

**PROGETTI DI “RICERCA CORRENTE 2022”**  
**RELAZIONE FINALE**

**N. identificativo progetto: IZS LT 10/22 RC**

**Progetto presentato da:**

**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE**

**LAZIO E TOSCANA “M. ALEANDRI”**

**Area tematica: Sanità Animale**

**Titolo del progetto: Terapia Rigenerativa: utilizzo di cellule staminali mesenchimali per il recupero funzionale del tessuto mammario. Il modello delle mastiti negli ovini da latte.**

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute

**Responsabile Scientifico: Daniele Sagrafoli**

## SINTESI

**Titolo:** Terapia Rigenerativa: utilizzo di cellule staminali mesenchimali per il recupero funzionale del tessuto mammario. Il modello delle mastiti negli ovini da latte.

**Parole chiave:** Mastite, Cellule Staminali Mesenchimali (CSM), terapia rigenerativa

La mastite è una delle patologie più diffuse negli allevamenti da latte e comporta rilevanti perdite economiche e problemi legati a benessere animale, sicurezza alimentare e salute pubblica. È un processo infiammatorio-infettivo, generalmente di origine batterica: i batteri Gram-negativi provocano forme acute e gravi, mentre i Gram-positivi tendono a causare infezioni croniche e subcliniche. Il danno principale è la perdita irreversibile di tessuto secernente e la formazione di cicatrici, che riducono la produzione lattifera anche nelle lattazioni successive. La mastite può inoltre diminuire fertilità e aumentare il rischio di parti prematuri.

La terapia attuale è basata sugli antibiotici, efficaci contro l'infezione ma incapaci di rigenerare il tessuto mammario danneggiato. Per questo motivo cresce l'interesse verso approcci di medicina rigenerativa, in particolare la terapia cellulare con cellule staminali mesenchimali (CSM), già utilizzate con successo in altre specie. Le CSM, ottenibili da vari tessuti (midollo osseo, tessuto adiposo, cordone ombelicale), hanno capacità di differenziazione, proprietà antinfiammatorie e favoriscono la riparazione tissutale.

Le CSM da cordone ombelicale (cCSM) e da tessuto adiposo (aCSM) sono candidate ideali per il trattamento delle mastiti grazie alla bassa immunogenicità, alla facilità di reperimento e alla capacità di ridurre cicatrizzazione e apoptosi e stimolare la rigenerazione. Poiché è fondamentale intervenire rapidamente nella fase acuta, l'uso di CSM eterologhe/allogeneiche (pronte all'uso e conservate in banche cellulari) risulta particolarmente vantaggioso rispetto a quelle autologhe, che richiedono tempi di espansione più lunghi. Un approccio allogeneico permette inoltre di trattare animali in cui le CSM autologhe non sarebbero utilizzabili (età avanzata, difetti genetici o metabolici). Parallelamente, modelli sperimentali come organoidi e organ-chip e l'impiego di biomateriali aprono nuove prospettive nella ingegneria tissutale, facilitando la rigenerazione in modo meno invasivo e potenziando il self-repair dei tessuti.

Il progetto di ricerca ha valutato gli effetti rigenerativi delle CSM nella terapia intramammaria degli ovini con mastiti subcliniche, con l'obiettivo di sviluppare un trattamento efficace, rapido e innovativo. I risultati hanno portato alla creazione di una biobanca di cellule staminali mesenchimali ovine di alta qualità, sicure, vitali e caratterizzate, rappresentando una risorsa importante per la medicina rigenerativa veterinaria. Nello studio in campo, il trattamento con CSM si è rivelato sicuro: non ha modificato produzione di latte, mungibilità, composizione e qualità della

secrezione, né lo stato sanitario della mammella. Anche la flora batterica intramammaria è rimasta stabile, confermando che l'inoculo cellulare non interferisce negativamente con la fisiologia della ghiandola. Questi dati indicano che le CSM possono essere somministrate senza effetti collaterali nelle condizioni testate e confermano il potenziale rigenerativo di questo approccio.

Un aspetto emerso riguarda l'assenza di casi di mastite clinica, caratterizzati da un danno tissutale più marcato. Questo offre però l'opportunità di approfondire in studi futuri l'efficacia terapeutica delle cellule anche in condizioni patologiche più severe, dove la loro azione rigenerativa potrebbe manifestarsi in modo ancora più evidente. Nonostante ciò, il lavoro compiuto rappresenta un passo significativo verso l'applicazione clinica delle CSM in zootecnia e pone solide basi per indagini successive più ampie e mirate.

