



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE

Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in Medicina Veterinaria

L'uso delle cellule stromali mesenchimali in Medicina Veterinaria: l'interazione con il sistema immunitario e potenzialità cliniche.

The use of mesenchymal stromal cells in Veterinary Medicine: interaction with the immune system and clinical potential.

Relatore:

Chiar.mo Prof. Stefano Grolli

Laurenda:

Camilla Allegri

Anno Accademico 2022-2023

Indice

Riassunto	4
Abstract	5
1. Introduzione.....	6
1.1. Le cellule staminali	9
1.1.1. Mantenimento dell'omeostasi tissutale: <i>self-renewing</i> e differenziamento.....	9
1.1.2. La nicchia delle cellule staminali	13
1.1.3. Quiescenza e attivazione delle cellule staminali	17
1.1.4. Classificazione delle cellule staminali.....	20
1.1.4.1. Classificazione in base all'origine.....	20
1.1.4.2. Classificazione in base al potenziale di differenziazione	20
2. Le cellule stromali mesenchimali (MSCs)	23
2.1. Scoperta delle cellule stromali mesenchimali	23
2.1.1. La nomenclatura	25
2.2. Identità e funzioni, multipotenza.....	26
2.3. Le fonti	29
2.3.1. MSCs e periciti.....	29
2.3.2. MSCs isolate dal midollo osseo	30
2.3.3. MSCs isolate da tessuto adiposo	31
2.3.4. Altre fonti di MSCs	32
2.3.5. Metodi di coltura MSCs	33
2.3.6. Vie di somministrazione	34
3. Proprietà delle MSCs.....	36
3.1. Homing.....	36
3.2. Attività paracrina delle MSCs: esosomi, vescicole e corpi apoptotici	38
3.3. Attività angiogenica delle MSCs.....	42
3.4. Attività antimicrobica delle MSCs	42
4. Il dialogo tra MSCs e il sistema immunitario.....	44
4.1. Ruolo delle MSCs nell'infiammazione tissutale	44
4.2. Le MSCs e l'immunità innata	45
4.2.1. Interazione con i granulociti neutrofili	45
4.2.2. Interazione con i monociti-macrofagi	46
4.2.3. Efferocitosi e MSCs	47
4.2.4. MSCs e le cellule Natural Killer	50
4.2.5. MSCs e mastociti.....	51
4.2.6. MSCs e complemento	51

4.2.7. MSCs e cellule dendritiche.....	51
4.3. MSCs e immunità adattativa	53
4.3.1. MSCs e i linfociti B.....	53
4.3.2. MSCs e i linfociti T.....	55
5. Le MSCs autologhe e allogeniche.....	57
5.1. Cosa sono, vantaggi e svantaggi terapeutici.....	57
5.2. Immunomodulazione di MSCs autologhe e allogeniche <i>in vivo</i>	59
6. Potenzialità cliniche delle MSCs.....	64
6.1. Nel gatto.....	64
6.1.1. Gengivostomatite cronica felina (<i>Feline Chronic Gengivostomatitis</i> , FCGS).....	64
6.1.2. Malattia renale cronica (<i>Chronic Kidney Disease</i> , CKD).....	66
6.2. Nel cane.....	68
6.2.1. Cheratocongiuntivite secca, KCS (o <i>Dry Eye</i>).....	68
6.2.2. Ferite cutanee	70
6.2.3. Osteoartrite	71
6.3. Nel cavallo.....	72
6.3.1. L'osteoartrite.....	73
7. Conclusioni.....	75
8. Bibliografia.....	77

Riassunto

La Medicina Rigenerativa rappresenta una disciplina che negli ultimi anni ha conosciuto una rapida crescita nella Medicina Veterinaria e nella sua controparte umana. Le terapie basate su cellule staminali/stromali adulte, i concentrati piastrinici (come il PRP) e altri derivati biologici autologhi sono emersi come alternative promettenti rispetto alle terapie tradizionali. L'aumento dell'aspettativa di vita degli animali domestici e l'evoluzione delle cure veterinarie hanno reso la terapia rigenerativa una soluzione attraente, soprattutto per le patologie non responsive ai trattamenti convenzionali.

Le cellule stromali mesenchimali (MSC) sono state inizialmente considerate un agente terapeutico interessante per le loro potenzialità di rigenerazione dei tessuti. Queste cellule, facilmente isolate e coltivate in vitro partendo da campioni di tessuto prelevati al paziente stesso, in realtà hanno successivamente dimostrato la capacità di svolgere funzioni biologiche estremamente complesse e sofisticate in cui l'azione terapeutica non è attribuibile soltanto alle capacità pro-rigenerative, ma ad una complessa azione di interazione e modulazione del sistema immunitario.

L'applicazione clinica delle MSC nella Medicina Veterinaria ha visto di conseguenza progressi e cambiamenti notevoli, estendendosi dalla risoluzione di lesioni muscolo-scheletriche, con un focus speciale sui cavalli sportivi e cani, al trattamento di patologie sistemiche e d'organo.

Restano, tuttavia, molti aspetti da chiarire relativamente alle azioni terapeutiche, alla sicurezza ed alla efficacia dei protocolli sino ad ora sviluppati. Inoltre, la regolamentazione delle terapie basate su cellule staminali nei pazienti veterinari non è ancora chiara ed univoca nei diversi paesi. La sicurezza e l'efficacia delle MSC autologhe rispetto a quelle allogeniche sono ancora oggi oggetto di particolare dibattito, con preoccupazioni riguardo al rischio di reazioni immunitarie avverse nelle terapie allogeniche.

La tesi si propone di analizzare le proprietà immunomodulatorie delle MSC utilizzate in terapia rigenerativa veterinaria, esaminando l'interazione con il sistema immunitario sia per le cellule autologhe che allogeniche, oltre che le potenzialità e le applicazioni cliniche della terapia rigenerativa in Medicina Veterinaria.

Abstract

Regenerative Medicine represents a discipline that has experienced rapid growth in recent years in Veterinary Medicine and its human counterpart. Therapies based on adult stem/stromal cells, platelet concentrates (such as PRP), and other autologous biological derivatives have emerged as promising alternatives to traditional therapies. Increasing life expectancy of pets and evolving veterinary care have made regenerative therapy an attractive option, especially for diseases unresponsive to conventional treatments.

Mesenchymal stromal cells (MSCs) were initially considered an attractive therapeutic agent because of their potential for tissue regeneration. These cells, easily isolated and cultured in vitro from tissue samples taken from the patient himself actually have subsequently demonstrated the ability to perform extremely complex and sophisticated biological functions in which the therapeutic action is attributable not only to pro-regenerative capabilities, but to a complex action of interaction and modulation of the immune system.

The clinical application of MSCs in Veterinary Medicine has consequently seen remarkable advances and changes, extending from the resolution of musculoskeletal injuries, with a special focus on sport horses and dogs, to the treatment of systemic and organ disorders.

However, many issues remain to be clarified regarding the therapeutic actions, safety, and efficacy of the protocols developed to date. In addition, the regulation of stem cell-based therapies in veterinary patients is still unclear and unambiguous in different countries. The safety and efficacy of autologous versus allogeneic MSCs are still particularly debated, with concerns about the risk of adverse immune reactions in allogeneic therapies.

This thesis aims to analyze the immunomodulatory properties of MSCs used in veterinary regenerative therapy, examining the interaction with the immune system for both autologous and allogeneic cells, as well as the potential and clinical applications of regenerative therapy in Veterinary Medicine.

1. Introduzione

La Medicina Rigenerativa rappresenta una branca importante e di recente introduzione della Medicina Veterinaria: al pari della Medicina Umana, le terapie a base di cellule staminali, di concentrato piastrinico (PRP) e di altri derivati biologici autologhi, costituiscono un'alternativa terapeutica che si sta affermando sempre di più e che sta guadagnando un interesse crescente.

Le aspettative di vita degli animali da compagnia sono aumentate in modo significativo negli ultimi decenni, grazie a più fattori: innanzitutto, grazie alla compliance dei proprietari, a una sensibilità maggiore da parte degli stessi verso i propri animali e il loro benessere e, soprattutto, grazie all'ampliamento delle possibilità terapeutiche esistenti. Bisogna considerare, infatti, che sempre più patologie, tra cui quelle determinate dalla senilità, sono poco responsive ai trattamenti convenzionali, per cui la terapia rigenerativa è da considerarsi una soluzione promettente (Pinheiro et al., 2019).

Le cellule staminali sono cellule *uncommitted*, ancora non differenziate in un tipo cellulare specifico, essenziali per lo sviluppo embrionale, la crescita tissutale e, infine, per il mantenimento tissutale, costituendo una fonte costante di nuove cellule da reclutare in caso di lesioni tissutali (Morrison and Kimble, 2006). Si può affermare che le cellule staminali garantiscono, grazie alle loro numerose proprietà, l'omeostasi tissutale. Per questo motivo, le terapie rigenerative a base cellulare non costituiscono trattamenti basati su sostanze estranee all'organismo, ma sono ottenute, in ultima analisi, utilizzando componenti dell'organismo stesso, il cui effetto consiste nel potenziare delle abilità intrinseche dei tessuti dell'organismo di crescita, guarigione e sostituzione di parti danneggiate.

Le cellule staminali, inoltre, possiedono delle proprietà uniche di auto-rinnovamento e differenziazione: l'obiettivo dell'impiego di queste cellule risiede nello sfruttare queste caratteristiche somministrandole a pazienti i cui tessuti presentano difficoltà di guarigione e ripristino della condizione tissutale originaria a causa di danni dovuti a malattie acute o croniche (Voga et al., 2020).

Le cellule stromali mesenchimali (MSCs) sono una popolazione di cellule staminali adulte, isolabili dalla componente mesenchimale di diversi tessuti. Sono in realtà cellule solo parzialmente definite dalla loro abilità di differenziarsi nei vari tessuti *in vitro*, infatti, sono le funzioni trofiche, paracrine e immunomodulatorie a determinare il maggiore impatto terapeutico *in vivo*. A differenza dei trattamenti farmacologici che rilasciano un singolo agente a una dose specifica, le MSCs vengono regolate dal sito in cui si trovano e secernono fattori bioattivi e segnali a concentrazioni variabili in risposta al microambiente locale (Murphy et al., 2013).

Grazie alla facilità di isolamento dall'individuo adulto e coltura *in vitro* le MSCs costituiscono il tipo di cellula staminale più promettente nel campo clinico della Medicina Veterinaria. Esse rappresentano degli espedienti terapeutici innovativi che stanno diventando sempre meglio conosciuti e applicati in campo medico-veterinario grazie alle loro innumerevoli proprietà pro-rigenerative (El-Husseiny et al., 2022).

Il campo delle cellule staminali in Medicina Veterinaria, di conseguenza, si è evoluto rapidamente soprattutto negli ultimi anni, sia da un punto di vista sperimentale che clinico. Le più consolidate applicazioni cliniche nella Medicina Veterinaria sono state per la risoluzione di lesioni muscolo-scheletriche nel cane e nel cavallo (Fortier and Travis, 2011). In particolare, un'area che è stata specialmente interessata dalla medicina rigenerativa è la medicina del cavallo sportivo; esistono infatti diversi report che esplorano l'utilizzo della medicina rigenerativa per le patologie ortopediche nel cavallo (Frisbie and Smith, 2010).

Passi in avanti nella ricerca e l'ottimizzazione delle modalità terapeutiche nell'ambito della Medicina Rigenerativa sono, senza dubbio, fondamentali nell'ottica del progresso terapeutico.

In questo senso, un forte contributo alla ricerca è stato apportato dalla scoperta di una nuova categoria di cellule staminali, conosciute come “cellule staminali pluripotenti indotte” (*Induced Pluripotent Stem Cells*, iPSCs), ovvero delle cellule generate a partire da colture di fibroblasti grazie all'aggiunta e all'espressione di fattori di trascrizione specifici (Oct 3/4, Sox2, c-Myc, Klf4) con regressione nella differenziazione cellulare e ripristino di uno stato simile a quello embrionale (Yamanaka et al., 2006). Sebbene le cellule staminali embrionali (*Embryonic stem cells*, ESCs) e le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) derivino da specie domestiche, come il cane (Luo et al., 2011; Vaags et al., 2009), il bovino (Sumer et al., 2011), il suino (Ezashi et al., 2009; Vassiliev et al., 2010) e il cavallo (Nagy et al., 2011), lo sviluppo di sistemi sperimentali che sfruttano l'impiego di queste cellule è sempre stato più rallentato rispetto alla controparte in Medicina Umana.

In generale, le terapie a base di cellule staminali nei pazienti veterinari non sono regolamentate in modo chiaro e univoco da un punto di vista normativo: questo ha portato all'implementazione di alcune terapie senza alcuna dimostrazione di efficacia *in vitro* o in modelli preclinici di studio animale (Fortier e Travis, 2011).

Si può affermare che il ruolo delle MSCs ancora non è stato completamente compreso. In particolare, non è chiaro quale sia il reale ruolo immunomodulatorio delle cellule stromali mesenchimali (MSCs) che vengono somministrate nelle applicazioni terapeutiche. Non è ben chiaro, cioè, se quanto osservato *in vitro* corrisponda al reale comportamento *in vivo* di queste

cellule. Di conseguenza, un tema molto dibattuto riguarda la sicurezza e l'efficacia dell'applicazione di MSCs autologhe piuttosto che allogeniche.

Nella terapia rigenerativa moderna le MSCs autologhe e allogeniche sono i due tipi principali di cellule staminali impiegate; esiste anche la possibilità di utilizzare MSCs xenogeniche. Si tratta di cellule la cui classificazione si basa sul rapporto esistente tra donatore e ricevente delle cellule. Le cellule autologhe sono prelevate dallo stesso individuo a cui si somministrano, le cellule staminali allogeniche, al contrario, derivano da un individuo differente, ma appartenente alla medesima specie. Le cellule di origine xenogenica sono prelevate da un individuo di specie diversa dal ricevente; queste ultime sono meno studiate, specie in ambito clinico, rispetto alle precedenti poiché costituiscono una fonte di cellule che possono differire notevolmente tra donatore e ricevente (El-Husseiny et al., 2022) e presentano alcuni rischi potenziali come, per esempio, una risposta del sistema immunitario dell'individuo ricevente. Nello specifico, si è tentato più volte di comprendere quale terapia, allogenica o autologa, fosse superiore e più conveniente in termini di rapporto rischio-beneficio. I trattamenti allogenici a base di cellule stromali mesenchimali (MSCs), categorizzati come “farmaci” sono stati ampiamente perseguiti, ma esistono dei dubbi riguardanti la sicurezza di queste applicazioni e, come già accennato, esiste una carenza normativa al riguardo. Questi fattori al momento rendono le cellule stromali mesenchimali autologhe un'opzione più attraente nella pratica clinica per molte applicazioni rigenerative, antinfiammatorie e in corso di malattie autoimmuni (Murphy et al., 2013). Le maggiori preoccupazioni, concernenti l'uso di terapie a base di prodotti allogenici, sono dovute alla documentazione di diversi casi di rigetto e di risposte immunitarie croniche riportati in studi animali, oltre che in trial clinici di medicina umana (Eliopoulos et al., 2005).

Lo scopo di questa tesi è quello di analizzare le proprietà di immunomodulazione delle MSCs impiegate nella terapia rigenerativa veterinaria, nonché la loro interazione con il Sistema Immunitario dell'animale ricevente la terapia con le cellule del donatore, sia considerando le cellule ad uso autologo che allogenico. Verranno infine passate in rassegna le numerose potenzialità e applicazioni cliniche della terapia rigenerativa in Medicina Veterinaria.

1.1. Le cellule staminali

Le cellule staminali costituiscono una tipologia di cellula indifferenziata presente negli stadi di sviluppo embrionale, fetale ed adulto che porta, in seguito a stimoli opportuni, alla creazione di cellule differenziate che, a loro volta, costituiscono dei “blocchi di costruzione” a livello di tessuti e organi; nel periodo di vita post-natale e adulta, cellule staminali tessuto-specifiche si ritrovano in organi differenziati e sono necessarie alla riparazione in seguito a un potenziale danno dell’organo (Kolios and Moodley, 2013). Le cellule staminali hanno quindi un ruolo importante nella crescita, nello sviluppo e nella riparazione dei tessuti.

Oltre che essere definite “non differenziate” e con una capacità differenziativa, queste cellule hanno una capacità unica di autorinnovamento o “self-renewal”: ciò è consentito grazie alla loro proprietà di replicazione, che può essere simmetrica o asimmetrica e generare tipologie differenti di cellule. Per queste caratteristiche funzionali le cellule staminali, ed in particolare quelle adulte trovano un ampio interesse nella medicina rigenerativa (Pinheiro et al., 2019; Morrison and Kimble, 2006).

Le cellule staminali si possono suddividere e classificare in base a diversi criteri che includono: il potenziale differenziativo, l’origine e il rapporto tra donatore e ricevente (El-Husseiny et al., 2022). Le cellule staminali sono capaci di convertirsi in differenti tipi di cellule specializzate; si possono, in base a ciò, dividere in base alla loro origine in: embrionali ed adulte. In più, considerando la loro fase di sviluppo e abilità di differenziazione, si possono classificare ulteriormente in cellule totipotenti, pluripotenti e multipotenti (Voga et al., 2020). In base al rapporto tra donatore e ricevente, le cellule si possono classificare in autologhe, allogene e, infine, xenogene. (El-Husseiny et al., 2022).

1.1.1. Mantenimento dell’omeostasi tissutale: *self-renewing* e differenziamento

Il concetto di “cellula staminale” venne proposto per la prima volta a seguito degli studi pionieristici di Till e McCulloch sulla rigenerazione del sistema ematico *in vivo*. La formazione di colonie cellulari all’interno del parenchima splenico era stata osservata in seguito a trapianto di una piccola quantità di cellule di midollo osseo (BM) syngeneiche in un modello animale di topo: secondo un’analisi più approfondita, una sottopopolazione limitata di cellule derivate dal midollo osseo del donatore (BM) aveva due caratteristiche significative: la capacità di produrre multipli tipi di cellule mieloeritroidi e la capacità di replicarsi in modo autosufficiente (Till JE et al., 1961; Becker AJ et al., 1963; Siminovitch L et al., 1963; Wu AM 1968).

Le cellule staminali si contraddistinguono dagli altri tipi cellulari grazie a due proprietà: l'auto-rinnovamento, che consente la creazione di cellule figlie identiche alla cellula madre e il differenziamento, ovvero la possibilità di differenziarsi in un tipo cellulare specializzato, tessuto-specifico. Ciò è consentito dalla divisione asimmetrica della cellula staminale che porta a generare due tipi cellulari: uno identico alla madre e l'altro differenziato (Morrison e Kimble, 2006).

Il processo di divisione asimmetrica è molto diffuso in diversi organismi, dai procarioti sino a organismi pluricellulari complessi e non è un processo esclusivo delle cellule staminali, infatti, anche le cellule batteriche e i lieviti si dividono in modo asimmetrico, come molte altre tipologie cellulari negli embrioni in via di sviluppo (Inaba e Yamashita, 2013).

Negli organismi pluricellulari, la divisione asimmetrica ha uno scopo differente rispetto agli organismi unicellulari: in questi ultimi la divisione asimmetrica della cellula è necessaria per mantenere del materiale cellulare "vantaggioso" o, viceversa, per escludere del materiale "nocivo" per le cellule figlie, con sacrificio della cellula madre da cui deriva (Inaba e Yamashita, 2013).

Negli organismi pluricellulari, invece, il significato è più importante: le cellule staminali rappresentano una fonte rinnovabile di cellule differenziate e, per questo motivo, la divisione asimmetrica serve per mantenere un pool di cellule staminali senza depauperarlo oltre che, simultaneamente, continuare a fornire nuove cellule differenziate per l'organismo.

Si può affermare che la divisione cellulare asimmetrica sia un requisito fondamentale per lo sviluppo degli organismi pluricellulari: squilibri nelle popolazioni di cellule staminali e delle cellule differenziate possono portare a patologie, come la tumorigenesi e la degenerazione tissutale; in particolare esistono delle mutazioni che portano alla perdita della polarità cellulare e/o all'impossibilità di divisione asimmetrica corretta (Yamashita Y., 2009).

La divisione asimmetrica, però, rappresenta soltanto una delle modalità di divisione cellulare e non può sussistere da sola per garantire l'omeostasi dell'intero organismo. Esistono infatti le divisioni di tipo simmetrico che consentono sia l'auto-rinnovamento (due cellule figlie identiche alla cellula madre), che il differenziamento (due cellule differenziate che derivano dalla medesima cellula madre). Le divisioni simmetriche consistono, cioè, nella creazione di due cellule figlie che condividono lo stesso destino. L'equilibrio fra divisioni simmetriche e asimmetriche è possibile grazie a segnali ambientali e di sviluppo che servono per produrre numeri adeguati di cellule staminali e cellule figlie differenziate (Morrison and Kimble, 2006) a seconda delle necessità specifiche del tessuto in un particolare momento.

Le cellule staminali ematopoietiche (*Haematopoietic Stem Cells, HSCs*), per esempio, sono le uniche cellule, all'interno del sistema ematopoietico, che possiedono proprietà di multipotenza e

di autorinnovamento. Nel caso delle HSC, la multipotenza consiste nell'abilità di differenziarsi in tutte le linee di cellule del sistema ematopoietico; per autorinnovamento si intende abilità di dare origine a cellule figlie identiche tra loro e alla cellula madre, senza alcun differenziamento (Seita et al., 2010).

Le HSCs, in particolare, devono sottostare a divisioni asimmetriche per generare cellule che sostengano a lungo termine l'ematopoiesi e, ugualmente, cellule differenziate che costituiscano le diverse linee cellulari del sistema ematopoietico (Ho AD, 2004).

Le maggiori intuizioni, riguardo i meccanismi cellulari e molecolari di divisione asimmetrica, derivano da esperimenti su organismi invertebrati, come *Drosophila melanogaster* (Yamashita Y., 2009) e *Caenorhabditis elegans*, in cui una serie di divisioni asimmetriche regolate da geni che si sono conservati nel corso dell'evoluzione determinano la formazione di diversi tipi cellulari nell'organismo (Munro E. et al., 2009).

La divisione cellulare asimmetrica comprende una sequenza di processi coordinati il cui espletamento dipende da numerosi fattori, sia intracellulari che extracellulari, denominati "intrinseci" o "estrinseci" (Kimble e Morrison, 2006).

Progressi recenti hanno chiarito che i meccanismi finora conosciuti non sono sufficienti a spiegare la divisione asimmetrica e che si devono considerare molti altri fattori di regolazione (Venkei e Yamashita, 2018).

I meccanismi intrinseci includono l'assemblaggio di fattori di polarità cellulare e la segregazione, nelle cellule figlie, di determinanti del destino cellulare: i fattori vengono stipati a un polo della cellula e poi vengono trasmessi interamente a una sola cellula figlia in seguito alla divisione cellulare. Grazie alla coordinazione della divisione cellulare con separazione tra le due cellule figlie di fattori di polarità cellulare, le stesse acquisiscono destini differenti: di autorinnovamento o di differenziazione.

I meccanismi estrinseci consistono nell'influenza, da parte di segnali extracellulari, del destino della cellula staminale: essi hanno luogo nella "nicchia" delle cellule staminali.

Le nicchie costituiscono dei microambienti, all'interno dei tessuti, che mantengono e regolano le cellule staminali attraverso una fine comunicazione, sia di tipo fisico che molecolare. Le nicchie presentano alla cellula staminale dei segnali molecolari o instaurano con essa delle interazioni che contribuiscono ai meccanismi di trasduzione cellulare della stessa, necessari per definire l'identità finale della cellula staminale (Morrison e Spradling, 2008) (Figura 1).

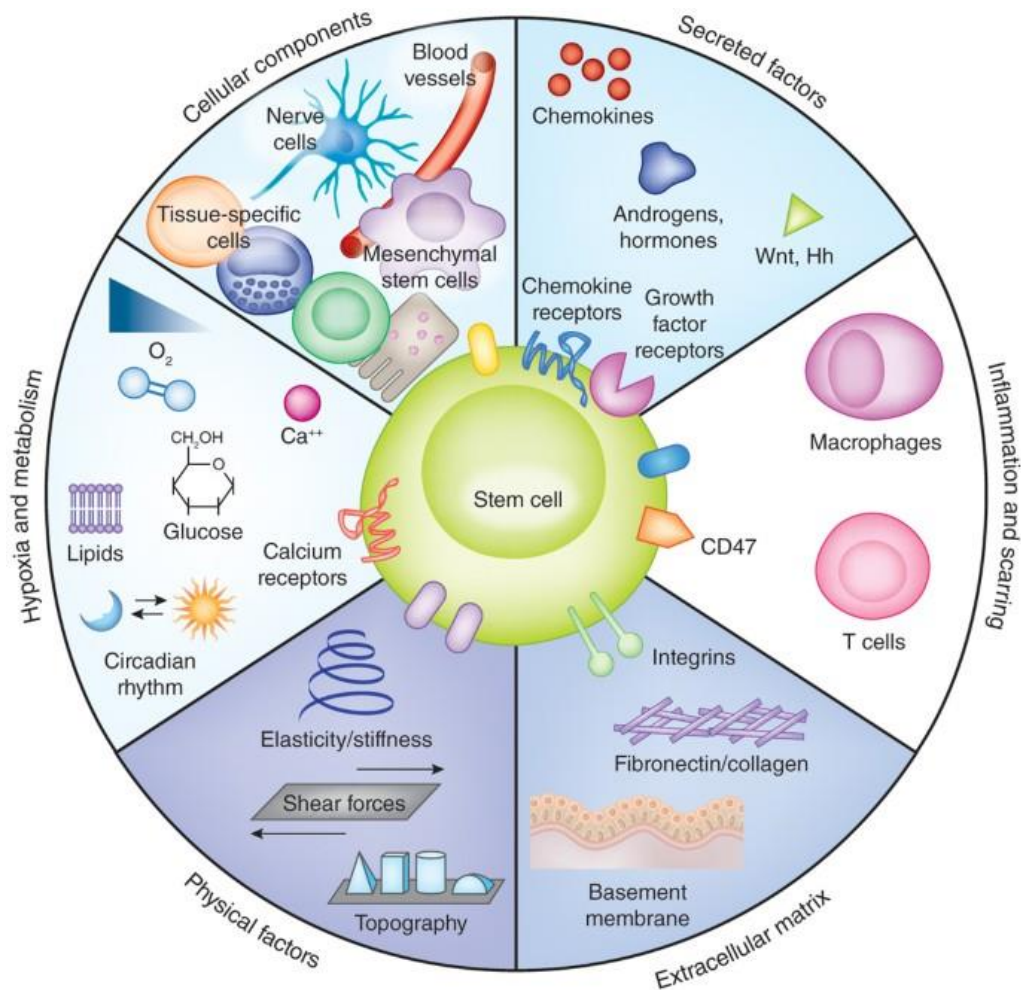


Figura 1: Organizzazione della nicchia delle cellule staminali (Lane S. et al, 2014).

In alcuni casi, le due cellule figlie derivanti dalla divisione cellulare asimmetrica sono equivalenti, ma il loro posizionamento in microambienti diversi (nella nicchia o al di fuori di essa) le guida verso differenziamenti in tipi cellulari differenti (Yamashita Y., 2009).

Esistono diverse modalità di segnalazione che influenzano e guidano il processo di sviluppo e divisione cellulare: fattori di trascrizione che regolano la pluripotenza (Oct-3/4, Sox2, Nanog e molti altri); il contatto diretto tra cellule adiacenti; l'attivazione di meccanismi di trasduzione cellulare; la presenza di alcune citochine (LIF e BMP4); meccanismi epigenetici (metilazione del DNA, modificazioni degli istoni, RNA non codificanti come lncRNA, miRNA e microRNA); processi metabolici (metabolismo di carboidrati, lipidi, glutamine) (Chen G. et al., 2022).

Le divisioni cellulari di tipo simmetrico sono tipiche dello sviluppo embrionale sia di organismi invertebrati che vertebrati. Alcune cellule staminali, nei mammiferi, cambiano modalità di divisione e passano da divisioni di tipo simmetrico a divisioni di tipo asimmetrico: durante lo sviluppo embrionale, si passa da una situazione di prevalenza di divisioni simmetriche che servono

ad espandere il pool di cellule staminali, a divisioni prevalentemente asimmetriche che consentono l'espansione del numero di cellule staminali differenziate verso metà e fine gestazione. Nonostante alcune cellule staminali adulte si dividano in modo asimmetrico in modo costante in condizioni di omeostasi, esse mantengono la capacità di dividersi simmetricamente per ricostituire il pool di cellule staminali in caso di deplezione a causa di danni o patologie, come è stato osservato nel sistema nervoso ed ematopoietico; per esempio, le divisioni simmetriche sono comuni in caso di riparazione di ferite e processi rigenerativi (Kimble e Morrison, 2006).

1.1.2. La nicchia delle cellule staminali

L'ipotesi dell'esistenza della nicchia delle cellule staminali è stata formulata nel 1978 grazie al lavoro di R. Schofield che intuì l'esistenza di un microambiente, all'interno del midollo osseo, con l'abilità di ricostituire l'intero pool ematopoietico: l'ipotesi proposta dall'autore consisteva nel considerare le cellule staminali non più come entità autonome e separate dall'ambiente in cui si trovano, ma in associazione ad altre cellule e immerse in un microambiente che ne influenza il comportamento se non, addirittura, il destino cellulare. Secondo questo studio, le cellule staminali si possono considerare delle cellule tissutali fisse (Schofield R., 1978).

Negli organismi pluricellulari, gruppi di cellule si specializzano all'interno di ogni tessuto ed organo per svolgere funzioni specifiche, ma nel corso dello sviluppo dell'organismo adulto, si verifica la perdita progressiva di queste cellule, che devono essere rimpiazzate. Per questo motivo, è vitale la compensazione da parte di nuove cellule funzionali: il mantenimento e la riparazione dei tessuti adulti fa affidamento sul turnover di una piccola popolazione cellulare – le cellule staminali adulte (Fuchs and Chen, 2013).

Le cellule staminali adulte costituiscono una popolazione cellulare eterogenea dal punto di vista trascrizionale, ma funzionalmente equivalenti nell'abilità di mantenere l'omeostasi tissutale e ristabilire l'integrità tissutale in seguito a danno (Goodel et al., 2015; Wabik e Jones, 2015).

La visione tradizionale delle popolazioni di cellule staminali come entità discrete comprendenti cellule funzionalmente equivalenti viene messa in discussione: secondo l'evidenza, in taluni tessuti, le cellule staminali potrebbero transire tra stati discreti, oppure continui, in cui vengono "commissionate" per destini specifici, ma la decisione finale (stocastica o governata) è influenzata localmente da fattori esterni alla cellula (Enver et al., 2009).

I tassi di proliferazione e di differenziazione delle cellule staminali devono essere perfettamente bilanciati: a seguito della divisione, una cellula figlia rimane all'interno del compartimento delle cellule staminali, e l'altra si differenzia direttamente nel tipo cellulare finale o attraversando una

serie limitata di divisioni, solo in questo modo può sussistere l'omeostasi tissutale (Krieger e Simons, 2015) (Fig. 2, Visvader JE e Clevers H, 2016).

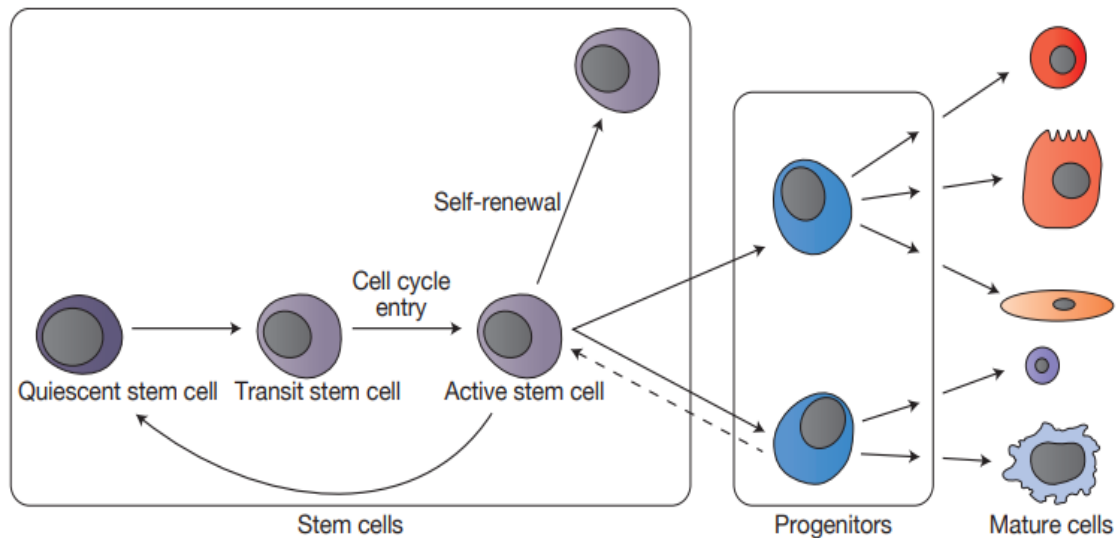


Figura 2: Quiescenza e attivazione delle cellule staminali tessuto-specifiche (Visvader JE e Clevers H, 2016).

