



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Medicina Rigenerativa: nuove prospettive terapeutiche in veterinaria

Katia Barbaro

Laboratorio Allestimento e Gestione dei Substrati Cellulari e Anticorpi Monoclonali e Medicina Rigenerativa

UOC Virologia – IZS Lazio e Toscana

7 dicembre 2022





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

MEDICINA RIGENERATIVA



E' una branca della medicina relativamente nuova e spiccatamente interdisciplinare focalizzata sulla prospettiva di riparare, sostituire e/o rigenerare cellule, tessuti e/o organi compromessi da patologie, invecchiamento e traumi.

La medicina rigenerativa si basa principalmente sull'impiego delle cellule staminali mesenchimali (**da tessuto adiposo o da midollo osseo**) e derivati piastrinici (es. **plasma ricco in piastrine, gel piastrinico e lisato piastrinico**) per stimolare la rigenerazione e il ripristino delle condizioni fisiologiche dei tessuti interessati da patologie, traumi o degenerazioni.

I **prodotti autologhi** (derivati dai tessuti del paziente) i trattamenti non comportano alcun rischio di effetti collaterali o avversi, quali intolleranza, allergia o rigetto.





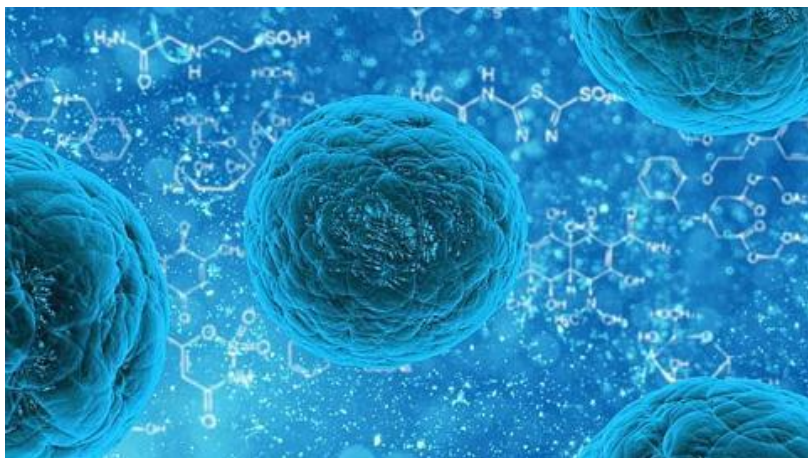
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Medicina Rigenerativa

- Cellule Staminali
- Derivati Piastrinici
- Secretomi



CHE COSA SONO LE CELLULE STAMINALI?



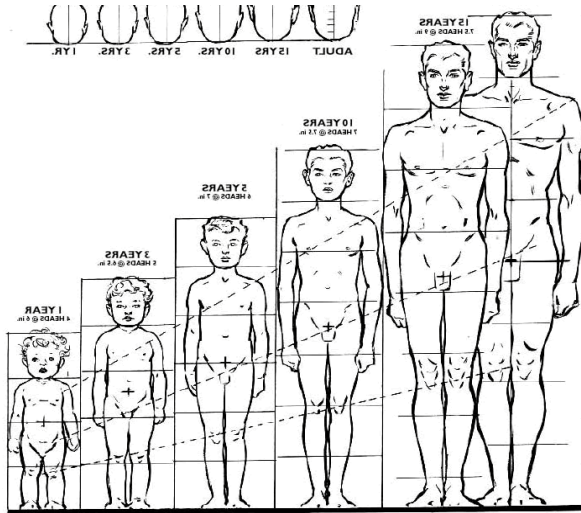
Sono cellule indifferenziate (immature), che possiedono la capacità di esteso **autorinnovamento** (cioè di generare cellule sostanzialmente identiche a se stessa) combinata con la capacità di generare una progenie di **cellule differenziate con diverse specializzazioni e competenze funzionali**





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

A CHE COSA SERVONO LE CELLULE STAMINALI?



Costruire e Mantenere





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

.....in base all'origine:

➤ **CELLULE STAMINALI EMBRIONALI**

➤ **CELLULE STAMINALI FETALI**

➤ **CELLULE STAMINALI ADULTE**

Quanti tipi di staminali???



