



# UNIVERSITÀ DI PARMA

Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie

**Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico  
in Medicina Veterinaria**

**ISOLAMENTO DI CELLULE STROMALI  
MESENCHIMALI DA TESSUTO ADIPOSO  
DI TARTARUGA *TRACHEMYS SCRIPTA***

**ISOLATION OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS FROM  
ADIPOSE TISSUE OF TURTLE *TRACHEMYS SCRIPTA***

**Relatore:**

**Chiar.mo Prof. Di Ianni Francesco**

**Correlatrice:**

**Dott.ssa Andreoli Valentina**

**Laureanda:**

**Martina Gavezzoli**

**Matricola 300381**

**Anno Accademico 2022-2023**

# INDICE

<b>RIASSUNTO</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>7</b>
LE MSC: CELLULE STROMALI MESENCHIMALI .....	7
DEFINIZIONE DI CELLULA STAMINALE E CELLULA STROMALE MESENCHIMALE .....	7
LE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI: UNA BREVE STORIA .....	9
CRITERI DI DEFINIZIONE DELLE MSC.....	12
LE MSC NELL'ORGANISMO, SITI DI ESTRAZIONE.....	15
RUOLO DELLE MSC COME AGENTI TERAPEUTICI.....	17
UTILIZZO DELLE MSC IN MEDICINA RIGENERATIVA .....	28
TRACHEMYS SCRIPTA.....	34
<b>SCOPO DELLA TESI</b> .....	<b>35</b>
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	<b>36</b>
PRELIEVO CAMPIONE .....	36
SCELTA DEI SOGGETTI DONATORI.....	36
PRELIEVO EMATICO.....	37
PROTOCOLLO ANESTESIOLOGICO .....	37
TECNICA CHIRURGICA .....	38
GESTIONE POST-OPERATORIA DEI SOGGETTI.....	40
PREPARAZIONE DI CELLULE STROMALI MESENCHIMALI DA TESSUTO ADIPOSO .....	41
ATTREZZATURA E SOLUZIONI UTILIZZATE .....	41
DIGESTIONE TESSUTO E PREPARAZIONE DI MICROFRAMMENTI DI TESSUTO ADIPOSO .....	42
CRESCITA COLONIE CELLULARI .....	44
TRIPSINIZZAZIONE E CONTA CELLULARE.....	44
CONGELAMENTO CAMPIONI.....	47
PREPARAZIONE DEL PLASMA ARRICCHITO DI TROMBOCITI E LEUCOCITI .....	48
PROVE IN VITRO .....	49
ADESIONE AL SUBSTRATO E CRESCITA IN VITRO .....	49
CONTA DELLE UNITA' FORMANTI COLONIA (CFU).....	50
ANALISI DELLA CAPACITA' DI DIFFERENZIAZIONE DELLE MSC .....	51
EFFETTI DELLA CRIOCONSERVAZIONE DELLE MSC .....	53

VALUTAZIONE DELLA ESPRESSIONE GENICA .....	54
ESTRAZIONE RNA.....	54
RETRO TRASCRIZIONE.....	55
PCR.....	56
PREPARAZIONE GEL AGAROSIO E CORSA ELETTROFORETICA.....	58
SEQUENZIAMENTO .....	59
DATI E ANALISI STATISTICA.....	60
<b>RISULTATI .....</b>	<b>61</b>
CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA DELLE COLTURE CELLULARI .....	61
CURVE DI CRESCITA.....	64
CFU .....	69
SOPPRAVVIVENZA AL CONGELAMENTO .....	69
VALUTAZIONE DELLA CAPACITA' DIFFERENZIATIVA.....	70
DIFFERENZIAZIONE IN SENSO ADIPOCITICO .....	71
DIFFERENZIAZIONE IN SENSO CONDROGENICO .....	72
DIFFERENZIAZIONE IN SENSO OSTEOGENICO.....	73
VALUTAZIONE DEL FENOTIPO CELLULARE MEDIANTE RT-PCR .....	74
RT-PCR MSC DI <i>T. SCRIPTA</i> .....	75
RT-PCR LEUCOCITI DI <i>T. SCRIPTA</i> .....	75
<b>DISCUSSIONE .....</b>	<b>77</b>
<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>85</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>86</b>
<b>SITOGRAFIA.....</b>	<b>98</b>

## RIASSUNTO

Le cellule stromali mesenchimali (MSC) sono da anni oggetto di studio in campo della medicina rigenerativa umana e veterinaria.

Sempre più spesso sono sfruttate le capacità terapeutiche di queste cellule per curare diverse patologie degli animali da compagnia e del cavallo.

In letteratura, tuttavia, non sono presenti molti studi sull'isolamento e lo studio in vitro di cellule derivate dai rettili. I riferimenti si limitano a pochi studi relativi all'isolamento di fibroblasti da cheloni. Per quanto riguarda in modo specifico le MSC, è riportato soltanto l'isolamento di MSC in una specie di anfibio (*Xenopus laevis*).

In questo studio sono state isolate e parzialmente caratterizzate MSC a partire da tessuto adiposo di *Trachemys scripta* ottenuto dalla fossa prefermorale durante la procedura chirurgica di sterilizzazione. Questa specie è stata scelta come modello per lo studio in quanto in Italia è presente il "Piano nazionale per la gestione della testuggine palustre americana (*Trachemys scripta*)" che prevede la sterilizzazione chirurgica dei soggetti per il controllo della popolazione invasiva. Durante la procedura di sterilizzazione è stato quindi possibile ottenere il campione di tessuto adiposo dall'animale senza ulteriori sofferenze. Pur non avendo *T. scripta* un interesse clinico specifico, la disponibilità dei campioni di tessuto adiposo ha reso questa specie un modello ideale per questo studio. Basandosi sulla scarsa letteratura pubblicata circa le colture cellulari di chelone e le MSC di *X. laevis* e mammifero, si sono scelte le seguenti condizioni di coltura: DMEM come medium di coltura, 28°C e 5% di CO<sub>2</sub> come parametri ambientali delle colture. In queste condizioni di coltura è stato possibile isolare cellule con morfologia simile ai fibroblasti sia partendo dalla digestione enzimatica del tessuto adiposo che da frammenti ottenuti meccanicamente dal tessuto.

Le metodiche di tripsinizzazione, amplificazione cellulare, crioconservazione e conta dei CFU sono le medesime di quelle utilizzate in ambito di MSC di mammifero e si sono rivelate efficaci anche con le cellule di *T.scripta*.

Per la caratterizzazione cellulare sono stati seguiti sostanzialmente i criteri pubblicati dall'ISTC (International Society for Cellular Therapy).

Le curve cellulari hanno indicato che le MSC di *T.scripta* mantengono costante la capacità replicativa dal P1 al P8 e che presentano, in media, una capacità di replicazione più bassa rispetto a MSC di altre specie di mammifero, ma anche di *X. Laevis*.

Le cellule stimulate con i medium di differenziazione utilizzati tipicamente per le MSC di mammifero sono state in grado di differenziare in senso adipocitico, condrogenico e osteogenico.

La fenotipizzazione delle cellule è stata fatta mediante studio dell'espressione genica in RT-PCR in quanto non sono presenti al momento anticorpi per la citofluorimetria (tecnica gold standard) utilizzabili per caratterizzare cellule di *T.scripta*. I primer per la ricerca dei geni sono stati progettati appositamente partendo dalle sequenze presenti nel genoma della specie di interesse in NCBI in quanto non presenti in letteratura.

L'espressione dei geni è stata valutata sia sulle MSC che sui leucociti di *T.scripta*, utilizzati come controllo negativo o positivo in funzione del marker analizzato.

Le cellule esprimono CD 105, CD 73, CD 44, CD 90 e GAPDH, non esprimono CD 34 e HLADRA.

La ricerca dell'espressione di CD 45 e CD 31 non ha portato risultati soddisfacenti in nessun tipo cellulare.

Tutti i geni ottenuti tramite PCR sono stati sequenziati, ed il confronto delle sequenze ottenute con le sequenze presenti sul sito ha riscontrato un'omologia > del 98%.

Dati i risultati ottenuti si può affermare che le cellule isolate si possano identificare con grande probabilità come MSC derivate da tessuto adiposo di *T. Scripta*, ulteriori studi sono necessari prima di poter valutarne l'utilizzo in medicina rigenerativa.

## ABSTRACT

Mesenchymal stromal cells (MSCs) have been studied for years in the fields of human and veterinary regenerative medicine.

The therapeutic feature of these cells are being exploited more and more in recent years to treat various diseases in companion animals and horses.

In the literature, however, there are not many studies on the isolation and in vitro study of reptile-derived cells. References are limited to a few studies related to the isolation of fibroblasts from chelonium. Regarding MSCs specifically, only the isolation of MSCs in an amphibian species (*Xenopus laevis*) is reported.

In this study, MSCs were isolated and partially characterized from adipose tissue of *Trachemys scripta* obtained from the preformal fossa during the surgical sterilization procedure. This species was chosen as the model for the study because Italy has a "National Plan for the Management of the American Marsh Tortoise (*Trachemys scripta*)," which requires surgical sterilization of individuals to control the invasive population. Therefore, during the sterilization procedure, it was possible to obtain the adipose tissue sample from the animal without further suffering. Although *T. scripta* has no specific clinical interest, the availability of the adipose tissue samples made this species an ideal model for this study.

The following culture conditions were chosen based on the small published literature about chelonian cell cultures and MSCs of *X.laevis* and mammalian: DMEM as culture medium, 28°C and 5% CO<sub>2</sub> as culture environmental parameters, it was possible to isolate cells with fibroblast-like morphology either from enzymatic digestion of adipose tissue or from fragments obtained mechanically from the tissue under these culture conditions.

The methods of trypsinization, cell amplification, cryopreservation, and CFU counts are the same as those used in mammalian MSCs and have also proved effective with *T.scripta* cells.

The criteria published by the International Society for Cellular Therapy (ISTC) were basically followed for cell characterization.

The cell curves indicated that MSCs of *T.scripta* maintain constant replicative capacity from P1 to P8 and that they exhibit, on average, lower replication capacity than MSCs of other mammalian species as well as *X. Laevis*.

Cells stimulated with differentiation medium typically used for mammalian MSCs were able to differentiate in an adipocytic, chondrogenic, and osteogenic direction.

Phenotyping of the cells was done by gene expression study in RT-PCR as there are currently no antibodies for cytofluorimetry (gold standard technique) that can be used to characterize *T.scripta* cells. Primers to search for genes were specially designed from the present sequences of the genome of the species of interest in NCBI as they are not present in the literature.

Gene expression was assessed on both MSCs and *T.scripta* leukocytes, which were used as negative or positive controls depending on the marker analyzed.

The cells expressed CD 105, CD 73, CD 44, CD 90 and GAPDH; they did not express CD 34 and HLADRA.

Searching for the expression of CD 45 and CD 31 did not yield satisfactory results in any cell type.

All genes obtained by PCR were sequenced, and comparison of the sequences obtained with sequences present at the site found >98% homology.

Given the results obtained, it can be stated that the isolated cells can be identified with high probability as MSCs derived from *T. scripta* adipose tissue; further studies are needed before their use in regenerative medicine can be evaluated.

# INTRODUZIONE

## LE MSC: CELLULE STROMALI MESENCHIMALI

### DEFINIZIONE DI CELLULA STAMINALE E CELLULA STROMALE MESENCHIMALE

Le cellule staminali possono essere definite come cellule funzionalmente multipotenti, in grado di auto-rinnovarsi e di proliferare differenziandosi nelle diverse tipologie cellulari presenti nei vari tessuti dell'organismo.

Queste caratteristiche sono mantenute dalle cellule staminali per tutta la vita dell'individuo a differenza delle linee cellulari progenitrici che sono transitorie (Van Der Kooy and Weiss 2000).

Due diverse modalità di classificazione sono utilizzate per descrivere le cellule staminali: la prima in base al loro potenziale di differenziazione e la seconda rispetto alla loro origine. In base al potenziale differenziativo, le cellule staminali possono essere indicate come totipotenti, pluripotenti, multipotenti e unipotenti (Can 2008).

Una cellula è definita come totipotente quando può generare qualsiasi cellula dell'embrione e dei tessuti extraembrionali; sono classificate come totipotenti le cellule della morula.

Le cellule del bottone embrionario sono invece classificate come pluripotenti, queste possono dare origine ai 3 foglietti embrionali.

Sono definite multipotenti le cellule che in vivo ed in vitro sono in grado di differenziarsi in diversi tipi cellulari, anche non appartenenti al loro tessuto d'origine (endoderma, mesoderma o ectoderma). Esistono diversi tipi di cellule multipotenti: cellule staminali ematopoietiche, cellule staminali neurali, cellule stromali mesenchimali.

Cellule che possono dare origine a un solo tipo cellulare sono definite come unipotenti, esempi sono le cellule epiteliali corneali, le cellule progenitrici endoteliali.

L'altra modalità di classificazione delle cellule staminali riguarda la loro origine: in base a tale criterio le cellule staminali si suddividono in cellule staminali embrionali (ESC) e



cellule staminali provenienti da un feto o da un individuo adulto. Queste ultime sono dette cellule staminali tessuto-specifiche (TSSCs)

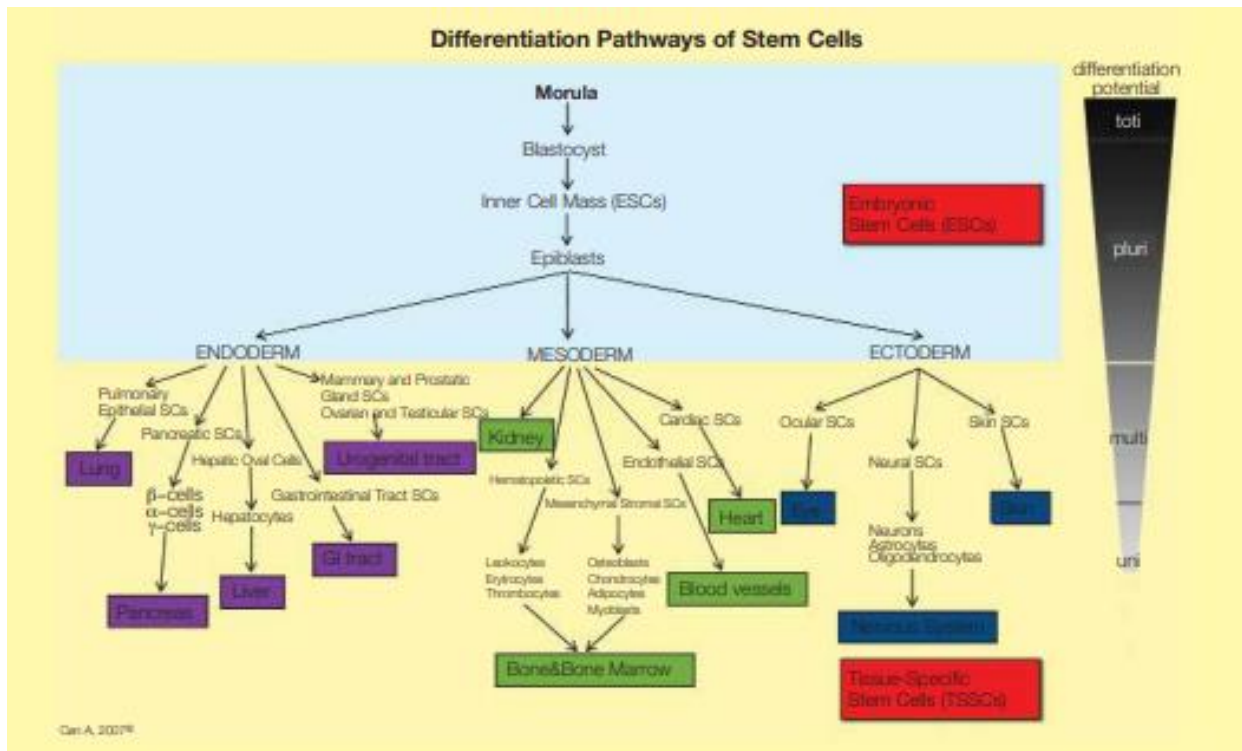
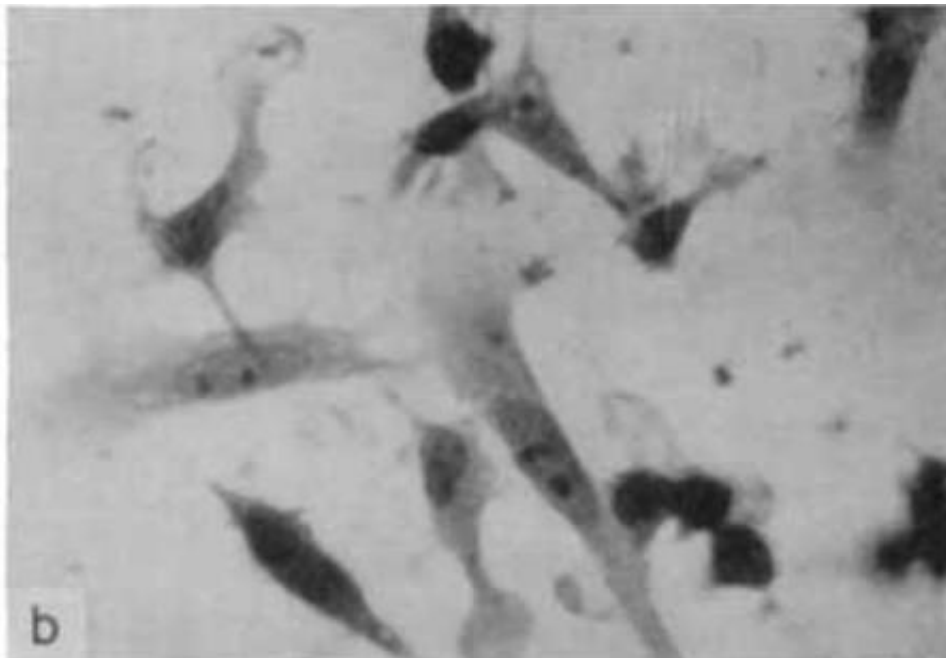


Figura 1 classificazione cellule staminali in base al tessuto d'origine (Can 2008).

## LE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI: UNA BREVE STORIA

Tra il 1960 e il 1970 A.J. Friedenstein osservò che trapiantando midollo osseo nella capsula di rene non si ottenevano solo cellule del midollo, ma anche la formazione di tessuto osseo (Andrzejewska et al. 2019). Questo portò Friedenstein a teorizzare l'esistenza di cellule staminali in grado di generare tessuto osseo all'interno del midollo osseo. Decise di dare a queste cellule il nome di cellule staminali osteogeniche (Friedenstein et al. 1968).

Friedenstein riuscì a isolare queste cellule in vitro e le descrisse come colonie di fibroblasti aderenti in grado di crescere rapidamente in vitro sotto forma di Unità Formanti Colonia (CFU) (Friedenstein et al. 1970).



*Figura 2 cellule isolate da Friedenstein (Friedenstein et al. 1970).*

Successivamente si scoprì la capacità di queste cellule di differenziarsi in vitro non solo in osteoblasti ma anche in condrociti e adipociti (Friedenstein et al. 1970).

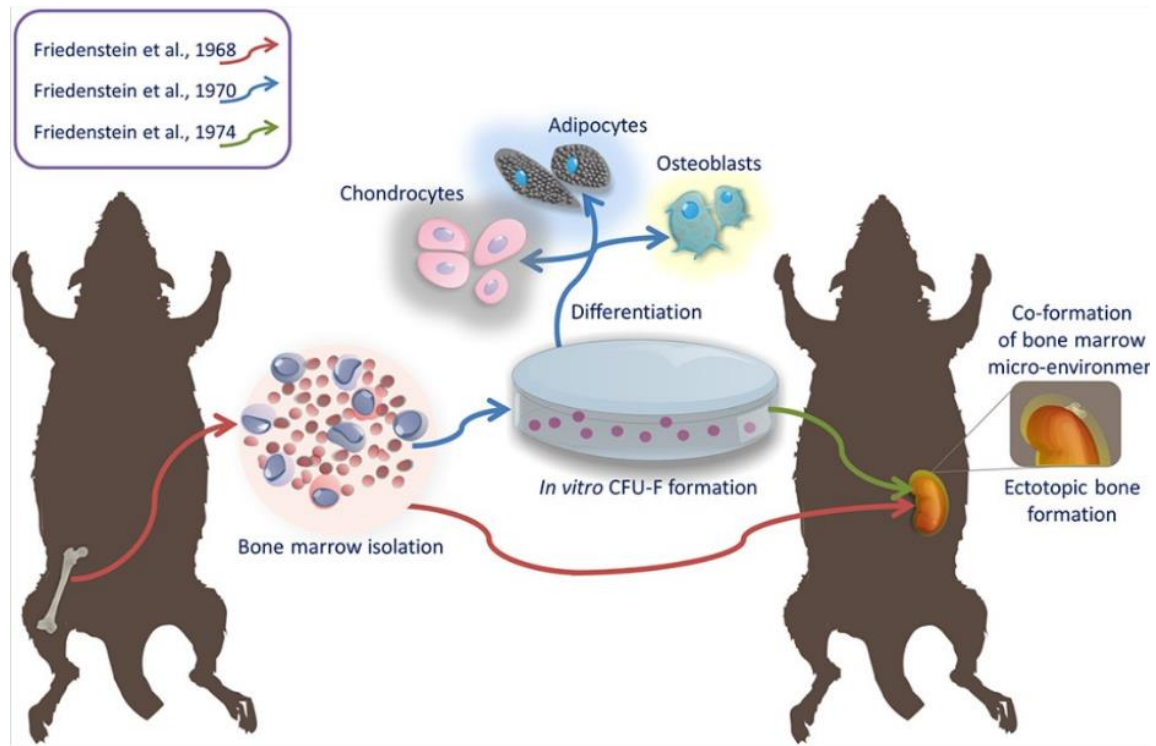


Figura 3 studi di Friedenstein sulle cellule (Andrzejewska et al. 2019).

Nel 1991 Caplan propose il termine “Cellule staminali mesenchimali” per descrivere queste cellule vista la loro capacità di differenziarsi nei diversi tessuti connettivi dell’organismo (Caplan 1991).

Da quel momento questo termine è stato adottato da molti autori per riferirsi a questa tipologia cellulare. La terminologia proposta da Caplan metteva l’accento sulla potenzialità staminale (spiccata capacità di replicazione e differenziazione), che caratterizza queste cellule e che, inizialmente, venne considerata fondamentale per un loro potenziale impiego terapeutico.

Ad oggi la nomenclatura di queste cellule è piuttosto eterogenea; vengono infatti descritte come Cellule Stromali Mesenchimali, Cellule Stromali Multipotenti, Cellule Stromali Midollari, Cellule Staminali Mesodermiche, Cellule Staminali Mesenchimali. La terminologia adottata evidenzia caratteristiche cellulari differenti, relative all’origine ed alla capacità staminale. Va ricordato che le MSC, isolate inizialmente a partire dal midollo osseo, vennero poi isolate da numerosi altri tessuti dell’organismo, in particolare dalla componente stromale degli stessi.

Vista la mancanza di una nomenclatura universale nel 2005 la International Society for Cellular Therapy (ISCT) ha pubblicato un articolo raccomandando di utilizzare il nome “Cellule stromali mesenchimali multipotenti” (Horwitz et al. 2005).

Questa definizione, derivata da evidenze scientifiche accumulate negli anni successivi all'isolamento di queste cellule, toglie il termine staminale e sottolinea l'origine stromale. Entrambi questi aspetti sono oggi considerati di grande importanza biologica. Nonostante questo, negli articoli è ancora molto probabile trovare la vecchia nomenclatura di “Cellule Staminali Mesenchimali”.(Andrzejewska et al. 2019).

## CRITERI DI DEFINIZIONE DELLE MSC

Nel 2006 è stato pubblicato l'articolo "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy (ISCT) position statement" dalla ISCT per chiarire i criteri di definizione delle MSC, cercando di uniformare così i successivi studi. (Dominici et al. 2006)

I criteri sono stati individuati sulla base dei dati presenti in letteratura fino a quel momento, sono quindi riferiti prevalentemente ad acquisizioni ottenute da colture cellulari umane e sono applicabili in parte ad altre specie.

I criteri indicati sono considerati come i minimi indispensabili a definire le colture in vitro delle MSC, ma molti autori hanno aggiunto altri criteri.

