuni.2015.04.005. PMID: 25902480.

Sackstein R, Merzaban JS, Cain DW, Dagia NM, Spencer JA, Lin CP, Wohlgemuth R. Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nat Med*. 2008 Feb;14(2):181-7. doi: 10.1038/nm1703. Epub 2008 Jan 13. PMID: 18193058.

Sackstein R. The lymphocyte homing receptors: gatekeepers of the multistep paradigm. *Curr Opin Hematol*. 2005 Nov;12(6):444-50. doi: 10.1097/01.moh.0000177827.78280.79. PMID: 16217160.

Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2010 Jun;5(2):103-10. doi: 10.2174/157488810791268564. PMID: 19941460.

Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*. 2000 Aug;164(2):247-56. doi: 10.1006/exnr.2000.7389. PMID: 10915564.

Sandonà M, Di Pietro L, Esposito F, Ventura A, Silini AR, Parolini O, Saccone V. Mesenchymal Stromal Cells and Their Secretome: New Therapeutic Perspectives for Skeletal Muscle Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021 May 13;9:652970. doi: 10.3389/fbioe.2021.652970. PMID: 34095095; PMCID: PMC8172230.

Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells*. 2005 Feb;23(2):220-9. doi: 10.1634/stemcells.2004-0166. PMID: 15671145.

Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K, Ozawa K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*. 2007 Jan 1;109(1):228-34. doi: 10.1182/blood-2006-02-002246. Epub 2006 Sep 19. PMID: 16985180.

Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4(1-2):7-25. PMID: 747780.

Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Deschaseaux F. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells*. 2008 Jan;26(1):212-22. doi: 10.1634/stemcells.2007-0554. Epub 2007 Oct 11. PMID: 17932417.

Shahriyari L, Komarova NL. Symmetric vs. asymmetric stem cell divisions: an adaptation against cancer? *PLoS One*. 2013 Oct 29;8(10):e76195. doi: 10.1371/journal.pone.0076195. PMID: 24204602; PMCID: PMC3812169.

Shahir M, Mahmoud Hashemi S, Asadirad A, Varahram M, Kazempour-Dizaji M, Folkerts G, Garssen J, Adcock I, Mortaz E. Effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes on the induction of mouse tolerogenic dendritic cells. *J Cell Physiol*. 2020 Oct;235(10):7043-7055. doi: 10.1002/jcp.29601. Epub 2020 Feb 11. PMID: 32043593; PMCID: PMC7496360.

Shao Y, Zhou F, He D, Zhang L, Shen J. Overexpression of CXCR7 promotes mesenchymal stem cells to repair phosgene-induced acute lung injury in rats. *Biomed Pharmacother.* 2019 Jan;109:1233-1239. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.108. Epub 2018 Nov 7. PMID: 30551373.

Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:457-78. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130230. PMID: 21073342.

Sioud, M., Mobergslien, A., Boudabous, A., & Fløisand, Y. (2011). Mesenchymal stem cell-mediated T cell suppression occurs through secreted galectins. *International Journal of Oncology*, 38, 385-390. <https://doi.org/10.3892/ijo.2010.869>

Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood.* 2008 Feb 1;111(3):1327-33. doi: 10.1182/blood-2007-02-074997. Epub 2007 Oct 19. PMID: 17951526.

Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood.* 2006 Feb 15;107(4):1484-90. doi: 10.1182/blood-2005-07-2775. Epub 2005 Oct 20. PMID: 16239427.

Steingen C, Brenig F, Baumgartner L, Schmidt J, Schmidt A, Bloch W. Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2008 Jun;44(6):1072-1084. doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.03.010. Epub 2008 Mar 19. PMID: 18462748.

Strobel ES, Gay RE, Greenberg PL. Characterization of the in vitro stromal microenvironment of human bone marrow. *Int J Cell Cloning.* 1986 Sep;4(5):341-56. doi: 10.1002/stem.5530040506. PMID: 3534110.

Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant.* 2016;25(5):829-48. doi: 10.3727/096368915X689622. Epub 2015 Sep 29. PMID: 26423725.