Esistono due meccanismi principali che governano le divisioni cellulari asimmetriche: la ripartizione di componenti cellulari distinte tra le cellule figlie che determinano il fato cellulare, oppure, il posizionamento in microambienti differenti delle cellule figlie con conseguente esposizione a segnali extracellulari diversi; per questo motivo, anche se la divisione intrinseca è equa tra le cellule figlie, il destino ultimo della cellula figlia dipende dal suo posizionamento, all'interno o all'esterno, della nicchia delle cellule staminali (Morrison SJ and Kimble J, 2006).

Le cellule staminali, infatti, espletano la loro attività in un ambiente dinamico, ricco di segnali molecolari e fisici di feedback: i livelli di espressione genica cellulare di queste cellule fluttuano in risposta a segnali derivanti dal microambiente locale, o nicchia (Morrison e Spradling, 2008).

Una nicchia consiste di un microambiente tissutale locale in grado di ospitare e mantenere una o più cellule staminali: non si tratta di una proprietà tissutale generale, ma di un microambiente definito e localizzato (Morrison J. e Spradling C., 2008).

Diversi studi hanno suggerito l'esistenza di una nicchia, in base all'osservazione del mantenimento localizzato, in punti specifici dei tessuti, di cellule staminali grazie a segnali locali; ma la più chiara dimostrazione deriva da altri studi nei quali è stata investigata la funzione di nicchie di cellule staminali vuote, in un modello di studio di *Drosophila* in cui, dopo aver svuotato dalla popolazione cellulare residente la nicchia, si è osservato che essa può persistere, mandare dei segnali a cellule

di nuova introduzione, oltre che sostenere la proliferazione ectopica di cellule staminali (Kai T., Spradling A., 2003).

La nicchia è un ambiente complesso e dinamico che sostiene le cellule staminali e di cui indirizza il comportamento per tutto il ciclo di vita dell'organismo: si tratta di un microambiente in grado di cambiare a seconda del contesto di sviluppo e delle necessità dell'organismo animale (Hicks MR., Pyle AD., 2023).

Una funzione comune alle diverse nicchie di cellule staminali consiste nel sostenere ondate di progenitori in via di sviluppo e di cellule staminali e uno dei sistemi di nicchie più studiato riguarda la nicchia delle cellule staminali ematopoietiche (HSC), che porta, come detto, ad originare tutte le linee delle cellule del sangue (Hicks MR., Pyle AD., 2023).

Esistono delle nicchie specializzate per differenti tipi di cellule staminali ematopoietiche e per cellule progenitrici e ogni nicchia è costituita da multipli tipi cellulari che contribuiscono alla nicchia in modo unico e ridondante, per cui, al pari delle cellule staminali, esiste eterogeneità anche tra le nicchie di cellule staminali (Morrison SJ e Scadden DT, 2014; Ding L. e Morrison SJ, 2013).

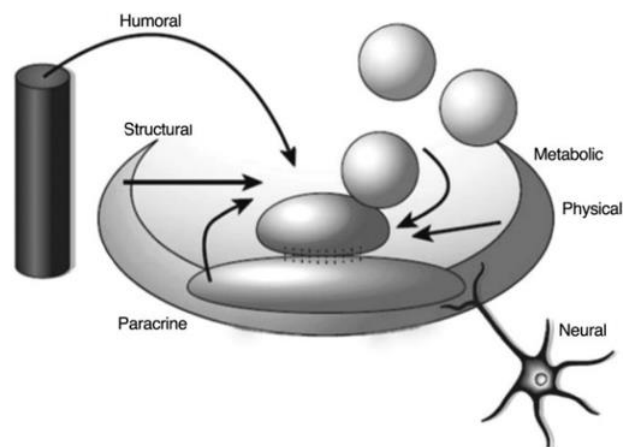


Figura 3: Segnali di natura molecolare e fisica contribuiscono a determinare il destino cellulare (Morrison SJ e Scadden DT, 2014).

La nicchia non si considera solamente come un luogo fisico per il mantenimento e l'auto-rinnovamento delle cellule staminali, bensì come un luogo in cui segnali estrinseci interagiscono e si integrano per influenzare il comportamento della cellula staminale: gli stimoli includono interazioni cellula-cellula e cellula-matrice e segnali molecolari che attivano e/o

reprimono geni e programmi di trascrizione (Ferraro F. et al., 2010) (Figura 3, Morrison SJ e Scadden DT, 2014).

I costituenti comuni delle nicchie di cellule staminali sono: 1. Cellule stromali di supporto, incluse molecole di adesione cellula-cellula e fattori solubili secreti, i quali si trovano in stretta vicinanza alle cellule staminali. 2. Le proteine della matrice extracellulare che fungono da ancoraggio alle cellule staminali e costituiscono un supporto meccanico che serve a trasmettere i segnali alle cellule staminali. 3. I vasi sanguigni che garantiscono una funzione trofica e l'arrivo di segnali sistemici alla nicchia derivanti da altri organi, oltre che partecipare al reclutamento di cellule staminali circolanti da e verso la nicchia (Ferraro et al., 2010).

La matrice extracellulare ECM che sostiene le cellule staminali all'interno della nicchia e controlla i processi cellulari, grazie alle sue diverse proprietà, gioca un ruolo critico nel controllo del destino cellulare. Le proprietà della ECM si possono suddividere in tre classi principali: biochimiche, geometriche, e meccaniche (Jhala D. & Rajesh V., 2015).

Per consentire la comunicazione tra cellule e molecole della matrice extracellulare esistono dei recettori specifici noti come "integrine". Esse trasmettono segnali dall'ECM alle cellule e sono cruciali per i segnali di proliferazione e differenziazione delle cellule staminali: il legame tra le proteine ECM e le integrine determina l'attivazione di percorsi di segnalazione che alterano l'organizzazione citoscheletrica della cellula; questo processo è noto come adesione focale (FA) o contatto focale (Gattazzo F. et al., 2014).

In più, l'interazione tra ECM e cellule staminali è bidirezionale. L'aderenza delle cellule staminali alla matrice facilita il rilascio di fattori di crescita che regolano la crescita delle cellule staminali. Di conseguenza, le cellule staminali attivano i geni per il rimodellamento dell'ECM e, successivamente, l'ECM riorganizzata influenza la differenziazione delle cellule staminali (Rasouli M. et al., 2021).

Nel periodo postnatale, il midollo osseo diviene il sito primario per il mantenimento delle HSC e per l'ematopoiesi e, in caso di stress del sistema ematopoietico la nicchia delle HSC può transitare ai siti extramidollari (Morrison SJ e Scadden DT, 2014).

È stato osservato, grazie a specifici marker cellulari, che la maggior parte delle cellule risiede in localizzazioni adiacenti ai vasi sinusoidali; inoltre, la maggior parte delle HSC si ritrova nella regione trabecolare del midollo osseo, suggerendo che le HSC vengono, direttamente o indirettamente, influenzate da fattori presenti vicino alla superficie ossea (Kiel MJ et al., 2005).

L'adiacenza delle HSC ai vasi sinusoidali suggerisce il mantenimento delle HSC in una nicchia perivascolare, grazie al supporto da parte di cellule endoteliali e perivascolari: la posizione vicino

ai vasi potrebbe indicare il possibile transito delle HSC, che si considerano cellule mobili e in grado di entrare e uscire regolarmente dal circolo ematico (Sugiyama T. et al., 2006; Sahin AO e Buitenhuis M., 2012).

Le nicchie di cellule staminali sono riscontrabili in altri tessuti: le cellule staminali del follicolo pilifero (HFSCs, *Hair Follicle Stem Cells*), presenti a livello di bulbo pilifero, entrano continuamente nel ciclo proliferativo per generare il follicolo pilifero e, in corso di un processo di guarigione di una ferita sono in grado di ricostituire le ghiandole sebacee e riparare l'epidermide (Lee SA et al., 2020).

Le cellule staminali intestinali (ISC, *Intestinal Stem Cells*), residenti a livello di cripte intestinali, mantengono l'omeostasi dell'epitelio intestinale e sono suscettibili al danno epiteliale indotto da agenti chimici, patogeni o da radiazioni. Le cellule staminali intestinali sono cellule longeve con la capacità di autorinnovarsi grazie alla nicchia circostante, a cui contribuiscono le cellule di Paneth, oltre che gli enterociti, le cellule enteroendocrine e le cellule stromali in caso di ablazione cellule di Paneth (Kurokawa K et al., 2020).

In condizioni di omeostasi del tessuto muscolare, le cellule satelliti sono normalmente quiescenti: in risposta a danni muscolari, dei segnali dalla nicchia alterata attivano le cellule satelliti e promuovono l'attività miogenica. Le ASCs (*Activated Stem Cells*) vanno incontro a un'attività biosintetica aumentata e a proliferazione cellulare per supportare il processo rigenerativo; in seguito, le cellule possono differenziarsi e integrarsi nel sito di danno tissutale oppure autorinnovarsi e ricostituire il pool di cellule satelliti quiescenti (QSC) per far fronte a possibili futuri danni muscolari (Sousa-Victor, P et al., 2022).

La neurogenesi avviene, principalmente, in due nicchie neurogeniche all'interno dell'encefalo dei mammiferi, tra cui la zona subgranulare del giro dentato dell'ippocampo e la zona sottoventricolare a livello del ventricolo laterale: la neurogenesi è garantita grazie alle cellule staminali neurali (NSC, *Neural Stem Cells*) e alla loro interazione continua con la nicchia delle cellule staminali (Li Y, Guo W., 2021).

1.1.3. Quiescenza e attivazione delle cellule staminali

Le cellule staminali presentano diverse strategie per far fronte alla continua richiesta di nuove cellule da parte dell'organismo. Una di queste è la quiescenza, una condizione che consente alle cellule di rimanere in uno stato di non proliferazione e di mantenere un pool di cellule madri il cui materiale genetico sia protetto da mutazioni durante i cicli di divisione cellulare; infatti, l'accumulo di danni a carico del DNA è un segno distintivo dell'invecchiamento cellulare che

causa l'invecchiamento tissutale oltre che, in taluni casi, la trasformazione maligna delle cellule (Walter et al., 2015).

Dunque, l'omeostasi tissutale è garantita grazie alla presenza di cellule staminali che, grazie a un network di segnali complesso, vanno incontro a processi di autorinnovamento o di differenziazione.

La quiescenza è una caratteristica essenziale per le cellule ematopoietiche: la possibilità di continuare a creare cellule nuove disponibili per il circolo ematico, mantenendo un pool di cellule quiescenti, è necessaria durante l'embriogenesi e durante la vita adulta dell'organismo (Nakamura-Ishizu A et al., 2014).

Nella linea ematopoietica si distinguono due popolazioni distinte di HSCs: le LT-HSCs (*Long Term Haematopoietic Stem Cells*) o HSC dormienti e le ST-HSCs (*Short Term Haematopoietic Stem Cells*). Le LT-HSCs hanno un potenziale rigenerativo significativo e si trovano in uno stato di quiescenza più profondo rispetto alle ST-HSC, si dividono solo poche volte nel corso della vita. Le ST-HSC, a differenza delle precedenti, sono già innescate per entrare nel ciclo cellulare (Wilson A et al., 2007).

Le LT-HSCs e le ST-HSCs contribuiscono in modo differente alle nuove generazioni di cellule ematopoietiche: le ST-HSCs mantengono continuamente la nuova produzione di cellule ematiche circolanti, invece, le LT-HSCs si attivano solamente in situazioni di danno al sistema ematopoietico (Wilson A et al., 2008).

La quiescenza è uno stato finemente regolato da segnali intrinseci ed estrinseci anche se, a lungo, è stato considerato erroneamente come uno stato di inerzia cellulare (Urban N e Cheung TH, 2021). Lo stato di quiescenza viene adottato normalmente dalle cellule per far fronte a condizioni sfavorevoli che ostacolano la proliferazione cellulare (privazione di nutrienti e inibizione da contatto), ma non solo: alcune cellule, in particolare le cellule staminali, entrano nello stato di quiescenza per preservare l'integrità genomica e la capacità di proliferare per una durata pari alla vita dell'organismo, anche in condizioni di stress metabolico (Cheung TH e Rando TA, 2013).

La fase G0 del ciclo cellulare precedentemente veniva considerata solamente come una fase di inattività cellulare di cui fanno parte le cellule differenziate, non più in grado di rientrare nel ciclo cellulare. In realtà, le cellule somatiche possono entrare in una fase G0 reversibile (quiescenza) o irreversibile (senescenza). Il punto critico oltre il quale viene deciso il destino cellulare è denominato *Restriction Point* o *R-Point* a livello di fase G1: le cellule possono differenziarsi, diventare senescenti, oppure, rientrare nello stato di quiescenza (Cheung TH e Rando TA, 2013).

Una caratteristica comune delle cellule staminali quiescenti è l'alta potenzialità di integrazione tissutale e di autorinnovamento in seguito a trapianto a confronto della progenie (de Morree A e Rando TA, 2023).

La quiescenza delle cellule staminali è controllata da meccanismi intrinseci ed estrinseci, derivanti dalla cellula stessa o dal microambiente in cui le cellule staminali sono immerse.

Per esempio, l'entrata e l'uscita di una cellula rispetto allo stato di quiescenza vengono orchestrate da una combinazione di processi intrinseci quali: la regolazione della trascrizione di geni che regolano il ciclo cellulare, le modificazioni epigenetiche della cromatina, il controllo mediato dai miRNA dell'espressione genica (Cho IJ et al., 2019).

Tra i meccanismi intrinseci fondamentali che governano la quiescenza cellulare sussistono diversi fattori che impediscono la progressione del ciclo cellulare: E2F media la trascrizione di geni regolanti il ciclo cellulare; nelle cellule quiescenti E2F viene represso tramite il legame con RB. L'abilità repressiva di RB viene modulata dal complesso CDK/cicline, che a sua volta viene regolato dagli inibitori CDK/cicline (Engeland K, 2022).

Inoltre, sussiste una regolazione intrinseca della quiescenza di natura metabolica: attraverso la macroautofagia, ovvero un processo di "autodigestione cellulare", la cellula ricicla il suo contenuto citoplasmatico ricavando l'energia necessaria per rallentare lo stato metabolico, quindi, mantenere lo stato di quiescenza, aumentando i nutrienti liberi ed eliminando ROS (*Reactive Oxygen Species*) e cataboliti cellulari (Griffwy CJ e Yamamoto A, 2022; Ho TT et al., 2017).

L'inibizione del metabolismo si ottiene anche tramite mitofagia, o repressione dei geni che regolano la biogenesi e la funzione mitocondriale; viceversa, un aumento della funzione mitocondriale porta alla perdita della quiescenza (Joshi A e Kundu M, 2013).

La produzione di ATP da parte delle cellule in quiescenza avviene per mezzo della glicolisi anaerobia (Marescal O e Cheeseman IM, 2020).

L'assetto epigenetico del materiale genetico delle cellule quiescenti differisce notevolmente rispetto alle cellule staminali in attività cellulare, in particolare, la metilazione del DNA sembra avere un ruolo importante nel reprimere la differenziazione cellulare e nel mantenere le cellule staminali in uno stato di quiescenza (Urban N e Cheung TH, 2021).

Anche i miRNA possiedono la capacità di modulare l'espressione genica e più tipi di cellule staminali tessuto-specifiche (NSCs, HSCs, MuSCs e HFSCs) hanno un profilo di miRNA comune, ciò suggerisce un ruolo dei miRNA nella regolazione della quiescenza delle cellule staminali (Cho IJ et al, 2019).

È stato dimostrato che diversi miRNA coordinano la progressione del ciclo cellulare delle cellule staminali. Livelli alterati di miRNA contribuiscono a condizioni patologiche, come la proliferazione cellulare incontrollata tipica delle forme neoplastiche, a causa della perdita della regolazione del ciclo cellulare (Mens MMJ e Ghanbari M, 2018).

Tra i fattori estrinseci che regolano la quiescenza delle cellule staminali si annoverano segnali ambientali che derivano dalla nicchia delle cellule staminali, quindi, dalle cellule stromali di supporto e altri tipi cellulari che secernono fattori solubili e che, tramite l'interazione cellula-cellula, influenzano il comportamento delle cellule staminali, oltre che dall'adesione alla matrice extracellulare o ECM (Cho IJ et al., 2019).

1.1.4. Classificazione delle cellule staminali

1.1.4.1. Classificazione in base all'origine

Le cellule staminali si suddividono in base alle fonti da cui derivano in quattro gruppi principali (Bacakova L. et al., 2018):

- Embrionali;
- Fetali, da feto, placenta (amnios, corion), fluido amniotico, cordone ombelicale (gelatina di Wharton, sangue);
- Adulte, da tessuto adiposo, midollo osseo, muscolo scheletrico, cute, sangue;
- iPSCs o *Induced Pluripotent Stem Cells*. Queste ultime sono cellule somatiche riprogrammate che acquisiscono caratteristiche delle cellule staminali embrionali (Ohnuki M e Takahashi K., 2015).

1.1.4.2. Classificazione in base al potenziale di differenziazione

L'abilità di differenziazione varia tra le cellule staminali a seconda della loro origine e derivazione. Tutte le cellule staminali si possono classificare in cinque gruppi: totipotenti, pluripotenti, multipotenti, oligopotenti e unipotenti (Fig. 4, Kyo S. et al., 2011).

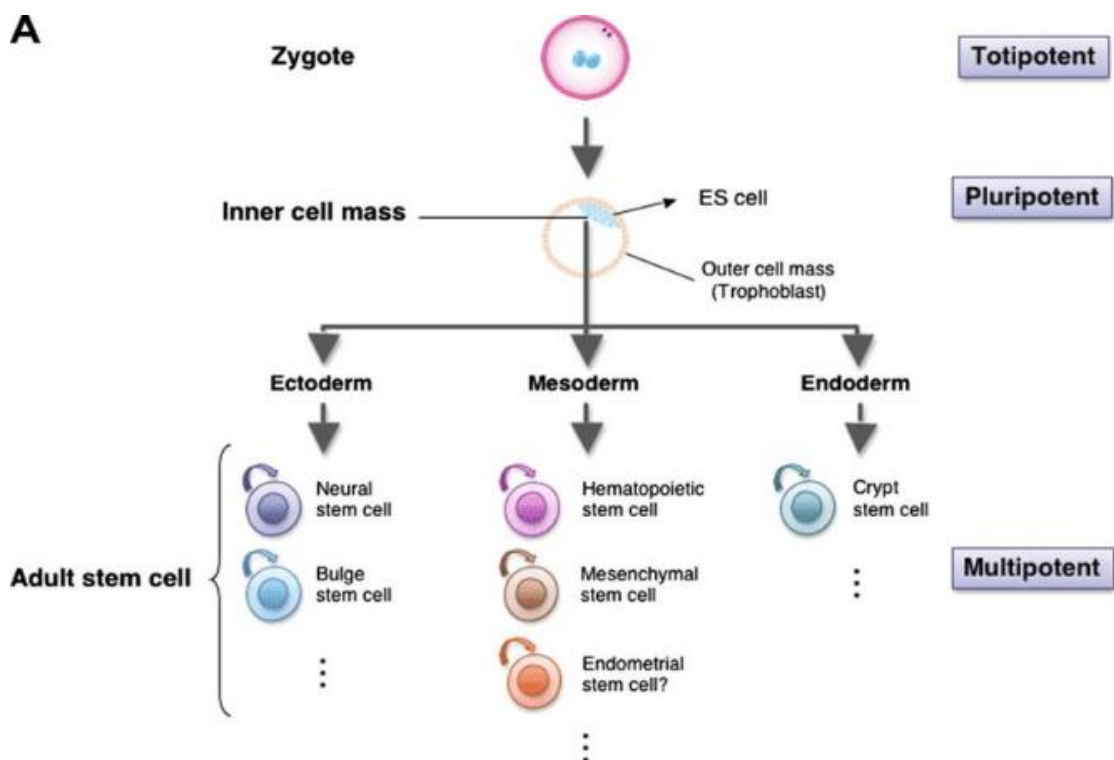


Figura 4: La gerarchia delle cellule staminali in base all'origine e all'abilità di differenziazione (Kyo S. et al, 2011).

Questi gruppi di cellule staminali differiscono nella potenza, nell'attivazione genica e quindi nel numero di cellule in cui possono differenziarsi. Le cellule staminali embrionali che derivano dalla morula sono totipotenti: possono differenziarsi in qualsiasi tipo cellulare, incluse le cellule della placenta. (Bacakova L. et al., 2018).

La definizione più rigorosa di "cellula totipotente" indica una singola cellula in grado di dare origine a un nuovo organismo, dato un sostegno materno appropriato. Una definizione più ampia considera le cellule totipotenti come cellule in grado di dare origine a tutti i tessuti extraembrionali compresi i tessuti dell'organismo e la linea germinale. (Baker CL e Pera MF, 2017).

Grazie ad alcuni studi sperimentali è stato dimostrato che la totipotenza si estende solamente fino allo stadio di sviluppo a due cellule nel topo, o fino a 4/8 cellule nella pecora, nel bovino e nella scimmia (Suwinska A., 2012).

Le cellule staminali pluripotenti originano in corrispondenza della formazione della massa cellulare interna e quando la linea cellulare del trofoectoderma viene stabilita. Prima di questo punto le cellule embrionali si considerano totipotenti. (Baker CL e Pera MF, 2017).

La pluripotenza si definisce come la proprietà delle cellule staminali di differenziarsi nelle cellule di tutti e tre i foglietti embrionali: endoderma, mesoderma, ectoderma. In vivo, la presenza di

cellule pluripotenti è transitoria e avviene durante le fasi precoci dello sviluppo embrionale (De Miguel MP et al., 2010).

Si considerano cellule pluripotenti sia le cellule embrionali che le cellule indotte, invece, le cellule più differenziate, come le cellule adulte multipotenti o le cellule staminali tessuto specifiche, hanno un potenziale di differenziazione più ristretto per una o più linee cellulari (Guadix JA et al., 2017). Le cellule multipotenti si riscontrano in ogni tessuto e si differenziano nelle cellule di derivazione di un solo foglietto embrionale (mesoderma): le cellule stromali mesenchimali (MSCs, *Mesenchymal Stem Cells*) sono le principali cellule multipotenti riconosciute (Caplan AI, 1991). Esse possono essere isolate da diversi tessuti: midollo osseo, tessuto adiposo, tessuto osseo, gelatina di Wharton, sangue del cordone ombelicale, sangue periferico (Kolios G. e Moodley Y., 2012).

Anche le cellule ematopoietiche sono un esempio di cellule staminali multipotenti: la capacità di dare origine a tutti i tipi cellulari del sistema ematico è un aspetto fondamentale delle *Haematopoietic Stem Cells*, HSCs. (Laurenti E. e Göttgens B., 2018).

Le cellule staminali oligopotenti sono in grado di autorinnovarsi e creare due o più linee cellulari all'interno di un tessuto specifico. Le cellule staminali unipotenti sono in grado di autorinnovarsi e differenziarsi in un solo tipo cellulare, un esempio sono le cellule satelliti del tessuto muscolare: l'attivazione delle cellule satelliti quiescenti genera delle cellule amplificatrici, o dei progenitori miogenici, che prima della differenziazione vanno incontro a divisioni multiple (Feige P. et al., 2018).

Le cellule attualmente impiegate a scopo terapeutico in Medicina Veterinaria sono le cellule staminali adulte, in particolare, le cellule stromali mesenchimali (MSCs) sono tra le più studiate nonostante il potenziale proliferativo minore rispetto alle cellule staminali embrionali (ESCs) e alle cellule pluripotenti indotte (iPSCs). A loro favore, le MSCs sono più semplici da ottenere dai tessuti, non presentano problemi etici come per le cellule embrionali, sono capaci di una grande espansione *in vitro* e un basso rischio di portare alla formazione di teratomi (Guadix JA et al., 2017).

2. Le cellule stromali mesenchimali (MSCs)

2.1. Scoperta delle cellule stromali mesenchimali

Le MSCs sono delle cellule staminali multipotenti, di origine mesodermica, capaci di differenziarsi in diversi tipi di cellule mesenchimali specializzate come osteoblasti, condrociti, adipociti, tenociti e altri (Caplan AI, 1991).

Grazie a una serie di studi di Friedenstein A. e colleghi le MSCs vennero identificate, tra il 1960 e il 1970 per la prima volta, come una popolazione di cellule, derivanti dal midollo osseo, con potenziale osteogenico e distinguibili dalle altre cellule di derivazione ematopoietica, anch'esse presenti all'interno del midollo osseo. Questi lavori iniziali dimostrarono che le cellule osteogeniche ed ematopoietiche derivano da precursori differenti presenti nel midollo osseo (Friedenstein et al., 1966; Friedenstein et al., 1968).

Inoltre, si dimostrò, grazie agli esperimenti di Friedenstein e Kuralesova (1971) che il tessuto osseo eterotopico, formatosi nell'animale ospite in seguito a trapianto di cellule del midollo osseo, era autosufficiente e non veniva rimodellato dalle cellule dell'animale ospite: le cellule del midollo osseo erano, quindi, in grado di generare continuamente tessuto osseo.

Per definire meglio la natura di queste cellule osteogeniche Friedenstein e colleghi (1970) trovarono il modo per isolare le cellule stromali dal midollo osseo; le cellule con potenziale osteogenico erano distinguibili per l'aderenza alla plastica e per l'aspetto fibroblastoide: l'impianto di queste cellule dimostrò la creazione di colonie discrete iniziate a partire da singole cellule (*Fibroblastic Colony Forming Units* o CFU-Fs).

Il trapianto in vivo portò all'identificazione di tessuti multipli di origine mesodermica (Friedenstein et al., 1990), quali il tessuto osseo, cartilagineo, adiposo, fibroso, che potevano essere generati sperimentalmente, partendo da una singola cellula stromale del midollo osseo. Fu Arnold Caplan AI nel 1991 a descrivere approfonditamente l'origine e lo sviluppo delle MSCs: le "cellule staminali mesenchimali", nome coniato per identificare queste cellule, non sono limitate da un numero specifico di divisioni mitotiche, ma sono cellule influenzate da fattori intrinseci ed estrinseci che le guidano verso percorsi di sviluppo specifici e differenti. La popolazione di MSCs, derivante dal midollo osseo, può dare origine a uno spettro di tessuti di origine mesenchimale che sono il prodotto di diversi step di sviluppo a partire da una comune cellula indifferenziata verso distinti percorsi di differenziazione cellulare (Fig.5, Caplan AI, 1991; Fig. 6, Caplan AI e Correa D, 2011),

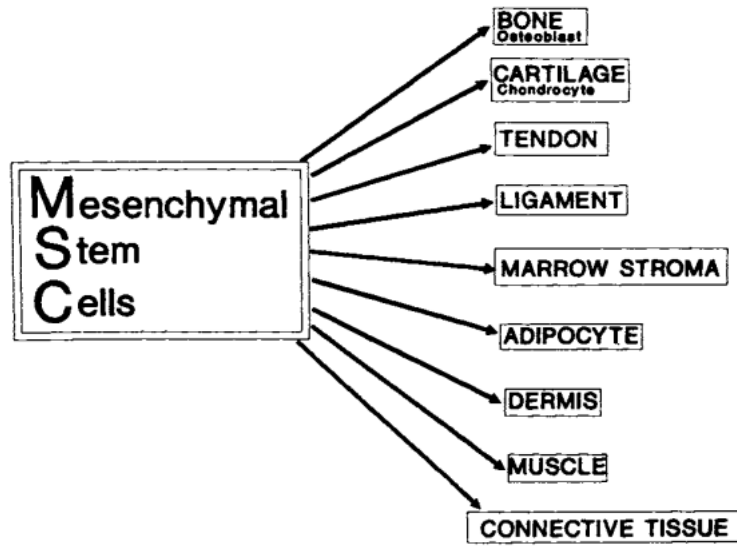


Figura 5: primo schema costruito per descrivere i fenotipi di cellule staminali mesenchimali (Caplan AI, 1991).

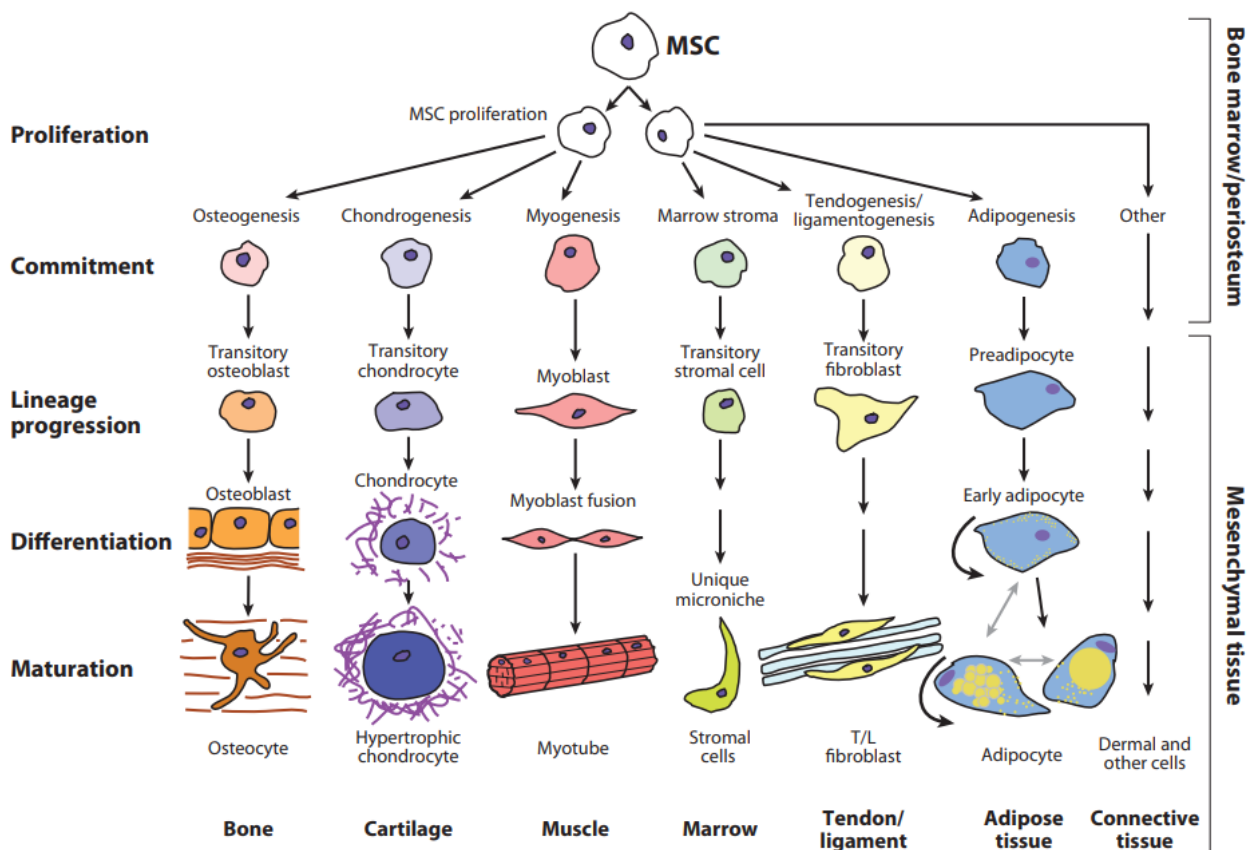


Figura 6: il processo mesengenic: genesi delle linee cellulari di origine mesenchimale (Singer NG, Caplan AI, 2011).

2.1.1. La nomenclatura

Le difficoltà nella nomenclatura delle cellule, impiegate nella medicina rigenerativa, derivano dall'impossibilità di riassumere in unico termine le loro numerose proprietà ed effetti che presentano: la staminalità intesa come multipotenza, la capacità di differenziazione in più linee cellulari e l'autorinnovamento (Caplan AI e Correa D, 2011), cui si aggiungono specifiche funzioni biologiche associate a queste cellule in un secondo tempo, con la progressione degli studi.

La prima terminologia comunemente accettata di “cellule staminali mesenchimali”, introdotta per la prima volta da A. Caplan nel 1991 venne usata per comprendere le caratteristiche delle cellule isolate da midollo osseo, tessuto adiposo e altri tessuti, con l'abilità di differenziare in multiple tipologie cellulari (Caplan AI, 1991).

La nozione di “cellula stromale” venne introdotta da M. Owen per indicare la matrice, comune ad ogni tessuto, in cui erano immerse e da cui erano isolabili le cellule staminali mesenchimali: lo stroma (Owen ME, 1985).

Il concetto di “stroma”, intendendo il tessuto connettivale come origine delle cellule multipotenti, è stato rivisto in seguito poiché, secondo alcuni autori, si tratta di una struttura non chiaramente identificabile e che non supporta realmente lo sviluppo di più linee cellulari all'interno del midollo osseo (Caplan AI, 2017).