### *CRESCITA IN VITRO*

Il primo criterio di definizione suggerito dalla ISCT è la capacità di crescita in vitro delle cellule formando colonie aderenti al fondo in plastica delle fiaschette in cui sono coltivate. Questa è stata una delle prime caratteristiche osservate per le MSC, confermata nei successivi lavori. Non è comunque una prerogativa esclusiva di queste cellule.

### *DIFFERENZIAZIONE*

Le cellule sottoposte in vitro a stimoli di differenziazione tissutale specifici standard (ossia riconosciuti dalla comunità scientifica) devono essere in grado di differenziarsi in osteoblasti, condroblasti e adipociti.

La differenziazione può essere dimostrata con metodiche molecolari oppure colorazioni citologiche specifiche (ad esempio Oil red O per la differenziazione adipocitica, Alcian Blu per quella in senso condrogenico, Alizarin Red o Von Kossa per quella osteogenica). Ad oggi sono presenti in commercio dei kit per stimolare la differenziazione, ISTC consiglia di utilizzare i protocolli in commercio per rendere comparabili gli studi eseguiti.

### *ESPRESSIONE E MANCATA ESPRESSIONE DI CLUSTER DI DIFFERENZIAMENTO*

Nell'articolo proposto dalla ISCT vengono indicati i cluster di differenziazione (CD) minimi per poter identificare una MSC umana. Gli autori, cioè, propongono che per poter essere definite come MSC le cellule, mancando di marker genetici espressi in modo specifico, debbano esprimere un particolare set di geni ed invece mancare della espressione di altri geni.

Le cellule in particolare devono esprimere CD105, CD73, CD90.

CD105 è conosciuto anche come endoglin, ed è una proteina di membrana glicoproteica.

La sua espressione aumenta in diversi processi come l'angiogenesi, la regolazione del ciclo cellulare; si è visto essere inoltre correlata con la produzione di matrice extracellulare da parte dei condrociti (Nassiri et al. 2011).

CD73, chiamato Ecto-5'-nucleotidasi è un enzima che converte l'adenosina 5' monofosfato in adenosina. Nel sistema nervoso ha funzione antidolorifica e protegge dal danno infiammatorio, nel sistema respiratorio inibisce la permeabilità endoteliale preservando la funzione di barriera del tessuto. Ha funzione cardioprotettiva durante danni ischemici, aumenta la sua espressione proteggendo anche fegato e reni contro i danni da riperfusione (Minor et al. 2019).

CD90 è una proteina della superficie cellulare. Regola l'adesione cellulare, la migrazione, l'apoptosi. Ha un ruolo nella crescita degli assoni e nell'interazione intercellulare e tra le cellule e la loro matrice. Inoltre, è stata descritta come necessaria nell'attivazione dei linfociti T e della fibrosi (Kumar et al. 2016).

È inoltre indicata la mancata espressione dei CD tipici delle cellule ematopoietiche per distinguerle da queste. In particolare, le cellule non devono esprimere CD45, CD34, CD14 o CD 11b, CD 79α o CD 19 e HLA-DR.

CD45 è detto anche "leucocyte common antigen", è uno dei principali marker di identificazione delle cellule emopoietiche (Donovan et al. 1993).

CD34 è da anni usato come marker per l'identificazione delle cellule staminali emopoietiche, recentemente è stato utilizzato anche come marker per altri tipi di cellule staminali come i precursori dell'epidermide (Nielsen and McNaghy 2008).

CD14 è espresso in maniera significativa dai monociti e da alcune tipologie di macrofagi residenti, è espresso in maniera minore nei granulociti polimorfonucleati (Ziegler-Heitbrock and Ulevitch 1993).

CD79 $\alpha$  è una porzione del recettore per gli antigeni dei linfociti B, ha un ruolo importante nel segnalamento cellulare. Non è presente nelle altre cellule dell'organismo, per questo è un ottimo marker per i linfociti B nei mammiferi (Chu and Arber 2001).

HLA-DR è complesso maggiore di istocompatibilità di tipo II espresso dalle cellule presentanti l'antigene nei mammiferi (Cogswell et al. 1991).

## LE MSC NELL'ORGANISMO, SITI DI ESTRAZIONE

Il midollo osseo è stato la prima fonte per l'isolamento delle MSC ed è ancora oggi molto utilizzato per la loro estrazione. In confronto ad altri tessuti, però, presenta una quota relativamente bassa di MSC e, oltre a questo, delle difficoltà nel suo prelievo.

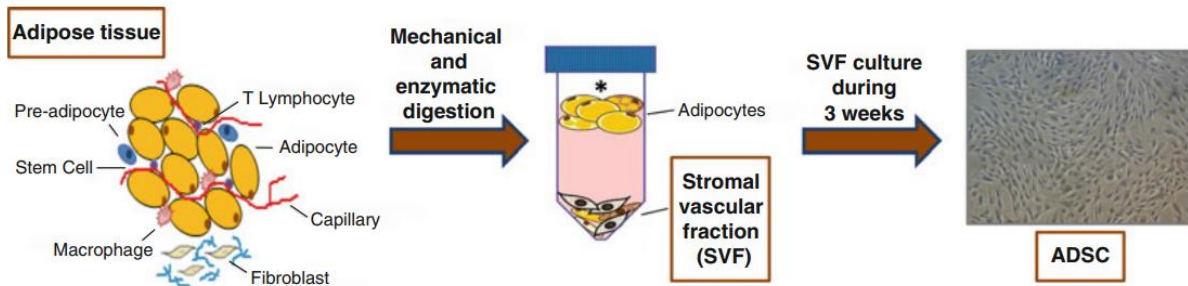


Figura 4 procedura isolamento MSC da tessuto adiposo (Araña et al. 2013).

Per questo, nel tempo, sono stati studiati altri tessuti per poter identificare una fonte più accessibile di MSC ed avere una resa migliore.

Ad oggi le MSC sono state isolate a partire da tessuto adiposo, tessuto della polpa dentale, pelle, muscolo, ghiandole salivari, sangue mestruale e tessuti perinatali (ad esempio il cordone ombelicale) (Mushahary et al. 2018).

In medicina veterinaria in particolare nei cani, cavalli e gatti le MSC sono state isolate a partire da midollo osseo, tessuto adiposo, liquido sinoviale, cordone ombelicale, muscolo, gengiva e legamento periodontale, endometrio e placenta. In generale tessuti che presentano una componente stromale possono essere considerate fonti di MSC. Con il termine stroma si intende la componente di sostegno di un organo e/o tessuto caratterizzata da matrice extracellulare di natura connettivale, strutture vascolari, nervose, vari elementi cellulari dispersi all'interno della matrice.

Attualmente le fonti più utilizzate in medicina veterinaria rimangono il tessuto adiposo ed il midollo osseo; il tessuto adiposo è in genere preferito per la facilità di prelievo (Voga et al. 2020).

L'isolamento di MSC dai tessuti di un individuo adulto prevede in ogni caso un intervento di tipo chirurgico. L'estrazione di MSC a partire da tessuto adiposo (indicate anche con Adipose-derived stem cells, ADSC) prevede il prelievo sterile di tessuto sottocutaneo,



addominale o inguinale. Le cellule saranno poi isolate dal tessuto mediante digestione enzimatica con collagenasi (Araña et al. 2013).

Il prelievo di midollo osseo avviene tramite la sua aspirazione dalla cresta iliaca del paziente, una procedura che risulta essere dolorosa e invasiva.

Per isolare un sufficiente quantitativo di cellule è necessario ottenere 5/10 ml di midollo, cosa che può risultare complessa e pericolosa per la vita del paziente in animali di piccola taglia.

Per queste motivazioni nell'attività clinica è generalmente preferito l'isolamento a partire da tessuto adiposo.

La natura e il comportamento in vivo delle MSC sono ancora oggi oggetto di grande dibattito.

Negli anni è stata documentata la presenza di MSC in diversi tessuti nell'organismo. In particolare, si tende a identificare queste cellule con popolazioni cellulari presenti a livello della parete vasale o nelle zone immediatamente limitrofe. Diversi studi hanno teorizzato l'identificazione delle MSC come periciti (Meirelles et al. 2006); (Caplan 2008); (Corselli et al. 2010).

È stata infatti riportata la capacità dei periciti di differenziarsi in senso osteogenico, adipogenico e condrogenico se opportunamente stimolati (Covas et al. 2008); (Corselli et al. 2010).

È stata inoltre riportata l'espressione di alcuni marker in comune tra periciti e MSC.

Questa teoria è stata però oggetto di controversie per la mancanza di marker specifici che identificano i periciti e dal momento che in studi recenti è stata evidenziata la presenza di MSC anche in siti extra vascolari come l'endostio (De Souza et al. 2016).

## RUOLO DELLE MSC COME AGENTI TERAPEUTICI

A seguito dell'isolamento delle MSC negli anni 60 è iniziato un forte interesse verso lo studio di queste cellule in funzione delle loro caratteristiche di staminalità: capacità di replicare in tempi rapidi e di differenziarsi nelle diverse tipologie cellulari se sottoposte a determinati stimoli. Basandosi sul paradigma che MSC inoculate all'interno di un tessuto danneggiato potessero integrarsi nel tessuto stesso e differenziarsi in cellule funzionali tipiche dello stesso, queste cellule furono utilizzate in una serie di studi sperimentali atti a dimostrarne la capacità terapeutica.

Diversi studi dimostrarono che le MSC sono in grado di promuovere la guarigione di tessuti danneggiati, in parte anche attraverso la loro differenziazione (Jimenez-Puerta et al. 2020).

Diversi studi hanno cercato di individuare la percentuale di cellule che sopravvivevano nel tessuto una volta inoculate, differenziandosi.

In alcuni studi è stato osservato che la sopravvivenza delle cellule trapiantate è molto bassa. In esperimenti di impianto delle MSC in tendini di cavallo affetti da tendinite, si è osservato che a 10 giorni rimaneva un numero di cellule inferiore al 5% di quelle inoculate mentre a 90 giorni questo numero risultava inferiore allo 0,2% (Guest et al. 2010).

Sostanzialmente questo studio, insieme ad altri ottenuti da altri modelli sperimentali, suggeriva che nonostante i miglioramenti osservabili, la integrazione e differenziazione delle cellule nel tessuto riparato era assolutamente limitata. Altri studi presentarono dati in parte contrastanti. Ad esempio, in uno studio in cui si è valutata l'efficacia dell'utilizzo delle MSC come terapia per la degenerazione del disco intervertebrale nell'uomo si è osservata la presenza delle MSC in sede di lesione fino ad 8 mesi post inoculazione (Henriksson et al. 2019).

In questo caso l'attività cellulare indicava la differenziazione delle MSC in cellule simil condrocitiche. Ad oggi non sono ancora chiare la capacità di sopravvivenza delle MSC dopo impianto nei tessuti, né la percentuale di cellule che si differenziano e i tempi medi di sopravvivenza in vivo. Questi valori sono piuttosto variabili a seconda dello studio; in generale, comunque, si ritiene attualmente la capacità terapeutica delle MSC non possa essere ascritta in modo esclusivo alla loro capacità differenziativa e si tende anzi ad assegnare questa capacità ad altre funzioni biologiche (H. Li et al. 2018).

In effetti negli ultimi anni sono state identificate diverse proprietà delle MSC che le rendono funzionali nella riparazione tissutale. Tra queste vanno annoverate:

- Le funzioni di homing e migrazione;
- L'interazione con il sistema immunitario, immunomodulazione;
- L'Azione paracrina e la produzione di vescicole extra-cellulari (secretoma)  
(Jimenez-Puerta et al. 2020).

## HOMING e MIGRAZIONE

Una proprietà delle MSC fondamentale per la medicina rigenerativa è la loro capacità di localizzarsi in vivo nel tessuto danneggiato (Ullah et al. 2019).

Questa capacità è definita come “homing”.

L’ homing è classificato in due diverse tipologie: non sistemico e sistemico (Nitzsche et al. 2017).

L’homing non sistemico prevede il trapianto di MSC nel tessuto danneggiato e lo spostamento delle cellule all’interno del tessuto seguendo il gradiente di fattori chemiotattici liberati in sede di lesione, fino a giungere alla sede del danno.

L’homing sistemico si osserva invece dopo l’inoculazione delle cellule per via parenterale; le MSC sono in grado di aderire alla parete vasale e lasciare la circolazione ematica per giungere al tessuto danneggiato.

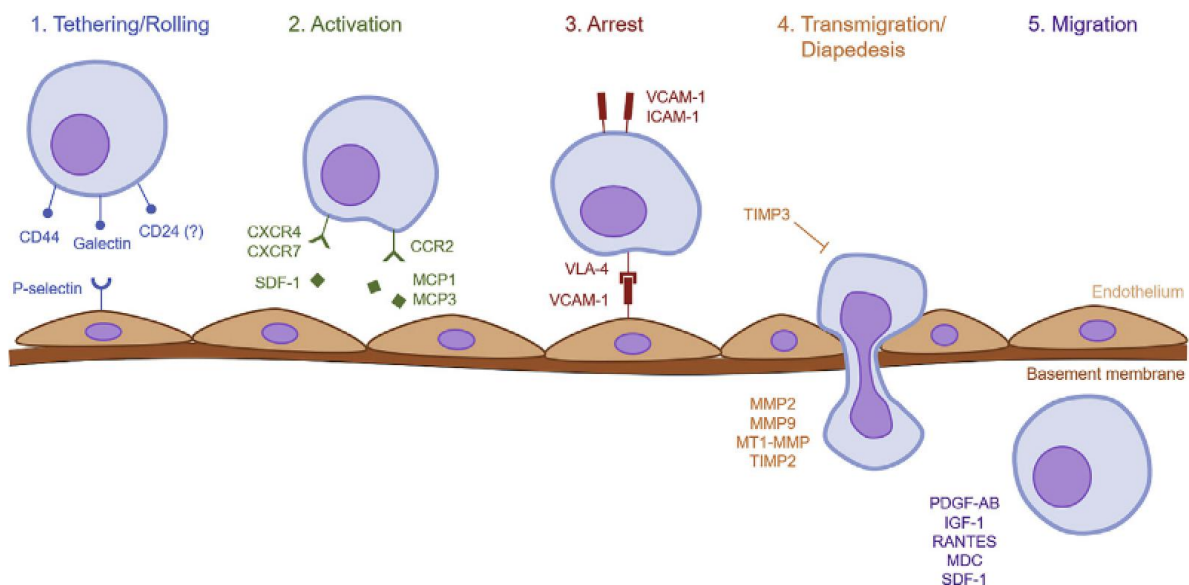


Figura 5 step del processo di homing (Ullah, Liu, and Thakor 2019).

Il tessuto danneggiato rilascia in circolo citochine proinfiammatorie come l’istamina, IL1, IL6, IL8, il TNF che vanno ad attivare le cellule endoteliali stimolando l’espressione di molecole di adesione cellulare (Andreas et al. 2014).

Le MSC iniziano il “rolling” ovvero a rotolare lungo l’endotelio vasale fino ad aderire completamente ed arrestarsi grazie al legame con ligandi cellulari espressi dalle cellule endoteliali (Jimenez-Puerta et al. 2020).

A questo punto si crea una superficie di contatto tra l’endotelio e la MSC e tramite la produzione e l’azione di metalloproteasi quest’ultima riesce a superare l’endotelio e la membrana basale uscendo dal circolo sanguigno (Nitzsche et al. 2017).

Uno degli obiettivi degli studi sulle MSC è quello di amplificare questa proprietà delle MSC per aumentarne l’efficacia nelle terapie di medicina rigenerativa.

## *IMMUNOMODULAZIONE*

La risposta delle MSC post stimolazione è condizionata dai segnali che queste cellule ricevono dal microambiente circostante come citochine infiammatorie o fattori di ipossia (Waterman et al. 2010).

La produzione da parte delle MSC di diversi fattori è il risultato dell'interazione tra il microambiente e il fenotipo cellulare per la presenza di diversi recettori sulla loro superficie, un esempio sono i recettori Toll-like (Sangiorgi e Panepucci 2016).

In un lavoro di Waterman del 2010 viene suggerita la suddivisione delle MSC in due diversi fenotipi: le MSC con fenotipo proinfiammatorio e con fenotipo antiinfiammatorio (Waterman et al. 2010).

Le MSC hanno importanti capacità immunosoppressive: in vitro è dimostrata l'inibizione della proliferazione dei linfociti T post stimolazione con MSC e l'inibizione della produzione di citochine proinfiammatorie (Di Nicola et al. 2002).

Le MSC inibiscono la produzione di anticorpi da parte dei linfociti B e la risposta delle cellule presentanti l'antigene (Nauta et al. 2006).

Gli effetti immunosoppressivi sono anche stati studiati in vivo in diverse patologie su base auto-immune o in cui il processo infiammatorio cronico svolga un importante ruolo patogenetico: diversi lavori riportano l'efficacia in patologie intestinali croniche (coliti, enteropatie) e in patologie d'organo come le nefropatie e le epatiti croniche (Popp et al. 2008); (Parekkadan et al. 2008).

Viste le loro capacità immunosoppressive le MSC sono anche in grado di prevenire o comunque ridurre le potenziali complicanze dovute ad una eccessiva risposta del sistema immunitario in corso di danno a tessuti e organi e permetterne quindi la riparazione.

Gli effetti immunosoppressivi delle MSC sono mediati da fattori solubili; molti fattori sono stati proposti come immunosoppressivi tra cui il TGF- $\beta$ , l'HGF (hepatocyte growth factor) e l'ossido nitrico. È stato dimostrato che l'attività immunosoppressiva delle MSC è indotta da stimoli infiammatori. A seguito della stimolazione delle MSC con citochine proinfiammatorie aumenta l'inibizione alla proliferazione linfocitaria (Hoogduijn et al. 2010).

Oltre alla capacità immunosoppressiva le MSC secernono anche citochine proinfiammatorie e chemochine.

È dimostrato che in condizioni fisiologiche (in tessuti non infiammati) le MSC secernono fattori chemiotattici per neutrofili e monociti; in condizioni di infiammazione per monociti, cellule dendritiche, linfociti T e natural killer (Hoogduijn et al. 2010).

Non è chiara la funzione dell'attività chemiotattica delle MSC, si presuppone che questo meccanismo avvicini le cellule dell'immunità alle MSC rendendole così più suscettibili ai meccanismi di immunomodulazione (Suva et al. 2008).

È da sottolineare anche l'interazione tra macrofagi e MSC: l'alta espressione di indolamina 2,3 diossigenasi da parte delle MSC stimola la differenziazione dei macrofagi in macrofagi di tipo 2, con azione antiinfiammatoria ed immunosoppressiva (Francois et al. 2010).

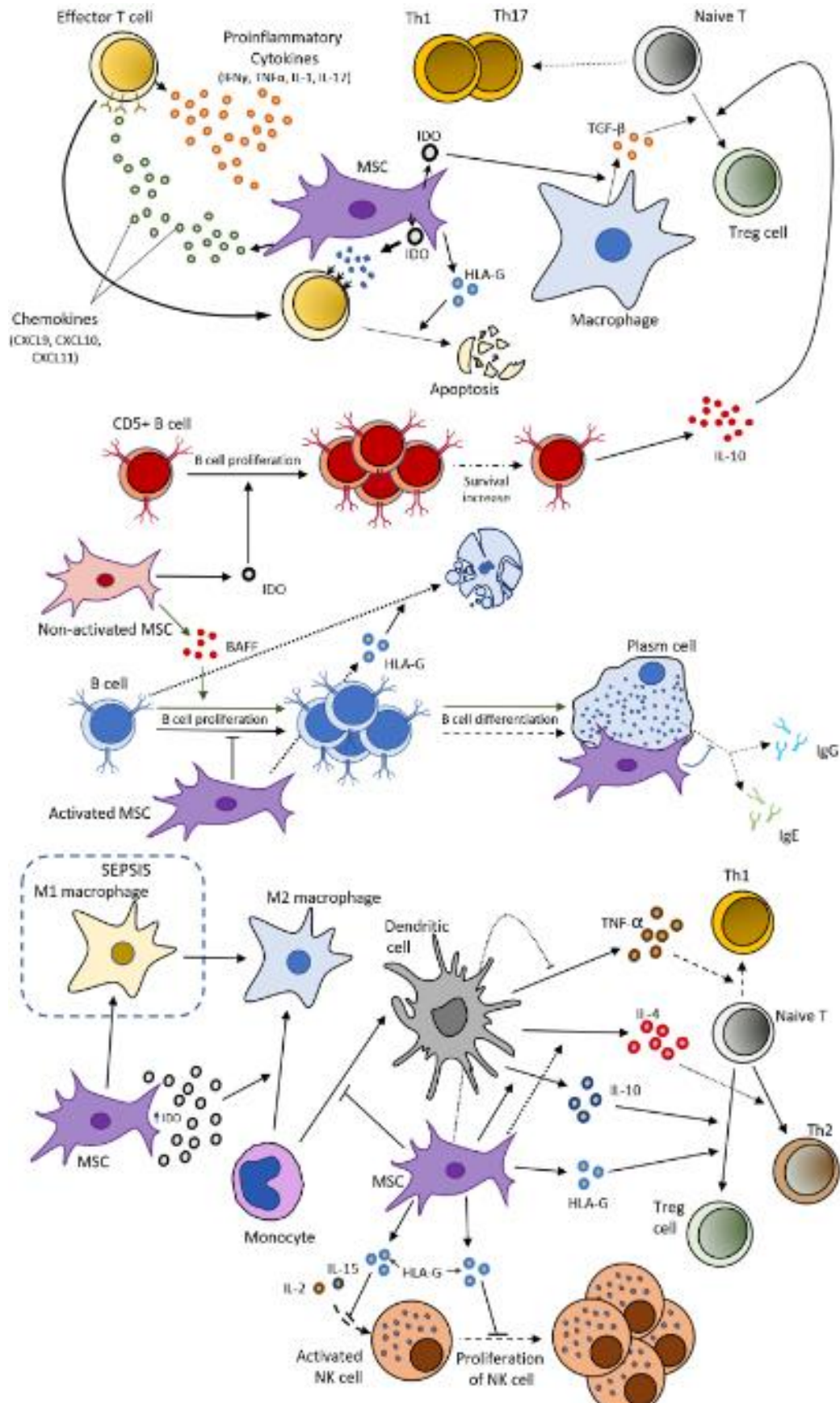


Figura 6 principali interazioni delle MSC con le cellule del sistema immunitario (Jimenez-Puerta et al. 2020).



## AZIONE PARACRINA

### SECRETOMA

Il secretoma derivato dalle MSC rappresenta l'insieme dei fattori solubili e delle molecole bioattive che vengono rilasciati da queste cellule nel loro microambiente. Comprende una vasta gamma di fattori paracrini, come citochine, chemochine, fattori di crescita, enzimi, ma anche vescicole extracellulari e acidi nucleici (L. et al. 2019); (Madrigal et al. 2014).

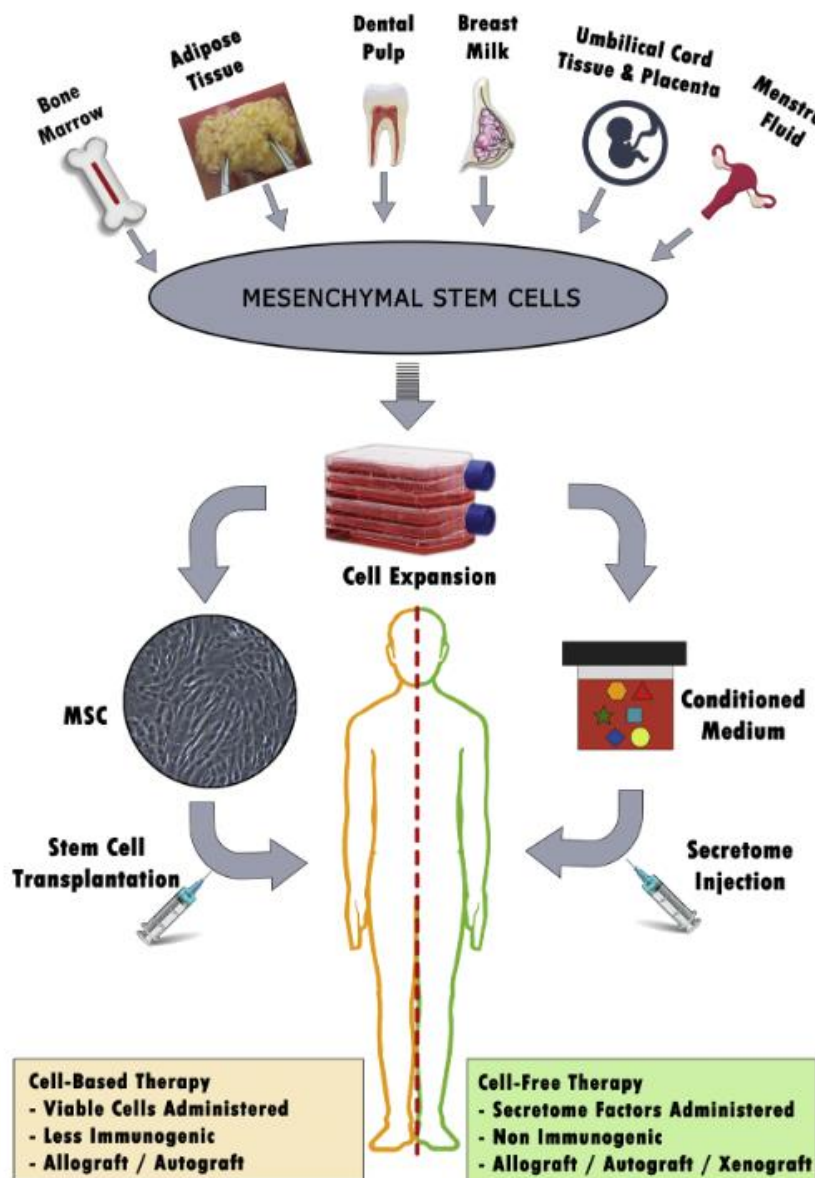


Figura 7 Differenze tra terapia con MSC e terapia con secretoma (L. et al. 2019).