PRINCIPI DI STAMINALITÀ



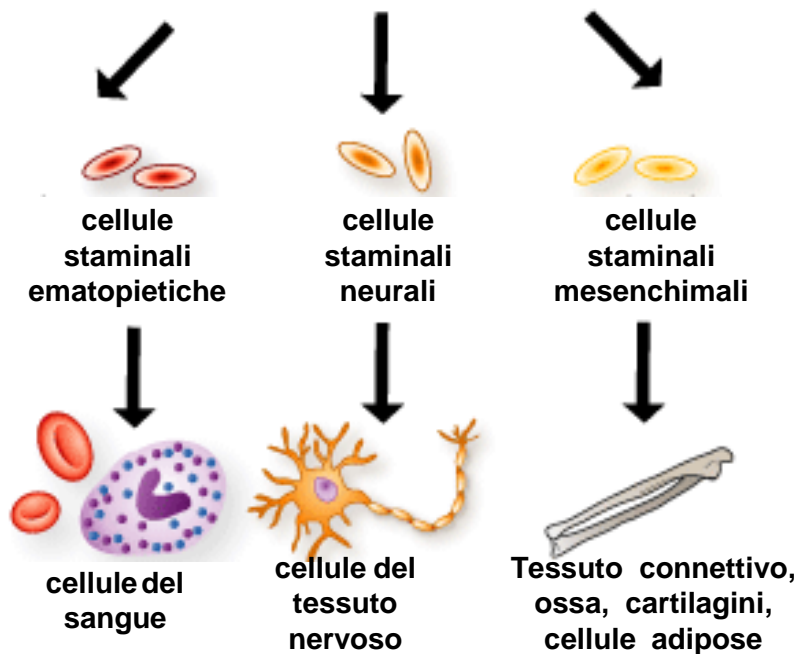
FETO



INDIVIDUO ADULTO

CORDONE OMBELICALE

➤ **Potenzialità**

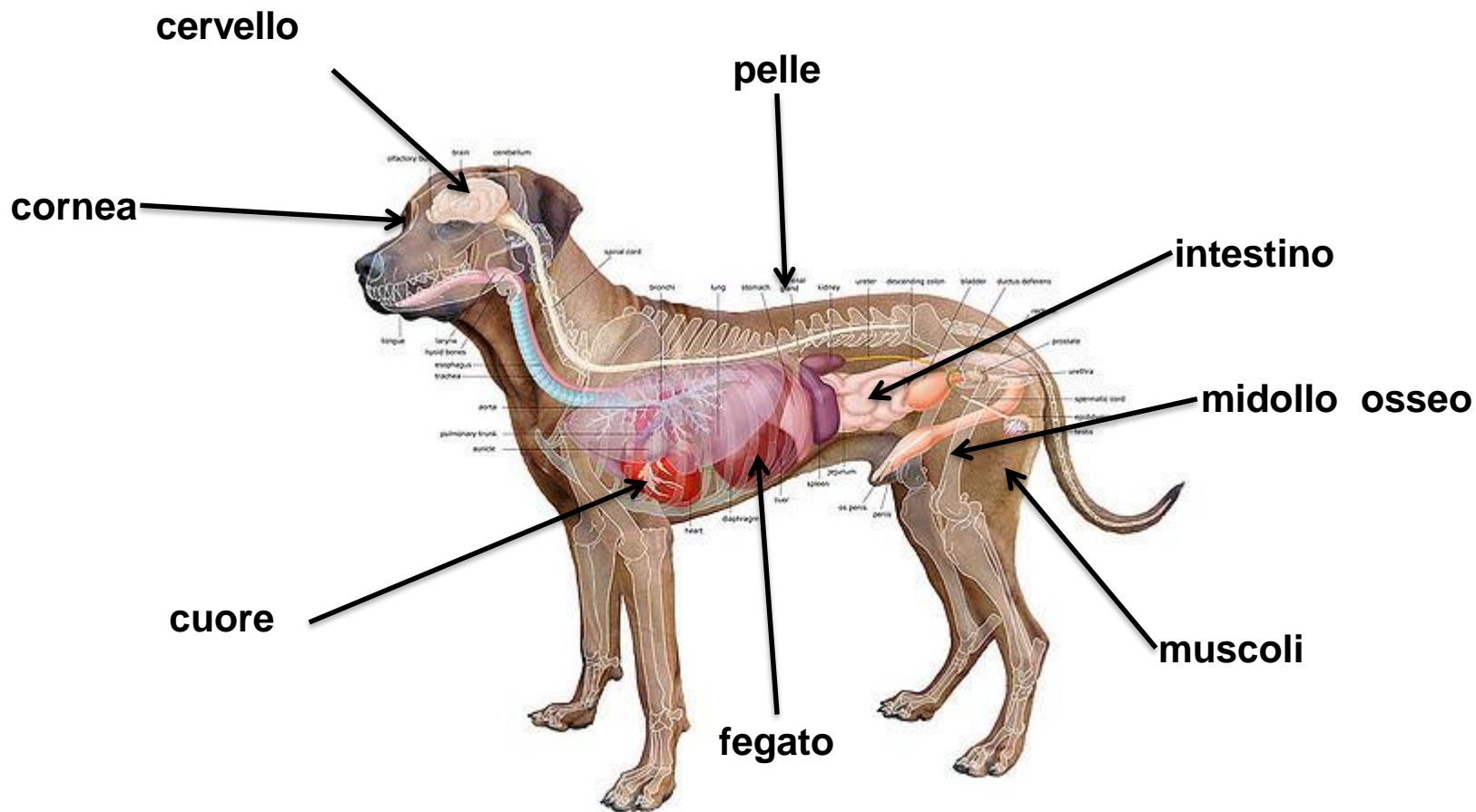


MULTIPOTENZA

**Cellule staminali adulte
o tessuto-specifiche**

**possono differenziarsi in
diversi tipi di cellule
specializzate di un solo
tessuto**

LE NICCHIE STAMINALI



PERCHÉ LE CELLULE STAMINALI?

NELLA MEDICINA RIGENERATIVA

capacità di IMMUNOMODULAZIONE (↓ citochine pro-infiammatorie, ↑ citochine anti-infiammatorie)

meccanismi PARACRINI e sintesi di FATTORI ANGIOGENETICI, di CRESCITA e ANTI-FIBROTICI

DIFFERENZIAZIONE in fibroblasti e cheratinociti



↑ **RIPARAZIONE TISSUTALE**



REGOLAMENTAZIONE LEGISLATIVA

26-11-2013

GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA

Serie generale - n. 277

DECRETI E DELIBERE DI ALTRE AUTORITÀ

CONFERENZA PERMANENTE PER I RAPPORTI TRA LO STATO, LE REGIONI E LE PROVINCE AUTONOME DI TRENTO E BOLZANO

ACCORDO 17 ottobre 2013.

Linee guida concernenti i requisiti sanitari minimi per
l'impiego delle cellule staminali in medicina veterinaria.
(Repertorio atti n. 147/CSR).

LA CONFERENZA PERMANENTE PER I RAPPORTI TRA LO STATO, LE REGIONI E LE PROVINCE AUTONOME DI TRENTO E BOLZANO

Nella odierna seduta del 17 ottobre 2013;

Visto l'art. 4 del decreto legislativo 28 agosto 1997,
n. 281, il quale prevede che questa Conferenza possa pro-
muovere e sancire accordi tra il Governo e le regioni e le

Sancisce accordo:

Tra il Governo, le regioni e le province autonome di
Trento e di Bolzano sulla proposta di accordo del Mini-
stro della salute recante «Linee guida concernenti i requi-
siti sanitari minimi per l'impiego delle cellule staminali
in medicina veterinaria», di cui all'allegato A, parte inte-
grante del presente atto.

Roma, 17 ottobre 2013

Il presidente
DELRIO

Il segretario
MARINO

ALLEGATO

Proposta di Accordo tra il Ministro della salute, le regioni e le
province autonome di Trento e di Bolzano sul documento recante
«Linee guida concernenti i requisiti minimi per l'impiego delle
cellule staminali in medicina veterinaria».