Per l'avversione al termine di “cellule staminali mesenchimali”, che fa riferimento erroneamente alla staminalità delle cellule impiegate nelle terapie rigenerative, alcuni autori proposero il concetto di “cellule stromali mesenchimali multipotenti”: il termine “staminali” fa riferimento a precisi criteri, di autorinnovamento a lungo termine e differenziazione in multipli tipi cellulari *in vivo*, che le cellule in questione non possiedono (Horwitz et al., 2005).

La terminologia più recente proposta è di “*Medicinal Signalling Cells*” o “Cellule medicinali di segnalazione” da parte di A. Caplan (Caplan AI, 2017) che fa riferimento al funzionamento principale delle cellule dopo la loro somministrazione *in vivo* nel corso della terapia: si tratta di cellule con attività secretoria, di numerosi fattori trofici, immunomodulatori e antiinfiammatori e si possono paragonare, per questo motivo, alle comuni terapie farmacologiche (Caplan AI, 2017). Quest'ultima definizione vuole rimpiazzare il concetto fuorviante di “cellule staminali”: queste terapie cellulari non funzionano grazie al loro potenziale rigenerativo e di sostituzione con nuove cellule, ma grazie al loro potenziale trofico, con cui stimolano le cellule residenti, tessuto-specifiche, a rigenerare il tessuto interessato dalla lesione (Caplan AI, 2017).

2.2. Identità e funzioni, multipotenza

Non esistono ancora dei criteri che definiscano in modo univoco le MSCs anche se l'uso clinico di queste cellule richiede una standardizzazione e un metodo oggettivo per poterle distinguere in base alle loro proprietà ed effetti *in vivo*.

L'ideale, per poter progredire nel campo delle terapie rigenerative cellulari, richiederebbe la caratterizzazione estensiva delle cellule per assicurare la qualità delle terapie in uso, la purezza delle cellule isolate e la sicurezza in seguito alla somministrazione delle cellule agli animali ospiti (Uder C. et al., 2018).

Per ovviare alla mancanza di uniformazione delle caratteristiche richieste per le MSCs è stata stilata una lista di criteri di identificazione, da parte dell'ISCT (*International Society for Cell Therapy*) nel 2006, ma ancora non definitiva nell'ottica dell'applicazione clinica.

I criteri elencati sono tre:

- Aderenza alla plastica;
- Espressione di specifici antigeni di superficie;
- Abilità di differenziazione in: adipociti, osteoblasti e condroblasti, per MSCs sottoposte a particolari condizioni di coltura *in vitro*.

Almeno il 95% delle cellule presenti nella popolazione di cellule esaminata deve presentare gli antigeni di superficie CD105, CD73, CD90 e, meno del 2% dovrebbe presentare antigeni quali CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79alfa, CD19, HLA di classe II, che sono antigeni tipi della linea ematopoietica (Dominici M. et al., 2006).

Il problema principale nella definizione di markers specifici delle MSC risiede nel fatto che gli antigeni di superficie presenti possono variare a seconda di più fattori, quali: le condizioni di coltura, il grado di differenziazione, il tessuto di isolamento, la specie animale considerata (Chamberlain G. et al., 2007); in più molti markers possono essere comuni ad altre tipologie cellulari (Uder C. et al., 2018).

Le MSCs presentano, inoltre, numerose molecole di superficie, oltre ai markers antigenici, quali molecole di adesione; ciò suggerisce la continua interazione tra le MSCs e le altre linee cellulari (Barry FP e Murphy JM; 2004).

Le molecole di adesione presenti a livello di superficie cellulare rappresentano degli elementi fondamentali per la comunicazione *cell-to-cell* e tra cellula e matrice extracellulare e, quindi, per la migrazione delle MSCs (Majumdar MK et al., 2003).

Di conseguenza, l'abilità di *homing* delle cellule stromali mesenchimali, intesa come l'abilità di migrare preferenzialmente verso il sito di lesione nell'organismo, è permessa dalle molecole di

adesione, che sussistono sia sulle MSCs che sulle cellule presenti nel sito di lesione, consentendo l'adesione tra di esse (Ullah M. et al., 2019).

Tra le molecole di adesione ci sono, in particolare quattro famiglie, tra cui le immunoglobuline, le integrine, le caderine e le selectine (Ren G. et al., 2011).

Le MSC sono cellule multipotenti, non ematopoietiche, con morfologia simil fibroblastica e di origine mesodermica, in grado di differenziare in tre linee cellulari: adipogenica, condrogenica e osteogenica; sembrano essere presenti in quasi tutti i tessuti dell'organismo (Jimenez Puerta GJ et al., 2020).

Le MSCs sono ottenibili da più fonti e, una volta isolate dalla fonte tissutale, possono essere coltivate *in vitro*: in condizioni colturali definite differenziano nelle cellule tissutali di origine mesodermica, quali osteociti, condrociti, adipociti (Fig. 7, Barry FP e Murphy MP; 2004), oltre che mioblasti e cardiomiociti. Le MSCs sembrano, inoltre, in grado di differenziare in linee cellulari di differente origine embrionale (Guadix JA et al., 2017).

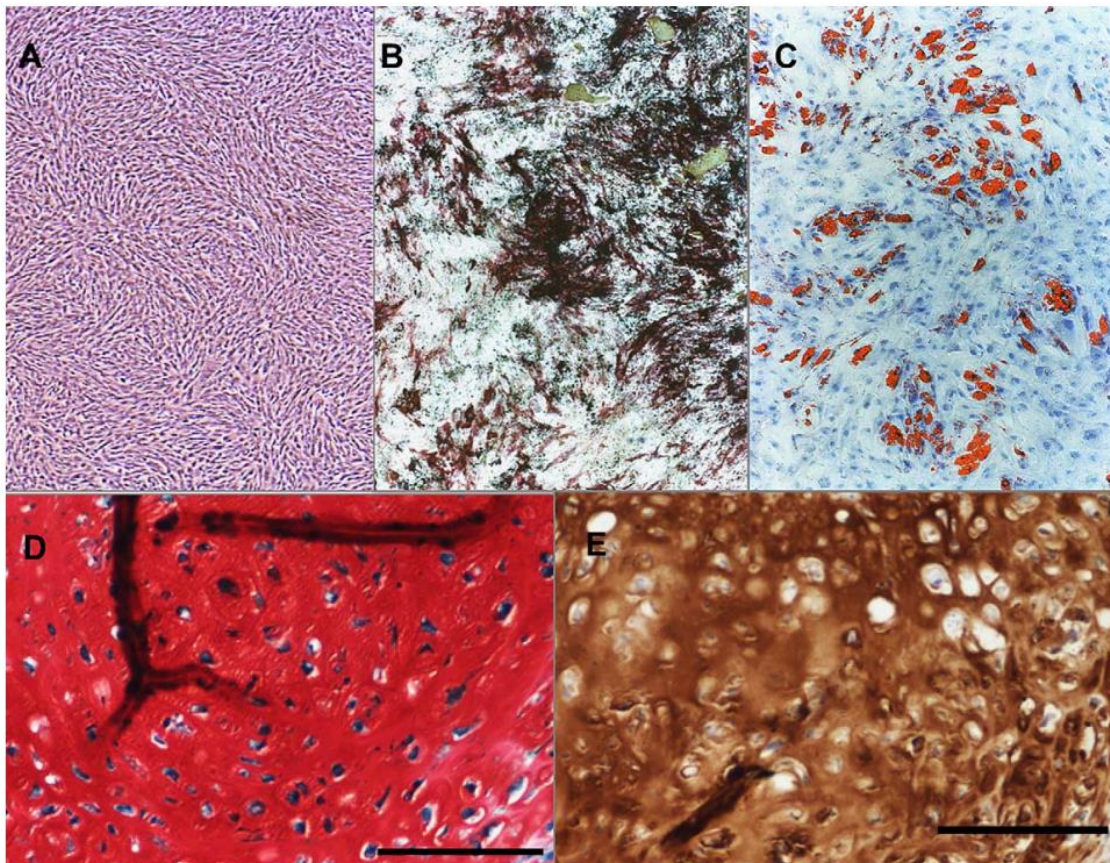


Figura 7, MSCs indifferenziate (A); in seguito a differenziazione lungo la linea osteogenica (B), adipogenica (C); condrogenica (D, E). (Barry FP e Murphy MP; 2004).

Alcuni studi si sono focalizzati sul potenziale differenziativo delle MSCs *in vitro* impiegando agenti chimici e fattori di crescita per ricreare le condizioni tissutali: in realtà, i rilevamenti *in vitro* potrebbero non coincidere con il quadro molecolare *in vivo*, in quanto i segnali di trasduzione, presenti a livello cellulare nei tessuti dell'organismo, non sono riproducibili in condizioni sperimentali, con conseguenti discrepanze sul potenziale differenziativo *in vitro* e *in vivo* (Gimble JM et al., 2008).

Secondo diversi studi l'abilità di differenziazione delle MSCs si estende oltre le cellule tissutali di origine mesodermica. Sembra possibile, in particolari condizioni colturali, la differenziazione verso linee di origine ectodermica ed endodermica: in neuroni (Safford KM et al., 2002), epatociti (Chen Y et al., 2007) e cardiomiociti (Pijnappels DA et al., 2017).

Altri studi hanno suggerito le proprietà delle MSCs di attecchimento e differenziazione *in vivo*: è da chiarire il ruolo della differenziazione rispetto al ruolo trofico e di interazione cellulare nell'ottenimento della rigenerazione tissutale (Kim N e Cho SG, 2013).

Gli effetti terapeutici delle MSCs nei tessuti lesionati sono dovuti in gran parte alla loro capacità trofica e immunomodulatoria, ma è stata descritta, in seguito alla loro somministrazione per via sistemica, la possibilità di differenziazione in diverse linee cellulari tessuto-specifiche (Wei X et al., 2013) (Fig. 8, Han Y et al, 2019).

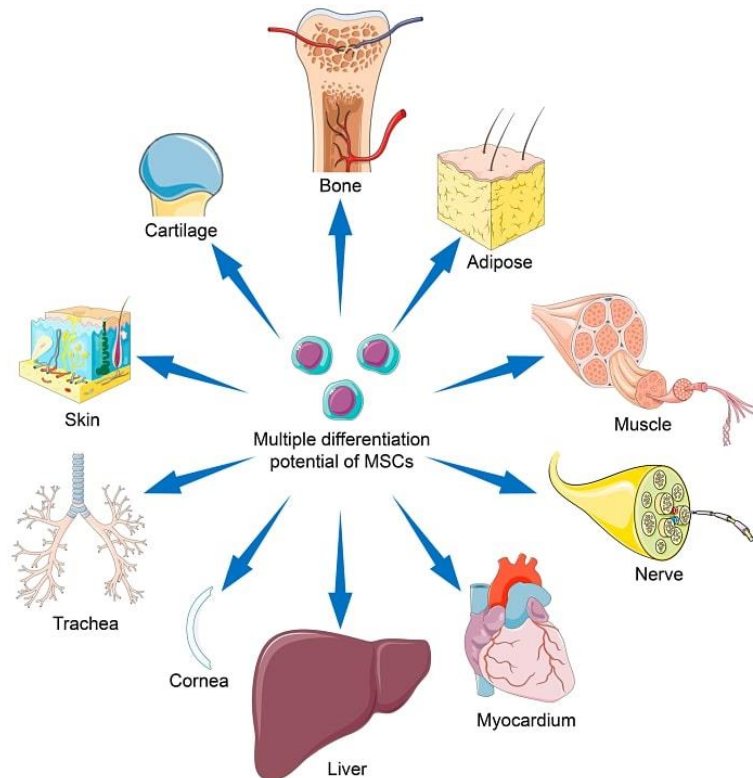


Figura 8: potenziale differenziativo delle MSCs (Han Y et al., 2019).

2.3. Le fonti

Le MSCs possono essere isolate da una grande varietà di tessuti, tra cui il tessuto adiposo, il midollo osseo, la cartilagine, il muscolo, il tessuto osseo, il cordone ombelicale (dal sangue del cordone ombelicale e dalla gelatina di Wharton), la placenta e il sangue periferico.

2.3.1. MSCs e periciti

Secondo alcuni studi esiste una correlazione tra le MSCs e i periciti (o cellule perivascolari): le MSCs presentano i markers di superficie propri dei periciti (CD146+, CD34-, CD45-, CD56-) e, viceversa, i periciti mostrano l'abilità di differenziazione *in vitro* nella linea adipogenica, condrogenica e osteogenica (Caplan AI, 2008); inoltre, entrambe le tipologie cellulari *in vitro* sopprimono la proliferazione dei linfociti CD3+ e, analizzando il profilo genetico, si è osservato che presentano profili di espressione genica molto simili (da Silva Meirelles L et al., 2015).

Le cellule perivascolari isolate da diversi tessuti di origine umana presentano abilità miogeniche e, coltivate *in vitro* per più passaggi, danno origine a progenitori cellulari multipotenti, con caratteristiche di aderenza e con i medesimi antigeni di superficie delle MSCs adulte (Crisan M. et al, 2008).

Quindi, i periciti si possono considerare, con grande probabilità, la controparte delle MSCs *in vivo*: ne risulta che le MSCs possono essere isolate virtualmente da tutti i tessuti vascolarizzati. Da questi ritrovamenti, si può anche ipotizzare che i periciti abbiano un ruolo rigenerativo e di turnover nel tessuto in cui risiedono. Non c'è però ancora evidenza che sussistano *in vivo* delle cellule funzionalmente identiche alle MSCs *in vitro* (Craig DJ et al, 2022).

Le MSCs, isolate da diversi tessuti, possiedono caratteristiche comuni in termini di markers di superficie e di multipotenza, ma esistono delle differenze che dipendono dal tessuto di origine, per esempio, per quanto riguarda il potenziale differenziativo verso specifiche linee cellulari di origine mesodermica (adipogenica, condrogenica e osteogenica) (Lin H. et al., 2019).

Le cellule multipotenti adulte, isolate da tessuti differenti, non differenziano tutte con la stessa abilità nelle tre linee mesodermiche: è stato dimostrato che le cellule staminali proprie di ogni tessuto tendono a specializzarsi verso le cellule del tessuto da cui derivano, rispetto alle altre linee cellulari (Pizzute T. et al, 2015).

Conoscere i fattori che influenzano la differenziazione verso la linea adipogenica, condrogenica o osteogenica risulterebbe utile per comprendere quale fonte tissutale possa risultare più adeguata ed efficiente per la terapia cellulare desiderata (Xu L. et al, 2017).

Tra i fattori che influenzano il destino cellulare delle MSCs si annoverano: il profilo genetico, modificazioni epigenetiche (metilazione del DNA), l'espressione di proteine della matrice extracellulare e i fattori secreti (Pizzute T. et al, 2015).

La fonte delle cellule staminali adulte e l'età del donatore sono dei criteri essenziali nella determinazione dell'efficacia delle terapie rigenerative (Babenko VA et al., 2021).

Dagli studi in letteratura emerge che le MSCs sono isolabili da quasi tutti i tessuti presenti nell'organismo, ancora però non esistono indicazioni chiare che stabiliscano quale fonte tissutale sia la più vantaggiosa per applicazioni terapeutiche specifiche (Mocchi M. et al, 2020).

Per le terapie rigenerative ad uso veterinario le fonti più impiegate di cellule sono il midollo osseo e il tessuto adiposo, che sono facilmente prelevabili e da cui le MSCs sono isolabili, senza particolari complicazioni nei pazienti (Vidal MA et al, 2012).

2.3.2. MSCs isolate dal midollo osseo

Negli animali le MSCs derivate da midollo osseo possono essere isolate da diversi siti, quali: l'omero prossimale, il femore e la cresta iliaca nel cane e nel gatto (Purwaningrum M et al, 2021). Nel cavallo il sito di prelievo principale è costituito dallo sterno, in particolare, dalla quinta sternebra, che è il punto di reperi più sicuro per garantire l'incolumità dell'animale in seguito al prelievo (Kasashima Y et al, 2011) (Figura 9, Duan W et al, 2018).

Lo svantaggio principale del prelievo da midollo osseo concerne l'invasività del metodo di collezione, non privo di complicanze: sono stati riportati casi di pneumopericardio non fatale nel cavallo conseguenti all'aspirazione di midollo osseo da sternebre (Durando MM et al, 2006) e casi di pneumotorace fatali (Jacobs RM et al, 1983).

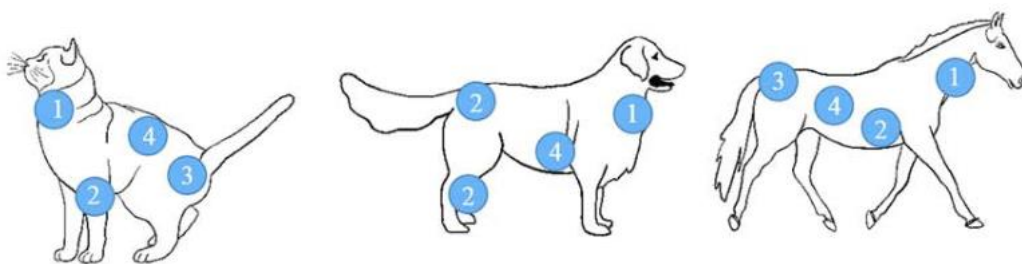


Figura 9: Siti di prelievo di BM-MSCs da gatto, cane e cavallo (adattamento da Duan W. Et al, 2018). Tra i siti indicati i più frequenti sono: omero prossimale, sternebre, cresta iliaca e femore.

Nel cavallo, in cui abbondano lesioni ortopediche, le MSCs derivate da midollo osseo autologhe e allogene sono state efficaci nel miglioramento di lesioni del tendine flessore superficiale, spesso oggetto di lesioni, data la prominenza a livello di arti anteriori (Kulus M et al, 2018).

L'impianto di MSCs autologhe, derivate da midollo osseo, è stato dimostrato essere efficace nel ripristino di condizioni simili a quelle fisiologiche originarie del tendine, senza la formazione di tessuto cicatriziale fibroso che conseguirebbe al naturale corso dell'infiammazione (Smith RK et al, 2013).

2.3.3. MSCs isolate da tessuto adiposo

Le MSCs derivate da tessuto adiposo sono largamente impiegate in cani e cavalli per la risoluzione di lesioni tendinee, legamentose e articolari, per patologie ossee, muscoloscheletriche, nonché per patologie d'organo.

Il prelievo di tessuto adiposo, da processare per l'isolamento delle AT-MSCs (*Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells*) prevede una procedura non-invasiva, non traumatica e invalidante come per l'aspirazione di midollo osseo, nonché più economico per il proprietario (Petrova V e Vachkova E, 2023).

La concentrazione di MSCs nel tessuto adiposo, inoltre, è nettamente superiore rispetto al midollo osseo (Vidal MA et al, 2007).

I prelievi di tessuto adiposo nei cani adulti si effettuano principalmente da localizzazioni sottocutanee (addome) e viscerali (da omento, rene, legamento falciforme, zona periovarica) durante le chirurgie di routine a cui vengono sottoposti, quali l'ovarioisterectomia (Bahamondes F et al, 2017).

Il sito di prelievo più adeguato è il tessuto adiposo periovarico, in cui sono state osservate: migliore vitalità cellulare; resa cellulare superiore; espressione maggiore di markers di superficie tipici delle AT-MSCs rispetto ad altri siti di prelievo, quali il legamento falciforme e il tessuto sottocutaneo (Hendawy H et al, 2021).

Il tessuto adiposo costituisce un organo complesso e con innumerevoli funzioni in cui si trovano tipologie cellulari differenti che interagiscono tra di loro, che compongono la cosiddetta "frazione stromale vascolare", composta da cellule del sangue, adipociti, precursori endoteliali, macrofagi e adipociti (Prišlin M et al, 2022).

Sia la SVF (*Stromal Vascular Fraction*) che le AT-MSCs presentano proprietà immunomodulatorie, antiinfiammatorie e di angiogenesi. Anche la SVF è stata proposta come agente terapeutico. Il vantaggio della SVF sulle AT-MSCs è dovuto a più fattori: la composizione cellulare eterogenea; la minore processazione del tessuto adiposo; la migliore vitalità cellulare

(Bora P e Majumdar AS, 2017). Tuttavia, rimane una popolazione cellulare estremamente eterogenea di cui è molto difficile avere una caratterizzazione precisa.

Le più frequenti applicazioni terapeutiche nei pazienti canini di AT-MSCs e SVF sono per condizioni patologiche ortopediche (osteoartrite, osteoartrosi, displasia dell'anca); neurologiche; dermatologiche (ferite estese); oftalmiche (cheratocongiuntivite secca), gastroenteriche (IBD) (Prišlin M et al, 2022).

Nel cavallo i maggiori impieghi di AT-MSCs sono indirizzati verso le patologie muscoloscheletriche, specialmente per lesioni tendinee, legamentose e per osteoartriti (Petrova V e Vachkova E, 2023).

In particolare, nel cavallo il tendine flessore superficiale digitale è facilmente esposto a rottura delle fibre che lo compongono. La formazione di tessuto fibroso segue normalmente il processo infiammatorio, invece, l'applicazione di MSCs modula la risposta infiammatoria del tessuto favorendone la rigenerazione, senza compromettere la struttura anatomica e la funzione del tendine (Petrova V e Vachkova E, 2023).

Diversi studi hanno dimostrato l'efficacia delle AT-MSCs associate a PRP, per la terapia di lesioni acute a danno del tendine flessore superficiale, con formazione di un tessuto comparabile al tessuto prima della lesione (Ricco S et al, 2013; Guercio A et al, 2015).

2.3.4. Altre fonti di MSCs

Un'altra fonte di MSCs è il sangue periferico: si tratta del sito di prelievo che richiede il metodo meno invasivo per l'animale e che non richiede sedazione o anestesia (Przadka et al, 2021).

Inoltre, vari studi hanno contribuito a definire l'abilità di differenziazione delle PB-MSCs e a caratterizzarle (Koerner J et al, 2006; Giovannini, S et al, 2008), nonché a descrivere le condizioni per aumentare la mobilizzazione a livello di sangue periferico nel cavallo tramite trattamenti con camera iperbarica (Dhar M et al, 2012).

Le MSCs possono essere isolate anche da tessuti perinatali, quali il cordone ombelicale, in particolare dalla gelatina di Wharton e dal sangue del cordone ombelicale (Naji A et al, 2019).

Le MSCs da sangue di cordone ombelicale sono cellule pluripotenti e più indifferenziate rispetto alle BM-MSCs: per questo motivo sembrano non indurre una reazione immunitaria, una volta somministrate, al pari di MSCs isolate da altre fonti tissutali. Secondo alcuni studi, infatti, le HSCs isolate da sangue di cordone ombelicale presentano HLA di superficie più tollerati, dal sistema immunitario dell'animale ricevente, in confronto a cellule isolate da midollo osseo o a MSCs da sangue periferico (Watt SM et al, 2005).

Le UCB-MSCs di equino sono facilmente ottenibili e presentano ottime caratteristiche di proliferazione e differenziazione, al contrario, le UCB-MSCs da cane sono difficilmente ottenibili in quanto, solitamente, si ricorre alla sterilizzazione dell'animale prima che vada incontro a gravidanza o, altrimenti, in caso di gravidanza l'animale tende a ingerire gli annessi fetali espulsi (Sultana T et al, 2018).

Gli annessi fetali, inclusi la placenta, il sacco amniotico e il cordone ombelicale mostrano abilità di differenziazione nelle tre linee mesodermiche; morfologia simil-fibroblastica e una buona capacità proliferativa. Le MSCs isolate dai tessuti perinatali presentano proprietà di immunoregolazione grazie al rilascio diIDO, in condizioni di infiammazione, significativamente più alto rispetto alle BM-MSCs (Saulnier N et al, 2016).

2.3.5. Metodi di coltura MSCs

Le MSCs prelevate da midollo osseo, sangue periferico e sangue del cordone ombelicale, si possono ottenere tramite centrifugazione secondo gradiente; le MSCs prelevate da tessuto adiposo o cordone ombelicale si ricavano per digestione enzimatica con l'azione dell'enzima collagenasi, in seguito si procede con una centrifugazione (Ranera B et al, 2011).

Le cellule vengono lavate con soluzione fisiologica tamponata (PBS) per allontanare l'enzima collagenasi potenzialmente tossico, contaminate e poi seminate in un medium di coltura adeguato. (Ranera B et al, 2011)

Il medium di coltura ottimale è addizionato con siero fetale bovino (FBS) e contiene nutrienti, ormoni e fattori di crescita che favoriscono la proliferazione cellulare (Sharma RR et al, 2014); i medium più frequentemente usati sono DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's Medium*) e *alpha-minimum essential medium* (Beyer Nardi N e da Silva Meirelles L, 2006).

Il procedimento per isolare le MSCs da tessuti, provenienti da fonti tissutali diverse, è inizialmente simile: le cellule vengono seminate in piastre, in cui le MSCs si distinguono dalle altre tipologie cellulari grazie alla caratteristica di aderenza alla plastica (Colbath AC et al, 2017).

La crescita e la confluenza in colonie delle MSCs richiede qualche giorno, fino a ricoprire la fiasca utilizzata e ad arrivare a confluenza (Barrachina L et al, 2018).

Al 70-90% di confluenza si esegue il cosiddetto passaggio, in cui le cellule vengono distaccate dal substrato plastico e riseminate a una minor densità cellulare per un'ulteriore espansione cellulare (Colbath AC et al, 2017).

Le caratteristiche cellulari di vitalità e proliferazione vengono meno al procedere dei passaggi, al pari dei quali incrementa la senescenza cellulare (Barrachina L et al, 2018)

I markers superficiali delle MSCs possono variare in seguito ai vari passaggi indicando senescenza cellulare, per cui, è preferibile somministrare le MSCs tra il terzo e il quarto passaggio (Colbath AC et al, 2017).

Il tempo richiesto per un'adeguata espansione cellulare dipende da più fattori, quali l'età dell'animale a cui vengono prelevate e il metodo di isolamento (Barrachina L et al, 2018).

2.3.6. Vie di somministrazione

Nel cavallo, per lesioni focali a tendini e legamenti si preferisce la somministrazione diretta di MSC per via ecoguiata (Barrachina L et al, 2018) o, per lesioni cartilaginee focali, l'apposizione di cellule eventualmente associate a scaffold per via artroscopica (Schnabel LV et al, 2013).

Gli scaffold sono costruiti congeniati per essere sovrapposti a difetti osteocondrali (Qiang Y et al, 2014).

La somministrazione sistemica di MSCs può risultare utile in corso di patologie sistemiche del cavallo, quali: endotossiemia, *Inflammatory Bowel Disease* e asma equina (MacDonald ES et al, 2020).

La via sistemica risulta vantaggiosa rispetto alla via topica poichè le MSCs evocano un'interazione maggiore con il sistema immunitario, in particolare, esercitano un effetto antinfiammatorio di tipo sistemico in seguito a somministrazione endovenosa in caso di disordini infiammatori (Olsen A et al, 2019).

Nel cane, in corso di osteoartrite, le MSCs si somministrano all'interno dell'articolazione affetta; inoltre, comprovata l'abilità di *homing* delle MSCs, alcuni studi hanno studiato altri tipi di somministrazione, come la via endovenosa sistemica e nei punti di agopuntura (Brondeel C et al, 2021).

Le MSCs si possono associare a soluzioni isotoniche con pH neutro, quali PBS (*Phosphate Buffered-Saline*) o LRS (*Lactated Ringer's Subcutaneous Fluid*). Oltre a questi, anche con prodotti biologici, quali PRP (*Platelet Rich Plasma*), BMS (*Bone Marrow Supernatant*), ACS (*Autologous Conditioned Serum*), HA (*Hyaluronic Acid*); sebbene non ci sia evidenza di effetti sinergici tra le MSCs e questi ultimi (Barrachina et al, 2013; Schnabel LV et al, 2013).

Le differenti vie di somministrazione delle MSCs risultano in diverse modalità di distribuzione e rischi: la somministrazione per via sistemica può portare all'intrappolamento delle cellule a livello polmonare con episodi di embolia polmonare se non eseguita con procedure adeguate (Jung JW et al, 2013).

Sono praticabili anche la somministrazione endoarteriosa e il trapianto diretto intraorgano, ma richiedono delle procedure di somministrazione più invasive e, quindi, rischiose (Heslop JA et al, 2015).

In seguito a somministrazione, la maggior parte delle cellule (sino al 90%) viene dispersa a causa di stress fisico del microambiente in cui le MSCs sono trapiantate, infiammazione, ipossia e morte cellulare o inibizione da parte del sistema immunitario ospite (Heslop JA et al, 2015).

Per questo, perché la somministrazione risulti efficace è richiesto un numero di cellule sufficiente e adeguato (Lee AS et al, 2009).

3. Proprietà delle MSCs

3.1. Homing

Un'abilità interessante delle MSCs, endogene o somministrate a fini terapeutici, è la capacità di *homing*, tramite cui le cellule migrano spontaneamente verso i siti di lesione e infiammazione (Nitzsche F et al, 2017).

Le MSCs, infatti, presentano un comportamento di migrazione che ricorda quello dei leucociti, con sensibilità alle citochine rilasciate e capacità di attraversamento della parete vasale, definita anche “transmigrazione endoteliale” o “diapedesi” (Nitzsche F et al, 2017).

Quando i tessuti sono interessati da lesioni le MSCs, provenienti dai depositi endogeni o somministrate tramite terapia, vengono rilasciate in circolo, migrano al sito di danno e secernono molecole per creare un microambiente che promuova la rigenerazione tissutale (Chapel A et al, 2003; Figura 10, Jimenez-Puerta GJ et al, 2020).

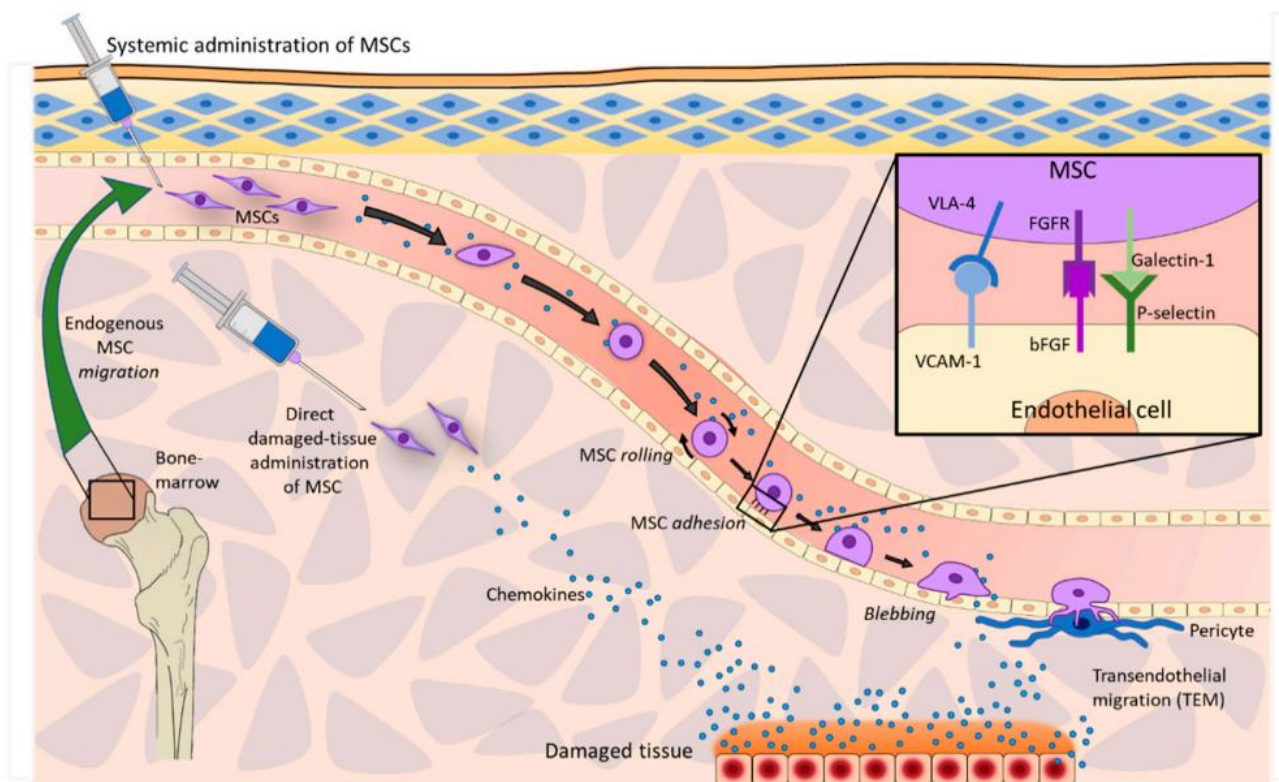


Figura 10: Processo di *homing* e migrazione transendoteliale delle MSCs verso il sito tissutale della lesione, in seguito a somministrazione esogena o da riserva endogena di MSCs, quale il midollo osseo (Jimenez-Puerta GJ et al, 2020).