Attraverso il secretoma si ritiene che le MSC svolgano la maggior parte delle loro attività fisiologiche e terapeutiche. In vitro, il secretoma è ottenuto coltivando le MSC in un medium condizionato che stimola la secrezione dei fattori utili per la terapia. Negli ultimi anni sono state messe a punto tecniche per l'induzione della produzione del secretoma e per la sua purificazione dai medium di coltura. Essendo una formulazione acellulare il secretoma derivato da MSC si ritiene non induca una risposta immunitaria anche quando venga usato per fini terapeutici su individui diversi dal donatore delle cellule utilizzate per la sua produzione.

Si ritiene che uno dei vantaggi fondamentali del secretoma sia che è possibile effettuare terapie acellulari con secretomi allogenici, ovvero utilizzando un secretoma prodotto da cellule non provenienti dal soggetto ricevente; sono necessari ulteriori studi e dati clinici per chiarire meglio se questo sia effettivamente possibile senza rischi.

Al contrario, le terapie cellulari basate su MSC prevedono solo l'utilizzo di cellule autologhe per motivi di sicurezza (L. et al. 2019). Pur essendo le MSC immunomodulanti, la somministrazione di cellule allogeniche potrebbe potenzialmente portare alla risposta del sistema immunitario del soggetto ricevente.

Oltre a questo, il secretoma può essere conservato e congelato in modo più agevole rispetto alle MSC, senza dimetilsolfossido DMSO, un crioprotettore che non può essere inoculato e dal quale è necessario purificare le cellule prima di procedere alla loro inoculazione.

Il secretoma può essere standardizzato e quindi essere considerato a livello legislativo come un agente uniforme, cosa che non può avvenire per le MSC (Bermudez et al. 2015). Ad oggi sono in corso molti studi per identificare con precisioni tutti i componenti del secretoma, sono però già state individuate delle differenze nella composizione correlate al tipo di MSC, all'età delle cellule e al medium di coltivazione (Pires et al. 2016).

## VEVICOLE EXTRACELLULARI

Le vescicole extracellulari (EVs) sono piccole vescicole secrete da diversi tipi cellulari, tra cui le MSC che hanno un ruolo importante nella comunicazione intercellulare, consentendo il trasferimento di molecole bioattive tra le cellule (Chen et al. 2016). Le EVs contengono una varietà di componenti biologicamente attive, tra cui proteine, peptidi, RNA messaggero, micro-RNA e altre molecole. Oltre a queste molecole contengono anche lipidi in grado di mediare la comunicazione tra cellule con un'azione di modulazione della risposta immunitaria, di riduzione dell'apoptosi e di maggiore resistenza allo stress ossidativo (Stone et al. 2017).

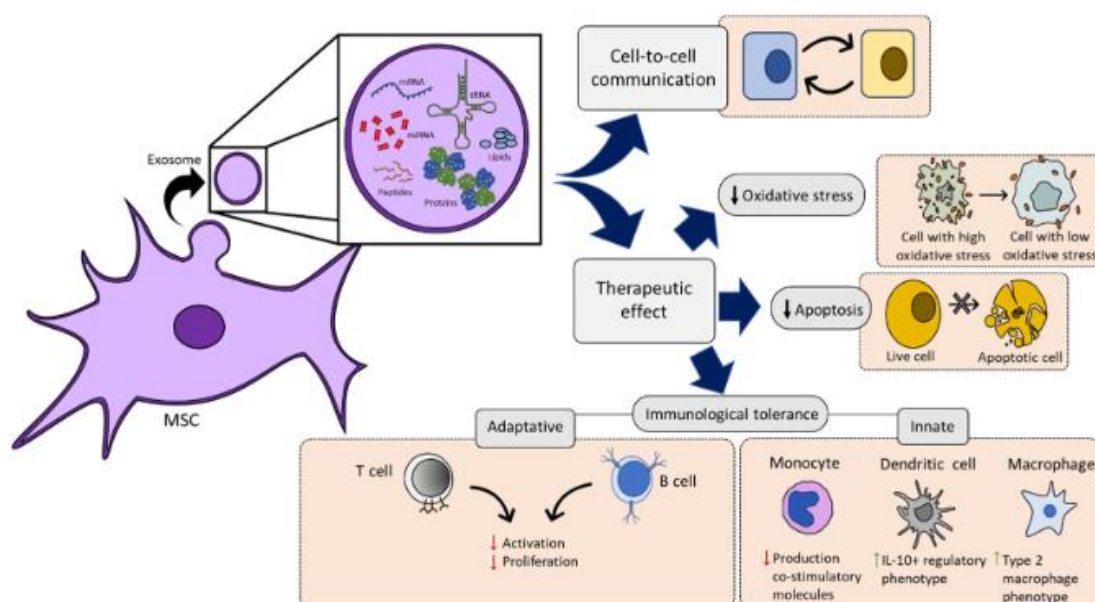


Figura 8 principali funzioni delle EVs (Jimenez-Puerta et al. 2020).

Diversi studi identificano le EVs come un carrier per il trasferimento di micro-RNA tra cellule diverse con l'obiettivo di regolare l'espressione genica.

È stato osservato anche il trasferimento di mitocondri tramite le EVs derivate da MSC. Ad esempio, è stato riportato che il trasferimento di mitocondri provenienti da MSC a cellule dell'immunità innata come i macrofagi determina un incremento dell'attività fagocitica (Jackson et al. 2016). Nel complesso si ritiene che le EVs con il loro carico di molecole biologicamente attive potrebbero offrire delle opzioni terapeutiche valide per tutte quelle

patologie in cui le MSC possono trovare un'applicazione (Qu et al. 2017); (Moghaddam et al. 2019).

Da un punto di vista di produzione e stoccaggio le EVs sono molto promettenti in quanto sono circondate da una membrana fosfolipidica e quindi stabili al congelamento e facilmente conservabili.

## UTILIZZO DELLE MSC IN MEDICINA RIGENERATIVA

### *VIE DI SOMMINISTRAZIONE*

Le vie di somministrazione utilizzate in medicina rigenerativa per la terapia con le MSC sono varie sia in medicina umana che in medicina veterinaria. Queste dipendono sia dalla condizione clinica del paziente (per esempio possibilità di sostenere un'anestesia) che dall'obiettivo terapeutico. Ad esempio, il target terapeutico potrebbe essere una struttura anatomica od un tessuto ben definito e facilmente raggiungibile, o, in alternativa, un organo interno oppure un sistema funzionale (ad esempio, il sistema immunitario) impossibili da raggiungere con una somministrazione localizzata. In generale si tende ad utilizzare la somministrazione locale se la sede del trattamento è facilmente raggiungibile, mentre si ricorre alla somministrazione sistemica al fine di ottenere una terapia d'organo o distribuire le cellule a più tessuti bersaglio.

La somministrazione sistemica prevede l'iniezione diretta delle MSC nel sistema circolatorio, per via endovenosa od endoarteriosa. La somministrazione endovenosa è relativamente semplice ed è per questo una delle più utilizzate (Sanchez-Diaz et al. 2021). La distribuzione delle MSC dopo somministrazione endovenosa segue un pattern descritto in diverse specie animali, da considerarsi attentamente sia per le conseguenze sulla distribuzione delle cellule, sia per gli effetti che questa distribuzione possono avere sul paziente. Dopo l'iniezione endovenosa la maggior parte delle cellule sono filtrate a livello polmonare, dove si localizzano. A seguito di questa prima distribuzione polmonare si ha una localizzazione a livello di milza, fegato e rene con una bassissima quota di MSC rimanenti che giungono ad altri organi (circa 1%) (Lee et al. 2009).

Si ritiene che la distribuzione delle cellule nei tessuti od organi sede di lesione avvenga in funzione della loro capacità di homing. La iniziale e prevalente localizzazione polmonare si giustifica con il fatto che le dimensioni delle MSC derivate dalle colture cellulari sono tali da determinare un loro intrappolamento a livello della rete capillare polmonare. Questo meccanismo di distribuzione va considerato al momento della somministrazione per evitare la formazione di trombi polmonari, potenzialmente dannosi per il paziente.

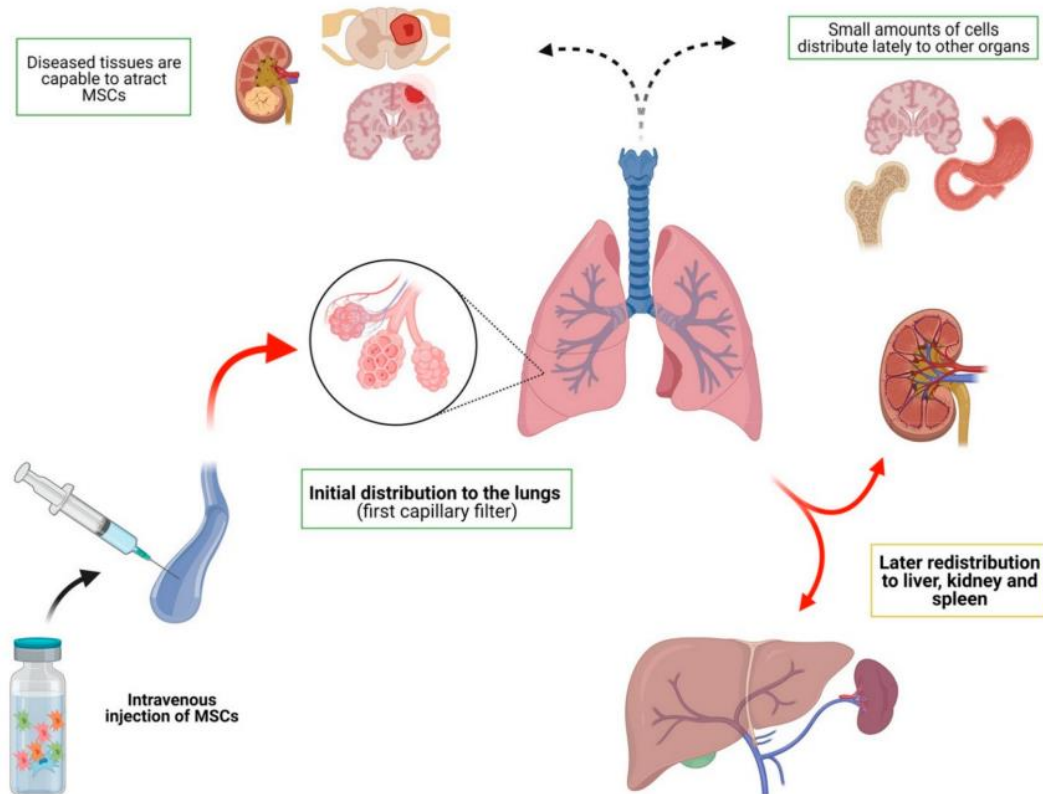


Figura 9 distribuzione delle MSC post somministrazione endovenosa (Sanchez-Diaz et al. 2021).

Un'alternativa all'iniezione endovenosa è la somministrazione endoarteriosa; grazie a questa tipologia di somministrazione si bypassa il filtro polmonare e si riesce ad ottenere una migliore distribuzione agli organi (Sanchez-Diaz et al. 2021).

Ottimale è l'inoculazione selettiva a livello dell'arteria target dell'organo interessato (es arteria renale in caso di patologie renali). Questa tipologia di somministrazione ha come contro la maggiore invasività e la necessità di un'anestesia che l'inoculazione endovenosa può non richiedere (Mäkelä et al. 2015).

Sia nella somministrazione endovenosa che endoarteriosa è dimostrata la capacità di organi danneggiati di attrarre le MSC e quindi aumentare la percentuale che normalmente giungerebbe a quell'organo. Questa percentuale è però molto variabile nei diversi studi (Dave et al. 2017); (Taylor et al. 2020).

Al contrario della somministrazione dei farmaci la somministrazione intramuscolare di MSC non determina una distribuzione sistemica delle cellule, si ha semplicemente una localizzazione e permanenza nel sito di inoculazione fino a 3 mesi (Creane et al. 2017).

Un'altra via di somministrazione delle MSC è l'iniezione diretta nel sito specifico della lesione o del tessuto bersaglio. Questo approccio è particolarmente adatto per trattare lesioni localizzate o per favorire la rigenerazione tissutale in un'area specifica. È utilizzata l'iniezione intra-articolare e tendinea, a livello del sistema nervoso centrale, a livello dell'apparato digerente, nell'apparato riproduttivo e urinario, nell'apparato cardiovascolare e respiratorio e a livello di cute, tessuti sottocutanei e linfonodi (Sanchez-Diaz et al. 2021).

La somministrazione intra-articolare è molto studiata in diversi modelli animali ed è una delle applicazioni più utilizzate. Nella somministrazione intra-articolare non si ha una diffusione sistemica delle cellule ma una localizzazione all'interno della capsula sinoviale. È stata dimostrata la capacità delle cellule di migrare dall'articolazione ai tendini vicini se danneggiati, questo perché i segnali di danno rilasciati dal tessuto hanno un'azione chemiotattica sulle cellule (Yang et al. 2019).

A livello del sistema nervoso sono state descritte l'inoculazione intratecale (Barberini et al. 2018), intracerebrale (Xie et al. 2016) e intraventricolare (Park et al. 2016).

La somministrazione intranasale è una via di somministrazione esplorata per patologie del sistema nervoso. Si è infatti osservata una migrazione di MSC a livello cerebrale utilizzando questa via di somministrazione (Y. hua Li et al. 2015).

Spesso si ha l'associazione di più vie di somministrazione (locale e sistemica) nell'attività clinica per cercare di ottenere la massima efficacia terapeutica possibile, compatibilmente con le necessità e caratteristiche del paziente.

Route of Administration	Systemic Distribution	Organs to Which the Cells are Distributed	Advantages	Disadvantages
Intravenous	Yes	First, cells move to the lungs (first capillary filter). Later, cells distribute, mainly to the liver, spleen and kidneys. Variable amounts of cells are found in other organs.	Convenient route of administration. Widely used. Useful to reach the lungs.	Cells do not reach other organs apart from lungs in great quantities.
Intraarterial (not selective)	Yes	Cells bypass the pulmonary filter so there is a wide distribution in the rest of the organs (heart, brain, kidneys, liver, digestive system)	Convenient route of administration. Useful to bypass the lungs and achieve broader distribution.	Not so widely used. Intraarterial infusion is not common in clinical practice
Intraarterial (selective)	Yes (reduced)	Cells are distributed mainly in the territory irrigated by the cannulated artery. Distribution of cells to other organs is possible but in smaller amounts.	Targeted deposition of cells is achieved.	Inconvenient route of administration. Difficult to transfer to clinical practice
Intramuscular and intraarticular	No	Cells remain at the injection site	Convenient route of administration. Targeted deposition of cells is achieved	No systemic distribution is achieved.
Intradermal, intratracheal, intrapulmonary and intraurinary tissue	No	Cells remain at the injection site	Convenient route of administration, depending on each specific route. Targeted deposition of cells is achieved	No systemic distribution is achieved.
Intrahepatic, intrasplenic, intrapericardial, intramyocardial	Yes	Cells distribute following the direction of the bloodstream derived from the infused organ.	Targeted deposition is achieved. Knowledge about the bloodstream derived from the infused organ might lead to targeted distribution after injection.	Inconvenient in clinical practice. Difficult to transfer to clinical practice.
Injection into cavities containing body fluids (peritoneum, cerebral ventricles)	Yes (low amounts)	Cells distribute mainly to tissues in contact with the body fluid.	Convenient route of administration, depending on each specific route. Targeted deposition is achieved. Limited systemic biodistribution.	Limited systemic biodistribution.
Intrathecal administration	No	Cells distribute caudally when injected in the upper segments of spine. Cranial migration of cells after lumbar injection seems to be possible if a high dose of MSCs is administered (e.g., distribution to brain).	Convenient route of administration if deposition of the cells at the central nervous system level is desired. Limited systemic biodistribution.	Inconvenient in clinical practice (depending on the cases).
Intra-Central Nervous System	Yes/No (variable amounts)	Cells are able to distribute within the central nervous system. Factors leading to the movement of the cells are still not clear.	Targeted deposition is achieved.	Inconvenient route of administration. Difficult to transfer to clinical practice.

Figura 10 vie di somministrazione delle MSC: vantaggi e svantaggi di ognuna (Sanchez-Diaz et al. 2021).



### UTILIZZO DI CELLULE ALLOGENICHE – AUTOLOGHE

Nelle terapie cellulari è possibile utilizzare cellule autologhe (provenienti dal soggetto ricevente) o allogeniche (provenienti da un soggetto diverso rispetto al ricevente).

Ad oggi, in Italia è autorizzato il trattamento solo con cellule autologhe; è possibile utilizzare cellule allogeniche solo in studi sperimentali approvati dal ministero ([https://www.anmvioggi.it/images/ACCORDO\\_LINEE\\_GUIDA\\_STAMINALI\\_IN\\_MEDICINA\\_VETERINARIA.pdf](https://www.anmvioggi.it/images/ACCORDO_LINEE_GUIDA_STAMINALI_IN_MEDICINA_VETERINARIA.pdf)).

	<i>Vantaggi</i>	<i>Svantaggi</i>
<i>MSC autologhe</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sicurezza</li> <li>- Immunocompatibilità</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lunghi tempi di produzione</li> <li>- Potenziali malattie genetiche del soggetto</li> </ul>
<i>MSC allogeniche</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Selezione del donatore</li> <li>- Disponibilità immediate</li> <li>- Scarsa immunogenicità</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Potenziali reazioni del Sistema immunitario</li> <li>- Eterogeneità dei donatori</li> <li>- Potenziali malattie genetiche del soggetto</li> <li>- Memoria immunitaria specifica</li> <li>- Clearance rapida delle cellule post infusione</li> </ul>

Tabella 1 vantaggi e svantaggi dell'utilizzo di MSC autologhe ed eterologhe (C. Li et al. 2021).

Da tenere in considerazione tra gli svantaggi dell'utilizzo di cellule autologhe è sicuramente il tempo necessario per la produzione delle cellule, che non possono essere quindi utilizzate in animali con patologie acute.

Oltre a questo, è da considerare che non tutti in tutti i casi il paziente si può sottoporre all'intervento di prelievo del tessuto adiposo/midollo osseo spesso a causa di patologie che rendono controindicato l'intervento.

Sarebbe ottimale riuscire con ulteriori studi a ridurre il più possibile i rischi dell'utilizzo di cellule allogeniche per poterne autorizzare l'uso nella pratica clinica (C. Li et al. 2021).

### UTILIZZO IN MEDICINA VETERINARIA

Le MSC sono state isolate in diverse specie animali; per la maggior parte si tratta di mammiferi (coniglio, cane, gatto, cavallo, topo, cavia peruviana, capre, pecore, suini, bovini) (Kumar Maiti et al. 2013); (Sahoo et al. 2017); (Barberini et al. 2018); ma sono presenti in letteratura studi in cui è riportato l'isolamento a partire da uccelli (Rivas et al. 2023); (Liu et al. 2019) e anfibi (Otsuka-Yamaguchi et al. 2021).

Sono utilizzate come terapia principalmente nel cavallo, nel cane e nel gatto e in queste tre specie stanno acquisendo una diffusione sempre maggiore come una valida alternativa ai trattamenti tradizionali.

Nel cavallo sono utilizzate per trattare principalmente patologie ortopediche tipiche degli animali agonisti come patologie a livello di tendini, cartilagini e ossee (De Schauwer et al. 2013).

Nel cane e nel gatto oltre che per problemi articolari si stanno studiando terapie a base di MSC per patologie autoimmuni (enteropatie croniche, gengivostomatite felina), (Quimby and Borjesson 2018; Pérez-Merino et al. 2015) patologie renali, polmonari (Quimby and Borjesson 2018), epatiche (Teshima et al. 2017), del sistema nervoso e patologie oculari (cheratocongiuntivite secca) (Sgrignoli et al. 2019).

Non è riportato in letteratura nessun tentativo di isolamento di MSC a partire da rettili, mentre recentemente è stato pubblicato un lavoro relativo all'isolamento dall'anfibio *Xenopus laevis*. In generale, comunque, i lavori scientifici che si occupano dell'isolamento di cellule da rettili sono piuttosto limitati e sono scarse in generale le informazioni relative alla ottimizzazione delle condizioni di coltura in-vitro.

Sono riportati in letteratura studi sull'isolamento dei fibroblasti di *Caretta Caretta* (Webb et al. 2014) e di *Chelonia mydas* (Finlayson et al. 2020), due specie di tartarughe marine.

## TRACHEMYS SCRIPTA

La *Trachemys scripta*, comunemente nota come tartaruga palustre americana, è una specie di tartaruga palustre originaria del Nord America.

Si tratta di una specie molto resistente e adattabile che ha trovato un habitat ideale in Europa, in particolare in Italia.

In Italia, la *Trachemys scripta* è considerata una specie invasiva. Questo significa che la sua presenza rappresenta una minaccia per gli ecosistemi nativi, in quanto compete con le specie autoctone per le risorse alimentari e gli habitat.

La specie è stata introdotta in Italia come animale da compagnia, ma molte tartarughe sono state rilasciate in modo irresponsabile nell'ambiente naturale, spesso in seguito a un'eccessiva crescita o perché i proprietari non potevano più occuparsene.

Per gestire il problema delle *Trachemys scripta* in Italia è stato redatto un piano di controllo della popolazione che prevede l'obbligo di denuncia da parte dei detentori delle tartarughe, l'assoluto divieto all'abbandono/cessione a terzi e la sterilizzazione o l'abbattimento dei soggetti presenti sul territorio (*Piano nazionale per la gestione della testuggine palustre americana (Trachemys scripta) 2020*); (Cadi and Joly 2004); (Ficetola et al. 2010).

## SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi è quello di valutare l'isolamento, proliferazione in vitro e caratterizzazione delle cellule stromali mesenchimali nelle tartarughe palustri ascritte al genere *Trachemys scripta* a partire da un campione di tessuto adiposo prelevato durante l'intervento di ovarisalpingectomia. Vista la mancanza di riferimenti bibliografici relativi all'isolamento di MSC nei rettili, il lavoro di tesi si è posto l'obiettivo di esplorare la possibilità di isolare questo tipo di cellule con ampie potenzialità applicative nella clinica dei rettili utilizzando *Trachemys scripta* come modello. Vista la disponibilità di campioni di tessuto adiposo, ottenuto durante i processi di sterilizzazione previsti dalla normativa nazionale, *Trachemys scripta* è stata utilizzata per valutare la possibilità di ottenere cellule con caratteristiche simili a quelle osservate nei mammiferi e mettere a punto le metodiche necessarie alla loro raccolta, espansione in vitro e conservazione a lungo termine. Il progetto è stato approvato dal comitato etico locale con la delibera PROT. N. 15/CESA/2022.