Secondo l'attuale letteratura scientifica e le esperienze maturate dal nostro Laboratorio, le patologie sulle quali ad oggi è possibile ottenere risultati terapeutici sono:

1) Patologie ortopediche

- Lesione tendinee e legamentose
- Trattamento di cisti ossee
- Trattamento di fratture (scheggie, comminute, esposte)
- Trattamento di fratture non consolidate/Pseudoartrosi
- Patologie osteolitiche
- Artropatie degenerative (artrosi)
- Patologie infiammatorie (artriti)
- Trattamento del dolore e riduzione dell'infiammazione delle articolazioni
- Lesioni muscolari

2) Patologie non ortopediche

- Grandi perdite di sostanza cutanea (ustioni, piaghe di grande estensione, ulcere con tendenza alla guarigione scarsa o nulla)
- Fistole circumanali
- Ulcere corneali
- Ferite profonde
- Insufficienza renale
- Patologie autoimmuni
- Malattie neurodegenerative
- Patologie epatiche e renali
- Patologie cardiovascolari e cuore infartuato
- Malattie degenerative della retina e della cornea
- Laminite
- Uveite
- Emorragia polmonare indotta da esercizio (EIPH)



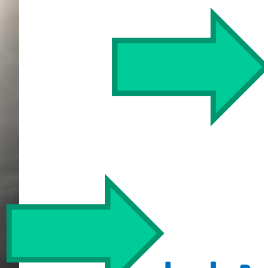
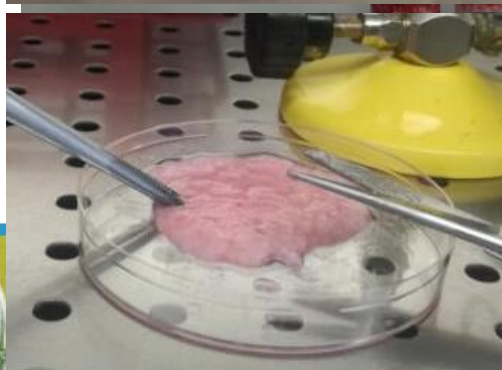
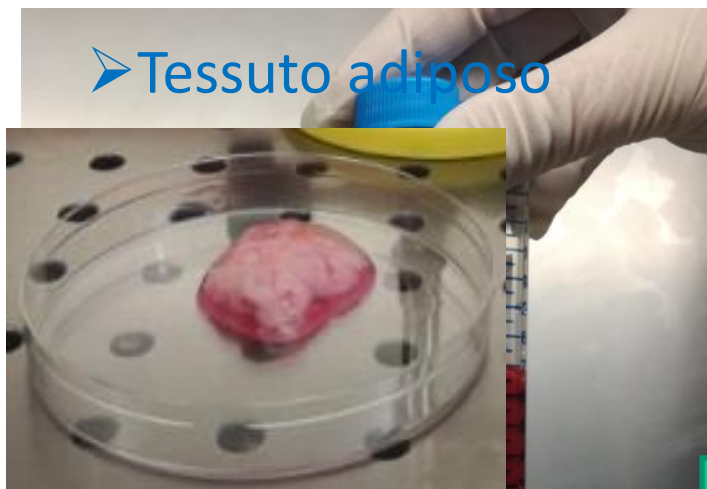
COSA FANNO LE CELLULE STAMINALI?



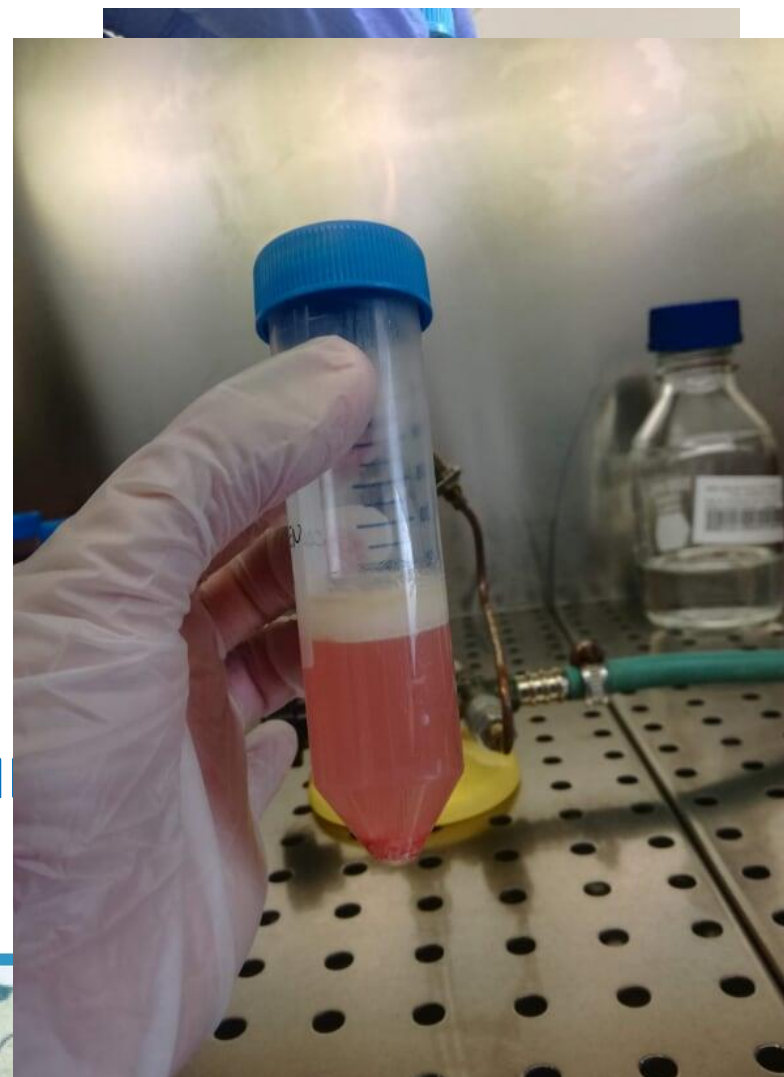
Possibili fonti per l'isolamento delle MSC:

➤ Midollo Osseo

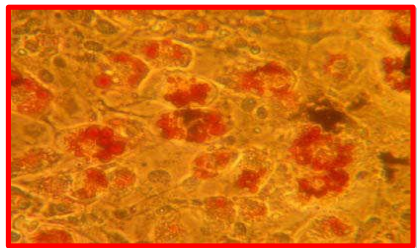
➤ Tessuto adiposo



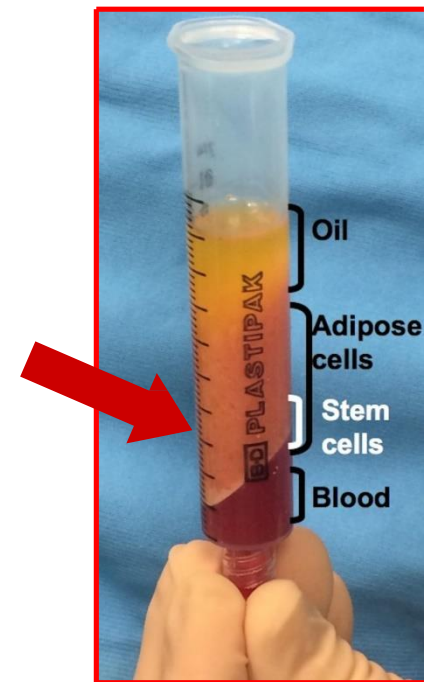
vano dal M



Vantaggi dell'uso del tessuto adiposo



- Accesso chirurgico semplice
- Alto rapporto numero cellule staminali/ml del tessuto:
4,737 - 1,550,000 (midollo osseo da 1-30 a 317,400)
- Bassa morbidità del sito di prelievo