In corrispondenza del tessuto target, le MSCs espletano proprietà trofiche, rilasciando fattori con effetti di immunomodulazione, angiogenesi e di antiapoptosi (Le Blanc K e Mougiakakos D, 2012).

La somministrazione di MSCs può essere condotta sia per via sistemica che topica, in un sito specifico: di conseguenza, si distinguono l'*homing* di tipo sistemico e l'*homing* di tipo non sistemico (Nitzsche F et al, 2017).

L'*homing* non sistemico consiste nella somministrazione in loco delle MSCs tramite terapia o nell'arruolamento di MSCs locali presenti nel sito di lesione. Le MSCs vengono guidate da un gradiente di chemochine rilasciate dal tessuto infiammato o danneggiato.

Nell'*homing* sistemico si distinguono tre fasi distinte (Nitzsche F et al, 2017):

- Somministrazione diretta delle MSCs in circolo o reclutamento di MSCs locali con ingresso delle stesse nel circolo ematico;
- Extravasazione;
- Migrazione nello spazio interstiziale sino al sito target.

Nello specifico, a livello vasale in prossimità della lesione, le MSCs subiscono più step per raggiungere il sito target: 1) *Rolling* e *tethering* 2) attivazione 3) arresto 4) Transmigrazione/diapedesi 5) migrazione (Ullah M et al, 2019; Figura 11, Yuan M et al, 2022).

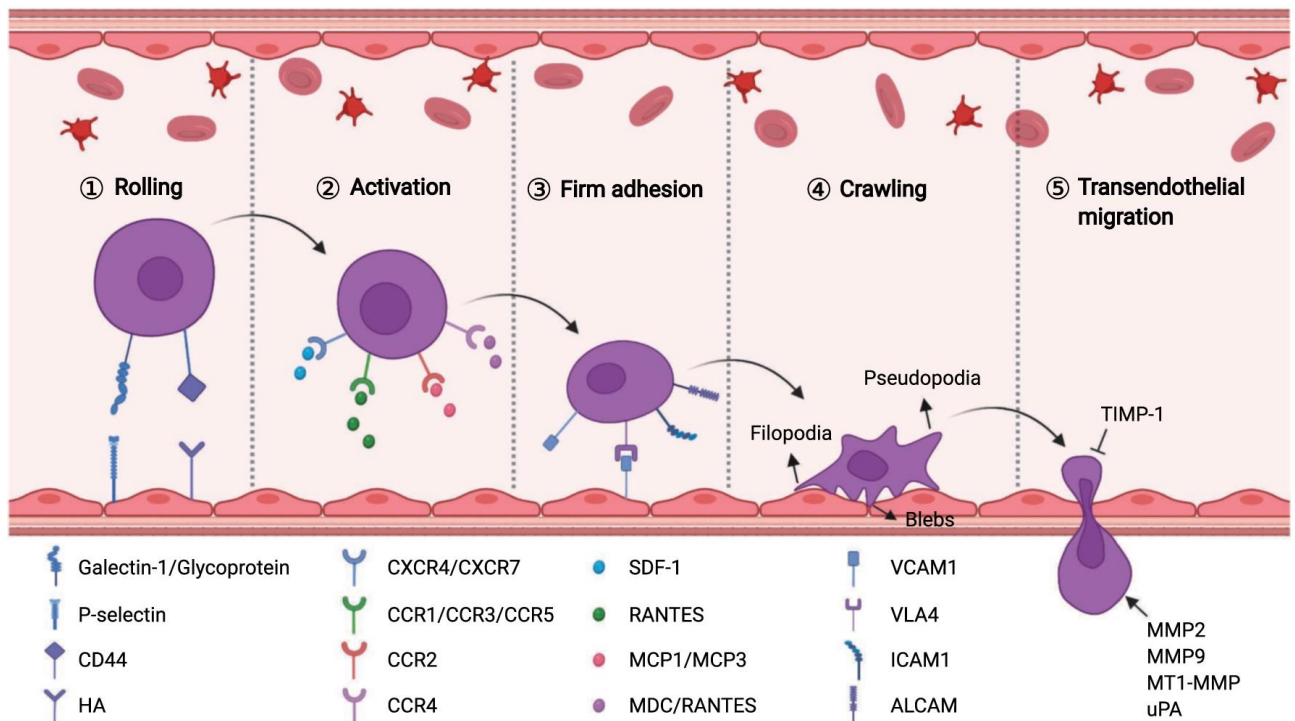


Figura 11: Homing delle MSCs, schema riassuntivo delle molecole e dei recettori coinvolti (Yuan M et al, 2022).

Il *tethering* iniziale viene mediato da selectine, espresse dalle cellule endoteliali: le MSCs esprimono CD44 complementari alle precedenti e l'interazione si espleta nel rotolamento delle MSCs a ridosso della parete endoteliale (Nitzsche F et al, 2017).

L'attivazione è mediata da recettori per le chemochine, rilasciate in seguito a segnali infiammatori. L'espressione di SDF-1 sulle cellule endoteliali si considera cruciale per questo passaggio (Lau TT e Wang DA, 2011). L'SDF-1, infatti, è il ligando per CXCR4 espresso dalle MSCs (Wynn RF et al, 2004).

L'arresto è facilitato dalle integrine. Le MSCs esprimono VLA-4 che si legano alle VCAM-1 sulle cellule endoteliali (Segers VF et al, 2006).

Nella transmigrazione endoteliale o diapedesi, le MSCs migrano attraverso lo strato endoteliale e la membrana basale tramite la secrezione di MMPs che digeriscono il collagene della membrana basale (Ullah M et al, 2019).

Infine, le MSCs migrano attraverso l'interstizio fino al sito di lesione. Questo step è guidato da segnali chemotattici rilasciati in seguito alla lesione tissutale (Nitzsche F et al, 2017).

3.2. Attività paracrina delle MSCs: esosomi, vescicole e corpi apoptotici

L'efficacia terapeutica delle MSCs è stata comunemente attribuita alla capacità di differenziazione e integrazione all'interno del tessuto-ospite durante il processo rigenerativo, con sostituzione delle cellule danneggiate.

Una volta somministrate, *in vivo*, le MSCs migrano verso i siti di lesione dell'organismo, ma poche MSCs si integrano in modo definitivo nel tessuto offeso: la gran parte delle MSCs somministrate viene intrappolata meccanicamente a livello precapillare, portando a una riduzione del flusso ematico notevole, con morte delle MSCs e integrazione della minor parte a livello perivascolare (Toma C et al, 2009).

Da recenti studi, si è evidenziato che il meccanismo responsabile dell'attività rigenerativa è dovuto, principalmente, alla comunicazione tra MSCs e cellule tissutali residenti per via paracrina, tramite la secrezione di segnali molecolari che incrementano la rigenerazione tissutale (Chang C et al, 2021).

Più studi hanno dimostrato che il medium di coltura delle MSCs, una volta somministrato, esercita i medesimi effetti delle MSCs poiché contenente fattori trofici, rilasciati dalle cellule stesse (Phinney DG e Pittenger MF, 2017).

I fattori secreti dalle MSCs e contenuti nel medium di coltura si definiscono, nel complesso, con il termine di “secretoma”, a cui è stata attribuita la maggior parte degli effetti benefici propri delle MSCs (Chang C et al, 2021).

Ciò suggerisce che l’effetto terapeutico concreto delle MSCs dipenda primariamente dalla loro attività trofica e, in particolare, dalla capacità di rilasciare fattori solubili che inneschino le attività rigenerative richieste a livello tissutale (Fu Y et al, 2017).

Il secretoma delle MSCs presenta numerose funzioni biologiche volte alla rigenerazione tissutale, tra cui: azione antiapoptotica, angiogenesi, immunomodulazione, chemoattrazione, proliferazione, antifibrosi e neuroprotezione (Chang C et al, 2021)

Un gruppo di fattori comuni, isolati da secretoma di MSCs provenienti da fonti differenti, sono: Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Hepatocyte Growth Factor (HGF), Stromal Cell Derived Growth Factor (SDF-1), Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1), Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1), Platelet-derived Growth Factor (PDGF) e Interleuchina 6 (IL-6) (Chang C et al, 2021).

Altri componenti sono i miRNAs (microRNAs) che, modulando l’espressione genica, guidano i processi di proliferazione cellulare e angiogenesi (Ferguson SW et al, 2018).

Il rilascio di molecole solubili da parte delle MSCs, l’instaurazione di giunzioni cellulari con le cellule residenti e le molecole di adesione cellulare rappresentano possibili modalità di comunicazione tra le MSCs e le cellule residenti con l’obiettivo di promuovere il processo di rigenerazione tissutale (Fu Y et al, 2017).

Le vescicole extracellulari (*Extracellular Vesicles*, EVs), nello specifico, costituiscono una possibile via di comunicazione tra le MSCs e le cellule dell’organismo ospite. Le EVs sono un gruppo eterogeneo di vescicole extracellulari che comprende esosomi, microvescicole e corpi apoptotici (Fu Y et al, 2017) (Figura 12, Abreu SC et al, 2021).

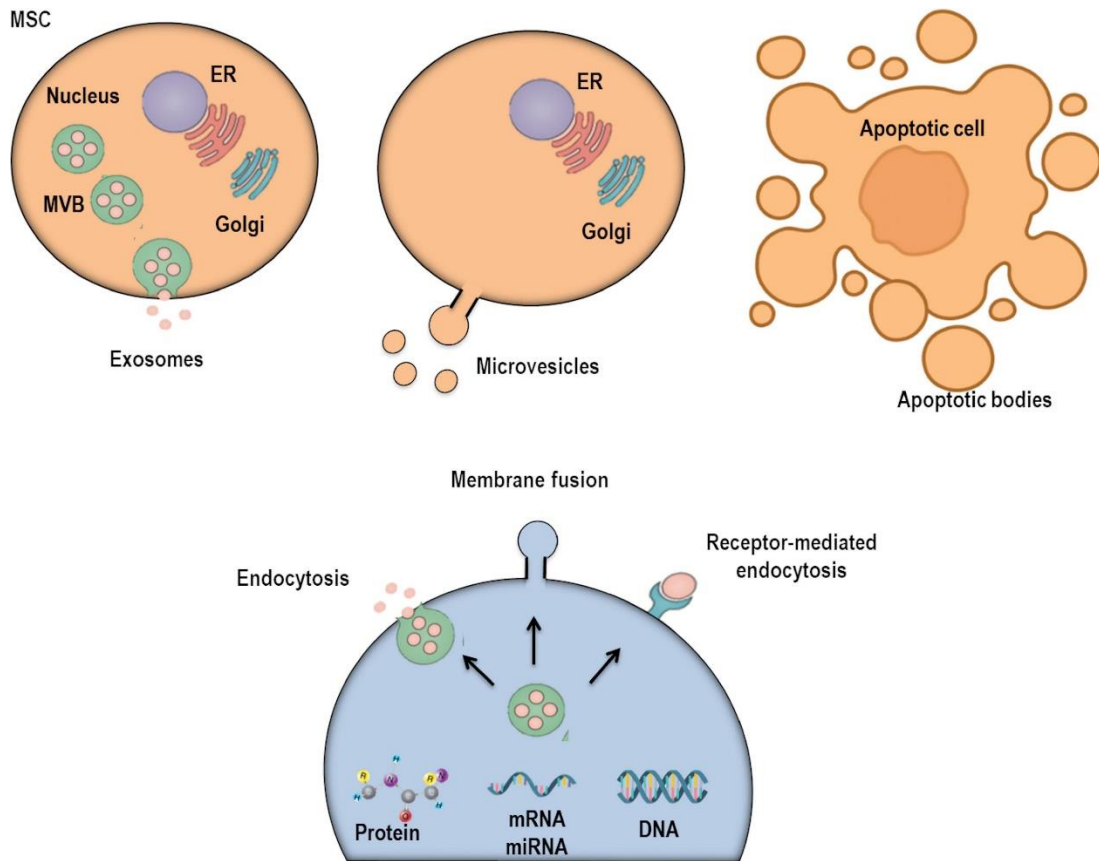


Figura 12: esosomi, microvescicole e corpi apoptotici (Abreu SC et al, 2021).

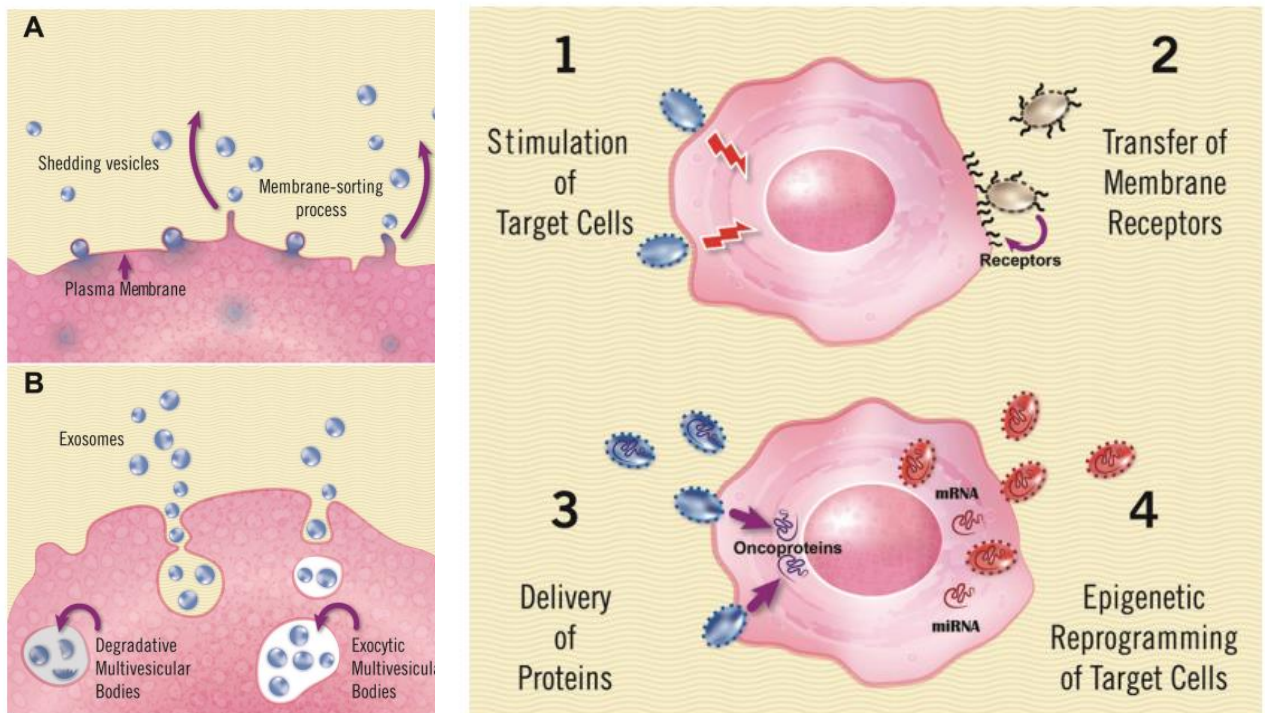


Figura 13: Modalità di rilascio di A) vescicole extracellulari ed B) esosomi; schema riassuntivo delle modalità di interazione con le cellule target (Camussi G et al, 2011).

Le EVs guidano l'attività delle cellule residenti nel tessuto target attraverso l'interazione ligando-recettore e il rilascio di proteine intracellulari, lipidi bioattivi, acidi nucleici; tramite la fusione con i veicoli extracellulari e le cellule ospiti; di particolare interesse è il trasferimento orizzontale dell'informazione genetica sotto forma di mRNAs, miRNAs e lncRNAs (*long-non coding RNA*) (Fu Y et al, 2017) (Figura 13, Camussi G et al, 2011).

Le microvescicole presentano un diametro > 200 nm; gli esosomi, di dimensioni minori, presentano un diametro di 50-200 nm, le prime derivano da distaccamenti della membrana citoplasmatica; gli ultimi da endosomi e corpi multivescicolari intracellulari, che vengono rilasciati, nell'ambiente extracellulare, tramite fusione con la membrana citoplasmatica (Phinney DG e Pittenger MF, 2017).

I corpi apoptotici, di diametro > 1 μ m, residuano da MSCs andate incontro ad apoptosi, e rimangono funzionali: le informazioni biologiche da essi contenute vengono veicolate alle cellule non-apoptotiche (Fu Y et al, 2017).

Da studi in letteratura emerge che gli esosomi derivanti da MSCs esercitano il loro effetto tramite il trasferimento, per via orizzontale, di fattori solubili, proteine e materiale genetico (Phinney DG e Pittenger MF, 2017).

L'uso del secretoma, per le caratteristiche elencate, presenta numerosi vantaggi rispetto alla terapia cellulare a base di MSCs: si evita il trasferimento di cellule con possibili mutazioni a carico del DNA; non presenta il rischio di *plugging* nelle reti capillari a livello polmonare con episodi di embolia; si possono usare maggiori quantità di secretoma e si possono raggiungere dosi più elevate che possono agire a livello del tessuto danneggiato (Phinney DG e Pittenger MF, 2017).

L'uso terapeutico delle EVs, come terapia *cell-free*, si sta sviluppando rapidamente come alternativa valida che possa aggirare i rischi concernenti la terapia con MSCs, quali anche problemi di immunoreazione.

Manca, ancora, un protocollo di standardizzazione per la preparazione delle vescicole extracellulari nelle applicazioni terapeutiche, dai metodi di preparazione e purificazione sino alle condizioni di conservazione richieste (Sandonà M et al, 2021).

3.3. Attività angiogenica delle MSCs

Il secretoma derivato da MSCs espleta effetti di angiogenesi in una varietà di patologie.

L'angiogenesi consiste nella formazione di nuovi vasi sanguigni a partire da vasi preesistenti e serve per migliorare l'afflusso di sangue nei tessuti interessati da ischemia (Kwon HM et al, 2014).

Un flusso ematico deficitario, infatti, non può sostenere le richieste metaboliche dei tessuti interessati, risultando in un danno ischemico (Kwon HM et al, 2014).

L'angiogenesi è possibile grazie all'attività sinergica del contenuto delle vescicole extracellulari come miRNAs (microRNA), tRNAs (transfer RNA), long noncoding RNA (lncRNA), fattori di crescita, proteine e lipidi (Maacha S et al, 2020).

I miRNA sono regolatori dell'espressione di geni codificanti per citochine, come MMPs, VEGF, PDGF, FGF e EGF (Maacha S et al, 2020).

Le MSCs rilasciano nello spazio extracellulare un gruppo eterogeneo di fattori promuoventi l'angiogenesi, quali bFGF, VEGF, TGF- β , PDGF, ANG-1, PIGF, IL-6, HGF e MCP-1 che stimolano il processo angiogenico *in vitro* e *in vivo* (Maacha S et al, 2020).

Gli esosomi derivati da MSCs promuovono la riepitelizzazione di ferite cutanee tramite la proliferazione di cellule epiteliali, la neoangiogenesi, l'attivazione della secrezione di collagene ed elastina da parte dei fibroblasti e riducendo la formazione di tessuto fibroso cicatriziale (Phinney DG e Pittenger MF, 2017).

Inoltre, le MSCs stimolano l'emostasi, riducono l'infiammazione tissutale, incrementano la migrazione *in situ* di cellule residenti e, perciò, accelerano il processo di guarigione della ferita cutanea (Chang C et al, 2021).

L'applicazione di MSCs o derivati rappresenta dunque una valida alternativa per il trattamento di patologie ischemiche, grazie al potenziale di rivascolarizzazione attraverso il rilascio di citochine, fattori di crescita e materiale genetico (Tao H et al, 2016).

3.4. Attività antimicrobica delle MSCs

Le MSCs presentano effetti antimicrobici mediati da meccanismi diretti e indiretti.

Infatti, le MSCs sono in grado di secernere peptidi antimicrobici (AMPs, *Antimicrobial Peptides*) e proteine per contrastare i patogeni (Alcayaga-Miranda F et al, 2017).

Gli AMPs sono molecole effettrici di 10-150 aa, di carica positiva, e fanno parte del sistema immunitario innato (Hosseiniyan Khatibi SM et al, 2020).

I peptidi agiscono penetrando all'interno delle membrane batteriche o vengono internati (tramite endocitosi) con conseguenti: rottura della parete batterica; blocco della sintesi di DNA o RNA e

delle proteine codificate; interazione con target intracellulari. Altri peptidi interagiscono direttamente con i recettori presenti sulla membrana cellulare (Silva-Carvalho AÉ et al, 2022).

Gli effetti antimicrobici diretti si esprimono anche attraverso l'espressione di molecole immunosoppressive, come IL-17 e IDO, oltre che con la riduzione della migrazione di cellule pro-infiammatorie e la diminuzione di fattori immunoregolatori (Hosseiniyan Khatibi SM et al, 2020).

Gli AMPs sono peptidi come: catelicidine; defensine; lipocaline; epcidine, che vengono sintetizzati come pre-propeptidi e poi enzimaticamente clivati nella forma attiva degli AMPs, che interagiscono con la membrana cellulare di batteri, dotati di carica superficiale negativa (Hosseiniyan Khatibi SM et al, 2020).

Queste molecole presentano un'attività contrastante una serie di patogeni, tra cui batteri, funghi, lieviti, virus e cellule tumorali (Zhang LJ e Gallo RL, 2016).

I meccanismi indiretti di contrasto dei patogeni prevedono, invece, la coordinazione dinamica di elementi pro- e anti-infiammatori del sistema immunitario e l'incremento di attività di cellule fagocitarie (Alcayaga-Miranda F et al, 2017), anche attraverso la secrezione di citochine che influenzano il comportamento delle cellule immunitarie, rendendole più efficaci contro più tipi di agenti patogeni e nel privare gli stessi delle condizioni ideali per la loro crescita (Silva-Carvalho AÉ et al, 2022).

In alcuni casi gli AMPs presenti nel secretoma di MSCs sono efficaci contro patogeni resistenti alle terapie antibiotiche convenzionali, come nel caso di batteri MDR (*MultiDrug Resistent*) (Alcayaga-Miranda F et al, 2017).

4. Il dialogo tra MSCs e il sistema immunitario

4.1. Ruolo delle MSCs nell'infiammazione tissutale

L'infiammazione è la prima risposta aspecifica del sistema immunitario dell'organismo a un danno tissutale.

La risposta cellulare alla presenza di patogeni o a un danno cellulare è rapida e possibile grazie a cellule sentinella che hanno il compito di intercettare l'antigene e richiamare, successivamente, altre cellule con il compito di distruggere gli invasori in un processo chiamato "infiammazione" (Tizard I., 2018).

In particolare, vengono attivate le cellule della prima linea di difesa del sistema immunitario innato, tra cui neutrofili, monociti-macrofagi, cellule Natural Killer e cellule dendritiche che rilasciano citochine e fattori di crescita (Tizard I., 2018).

In risposta ai molteplici segnali infiammatori le MSCs producono, a loro volta, fattori di immunoregolazione, di chemiotassi e fattori di crescita, favorendo la rigenerazione tissutale da parte delle cellule residenti (Wang et al, 2014).

Infatti, l'effetto terapeutico delle MSCs sembra essere principalmente dovuto all'abilità di "empowerment" delle cellule residenti, piuttosto che di integrazione tissutale delle stesse: la sopravvivenza delle MSCs, una volta somministrate, è ridotta e solo una piccola percentuale si integra definitivamente a livello tissutale (Wang et al, 2014).

L'efficacia terapeutica delle MSCs è possibile grazie alla secrezione di fattori di immunomodulazione e regolanti l'omeostasi tissutale, quali: interleuchina 6 (IL-6), Transforming Growth Factor- β (TGF- β), Prostaglandin E2 (PGE2), Hepatic Growth Factor (HGF), Epidermal Growth Factor (EGF), Fibroblastic Growth Factor (FGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Insulin-like Growth Factor (IGF), Stromal cell derived Growth Factor (SDF1), l'enzimaIDO e l'ossido nitrico NO (Ma S et al, 2014).

Le MSCs presentano l'abilità di influenzare sia l'immunità innata che l'immunità adattativa (Wang et al, 2014).

4.2. Le MSCs e l'immunità innata

Le MSCs partecipano a due fasi principali dell'inflammation: la fase acuta iniziale e la fase di risoluzione che serve per ottenere l'omeostasi tissutale (Figura 14, Planat-Benard V et al, 2021).

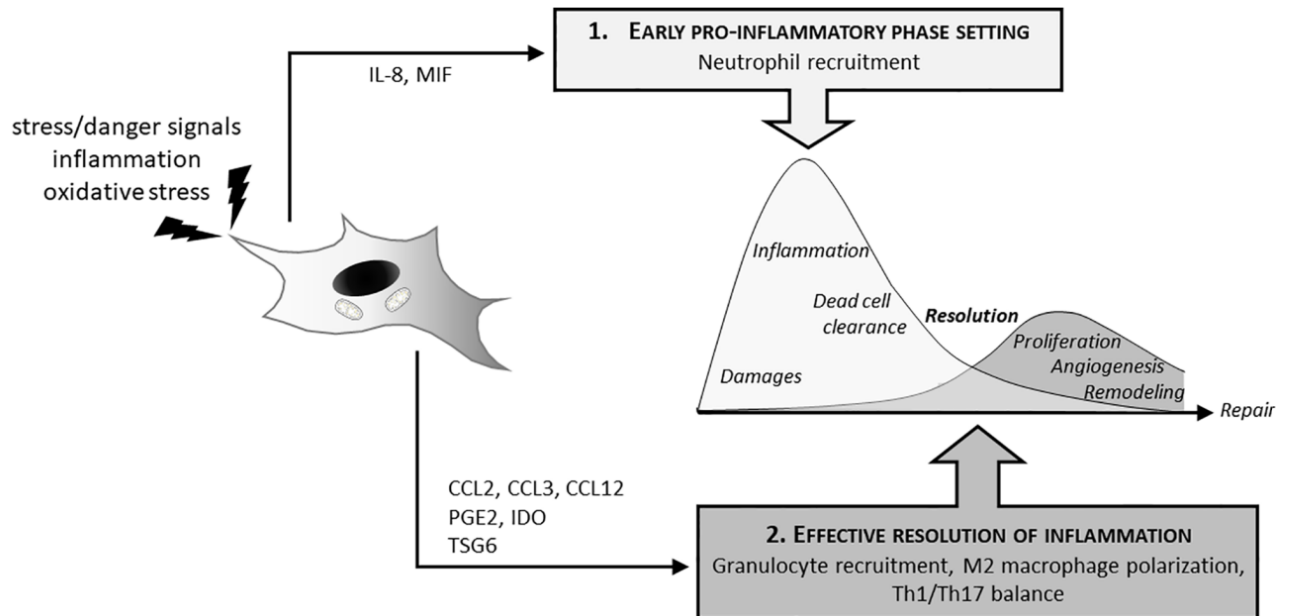


Figura 14: le MSC e la risposta infiammatoria (Planat-Benard V et al, 2021).

4.2.1. Interazione con i granulociti neutrofilici

I neutrofili costituiscono la prima linea di difesa contro i patogeni e il danno tissutale. Queste cellule resistono per pochi giorni all'interno del circolo ematico, a meno che siano attivati da stimoli infiammatori e, dunque, vengono continuamente sostituiti da cellule rinnovate (Tizard I., 2018).

In corso di infezioni batteriche il numero di neutrofili circolanti può aumentare sino a dieci volte la quota iniziale, vengono rilasciati nel circolo ematico, raggiungono i tessuti e muoiono per apoptosi dopo aver svolto la loro funzione (Tizard I., 2018).

Le MSCs favoriscono la migrazione dei neutrofili nel sito di danno tissutale, allungano la loro durata nel circolo ematico, migliorano la funzione proinfiammatoria di fagocitosi e di *burst* respiratorio tramite il rilascio di fattori solubili, quali: G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*) o IFN- γ , IL-8 e MIF (*Macrophage migration Inhibitory Factor*), oltre che grazie alla secrezione del contenuto esosomiale (Planat-Benard V et al, 2021).

La stimolazione dell'attività dei granulociti neutrofilici è resa possibile anche attraverso dei meccanismi di tipo indiretto, come la stimolazione della produzione di IL-17 da parte dei linfociti T che incrementa la funzione di fagocitosi (Hsu SC et al, 2013).

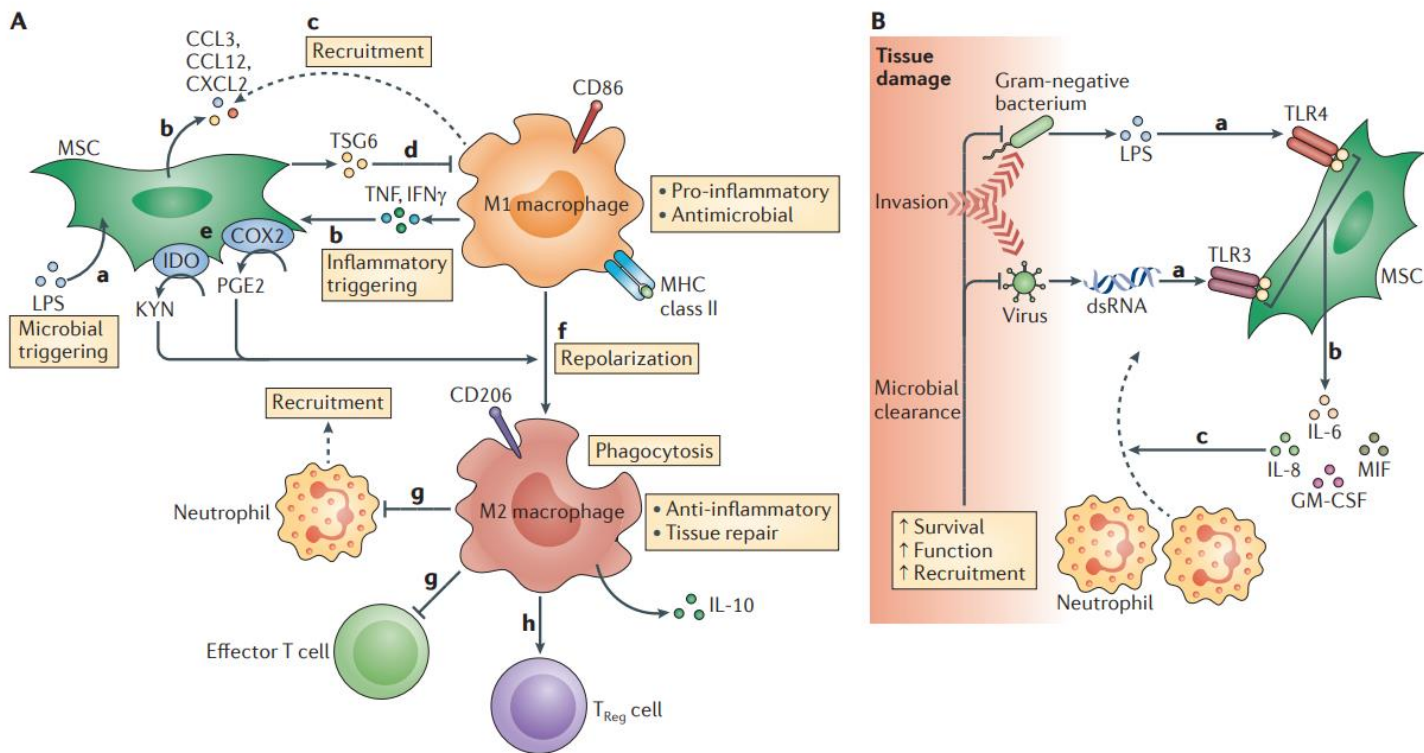


Figura 15: Interazione tra MSCs e cellule fagocitarie durante la risposta immunitaria innata (Le Blanc K e Mougiakakos D, 2012).

4.2.2. Interazione con i monociti-macrofagi

I macrofagi derivano dai monociti, generati a livello di midollo osseo, e sono delle cellule sentinella diffuse in tutto l'organismo; hanno il compito di intercettare e rispondere all'invasione da parte di patogeni, come virus e batteri (Tizard I, 2018). I macrofagi promuovono il reclutamento dei granulociti neutrofilo e la loro migrazione a partire dai vasi sanguigni e svolgono il loro ruolo di fagocitosi una volta giunti nel sito di danno tissutale (Tizard I, 2018).

I macrofagi hanno un ruolo essenziale nella prosecuzione dell'infiammazione, come anche nella risoluzione.

La differenziazione da monociti a macrofagi avviene in seguito a migrazione e ricezione di stimoli infiammatori tissutali (Le Blanc K e Mougiakakos D, 2012).

In base al loro fenotipo e funzioni i macrofagi si possono distinguere in due categorie: i macrofagi M1 pro-infiammatori e i macrofagi M2. L'equilibrio M1-M2 è bilanciato dal microambiente infiammatorio in cui i macrofagi sono immersi, da citochine e fattori di crescita rilasciati dalle MSCs (Tizard I, 2018) (Figura 15, Le Blanc K e Mougiakakos D, 2012).

I macrofagi M1 presentano attività antimicrobica; gli M2 contribuiscono a spegnere l'infiammazione: rilasciano IL-10 antiinfiammatoria, secernono fattori di crescita, promuovono

l'angiogenesi e il rimodellamento tissutale nella fase risolutiva dell'inflammazione (Tizard I, 2018).