## MATERIALI E METODI

### PRELIEVO CAMPIONE

#### SCELTA DEI SOGGETTI DONATORI

Dal 2020 in Italia è in vigore il “*Piano nazionale per la gestione della testuggine palustre americana (Trachemys scripta)*”, finalizzato al controllo di queste specie non autoctona. Nella regione Emilia-Romagna il piano prevede il controllo della popolazione di *T. scripta* presente sul territorio tramite cattura e abbattimento dei soggetti (Macchi et al. 2020).

In alternativa: “*In casi eccezionali di particolare sensibilità sociale e di popolazioni estremamente contenute e isolate, può essere considerata la sterilizzazione chirurgica come alternativa alla soppressione, previa verifica della fattibilità dell'intervento anche in termini di dimensioni della popolazione e costi, tenuto conto che andranno trattati tutti gli individui di uno stesso sesso presenti*” (Macchi et al. 2020).

I soggetti inclusi nello studio sono parte di un progetto del Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie dell'Università degli Studi di Parma in collaborazione con le associazioni Rescue Dogs e ENPA Parma approvato a livello regionale che prevede il recupero degli esemplari di *T. scripta* da cessioni di privati, la loro sterilizzazione chirurgica e il loro reinserimento in un'oasi appositamente scelta per evitare danni alla fauna locale; *T. scripta* è infatti classificata come specie invasiva in Italia.(Ficetola and Scali 2010).

Nello studio relativo all'isolamento delle MSC da tessuto adiposo sono stati inclusi 5 soggetti adulti di *T. scripta* di entrambi i sessi, con esame obiettivo generale nella norma, e peso medio di 1,59 Kg. Gli animali sono stati considerati clinicamente sani, in quanto non presentavano sintomi o segni di patologie sottostanti. Il tessuto adiposo è stato raccolto contestualmente all'intervento di sterilizzazione.

Il comitato etico (OBPA), con la delibera PROT. N. 15/CESA /2022, ha approvato il progetto.

## PRELIEVO EMATICO

Tutti i soggetti dello studio sono stati sottoposti ad un prelievo ematico dalla vena giugulare di circa 0.5 ml (Doneley et al. 2018).

Il campione è stato raccolto in litio eparina, sul campione tal quale è stato eseguito un microematocrito e sul plasma ottenuto a seguito di centrifugazione un esame biochimico per gli analiti considerati essenziali per la specie (BUN, K<sup>+</sup>, TP, acidi biliari, acido urico).

Nei due soggetti di peso superiore a 2 Kg è stata raccolta un'ulteriore quota di 1,5 ml di sangue, è stata posta in una provetta con sodio citrato (3,2%) e conferita al laboratorio per l'isolamento dei leucociti seguendo la metodica utilizzata da Di Ianni et al. nel 2015. (Di Ianni et al. 2015)

Solo i soggetti che non presentavano alterazioni ematologiche rispetto ai parametri considerati normali per la specie (Carpenter and Harms 2023) sono stati inclusi nello studio.

## PROTOCOLLO ANESTESIOLOGICO

Considerata l'importanza di un range termico ottimale nei rettili (Preferred Optimal temperature Zone o "POTZ"), tutti gli animali sono stati mantenuti in un ambiente con temperatura ambientale controllata compresa tra 28°C diurni 25°C notturni prima della procedura chirurgica (Longley 2008).

Durante le fasi di premedicazione e durante tutta la durata dell'anestesia gli animali sono stati posti su un tappetino riscaldante e la temperatura cloacale è stata monitorata tramite un termometro digitale (Scarabelli and Di Girolamo 2022).

Tutti i soggetti sono stati premedicati con: ketamina 10 mg/kg, dexdemetomidina 50 µg/kg e midazolam 0.7 mg/kg IM (Carpenter and Harms 2023); (Greer et al. 2001).

In tutti i soggetti è stato garantito un accesso venoso in vena giugulare tramite catetere venoso di dimensioni variabili in base al calibro vascolare (Scarabelli and Di Girolamo 2022).

I soggetti sono stati monitorati durante tutto il piano anestesio logico tramite l'utilizzo di sound doppler (posto all'intersezione tra la base del collo e l'epifisi prossimale dell'omero), ECG, capnografia per valutare la profondità del piano anestesio logico. Nel

caso in cui il piano anestesiológico fosse ritenuto inadeguato alle procedure chirurgiche, si è scelto di utilizzare propofol come agente di induzione ad una dose massima di 10 mg/kg EV (Carpenter and Harms); (Ziolo and Bertelsen 2009).

I soggetti sono stati successivamente intubati tramite tracheotubi non cuffiati o cateteri venosi in Teflon™ in relazione al diametro tracheale del soggetto.

Tutti i soggetti sono stati mantenuti in anestesia con isoflurano all'1.5% e ventilati meccanicamente con pallone da 0.5l a 4 atti al minuto (Scarabelli and Di Girolamo 2022).

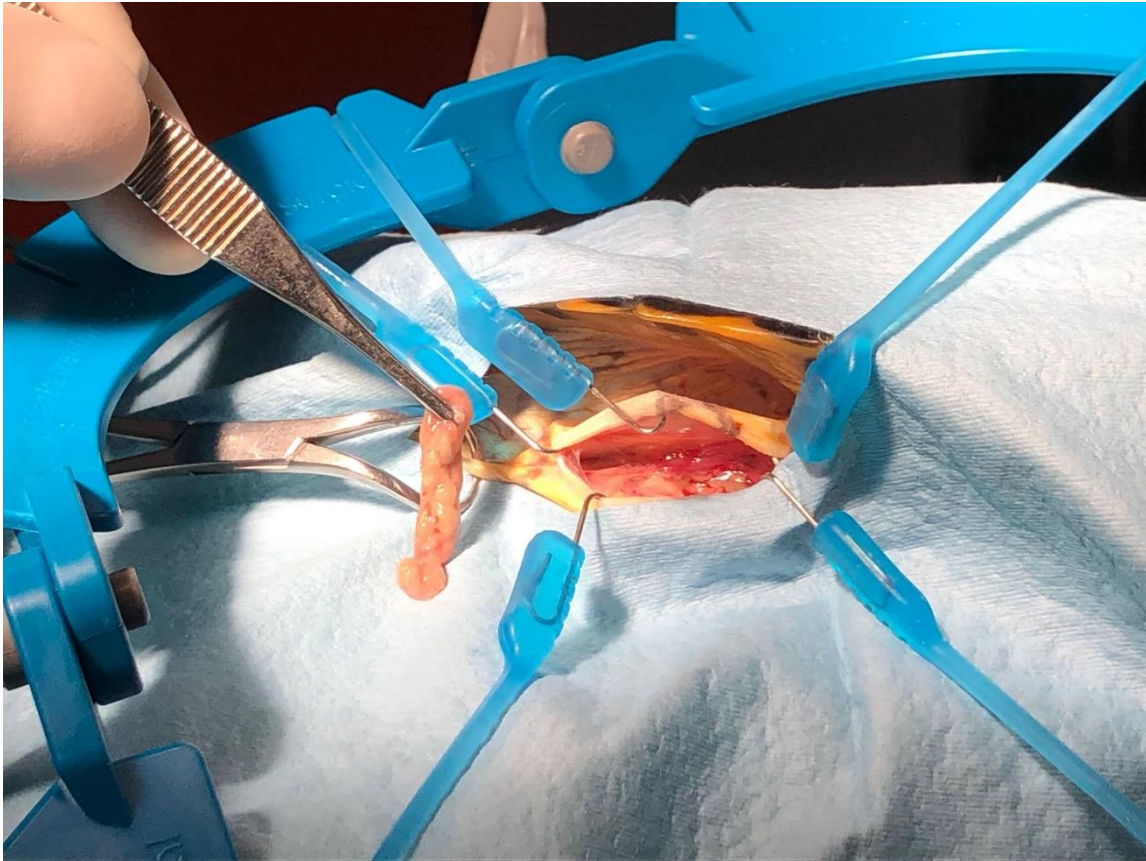
Al termine della procedura tutti i soggetti sono stati antagonizzati con atipamezolo al dosaggio di 0.5 mg/Kg IM (Carpenter and Harms 2023).

### TECNICA CHIRURGICA

La procedura chirurgica eseguita è stata quella proposta da Proença and Divers nel 2015. Tutti i soggetti sono stati stimolati ad urinare e defecare 30 minuti prima dell'operazione tramite la stimolazione cloacale utilizzando un cotton fioc umido, per ridurre i rischi di rotture traumatiche della vescica o dell'intestino, se repleti.

In tutti i soggetti di sesso femminile sono state eseguite ecografia e rx preoperatorie per valutare la presenza/assenza di eventuali uova e di misurarne le dimensioni per valutare la possibilità di estrazione attraverso la fossa del fianco. In caso contrario sarebbe stato necessario procedere attraverso una celiotomia tramite piastrotomia.

Tutti i soggetti sono stati posizionati in decubito laterale sx e mantenuti in sede con sostegni in gommapiuma. Le zampe posteriori sono state estese caudalmente e mantenute unite con del cerotto in modo da esporre al meglio la fossa del fianco. È stato successivamente eseguito uno scrub chirurgico della fossa prefemorale e delle aree anatomiche adiacenti (piastrone, ponte e carapace)



*Figura 11 procedura di prelievo del tessuto adiposo dalla fossa prefemorale.*

È stata eseguita un'incisione cranio-caudale lungo la fossa del fianco, seguita da una dissezione dei tessuti sottocutanei fino a giungere all'esposizione dell'aponeurosi dei muscoli obliquo e trasverso dell'addome. Questa è poi stata incisa permettendo così la visualizzazione della membrana celomatica.

Dal tessuto sottocutaneo è stato prelevato sterilmente un campione di circa 0.5 g di tessuto adiposo sottocutaneo. Questo è stato posto in una provetta sterile contenente 10 ml di soluzione formata da PBS sterile (tampono fosfato), penicillina/streptomicina (100 U/ml, 100ug/ml) e amfotericina B (2.5 ug/ml).

Il campione è stato consegnato in laboratorio e processato entro massimo un'ora dal prelievo.

La membrana celomatica è stata delicatamente incisa per permettere l'ingresso dell'endoscopio, ponendo attenzione a non danneggiare la vescica, l'intestino ed i polmoni durante la procedura.



Nei maschi, dopo aver identificato il testicolo a livello di polo caudale renale, si è proceduto a legare i vasi del mesorchio tramite una emoclip e si è asportato il testicolo. In alcuni casi, è stato possibile eseguire una orchietomia bilaterale tramite il medesimo accesso e senza cambiare decubito.

In caso di un individuo di sesso femminile, l'ovaio dx e l'ovidutto omolaterale, sono stati identificati ed esteriorizzati tramite l'utilizzo di tamponi sterili e asportati.

Prima della chiusura del celoma, è stata verificata l'assenza di emorragie. I piani muscolari sono stati suturati tramite utilizzo di monofilamento assorbibile con sutura continua.

La cute è stata suturata con una sutura continua estroflettente. Non è mai stato necessario suturare la membrana celomatica.

#### GESTIONE POST-OPERATORIA DEI SOGGETTI

Nel post-operatorio è stato garantito ai pazienti un ricovero tranquillo, riscaldato alla temperatura ottimale per la specie (28 °C), lontano da rumori molesti, in box singoli. Tutti i soggetti sono stati monitorati da personale competente fino a completo risveglio.

Gli animali sono poi stati ricoverati in una stanza a 28°C per 7 gg al secco ("dry docking") e sottoposti a due bagnetti giornalieri di 15 minuti, ciascuno in 2-3 cm di acqua tiepida, durante i quali soggetti erano liberi di idratarsi, urinare e defecare.

La valutazione del dolore post-operatorio è stata effettuata monitorando l'assunzione di cibo e la ripresa di un comportamento considerato fisiologicamente normale nel preoperatorio. È stato somministrato post-intervento tramadolo a 10mg/kg (durata oltre 72h nelle *Trachemys*), singola somministrazione (Baker et al. 2011).

## **PREPARAZIONE DI CELLULE STROMALI MESENCHIMALI DA TESSUTO ADIPOSO**

### ATTREZZATURA E SOLUZIONI UTILIZZATE

#### *ATTREZZATURA NECESSARIA*

- Cappa a flusso laminare
- Incubatore per colture cellulari
- Bagno termostato a 37°C
- Petri sterili da 3 e 6 cm di diametro
- Bisturi con lama sterili
- Provette da centrifuga a fondo conico sterili (15 e 50 ml)
- Fiasche da 25, 75 cm<sup>2</sup> per coltura in monostrato
- Camera di Burker
- Vials congelamento (criovials)
- Contenitore per vials congelamento
- Frigorifero a -80 °C
- Bidone azoto liquido

#### *REAGENTI PER COLTURE CELLULARI (GIBCO)*

- DMEM glutamax High Glucose
- FBS (fetal bovine serum)
- Penicillina/streptomina (10000 U/ml, 10000 ug/ml) soluzione 100x
- Amfotericina B 250 ug/ml soluzione 100x
- Tripsina-EDTA 0,5% soluzione 10x
- Collagenasi I
- DMSO (Dimetilsolfossido) per colture cellulari
- Histopaque-1077

*SOLUZIONI DI LAVORO*

- Etanolo 70%
- PBS sterile (soluzione salina acquosa contenente NaCl, KCl, Na<sub>3</sub> PO<sub>4</sub> sterile, pH 7.4)
- DMEM High Glucose: medium comunemente utilizzato per supportare la crescita di culture cellulari
- DMEM collagenasi I: DMEM H.G., penicillina/streptomicina (100 U/ml,100ug/ml), amfotericina B (2.5 ug/ml), 0.1% collagenasi.
- DMEM di mantenimento (medium di coltura): DMEM H.G. con 10% FBS, soluzione penicillina/streptomicina (100U/ml, 100ug/ml), amfotericina B (2.5 ug/ml)
- Soluzione Tripsina in PBS (0.05%)
- Soluzione di congelamento: DMEM H.G.,50% FBS, penicillina/streptomicina (100U/ml,100 ug/ml), amfotericina B (2.5 ug/ml), 10% DMSO

**DIGESTIONE TESSUTO E PREPARAZIONE DI MICROFRAMMENTI DI TESSUTO ADIPOSO**

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

*ISOLAMENTO DI MSC DA DIGESTIONE DI TESSUTO ADIPOSO*

Un primo metodo adottato per l'isolamento delle MSC è stato quello della digestione enzimatica del tessuto adiposo, mutuando sostanzialmente la tecnica utilizzata per isolare le cellule di mammifero.

Il campione è stato lavato in una piastra Petri da 6 cm di diametro contenente etanolo al 70% per pochi secondi e spostato poi in un'altra Petri contenente PBS per rimuovere completamente l'alcool rimasto.

Il campione è stato poi pesato; solo con campioni di peso > 0,2 g è stata eseguita la digestione.

Il campione è stato frammentato con la lama da bisturi in pezzi di circa 1 mm di diametro. I frammenti sono stati inseriti con l'ausilio di una pinza in una provetta sterile da colture

cellulari da 15 ml contenente 5 ml di DMEM collagenasi I precedentemente portato a 37°C. La provetta è stata posta in agitatore a 37°C per 60 minuti.

A digestione avvenuta è stato aggiunto alla provetta un ugual volume di DMEM di mantenimento (5 ml) ed è stata posta la provetta in centrifuga a 400xg per 10 min.

Il surnatante è stato eliminato ed è stato mantenuto nella provetta il pellet composto dalle cellule. Il precipitato pellet è stato risospeso in 1 ml di DMEM di mantenimento.

La sospensione cellulare è stata divisa in due aliquote da 0.5 ml, ognuna di queste aliquote è stata seminata in una piastra Petri di diametro 3.5 cm nella quale era stato precedentemente versato 2 ml di DMEM di mantenimento. Le colture cellulari sono state poste in incubatore ad atmosfera controllata di CO<sub>2</sub> al 5%, a temperatura di 28°C.

#### *ISOLAMENTO DI MSC DA FRAMMENTI DI TESSUTO ADIPOSITO*

Questa procedura non prevede un trattamento enzimatico del tessuto, ma la sua frammentazione meccanica e il successivo mantenimento dei frammenti in condizioni tali da permetterne il mantenimento della vitalità cellulare. Una volta adesi alla superficie di coltura, dai frammenti vitali migrano spontaneamente cellule in grado di crescere aderendo alla fiasca. Per questa procedura, al fine di ottenere un gel che permetta l'adesione dei frammenti alla plastica di coltura, è stata utilizzata una aliquota del sangue prelevato in sodio citrato (0.5 ml), centrifugato per isolare il plasma dalla componente cellulare.

Dopo essere stato lavato in alcool e PBS come nella procedura sopra descritta, il campione di tessuto è stato diviso in piccoli frammenti (diametro di circa 3 mm). I frammenti sono poi stati disposti in maniera da coprire più superficie possibile in una Petri da 3.5 cm con l'ausilio di una pinzetta.

Alla Petri sono stati aggiunti 200 µl di soluzione di *plasma attivato* così composta: 100 µl di plasma, 80µl di DMEM di mantenimento e 20 µl di calcio gluconato (in soluzione di 1000 mg/10ml), distribuita in modo tale da coprire ogni frammento con una goccia di plasma.

Dopo gelificazione del plasma (circa 1 minuto) sono stati aggiunti 2.5 ml di DMEM di mantenimento per coprire ogni singolo frammento di tessuto. La piastra è stata posta in incubatore a temperatura di 28°C, 5% CO<sub>2</sub>.

## CRESCITA COLONIE CELLULARI

Le cellule sono state mantenute in incubatore a 28°C ad una percentuale di CO<sub>2</sub> del 5%, in ambiente ad umidità controllata per tutta la durata dello studio. Il primo cambiamento del medium di coltura viene effettuato dopo 48 h dalla semina. Successivamente, il DMEM di mantenimento è stato cambiato regolarmente ogni 48 h, sostituendolo con nuovo DMEM preriscaldato a 28°C. Ogni giorno le cellule sono state controllate al microscopio per escludere la presenza di contaminanti biologici come muffe o batteri che potessero inquinare le colonie. In media dopo i primi 5 giorni dal trattamento del campione è stato possibile osservare al microscopio le prime cellule adese al fondo della Petri.

Una volta giunte al 90% di confluenza le cellule sono state tripsinizzate, contate e riseminate fino al passaggio 8 (P8).

## TRIPSINIZZAZIONE E CONTA CELLULARE

Per procedere con la tripsinizzazione il DMEM di mantenimento presente nella Petri è eliminato, ed il monostrato cellulare presente sul fondo della Petri è lavato con 3 ml di PBS sterile a 28°C e quindi sono aggiunti 0,3ml di tripsina-EDTA 0,05% a 37°C.

La Petri con la soluzione di tripsina è posta ad incubare a 37°C per 5 minuti.

Dopo aver verificato che le cellule si siano staccate dalla superficie di coltura, la soluzione contenente le cellule è trasferita in una provetta sterile con 5 ml di DMEM di mantenimento a 28°C e la provetta è posta a centrifugare a 190xg per 10'.

Al termine della centrifugazione il surnatante è eliminato ed il pellet cellulare è risospeso in 1 ml di DMEM di mantenimento a 28°C.

Ad ogni passaggio viene fatta la conta delle cellule mediante camera di Burker. A tal fine sono utilizzati 10 µl di sospensione cellulare dopo la centrifugazione.

I 10 µl sono posti in 1 dei due quadranti della camera di Burker coperta con un vetrino copri-oggetto.

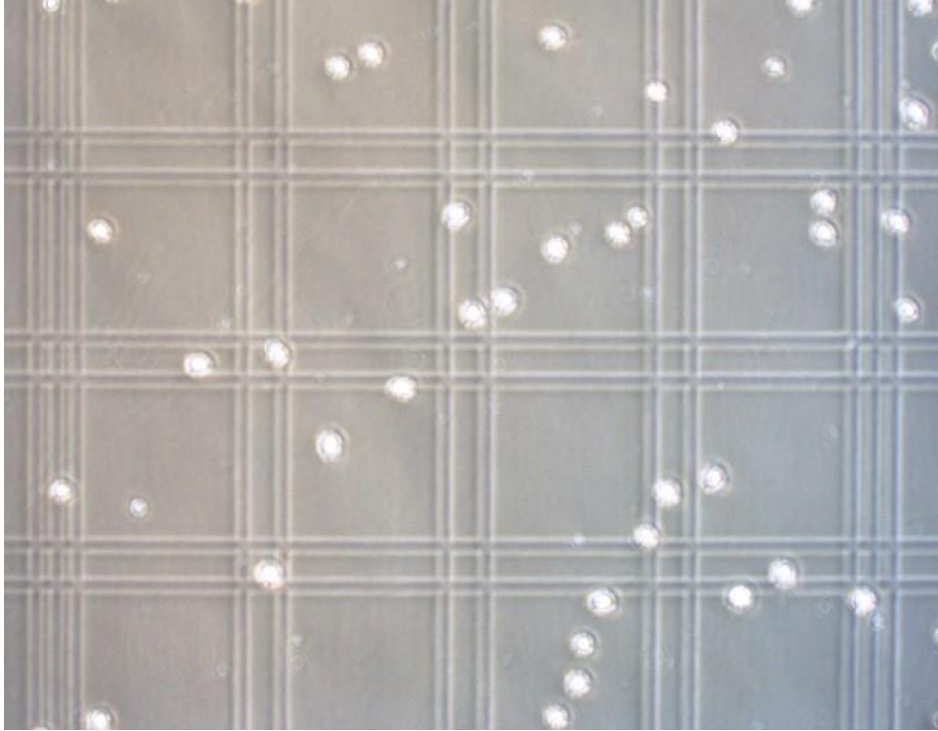


Figura 12 camera di Burkert con cellule. Ingrandimento 40x

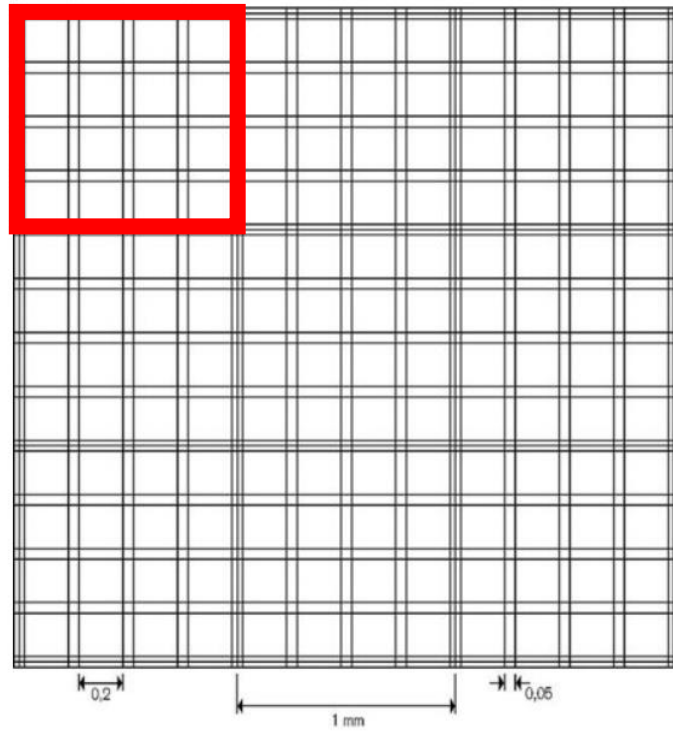


Figura 13 schema camera di Burkert

Al microscopio sono contate le cellule contenute in 4 quadrati con lato 1mm (evidenziato in rosso in Figura 13) scelti casualmente: sono contate tutte le cellule presenti all'interno del quadrato e quelle presenti solo su 2 dei 4 lati del quadrato.

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

Per calcolare il numero di cellule in sospensione per 1 ml di DMEM è stata applicata la seguente formula (dove  $n$  indica la media delle cellule contate precedentemente calcolata)

$$X = n \times 10.000$$

Dove X indica il numero totale di cellule risospese.

Una quota di 8000 cellule /cm<sup>2</sup> è ripiastrata in 2 fiaschette per colture cellulari da 25 cm<sup>2</sup> contenenti 5 ml di DMEM di mantenimento a 28°C.

Il volume di sospensione da piastrare è calcolato con la seguente proporzione:

$$X:1 = 200000 : Y.$$

Dove X indica il numero totale di cellule risospese, e Y il volume di sospensione da piastrare per avere 8000 cellule /cm<sup>2</sup> nella fiaschetta da 25 cm<sup>2</sup>.

Le cellule in eccesso sono conservate tramite congelamento.