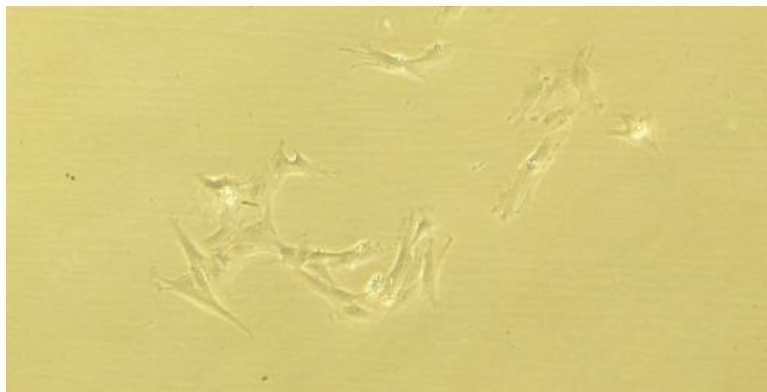




Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Caratteristiche delle MSC (da ISCT, International Society for Cellular Therapy):

- crescere adese alla superficie di coltura formando colonie di cellule ad aspetto simil-fibroblastico
- Essere in grado di differenziare in cellule della linea osteogenica, condrogenica ed adipocitaria
- Espressione di marker tipici (positività per CD90, CD73, CD105; negatività per CD45, CD34, CD14, CD19)



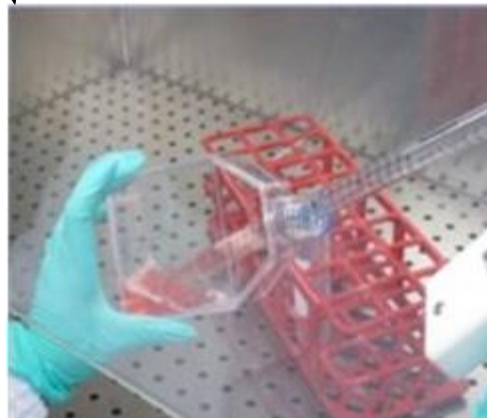
ISOLAMENTO E PRODUZIONE DI CELLULE STAMINALI



Impianto nel sito
della lesione



Sito prelievo:
Tessuto Adiposo
Midollo osseo

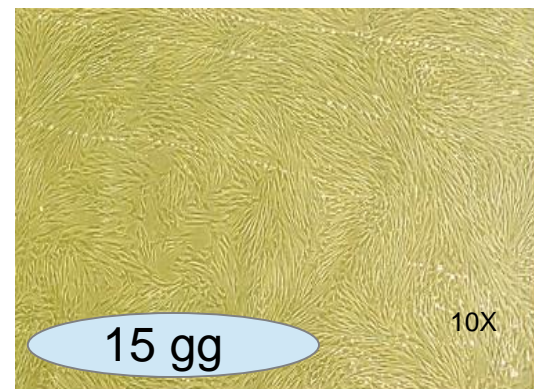
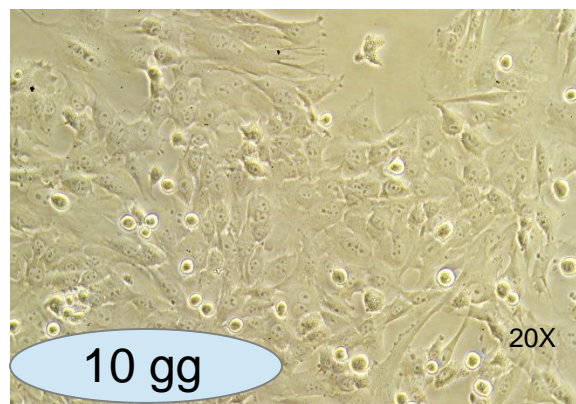
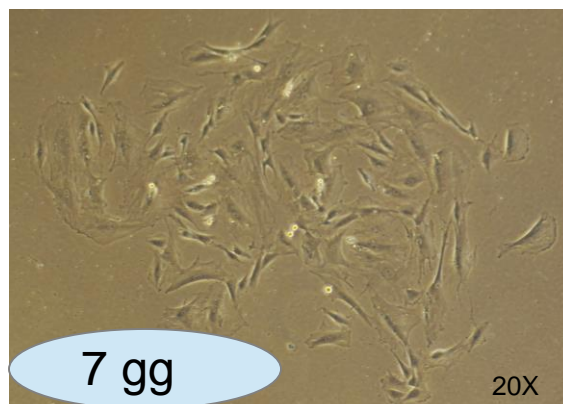
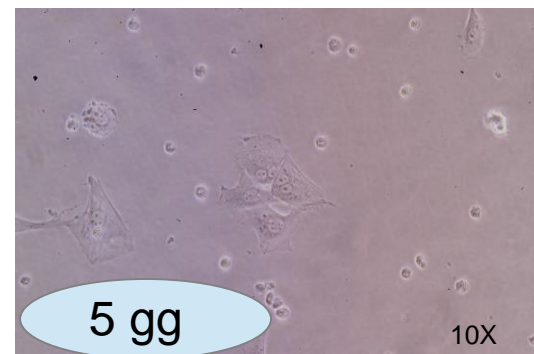
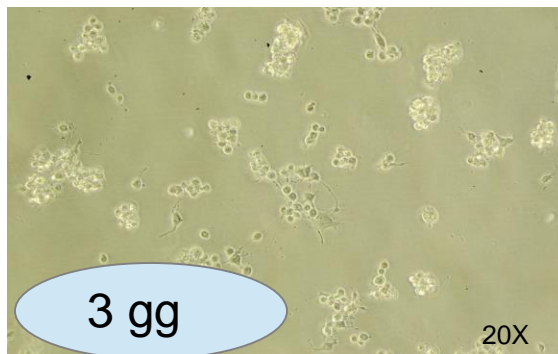
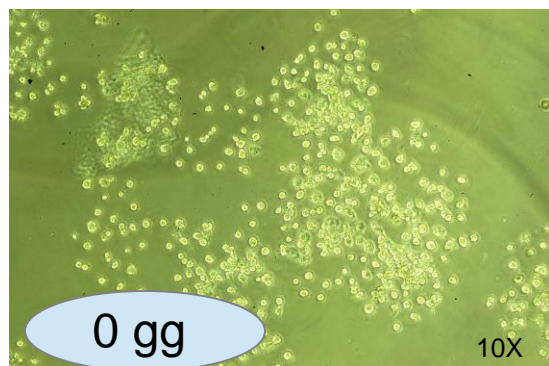