La secrezione di IL-10 blocca l'ulteriore migrazione di granulociti neutrofili a livello tissutale, limitando il danno d'organo e deprimendo l'inflammazione (Planat-Benard V et al, 2021).

L'equilibrio M1-M2 si sposta verso l'incremento dei macrofagi M1 quando l'inflammazione è richiesta e verso M2 durante lo spegnimento dell'inflammazione. Una terza categoria di macrofagi è rappresentata dai macrofagi regolatori, generati in seguito a esposizione a citochine, quali IL-10 (Tizard I, 2018).

Le MSCs interagiscono con i monociti-macrofagi tramite meccanismi *cell-to-cell* di contatto diretto e la secrezione di fattori paracrini. Il rilascio di chemochine, quali CCL2, CCL3, MIP2 e MCP5 da parte delle MSCs richiama i monociti-macrofagi verso il tessuto interessato da inflammation (Le Blanc K e Mougiakakos D, 2012).

Gli stimoli infiammatori rappresentati da IFN γ , TNF, LPS incrementano il rilascio, da parte delle MSCs, di fattori immunoregolatori, come IDO (*indoleamine 2,3-dioxygenase*) e COX2 (*cyclooxygenase 2*) che promuovono la polarizzazione dei macrofagi verso il fenotipo M2 (Le Blanc K e Mougiakakos D, 2012).

Altre vie di stimolazione polarizzazione i macrofagi verso il fenotipo M2 prevedono: il rilascio di PGE2 (prostaglandina E2) e TSG6 (*Tumor Necrosis Factor-Stimulated Gene 6 protein*), il recettore antagonista dell'IL-1 o IL-1RA; il trasferimento di mitocondri dalle MSCs ai macrofagi tramite la creazione di ponti citoscheletrici o "tunneling" e il trasferimento di microvescicole (Planat-Benard V et al, 2021; Jackson MV et al, 2016).

I macrofagi M2 presentano una fagocitosi maggiore e producono grandi quantità di citochine regolatrici come IL-4, IL-3, IL-10, TGF- β , IL-1RA (Tizard I., 2018).

Al pari di altre cellule "regolatorie" che caratterizzano la fase di risoluzione dell'inflammazione producono anche IDO (*indoleamine 2,3-dioxygenase*). IDO è un enzima che catabolizza il triptofano, richiesto per lo svolgimento del ciclo cellulare nelle cellule T: la sua assenza provoca un arresto del ciclo cellulare, della proliferazione, sopravvivenza e attivazione delle cellule T (Tizard I., 2018).

4.2.3. Efferocitosi e MSCs

La risoluzione dell'inflammazione è un processo attivo: a mano a mano che l'inflammazione procede, i segnali tissutali antiinfiammatori inducono un fenotipo differente delle cellule infiammatorie presenti (Tizard I., 2018).

La rimozione di cellule apoptotiche da parte dei fagociti (cellule dendritiche DCs e macrofagi M) nel corso della risoluzione del processo infiammatorio si definisce come “efferocitosi”. Le funzioni di questo processo sono: lo spegnimento dell’infiammazione; la modulazione della tolleranza tissutale (tramite le cosiddette “cellule tollerogeniche”) e il raggiungimento dell’omeostasi tissutale (Planat-Benard V et al, 2021).

I neutrofili apoptotici *in situ* attraggono i macrofagi che, in seguito alla fagocitosi dei detriti cellulari, vengono riprogrammati verso il fenotipo M2, antiinfiammatorio (Tizard I, 2018).

L’interazione tra macrofagi e neutrofili apoptotici porta alla produzione da parte dei primi di: VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), una citochina essenziale per la riparazione tissutale (Tizard I., 2018); IL-10, TGF β e di PGE2 che impedisce la produzione di ulteriori citochine proinfiammatorie (Planat-Benard V et al, 2021).

In più, i macrofagi con fenotipo M2 rilasciano SLP1 (*Serine Protease Inhibitor*) che blocca il rilascio di elastasi e ossidanti da parte dei neutrofili e protegge l’attività di citochine antiinfiammatorie, come il TGF β (Tizard I., 2018).

La rimozione dei neutrofili apoptotici non causa danno tissutale o infiammazione, infatti, durante la fagocitosi da parte dei macrofagi non avviene il rilascio di citochine né di lipidi vasoattivi. I macrofagi “palpano” ogni neutrofilo che incontrano tramite il CD31: se il neutrofilo è interessato da danno o non emette un segnale di integrità cellulare, viene fagocitato dal macrofago (Tizard I., 2018).

Secondo diversi studi in letteratura, una volta somministrate per via endovenosa sistemica, le MSCs tendono ad accumularsi a livello polmonare e in altri tessuti altamente vascolarizzati (fegato, reni, milza), ma presentano un breve tempo di sopravvivenza (Sanchez-Diaz M et al, 2021); (Fig. 16, de Witte SFH et al, 2018). La presenza limitata delle MSCs all’interno degli organi non giustifica gli effetti a breve e lungo termine dimostrati in trial preclinici e clinici (de Witte SFH et al, 2018).

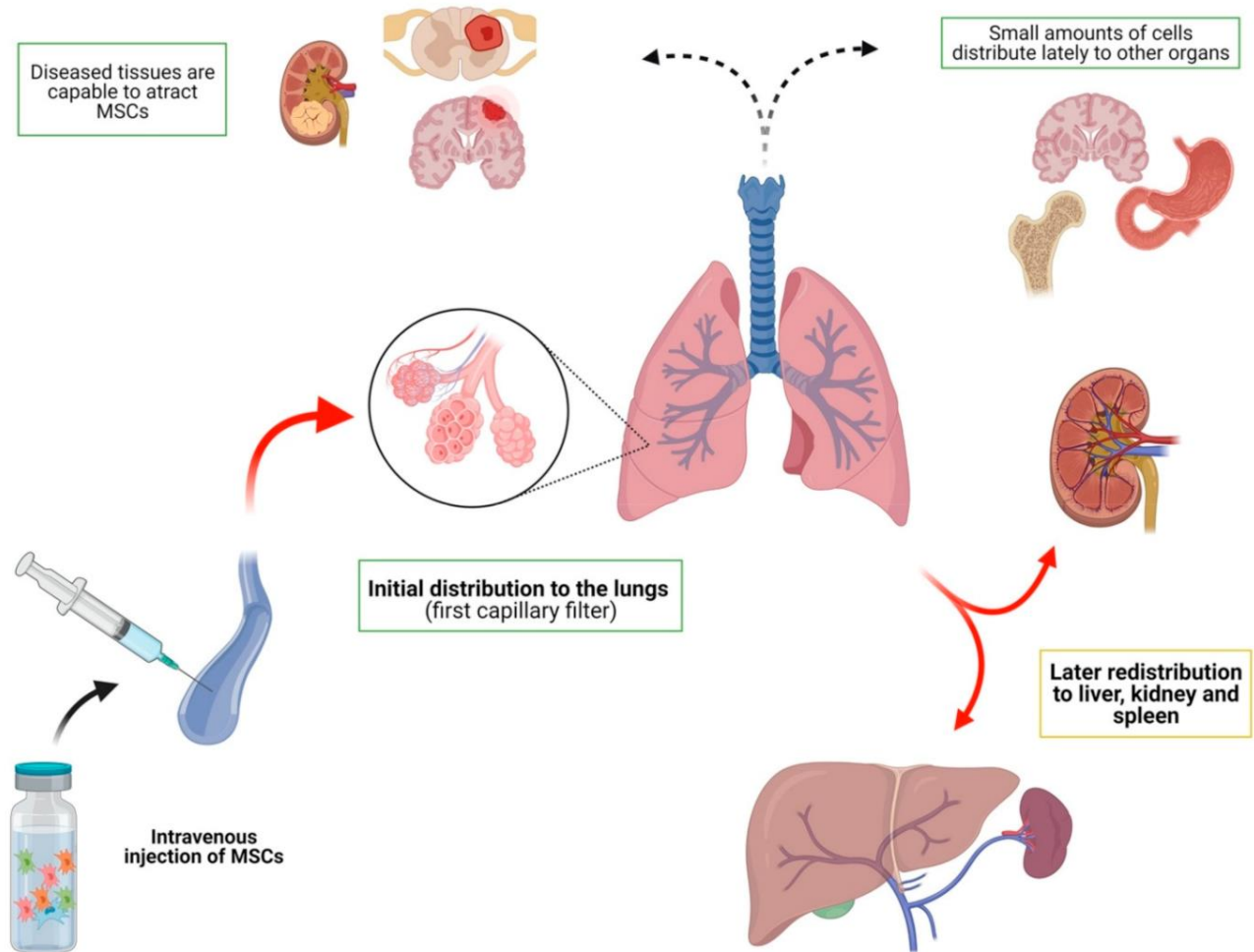


Figura 16: La biodistribuzione delle MSCs: dopo l'iniziale somministrazione per via endovenosa sistemica il primo passaggio avviene a livello dei polmoni, poi a livello di reni, milza e fegato.

Un certo grado di attrazione delle MSCs avviene a livello degli organi intaccati da danno tissutale (de Witte SFH et al, 2018).

La resistenza limitata delle MSCs, in seguito ad amministrazione sistemica, è supportata dall'evidenza che la maggioranza delle MSCs esprime geni legati all'apoptosi dopo la somministrazione (Liu XB et al, 2012).

È possibile che la disintegrazione delle MSCs, in seguito all'apoptosi, porti al rilascio di citochine intracellulari e fattori di crescita responsabili del ruolo immunoregolatorio delle MSCs (Galleu A et al, 2017).

La fagocitosi delle MSCs apoptotiche, operata dai macrofagi, risulta nella polarizzazione dei monociti-macrofagi verso il fenotipo antiinfiammatorio M2 e nella distribuzione degli stessi in tutto l'organismo (de Witte SFH et al, 2018).

L'immunomodulazione da parte delle MSCs è resa possibile, quindi, da cellule non più vitali, bensì da loro frammenti e dal contenuto intracellulare liberato che influenza le cellule infiammatorie circostanti, in particolare la linea monocitica-macrofagica (Pang SHM et al, 2021).

Inoltre, il cambio nel profilo dei monociti verso un fenotipo immunoregolatorio, mediato dalla fagocitosi delle MSCs, potrebbe essere la spiegazione per comprendere gli effetti a lungo termine delle MSCs non accompagnati dalla loro sopravvivenza nell'organismo (Weiss ARR et al, 2019).

I monociti in co-cultura con MSCs apoptotiche mostrano un decremento della produzione di TNF α e IL-12, a fronte di un aumento dell'IL-10, IL-6 e TGF β ; oltre che un aumento della quota dei linfociti T regolatori (de Witte SFH et al, 2018).

Infine, anche le MSCs sono in grado di fagocitare le cellule apoptotiche e di indurre l'apoptosi delle cellule T citotossiche a favore delle cellule T con fenotipo regolatorio mediante la secrezione di TGF β , meccanismi FAS-FASL (Planat-Benard V et al, 2021).

4.2.4. MSCs e le cellule Natural Killer

Le cellule Natural Killer sono cellule "a chiamata" dell'immunità innata e attaccano prontamente le cellule tumorali e le cellule infettate da virus.

Le NKs presentano attività citolitica e producono citochine proinfiammatorie, come l'IFN- γ che favorisce l'ulteriore differenziazione di cellule precursore NK e di TNF α (Uccelli A et al, 2008).

La funzione delle NKs viene mediata dai recettori che presentano in superficie, i quali possono trasdurre segnali di attivazione o di inibizione (Uccelli A et al, 2008).

In particolare, le NKs sfruttano due tipi di ligandi per distinguere cellule normali da cellule anomale: l'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità MHC-I e le proteine stress-indotte. Un livello di espressione basso-assente dell'MHC-I da parte di una cellula target, caratteristico di cellule tumorali o virus-infette, viene captato dai recettori inibitori dell'MHC-I delle NKs e risulta nell'eliminazione della stessa (Tizard I., 2018).

Le cellule NKs vengono attivate da citochine come IL-2 e IL-15 e il ruolo citolitico è mediato da perforine, granzimi e contatto *cell-to-cell* (Le Blanc K e Davies LC, 2015).

Le MSCs interferiscono con il ruolo delle cellule NKs, in particolare inibiscono la proliferazione IL-2/IL-15 indotta e il rilascio di citochine proinfiammatorie come IFN γ e TNF α e di granzima B; in più, limitano il ruolo citotossico limitando l'espressione dei recettori di attivazione delle NKs (Le Blanc K e Davies LC, 2015; Le Blanc K e Mougiakakos D, 2012).

Gli effetti MSCs-mediati nei confronti delle NKs derivano da interazioni *cell-to-cell*, dal rilascio di PGE2 e, in minor parte, dal rilascio di IDO e TGF- β (Le Blanc K e Mougiakakos D, 2012).

Il microambiente infiammatorio in cui sono richiamate le MSCs le espone all'influenza di citochine proinfiammatorie come l'IFN γ : studi *in vitro* hanno dimostrato che il pretrattamento con IFN γ di BM-MSCs umane risulta nell'*upregulation* dell'espressione dell'MHC-I e nella *downregulation* di ULBP3, che sono rispettivamente dei segnali inibitori e di attivazione delle cellule NK (Spaggiari GM et al, 2006).

L'influenza da parte dell'IFN γ in sinergia con la secrezione di PGE2 e COX2 da parte delle MSCs spiega la resistenza delle MSCs al ruolo citolitico delle NKs (Le Blanc K e Mougiakakos D, 2012).

4.2.5. MSCs e mastociti

I mastociti hanno un ruolo chiave nell'immunità innata e nella risposta allergica: sono localizzati in vicinanza della superficie corporea, fungono da cellule sentinella e rilasciano molecole infiammatorie subito dopo il contatto con l'antigene (Tizard I., 2018).

È stato dimostrato *in vitro* (Brown JM et al, 2011) che le BM-MSCs di topo sono in grado di inibire la migrazione, il rilascio di citochine come TNF α , la degranolazione IgE-mediata dell'istamina tramite il rilascio di PGE2.

4.2.6. MSCs e complemento

Il sistema del complemento è un sistema di difesa innato essenziale. Il complemento consiste di numerose proteine che vengono attivate in sequenza; la sua attivazione può avvenire in tre modalità differenti (classica, della lectina o alternativa) (Tizard I., 2018).

Nonostante la distruzione dei patogeni batterici rappresenti il ruolo principale di questo network molecolare, gli effetti protettivi consistono anche nell'opsonizzazione; nella rimozione di cellule apoptotiche; nell'intensificazione della risposta infiammatoria; nella chemiotassi dei neutrofilii e nella coagulazione del sangue (Tizard I., 2018).

Le componenti del complemento C3 e C5 vengono clivate da convertasi specifiche nelle anafilatossine C3a e C5a: le MSCs presentano i recettori specifici e l'interazione recettore-ligando sembra essere funzionale per la migrazione delle MSCs nel sito di danno (Le Blanc K e Davies LC, 2015).

Inoltre, il legame di C5 e C3 con i rispettivi recettori è responsabile della resistenza delle MSCs allo stress ossidativo e della loro proliferazione e sopravvivenza in corso di infiammazione. Esiste un fine equilibrio tra l'attività del complemento e delle MSCs, le due controparti si influenzano a vicenda con meccanismi di attivazione o inibizione (Le Blanc K e Davies LC, 2015).

4.2.7. MSCs e cellule dendritiche

Le cellule dendritiche rivestono un ruolo fondamentale di intercettazione, processazione e presentazione dell'antigene alle cellule T, in qualità di cellule presentanti l'antigene (*APCs, Antigen Presenting Cells*); grazie ad esse può avere inizio l'immunità adattativa (Tizard I., 2018).

Sono cellule fondamentali, infatti, per dare inizio ad una risposta immunitaria primaria.

Le MSCs limitano l'attività delle cellule dendritiche: sia per quanto riguarda la loro genesi a partire dai monociti, sia nella maturazione che nella secrezione di citochine proinfiammatorie (Huang Y et al, 2022).

Le MSCs interferiscono con l'avanzamento del ciclo cellulare da G0-G1 delle cellule dendritiche attraverso la *downregulation* della ciclina D2, rendendo le DCs incapaci di istruire i linfociti T tramite la presentazione dell'antigene (Ramasamy R et al, 2007).

Più fattori sono stati identificati come responsabili dell'interazione tra MSCs e DCs: TSG-6, PGE2, IL-6, M-CSF (*Monocyte-Colony Stimulating Factor*), Jagged-2 e IDO. In co-cultura con le MSCs, le DCs mostrano una riduzione dei livelli di espressione di markers di maturazione (MHC-II, CD80, CD40, CD86) e una minor secrezione di citochine proinfiammatorie come TNF α e IL-12, a favore di IL-1 β e IL-10 (Qi K et al, 2018).

Più studi dimostrano, inoltre, che l'ostacolo alla differenziazione delle DCs risulta in primo luogo nell'inibizione di una risposta da parte delle cellule T, oltre che nella genesi di linfociti T regolatori (Spaggiari GM et al, 2009).

Per cui, i fattori immunomodulatori rilasciati dalle MSCs inducono, durante la fase di guarigione tissutale, un fenotipo tollerogenico delle DCs. L'azione delle DCs, in presenza di MSCs, shifta da "cellule sentinella" a cellule immunoregolatrici: l'IL-10 blocca la loro normale attività di attivazione delle cellule T helper 1 a favore delle risposte T helper 2 mediate (Tizard I., 2018).

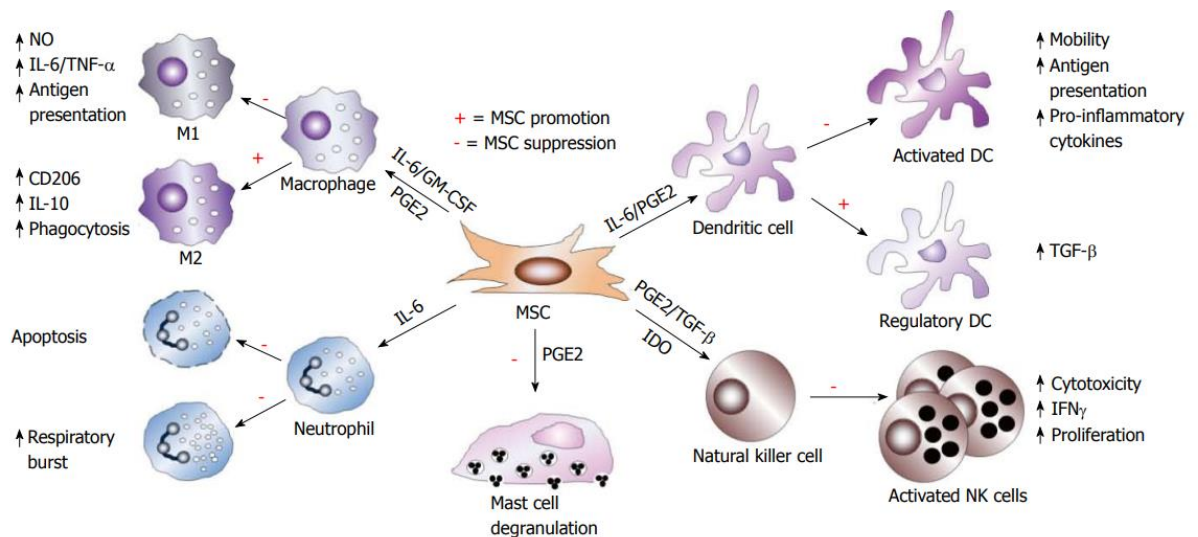


Figura 17: Immunosoppressione da parte delle MSCs dell'immunità innata (Glenn JD e Whartenby KA, 2014).

4.3. MSCs e immunità adattativa

I linfociti sono le cellule protagoniste dell'immunità adattativa. Esistono tre tipologie principali di linfociti: le cellule linfoidi innate; le cellule T, responsabili delle risposte cellulo-mediate e le cellule B che producono anticorpi. All'interno di questi gruppi principali sono comprese delle sottopopolazioni di linfociti con funzioni differenti e regolabili grazie all'interazione con il sistema immunitario (Tizard I., 2018).

A differenza dell'immunità innata, le cellule dell'immunità adattativa riconoscono molecole specifiche e, una volta istruite, raggiungono lo stato di cellule effettrici per migliorare la risposta immunitaria in base al tipo di patogeni presenti (Glenn JD e Whartenby KA, 2014).

Le MSCs presentano una straordinaria capacità di modulazione del fenotipo e della funzione di varie cellule del sistema immunitario: per questo, si considerano candidate ideali per la risoluzione di patologie infiammatorie e immunomediate.

4.3.1. MSCs e i linfociti B

Le cellule B producono anticorpi e vengono attivate grazie ai recettori BCR (*B-cell receptor*), il legame CD40-CD40L e l'interazione tra TLR (*Toll-like Receptor*) e antigeni microbici (Glenn JD e Whartenby KA, 2014).

Le plasmacellule si formano in seguito alla stimolazione antigenica dei linfociti B e producono le immunoglobuline (Tizard I., 2018).

Le MSCs inibiscono la proliferazione, differenziazione e produzione anticorpale da parte delle cellule B, tramite il rilascio di fattori solubili e il contatto cellula-cellula, come l'interazione tra PD1 (*Programmed cell Death 1*) e i suoi ligandi (Uccelli A et al, 2008).

Le MSCs, infatti, sono in grado di impedire la proliferazione dei linfociti B mediante l'arresto del ciclo cellulare nella fase G0/G1 per via paracrina (Qi K et al, 2017).

La via paracrina consiste nel rilascio di fattori, quali: PGE2, IL1-RA, IDO (Müller L et al, 2021) e di vescicole extracellulari con inibizione dell'organizzazione dell'assetto citoscheletrico delle cellule B (Adamo A et al, 2019).

Nonostante, secondo alcuni studi, gli effetti MSC-mediati sulla popolazione di linfociti B siano controversi, di inibizione o di attivazione a seconda di diversi fattori (Müller L et al, 2021), le MSCs presentano un effetto inibitorio sui linfociti T *in vivo* e, di conseguenza, anche sulle cellule B (Uccelli A et al, 2008).

Le proprietà di immunomodulazione da parte delle MSCs sono strettamente dipendenti dalla presenza di fattori proinfiammatori, come L'IFN γ . In seguito a pretrattamento con IFN γ , le MSCs sono in grado di ridurre la produzione di IgG; inibire la proliferazione dei linfociti B, invece, senza una preattivazione, promuovono la sopravvivenza delle cellule B (Fig. 18, Luk F et al, 2017).

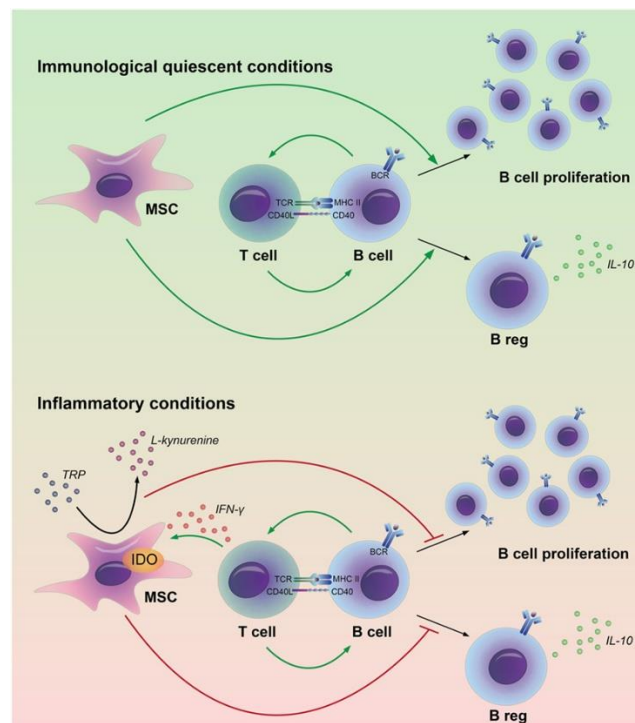


Figura 18: L'interazione tra MSCs e cellule B in condizioni di quiescenza immunologica e in condizioni infiammatorie. In condizioni infiammatorie, l'IFN γ prepara le MSCs al rilascio di

IDO che catabolizza il triptofano, necessario alle cellule B per la progressione nel ciclo cellulare (Luk F et al, 2017).

4.3.2. MSCs e i linfociti T

Le cellule T dell'immunità adattativa si dividono nelle linee CD4⁺ e CD8⁺ ed entrambe le linee si possono suddividere, ulteriormente, in più sottogruppi di cellule effettrici.

I linfociti T possono ricevere segnali da parte di altre cellule immunitarie attraverso i TCR (*T-cell receptors*) e tramite le cellule presentanti l'antigene (*APCs, Antigen Presenting Cells*) come le cellule dendritiche, in seguito ai quali si specializzano nel ruolo di cellule effettrici (Glenn JD e Whartenby KA, 2014).

Le cellule T CD4⁺ si possono suddividere in (Tizard I., 2018):

- Linfociti T Helper 1 con rilascio di IL-2, IFN γ e TNF α ;
- Linfociti T helper 2 con rilascio di IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13;
- Linfociti T helper 17 con rilascio di IL-17;
- Linfociti T regolatori con rilascio di IL-10.

Le cellule T CD8⁺ sono, per la maggior parte, cellule ad attività citotossica (*Cytotoxic T lymphocytes, CTLs*) e distruggono, tramite il rilascio di granuli, le cellule infette e tumorali (Glenn JD e Whartenby KA, 2014).

Le MSCs espletano i loro effetti inibitori sulla popolazione di cellule T grazie all'attivazione da parte dello stimolo infiammatorio costituito da IFN γ , TNF α e IL-1 che caratterizzano il microambiente proinfiammatorio in cui le MSCs agiscono (Qi K et al, 2017).

Le MSCs inibiscono la proliferazione delle cellule T arrestando il ciclo cellulare nella fase G0/G1 del ciclo cellulare (Uccelli A et al, 2008).

Inoltre, le MSCs polarizzano il fenotipo delle cellule T da un assetto proinfiammatorio (IFN γ , TNF α , IL-17) T helper 1/T helper 17 ad antiinfiammatorio (IL-4, IL-10) T helper 2/T regs (Uccelli A et al, 2008; Qi K et al, 2017).

Le MSCs riducono l'attività citotossica mediata dai linfociti T citotossici (*CTLs, Cytotoxic T Lymphocytes*) e stimolano la genesi e proliferazione dei linfociti T regolatori (Uccelli A et al, 2008).

Il contatto diretto cellula-cellula e il rilascio di fattori paracrini, come PGE2, IL-6, IL-10, TGF β , permette il differenziamento da cellule T preesistenti in linfociti T regs (Qi K et al, 2017; Müller L et al, 2021).

Le cellule dendritiche a fenotipo tollerogenico sono anch'esse responsabili dello switch nel fenotipo immunoregolatorio delle cellule T (Uccelli A, 2008).

I linfociti T regolatori (Tregs) giocano un ruolo essenziale nella regolazione del sistema immunitario e nell'equilibrio tra tolleranza periferica e risposta immunitaria: l'assenza di questa sottopopolazione cellulare, infatti, determina l'insorgenza di patologie autoimmuni multiorgano e l'infiammazione incontrollata (Tizard I., 2018).

I linfociti Tregs sopprimono la risposta immunitaria attraverso più percorsi possibili (Tizard I., 2018):

- Il contatto diretto tra cellule;
- Molecole immunosoppressive (IL-10, TGF β , IL-35, PGE2);
- Interferenza con la presentazione dell'antigene.

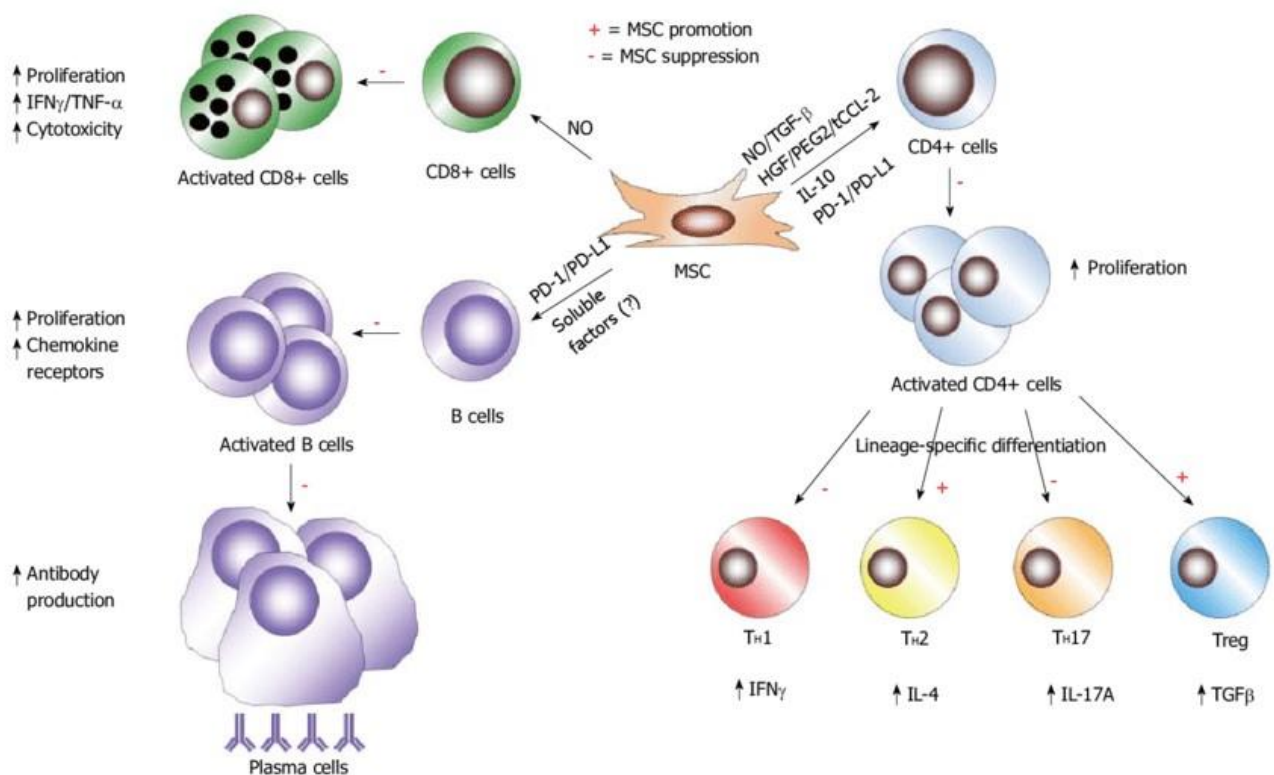


Figura 19: Interazione tra le MSCs e le cellule dell'immunità adattativa: i linfociti T CD8+, CD4+ e i linfociti B (Glenn JD e Whartenby KA, 2014).

5. Le MSCs autologhe e allogeneiche

5.1. Cosa sono, vantaggi e svantaggi terapeutici

In medicina veterinaria, le MSCs impiegate a scopo terapeutico, si possono distinguere in base alla relazione tra donatore e ricevente in: autologhe, allogeneiche e xenogeneiche.

Le MSCs autologhe sono le cellule che vengono isolate e utilizzate nello stesso soggetto. Invece, le cellule allogeneiche e xenogeneiche derivano da un donatore differente rispetto all'animale ricevente e, rispettivamente, appartenente alla medesima specie o ottenute da una specie diversa (Fig. 20, Prišlin M et al, 2022).

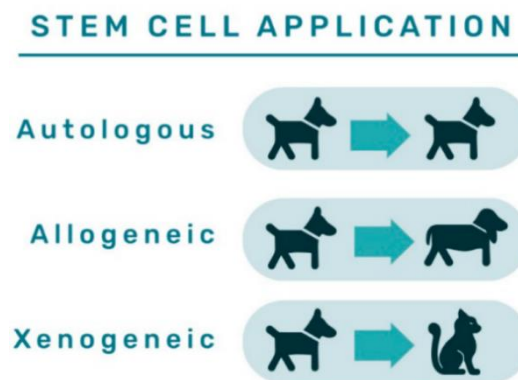


Figura 20: Possibili applicazioni di MSCs: autologhe, allogeneiche, xenogeneiche (Prišlin M et al, 2022).

Queste possibili applicazioni terapeutiche sono tutt'oggi un tema molto dibattuto per quanto concerne la sicurezza e l'efficacia di cellule di origine diversa dall'animale ricevente (Prišlin M et al, 2022).

L'impiego delle MSCs autologhe è generalmente ritenuto essere più sicuro rispetto alle altre proposte terapeutiche poiché le cellule derivano dal paziente in cui verranno somministrate e ciò sembra garantire un minor rischio di risposta immunitaria (Przadka P et al, 2021).

In realtà, le MSCs autologhe presentano numerosi svantaggi. Per poter isolare le MSCs autologhe il paziente deve essere sottoposto a un'operazione chirurgica per l'isolamento del materiale-fonte delle cellule da cui, successivamente, le MSCs verranno isolate ed espanse in coltura (Przadka P et al, 2021).