Le fiaschette sono poste nuovamente in incubatore a 28 °C

Raggiunto il 90% di confluenza delle cellule nella fiaschetta la procedura è ripetuta.

## CONGELAMENTO CAMPIONI

Al termine della tripsinizzazione è possibile procedere al congelamento delle cellule non utilizzate per i successivi passaggi di espansione e la loro conservazione.

La sospensione di cellule in DMEM di mantenimento è centrifugata a 190xg per 10'. Dopo aver eliminato il sovrnatante, il pellet cellulare è risospeso in 1 ml di soluzione di congelamento, costituita da DMEM H.G., 50% FBS, penicillina/streptomicina (100U/ml, 100 ug/ml), amfotericina B (2,5 ug/ml), 10% DMSO.

La sospensione cellulare è trasferita in cryovials poste successivamente nel sistema di congelamento Mr. Frosty a -80°C. Dopo 24 h le cryovials sono trasferite in azoto liquido e lì conservate.

I campioni cellulari utilizzati per lo studio della espressione genica non sono stati risospesi in soluzione di congelamento, ma congelati tal quali dopo allontanamento del medium.



## PREPARAZIONE DEL PLASMA ARRICCHITO DI TROMBOCITI E LEUCOCITI

Il campione ematico raccolto in una provetta contenente sodio citrato è trattato in laboratorio entro 1 ora per procedere alla preparazione di plasma arricchito in trombociti e leucociti modificando il protocollo proposto da Di Ianni et al. nel 2015.

Il campione ematico è posto in una provetta sterile stratificandolo sopra una soluzione di Histopaque 1.077 preriscaldato alla temperatura di 28 °C (Morgan et al. 2009).

Il campione è trasferito evitando che si miscelasse con L' Histopaque 1.077. Il rapporto tra il volume di sangue e di Histopaque utilizzato è di 1:1.

La provetta è centrifugata a 150xg per 20'. Al termine è raccolta la frazione cellulare evidenziabile come anello bianco all'interfaccia con la soluzione di Histopaque.

È poi eseguito un lavaggio con PBS sterile: le cellule sono risospese in 5 ml di PBS sterile e centrifugati a 250 g per 10'.

Il pellet è conservato in congelatore (-20°C) e utilizzato successivamente per lo studio della espressione genica (vedi paragrafo "Valutazione dell'espressione genica").



*Figura 14 provetta post centrifugazione. Si nota l'anello bianco dei leucociti.*

## PROVE IN VITRO

### ADESIONE AL SUBSTRATO E CRESCITA IN VITRO

Al fine di valutare la capacità di espansione in vitro delle cellule isolate dal tessuto adiposo, i sono state valutate le curve di crescita dei 5 diversi campioni prelevati.

I parametri della crescita cellulare sono stati valutati dal passaggio 1 (P1) al passaggio 8 (P8): per ogni passaggio valutato, in due fiaschette da 25 cm<sup>2</sup> sono seminate 8000 cellule/cm<sup>2</sup>. Arrivate a semi-confluenza le cellule sono tripsinizzate e contate mediante camera di Burker. Dopo la conta, una aliquota di cellule pari a 8000 cellule / cm<sup>2</sup> è nuovamente seminata, ripetendo lo schema sino al P8.

La conta è stata valutata dal P1 e non dal P0 (campione trattato e seminato) in quanto è necessario avere un numero preciso di cellule di partenza per valutare la replicazione cellulare. Questo dato, questo è impossibile ottenerlo partendo dal tessuto adiposo digerito enzimaticamente in quanto le cellule ottenute rappresentano una popolazione eterogenea.

Per valutare la crescita cellulare sono stati calcolati i seguenti valori:

$$\text{Cell Doubling Number (CDn): } \ln (N_f/N_i)/\ln$$

$$\text{Doubling Time (DT): } CT/CDn$$

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

### CONTA DELLE UNITA' FORMANTI COLONIA (CFU)

Per valutare la capacità di adesione e replicazione cellulare sono stati contati i CFU (Colony-Forming Unit). La caratterizzazione della capacità di formare CFU è ritenuta essenziale nello studio delle MSC derivate da mammifero. La formazione di CFU si ritiene rispecchi le caratteristiche di staminalità della popolazione cellulare analizzata.

Per valutare la formazione di CFU sono utilizzate piastre a 6 pozzetti.

In 3 pozzetti è aggiunto DMEM contenente 100 cellule, negli altri 3 pozzetti è sono seminate 200 cellule. La piastra è mantenuta in incubatore a 28°C per 14 gg. Ogni 72 h è rinnovato il DMEM di mantenimento.

Al termine dei 14 gg è rimosso il DMEM di mantenimento all'interno dei pozzetti e le cellule cresciute sul fondo della piastra sono fissate con formalina.

24 h dopo i pozzetti sono colorati in modo da poter procedere alla conta dei CFU: A tal fine i pozzetti sono lavati con acqua distillata, sono poi aggiunti 2 ml di colorante May-Grunwald Giemsa (0,2 ml di Giemsa soluzione azur-eosina-blu di metilene /ml di acqua distillata) Dopo 12 minuti i pozzetti sono lavati con acqua distillata.

Una volta eseguita la colorazione è possibile effettuare la conta dei CFU al microscopio, definendo 1 CFU ogni raggruppamento di almeno 50 cellule (Secunda et al. 2015).

## ANALISI DELLA CAPACITA' DI DIFFERENZIAZIONE DELLE MSC

La capacità di differenziazione delle cellule derivate dal tessuto adiposo è stata valutata applicando protocolli già validati per cellule di mammifero (Neupane et al. 2008); (Secunda et al. 2015), non esistendo letteratura di riferimento per *Trachemys Scripta* o altri rettili. La prova è stata fatta su due preparati cellulari, derivati in particolare dall'animale siglato 04-02-22, al passaggio 5 e dall'animale 08-09-22 al passaggio 2.

Sono state valutate la capacità di differenziazione in senso adipocitico, osteogenico e condrogenico. Le prove di differenziazione sono state fatte in piastre da 6 pozzetti, seminando inizialmente 6000 cellule/cm<sup>2</sup>. Per ogni differenziazione è stata allestita una coltura di controllo. Sul fondo di ogni pozzetto è posizionato un vetrino per permettere la colorazione e valutazione microscopica delle cellule al termine del trattamento.

Il trattamento con i diversi metodi di induzione inizia quando le cellule arrivano a circa 70% di confluenza. Le colture di controllo sono mantenute in DMEM di mantenimento.

Differenziazione in senso adipogenico: al raggiungimento del 80%-90% di confluenza è aggiunto *il medium di differenziamento* composto da: DMEM H.G. con 10% di FBS antibiotici, antifungino e 1uM desametasone, 0,2 mM indometacina, 0,5 mM IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine), 1,7 uM insulina-10 ug/ml). Questo medium è mantenuto per 3 gg; al quarto giorno il medium è sostituito con *il medium di mantenimento* costituito da DMEM H.G. 10% FBS antibiotici, antifungino e 1,7 uM insulina-10 ug/ml), mantenuto per 1 gg. Si è quindi ripetuto il ciclo alterno tra i due medium sino ad arrivare al giorno 24, quando le cellule sono state fissate formalina e colorate con Red Oil O.

Differenziazione in senso condrogenico: la differenziazione è stata indotta utilizzando il kit *StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit* (GIBCO). Il medium viene rinnovato ogni 3 giorni, seguendo le istruzioni del produttore. Al termine del processo, le cellule sono fissate in formalina e colorate secondo la colorazione Alcian-Blue.

Differenziazione in senso osteogenico: al raggiungimento del 80-90% di confluenza, il DMEM di mantenimento è sostituito con un medium composto da: DMEM H.G. con 10% di FBS, antibiotici, antifungino e 100 nM desametasone, 10 mM glicerofosfato, 0,250 mM

acido ascorbico sostituito ogni 48 h fino al 31° gg. Al termine del trattamento le cellule sono fissate in metanolo freddo al 95% e colorate con Alizarin-Red.

Tutti i medium sono sempre portati alla temperatura di 28°C prima di essere messi a contatto con le cellule, la piastra è incubata a 28° C in atmosfera al 5% CO<sub>2</sub> per tutta la durata del trattamento.

## EFFETTI DELLA CRIOCONSERVAZIONE DELLE MSC

Per valutare la possibilità di crio-conservare le MSC di T. Scripta, un'aliquota delle cellule amplificate è stata congelata, conservata in azoto liquido per un periodo variabile e quindi è stata valutata la vitalità cellulare. Al termine del periodo di conservazione le cellule sono scongelate in bagno termostatico a 28 °C, risospese in 15 ml di soluzione fisiologica sterile e centrifugate a 190xg per 10'. Il pellet cellulare è stato risospeso in 1ml di DMEM di mantenimento.

Una volta risospese in DMEM di mantenimento è valutata la vitalità delle cellule tramite colorazione con Trypan Blue Solution, 0.4% in rapporto 1:1. A tal fine sono miscelati 10 µl di Trypan Blue con 10 µl di DMEM contenente le cellule in sospensione. Di questa nuova soluzione sono prelevati 10µl ed il numero di cellule totale e cellule vitali sono valutati in camera di Burker.

Le cellule che presentano una colorazione blu scura/nera sono considerate non vitali. Sono contate le cellule vitali e non vitali utilizzando la metodica precedentemente descritta nel paragrafo "Trypsinizzazione e conta".















In questo caso nella determinazione del numero di cellule è tenuta in considerazione la diluizione eseguita (1:1) con il colorante; quindi, è necessario aggiungere il fattore di correzione x 0,5 al momento del calcolo del numero delle cellule.

Le cellule una volta contate sono poste in piastre con DMEM di mantenimento sostituito ogni 48 h e ricontate dopo 4 gg per valutare la crescita.

## VALUTAZIONE DELLA ESPRESSIONE GENICA

Al fine di caratterizzare le cellule di *T. scripta* si è valutata la espressione di un panel di geni utilizzati per la caratterizzazione di MSC di mammifero. Pur non essendo presenti in letteratura lavori di caratterizzazione di MSC di rettile, si è ritenuto di utilizzare le indicazioni della ISCT (International Society for Cell Therapy) e della letteratura relativa a cellule derivate da mammifero.

### ESTRAZIONE RNA

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

Per l'estrazione dell'RNA totale si è utilizzato il kit *Macherey-Nagel NucleoSpin RNA Kit* (Grezzella et al. 2018).

Questo Kit permette di estrarre RNA a partire da tessuto o da coltura cellulare (minimo  $5 \times 10^5$  cellule).

L'RNA è stato estratto da cellule isolate a partire da tessuto adiposo e da leucociti/trombociti isolati tramite la procedura precedentemente descritta.

Per entrambi i campioni è stata eseguita la procedura indicata dal produttore.

Figura 15 procedura di estrazione RNA con il kit Macherey-Nagel NucleoSpin RNA Kit.

## RETRO TRASCRIZIONE

Al termine della procedura, l'RNA totale estratto è quantificato mediante "GeneQuant-pro RNA/DNA Calculator" (Biochrom).

Il macchinario fornisce sia il risultato quantitativo di RNA estratto espresso in ng/ $\mu$ l, sia un indice di purezza del campione espresso come rapporto tra le due letture a lunghezza d'onda 260nm e 280nm. Il rapporto ideale deve rimanere compreso tra 1,8 e 2,2.

Dopo la quantificazione, 2 $\mu$ g di RNA sono retrotrascritti mediante kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems™) seguendo le istruzioni del produttore

Il ciclo utilizzato per la retrotrascrizione è indicato in Tabella 2

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

Tabella 2 Ciclo retrotrascrizione



## PCR

Primer utilizzati:

GENE		CODICE	PESO	Tm
<b>CD44</b>	GCTTCTACAGCCACCAGTTCTA CCACCCATCTTCTTGTCGGA	<u>XM_034769691.1</u> Cd44	263	59.77/59.39
<b>CD73</b>	CTTGGGAAATTTGATTTGTGATGCC GTAGACCACATGAATGCCTGC	<u>XM_034766097.1</u> NT5E transcript variant X2	297	59.88/59.33
<b>CD90</b>	GAACAGCCTCAAGACCCGAT CCTTCCCTTCACAGGGACAC	<u>XM_034754732.1</u> THY1	282	59.75/59.96
<b>CD105</b>	GTGCACAGACGACTCCATTG CACTCGAACGGCACCTCAA	<u>XM_034793487.1</u> Endoglin	243	59.21/60.30
<b>CD31</b>	TGAGAAACTGCCATCTGGACC CTATTGGCAATGAGGAGGGGG	<u>XM_034789735.1</u> PECAM1transcript variant X1(comp. X4,5,9,10)	278	60.00/60.20
<b>CD34</b>	GCAGAGTATTGAACGCCACC TCTGAGCCCTCTGTTGAGA	<u>XM_034770555.1</u> CD34 transcript variant X1	257	59.27/59.88
<b>CD45</b>	TTACGTGTCCGCTTTACGGG AGGAGACACCCTCACCTGTT	<u>XM_034780075.1</u> PTPRC	269	60.39/60.10
<b>HLA-DRA</b>	CAGGGCGACTTCTACGACTG CCCCGCGTTTATAAGGGGC	<u>XM_034789225.1</u> HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain-like (LOC117886999), transcript variant X1	230	60.18/60.90
<b>GAPDH</b>	GAATGGGAAGCTCACTGGAA CCAAACTCATTGTCATACCAGG	<u>XM_034787619.1</u>	285	57.50/57.03

Tabella 3 Primer PCR

Tutti i primer sono stati generati attraverso la piattaforma NCBI Primer-BLAST. Questo strumento è offerto dal National Center for Biotechnology Information (NCBI) e consente di progettare primer specifici per sequenze di DNA conosciute (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Le sequenze utilizzate, descritte dallo specifico NCBI Reference Sequence code indicato in tabella, sono derivate dal genoma di *Trachemys scripta* che si trova completamente sequenziato sul sito.

I primer progettati sono stati prodotti da Microgen Europe.

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

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

I geni CD 31, CD 34, CD 45, HLA-DRA sono marker negativi delle MSC. Questi geni sono espressi dai leucociti. La espressione di questo set di geni nelle cellule bianche del sangue è stata valutata per validare i primers utilizzati nella RT-PCR (Sun et al. 2012).

La master mix per la PCR è stata allestita in un volume totale di 50  $\mu$ l come indicato in tabella 4:

Cdna	2 $\mu$ l
Primer	2,5 $\mu$ l
DnTPs	1 $\mu$ l
TaqDNApolimerasi	0,2 $\mu$ l
Buffer 5%	10 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O DEPC	34,5 $\mu$ l

Tabella 4 Master Mix PCR

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

Settings	Step 1	Step 2	Step3	Step 4	Step 5	Step 6
Temperature	94°C	94°C	54°C	72°C	Repet 30 times from 2 to 4	72°C
Time	2'	45''	45''	1'		10'

Tabella 5 ciclo PCR

## PREPARAZIONE GEL AGAROSIO E CORSA ELETTROFORETICA

Prima del sequenziamento, i risultati della PCR sono stati controllati, valutando la presenza degli ampliconi attesi.

Preparazione gel:

per la preparazione del gel sono preparati 70 ml di soluzione TAE (Tampone Tris-Acetato-EDTA) all' 1,5% p/v di agarosio riscaldando la soluzione in microonde. Alla soluzione sono uniti 3,5  $\mu$ l di bromuro di etidio come tracciante del DNA.

Preparazione campioni:

Una aliquota della reazione di PCR è utilizzata per l'analisi elettroforetica, miscelando 20 $\mu$ l di campione e 4 $\mu$ l di loading solution 6x (Thermo scientific). In ogni pozzetto del gel sono caricati 20 $\mu$ l di questa soluzione; le dimensioni degli ampliconi sono state determinate utilizzando DNA ladder 1000bp-100bp come markers. (Thermoscientific).

Per la corsa elettroforetica i campioni sono fatti correre a un'intensità 25 milliampere per i primi 60 minuti, e a 50 milliampere sino al termine della corsa (circa 60 minuti).

La lettura è eseguita utilizzando un trans-illuminatore a luce ultravioletta.

## SEQUENZIAMENTO

Dopo aver eseguito il controllo sulla positività della espressione dei singoli geni, 30 microlitri non utilizzati per la corsa sono inviati al laboratorio per il sequenziamento eseguito da MacroGen Europe tramite il servizio *sangers sequency*.

I risultati del sequenziamento sono stati validati confrontando la sequenza riportata con le sequenze specifiche utilizzate per la scelta dei primers. In caso di discrepanze tra le sequenze attese e quelle ottenute è stata fatta la valutazione manuale dei singoli tracciati cromatografici derivati dal sequenziamento.

## DATI E ANALISI STATISTICA

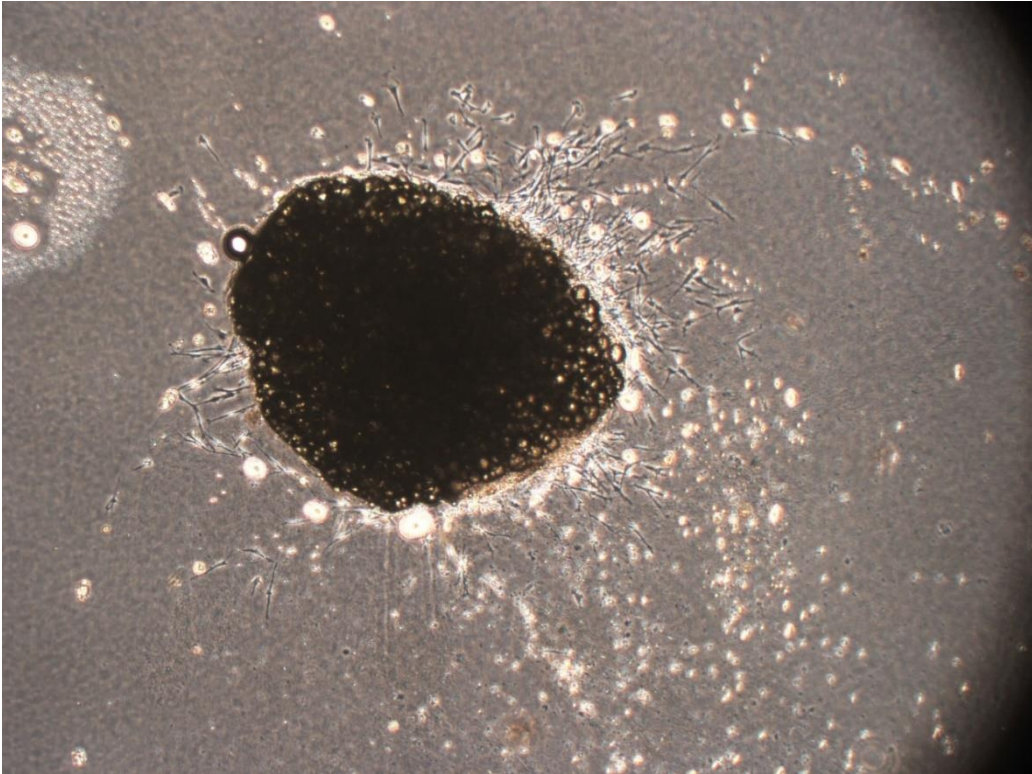
Le differenze statistiche negli esperimenti sono state calcolate mediante ANOVA, utilizzando il Software *StatPlusLE* (<https://www.analystsoft.com/it/products/statplus/>). In presenza di una differenza significativa ( $p < 0,05$ ) le medie sono state sottoposte ai test di Scheffè e Bonferroni per confronti multipli.

## **RISULTATI**

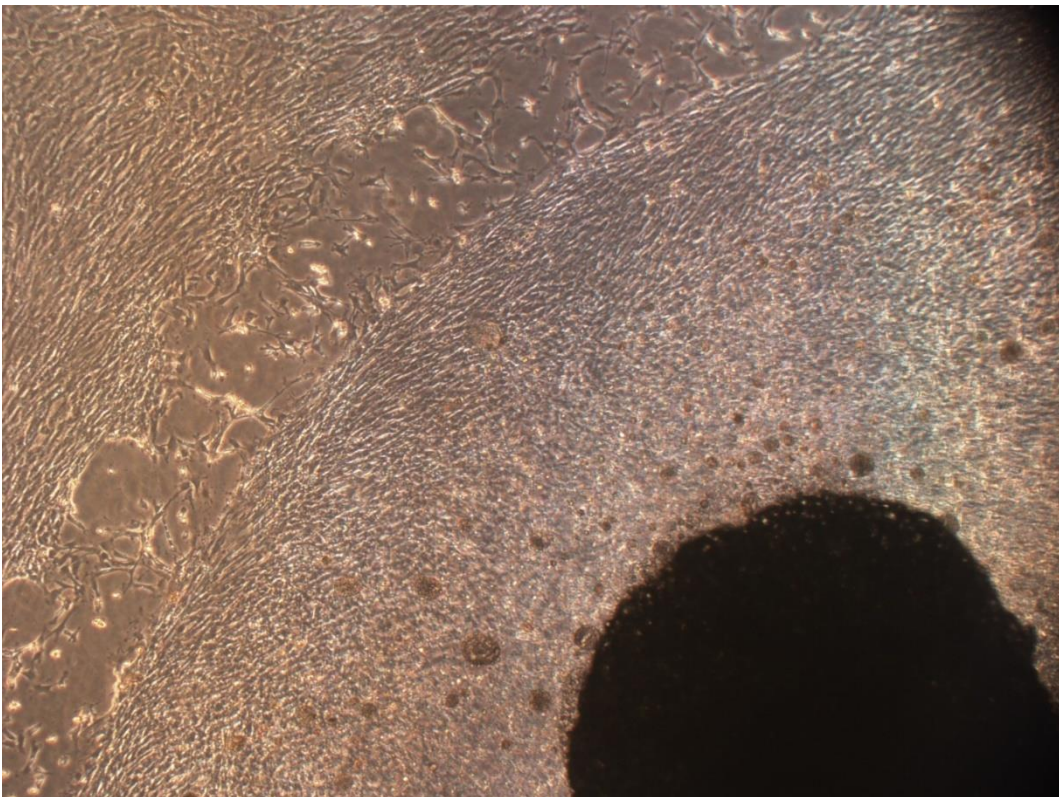
### **CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA DELLE COLTURE CELLULARI**

Dopo alcuni giorni (5-7 giorni circa) dalla processazione del tessuto adiposo e dalla semina delle cellule dissociate o dei frammenti di tessuto è stato possibile evidenziare la presenza di cellule adese al fondo della piastra in tutti i campioni trattati. Le cellule appaiono allungate, con una morfologia simile a quella dei fibroblasti. La morfologia è simile a quella delle MSC dei mammiferi ed è mantenuta costante per tutti i passaggi valutati (fino a P8).

Non sono state evidenziate differenze tra le due metodiche di processazione del campione (frammentazione o digestione del tessuto) riguardo alla morfologia delle singole cellule anche se la evoluzione delle colture segue una diversa evoluzione. Nelle colture contenenti i frammenti di tessuto, dopo circa 5-6 giorni appaiono le prime cellule migrate dal frammento (figura 16) che poi si diffondono nell'ambiente circostante andando gradualmente ad occupare la superficie disponibile. Le cellule hanno una evidente tendenza a aderire al gel ottenuto dalla coagulazione del plasma (figura 17). Le cellule derivate dalla dissociazione crescono invece formando gruppi isolati (CFU) che tendono successivamente a confluire. Anche questo comportamento è simile a quello osservato per cellule di mammifero.