Svensson KJ, Christianson HC, Wittrup A, Bourseau-Guilmain E, Lindqvist E, Svensson LM, Mörgelin M, Belting M. Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *J Biol Chem.* 2013 Jun 14;288(24):17713-24. doi: 10.1074/jbc.M112.445403. Epub 2013 May 7. PMID: 23653359; PMCID: PMC3682571.

Tao H, Han Z, Han ZC, Li Z. Proangiogenic Features of Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Applications. *Stem Cells Int.* 2016;2016:1314709. doi: 10.1155/2016/1314709. Epub 2016 Jan 6. PMID: 26880933; PMCID: PMC4736816.

Te Moller NCR, van Weeren PR. How exercise influences equine joint homeostasis. *Vet J.* 2017 Apr;222:60-67. doi: 10.1016/j.tvjl.2017.03.004. Epub 2017 Mar 28. PMID: 28392152.

Théry C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 2018 Nov 23;7(1):1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750. PMID: 30637094; PMCID: PMC6322352.

Tofiño-Vian M, Guillén MI, Pérez Del Caz MD, Silvestre A, Alcaraz MJ. Microvesicles from Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a New Protective Strategy in Osteoarthritic Chondrocytes. *Cell Physiol Biochem*. 2018;47(1):11-25. doi: 10.1159/000489739. Epub 2018 May 9. PMID: 29763932.

Toh WS, Lai RC, Hui JHP, Lim SK. MSC exosome as a cell-free MSC therapy for cartilage regeneration: Implications for osteoarthritis treatment. *Semin Cell Dev Biol*. 2017 Jul;67:56-64. doi: 10.1016/j.semcd.2016.11.008. Epub 2016 Nov 18. PMID: 27871993.

Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(1):32-45. doi: 10.1186/ar614. Epub 2002 Dec 11. PMID: 12716446; PMCID: PMC154434.

Ullah M, Liu DD, Thakor AS. Mesenchymal Stromal Cell Homing: Mechanisms and Strategies for Improvement. *iScience*. 2019 May 31;15:421-438. doi: 10.1016/j.isci.2019.05.004. Epub 2019 May 9. PMID: 31121468; PMCID: PMC6529790.

Van Weeren PR, Back W. Musculoskeletal Disease in Aged Horses and Its Management. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2016 Aug;32(2):229-47. doi: 10.1016/j.cveq.2016.04.003. PMID: 27449390.

Velloso Alvarez A, Boone LH, Braim AP, Taintor JS, Caldwell F, Wright JC, Wooldridge AA. A Survey of Clinical Usage of Non-steroidal Intra-Articular Therapeutics by Equine Practitioners. *Front Vet Sci*. 2020 Oct 22;7:579967. doi: 10.3389/fvets.2020.579967. PMID: 33195592; PMCID: PMC7642446.

Villani S, Marazzi M, Bucco M, Faustini M, Klinger M, Gaetani P, Crovato F, Vigo D, Caviglioli F, Torre ML. Statistical approach in alginate membrane formulation for cell encapsulation in a GMP-based cell factory. *Acta Biomater*. 2008 Jul;4(4):943-9. doi: 10.1016/j.actbio.2008.01.007. Epub 2008 Jan 26. PMID: 18296132.

Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 25;18(9):1852. doi: 10.3390/ijms18091852. PMID: 28841158; PMCID: PMC5618501.

Wangler S, Kamali A, Wapp C, Wuertz-Kozak K, Häckel S, Fortes C, Benneker LM, Haglund L, Richards RG, Alini M, Peroglio M, Grad S. Uncovering the secretome of mesenchymal stromal cells exposed to healthy, traumatic, and degenerative intervertebral discs: a proteomic analysis. *Stem Cell Res Ther*. 2021 Jan 7;12(1):11. doi: 10.1186/s13287-020-02062-2. PMID: 33413584; PMCID: PMC7789679.

Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol*. 2014 Nov;15(11):1009-16. doi: 10.1038/ni.3002. PMID: 25329189.