Il tempo richiesto per l'espansione *in vitro* di cellule autologhe può richiedere diverse settimane per il raggiungimento di un numero sufficiente di cellule per la somministrazione, con il conseguente depauperamento delle proprietà biologiche delle cellule stesse e, quindi, una ridotta efficacia terapeutica (Berglund AK et al, 2017).

Inoltre, i pazienti a cui somministrare terapie cellulari autologhe sono spesso affetti da patologie che non consentono un prelievo sicuro ed ottimale del materiale da cui isolare le cellule; è il caso del prelievo di AT-MSCs (cellule stromali mesenchimali derivanti da tessuto adiposo) in pazienti con un BCS ridotto o di BM-MSCs (cellule stromali mesenchimali derivanti da midollo osseo) in pazienti affetti da mielofibrosi (Zhang J et al, 2015).

In aggiunta, le cellule autologhe isolate da pazienti anziani presentano un potenziale differenziativo e rigenerativo scarso rispetto a cellule isolabili da pazienti giovani e sani (Zhang J et al, 2015).

Le MSCs derivanti da soggetti anziani presentano una ridotta capacità migratoria, di proliferazione e di neoangiogenesi, rispetto a cellule isolate da animali giovani (Choudhery MS et al, 2012).

Senza, infine, dimenticare che esistono degli svantaggi anche tecnici per l'isolamento di auto-MSCs (MSCs autologhe). Infatti, per rendere possibile questa applicazione terapeutica sono necessari più appuntamenti per effettuare la procedura chirurgica (con i rischi connessi di somministrazione dell'anestesia ad un animale malato e al prelievo stesso) e la somministrazione terapeutica delle MSCs; è necessario che la clinica veterinaria sia dotata dell'attrezzatura medica adeguata o che invii il campione biologico di partenza a un laboratorio esterno (Lin CS et al, 2012). Perciò l'ottenimento di auto-MSCs non è scevro di rischi ed è un procedimento costoso e richiedente molto tempo, con l'impossibilità, nella pratica, di trattare patologie ad andamento acuto (Zhang J et al, 2015).

Questi impedimenti possono essere aggirati tramite l'utilizzo delle cellule allogene o xenogene.

La terapia a base di MSCs adulte allogene rappresenta un'alternativa promettente, in quanto permette la somministrazione immediata di cellule standardizzate e di qualità controllata al momento della diagnosi o dell'instaurarsi della lesione, sotto forma di prodotti commerciali *ready-to-use* (Berglund AK et al, 2017).

L'utilizzo di MSCs allogene presenta altri innumerevoli vantaggi, come l'omogeneità dei trattamenti e dei risultati terapeutici; la possibilità di creare delle banche di cellule testate per sicurezza, efficacia, caratteristiche biologiche di proliferazione e differenziazione; il risparmio di tempo per la collezione del materiale da animali e la coltura delle cellule (Przadka P et al, 2021). Dall'altra parte, gli svantaggi che interessano l'impiego di cellule allogene (o xenogene) derivano dal rischio di trasmissione di agenti patogeni e dalla possibile stimolazione di una reazione immunitaria avversa nell'animale ricevente (Przadka P et al, 2021).

D'altra parte, poiché le MSCs sono considerate cellule ad attività immunosoppressiva e dinamica nell'interazione con il sistema immunitario dell'animale ospite, la tipologia allogenica potrebbe fornire una fonte ideale in termini di allestimento e proprietà biologiche per la terapia rigenerativa veterinaria (Zhang J et al, 2015).

5.2. Immunomodulazione di MSCs autologhe e allogeniche *in vivo*

L'impianto di comuni cellule somatiche o organi di natura allogenica verrebbe rigettato dal sistema immunitario dell'animale ricevente.

Infatti, il rifiuto di cellule *non-self* è mediato dal complesso maggiore di istocompatibilità (MHC, *Major Histocompatibility Complex*), presente a livello della superficie di ogni cellula in organismi viventi (Przadka P et al, 2021).

Le molecole glicoproteiche di MHC, sulla superficie cellulare, compongono un recettore presentante l'antigene, con la funzione di legare peptidi antigenici (Tizard I, 2018).

Il legame tra le molecole antigeniche e l'MHC permette la presentazione antigenica da parte delle cellule presentanti l'antigene alle cellule T del sistema immunitario con l'innesco della risposta adattativa (Tizard I, 2018) (Fig. 21 a, Tizard I, 2018).

Perciò, gli MHC si considerano molecole decisive nell'influenzare l'integrazione o il rigetto di cellule o tessuti trapiantati da parte dell'organismo ricevente (Przadka P et al, 2021).

Le classi geniche che codificano per gli MHC si distinguono in: classe I, II e III (Fig. 21 b, Tizard I, 2018)

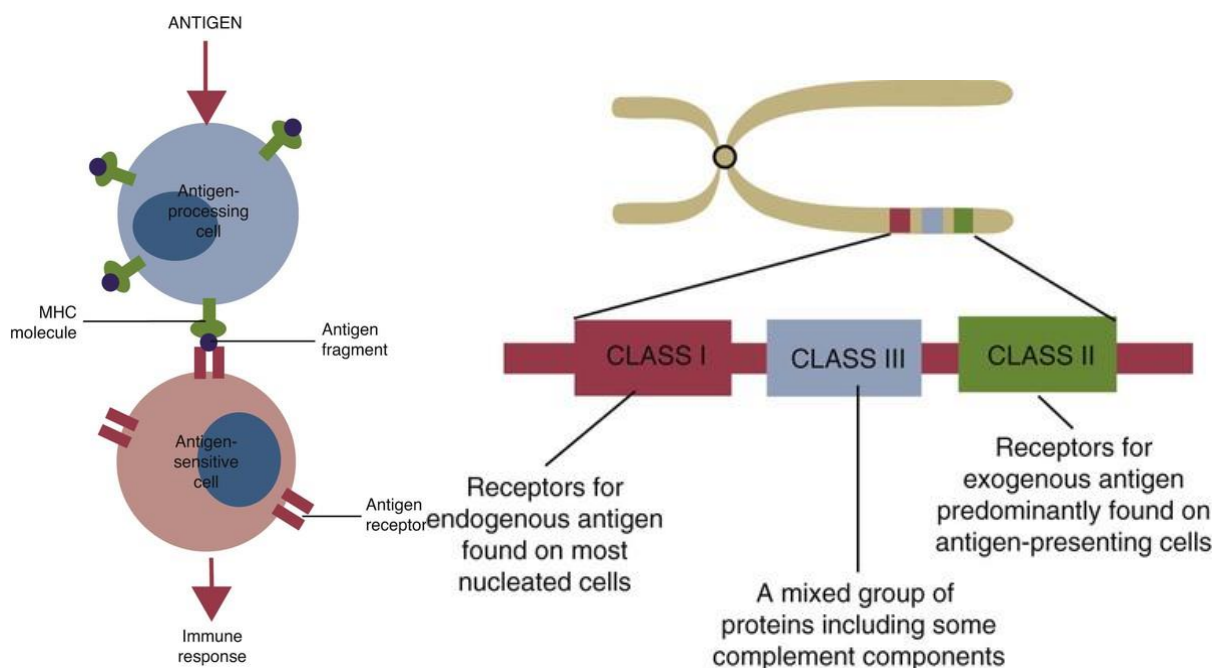


Figura 21: a) L'MHC sulle cellule presentanti l'antigene lega il frammento antigenico e lo presenta alla cellula immunitaria che stimola l'inizio della risposta immunitaria. b) Distribuzione delle tre classi di geni codificanti per MHC-I, MHC-II e MHC-III (Tizard I., 2018).

Le molecole MHC-I ricoprono la membrana cellulare di qualsiasi cellula nucleata; le MHC-II sono esclusive delle cellule presentanti l'antigene (cellule dendritiche, macrofagi e cellule B) e l'MHC-III codifica per un misto di proteine (sistema del complemento) (Tizard I., 2018).

Le cellule allogeniche con MHC-I sono riconosciute da cellule T CD8⁺ con conseguente risposta citotossica; le cellule allogeniche con MHC-II da cellule T CD4⁺ con risposta citotossica o umorale; le cellule B possono rilasciare allo-anticorpi (anticorpi direzionati verso cellule allogeniche) in seguito a stimolazione indiretta da APCs (Przadka P et al, 2021).

Le MSCs allogeniche si considerano, a differenza di altre tipologie cellulari, ipo-immunogeniche. La ridotta immunogenicità è dovuta a diverse caratteristiche delle MSCs, quali: ridotti/assenti livelli di MHC-I; assenza di MHC-II e molecole costimolatorie, quali CD40, CD80 e CD86; inibizione della proliferazione e funzione di numerose cellule immunitarie (Zhang J et al, 2015), quali cellule B, T e cellule NK; proliferazione di linfociti Treg e altre cellule tollerogeniche.

Queste caratteristiche conferiscono alle MSCs proprietà di immunoregolazione che sono comuni a cellule autologhe, allogeniche e xenogeniche (Przadka P et al, 2021).

La letteratura, tutt'oggi, si divide tra studi che dimostrano che le MSCs allogeniche promuovono la rigenerazione tissutale e la guarigione da patologie senza causare una risposta immunitaria ed effetti sistemici avversi (Carrade DD et al, 2011; Shah K et al, 2018; Brandão JS et al, 2018; Guest DJ et al, 2008) e studi che sostengono, invece, che l'impiego di MSCs allogeniche determini una risposta avversa (Pigott JH et al, 2013; Joswig AJ et al, 2017).

Le MSCs allogeniche, per la loro abilità di sopprimere la risposta immunitaria attraverso la secrezione di citochine e il contatto cellula-cellula, sono state ritenute cellule "immunoprivilegiate" e sono state considerate, senza il supporto di studi più approfonditi, sicure per la somministrazione terapeutica, senza dubbi riguardanti l'assenza del rigetto (Le Blanc K et al, 2003).

Studi *in vivo* più recenti riportano, invece, che le MSCs allogeniche non sono risparmiate dal riconoscimento da parte del sistema immunitario e non si possono considerare "immunoprivilegiate". Le allo-MSCs inducono una risposta immunitaria, nonostante le proprietà immunosoppressive e la ridotta immunogenicità (Zhang J et al, 2015).

Infatti, sembra che minime differenze esistenti tra le cellule dell'animale donatore e il ricevente abbiano una ripercussione in termini di aumento dell'immunogenicità e perdita degli effetti trofici e antiinfiammatori (Murphy M et al, 2013).

In particolare, il grado di corrispondenza tra MHC-I e MHC-II tra animale donatore e ricevente si può correlare con l'espressione della risposta immunitaria, supportando l'ipotesi che la risposta sia MHC-specifica e che le MSCs con MHC non corrispondente non siano immunoprivilegiate (Berglund AK et al, 2017).

In più studi con modelli animali, le MSCs con mancata corrispondenza di MHC tra donatore e ricevente hanno indotto sia una risposta cellulo-mediata che umorale ed erano conseguentemente rigettate. Le risposte vengono scatenate quando le cellule T si attivano in seguito al riconoscimento di molecole MHC non-self sulla superficie di MSCs di donatori (Berglund AK et al, 2017).

Oltre a ciò, si verifica anche la formazione di linfociti memoria MHC-specifici e, quindi, la possibilità di un rigetto più veloce nel caso di successive somministrazioni (Fig. 22, Berglund AK et al, 2017).

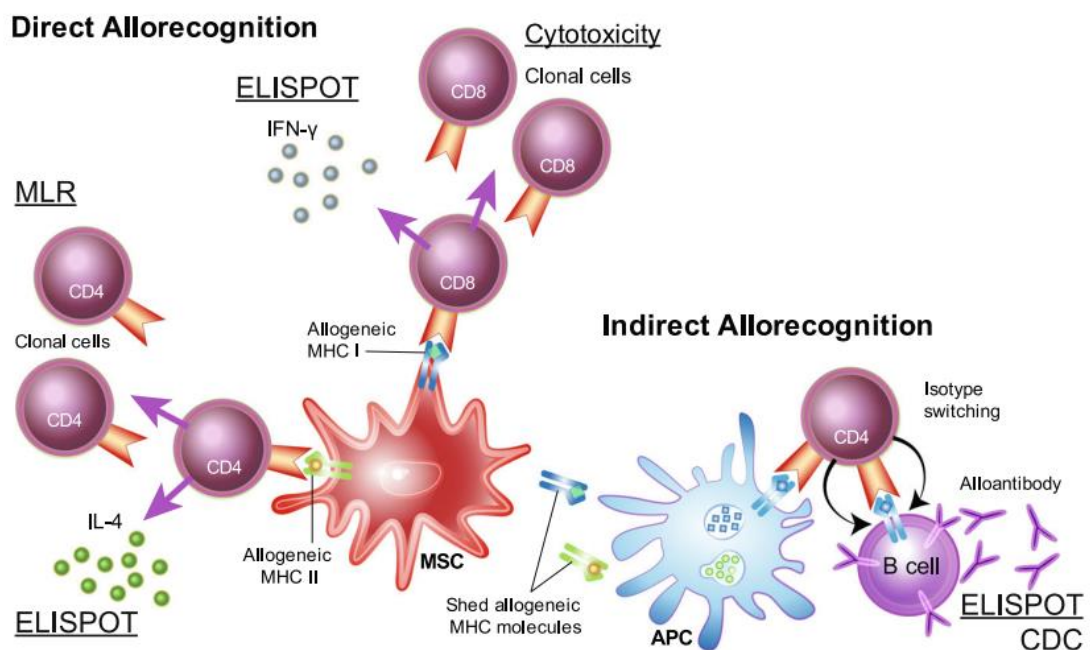


Figura 22: Risposta immunitaria in vivo verso MSCs con MHC non corrispondenti e saggi funzionali per misurare la funzione cellulare (Berglund AK et al, 2017).

La formazione di allo-anticorpi prodotti da cellule B contribuisce al rigetto delle cellule allogeniche (Badillo AT et al, 2007).

Le MSCs con MHC non corrispondente tra donatore e ricevente sopravvivono per un tempo più breve nell'organismo, ma comunque, sopravvivono più a lungo rispetto a fibroblasti di natura allogenica, a supporto della loro funzione immunomodulatoria *in vivo* (Berglund AK et al, 2017). Dei saggi di funzionalità dovrebbero essere eseguiti per delineare il tipo di risposta immunitaria stimolata e valutare le possibili implicazioni nell'efficacia terapeutica: prima della somministrazione e a più intervalli post-somministrazione (Berglund AK et al, 2017). L'efficacia terapeutica delle MSCs allogeniche può essere condizionata anche da altri fattori (Zhang J et al, 2015):

- La via di somministrazione, per esempio, topica o sistemica, determina il primo microambiente con cui si interfacciano le cellule dopo la somministrazione;
- Il tempo che intercorre tra la somministrazione e la fine degli effetti terapeutici: le MSCs, come detto, inducono una risposta immunitaria, ma il rigetto è molto debole. Le MSCs, quindi, possono resistere per un lasso di tempo, prima di essere eliminate, in cui esercitano il loro effetto. Sono meno efficaci, invece, nel lungo termine;
- Anche i tipi di patologie riscontrati possono essere determinanti: ci sono risultati controversi per quanto concerne il trapianto d'organi;
- Lo stato immunitario dell'animale ricevente prima e dopo la somministrazione cellulare influenza la sopravvivenza delle cellule;
- Il dosaggio ottimale di cellule;
- Il differenziamento cellulare: le MSCs, in seguito alla somministrazione *in vivo*, tendono a differenziare, con indebolimento o inibizione dei loro effetti terapeutici. Infatti, le condizioni infiammatorie tissutali influenzano l'espressione di MHC-I e MHC-II con l'incremento dell'immunogenicità e del rischio di rigetto da parte del sistema immunitario (Zhang J et al, 2015).

Il differenziamento, tuttavia, non determina una perdita immediata degli effetti delle cellule, bensì una perdita anticipata rispetto a MSCs non differenziate.

Nonostante le MSCs coltivate *in vitro* di alcune specie mantengano un'espressione simile dei livelli di MHC-I e MHC-II prima e dopo il differenziamento, le stesse ritengono dei depositi di mRNA codificante per MHC-II nel citoplasma che vengono rapidamente tradotti e trasferiti sulla superficie cellulare in seguito a stimolazione con IFN γ (Lohan P et al, 2014).

Per esempio, le MSCs allogeniche di derivazione equina sono uniformemente positive per l'espressione di MHC di classe I, ma sono eterogenee per l'espressione di MHC di classe

II. L'espressione di MHC di classe II è dinamica e dipende dal tipo di aspirato cellulare; dal numero di passaggi in coltura e dall'esposizione all'IFN γ (Pezzanite LM et al, 2015). In più, anche il profilo secretorio di MSCs allogeniche *in vivo* viene modificato, con riduzione di PGE2, NO e altre citochine con riduzione della sopravvivenza di queste cellule nell'organismo (Lohan P et al, 2014).

6. Potenzialità cliniche delle MSCs

Inizialmente, le cellule stromali mesenchimali (MSC) erano utilizzate principalmente nelle terapie con l'obiettivo di integrazione tissutale, soprattutto nel trattamento di patologie muscolo-scheletriche. Tuttavia, successivamente, la scoperta delle loro potenti proprietà immunomodulatorie e trofiche ha segnato un cambiamento significativo nell'approccio terapeutico. Queste nuove proprietà hanno aperto la strada all'applicazione delle MSC in una vasta gamma di patologie, in particolare quelle di natura immunomediata o infiammatoria.

6.1. Nel gatto

6.1.1. Gengivostomatite cronica felina (*Feline Chronic Gengivostomatitis*, FCGS)

La gengivostomatite cronica felina (FCGS) è una patologia infiammatoria debilitante che interessa il cavo orale del gatto e colpisce dallo 0,7% al 26% della popolazione felina con diversi gradi di gravità (Kim DH et al, 2023).

Le lesioni di FGCS interessano aree multiple all'interno del cavo orale dalle gengive sino al faringe e assomigliano a noduli simil-tumorali dovuti all'infiltrazione di plasmacellule (Hennet P, 1997). (Figura GG, Soltero-Rivera M et al, 2023).

I segni clinici dei gatti affetti sono, comunemente: anoressia, alitosi, riduzione o assenza del grooming, perdita di peso e ptialismo (Lommer MJ, 2013).

L'eziopatogenesi della FGCS ancora non è stata delineata con precisione, ma sembra essere dovuta a una risposta immunitaria cronica a patogeni intracellulari, quali il calicivirus felino (Harley R et al, 2011).

Il trattamento consiste in un'estrazione dentale parziale o completa, a seconda del grado di infiammazione presente e al coinvolgimento dentale (Soltero-Rivera M et al, 2023).

Circa un terzo dei gatti sottoposto a trattamento non è responsivo e richiede l'utilizzo di una terapia medica con farmaci immunosoppressori, antidolorifici e antibiotici. I gatti non responsivi alla terapia potrebbero essere sottoposti a eutanasia (Soltero-Rivera M et al, 2023).

Istologicamente, le lesioni sono caratterizzate dall'infiltrazione di cellule T effettrici e cellule B a livello di mucosa orale, oltre che di linfociti (CD4+ e CD8+) (Soltero-Rivera M et al, 2023).

La risposta sistemica consiste in iperglobulinemia (60% dei pazienti), livelli elevati di IFN γ , TNF α , IL-1 β , neutrofilia (30-40% dei pazienti) e presenza di cellule memoria CD8+ (Arzi B et al, 2016).

Data la natura immunomediata e infiammatoria della patologia, le MSCs rappresentano un'opzione terapeutica ideale, grazie alle proprietà di immunomodulazione, con riduzione dei

livelli sistemici di cellule B e T circolanti, cellule Natural Killers e cellule dendritiche (Soltero-Rivera M et al, 2023).

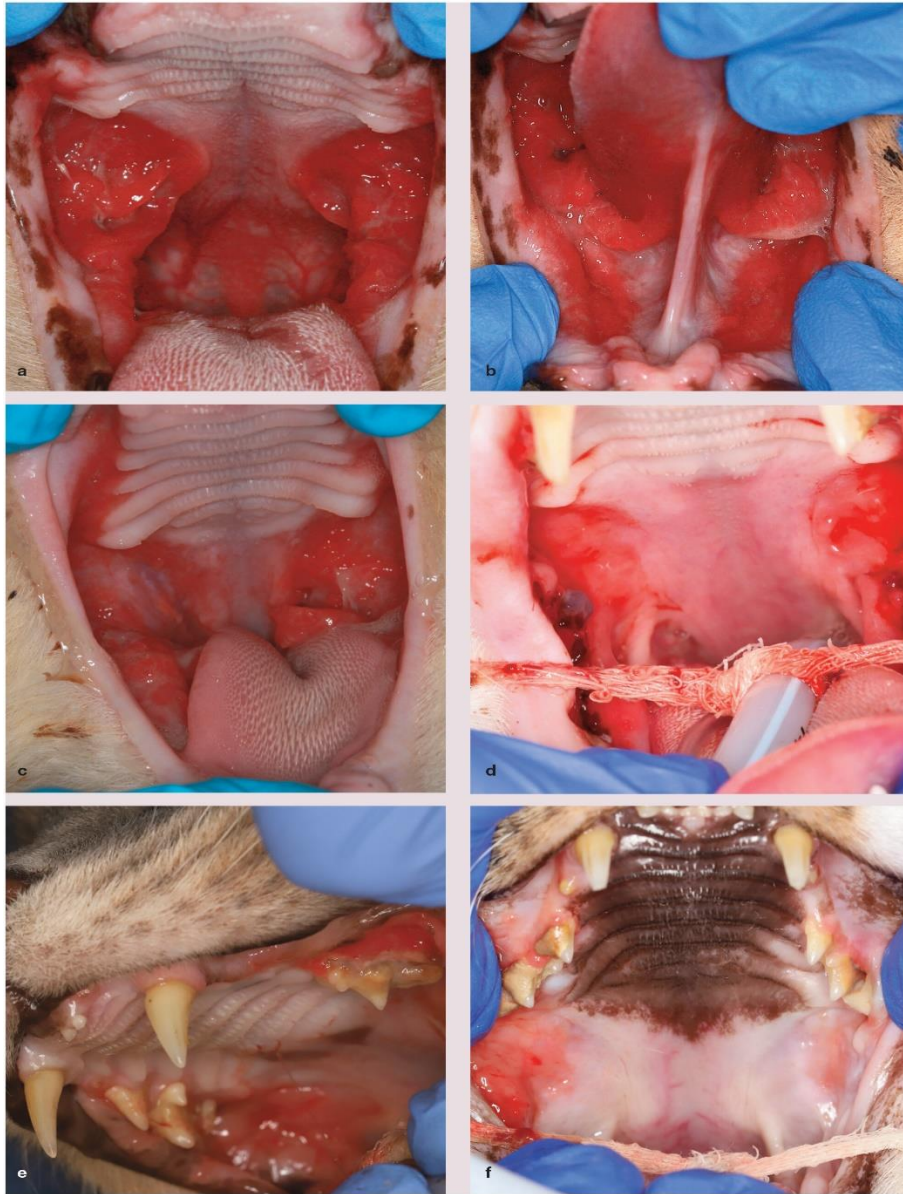


Figura 23: All'esame del cavo orale si possono riscontrare due principali quadri di FGCS: ulcerativo e proliferativo. In alcuni casi possono sussistere entrambi. (Soltero-Rivera M et al, 2023).

Arzi B e colleghi (2016, 2017) hanno applicato aMSCs (MSCs da tessuto adiposo, Fig. 23, Arzi B. et al, 2017) in gatti affetti da FCGS: in particolare, dei gatti refrattari all'estrazione dentale completa erano compresi nello studio. In ogni trial clinico, 7 gatti affetti da FCGS hanno ricevuto 2 somministrazioni per via sistemica endovenosa di 2×10^7 aMSCs a distanza di 3-4 settimane. Nel primo studio (2016) i gatti hanno ricevuto aMSCs autologhe; nel secondo (2017) aMSCs

allogeneiche. I risultati dei due studi hanno dimostrato che entrambe le aMSCs hanno portato a guarigione i gatti, tramite il reperto istopatologico di minor infiltrazione da parte di cellule B e T. Inoltre, si è verificata una riduzione della conta dei neutrofili, del numero di cellule T CD8+ circolanti e una normalizzazione del rapporto CD4+/CD8+ e riduzione transitoria dei livelli di IL-6 e TNF α (Arzi B et al, 2017).

La somministrazione endovenosa sistemica di aMSCs sia autologhe che allogeneiche ha determinato un miglioramento marcato e definitivo a lungo termine delle lesioni orali.

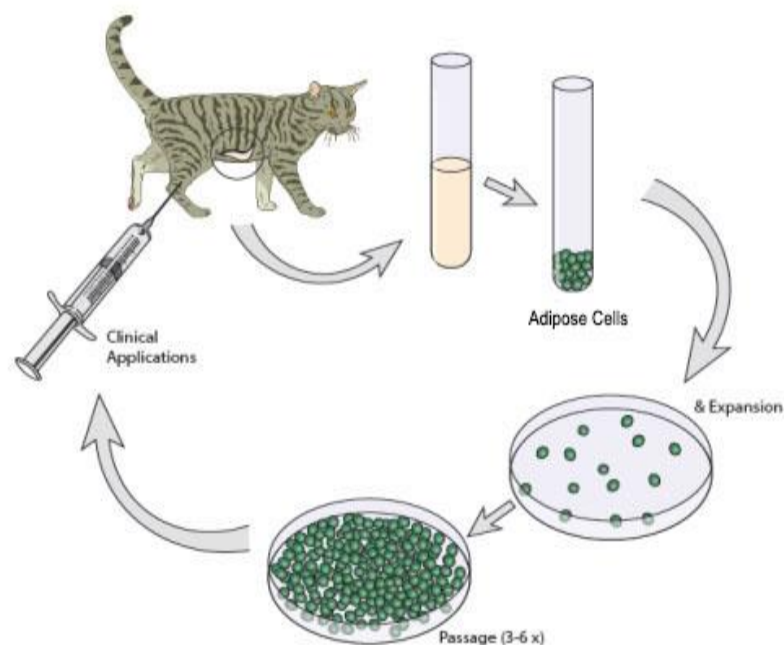


Figura 24: Arzi B. et al, 2017.

6.1.2. Malattia renale cronica (*Chronic Kidney Disease, CKD*)

La malattia renale cronica (*Chronic Kidney Disease*) è la patologia metabolica più comune dei gatti anziani, con un'incidenza dell'80% nei gatti oltre i 15 anni d'età (Brown CA et al, 2016).

È responsabile di un elevato tasso di mortalità e morbilità negli animali anziani e consiste nella compromissione strutturale e/o funzionale di uno o entrambi i reni.

Spesso la causa di CKD non è chiara e nella maggior parte dei casi in seguito a biopsia renale è possibile osservare un'inflammazione interstiziale di eziologia non nota (Brown CA et al, 2016).

In seguito alla diagnosi di CKD, il decorso della patologia è progressivo e variabile: i gatti vengono stadiati con il sistema IRIS (*International Renal Interest Society*), in base alla concentrazione

sierica di creatinina, di dimetilarginina simmetrica (SDMA), alla pressione arteriosa e al rapporto proteine:creatinina urinaria (UPC) (Geddes R e Aguiar J, 2022).

Non esiste un trattamento definitivo per ripristinare la funzione renale nei gatti con CKD, inoltre, è una malattia silente e i sintomi sono rilevabili con almeno il 75% dei nefroni compromessi (Vidane AS et al, 2017).

Il trattamento è mirato a rallentare la progressione della patologia con transizione a una dieta di tipo renale; trattamenti addizionali sono valutati caso per caso (supplementazione di potassio; fluidi per via sottocutanea; uso di eritropoietina in caso di anemia) (Geddes R e Aguiar J, 2022).

Le MSCs hanno l'abilità di migrare verso i tessuti lesionati ed effetti renoprotettivi in vitro (antiinfiammatori, proangiogenici, antifibrotici e antiossidanti) (de Almeida DC et al, 2013).

Per la natura infiammatoria della CKD, le MSCs sembrano una scelta promettente.

I benefici terapeutici delle MSCs in patologie renali sono stati dimostrati ampiamente da studi su modelli murini, con riduzione dell'infiammazione intrarenale e inibizione del processo di fibrosi (Semedo P et al, 2009; Villanueva S et al, 2011).

L'efficacia del trattamento con MSCs è stata dimostrata nel trattamento di gatti affetti da CKD, con un'iniezione unilaterale di aMSCs autologhe per via ecoguidata. Un totale di 6 gatti è stato impiegato in questo studio, con 2 gatti sani di 1,5 anni e 4 gatti con CKD tra i 6 e i 13 anni. L'iniezione intrarenale è risultata in un decremento della creatinina sierica e in un lieve miglioramento del tasso di filtrazione glomerulare senza l'induzione di effetti avversi (Quimby JM et al, 2011).

In un altro studio, dei gatti con CKD sono stati trattati con MSCs di derivazione amniotica sia per iniezione intraorgano che endovenosa. Un gatto sano è stato sottoposto all'iniezione intrarenale con somministrazione di 1×10^5 AMSCs e monitoraggio 1, 5, 24 ore e 7 giorno dopo la somministrazione; 9 gatti con CKD hanno ricevuto due somministrazioni endovenose di 2×10^6 cellule a distanza di 21 giorni. La somministrazione intraorgano richiede sedazione e anestesia generale, con il rischio di progressione della CKD e possibili complicazioni durante l'anestesia (Vidane AS et al, 2017).

Per contro, la somministrazione endovenosa di MSCs allogeniche (amniotiche) ha determinato un netto miglioramento delle condizioni cliniche dei pazienti, con ridotta proteinuria, riduzione della creatinina sierica e miglioramento del peso specifico urinario. Si è osservato un miglioramento più significativo nei gatti allo stadio II di CKD rispetto ai cani con CKD III (Vidane AS et al, 2017).

Nonostante ciò, la terapia con MSCs si considera ancora sperimentale e in via di miglioramento. Infatti, L'efficacia terapeutica notata in modelli murini con CKD sperimentalmente indotta era di

gran lunga superiore rispetto a quella notata negli studi condotti con gatti affetti da CKD (Semedo et al, 2009; Villanueva et al, 2011).

Questa differenza può essere causata dalla diversa progressione della patologia: nel gatto la CKD è una malattia silente e cronica, con un declino della funzionalità renale di anni (Quimby JM et al, 2011).

L'utilizzo delle MSCs per la malattia renale cronica, tuttavia, è ancora in fase di approfondimento, dati i risultati terapeutici notevoli in altre patologie del gatto, come l'asma felina, la gengivostomatite cronica felina e l'IBD felina (Quimby JM et al, 2011).

6.2. Nel cane

6.2.1. Cheratocongiuntivite secca, KCS (o *Dry Eye*)

La cheratocongiuntivite secca, conosciuta anche come "*Dry Eye Syndrome*", è una patologia oftalmica cronica di natura infiammatoria, caratterizzata da un'inflammazione delle ghiandole lacrimali e una ridotta secrezione di film lacrimale (Bittencourt MK et al, 2016).

La patologia interessa l'apparato lacrimale e la privazione del film lacrimale determina l'insufficiente lubrificazione, apporto nutritivo e rimozione di detriti dalla superficie corneale.

L'eziologia di KCS comprende cause: congenite (Yorkshire Terrier, Bedlington Terrier, English Cocker Spaniel, Cavalier King Charles Spaniel), metaboliche (diabete mellito, ipotiroidismo), infettive (Virus del cimurro, Leishmania), da farmaci (sedativi, anestetici), neurogenica, da radiazioni e iatrogena (per rimozione chirurgica), idiopatiche, ma principalmente immunomediate (Dodi PL, 2015).

La KCS immunomediata è bilaterale e consiste nella distruzione immunomediata delle ghiandole lacrimali. La predisposizione di razza comprende Cavalier King Charles Spaniel, American Cocker Spaniel, English Bulldog, Lhasa Apsos, carlini, Shih Tzu, WHWT, Boston Terrier e Samoyedo (O'Neill DG et al, 2021).

I sintomi di KCS sono scolo oculare mucoso, iperemia congiuntivale, blefarospasmo, vascolarizzazione corneale, fibrosi, pigmentazione corneale, fino a densa opacità corneale (o *clouding*) e possibile ulcerazione con perdita della vista (Bittencourt MK et al, 2016).

La terapia corrente consiste principalmente in farmaci immunosoppressori, come ciclosporina, tacrolimus e pimecrolimus, da usare per un tempo indefinito; inoltre, alcuni cani sono resistenti alla ciclosporina. I proprietari sono tenuti, prima della terapia, a rimuovere le secrezioni oculari, più volte al giorno (Dodi PL, 2015).

Le MSCs, in quanto cellule regolatrici della risposta immunitaria, sono state impiegate con comprovata efficacia, tramite trapianto in ghiandole lacrimali, in cani con KCS (Villatoro AJ et al, 2015).