*Figura 16: dopo 6 giorni dal trattamento del campione si notano le prima cellule che si moltiplicano a partire dal frammento di grasso centrale. Ingrandimento 40x*

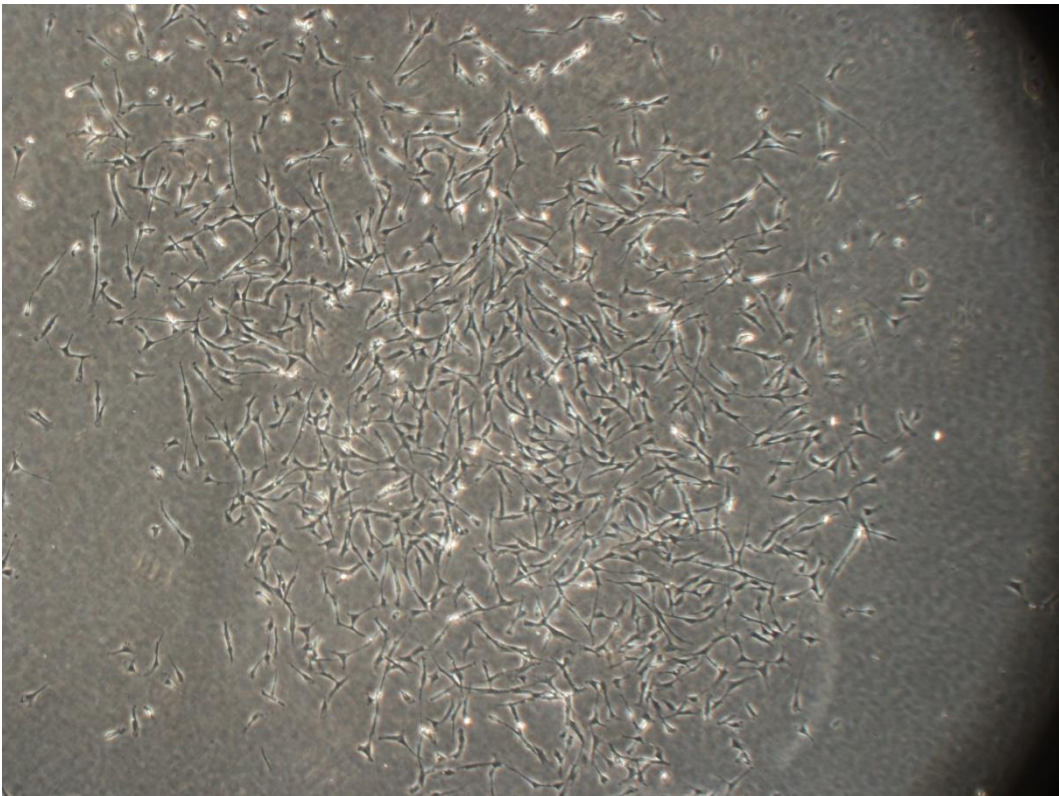


*Figura 17: Dopo 18 giorni dal trattamento del campione si notano le cellule che si dispongono fino al margine della goccia di plasma che è stata utilizzata per fissare il frammento alla piastra. A questo punto si procede con la tripsinizzazione. Ingrandimento 40x*





*Figura 18: cellule 6 giorni post semina del campione di tessuto adiposo digerito. Ingrandimento 100x.*



*Figura 19: cellule dopo 15 giorni dalla semina del campione di tessuto adiposo digerito. Ingrandimento 40x.*



## CURVE DI CRESCITA

Al fine di valutare la cinetica della crescita cellulare e verificarne il comportamento nel tempo, in seguito ai successivi passaggi in coltura, sono state valutate le curve di crescita di 5 campioni sino al passaggio 8. Ad ogni passaggio è stato valutato il cell doubling number (CDN), il cell doubling number nelle 24 ore (CDN/24h), il cell doubling number totale (CDN tot), il doubling time (DT).

Il cell doubling number (CDN) indica il numero di duplicazioni cellulari avvenuto in un determinato passaggio di coltura; il CDN/24h indica il numero di duplicazioni nelle 24 ore; CDNtot indica la somma delle repliche cellulari nei diversi passaggi; il DT è una misura del tempo necessario per avere il raddoppio della popolazione cellulare.

Le tabelle 6-10, riportano i dati relativi alle popolazioni cellulari isolate dai 5 animali arruolati nello studio. Le figure 20 e 21 riportano i CDN/24h e i DT medi ottenuti per i cinque animali dal P2 al P8. È evidente una differenza di comportamento tra i diversi campioni, come in parte atteso essendo animali di età e condizioni di vita differente. Tali differenze sono comunque riportate anche per MSC di mammifero. L'analisi statistica delle curve di crescita non evidenzia differenze per i valori di CDN/24h e DT ( $p > 0,05$ ) tra i diversi passaggi indicando che almeno sino al P8 non si osserva un invecchiamento evidente almeno in relazione alla capacità di replicazione cellulare.

## CAMPIONE 28-01

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

Tabella 6 valori curva di crescita del campione 28-01

## CAMPIONE 04-02

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

Tabella 7 valori curva di crescita del campione 04-02

## CAMPIONE 11-02

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

Tabella 8 valori curva di crescita del campione 11-02

## CAMPIONE 13-05

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

Tabella 9 valori curva di crescita del campione 13-05

## CAMPIONE 08-09

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

Tabella 10 valori curva di crescita del campione 08-09

Sono stati successivamente confrontati i valori medi dei CDn/24h e dei DT dei vari passaggi a partire da P2 (tabelle 11 e 12)

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

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

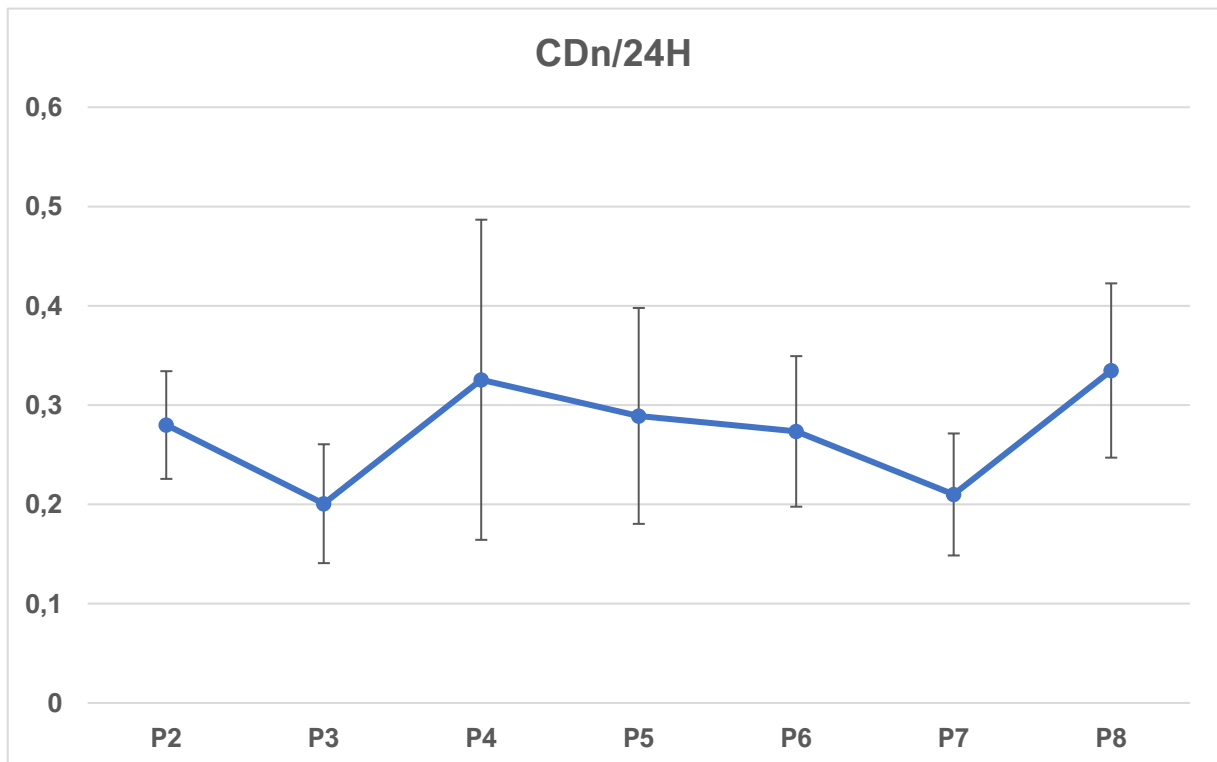


Figura 20 CDn/24h medi +/- deviazione standard.

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

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

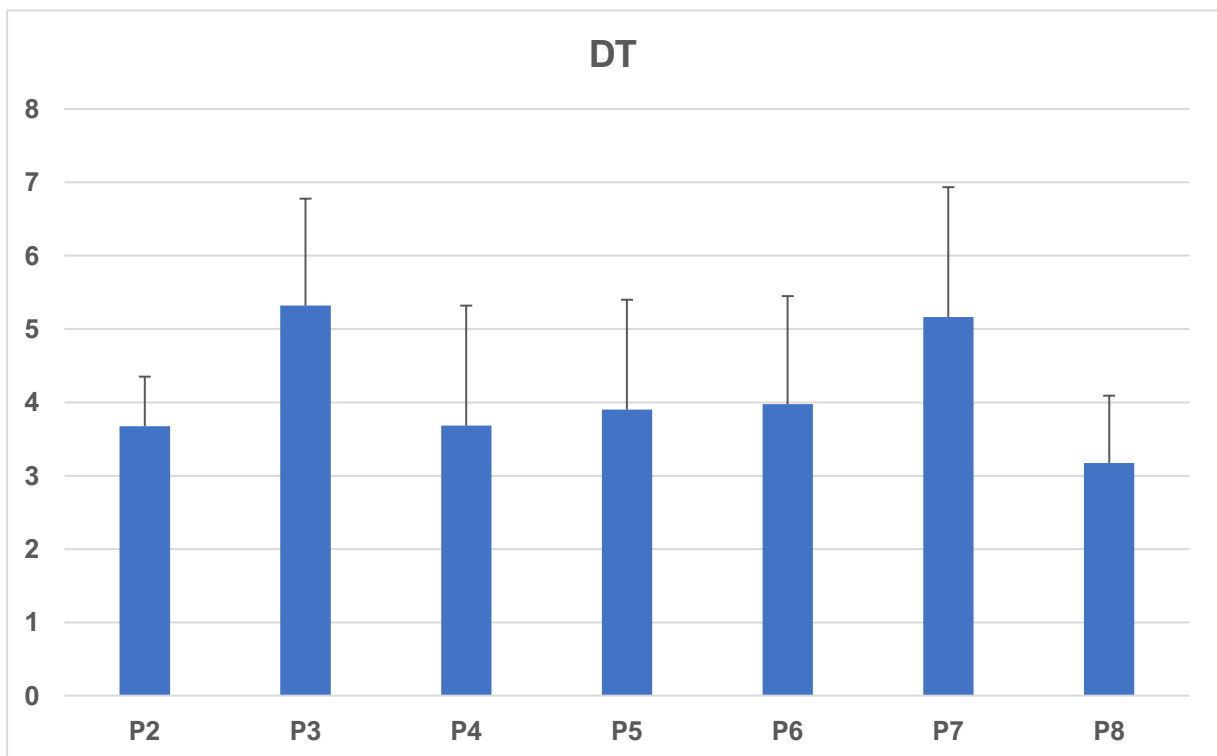


Figura 21 DT medi con deviazione standard.

## CFU

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

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

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

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

## SOPPRAVVIVENZA AL CONGELAMENTO

In due campioni è stata valutata la percentuale di sopravvivenza delle cellule in seguito al loro congelamento ed al mantenimento in azoto liquido, il metodo standard di crioconservazione e a -80 °C.

I campioni sono stati scongelati dopo 3,5 mesi. I valori riportati in tabella 14 indicano i valori percentuali di mortalità media e la deviazione standard.

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

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

## **VALUTAZIONE DELLA CAPACITA' DIFFERENZIATIVA**

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

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

Si possono notare nella Figura 22A la presenza di raccolte intracellulari di materiale lipidico, segno dell'avvenuta differenziazione in senso adipogenico.

Nella Fig 23A e 23A' si notano la presenza di accumuli di matrice cartilaginea prodotta dalle MSC differenziate in senso condrogenico.

In Fig 24A e 24A' si notano depositi di matrice ossea, prodotti dalle MSC, segno della differenziazione in senso osteogenico.

## DIFFERENZIAMENTO IN SENSO ADIPOCITICO

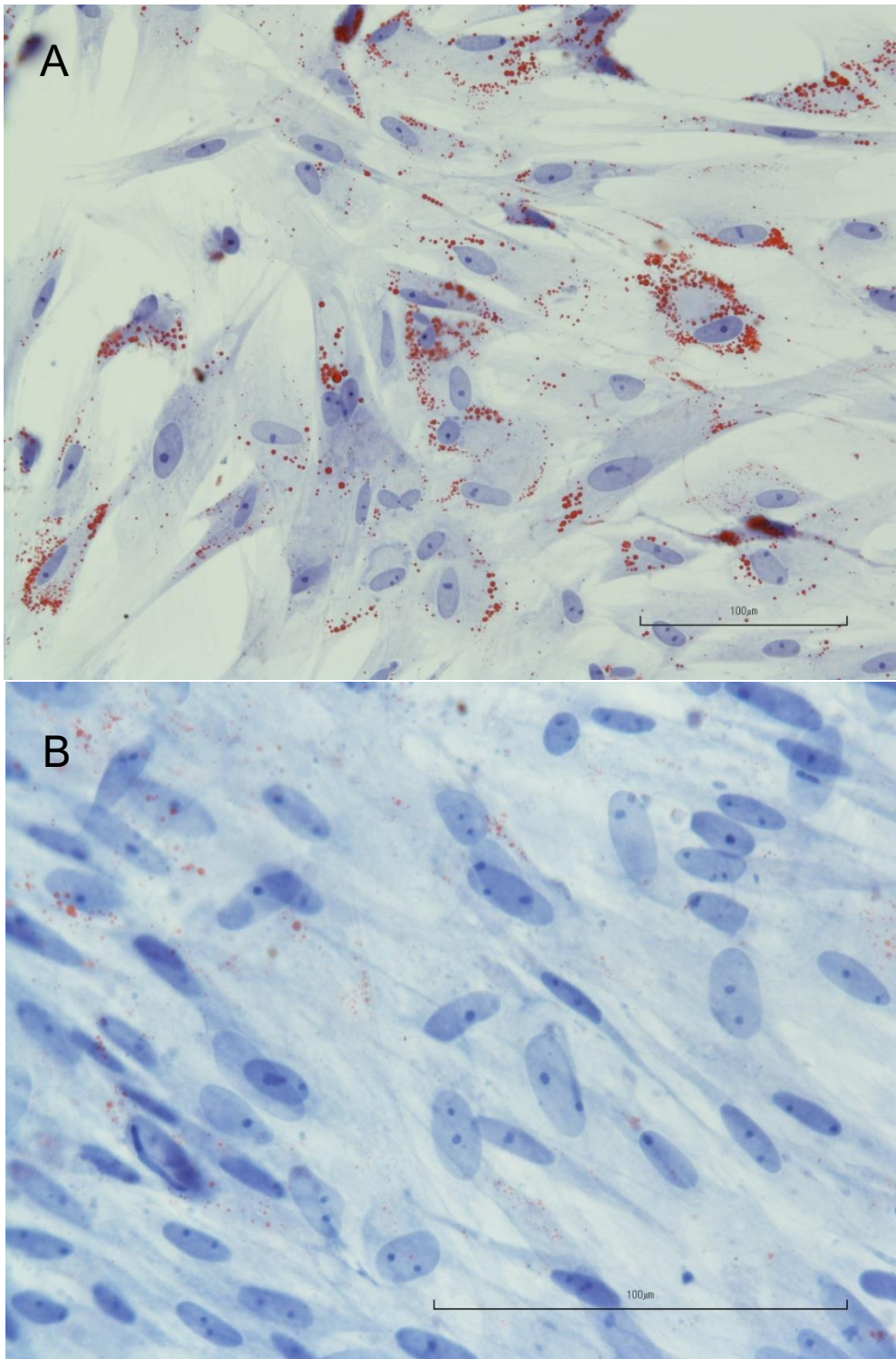


Figura 22 nell'immagine A si notano le cellule differenziate in senso adipocitico contenenti vacuoli lipidici colorati in rosso. Nell'immagine B il controllo. Ingrandimento 400x, colorazione red Oil O.



## DIFFERENZIAMENTO IN SENSO CONDROGENICO

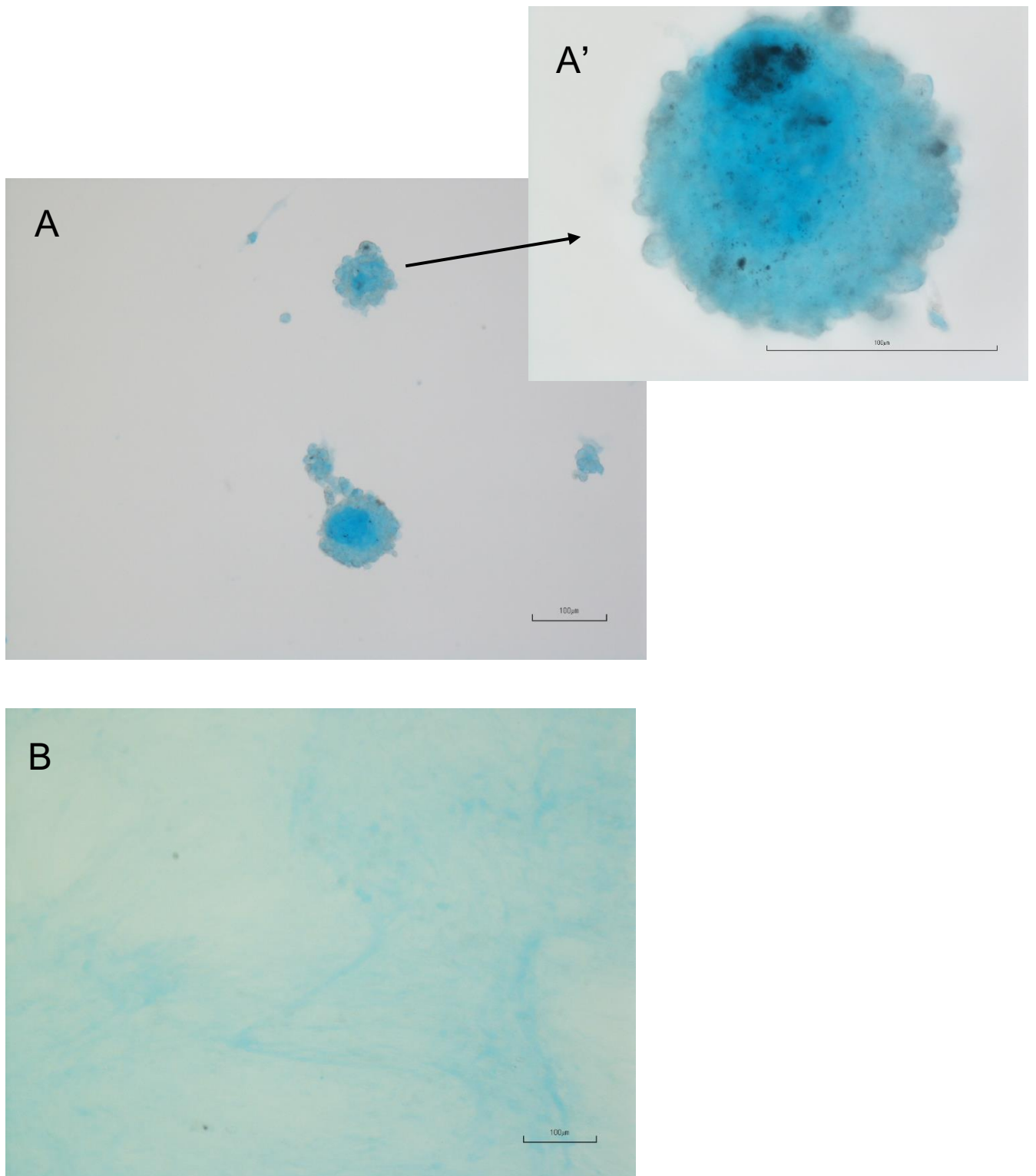


Figura 23 nell'immagine A si notano in azzurro i depositi di matrice extracellulare segno dell'avvenuta differenziazione in senso condrogenico. A' un ingrandimento a 400x del deposito. B il controllo. Ingrandimento 100x, colorazione Alcian Blu.

## DIFFERENZIAMENTO IN SENSO OSTEOGENICO

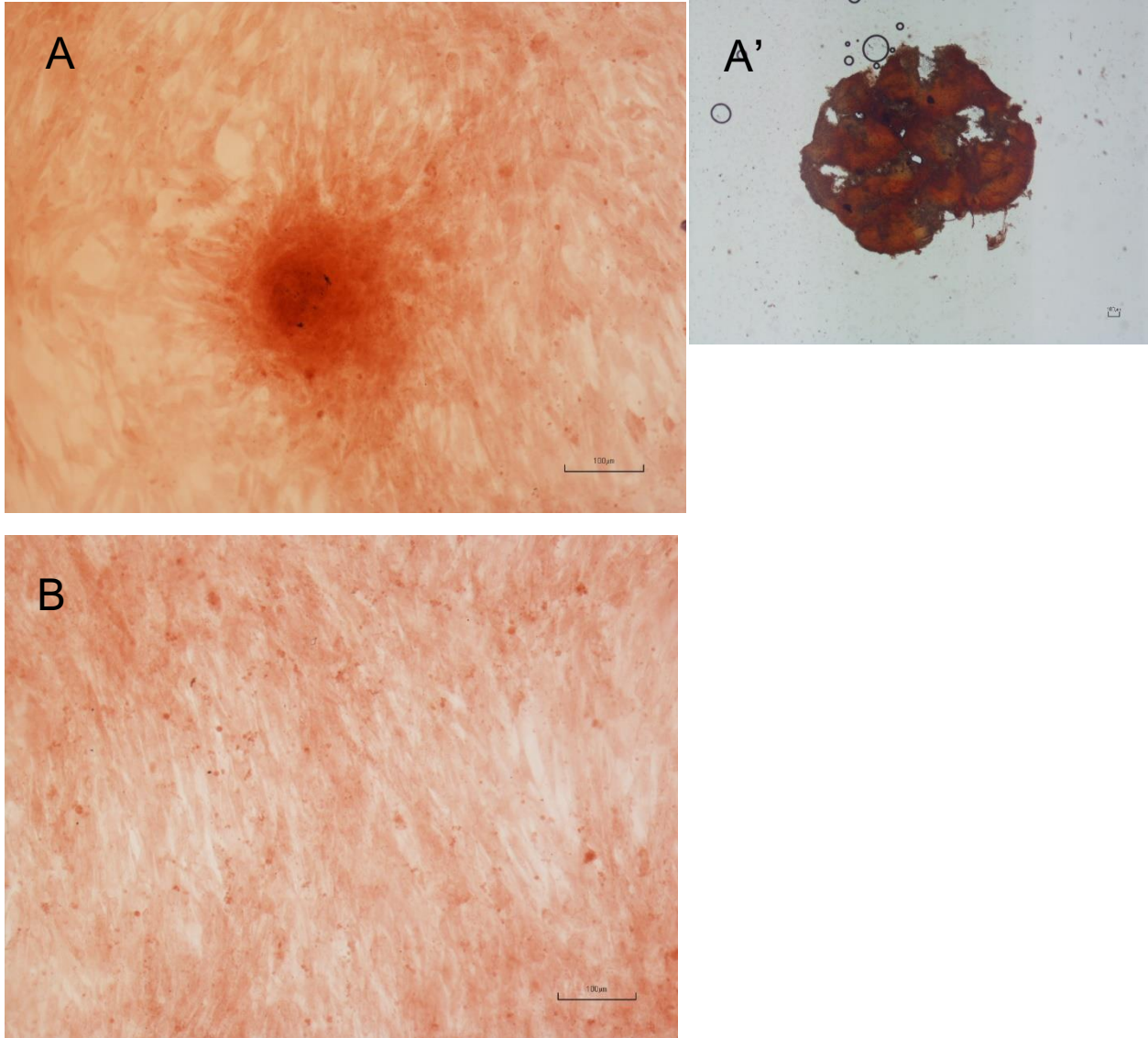


Figura 24 nell'immagine A si notano i depositi di matrice osteoide in rosso segno dell'avvenuta differenziazione in senso osteogenico. A' un'altra porzione del vetrino con depositi a ingrandimento 20x. B immagine del controllo. Ingrandimento 100x, colorazione Alizarin Red.

## VALUTAZIONE DEL FENOTIPO CELLULARE MEDIANTE RT-PCR

L' identificazione di popolazioni cellulari di MSC nei mammiferi si basa anche sulla valutazione della espressione di un panel di markers genici identificati dalla International Society for Cellular Therapy (ISCT). Vista la mancanza di anticorpi specifici per cellule di *T. scripta*, di norma utilizzati per questo tipo di analisi nelle colture di mammifero, l'espressione genica è stata analizzata mediante RT-PCR, generando per i diversi markers utilizzati primers specifici, come indicato nella sezione Materiali e Metodi. È stata eseguita la RT-PCR su 4 diversi campioni ai passaggi tra il P4 e il P8 di cellule e su 3 campioni di leucociti isolati come controllo positivo dei marker negativi delle MSC. Gli ampliconi ottenuti sono stati sequenziati per confermare la corrispondenza con la sequenza genica descritta in banca dati. Per i geni non espressi nelle colture di MSC, l'espressione è stata valutata su popolazioni di cellule bianche del sangue in cui la espressione dovrebbe essere presente.