Digestione
enzimatica e
centrifugazione

Crescita delle cellule
staminali



CAMBIAMENTO MORFOLOGICO DEI CONDROCITI *IN VITRO*



Microscopio Ottico Rovesciato





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

UTILIZZO DELLE MSC

VIE DI SOMMINISTRAZIONE:

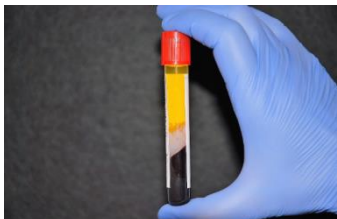
➤ **TOPICHE:** intralesionale,
microcircolo (es. endocoronarica)



➤ **SISTEMICHE:** endovenosa,
endoarteriosa, intraperitoneale



MEZZI DI RISOSPENSIONE

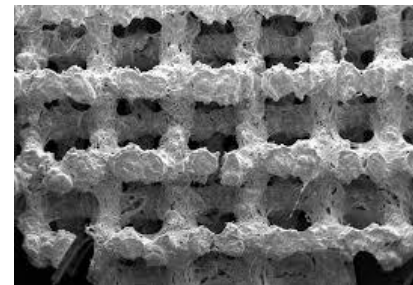


- Plasma o Siero
- PRP (Plasma Ricco in Piastrine) o Lisato Piastrinico
- Soluzioni isotoniche
- Soluzioni di Acido Jaluronico
- Medium di congelamento
- Medium di coltura



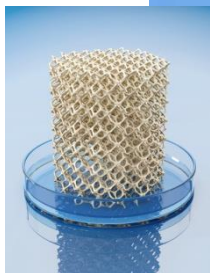


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



SCAFFOLD

supporto in cui vengono generalmente impiantate le cellule e fornisce

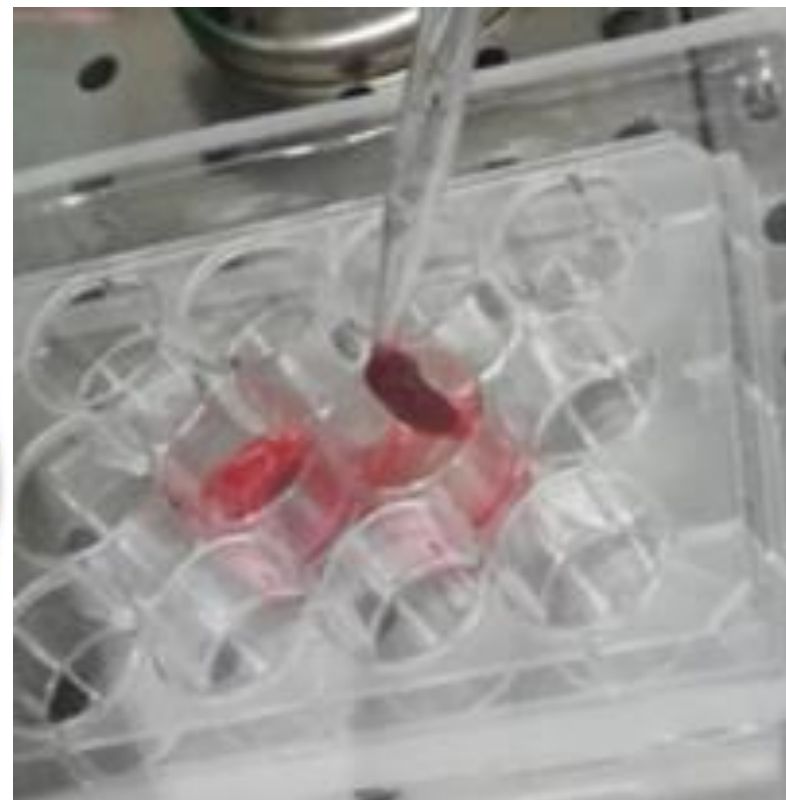
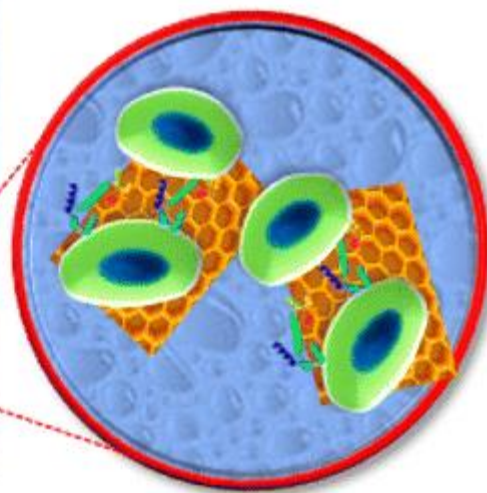
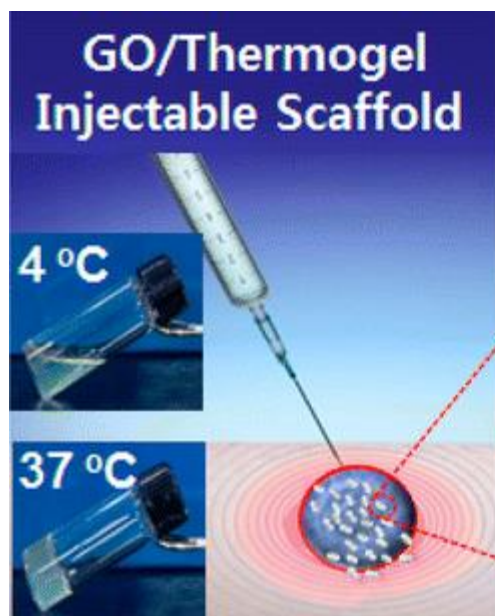