In uno studio di Bittencourt e colleghi (Bittencourt MK et al, 2016) è stato valutato il beneficio del trapianto intralacrimale di MSCs allogeneiche in cani con grado lieve-moderato-severo di KCS. Un totale di 24 occhi con KCS da 15 cani di razze differenti erano stati selezionati. Una singola somministrazione di MSCs, 1×10^6 all'interno delle ghiandole lacrimali (dorsale e della terza palpebra) è stata effettuata. Nessun effetto avverso è stato osservato in seguito alla somministrazione allogena. Nei cani con KCS lieve la produzione lacrimale fisiologica è stata ripristinata, nei casi di KCS più grave non si è verificata la guarigione completa dell'occhio, ma è stata osservato un miglioramento nei segni clinici (Fig. 25, Bittencourt MK et al, 2016). Il vantaggio delle MSCs rispetto alle terapie convenzionali consiste nell'effetto sul lungo periodo (fino a 12 mesi), anche in seguito a singola somministrazione, senza la necessità di una somministrazione quotidiana di altri farmaci.



Figura 25: Valutazione del miglioramento dei segni clinici post somministrazione di MSCs a breve termine (28 giorni) e a lungo termine (12 mesi) in quattro cani (Bittencourt MK et al, 2016).

In un altro studio di Wei LN e colleghi (Wei LN et al, 2022) è stata eseguita una somministrazione topica di MSCs allogeniche da tessuto adiposo in cani con KCS. I cani sono stati divisi in due gruppi e hanno ricevuto le aMSCs per via topica una volta a settimana per sei settimane. I risultati hanno evidenziato un miglioramento nella quantità e qualità del film lacrimale. In particolare, il 56,6% dei pazienti non responsivi al trattamento con farmaci immunosoppressori ha risposto alla terapia con MSCs allogeniche. La via topica è stata preferita all'iniezione periorbitale per evitare procedure di sedazione o anestesia generale.

6.2.2. Ferite cutanee

Le lesioni cutanee sono molto comuni nei cani e diversi studi hanno dimostrato che l'utilizzo di MSCs può portare a una miglior guarigione delle ferite.

La guarigione tissutale consiste in un processo a cascata che comprende numerose tipologie cellulari, citochine e fattori di crescita e le MSCs rappresentano una potenziale terapia alternativa (Enciso N et al, 2020).

Nello studio di Enciso N e colleghi (Enciso N et al, 2020) un cane con ferite da morso multiple è stato sottoposto a terapia antibiotica per 8 giorni. Al terzo giorno sono state somministrate 1×10^7 MSCs allogeniche da tessuto adiposo per via intradermica in alcune ferite. Altre ferite sono state trattate con le terapie convenzionali con antibiotici ad uso topico sino a completa chiusura. Il monitoraggio con istopatologia ha evidenziato, nelle ferite trattate con aMSCs, l'assenza di cellule infiammatorie e la presenza di follicoli piliferi, a differenza delle ferite trattate con la terapia convenzionale.

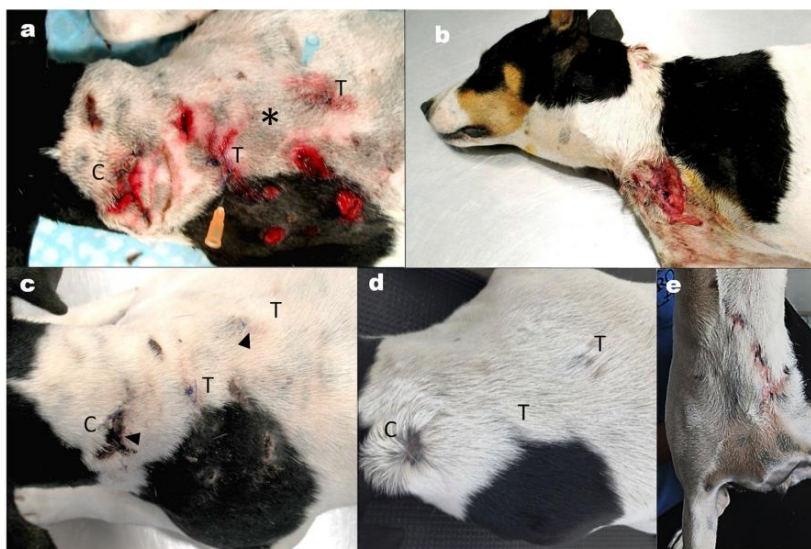


Figura 26: Processo di guarigione delle ferite trattate con aMSCs allogeniche a livello del collo del cane (a, c, d) VS delle ferite trattate con terapia convenzionale sul torace (b, e).

La valutazione delle ferite trattate con aMSCs ha permesso di stabilire un processo di guarigione più rapido e la ricomparsa dei peli a differenza delle ferite trattate con terapia convenzionale. L'uso di MSCs allogeniche non presenta rischio di rigetto e sopprime la risposta da parte di popolazioni linfocitarie.

Lo studio ha dimostrato che le MSCs supportano un processo rigenerativo, con riepitelizzazione, riduzione dell'infiltrato infiammatorio e presenza di follicoli piliferi.

Nello studio di Kim JW e colleghi (Kim JW et al, 2013) 10 cani sani con ferite sul dorso sperimentalmente indotte sono stati sottoposti a somministrazione intradermica con MSCs allogeniche. Il tasso di chiusura e la produzione di collagene, la proliferazione cellulare e l'angiogenesi sono stati evidenziati essere incrementati nelle ferite trattate con MSCs rispetto a quelle non trattate. Inoltre, le ferite trattate con MSCs hanno evidenziato una riduzione nella quota di citochine proinfiammatorie secrete e dei fattori di guarigione tissutale (bFGF e MMP-2).

6.2.3. Osteoartrite

L'osteoartrite (OA) rappresenta una patologia degenerativa comune del cane ed è una causa frequente di zoppia e dolore.

È una patologia multifattoriale e progressiva che interessa le articolazioni sinoviali: non interessa solo la porzione cartilaginea, ma anche le altre strutture articolari, con sclerosi ossea subcondrale, osteofitosi, sinovite, degenerazione dei legamenti e dei menischi (Pye C et al, 2022).

L'OA insorge in seguito a fattori scatenanti, quali: displasia dell'anca, displasia del gomito, malattia del legamento crociato craniale, lussazione di rotula, malformazioni degli arti e fratture articolari. Tra i fattori di rischio si annoverano: predisposizione genetica, dieta, sedentarietà e obesità (Anderson KL et al, 2018).

In particolare, alcune razze, di grossa taglia, sono più soggette a questa patologia: Border Collie, Bull Mastiff, Dogue de Bordeaux, Pointer tedesco, Pastore tedesco, Golden Retriever, Labrador Retriever, Rottweiler, Springer Spaniel, cane da pastore scozzese e old english sheepdog (Anderson KL et al, 2018).

La terapia medica è sintomatica e consiste nella somministrazione di farmaci antiinfiammatori non steroidei; piprant; anti-NGF mabs (*anti-Nerve Growth Factor Monoclonal Antibodies*), oppioidi; gabapentinoidi; antagonisti dei recettori NMDA; cannabinoidi (Pye C et al, 2022).

La terapia con MSCs è un'ottima candidata: le molecole bioattive rilasciate hanno un'attività condroprotettiva, immunosoppressiva, antiinfiammatoria (Kriston-Pál É et al, 2020).

Nello studio di Kriston P e colleghi (Kriston-Pál É et al, 2020) il tessuto adiposo viscerale di scarto da chirurgia di ovarioisterectomia è servito come fonte di MSC allogeniche da utilizzare come

terapia rigenerativa per casi di osteoartrite nel cane. Erano compresi 58 cani tra cui la maggioranza con displasia di spalla, e il resto displasia d'anca, ginocchio e gomito. La somministrazione di aMSCs consisteva in 12×10^6 cellule per iniezione intraarticolare. Lo studio ha dimostrato che il trapianto intraarticolare di MSC ha avuto un effetto benefico a lungo termine sulla zoppia e sul miglioramento di qualità di vita degli animali: l'84% degli animali ha mantenuto una condizione migliorata con assenza di zoppia, di somministrazione di altri farmaci o zoppia sporadica nel follow-up 4-5 anni dopo. Inoltre, la somministrazione di MSCs allogeniche non appare associata all'insorgenza di tumori o effetti avversi (se non una lieve infiammazione locale in due casi per circa una settimana).

Nello studio di Shah K e colleghi (Shah K et al, 2018) è stato descritto l'andamento dell'osteoartrite in seguito a somministrazione di MSCs allogeniche da tessuto adiposo in 203 cani. La somministrazione è stata eseguita sia per via intraarticolare che endovenosa. I cani presentavano dolore cronico delle articolazioni, zoppia all'andatura e mobilità ridotta. Al follow-up a 10 settimane si è rilevato un miglioramento significativo dei sintomi con riduzione del dolore, aumentata attività motoria, migliore mobilità. Il 90% dei cani di età inferiore ai 9 anni e il 60% dei cani anziani hanno mostrato una migliore qualità di vita.

Per questi risultati, le MSCs, anche allogeniche, si considerano una svolta nel trattamento dell'osteoartrite nel cane.

Nello studio di Olsen A e colleghi (Olsen A et al, 2019) 13 cani con osteoartrite del gomito spontanea hanno ricevuto tre dosi di MSCs allogeniche da tessuto adiposo. In un periodo di 6 mesi sono stati raccolti dati sull'andatura, sull'analisi del fluido articolare e tramite questionari ai proprietari. Non sono stati rilevati eventi avversi in seguito ai trattamenti ripetuti con buona tolleranza. Sono stati osservati miglioramenti per quanto riguarda il comportamento dell'animale e l'attività media, al contrario, i biomarcatori del liquido sinoviale non sono variati. Per questo, nonostante la tolleranza e il miglioramento clinico, la mancanza di corrispondenza nei dati di laboratorio rende necessarie ulteriori ricerche.

6.3. Nel cavallo

Nella specie equina il trattamento a base di MSCs, da tessuto adiposo o midollo osseo, rappresenta un trattamento efficiente per patologie ortopediche, come osteoartriti, tendiniti, desmiti e anche per la guarigione di ferite.

Le MSCs autologhe richiedono qualche settimana per l'espansione causando un ritardo nella somministrazione, invece, le MSCs allogeniche, come terapia "off-the-shelf", permettono una somministrazione immediata, al momento della diagnosi.

Nonostante la terapia promettente, esiste una preoccupazione riguardante l'immunogenicità delle MSCs allogeniche e quindi la possibilità di rigetto.

Infatti, le MSCs allogeniche sembrano essere riconosciute dal sistema immunitario, con l'induzione di una risposta anticorpale *in vivo*; cross-reattività con classi di MHC anche diversi dal donatore di MSCs nonché una possibile riduzione nell'efficacia di somministrazioni ripetute (Pezzanite LM et al, 2015).

Sembra che l'insorgenza di una risposta umorale, tuttavia, sia comune alle somministrazioni di tipo allogenico e che non sia correlata a una risposta avversa verso le MSCs (Owens SD et al, 2016).

Nello studio condotto da Colbath A e colleghi (Colbath AC et al, 2020) sono stati selezionati 8 cavalli sani per paragonare l'effetto di cellule autologhe e allogeniche ad uso intraarticolare. In particolare, si è voluto paragonare l'effetto della somministrazione di MSCs autologhe e allogeniche sulle articolazioni metacarpo-falangee del medesimo paziente. L'obiettivo era di valutare la risposta infiammatoria intraarticolare e di aggirare la possibile variabilità di risposta dovuta al sistema immunitario dell'individuo e al tipo di articolazione. 1×10^6 cellule sono state somministrate nel medesimo punto dell'articolazione. Di seguito, parametri clinici come zoppia, risposta alla flessione, circonferenza dell'articolazione ed effusione articolare sono stati valutati. All'artrocentesi, sono stati valutati parametri di: conta totale di cellule nucleate, conta differenziale di cellule, proteine totali e concentrazioni sinoviali di PGE2 e CRP.

Nessuna differenza era stata osservata in un alcun parametro (clinico e di laboratorio) tra le due articolazioni trattate con MSCs autologhe e allogeniche. Entrambe le tipologie cellulari hanno causato una lieve e transitoria infiammazione sinoviale.

6.3.1. L'osteoartrite

Circa il 25% dei cavalli è affetto da osteoartrite, a diversi gradi, a un certo punto della loro vita. Possono sussistere stadi precoci con componenti infiammatorie e metabolismo della cartilagine alterato o stadi cronici con modificazioni ossee e grave compromissione della cartilagine (Broeckx SY et al, 2019).

Il trattamento più frequentemente impiegato, per stadi precoci di OA, consiste in antiinfiammatori non steroidei, corticosteroidi, glucosamina, condroitinsolfato e acido ialuronico e, più recentemente, sono state investigate le terapie cellulari. Le terapie a base di MSCs potrebbero

costituire una soluzione più duratura, poiché potenziano le popolazioni cellulari residenti e le guidano verso la rigenerazione cartilaginea (Broeckx SY et al, 2019).

Nello studio condotto da Broeckx e colleghi (Broeckx SY et al, 2019) 75 cavalli con segni precoci di osteoartrite sono stati selezionati. Di questi, 50 sono stati sottoposti a iniezione intraarticolare con un prodotto veterinario in via di sperimentazione (costituito da MSCs allogene indotte alla linea condrogenica e plasma) e i restanti con soluzione salina per costituire un gruppo di controllo. Miglioramenti significativi (in base a score di zoppia, risposta al test di flessione, score di effusione articolare) sono stati segnalati superiori nel gruppo trattato rispetto al controllo. A un anno di follow-up l'84% dei cavalli del gruppo trattato era in grado di lavorare al livello precedente all'insorgenza dei sintomi, indicando l'efficacia a lungo termine del trattamento.

Nello studio condotto da Marinas Pardo L e colleghi (Mariñas-Pardo L et al, 2018) è stata testata l'efficacia di un farmaco veterinario *off-the-shelf* costituito da MSCs allogene da tessuto adiposo. Lo studio comprendeva 80 cavalli con 90 giorni di follow-up dalla terapia. L'obiettivo di questo studio era di dimostrare che vi fosse tolleranza locale e sistemica alla terapia anche dopo somministrazioni ripetute. Non sono state osservate reazioni sistemiche alla somministrazione del farmaco e tutti i parametri sono rimasti nei range fisiologici, inclusa la CRP. La lieve reazione infiammatoria locale dopo la seconda/terza somministrazione si è risolta spontaneamente in poco tempo. Il risultato era stato un miglioramento netto della zoppia per un periodo di tempo prolungato, con riduzione della necessità di altri trattamenti antiinfiammatori prolungati.

7. Conclusioni

La medicina rigenerativa rappresenta un'area di forte interesse nella ricerca medica, sia nel campo della medicina umana che della medicina veterinaria.

L'aspetto innovativo della terapia a base di cellule stromali mesenchimali risiede nella possibilità di guidare il processo terapeutico stimolando le capacità spontanee di rigenerazione tissutale. A differenza delle terapie convenzionali, infatti, l'obiettivo non è più la risoluzione dell'infiammazione tramite meccanismi di riparazione, ma il ripristino delle proprietà tissutali originarie e precedenti all'instaurarsi della patologia.

L'uso delle cellule stromali mesenchimali in medicina veterinaria è soggetto a diversi fattori: la mancanza di una chiara regolamentazione circa il loro impiego; la variabilità interspecifica (in termini di fisiologia e anatomia); la mancanza di una conoscenza definitiva sul meccanismo d'azione di queste cellule e sulla loro interazione con il sistema immunitario dell'animale ricevente.

Questa tesi ha esplorato i meccanismi complessi di interazione tra le cellule stromali mesenchimali (MSCs) e il sistema immunitario, sia nelle prime fasi del processo infiammatorio, sia durante l'elaborazione della risposta adattativa. In particolare, il focus di questo elaborato risiede nella differenza tra le MSC autologhe e allogeniche, in termini di interazione immunitaria e di potenzialità cliniche negli animali da compagnia.

La scelta tra i due approcci rappresenta una sfida nel contesto clinico e, quindi, la comprensione dell'interazione tra queste cellule ed il sistema immunitario dell'organismo si rende necessaria per guidare la ricerca e lo sviluppo di terapie standardizzate e realizzate su misura per il paziente animale.

Attualmente, l'applicazione terapeutica delle MSC presenta risultati incoraggianti nelle patologie muscoloscheletriche, anche se recentemente la letteratura scientifica disponibile si è estesa a diversi altri tipi di patologie. Il cane e il cavallo sono le specie più indagate, ma anche altre sono comprese nella sperimentazione con le MSCs, come il gatto.

Nonostante le prime controversie sulla possibilità che le MSC allogeniche inducano una risposta avversa e dannosa per l'animale ricevente, la maggior parte delle evidenze cliniche e degli studi recenti, suggeriscono che le MSC allogeniche non siano dotate di un'immunogenicità significativa e causa di rigetto o dell'insorgenza di effetti secondari potenzialmente dannosi per il paziente.

Il confronto *in vivo* tra cellule autologhe e allogeniche non ha evidenziato alcuna differenza nella variazione dei parametri clinici o di laboratorio del paziente, se non l'induzione di lievi e transitorie risposte infiammatorie.

Per risolvere il dubbio tra l'utilizzo di un tipo cellulare rispetto ad un altro mancano studi standardizzati che si concentrino sulla caratterizzazione del tipo cellulare in uso, sull'aplotipo MHC, sui metodi di coltura impiegati e sugli effetti avversi e la sicurezza a breve e a lungo termine. Questa tesi ha tentato di sbrogliare l'interazione complessa di queste cellule con il sistema immunitario: le cellule stromali mesenchimali emergono come una terapia affascinante, in costante sviluppo e innovazione, con il potenziale di trasformare il panorama delle cure mediche e veterinarie.

8. Bibliografia

Abreu SC, Lopes-Pacheco M, Weiss DJ, Rocco PRM. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles in Lung Diseases: Current Status and Perspectives. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Feb 15;9:600711. doi: 10.3389/fcell.2021.600711.

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 Kanga 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.

Alcayaga-Miranda F, Cuenca J, Khoury M. Antimicrobial Activity of Mesenchymal Stem Cells: Current Status and New Perspectives of Antimicrobial Peptide-Based Therapies. *Front Immunol.* 2017 Mar 30;8:339. doi: 10.3389/fimmu.2017.00339.

Anderson KL, O'Neill DG, Brodbelt DC, Church DB, Meeson RL, Sargan D, Summers JF, Zulch H, Collins LM. Prevalence, duration and risk factors for appendicular osteoarthritis in a UK dog population under primary veterinary care. *Sci Rep.* 2018 Apr 4;8(1):5641. doi: 10.1038/s41598-018-23940-z.

Arzi B, Clark KC, Sundaram A, Spriet M, Verstraete FJM, Walker NJ, Loscar MR, Fazel N, Murphy WJ, Vapniarsky N, Borjesson DL. Therapeutic Efficacy of Fresh, Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Severe Refractory Feline Chronic Gingivostomatitis. *Stem Cells Transl Med.* 2017 Aug;6(8):1710-1722. doi: 10.1002/sctm.17-0035.

Arzi B, Mills-Ko E, Verstraete FJ, Kol A, Walker NJ, Badgley MR, Fazel N, Murphy WJ, Vapniarsky N, Borjesson DL. Therapeutic Efficacy of Fresh, Autologous Mesenchymal Stem Cells for Severe Refractory Gingivostomatitis in Cats. *Stem Cells Transl Med.* 2016 Jan;5(1):75-86. doi: 10.5966/sctm.2015-0127.

Babenko VA, Silachev DN, Danilina TI, Goryunov KV, Pevzner IB, Zorova LD, Popkov VA, Chernikov VP, Plotnikov EY, Sukhikh GT, Zorov DB. Age-Related Changes in Bone-Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Cells.* 2021 May 21;10(6):1273. doi: 10.3390/cells10061273.

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.

Badillo AT, Beggs KJ, Javazon EH, Tebbets JC, Flake AW. Murine bone marrow stromal progenitor cells elicit an in vivo cellular and humoral alloimmune response. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007 Apr;13(4):412-22. doi: 10.1016/j.bbmt.2006.12.447.

Bahamondes, F., Flores, E., Cattaneo, G., Bruna, F., & Conget, P. (2017). Omental adipose tissue is a more suitable source of canine Mesenchymal stem cells. *BMC Veterinary Research*, 13(1). doi:10.1186/s12917-017-1053-0.

Baker CL, Pera MF. Capturing Totipotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2018 Jan 4;22(1):25-34. doi: 10.1016/j.stem.2017.12.011.

Barrachina L, Romero A, Zaragoza P, Rodellar C, Vázquez FJ. Practical considerations for clinical use of mesenchymal stem cells: From the laboratory to the horse. *Vet J*. 2018 Aug;238:49-57. doi: 10.1016/j.tvjl.2018.07.004.

Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Apr;36(4):568-84. doi: 10.1016/j.biocel.2003.11.001.

Becker AJ, McColluch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963 Feb 2;197:452-4. doi: 10.1038/197452a0.

Berglund AK, Fortier LA, Antczak DF, Schnabel LV. Immunoprivileged no more: measuring the immunogenicity of allogeneic adult mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2017 Dec 22;8(1):288. doi: 10.1186/s13287-017-0742-8.

Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;(174):249-82.

Bittencourt MK, Barros MA, Martins JF, Vasconcellos JP, Morais BP, Pompeia C, Bittencourt MD, Evangelho KD, Kerkis I, Wenceslau CV. Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Dogs With Keratoconjunctivitis Sicca. *Cell Med.* 2016 Oct 18;8(3):63-77. doi: 10.3727/215517916X693366.

Bora P, Majumdar AS. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation. *Stem Cell Res Ther.* 2017 Jun 15;8(1):145. doi: 10.1186/s13287-017-0598-y.

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.

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.

Brondeel C, Pauwelyn G, de Bakker E, Saunders J, Samoy Y, Spaas JH. Review: Mesenchymal Stem Cell Therapy in Canine Osteoarthritis Research: "Experientia Docet" (Experience Will Teach Us). *Front Vet Sci.* 2021 May 19;8:668881. doi: 10.3389/fvets.2021.668881.

Brown CA, Elliott J, Schmiedt CW, Brown SA. Chronic Kidney Disease in Aged Cats: Clinical Features, Morphology, and Proposed Pathogeneses. *Vet Pathol.* 2016 Mar;53(2):309-26. doi: 10.1177/0300985815622975.

Brown JM, Nemeth K, Kushnir-Sukhov NM, Metcalfe DD, Mezey E. Bone marrow stromal cells inhibit mast cell function via a COX2-dependent mechanism. *Clin Exp Allergy.* 2011 Apr;41(4):526-34. doi: 10.1111/j.1365-2222.2010.03685.x.

Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Grange C, Fonsato V, Tetta C. Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. *Am J Cancer Res.* 2011;1(1):98-110. Epub 2010 Oct 22.

Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell*. 2011 Jul 8;9(1):11-5. doi: 10.1016/j.stem.2011.06.008.

Caplan AI. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell*. 2008 Sep 11;3(3):229-30. doi: 10.1016/j.stem.2008.08.008.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991 Sep;9(5):641-50. doi: 10.1002/jor.1100090504.

Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl Med*. 2017 Jun;6(6):1445-1451. doi: 10.1002/sctm.17-0051.

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.

Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007 Nov;25(11):2739-49. doi: 10.1634/stemcells.2007-0197.

Chang C, Yan J, Yao Z, Zhang C, Li X, Mao HQ. Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Paracrine Signals and Their Delivery Strategies. *Adv Healthc Mater*. 2021 Apr;10(7):e2001689. doi: 10.1002/adhm.202001689.

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.

Chen Y, Dong XJ, Zhang GR, Shao JZ, Xiang LX. In vitro differentiation of mouse bone marrow stromal stem cells into hepatocytes induced by conditioned culture medium of hepatocytes. *J Cell Biochem*. 2007 Sep 1;102(1):52-63. doi: 10.1002/jcb.21275.

Cheung TH, Rando TA. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013 Jun;14(6):329-40. doi: 10.1038/nrm3591.

Cho IJ, Lui PP, Obajdin J, Riccio F, Stroukov W, Willis TL, Spagnoli F, Watt FM. Mechanisms, Hallmarks, and Implications of Stem Cell Quiescence. *Stem Cell Reports*. 2019 Jun 11;12(6):1190-1200. doi: 10.1016/j.stemcr.2019.05.012.

Choudhery MS, Khan M, Mahmood R, Mehmood A, Khan SN, Riazuddin S. Bone marrow derived mesenchymal stem cells from aged mice have reduced wound healing, angiogenesis, proliferation and anti-apoptosis capabilities. *Cell Biol Int*. 2012 Aug 1;36(8):747-53. doi: 10.1042/CBI20110183.

Colbath AC, Dow SW, Hopkins LS, Phillips JN, McIlwraith CW, Goodrich LR. Allogeneic vs. autologous intra-articular mesenchymal stem cell injection within normal horses: Clinical and cytological comparisons suggest safety. *Equine Vet J*. 2020 Jan;52(1):144-151. doi: 10.1111/evj.13136.

Colbath AC, Frisbie DD, Dow SW, Kisiday JD, McIlwraith CW, Goodrich LR. Equine Models for the Investigation of Mesenchymal Stem Cell Therapies in Orthopaedic Disease. *Operative Techniques in Sports Medicine*, 2017 25(1), 41–49. doi:10.1053/j.otsm.2016.12.007.

Craig DJ, James AW, Wang Y, Tavian M, Crisan M, Péault BM. Blood Vessel Resident Human Stem Cells in Health and Disease. *Stem Cells Transl Med*. 2022 Mar 3;11(1):35-43. doi: 10.1093/stcltm/szab001.

Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008 Sep 11;3(3):301-13. doi: 10.1016/j.stem.2008.07.003.

da Silva Meirelles L, Malta TM, de Deus Wagatsuma VM, Palma PV, Araújo AG, Ribeiro Malmegrim KC, Morato de Oliveira F, Panepucci RA, Silva WA Jr, Kashima Haddad S, Covas DT. Cultured Human Adipose Tissue Pericytes and Mesenchymal Stromal Cells Display a Very Similar Gene Expression Profile. *Stem Cells Dev*. 2015 Dec 1;24(23):2822-40. doi: 10.1089/scd.2015.0153.

de Almeida DC, Donizetti-Oliveira C, Barbosa-Costa P, Origassa CS, Câmara NO. In search of mechanisms associated with mesenchymal stem cell-based therapies for acute kidney injury. *Clin Biochem Rev.* 2013 Nov;34(3):131-44.

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.

de Morree A, Rando TA. Regulation of adult stem cell quiescence and its functions in the maintenance of tissue integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2023 May;24(5):334-354. doi: 10.1038/s41580-022-00568-6.

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.

Dhar, M., Neilsen, N., Beatty, K., Eaker, S., Adair, H., & Geiser, D. (2012). Equine peripheral blood-derived mesenchymal stem cells: Isolation, identification, trilineage differentiation and effect of hyperbaric oxygen treatment. *Equine Veterinary Journal*, 44(5), 600–605. doi:10.1111/j.2042-3306.2011.00536.x.

Ding L, Morrison SJ. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature.* 2013 Mar 14;495(7440):231-5. doi: 10.1038/nature11885.

Dodi PL. Immune-mediated keratoconjunctivitis sicca in dogs: current perspectives on management. *Vet Med (Auckl).* 2015 Oct 30;6:341-347. doi: 10.2147/VMRR.S66705.

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.

Duan W, Lopez MJ, Hicok K. Adult multipotent stromal cell cryopreservation: Pluses and pitfalls. *Vet Surg.* 2018 Jan;47(1):19-29. doi: 10.1111/vsu.12730.

El-Husseiny HM, Mady EA, Helal MAY, Tanaka R. The Pivotal Role of Stem Cells in Veterinary Regenerative Medicine and Tissue Engineering. *Vet Sci*. 2022 Nov 21;9(11):648. doi: 10.3390/vetsci9110648.

Eliopoulos N, Stagg J, Lejeune L, Pommey S, Galipeau J. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood*. 2005 Dec 15;106(13):4057-65. doi: 10.1182/blood-2005-03-1004.

Enciso N, Avedillo L, Fermín ML, Fragío C, Tejero C. Regenerative potential of allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal cells in canine cutaneous wounds. *Acta Vet Scand*. 2020 Mar 12;62(1):13. doi: 10.1186/s13028-020-0511-z.

Engeland K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ*. 2022 May;29(5):946-960. doi: 10.1038/s41418-022-00988-z.

Enver T, Pera M, Peterson C, Andrews PW. Stem cell states, fates, and the rules of attraction. *Cell Stem Cell*. 2009 May 8;4(5):387-97. doi: 10.1016/j.stem.2009.04.011.

Feige P, Brun CE, Ritso M, Rudnicki MA. Orienting Muscle Stem Cells for Regeneration in Homeostasis, Aging, and Disease. *Cell Stem Cell*. 2018 Nov 1;23(5):653-664. doi: 10.1016/j.stem.2018.10.006.

Ferguson SW, Wang J, Lee CJ, Liu M, Neelamegham S, Canty JM, Nguyen J. The microRNA regulatory landscape of MSC-derived exosomes: a systems view. *Sci Rep*. 2018 Jan 23;8(1):1419. doi: 10.1038/s41598-018-19581-x.

Ferraro F, Celso CL, Scadden, D. Adult stem cells and their niches. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2010 695, 155–168. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7037-4_11

Frisbie DD, Smith RK. Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. *Equine Vet J*. 2010 Jan;42(1):86-9. doi: 10.2746/042516409X477263.

Fu Y, Karbaat L, Wu L, Leijten J, Both SK, Karperien M. Trophic Effects of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 2017 Dec;23(6):515-528. doi: 10.1089/ten.TEB.2016.0365.

Fuchs E, Chen T. A matter of life and death: self-renewal in stem cells. *EMBO Rep.* 2013 Jan;14(1):39-48. doi: 10.1038/embor.2012.197.

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.

Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Aug;1840(8):2506-19. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.01.010.

Geddes R, Aguiar J. Feline Comorbidities: Balancing hyperthyroidism and concurrent chronic kidney disease. *J Feline Med Surg.* 2022 Jul;24(7):641-650. doi: 10.1177/1098612X221090390.

Gimble JM, Guilak F, Nuttall ME, Sathishkumar S, Vidal M, Bunnell BA. In vitro Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Transfus Med Hemother.* 2008;35(3):228-238. doi: 10.1159/000124281.

Giovannini S, Brehm W, Mainil-Varlet P, Nesic D. Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells. *Differentiation*, 2008 76(2), 118–129. doi:10.1111/j.1432-0436.2007.00207.x.

Glenn JD, Whartenby KA. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World J Stem Cells.* 2014 Nov 26;6(5):526-39. doi: 10.4252/wjsc.v6.i5.526.

Goodell MA, Nguyen H, Shroyer N. Somatic stem cell heterogeneity: diversity in the blood, skin and intestinal stem cell compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015 May;16(5):299-309. doi: 10.1038/nrm3980.

Griffey CJ, Yamamoto A. Macroautophagy in CNS health and disease. *Nat Rev Neurosci.* 2022 Jul;23(7):411-427. doi: 10.1038/s41583-022-00588-3.

Guadix JA, Zugaza JL, Gálvez-Martín P. Characteristics, applications and prospects of mesenchymal stem cells in cell therapy. *Med Clin (Barc)*. 2017 May 10;148(9):408-414. English, Spanish. doi: 10.1016/j.medcli.2016.11.033.

Guadix JA, Zugaza JL, Gálvez-Martín P. Characteristics, applications and prospects of mesenchymal stem cells in cell therapy. *Med Clin (Barc)*. 2017 May 10;148(9):408-414. English, Spanish. doi: 10.1016/j.medcli.2016.11.033.

Guercio A, Di Marco P, Casella S, Russotto L, Puglisi F, Majolino C, Giudice E, Di Bella S, Purpari G, Cannella V, Piccione V, Mesenchymal Stem Cells Derived From Subcutaneous Fat and Platelet-Rich Plasma Used in Athletic Horses With Lameness of the Superficial Digital Flexor Tendon, *Journal of Equine Veterinary Science*. 2015, doi:10.1016/j.jevs.2014.10.006 .

Guest DJ, Smith MR, Allen WR. Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: preliminary study. *Equine Vet J*. 2008 Mar;40(2):178-81. doi: 10.2746/042516408X276942.

Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F, Ding J. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells*. 2019 Aug 13;8(8):886. doi: 10.3390/cells8080886.

Harley R, Gruffydd-Jones TJ, Day MJ. Immunohistochemical characterization of oral mucosal lesions in cats with chronic gingivostomatitis. *J Comp Pathol*. 2011 May;144(4):239-50. doi: 10.1016/j.jcpa.2010.09.173.

Hendawy H, Uemura A, Ma D, Namiki R, Samir H, Ahmed MF, Elfadadny A, El-Husseiny HM, Chieh-Jen C, Tanaka R. Tissue Harvesting Site Effect on the Canine Adipose Stromal Vascular Fraction Quantity and Quality. *Animals (Basel)*. 2021 Feb 9;11(2):460. doi: 10.3390/ani11020460.