Le cellule derivate dal tessuto adiposo ed espanse in coltura sono risultate positive a CD90, CD105, CD44 e CD73. Non si è osservata espressione di CD34, mentre l'espressione di HLA-DRA è risultata molto debole. L' espressione di CD34 e HLA-DRA è stata invece osservata in cellule bianche del sangue, permettendo di validare i primers utilizzati. Per CD45 invece non è stato possibile osservare l'espressione in MSC e in cellule bianche del sangue, indicando possibili problemi nel funzionamento dei primers utilizzati. Per CD31 è stata osservata una debole espressione nelle MSC, ma il sequenziamento non ha dimostrato corrispondenza con le sequenze riportate in banca dati.

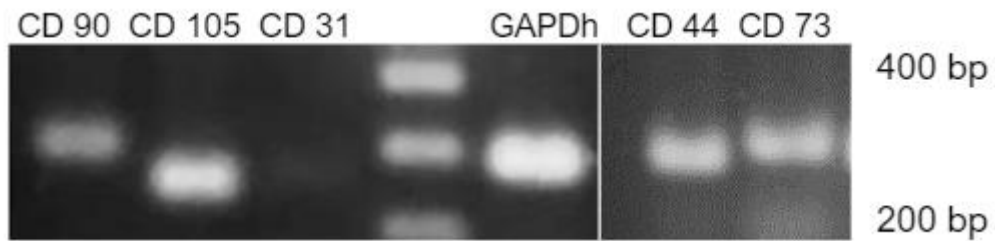
RT-PCR MSC DI *T. SCRIPTA*

Figura 25 caratterizzazione fenotipica delle MSC di *T. scripta*.

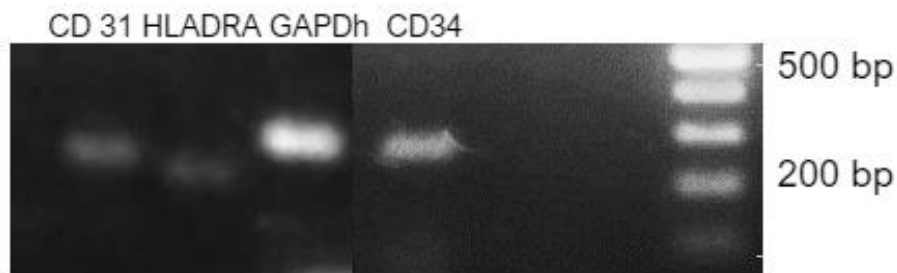
RT-PCR LEUCOCITI DI *T. SCRIPTA*

Figura 26 caratterizzazione fenotipica dei leucociti di *T. scripta*

Come precedentemente descritto, non essendo descritti in letteratura coppie di primers validate per lo studio della espressione dei geni valutati, gli ampliconi ottenuti sono stati sottoposti a sequenziamento di entrambi i filamenti per confermarne la sequenza e validare la corrispondenza con le sequenze riportate in banca dati (vedi materiali e metodi). Dopo analisi delle sequenze e dei tracciati cromatografici, è stata costruita una tabella (tabella 15) che riporta le percentuali corrispondenza del campione sequenziato rispetto alla sequenza del gene riportata in banca dati.

GENE		CODICE	PESO	% DI CORRISPONDENZA
<b>CD44</b>	F- GCTTCTACAGCCACCAGTTCTA R- CCACCCATCTTCTTGTGCGGA	<u>XM_034769691.1</u> Cd44	263	99,0%
<b>CD73</b>	F- CTTGGGAAATTTGATTTGTGATGCC R- GTAGACCACATGAATGCCTGC	<u>XM_034766097.1</u> NT5E transcript variant X2	297	99,0%
<b>CD90</b>	F- GAACAGCCTCAAGACCCGAT R- CCTTCCCTTCACAGGGACAC	<u>XM_034754732.1</u> THY1	282	98,0%
<b>CD105</b>	F- GTGCACAGACGACTCCATTG R- CACTCGAACGGCACCTCAA	<u>XM_034793487.1</u> Endoglin	243	98,4%
<b>CD31</b>	F- TGAGAAACTGCCATCTGGACC R- CTATTGGCAATGAGGAGGGGG	<u>XM_034789735.1</u> PECAM1transcrip t variant X1(comp. X4,5,9,10)	278	NON CORRISPONDENTE
<b>CD34</b>	F- GCAGAGTATTGAACGCCACC R- TCTGAGCCCCTCTGTTGAGA	<u>XM_034770555.1</u> CD34 transcript variant X1	257	100%
<b>CD45</b>	F- TTACGTGTCCGCTTTACGGG R- AGGAGACACCCTCACCTGTT	<u>XM_034780075.1</u> PTPRC	269	NON ISOLATO
<b>HLA-DRA</b>	F- CAGGGCGACTTCTACGACTG R- CCCCgcgTTTATAAGGGGC	<u>XM_034789225.1</u> HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain-like (LOC117886999), transcript variant X1	230	98,2%
<b>GAPDH</b>	F- GAATGGGAAGCTCACTGGAA R- CCAAACCTCATTGTCATACCAGG	<u>XM_034787619.1</u>	285	98,0%

Tabella 15 percentuale di corrispondenza delle sequenze ottenute tramite RT-PCR rispetto alla sequenza riportata in banca dati

## DISCUSSIONE

Negli ultimi anni lo studio delle Cellule Stromali Mesenchimali si è molto sviluppato sia in medicina umana che veterinaria. Poco è invece presente in letteratura su culture cellulari di rettile in generale, e nulla, in particolare, riguardo le MSC.

La maggior parte degli studi su culture cellulari di cheloni rientrano nell'ambito della tossicologia e si concentrano in particolare su culture di fibroblasti di tartarughe marine (Finlayson, Madden Hof, and van de Merwe 2020).

Nel presente lavoro di tesi, è stata valutata la possibilità di isolare MSC di rettile, utilizzando come modello *Trachemys scripta*. La scelta della *T.scripta* come specie oggetto dello studio è legata alla facilità di reperimento di questi animali in Italia e nella necessità di sterilizzarli chirurgicamente come dettato dal “Piano nazionale per la gestione della testuggine palustre americana (*Trachemys scripta*)”. Da questo la possibilità di avere facilmente accesso al tessuto adiposo della fossa del fianco senza arrecare ulteriori disagi all'animale rispetto a quelli già considerati per l'intervento di sterilizzazione previsto. Queste caratteristiche rendono *T.scripta* un modello ideale per lo studio, nonostante in letteratura non sia stato possibile trovare nessuno studio su colture cellulari a partire da questa specie. L'obiettivo del progetto è quindi utilizzare *T.scripta* come modello per la messa a punto di protocolli di raccolta, isolamento, espansione e caratterizzazione di MSC, per poter estendere poi le conoscenze ottenute ad altre specie di maggior interesse.

In letteratura è stato recentemente descritto uno studio sull'isolamento e caratterizzazione di MSC isolate a partire dal midollo osseo da *Xenopus laevis* (Otsuka-Yamaguchi et al. 2021). Nella *T.scripta* il prelievo di midollo osseo è una procedura molto invasiva che si esegue prelevando dal carapace una minima quantità di campione sufficiente appena per eseguire analisi cliniche. Si è quindi deciso di non utilizzare questa metodica per l'isolamento delle MSC perché non avrebbe fornito una quantità sufficiente di materiale da cui isolare le cellule e avrebbe causato inutili sofferenze agli animali. Inoltre, questo approccio non avrebbe possibilità di trovare un'applicazione terapeutica, al contrario dell'isolamento di cellule da tessuto adiposo, più facilmente isolabile in un contesto clinico.

In questo studio quindi si è scelto di isolare le MSC a partire da tessuto adiposo raccolto durante le procedure di sterilizzazione degli animali e processato sia tramite la digestione enzimatica del tessuto che tramite la sua frammentazione. Entrambi i metodi sono indicati come validi in letteratura nell'isolamento delle MSC di mammifero (Neupane et al. 2008)(Araña et al. 2013)(Ghorbani, Jalali, and Varedi 2014).

Viste le dimensioni dei soggetti non è mai stato possibile ottenere campioni di tessuto adiposo di peso maggiore di 1 grammo circa. Queste esigue quantità di campione portano ad un numero di cellule ottenute tramite digestione molto basso, che impiega molto tempo ad aumentare ed arrivare a valori di significato terapeutico. L'utilizzo di frammenti di tessuto piastrati in plasma gelificato, anche in spessore 3D, potrebbe ridurre i tempi di replicazione. Questo si rivelerebbe utile soprattutto in ambito terapeutico in cui si ha necessità di un numero elevato di cellule in poco tempo per poter affrontare adeguatamente le richieste della specifica terapia.

Con entrambe le metodiche è stato possibile isolare una popolazione di cellule che replicano le caratteristiche delle MSC di mammifero in modo efficace: è quindi possibile indicare entrambe le procedure come protocolli validi per l'isolamento di MSC di *T.scripta*. Sono certamente necessari ulteriori studi per valutare la metodica che permette la migliore resa possibile in termini di numero di cellule ottenute e tempi necessari.

La coltura di cellule di rettili e cheloni nel caso specifico presenta delle problematiche legate alle specificità biologiche di questi animali. Inoltre, come già indicato, i riferimenti bibliografici esistenti sono minimi e relativi a specie anche assai diverse tra di loro.

La scelta delle condizioni di coltura cellulare è stata eseguita valutando la poca bibliografia presente sulla coltura di altri tipi cellulari di tartaruga e sulla coltura delle MSC da midollo osseo di *Xenopus laevis*, (Otsuka-Yamaguchi et al. 2021)(Webb et al. 2014).

A differenza dei mammiferi i rettili sono animali eterotermi, presentano quindi una temperatura variabile in base alla temperatura esterna, e questo si ripercuote anche sulla scelta della temperatura ottimale delle colture cellulari.

In letteratura sono indicate per la coltura di cellule di tartaruga marina temperature comprese tra i 26 °C e i 30 °C (Finlayson, Madden Hof, and van de Merwe 2020).

Considerando la POTZ (Preferred Optimal temperature Zone) di *T.scripta* è stato scelto di incubare le cellule ad una temperatura di 28 °C.

Poche indicazioni sono presenti in letteratura anche sui medium utilizzati per la coltura di cellule di rettile che potrebbero presentare delle differenze metaboliche rispetto alle cellule di mammifero.

In uno lavoro di Webb et al. finalizzato a identificare protocolli di colture cellulari al fine di isolare ed amplificare i fibroblasti di *Caretta Caretta*, i medium di coltura valutati sono stati RPMI 1640, MEM e DMEM, ma nessuno di questi ha mostrato significative differenze nella crescita cellulare. In questo studio è stato quindi scelto di utilizzare il DMEM come medium di coltura in quanto si tratta di una tipologia largamente utilizzata nella coltura di MSC di mammifero e già utilizzato nella coltura di cellule di *Caretta Caretta* (Webb et al. 2014).

Il medium utilizzato per la coltura contiene un supplemento del 20% di FBS. E' stata scelta questa concentrazione seguendo lo studio dell'isolamento di MSC da *Xenopus*, nel quale le MSC sono coltivate appunto in un medium con il 20% di FBS (Otsuka-Yamaguchi et al. 2021).

Le metodologie per la tripsinizzazione dei campioni, per l'amplificazione delle cellule, così come quelle utilizzate per la conta dei CFU e per la crioconservazione delle MSC sono sostanzialmente quelle utilizzate per la coltura di MSC di mammifero e in questo studio si sono rivelate efficaci anche con le MSC di *T.scripta* (Mushahary et al. 2018) (Neupane et al. 2008) (Araña et al. 2013).

Per la caratterizzazione delle colture cellulari ottenute da tessuto adiposo si sono utilizzati sostanzialmente gli approcci descritti dalla letteratura relativa ai mammiferi (Dominici et al. 2006), tenendo conto di alcune problematiche sperimentali che derivano dalla particolarità della specie studiata. Ad esempio, la caratterizzazione fenotipica delle MSC di mammifero avviene mediante citofluorimetria a flusso, tecnica che richiede la disponibilità di anticorpi specifici per dimostrare la presenza o la assenza di proteine specifiche sulla superficie cellulare. Nel caso di *T. scripta*, come dei rettili in generale, questi anticorpi non sono disponibili e si è quindi valutata la espressione dei geni mediante RT-PCR, associata al sequenziamento degli ampliconi ottenuti per confermarne la identità. Anche questo approccio comunque presenta delle difficoltà in quanto le sequenze geniche di *T.scripta* presenti nelle banche dati sono sequenze genomiche annotate e non confermate sperimentalmente, come più sotto discusso.



In sostanza, per le presunte popolazioni di MSC si sono studiate: morfologia cellulare, curva di crescita dal passaggio cellulare 1 (P1) al passaggio 8 (P8); formazione di CFU; capacità di differenziazione in seguito a specifiche stimolazioni, valutazione dell'espressione genica dei markers indicati da IPSC. Inoltre, è stata valutata la possibilità di crioconservare le cellule.

Per quanto riguarda la caratterizzazione della capacità di crescita delle MSC di *T.scripta*, le curve cellulari non hanno presentato delle variazioni significative nella capacità replicativa delle cellule dal P1 al P8: le cellule mantengono infatti per tutti passaggi valutati cell doubling number (CDn) e tempo di duplicazione(DT) che non presentano differenze statisticamente significative tra loro.

I CDn e DT medi dei singoli passaggi denotano una velocità di replicazione più bassa rispetto alle MSC di mammifero e di *Xenopus*; in particolare il DT delle MSC di *T.scripta* medio al P3 risulta essere 5,3 gg, nello *Xenopus* è 25,6 h (1,06 gg) mentre nel cane è 80h (3,33 gg) ; questo potrebbe essere correlato a un metabolismo cellulare più lento tipico dei rettili o a condizioni di coltura non ottimali (Maccoccia et al. 2021),(Otsuka-Yamaguchi et al. 2021).

La curva cellulare delle MSC di cane a confronto di quella di *T.scripta* presenta una diminuzione della velocità replicativa dal passaggio P4 (Maccoccia et al. 2021), le MSC di *Xenopus* presentano un rallentamento della crescita dal P5 (Otsuka-Yamaguchi et al. 2021); le cellule di *T.scripta* non presentano, nelle condizioni da noi valutate, rallentamenti nella crescita fino all'ultimo passaggio valutato in questo studio (P8).

In questo studio non è stato possibile valutare eventuali variazioni nelle curve di crescita cellulare in funzione dell'età dei soggetti in quanto questo dato non era noto per i soggetti recuperati utilizzati.

Le curve ottenute presentano una variabilità probabilmente correlabile a fattori individuali dei singoli soggetti come età, sesso e stato di salute. Tutti i soggetti sono stati dichiarati sani alla visita clinica e agli esami ematici ma questo non esclude che gli animali potessero presentare patologie croniche/infezioni subcliniche non evidenziabili con i parametri valutati. Nelle MSC di mammifero è stata infatti individuata una variazione della capacità replicativa delle cellule in funzione dell'età e dello stato di salute dei soggetti donatori. (Alt et al. 2012) (Mastrolia et al. 2019).

Le cellule hanno dimostrato di essere sensibili ai medium utilizzati per indurre la differenziazione nelle cellule di mammifero. Le cellule si sono differenziate in senso adipocitico, condrogenico e osteogenico efficacemente in una tempistica comparabile a quella descritta per i mammiferi. È interessante notare che i medium di differenziazione formulati per cellule di mammifero abbiano funzionato per tutte e tre le differenziazioni, ad indicare che le cellule sono quindi sensibili agli stessi stimoli a cui sono sensibili le cellule di mammifero.

Come già accennato precedentemente, la fenotipizzazione delle cellule è stata fatta mediante studio dell'espressione genica in RT\_PCR, come già descritto per le MSC di *Xenopus laevis*. Non è stato possibile trovare in letteratura nessun studio che valutasse l'espressione genica dei CD ricercati nelle cellule o nei tessuti di *T.scripta*. I primer utilizzati in questo studio sono quindi stati appositamente progettati partendo dalle sequenze dei geni presenti sul sito NCBI. È importante notare che la sequenza di DNA utilizzata per progettare i primer risulta non annotata sul sito NCBI.

Tutti le coppie di primer utilizzate tranne due si sono rivelate efficaci per amplificare il gene ricercato. I primer per il gene CD 45 non hanno dato risultati positivi, quelli utilizzati per il gene CD 31 hanno generato un amplicone che si è rivelato al sequenziamento non corrispondente alla sequenza ricercata.

L'espressione di entrambi i geni è stata valutata senza successo sia nelle MSC che nei leucociti di *T.scripta*, cellule in cui i geni dovrebbero essere espressi, almeno secondo la letteratura relativa ai mammiferi.

Gli insuccessi nello studio dell'espressione di CD45 e CD31 potrebbero essere spiegati da un errore nella loro progettazione, ma anche da un'altra serie di fattori. È bene considerare che la sequenza presente sul sito NCBI potrebbe contenere degli errori non essendo mai stata validata.

Un altro tipo di imprecisione presente nella sequenza in banca dati potrebbe essere la scorretta indicazione degli esoni e degli introni all'interno del DNA che potrebbe a degli errori della scelta dei primer per lo studio dell'RNA.

È anche da considerare che le cellule potrebbero semplicemente non esprimere i geni da noi ricercati, non essendo presente nessuno studio precedente che dimostra la loro espressione in *T. scripta*

Per tutti gli altri geni sono state valutate le sequenze ottenute tramite la procedura di sequenziamento. Per tutti gli ampliconi sono state fatti due sequenziamenti (forward e reverse). Dopo analisi dei cromatogrammi e confronto delle due sequenze complementari si sono ottenute percentuali di omologia con la sequenza presente in banca dati > del 98%. Questa percentuale di omologia permette di affermare che i geni isolati sono con ogni probabilità quelli ricercati; tuttavia, sarà necessario ripetere il sequenziamento su campioni cellulari derivati da animali diversi per confermare l'effettiva corrispondenza delle sequenze.

Nuove ricerche e valutazioni sono invece da eseguire per quanto riguarda CD 45 e CD 31, per i quali va valutata la progettazione di nuovi primer prima di poter affermare che non siano espressi da queste cellule.

Vista la loro morfologia, la capacità di differenziare in vari tipi cellulari di origine mesenchimale e l'espressione dei markers utilizzati per la caratterizzazione di MSC di mammifero, è possibile affermare che le cellule isolate sono con ogni probabilità Cellule Stromali Mesenchimali.

Una problematica frequentemente osservata durante le procedure di espansione delle MSC di *T. scripta* è la comparsa di inquinamenti delle colture. Diversi soggetti sono stati infatti esclusi dallo studio per inquinamento dei campioni entro i 5 gg dalla loro processazione.

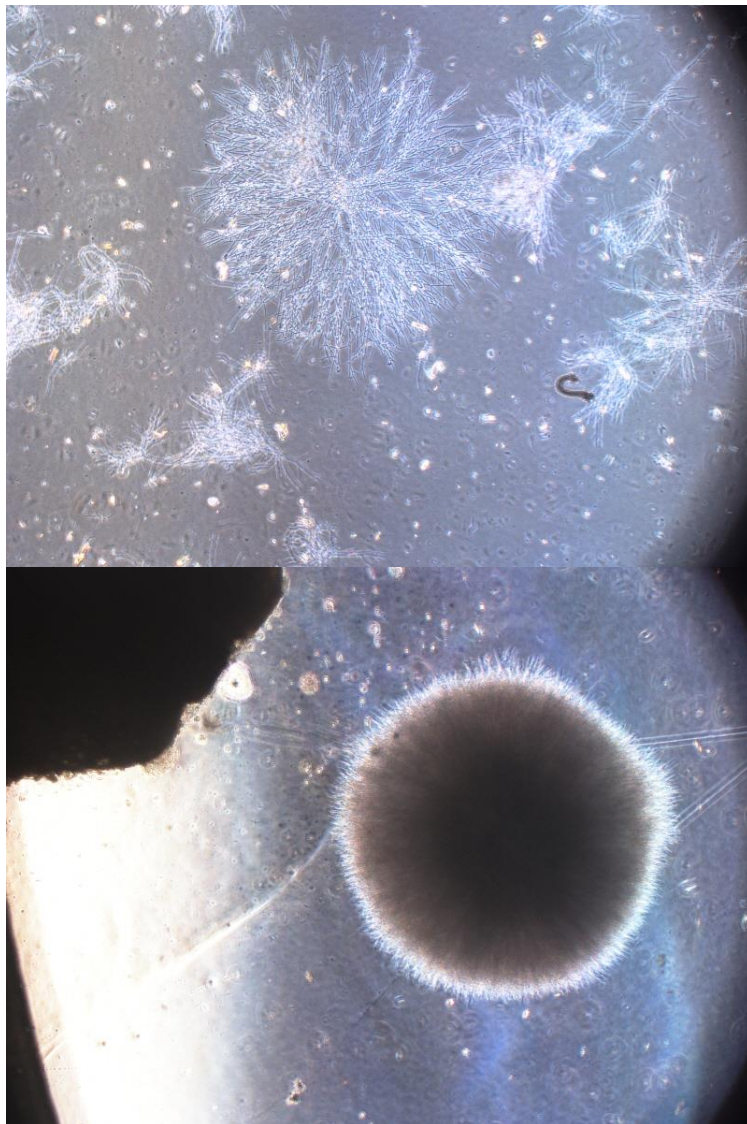
Nel medium inquinato è stato possibile isolare *Elizabethkingia meningoseptica* (Jean et al. 2014) un battere presente nell'ambiente acquatico che può essere patogeno e osservare la presenza di muffe al microscopio.

Non è possibile escludere che l'inquinamento derivi da una contaminazione durante il campionamento del grasso, nonostante la procedura preveda un campionamento effettuato applicando rigidamente le norme della sterilità chirurgica.

Non si può escludere a priori che una quota di contaminazione fosse già presente nel tessuto vivo dell'animale

È stato interessante notare che le cellule apparentemente non risentivano di questa contaminazione, in quanto non presentavano alterazioni nella morfologia, non si notava un aumento di cellule morte e la velocità di replicazione rimaneva invariata.

I campioni contaminati sono stati comunque eliminati per evitare contaminazione di altri preparati cellulari.



*Figura 27 esempi di contaminazione da muffe riscontrati nei campioni eliminati*

Viste il grande utilizzo in medicina rigenerativa dei mammiferi di queste cellule si potrebbe valutare in futuro l'uso terapeutico di MSC anche in animali non convenzionali. Interessante sarebbe valutare l'isolamento e l'utilizzo terapeutico delle MSC in specie di cheloni minacciate come *Caretta caretta*, ma anche altre specie meno conosciute come la *Chelonia mydas*, la *Dermochelys coriacea* o specie terrestri come la *Astrochelys radiata* e specie autoctone come la *Testudo marginata*.

Utile sarebbe sicuramente l'utilizzo delle MSC isolate da specie di cheloni diffuse come animali da compagnia, come *T. hermanni* o *T. graeca*, in animali traumatizzati con ferite di grandi estensioni provocate per esempio dalle automobili e tagliaerba che, purtroppo, sono molto frequenti nella pratica clinica di queste specie.

## CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi dimostra che applicando le tecniche di isolamento e di caratterizzazione fenotipica in uso nella medicina rigenerativa dei mammiferi, è stato possibile allestire un protocollo preliminare per l'isolamento di cellule stromali mesenchimali (MSCs) da tessuto adiposo di *Trachemys scripta*, un chelone usato come modello per lo studio delle MSCs dei rettili.