BIOCOMPATIBILI



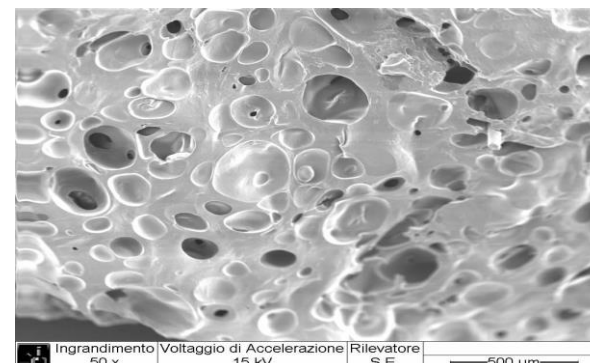
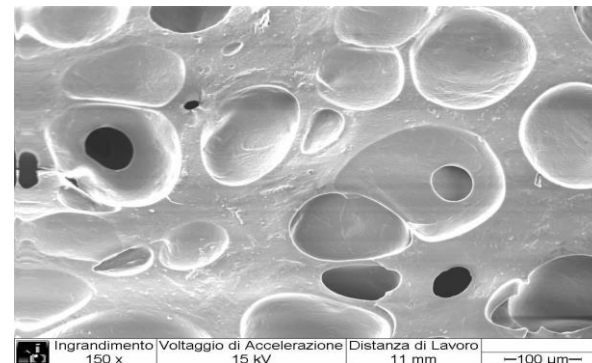


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Quali i requisiti degli scaffold ideali nei processi di riparazione tissutale?

- Sterilizzabilità
- Elevata porosità
- Interconnessione tra i pori (contatto fra cellule e vascolarizzazione)
- Resistenza all'acqua, alle temperature
- Resistenza agli enzimi proteolitici
- Proprietà antimicrobiche
- Anisotropia
- Stabilità
- Biocompatibilità
- Elasticità (trasmissione di forza contrattile)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

PRP

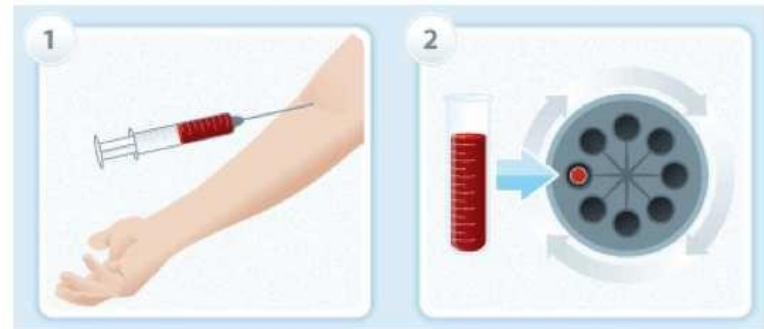
Il **plasma ricco di piastrine (PRP)** è definito come una frazione plasmatica, ottenuta mediante un processo di **centrifugazione e separazione**, con una concentrazione di piastrine superiore ai livelli di base. Queste piastrine contengono fattori di crescita che possono intervenire favorevolmente nei processi di guarigione attirando cellule indifferenziate dalla matrice e favorendo la replicazione cellulare.

Il PRP può sopprimere inoltre il rilascio di citochine correlate alla flogosi cronica, migliorando il tessuto di guarigione e di rigenerazione.



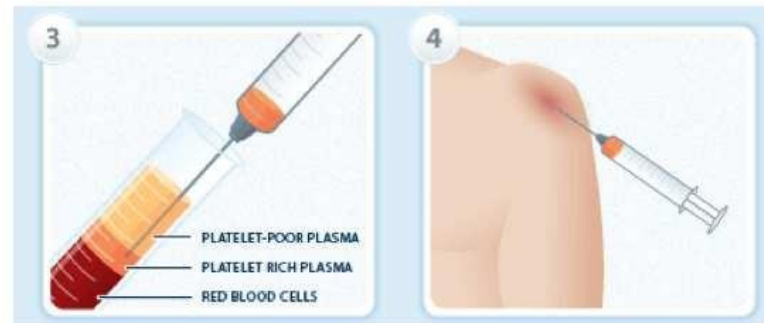
TECNICA di PREPARAZIONE del PRP

- il Concentrato piastrinico che deve avere una concentrazione di piastrine di **1.000.000/ μ l \pm 20%**, cioè può variare da 800.000 a 1.200.000/ μ l.
- Questo significa che un sistema di produzione deve essere in grado di aumentare di 4-5 volte la concentrazione basale delle piastrine di un paziente. Per concentrazioni più basse, si considera che il prodotto sia non conforme e che non ci si possa aspettare una completa efficacia clinica. Pertanto tecniche che non garantiscano questi parametri non verranno approvate.



Prelievo di sangue: 30-60 cc vengono prelevati dal sangue del paziente

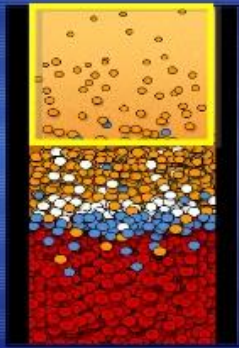
Separazione delle piastrine: il sangue viene messo in una centrifuga. La centrifuga separerà le piastrine dal resto del sangue



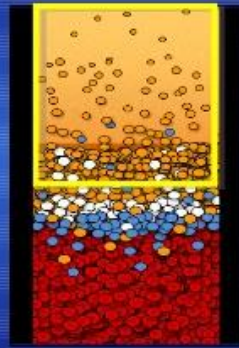
Estrazione del sangue ricco di piastrine (PRP): estrazione di 3-6 ml di PRP

Infiltrazione di PRP nella zona malata

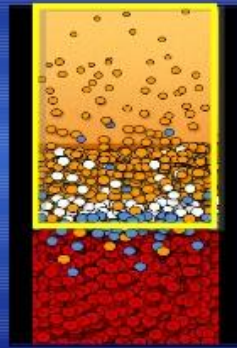
Diverse strategie terapeutiche



- Totale assenza di Leucociti
- Scarsa presenza di piastrine
- Bassa resa piastrinica

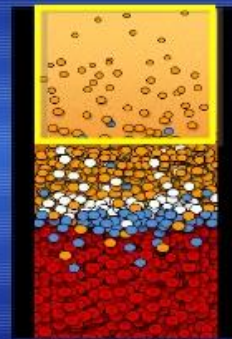


- Qualche presenza di Leucociti
- Buona presenza di piastrine
- Buona resa piastrinica



- Totale presenza di Leucociti
- Totale presenza di piastrine
- Totale resa piastrinica
- Contaminazione di rossi

Applicazioni cliniche



- Collirio per oculistici
- Wound Healing Ambulatoriale
- Biostimolazione Pelle



- Infiltrazioni intrarticolari
- Lesioni Muscolari
- Studi odontoiatrici
- Regenerative Medicine Low Cost



- Tendinopatie
- Rigenerazione Ossea
- Rigenerazione cartilaginea
- High Level TE



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Perché Utilizzare il PRP?