Wang Q, Sun B, Wang D, Ji Y, Kong Q, Wang G, Wang J, Zhao W, Jin L, Li H. Murine bone marrow mesenchymal stem cells cause mature dendritic cells to promote T-cell tolerance. *Scand J Immunol*. 2008 Dec;68(6):607-15. doi: 10.1111/j.1365-3083.2008.02180.x. Epub 2008 Oct 27. PMID: 18959624.

- Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):157-68. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81692-x. PMID: 10647940.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000 Aug 15;61(4):364-70. doi: 10.1002/1097-4547(20000815)61:4<364::AID-JNR2>3.0.CO;2-C. PMID: 10931522.
- Wu Y, Hoogduijn MJ, Baan CC, Korevaar SS, de Kuiper R, Yan L, Wang L, van Besouw NM. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Have a Heterogenic Cytokine Secretion Profile. *Stem Cells Int*. 2017;2017:4960831. doi: 10.1155/2017/4960831. Epub 2017 May 31. PMID: 28642794; PMCID: PMC5470019.
- Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, O'Neill L, Evans CA, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*. 2004 Nov 1;104(9):2643-5. doi: 10.1182/blood-2004-02-0526. Epub 2004 Jul 13. PMID: 15251986.
- Xin D, Li T, Chu X, Ke H, Yu Z, Cao L, Bai X, Liu D, Wang Z. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles modulate microglia/macrophage polarization and protect the brain against hypoxia-ischemic injury in neonatal mice by targeting delivery of miR-21a-5p. *Acta Biomater*. 2020 Sep 1;113:597-613. doi: 10.1016/j.actbio.2020.06.037. Epub 2020 Jun 30. PMID: 32619670.
- Yi-Ling Si, Ya-Li Zhao, Hao-Jie Hao, Xiao-Bing Fu, Wei-Dong Han. MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. 2011. doi:10.1016/j.arr.2010.08.005
- Yi T, Song SU. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch Pharm Res*. 2012 Feb;35(2):213-21. doi: 10.1007/s12272-012-0202-z. Epub 2012 Feb 28. PMID: 22370776.
- Zagoura DS, Roubelakis MG, Bitsika V, Trohatou O, Pappa KI, Kapelouzou A, Antsaklis A, Anagnou NP. Therapeutic potential of a distinct population of human amniotic fluid mesenchymal stem cells and their secreted molecules in mice with acute hepatic failure. *Gut*. 2012 Jun;61(6):894-906. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300908. Epub 2011 Oct 13. PMID: 21997562.
- Zanotti L, Angioni R, Cali B, Soldani C, Ploia C, Moalli F, Garghesha M, D'Amico G, Elliman S, Tedeschi G, Maffioli E, Negri A, Zacchigna S, Sarukhan A, Stein JV, Viola A. Mouse mesenchymal stem cells inhibit high endothelial cell activation and lymphocyte homing to lymph nodes by releasing TIMP-1. *Leukemia*. 2016 May;30(5):1143-54. doi: 10.1038/leu.2016.33. Epub 2016 Feb 22. PMID: 26898191; PMCID: PMC4858586.
- Zayed M, Adair S, Ursini T, Schumacher J, Misk N, Dhar M. Concepts and challenges in the use of mesenchymal stem cells as a treatment for cartilage damage in the horse. *Res Vet Sci*. 2018 Jun;118:317-323. doi: 10.1016/j.rvsc.2018.03.011. Epub 2018 Mar 20. PMID: 29601969.
- Zhang S, Chu WC, Lai RC, Lim SK, Hui JH, Toh WS. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016 Dec;24(12):2135-2140. doi: 10.1016/j.joca.2016.06.022. Epub 2016 Jul 5. PMID: 2.

Zhang Y, Hao Z, Wang P, Xia Y, Wu J, Xia D, Fang S, Xu S. Exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cells enhance fracture healing through HIF-1 α -mediated promotion of angiogenesis in a rat model of stabilized fracture. *Cell Prolif.* 2019 Mar;52(2):e12570. doi: 10.1111/cpr.12570. Epub 2019 Jan 20. PMID: 30663158; PMCID: PMC6496165.