Non esistendo in letteratura protocolli per colture cellulari di cheloni, si è allestito un protocollo che andrà in futuro ottimizzato al fine di evidenziare quali siano le condizioni di coltura migliori, in termini di medium, temperatura e concentrazione di CO<sub>2</sub> utilizzabili per sviluppare applicazioni di terapia cellulare in queste specie animali.,

Le cellule espanse dal tessuto adiposo di *T. Scripta* rispettano i criteri di definizione delle cellule stromali mesenchimali presentati dalla International Society for Cellular Therapy (ISCT). Le cellule aderiscono alla piastra di coltura, hanno morfologia simil-fibroblastica, si differenziano in senso adipocitico, condrocitico e osteocitico quando stimolate con i medium di differenziazione utilizzati nei mammiferi. È stata inoltre valutata l'espressione genica tramite RT-PCR di un panel di markers necessario, secondo l'ISCT, per indicare queste cellule come stromali mesenchimali. Le cellule esprimono i markers utilizzati per la caratterizzazione di MSC di mammifero seguendo le indicazioni della ISCT. Tuttavia, per alcuni markers i risultati sono ancora preliminari e andranno confermati su ulteriori preparati cellulari. Infine, sono stati ottenuti dati relativi alle curve di crescita delle cellule che indicano la possibilità di espandere le popolazioni isolate per diversi passaggi, seppure con una velocità di replicazione limitata rispetto alle cellule di mammifero.

Dal momento che le caratteristiche indicate dalla ISCT sono rispettate è possibile affermare che le cellule isolate in questo studio sono con grande probabilità identificabili con popolazioni di MSC di *T.scripta*. *T.scripta* si è rivelata un'ottima specie modello per questo studio, ma non è, tuttavia, un animale di interesse clinico rilevante nel campo della clinica veterinaria. Nel prosieguo degli studi, sarà necessario esplorare la possibilità di isolare MSC anche da altre specie di rettili per valutarne le potenzialità di applicazione clinica.

## BIBLIOGRAFIA

- Alt, E. U., Senst, C., Murthy, S. N., Slakey, D. P., Dupin, C. L., Chaffin, A. E., ... & Izadpanah, R. (2012). Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell properties. *Stem cell research*, 8(2), 215-225. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2011.11.002>.
- Andreas, K., Sittinger, M., & Ringe, J. (2014). Toward in situ tissue engineering: chemokine-guided stem cell recruitment. *Trends in biotechnology*, 32(9), 483-492. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.06.008>.
- Andrzejewska, A., Lukomska, B., & Janowski, M. (2019). Concise review: mesenchymal stem cells: from roots to boost. *Stem cells*, 37(7), 855-864. <https://doi.org/10.1002/stem.3016>.
- Araña, M., Mazo, M., Aranda, P., Pelacho, B., & Prosper, F. (2013). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, and characterization. *Cellular Cardiomyoplasty: Methods and Protocols*, 47-61. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-511-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-511-8_4).
- Baker, B. B., Sladky, K. K., & Johnson, S. M. (2011). Evaluation of the analgesic effects of oral and subcutaneous tramadol administration in red-eared slider turtles. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 238(2), 220-227. <https://doi.org/10.2460/javma.238.2.220>.
- Barberini, D. J., Aleman, M., Aristizabal, F., Spriet, M., Clark, K. C., Walker, N. J., ... & Borjesson, D. L. (2018). Safety and tracking of intrathecal allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in healthy and diseased horses. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0849-6>.
- Bermudez, M. A., Sendon-Lago, J., Eiro, N., Trevino, M., Gonzalez, F., Yebra-Pimentel, E., ... & Perez-Fernandez, R. (2015). Corneal epithelial wound healing and bactericidal effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 56(2), 983-992. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-15859>.
- Cadi, A., & Joly, P. (2004). Impact of the introduction of the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) on survival rates of the European pond turtle (*Emys orbicularis*). *Biodiversity & Conservation*, 13, 2511-2518.

- Can, A. (2008). A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turk J Hematol*, 25(2), 57-9.
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*, 9(5), 641-650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>.
- Caplan, A. I. (2008). All MSCs are pericytes?. *Cell stem cell*, 3(3), 229-230. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.08.008>.
- Carpenter, J. W., & Harms, C. (Eds.). (2022). *Exotic Animal Formulary-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Chen, W., Huang, Y., Han, J., Yu, L., Li, Y., Lu, Z., ... & Xiao, Y. (2016). Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells-derived exosome. *Immunologic research*, 64, 831-840. <https://doi.org/10.1007/s12026-016-8798-6>.
- Chu, P. G., & Arber, D. A. (2001). CD79: a review. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 9(2), 97-106.
- Cogswell, J. P., Zeleznik-Le, N., & Ting, J. P. (1991). Transcriptional regulation of the HLA-DRA gene. *Critical reviews in immunology*, 11(2), 87-112.
- Corselli, M., Chen, C. W., Crisan, M., Lazzari, L., & Péault, B. (2010). Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30(6), 1104-1109. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.191643>.
- Covas, D. T., Panepucci, R. A., Fontes, A. M., Silva Jr, W. A., Orellana, M. D., Freitas, M. C., ... & Zago, M. A. (2008). Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Experimental hematology*, 36(5), 642-654. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2007.12.015>.
- Creane, M., Howard, L., O'Brien, T., & Coleman, C. M. (2017). Biodistribution and retention of locally administered human mesenchymal stromal cells: Quantitative polymerase chain reaction–based detection of human DNA in murine organs. *Cytotherapy*, 19(3), 384-394. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.12.003>.
- Dave, M., Menghini, P., Sugi, K., Somoza, R. A., Lee, Z., Jain, M., ... & Cominelli, F. (2017). Ultrasound-guided intracardiac injection of human mesenchymal stem cells to increase homing to the intestine for use in murine models of experimental



- inflammatory bowel diseases. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (127), e55367. <https://doi.org/10.3791/55367>.
- Dominici, M. L. B. K., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.
- Doneley, B., Monks, D., Johnson, R., Carmel, B., & Wiley, J. (Eds.). (2018). Reptile medicine and surgery in clinical practice (pp. 425-439). Oxford, UK:: Wiley Blackwell.
- Donovan, J. A., & Koretzky, G. A. (1993). CD45 and the immune response. *Journal of the American Society of Nephrology*, 4(4), 976-985.
- Ficetola, G. F., & Scali, S. (2010). Invasive amphibians and reptiles in Italy. In *Atti VIII Congresso Nazionale Societas Herpetologica Italica* (pp. 335-340). Pescara, Italy: Ianieri Edizioni.
- Finlayson, K. A., Hof, C. A. M., & van de Merwe, J. P. (2020). Development and application of species-specific cell-based bioassays to assess toxicity in green sea turtles. *Science of the Total Environment*, 747, 142095.
- Francois, M., Romieu, R., Li, M., & Galipeau, J. (2010). IDO Expression in human mesenchymal stromal cells mediates T cell suppression and leads to monocyte differentiation into IL-10 secreting immunosuppressive CD206+ M2 macrophages. *Blood*, 116(21), 2784. <https://doi.org/10.1182/blood.v116.21.2784.2784>.
- Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., & Frolova, G. P. (1968). Heterotopic transplants of bone marrow. *Transplantation*, 6(2), 230-247.
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., & Lalykina, K. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Proliferation*, 3(4), 393-403.
- Ghorbani, A., Jalali, S. A., & Varedi, M. (2014). Isolation of adipose tissue mesenchymal stem cells without tissue destruction: a non-enzymatic method. *Tissue and Cell*, 46(1), 54-58. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2013.11.002>.

- Greer, L. L., Jenne, K. J., & Diggs, H. E. (2001). Medetomidine-ketamine anesthesia in red-eared slider turtles (*Trachemys scripta elegans*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 40(3), 8-11.
- Grezzella, C., Fernandez-Rebollo, E., Franzen, J., Ventura Ferreira, M. S., Beier, F., & Wagner, W. (2018). Effects of senolytic drugs on human mesenchymal stromal cells. *Stem cell research & therapy*, 9, 1-6. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0857-6>.
- Guest, D. J., Smith, M. R. W., & Allen, W. R. (2010). Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon. *Equine veterinary journal*, 42(7), 636-642. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00112.x>.
- Henriksson, H. B., Papadimitriou, N., Hingert, D., Baranto, A., Lindahl, A., & Brisby, H. (2019). The traceability of mesenchymal stromal cells after injection into degenerated discs in patients with low back pain. *Stem cells and development*, 28(17), 1203-1211. <https://doi.org/10.1089/scd.2019.0074>.
- Hoogduijn, M. J., Popp, F., Verbeek, R., Masoodi, M., Nicolaou, A., Baan, C., & Dahlke, M. H. (2010). The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. *International immunopharmacology*, 10(12), 1496-1500. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.06.019>.
- Horwitz, E. M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., ... & Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7(5), 393-395. <https://doi.org/10.1080/14653240500319234>.
- Ianni Di, F., Merli, E., Burtini, F., Conti, V., Pelizzone, I., Di Lecce, R., ... & Grolli, S. (2015). Preparation and application of an innovative thrombocyte/leukocyte-enriched plasma to promote tissue repair in chelonians. *PLoS One*, 10(4), e0122595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122595>.
- Jackson, M. V., Morrison, T. J., Doherty, D. F., McAuley, D. F., Matthay, M. A., Kissenpfennig, A., ... & Krasnodembskaya, A. D. (2016). 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*, 34(8), 2210-2223. <https://doi.org/10.1002/stem.2372>.
- Jean, S. S., Lee, W. S., Chen, F. L., Ou, T. Y., & Hsueh, P. R. (2014). Elizabethkingia meningoseptica: an important emerging pathogen causing healthcare-associated infections. *Journal of Hospital Infection*, 86(4), 244-249. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.01.009>.
- Jimenez-Puerta, G. J., Marchal, J. A., López-Ruiz, E., & Gálvez-Martín, P. (2020). Role of mesenchymal stromal cells as therapeutic agents: potential mechanisms of action and implications in their clinical use. *Journal of clinical medicine*, 9(2), 445. <https://doi.org/10.3390/jcm9020445>.
- Kooy van der, D., & Weiss, A. S. (2000). Why stem cells?. *Science*, 287(5457), 1439-1441.
- Kumar, A., Bhanja, A., Bhattacharyya, J., & Jaganathan, B. G. (2016). Multiple roles of CD90 in cancer. *Tumor Biology*, 37, 11611-11622. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5112-0>.
- Kumar, P., Kandoi, S., Misra, R., Vijayalakshmi, S., Rajagopal, K., & Verma, R. S. (2019). The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. *Cytokine & growth factor reviews*, 46, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.04.002>.
- Lee, R. H., Pulin, A. A., Seo, M. J., Kota, D. J., Ylostalo, J., Larson, B. L., ... & Prockop, D. J. (2009). Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell stem cell*, 5(1), 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.003>.
- Li, C., Zhao, H., Cheng, L., & Wang, B. (2021). Allogeneic vs. autologous mesenchymal stem/stromal cells in their medication practice. *Cell & Bioscience*, 11(1), 1-21. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00698-y>.
- Li, H., Rong, P., Ma, X., Nie, W., Chen, C., Yang, C., ... & Wang, W. (2018). Paracrine effect of mesenchymal stem cell as a novel therapeutic strategy for diabetic nephropathy. *Life sciences*, 215, 113-118. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.11.001>.
- Li, Y. H., Feng, L., Zhang, G. X., & Ma, C. G. (2015). Intranasal delivery of stem cells as therapy for central nervous system disease. *Experimental and molecular pathology*, 98(2), 145-151. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.01.016>.

- Liu, Q., Zhu, Y., Qi, J., Amadio, P. C., Moran, S. L., Gingery, A., & Zhao, C. (2019). Isolation and characterization of turkey bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 37(6), 1419-1428. <https://doi.org/10.1002/jor.24203>.
- Longley, L., Fiddes, M., & O'Brien, M. (2008). Anaesthesia of exotic pets. *“Chelonian (Tortoise, Terrapin and Turtle) Anaesthesia.”*
- Macchi, S., Scali, S., Bisi, F., Martinoli, A., Alonzi, A., Carnevali, L. (2020). “Piano Nazionale per La Gestione Della Testuggine Palustre Americana (Trachemys Scripta).”
- Madrigal, M., Rao, K. S., & Riordan, N. H. (2014). A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *Journal of translational medicine*, 12(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12967-014-0260-8>.
- Maiti, S. K., Kumar, M. U., Srivastava, L., Ninu, A. R., & Kumar, N. (2013). Isolation, Proliferation and Morphological Characteristics of Bone-Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells (BM-MSC) from Different Animal Species. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, 27(1).
- Mäkelä, T., Takalo, R., Arvola, O., Haapanen, H., Yannopoulos, F., Blanco, R., ... & Lehenkari, P. (2015). Safety and biodistribution study of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells and mononuclear cells and the impact of the administration route in an intact porcine model. *Cytotherapy*, 17(4), 392-402. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.12.004>.
- Marcoccia, R., Nesci, S., Merlo, B., Ballotta, G., Algieri, C., Pagliarani, A., & Iacono, E. (2021). Biological characteristics and metabolic profile of canine mesenchymal stem cells isolated from adipose tissue and umbilical cord matrix. *PLoS One*, 16(3), e0247567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247567>.
- Mastrolia, I., Foppiani, E. M., Murgia, A., Candini, O., Samarelli, A. V., Grisendi, G., ... & Dominici, M. (2019). Challenges in clinical development of mesenchymal stromal/stem cells: concise review. *Stem cells translational medicine*, 8(11), 1135-1148. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0044>.

- Minor, M., Alcedo, K. P., Battaglia, R. A., & Snider, N. T. (2019). Cell type-and tissue-specific functions of ecto-5'-nucleotidase (CD73). *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 317(6), C1079-C1092. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00285.2019>.
- Moghaddam, A. S., Afshari, J. T., Esmaili, S. A., Saburi, E., Joneidi, Z., & Momtazi-Borojeni, A. A. (2019). Cardioprotective microRNAs: Lessons from stem cell-derived exosomal microRNAs to treat cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 285, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.03.016>.
- Morgan, D. A., Class, R., Violetta, G., & Soslau, G. (2009). Cytokine mediated proliferation of cultured sea turtle blood cells: Morphologic and functional comparison to human blood cells. *Tissue and Cell*, 41(4), 299-309. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2008.12.004>.
- Mushahary, D., Spittler, A., Kasper, C., Weber, V., & Charwat, V. (2018). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry Part A*, 93(1), 19-31. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23242>.
- Nassiri, F., Cusimano, M. D., Scheithauer, B. W., Rotondo, F., Fazio, A., Yousef, G. M., ... & Lloyd, R. V. (2011). Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer research*, 31(6), 2283-2290.
- Nauta, A. J., Kruisselbrink, A. B., Lurvink, E., Willemze, R., & Fibbe, W. E. (2006). Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 177(4), 2080-2087.
- Neupane, M., Chang, C. C., Kiupel, M., & Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2008). Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering Part A*, 14(6), 1007-1015. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2007.0207>.
- Nicola Di, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., ... & Gianni, A. M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 99(10), 3838-3843.
- Nielsen, J. S., & McNagny, K. M. (2008). Novel functions of the CD34 family. *Journal of cell science*, 121(22), 3683-3692. <https://doi.org/10.1242/jcs.03504>.

- Nitzsche, F., Müller, C., Lukomska, B., Jolkkonen, J., Deten, A., & Boltze, J. (2017). Concise review: MSC adhesion cascade—insights into homing and transendothelial migration. *Stem cells*, 35(6), 1446-1460. <https://doi.org/10.1002/stem.2614>.
- Otsuka-Yamaguchi, R., Kitada, M., Kuroda, Y., Kushida, Y., Wakao, S., & Dezawa, M. (2021). Isolation and characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in *Xenopus laevis*. *Stem Cell Research*, 53, 102341. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2021.102341>.
- Parekkadan, B., Tilles, A. W., & Yarmush, M. L. (2008). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate autoimmune enteropathy independently of regulatory T cells. *Stem cells*, 26(7), 1913-1919. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0790>.
- Park, S. E., Jung, N. Y., Lee, N. K., Lee, J., Hyung, B., Myeong, S. H., ... & Na, D. L. (2016). Distribution of human umbilical cord blood–derived mesenchymal stem cells (hUCB- MSCs) in canines after intracerebroventricular injection. *Neurobiology of Aging*, 47, 192-200. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.08.002>.
- Pérez-Merino, E. M., Usón-Casaús, J. M., Zaragoza-Bayle, C., Duque-Carrasco, J., Mariñas-Pardo, L., Hermida-Prieto, M., ... & Gualtieri, M. (2015). Safety and efficacy of allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for treatment of dogs with inflammatory bowel disease: Clinical and laboratory outcomes. *The Veterinary Journal*, 206(3), 385-390. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.08.003>.
- Pires, A. O., Mendes-Pinheiro, B., Teixeira, F. G., Anjo, S. I., Ribeiro-Samy, S., Gomes, E. D., ... & Salgado, A. J. (2016). Unveiling the differences of secretome of human bone marrow mesenchymal stem cells, adipose tissue-derived stem cells, and human umbilical cord perivascular cells: a proteomic analysis. *Stem cells and development*, 25(14), 1073-1083. <https://doi.org/10.1089/scd.20>.
- Popp, F. C., Eggenhofer, E., Renner, P., Slowik, P., Lang, S. A., Kaspar, H., ... & Dahlke, M. H. (2008). Mesenchymal stem cells can induce long-term acceptance of solid organ allografts in synergy with low-dose mycophenolate. *Transplant immunology*, 20(1-2), 55-60. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2008.08.004>.

- Proença, L. M., & Divers, S. J. (2015). Coelioscopic and endoscope-assisted sterilization of chelonians. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 18(3), 555-570. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2015.05.004>.
- Qu, Y., Zhang, Q., Cai, X., Li, F., Ma, Z., Xu, M., & Lu, L. (2017). Exosomes derived from miR-181-5p-modified adipose-derived mesenchymal stem cells prevent liver fibrosis via autophagy activation. *Journal of cellular and molecular medicine*, 21(10), 2491-2502. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13170>.
- Quimby, J. M., & Borjesson, D. L. (2018). Mesenchymal stem cell therapy in cats: Current knowledge and future potential. *Journal of feline medicine and surgery*, 20(3), 208-216.
- Rivas, J., Dubois, A., Blanquer, A., Gérardy, M., Ziegler, U., Groschup, M. H., ... & Garigliany, M. M. (2023). Tendon-Derived Mesenchymal Stem Cells (TDSCs) as an In Vitro Model for Virological Studies in Wild Birds. *Viruses*, 15(7), 1455. <https://doi.org/10.3390/v15071455>.
- Sahoo, A. K., Das, J. K., & Nayak, S. (2017). Isolation, culture, characterization, and osteogenic differentiation of canine endometrial mesenchymal stem cell. *Veterinary world*, 10(12), 1533. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1533-1541>.
- Sanchez-Diaz, M., Quiñones-Vico, M. I., Sanabria de la Torre, R., Montero-Vílchez, T., Sierra-Sánchez, A., Molina-Leyva, A., & Arias-Santiago, S. (2021). Biodistribution of mesenchymal stromal cells after administration in animal models and humans: a systematic review. *Journal of Clinical Medicine*, 10(13), 2925. <https://doi.org/10.3390/jcm10132925>.
- Sangiorgi, B., & Panepucci, R. A. (2016). Modulation of immunoregulatory properties of mesenchymal stromal cells by toll-like receptors: potential applications on GVHD. *Stem cells international*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9434250>.
- Scarabelli, S., & Di Girolamo, N. (2022). Chelonian sedation and anesthesia. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 25(1), 49-72. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2021.08.009>.

- Schauwer De, C., Van de Walle, G. R., Van Soom, A., & Meyer, E. (2013). Mesenchymal stem cell therapy in horses: useful beyond orthopedic injuries?. *Veterinary Quarterly*, 33(4), 234-241.
- Secunda, R., Vennila, R., Mohanashankar, A. M., Rajasundari, M., Jeswanth, S., & Surendran, R. (2015). Isolation, expansion and characterisation of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood and matrix: a comparative study. *Cytotechnology*, 67(5), 793-807. <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9718-z>.
- Sgrignoli, M. R., Silva, D. A., Nascimento, F. F., Sgrignoli, D. A. M., Nai, G. A., da Silva, M. G., ... & Andrade, S. F. (2019). Reduction in the inflammatory markers CD4, IL-1, IL-6 and TNF $\alpha$  in dogs with keratoconjunctivitis sicca treated topically with mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research*, 39, 101525. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101525>.
- Meirelles, L. D. S., Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science*, 119(11), 2204-2213. <https://doi.org/10.1242/jcs.02932>.
- Souza De, L. E. B., Malta, T. M., Kashima Haddad, S., & Covas, D. T. (2016). Mesenchymal stem cells and pericytes: to what extent are they related?. *Stem cells and development*, 25(24), 1843-1852. <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0109>.
- Stone, M. L., Zhao, Y., Robert Smith, J., Weiss, M. L., Kron, I. L., Laubach, V. E., & Sharma, A. K. (2017). Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles attenuate lung ischemia-reperfusion injury and enhance reconditioning of donor lungs after circulatory death. *Respiratory research*, 18, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0704-9>.
- Suelzu, C. M., Conti, V., Khalidy, Y., Montagna, S., Strusi, G., Di Lecce, R., ... & Grolli, S. (2020). Xenobiotic-free medium guarantees expansion of adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells both in 3D fibrin-based matrices and in 2D plastic surface cultures. *Cells*, 9(12), 2578. <https://doi.org/10.3390/cells9122578>.
- Suva, D., Passweg, J., Arnaudeau, S., Hoffmeyer, P., & Kindler, V. (2008). In vitro activated human T lymphocytes very efficiently attach to allogenic multipotent mesenchymal



- stromal cells and transmigrate under them. *Journal of Cellular Physiology*, 214(3), 588-594. <https://doi.org/10.1002/jcp.21244>.
- Taylor, A., Sharkey, J., Harwood, R., Scarfe, L., Barrow, M., Rosseinsky, M. J., ... & Murray, P. (2020). Multimodal imaging techniques show differences in homing capacity between mesenchymal stromal cells and macrophages in mouse renal injury models. *Molecular imaging and biology*, 22, 904-913. <https://doi.org/10.1007/s11307-019-01458-8>.
- Teshima, T., Matsumoto, H., Michishita, M., Matsuoka, A., Shiba, M., Nagashima, T., & Koyama, H. (2017). Allogenic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells ameliorate acute hepatic injury in dogs. *Stem cells international*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3892514>.
- Ullah, M., Liu, D. D., & Thakor, A. S. (2019). Mesenchymal stromal cell homing: mechanisms and strategies for improvement. *Iscience*, 15, 421-438. <https://doi.org/10.1016/j.isci>.
- Voga, M., Adamic, N., Vengust, M., & Majdic, G. (2020). Stem cells in veterinary medicine—current state and treatment options. *Frontiers in veterinary science*, 7, 278. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00278>.
- Waterman, R. S., Tomchuck, S. L., Henkle, S. L., & Betancourt, A. M. (2010). A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PloS one*, 5(4), e10088. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010088>.
- Webb, S. J., Zychowski, G. V., Bauman, S. W., Higgins, B. M., Raudsepp, T., Gollahon, L. S., ... & Godard-Coding, C. (2014). Establishment, characterization, and toxicological application of loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) primary skin fibroblast cell cultures. *Environmental science & technology*, 48(24), 14728-14737. <https://doi.org/10.1021/es504182e>.
- Xie, J., Wang, B., Wang, L., Dong, F., Bai, G., & Liu, Y. (2016). Intracerebral and intravenous transplantation represents a favorable approach for application of human umbilical cord mesenchymal stromal cells in intracerebral hemorrhage rats. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 22, 3552. <https://doi.org/10.12659/MSM.900512>.

- Yang, Y., Chen, J., Shang, X., Feng, Z., Chen, C., Lu, J., ... & Chen, S. (2019). Visualizing the fate of intra-articular injected mesenchymal stem cells in vivo in the second near-infrared window for the effective treatment of supraspinatus tendon tears. *Advanced Science*, 6(19), 1901018. <https://doi.org/10.1002/advs.201901018>.
- Ziegler-Heitbrock, H. W. L., & Ulevitch, R. J. (1993). CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunology today*, 14(3), 121-125.
- Ziolo, M. S., & Bertelsen, M. F. (2009). Effects of propofol administered via the supravertebral sinus in red-eared sliders. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 234(3), 390-393.

## SITOGRAFIA

[https://www.anmvioggi.it/images/ACCORDO\\_LINEE\\_GUIDA\\_STAMINALI\\_IN\\_MEDICINA\\_VETERINARIA.pdf](https://www.anmvioggi.it/images/ACCORDO_LINEE_GUIDA_STAMINALI_IN_MEDICINA_VETERINARIA.pdf) (10/09/2023 data ultima consultazione)

<https://www.omnicalculator.com/biology/cell-doubling-time> (12/07/2023 data ultima consultazione)