Mentre i concentrati cellulari da grasso o da midollo sono utilizzati essenzialmente per le loro potenzialità in ambito rigenerativo, **nei casi in cui si punti ad accentuare i fattori di crescita** è più opportuno il trattamento con Concentrato Piastrinico, anche detto Plasma Ricco di Piastrine o PRP. Il PRP si ottiene – tramite un semplice prelievo – dal sangue del paziente stesso, dal quale tramite centrifugazione viene recuperato **il Gel Piastrinico, un concentrato completamente naturale di notevole efficacia nell'accelerare la guarigione dei tessuti molli e nel ridurre infiammazioni e dolore post-operatorio.**

Le infiltrazioni con PRP possono essere eseguite sia in **ambulatorio** sia in **ambito chirurgico**, a seconda delle zone da trattare e delle specificità patologiche.

L'utilizzo di emocomponenti per uso non trasfusionale si è diffuso in diversi campi specialistici della medicina e della chirurgia. In relazione alle modalità di impiego degli emocomponenti ad uso non trasfusionale occorre distinguere:

- l'applicazione su superfici cutanee o mucose, **uso topico**;
- l'infiltrazione intra-tissutale o intra-articolare, **uso infiltrativo**;
- l'applicazione locale in sedi chirurgiche, **uso chirurgico**.



COME FUNZIONA IL PRP

- Concentrando i **Fattori di crescita naturali** del sangue (piastrine in piccoli volumi di plasma), si forniscono una grande quantità di biomolecole che partecipano attivamente in ogni fase della riparazione dei tessuti.
- Si inizia con il **processo infiammatorio** e si prosegue con la fase di **richiamo cellulare** e si conclude con il **rilascio di fattori di crescita**.
- I Fattori di crescita attivano meccanismi quali:
 - -la proliferazione
 - -la differenziazione
 - -l'angiogenesi
- **PORTANDO ALLA GUARIGIONE DELLE FERITE**

Ruolo del PRP nel meccanismo di guarigione delle ferite

I processi di riparazione vengono raggruppati in quattro fasi tra loro distinte, ma temporalmente in parte sovrapposte: **emostasi, infiammazione, Rigenerazione dei tessuti e rimodellamento dei tessuti**

FIG. 2 DAYS AFTER WOUNDING (LOG. SCALE)