Hennet P. Chronic Gingivo-Stomatitis in Cats: Long-Term follow-up of 30 cases Treated by Dental Extractions. *Journal of Veterinary Dentistry*. 1997;14(1):15-21. doi:10.1177/089875649701400103

Heslop JA, Hammond TG, Santeramo I, Tort Piella A, Hopp I, Zhou J, Baty R, Graziano EI, Proto Marco B, Caron A, Sköld P, Andrews PW, Baxter MA, Hay DC, Hamdam J, Sharpe ME, Patel S, Jones DR, Reinhardt J, Danen EH, Ben-David U, Stacey G, Björquist P, Piner J, Mills J, Rowe C, Pellegrini G, Sethu S, Antoine DJ, Cross MJ, Murray P, Williams DP, Kitteringham NR, Goldring CE, Park BK. Concise review: workshop review: understanding and assessing the risks of stem

cell-based therapies. *Stem Cells Transl Med.* 2015 Apr;4(4):389-400. doi: 10.5966/sctm.2014-0110.

Hicks MR, Pyle AD. The emergence of the stem cell niche. *Trends Cell Biol.* 2023 Feb;33(2):112-123. doi: 10.1016/j.tcb.2022.07.003.

Ho TT, Warr MR, Adelman ER, Lansinger OM, Flach J, Verovskaya EV, Figueroa ME, Passequé E. Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells. *Nature.* 2017 Mar 9;543(7644):205-210. doi: 10.1038/nature21388.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7(5):393-5. doi: 10.1080/14653240500319234.

Hosseiniyan Khatibi SM, Kheyrolahzadeh K, Barzegari A, Rahbar Saadat Y, Zununi Vahed S. Medicinal signaling cells: A potential antimicrobial drug store. *J Cell Physiol.* 2020 Nov;235(11):7731-7746. doi: 10.1002/jcp.29728.

Hsu SC, Wang LT, Yao CL, Lai HY, Chan KY, Liu BS, Chong P, Lee OK, Chen HW. Mesenchymal stem cells promote neutrophil activation by inducing IL-17 production in CD4⁺ CD45RO⁺ T cells. *Immunobiology.* 2013 Jan;218(1):90-5. doi: 10.1016/j.imbio.2012.02.007.

Huang Y, Wu Q, Tam PKH. Immunomodulatory Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells and Their Potential Clinical Applications. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 2;23(17):10023. doi: 10.3390/ijms231710023.

Inaba M, Yamashita YM. Asymmetric stem cell division: precision for robustness. *Cell Stem Cell.* 2012 Oct 5;11(4):461-9. doi: 10.1016/j.stem.2012.09.003.

Jackson MV, Morrison TJ, Doherty DF, McAuley DF, Matthay MA, Kissenpfennig A, O'Kane CM, Krasnodembskaya AD. Mitochondrial Transfer via Tunneling Nanotubes is an Important Mechanism by Which Mesenchymal Stem Cells Enhance Macrophage Phagocytosis in the In Vitro and In Vivo Models of ARDS. *Stem Cells.* 2016 Aug;34(8):2210-23. doi: 10.1002/stem.2372.

Jacobs RM, Kociba GJ, Ruoff WW. Monoclonal gammopathy in a horse with defective hemostasis. *Vet Pathol.* 1983 Sep;20(5):643-7. doi: 10.1177/030098588302000520.

Jhala D, Vasita R. A Review on Extracellular Matrix Mimicking Strategies for an Artificial Stem Cell Niche, *Polymer Reviews*, 2015, 55:4, 561-595, doi: 10.1080/15583724.2015.1040552.

Jimenez-Puerta GJ, Marchal JA, López-Ruiz E, Gálvez-Martín P. Role of Mesenchymal Stromal Cells as Therapeutic Agents: Potential Mechanisms of Action and Implications in Their Clinical Use. *J Clin Med*. 2020 Feb 6;9(2):445. doi: 10.3390/jcm9020445.

Joshi A, Kundu M. Mitophagy in hematopoietic stem cells: the case for exploration. *Autophagy*. 2013 Nov 1;9(11):1737-49. doi: 10.4161/auto.26681.

Joswig AJ, Mitchell A, Cummings KJ, Levine GJ, Gregory CA, Smith R 3rd, Watts AE. Repeated intra-articular injection of allogeneic mesenchymal stem cells causes an adverse response compared to autologous cells in the equine model. *Stem Cell Res Ther*. 2017 Feb 28;8(1):42. doi: 10.1186/s13287-017-0503-8.

Jung JW, Kwon M, Choi JC, Shin JW, Park IW, Choi BW, Kim JY. Familial occurrence of pulmonary embolism after intravenous, adipose tissue-derived stem cell therapy. *Yonsei Med J*. 2013 Sep;54(5):1293-6. doi: 10.3349/ymj.2013.54.5.1293.

Kai T, Spradling A. An empty Drosophila stem cell niche reactivates the proliferation of ectopic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 15;100(8):4633-8. doi: 10.1073/pnas.0830856100. Epub 2003 Apr 3.

Kasashima Y, Ueno T, Tomita A, Goodship AE, Smith RK. Optimisation of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells. *Equine Vet J*. 2011 May;43(3):288-94. doi: 10.1111/j.2042-3306.2010.00215.x.

Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005 Jul 1;121(7):1109-21. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.026.

Kim DH, Kwak HH, Woo HM. Prevalence of feline chronic gingivostomatitis in feral cats and its risk factors. *J Feline Med Surg*. 2023 Jan;25(1):1098612X221131453. doi: 10.1177/1098612X221131453.

Kim JW, Lee JH, Lyoo YS, Jung DI, Park HM. The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds. *Vet Dermatol*. 2013 Apr;24(2):242-e53. doi: 10.1111/vde.12011.

Koerner J, Nesic D, Romero JD, Brehm W, Mainil-Varlet P, Grogan SP. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006 Jun;24(6):1613-9. doi: 10.1634/stemcells.2005-0264.

Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*. 2013;85(1):3-10. doi: 10.1159/000345615.

Krieger T, Simons BD. Dynamic stem cell heterogeneity. *Development*. 2015 Apr 15;142(8):1396-406. doi: 10.1242/dev.101063.

Kriston-Pál É, Haracska L, Cooper P, Kiss-Tóth E, Szukacsov V, Monostori É. A Regenerative Approach to Canine Osteoarthritis Using Allogeneic, Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. Safety Results of a Long-Term Follow-Up. *Front Vet Sci*. 2020 Aug 13;7:510. doi: 10.3389/fvets.2020.00510.

Kulus M, Kulus J, Jankowski M, Borowiec B, Jeseta M, Bukowska D, Brüßow KP, Kempisty B, Antosik P. The use of mesenchymal stem cells in veterinary medicine. *Medical Journal of Cell Biology*, vol.6, no.3, 3918, pp.101-107. <https://doi.org/10.2478/acb-2018-0016>.

Kurokawa K, Hayakawa Y, Koike K. Plasticity of Intestinal Epithelium: Stem Cell Niches and Regulatory Signals. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(1):357. <https://doi.org/10.3390/ijms22010357>.

Kwon HM, Hur SM, Park KY, Kim CK, Kim YM, Kim HS, Shin HC, Won MH, Ha KS, Kwon YG, Lee DH, Kim YM. Multiple paracrine factors secreted by mesenchymal stem cells contribute to angiogenesis. *Vascul Pharmacol*. 2014 Oct;63(1):19-28. doi: 10.1016/j.vph.2014.06.004.

Kyo S, Maida Y, Inoue M. Stem cells in endometrium and endometrial cancer: accumulating evidence and unresolved questions. *Cancer Lett*. 2011 Sep 28;308(2):123-33. doi: 10.1016/j.canlet.2011.05.015.

Lakshmiopathy U, Verfaillie C. Stem cell plasticity. *Blood Rev*. 2005 Jan;19(1):29-38. doi: 10.1016/j.blre.2004.03.001.

Lane SW, Williams DA, Watt FM. Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nat Biotechnol*. 2014 Aug;32(8):795-803. doi: 10.1038/nbt.2978.

- 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.
- Laurenti E, Göttgens B. From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature.* 2018 Jan 24;553(7689):418-426. doi: 10.1038/nature25022.
- Le Blanc K, Davies LC. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. *Immunol Lett.* 2015 Dec;168(2):140-6. doi: 10.1016/j.imlet.2015.05.004.
- 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.
- Le Blanc K, Ringdén O. Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol.* 2006 Oct;18(5):586-91. doi: 10.1016/j.coi.2006.07.004.
- Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol.* 2003 Oct;31(10):890-6. doi: 10.1016/s0301-472x(03)00110-3.
- Lee AS, Tang C, Cao F, Xie X, van der Bogt K, Hwang A, Connolly AJ, Robbins RC, Wu JC. Effects of cell number on teratoma formation by human embryonic stem cells. *Cell Cycle.* 2009 Aug 15;8(16):2608-12. doi: 10.4161/cc.8.16.9353.
- Lee SA, Li KN, Tumbar T. Stem cell-intrinsic mechanisms regulating adult hair follicle homeostasis. *Exp Dermatol.* 2021 Apr;30(4):430-447. doi: 10.1111/exd.14251.
- Li Y, Guo W. Neural Stem Cell Niche and Adult Neurogenesis. *Neuroscientist.* 2021 Jun;27(3):235-245. doi: 10.1177/1073858420939034.
- Lin CS, Lin G, Lue TF. Allogeneic and xenogeneic transplantation of adipose-derived stem cells in immunocompetent recipients without immunosuppressants. *Stem Cells Dev.* 2012 Oct 10;21(15):2770-8. doi: 10.1089/scd.2012.0176.
- Lin H, Sohn J, Shen H, Langhans MT, Tuan RS. Bone marrow mesenchymal stem cells: Aging and tissue engineering applications to enhance bone healing. *Biomaterials.* 2019 May;203:96-110. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.06.026.

- Liu XB, Chen H, Chen HQ, Zhu MF, Hu XY, Wang YP, Jiang Z, Xu YC, Xiang MX, Wang JA. Angiopoietin-1 preconditioning enhances survival and functional recovery of mesenchymal stem cell transplantation. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2012 Aug;13(8):616-23. doi: 10.1631/jzus.B1201004.
- Lohan P, Coleman CM, Murphy JM, Griffin MD, Ritter T, Ryan AE. Changes in immunological profile of allogeneic mesenchymal stem cells after differentiation: should we be concerned? *Stem Cell Res Ther*. 2014 Aug 19;5(4):99. doi: 10.1186/scrt488.
- Lommer MJ. Efficacy of cyclosporine for chronic, refractory stomatitis in cats: A randomized, placebo-controlled, double-blinded clinical study. *J Vet Dent*. 2013 Spring;30(1):8-17. doi: 10.1177/089875641303000101.
- 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.
- Luo J, Suhr ST, Chang EA, Wang K, Ross PJ, Nelson LL, Venta PJ, Knott JG, Cibelli JB. Generation of leukemia inhibitory factor and basic fibroblast growth factor-dependent induced pluripotent stem cells from canine adult somatic cells. *Stem Cells Dev*. 2011 Oct;20(10):1669-78. doi: 10.1089/scd.2011.0127.
- Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ*. 2014 Feb;21(2):216-25. doi: 10.1038/cdd.2013.158.
- Maacha S, Sidahmed H, Jacob S, Gentilcore G, Calzone R, Grivel JC, Cugno C. Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stromal Cells in Angiogenesis. *Stem Cells Int*. 2020 Mar 9;2020:4356359. doi: 10.1155/2020/4356359.
- MacDonald ES, Barrett JG. The Potential of Mesenchymal Stem Cells to Treat Systemic Inflammation in Horses. *Front Vet Sci*. 2020 Jan 21;6:507. doi: 10.3389/fvets.2019.00507.
- Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, Mosca JD. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*. 2003 Mar-Apr;10(2):228-41. doi: 10.1007/BF02256058.

Marescal O, Cheeseman IM. Cellular Mechanisms and Regulation of Quiescence. *Dev Cell*. 2020 Nov 9;55(3):259-271. doi: 10.1016/j.devcel.2020.09.029.

Mariñas-Pardo L, García-Castro J, Rodríguez-Hurtado I, Rodríguez-García MI, Núñez-Naveira L, Hermida-Prieto M. Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (Horse Allo 20) for the Treatment of Osteoarthritis-Associated Lameness in Horses: Characterization, Safety, and Efficacy of Intra-Articular Treatment. *Stem Cells Dev*. 2018 Sep 1;27(17):1147-1160. doi: 10.1089/scd.2018.0074.

Mens MMJ, Ghanbari M. Cell Cycle Regulation of Stem Cells by MicroRNAs. *Stem Cell Rev Rep*. 2018 Jun;14(3):309-322. doi: 10.1007/s12015-018-9808-y.

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

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.

Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014 Jan 16;505(7483):327-34. doi: 10.1038/nature12984.

Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):598-611. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.038.

Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE, Weissman IL. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development*. 1997 May;124(10):1929-39. doi: 10.1242/dev.124.10.1929.

Müller L, Tunger A, Wobus M, von Bonin M, Towers R, Bornhäuser M, Dazzi F, Wehner R, Schmitz M. Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stromal Cells: An Update. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Feb 9;9:637725. doi: 10.3389/fcell.2021.637725.

Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med*. 2013 Nov 15;45(11):e54. doi: 10.1038/emm.2013.94.

- Nagy K, Sung HK, Zhang P, Laflamme S, Vincent P, Agha-Mohammadi S, Woltjen K, Monetti C, Michael IP, Smith LC, Nagy A. Induced pluripotent stem cell lines derived from equine fibroblasts. *Stem Cell Rev Rep*. 2011 Sep;7(3):693-702. doi: 10.1007/s12015-011-9239-5.
- Naji A, Eitoku M, Favier B, Deschaseaux F, Rouas-Freiss N, Suganuma N. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cell Mol Life Sci*. 2019 Sep;76(17):3323-3348. doi: 10.1007/s00018-019-03125-1.
- Nakamura-Ishizu A, Takizawa H, Suda T. The analysis, roles and regulation of quiescence in hematopoietic stem cells. *Development*. 2014 Dec;141(24):4656-66. doi: 10.1242/dev.106575.
- Nitzsche F, Müller C, Lukomska B, Jolkkonen J, Deten A, Boltze J. Concise Review: MSC Adhesion Cascade-Insights into Homing and Transendothelial Migration. *Stem Cells*. 2017 Jun;35(6):1446-1460. doi: 10.1002/stem.2614.
- Ohnuki M, Takahashi K. Present and future challenges of induced pluripotent stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015 Oct 19;370(1680):20140367. doi: 10.1098/rstb.2014.0367.
- Olsen A, Johnson V, Webb T, Santangelo KS, Dow S, Duerr FM. Evaluation of Intravenously Delivered Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Elbow Osteoarthritis in Dogs: A Pilot Study. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2019 May;32(3):173-181. doi: 10.1055/s-0039-1678547.
- O'Neill DG, Brodbelt DC, Keddy A, Church DB, Sanchez RF. Keratoconjunctivitis sicca in dogs under primary veterinary care in the UK: an epidemiological study. *J Small Anim Pract*. 2021 Aug;62(8):636-645. doi: 10.1111/jsap.13382.
- Owen ME. Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. In: *Peck WA (ed) Bone and mineral research*, vol 3. Elsevier, 1985, Amsterdam, New York, Oxford, pp 1–25.
- Owens SD, Kol A, Walker NJ, Borjesson DL. Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Treatment Induces Specific Alloantibodies in Horses. *Stem Cells Int*. 2016;2016:5830103. doi: 10.1155/2016/5830103.
- Pang SHM, D'Rozario J, Mendonca S, Bhuvan T, Payne NL, Zheng D, Hisana A, Wallis G, Barugahare A, Powell D, Rautela J, Huntington ND, Dewson G, Huang DCS, Gray DHD, Heng TSP. Mesenchymal stromal cell apoptosis is required for their therapeutic function. *Nat Commun*. 2021 Nov 11;12(1):6495. doi: 10.1038/s41467-021-26834-3.

- Petrova V, Vachkova E. Outlook of Adipose-Derived Stem Cells: Challenges to Their Clinical Application in Horses. *Vet Sci*. 2023 May 12;10(5):348. doi: 10.3390/vetsci10050348.
- Pezzanite LM, Fortier LA, Antczak DF, Cassano JM, Brosnahan MM, Miller D, Schnabel LV. Equine allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells elicit antibody responses in vivo. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Apr 12;6(1):54. doi: 10.1186/s13287-015-0053-x.
- Phinney DG, Pittenger MF. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells*. 2017 Apr;35(4):851-858. doi: 10.1002/stem.2575.
- Pigott JH, Ishihara A, Wellman ML, Russell DS, Bertone AL. Inflammatory effects of autologous, genetically modified autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2013;26(6):453-60. doi: 10.3415/VCOT-13-01-0008.
- Pijnappels DA, Schaliij MJ, Ramkisoensing AA, van Tuyn J, de Vries AA, van der Laarse A, Ypey DL, Atsma DE. Forced alignment of mesenchymal stem cells undergoing cardiomyogenic differentiation affects functional integration with cardiomyocyte cultures. *Circ Res*. 2008 Jul 18;103(2):167-76. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.176131.
- Pinheiro LL, de Lima AR, Branco É. Is Stem Cell Commerce in Small Animal Therapies Scientifically and Morally Justified? *Stem Cell Rev Rep*. 2019 Aug;15(4):506-518. doi: 10.1007/s12015-019-09898-z.
- Pizzute T, Lynch K, Pei M. Impact of tissue-specific stem cells on lineage-specific differentiation: a focus on the musculoskeletal system. *Stem Cell Rev Rep*. 2015 Feb;11(1):119-32. doi: 10.1007/s12015-014-9546-8.
- Planat-Benard V, Varin A, Casteilla L. MSCs and Inflammatory Cells Crosstalk in Regenerative Medicine: Concerted Actions for Optimized Resolution Driven by Energy Metabolism. *Front Immunol*. 2021 Apr 30;12:626755. doi: 10.3389/fimmu.2021.626755.
- Prišlin M, Vlahović D, Kostešić P, Ljolje I, Brnić D, Turk N, Lojkić I, Kunić V, Karadjole T, Krešić N. An Outstanding Role of Adipose Tissue in Canine Stem Cell Therapy. *Animals (Basel)*. 2022 Apr 22;12(9):1088. doi: 10.3390/ani12091088.

Prządka P, Buczak K, Frejlich E, Gąsior L, Suliga K, Kiełbowicz Z. The Role of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Veterinary Medicine and Their Use in Musculoskeletal Disorders. *Biomolecules*. 2021 Aug 2;11(8):1141. doi: 10.3390/biom11081141.

Purwaningrum M, Jamilah NS, Purbantoro SD, Sawangmake C, Nantavisai S. Comparative characteristic study from bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Vet Sci*. 2021 Nov;22(6):e74. doi: 10.4142/jvs.2021.22.e74.

Pye C, Bruniges N, Peffers M, Comerford E. Advances in the pharmaceutical treatment options for canine osteoarthritis. *J Small Anim Pract*. 2022 Oct;63(10):721-738. doi: 10.1111/jsap.13495.

Qi K, Li N, Zhang Z, Melino G. Tissue regeneration: The crosstalk between mesenchymal stem cells and immune response. *Cell Immunol*. 2018 Apr;326:86-93. doi: 10.1016/j.cellimm.2017.11.010.

Qiang Y, Yanhong Z, Jiang P, Shibi L, Quanyi G, Xinlong M, Qun X, Baoshan X, Bin Z, Aiyuan W, Li Z, Wengjing X, Chao Z. Xenotransplantation of an extracellular-matrix-derived, biphasic, cell-scaffold construct for repairing a large femoral-head high-load-bearing osteochondral defect in a canine model. *ScientificWorldJournal*. 2014 Mar 11;2014:127084. doi: 10.1155/2014/127084.

Quimby JM, Webb TL, Gibbons DS, Dow SW. Evaluation of intrarenal mesenchymal stem cell injection for treatment of chronic kidney disease in cats: a pilot study. *J Feline Med Surg*. 2011 Jun;13(6):418-26. doi: 10.1016/j.jfms.2011.01.005.

Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation*. 2007 Jan 15;83(1):71-6. doi: 10.1097/01.tp.0000244572.24780.54.

Ranera B, Lyahyai J, Romero A, Vázquez FJ, Remacha AR, Bernal ML, Zaragoza P, Rodellar C, Martín-Burriel I. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Vet Immunol Immunopathol*. 2011 Nov 15;144(1-2):147-54. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.06.033.

Rasouli M, Rahimi A, Soleimani M, Keshel SH. The interplay between extracellular matrix and progenitor/stem cells during wound healing: Opportunities and future directions. *Acta Histochem*. 2021 Oct;123(7):151785. doi: 10.1016/j.acthis.2021.151785.

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.

Ricco S, Renzi S, Del Bue M, Conti V, Merli E, Ramoni R, Lucarelli E, Gnudi G, Ferrari M, Grolli S. Allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in combination with platelet rich plasma are safe and effective in the therapy of superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2013 Jan-Mar;26(1 Suppl):61-8. doi: 10.1177/03946320130260s108.

Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, Rice HE. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Jun 7;294(2):371-9. doi: 10.1016/S0006-291X(02)00469-2.

Sahin AO, Buitenhuis M. Molecular mechanisms underlying adhesion and migration of hematopoietic stem cells. *Cell Adh Migr*. 2012 Jan-Feb;6(1):39-48. doi: 10.4161/cam.18975.

Sanchez-Diaz M, Quiñones-Vico MI, Sanabria de la Torre R, Montero-Vílchez T, Sierra-Sánchez A, Molina-Leyva A, Arias-Santiago S. Biodistribution of Mesenchymal Stromal Cells after Administration in Animal Models and Humans: A Systematic Review. *J Clin Med*. 2021 Jun 29;10(13):2925. doi: 10.3390/jcm10132925.

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.

Saulnier N, Loriau J, Febre M, Robert C, Rakic R, Bonte T, Buff S, Maddens S. Canine placenta: A promising potential source of highly proliferative and immunomodulatory mesenchymal stromal cells? *Vet Immunol Immunopathol*. 2016 Mar;171:47-55. doi: 10.1016/j.vetimm.2016.02.005.

Schnabel LV, Fortier LA, McIlwraith CW, Nobert KM. Therapeutic use of stem cells in horses: which type, how, and when? *Vet J*. 2013 Sep;197(3):570-7. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.04.018.

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

Segers VF, Van Riet I, Andries LJ, Lemmens K, Demolder MJ, De Becker AJ, Kockx MM, De Keulenaer GW. Mesenchymal stem cell adhesion to cardiac microvascular endothelium: activators

and mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Apr;290(4):H1370-7. doi: 10.1152/ajpheart.00523.2005.

Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010 Nov-Dec;2(6):640-53. doi: 10.1002/wsbm.86.

Semedo P, Correa-Costa M, Antonio Cenedeze M, Maria Avancini Costa Malheiros D, Antonia dos Reis M, Shimizu MH, Seguro AC, Pacheco-Silva A, Saraiva Camara NO. Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model. *Stem Cells*. 2009 Dec;27(12):3063-73. doi: 10.1002/stem.214. PMID: 19750536.

Shah K, Drury T, Roic I, Hansen P, Malin M, Boyd R, Sumer H, Ferguson R. Outcome of Allogeneic Adult Stem Cell Therapy in Dogs Suffering from Osteoarthritis and Other Joint Defects. *Stem Cells Int*. 2018 Jun 28;2018:7309201. doi: 10.1155/2018/7309201.

Sharma RR, Pollock K, Hubel A, McKenna D. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion*. 2014 May;54(5):1418-37. doi: 10.1111/trf.12421.

Silva-Carvalho AÉ, Cardoso MH, Alencar-Silva T, Bogéa GMR, Carvalho JL, Franco OL, Saldanha-Araujo F. Dissecting the relationship between antimicrobial peptides and mesenchymal stem cells. *Pharmacol Ther*. 2022 May;233:108021. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.108021.

Siminovitch L, McCulloch EA, Till Je. The Distribution of Colony-Forming Cells among spleen Colonies. *J Cell Comp Physiol*. 1963 Dec;62:327-36. doi: 10.1002/jcp.1030620313.

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

Smith RK, Werling NJ, Dakin SG, Alam R, Goodship AE, Dudhia J. Beneficial effects of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in naturally occurring tendinopathy. *PLoS One*. 2013 Sep 25;8(9):e75697. doi: 10.1371/journal.pone.0075697.

Soltero-Rivera M, Goldschmidt S, Arzi B. Feline chronic gingivostomatitis current concepts in clinical management. *J Feline Med Surg.* 2023 Aug;25(8):1098612X231186834. doi: 10.1177/1098612X231186834.

Soltero-Rivera M, Hart S, Blandino A, Vapniarsky N, Arzi B. Mesenchymal stromal cell therapy for feline chronic gingivostomatitis: Long term experience. *Front Vet Sci.* 2023 Apr 14;10:1171922. doi: 10.3389/fvets.2023.1171922.

Sousa-Victor P, García-Prat L, Muñoz-Cánoves P. Control of satellite cell function in muscle regeneration and its disruption in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022 Mar;23(3):204-226. doi: 10.1038/s41580-021-00421-2.

Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood.* 2009 Jun 25;113(26):6576-83. doi: 10.1182/blood-2009-02-203943.

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.

Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity.* 2006 Dec;25(6):977-88. doi: 10.1016/j.immuni.2006.10.016.

Sultana T, Lee S, Yoon HY, Lee JI. Current Status of Canine Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells in Veterinary Medicine. *Stem Cells Int.* 2018 Jul 15;2018:8329174. doi: 10.1155/2018/8329174.

Sumer H, Liu J, Malaver-Ortega LF, Lim ML, Khodadadi K, Verma PJ. NANOG is a key factor for induction of pluripotency in bovine adult fibroblasts. *J Anim Sci.* 2011 Sep;89(9):2708-16. doi: 10.2527/jas.2010-3666.

Suwińska A. Preimplantation mouse embryo: developmental fate and potency of blastomeres. *Results Probl Cell Differ.* 2012;55:141-63. doi: 10.1007/978-3-642-30406-4_8.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.

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.

Till Je, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. 1961 Feb;14:213-22.

Tizard Ian R. 2018. *Veterinary Immunology*. 10th ed. St. Louis Mo: Elsevier/Saunders.

Toma C, Wagner WR, Bowry S, Schwartz A, Villanueva F. Fate of culture-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature: in vivo observations of cell kinetics. *Circ Res*. 2009 Feb 13;104(3):398-402. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.187724.

Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008 Sep;8(9):726-36. doi: 10.1038/nri2395. PMID: 19172693.

Uder C, Brückner S, Winkler S, Tautenhahn HM, Christ B. Mammalian MSC from selected species: Features and applications. *Cytometry A*. 2018 Jan;93(1):32-49. doi: 10.1002/cyto.a.23239.

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.

Urbán N, Cheung TH. Stem cell quiescence: the challenging path to activation. *Development*. 2021 Feb 8;148(3):dev165084. doi: 10.1242/dev.165084.

Vaags AK, Rosic-Kablar S, Gartley CJ, Zheng YZ, Chesney A, Villagómez DA, Kruth SA, Hough MR. Derivation and characterization of canine embryonic stem cell lines with in vitro and in vivo differentiation potential. *Stem Cells*. 2009 Feb;27(2):329-40. doi: 10.1634/stemcells.2008-0433.

Vassiliev I, Vassilieva S, Beebe LF, Harrison SJ, McIlpatrick SM, Nottle MB. In vitro and in vivo characterization of putative porcine embryonic stem cells. *Cell Reprogram*. 2010 Apr;12(2):223-30. doi: 10.1089/cell.2009.0053.

Venkei ZG, Yamashita YM. Emerging mechanisms of asymmetric stem cell division. *J Cell Biol.* 2018 Nov 5;217(11):3785-3795. doi: 10.1083/jcb.201807037.

Vidal MA, Kilroy GE, Lopez MJ, Johnson JR, Moore RM, Gimble JM. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Vet Surg.* 2007 Oct;36(7):613-22. doi: 10.1111/j.1532-950X.2007.00313.x.

Vidal MA, Walker NJ, Napoli E, Borjesson DL. Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue. *Stem Cells Dev.* 2012 Jan 20;21(2):273-83. doi: 10.1089/scd.2010.0589.

Vidane AS, Pinheiro AO, Casals JB, Passarelli D, Hage M, Bueno RS, Martins DS, Ambrósio CE. Transplantation of amniotic membrane-derived multipotent cells ameliorates and delays the progression of chronic kidney disease in cats. *Reprod Domest Anim.* 2017 Apr;52 Suppl 2:316-326. doi: 10.1111/rda.12846.

Villanueva S, Ewertz E, Carrión F, Tapia A, Vergara C, Céspedes C, Sáez PJ, Luz P, Irrarázabal C, Carreño JE, Figueroa F, Vio CP. Mesenchymal stem cell injection ameliorates chronic renal failure in a rat model. *Clin Sci (Lond).* 2011 Dec;121(11):489-99. doi: 10.1042/CS20110108.

Villatoro AJ, Fernández V, Claros S, Rico-Llanos GA, Becerra J, Andrades JA. Use of adipose-derived mesenchymal stem cells in keratoconjunctivitis sicca in a canine model. *Biomed Res Int.* 2015;2015:527926. doi: 10.1155/2015/527926.

Visvader JE, Clevers H. Tissue-specific designs of stem cell hierarchies. *Nat Cell Biol.* 2016 Apr;18(4):349-55. doi: 10.1038/ncb3332.

Voga M, Adamic N, Vengust M, Majdic G. Stem Cells in Veterinary Medicine-Current State and Treatment Options. *Front Vet Sci.* 2020 May 29;7:278. doi: 10.3389/fvets.2020.00278.

Wabik A, Jones PH. Switching roles: the functional plasticity of adult tissue stem cells. *EMBO J.* 2015 May 5;34(9):1164-79. doi: 10.15252/embj.201490386.

Walter D, Lier A, Geiselhart A, Thalheimer FB, Huntscha S, Sobotta MC, Moehrle B, Brocks D, Bayindir I, Kaschutnig P, Muedder K, Klein C, Jauch A, Schroeder T, Geiger H, Dick TP, Holland-

Letz T, Schmezer P, Lane SW, Rieger MA, Essers MA, Williams DA, Trumpp A, Milsom MD. Exit from dormancy provokes DNA-damage-induced attrition in haematopoietic stem cells. *Nature*. 2015 Apr 23;520(7548):549-52. doi: 10.1038/nature14131.

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.

Watt SM, Contreras M. Stem cell medicine: umbilical cord blood and its stem cell potential. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2005 Jun;10(3):209-20. doi: 10.1016/j.siny.2005.02.001.

Wei LN, Wu CH, Lin CT, Liu IH. Topical applications of allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate the canine keratoconjunctivitis sicca. *BMC Vet Res*. 2022 Jun 10;18(1):217. doi: 10.1186/s12917-022-03303-7.

Wei X, Yang X, Han ZP, Qu FF, Shao L, Shi YF. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin*. 2013 Jun;34(6):747-54. doi: 10.1038/aps.2013.50.

Weiss ARR, Dahlke MH. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs. *Front Immunol*. 2019 Jun 4;10:1191. doi: 10.3389/fimmu.2019.01191.

Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, Offner S, Dunant CF, Eshkind L, Bockamp E, Lió P, Macdonald HR, Trumpp A. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*. 2008 Dec 12;135(6):1118-29. doi: 10.1016/j.cell.2008.10.048.

Wilson A, Oser GM, Jaworski M, et al. Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007 Jun;1106:64-75. doi: 10.1196/annals.1392.021.

Wu AM, Till JE, Siminovitch L, McCulloch EA. Cytological evidence for a relationship between normal hemotopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system. *J Exp Med*. 1968 Mar 1;127(3):455-64. doi: 10.1084/jem.127.3.455.

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.

Xu L, Liu Y, Sun Y, Wang B, Xiong Y, Lin W, Wei Q, Wang H, He W, Wang B, Li G. Tissue source determines the differentiation potentials of mesenchymal stem cells: a comparative study of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Stem Cell Res Ther.* 2017 Dec 6;8(1):275. doi: 10.1186/s13287-017-0716-x.

Yamashita Y. Asymmetric stem cell division and pathology: insights from *Drosophila* stem cell systems. *J Pathol.* 2009 Jan;217(2):181-5. doi: 10.1002/path.2470.

Yuan M, Hu X, Yao L, Jiang Y, Li L. Mesenchymal stem cell homing to improve therapeutic efficacy in liver disease. *Stem Cell Res Ther.* 2022 May 3;13(1):179. doi: 10.1186/s13287-022-02858-4.

Zhang J, Huang X, Wang H, Liu X, Zhang T, Wang Y, Hu D. The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy. *Stem Cell Res Ther.* 2015 Dec 1;6:234. doi: 10.1186/s13287-015-0240-9.

Zhang LJ, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *Curr Biol.* 2016 Jan 11;26(1):R14-9. doi: 10.1016/j.cub.2015.11.017.