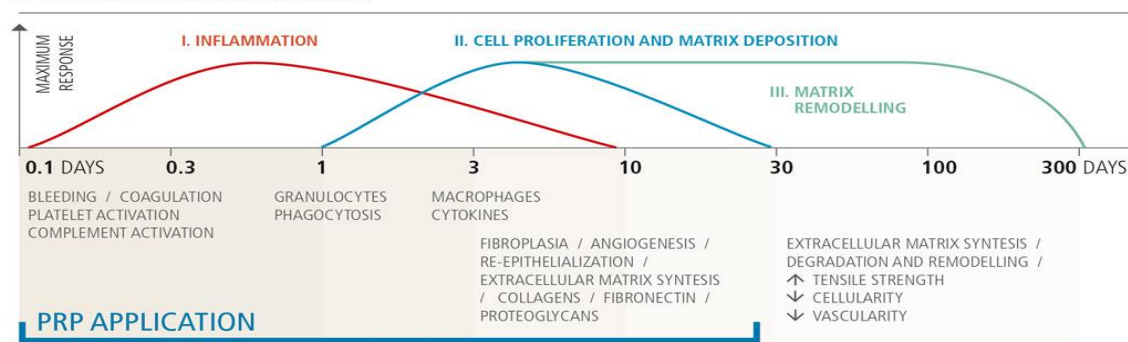


FIG. 3 TIME - BODY RESPONSE TO TISSUE INJURY

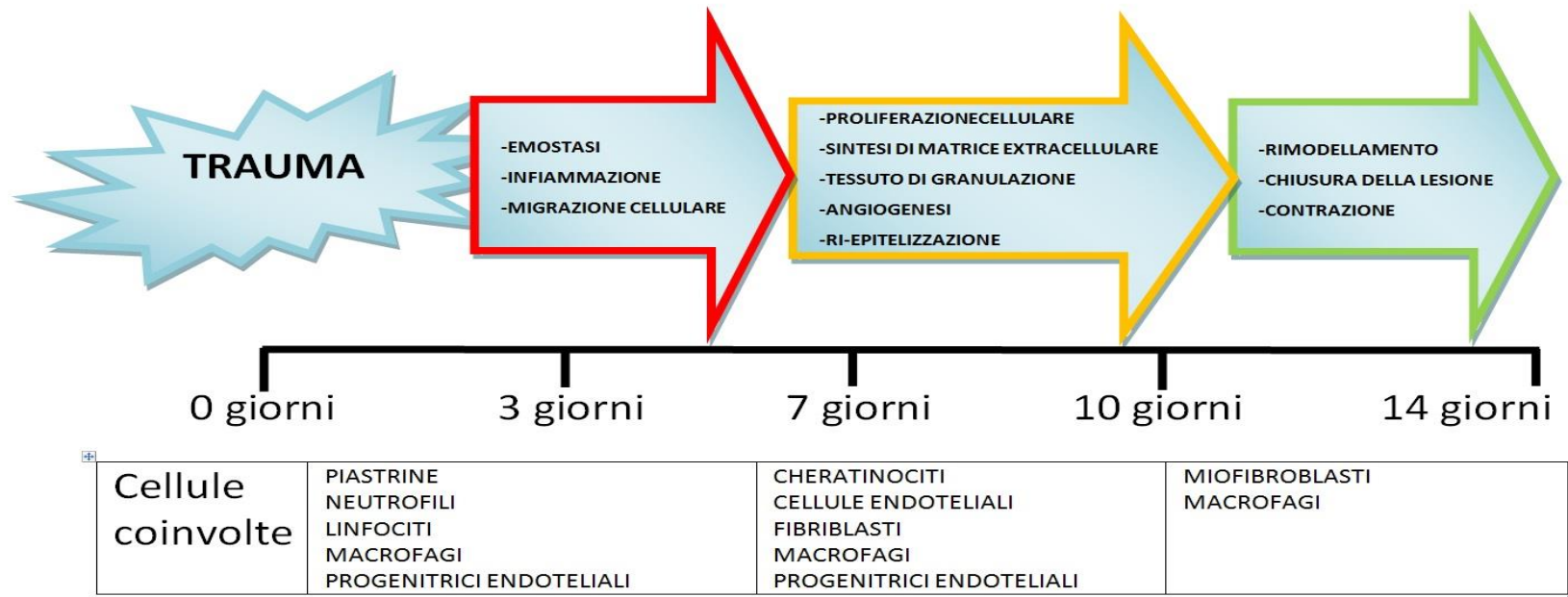


Recommendations of Italian Society for Transfusional Medicine and Immunology (SIMTI), May 2012.

-Il PRP agisce sull'infiammazione e sulla rigenerazione del tessuto durante il processo di guarigione

-Il Tempo di rigenerazione è ridotto, con conseguente riduzione del dolore e un miglioramento del recupero funzionale

Continuum di guarigione delle ferite



Fasi del meccanismo di riparazione:

TRAUMA

- formazione del tappo piastrinico
- attivazione della cascata della coagulazione
- degranolazione piastrinica seguita dal rilascio dei fattori di crescita

Nei primi 3 giorni del processo di guarigione ha inizio la fase **infiammatoria** per **migrazione di neutrofili e successivamente macrofagi** nel sito della ferita.

I **macrofagi attivati** rilasciano i fattori di crescita, in particolare TGF β , PDGF, IL-1 e FGF.

Le fasi di angiogenesi e fibroplasia sono seguite dalla sintesi del collagene, ri-epitelizzazione e rimodellamento.

Gli **effetti rigenerativi del PRP** sono fortemente correlati alla presenza di fattori di crescita:

- DGF (Platelet Derived Growth Factor)
- TGF (Transforming Growth Factor)
- VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)
- EGF (Epidermal Growth Factor)
- FGF (Fibroblast Growth Factor)
- IGF (Insulin - like Growth Factor)

MECCANISMI BIOLOGICI DELLE MSC

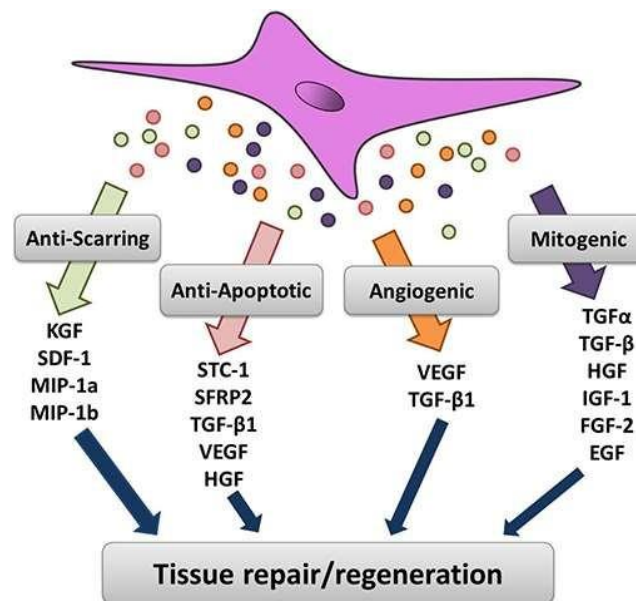
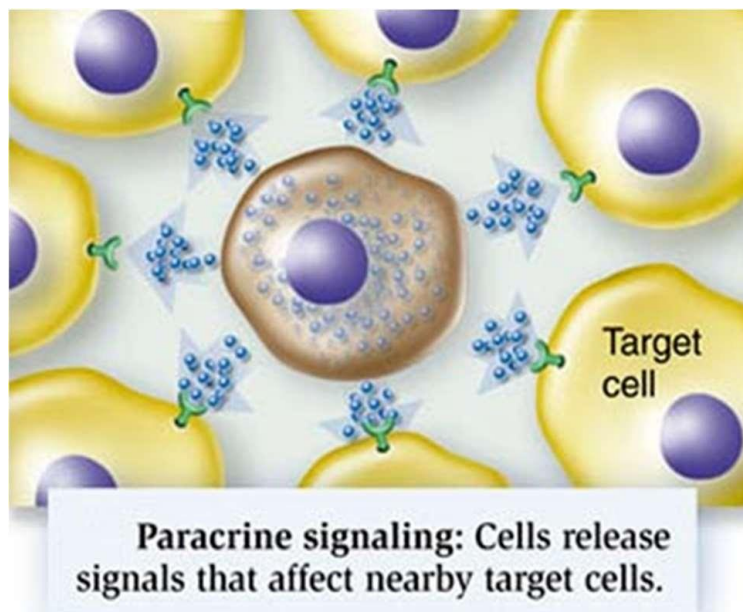
- Attività paracrina (secrezione molecole che modulano: la replicazione cellulare, l'inibizione dell'apoptosi, l'infiammazione, stimolano l'angiogenesi, regolano la deposizione di matrice extracellulare, la chemoattrazione cellulare, le funzioni del sistema immunitario)

SECRETOMI

- Produzione Microvescicole (particelle nanometriche, delimitate da doppio strato lipidico e contenenti componenti idrosolubili al loro interno: -stimolare direttamente le cellule bersaglio mediante recettori di membrana; -trasferire recettori o proteine alle cellule bersaglio modulandone capacità di risposta; -veicolare fattori di trascrizione mRNA inducendo cambiamenti funzionali in queste cellule)



RILASCIO DI FATTORI DI CRESCITA, CITOCINE, MOLECOLE MESSAGGERE



LE CELLULE RILASCIANO MOLECOLE CHE AGISCONO SULLE CELLULE CIRCOSTANTI

Il meccanismo d'azione è basato sull'effetto PARACRINO (anche per le staminali) e NON sul DIFFERENZIAMENTO

Caplan AI. New era of cell-based orthopedic therapies. Tissue Eng Part B Rev.2009;15:195–200c





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