## SUMMARY

Title: Regenerative Therapy: Use of Mesenchymal Stem Cells for the Functional Recovery of Mammary Tissue. The Mastitis Model in Dairy Sheep

**Key words:** Mastitis, Mesenchymal stem cells, (MSCs), regenerative therapy

Mastitis is one of the most widespread diseases in dairy farms and leads to significant economic losses as well as issues related to animal welfare, food safety, and public health. It is an inflammatory–infectious process, generally of bacterial origin: Gram-negative bacteria cause acute and severe forms, while Gram-positive bacteria tend to induce chronic and subclinical infections. The main damage consists in the irreversible loss of secretory tissue and the formation of scarring, which reduces milk production even in subsequent lactations. Mastitis can also decrease fertility and increase the risk of premature births.

Current therapy is based on antibiotics, which are effective against infection but unable to regenerate damaged mammary tissue. For this reason, interest is growing in regenerative medicine approaches, particularly cell therapy with mesenchymal stem cells (MSCs), already successfully used in other species. MSCs can be obtained from various tissues (bone marrow, adipose tissue, umbilical cord), and possess differentiation capacity, anti-inflammatory properties, and the ability to promote tissue repair.

Umbilical cord-derived MSCs (cMSCs) and adipose-derived MSCs (aMSCs) are ideal candidates for the treatment of mastitis thanks to their low immunogenicity, ease of collection, and ability to reduce scarring and apoptosis while stimulating regeneration. Since rapid intervention during the acute phase is essential, the use of heterologous/allogeneic MSCs (ready-to-use and stored in cell banks) is particularly advantageous compared to autologous ones, which require longer expansion

times. An allogeneic approach also allows the treatment of animals for which autologous MSCs would not be suitable (advanced age, genetic or metabolic defects). At the same time, experimental models such as organoids, organ-on-chip systems, and the use of biomaterials open new perspectives in tissue engineering, enabling less invasive regeneration strategies and enhancing tissue self-repair.

The research project assessed the regenerative effects of MSCs in the intramammary treatment of sheep with subclinical mastitis, with the aim of developing an effective, rapid, and innovative therapy. The results led to the creation of a biobank of high-quality, safe, viable, and well-characterized ovine MSCs, representing an important resource for veterinary regenerative medicine. In the field trial, MSC treatment proved to be safe: it did not alter milk yield, milking performance, milk composition or quality, nor the health status of the udder. Intramammary bacterial flora also remained stable, confirming that cell inoculation does not negatively affect gland physiology. These findings indicate that MSCs can be administered without adverse effects under the tested conditions and support the regenerative potential of this approach.

An aspect that emerged concerns the absence of clinical mastitis cases, which are characterized by more pronounced tissue damage. However, this provides an opportunity for future studies to further investigate the therapeutic effectiveness of the cells even in more severe pathological conditions, where their regenerative action could become even more evident. Nevertheless, the work carried out represents a significant step toward the clinical application of MSCs in animal production and lays a solid foundation for broader and more targeted future investigations.

## **INTRODUZIONE**

Nei sistemi di allevamento dei principali animali da latte la mastite rappresenta una delle patologie più diffuse causando non solo importanti perdite economiche per l'intero settore lattiero-caseario ma anche risvolti di tipo sanitario in relazione al benessere animale, alla sicurezza alimentare e alla salute pubblica.

La mastite sia nella sua forma clinica che subclinica è definita come un processo infiammatorio-infettivo la cui principale causa è di origine batterica. I microrganismi Gram-negativi maggiormente causano una risposta infiammatoria acuta con segni clinici anche gravi, mentre i microrganismi Gram-positivi possono causare infezioni persistenti, talvolta con forme subcliniche che tendono alla cronicizzazione. Il danno causato alla ghiandola mammaria è principalmente una riduzione del tessuto alveolare secernente per aumentata apoptosi e un ispessimento del tessuto connettivo inter-alveolare per esito cicatriziale. Il recupero anatomico e

funzionale della mammella dopo un evento di mastite non è mai completo, con conseguente diminuzione della produzione di latte nella lattazione in corso, e talvolta anche in quella successiva. E' stato stimato che la riduzione del tessuto secretorio concorre per circa il 70% del costo complessivo dovuto alla mastite. In aggiunta, negli animali colpiti da mastite è possibile riscontrare anche una riduzione della fertilità e un aumento dell'incidenza di parti prematuri.

Attualmente, il trattamento della mastite ad eziologia infettiva si basa sull'uso di antibiotici in grado di controllare e/o inibire la crescita dei batteri responsabili dell'infezione della ghiandola mammaria. Tuttavia, la terapia antibiotica non interviene nella rigenerazione del tessuto ghiandolare mammario, la cui integrità è fondamentale in termini di produzione quantitativa e qualitativa di latte

Lo studio di nuovi modelli terapeutici come la Terapia Cellulare, che trova sempre più consensi scientifici e continui spazi di ricerca e di applicazione pratica nel campo della medicina rigenerativa, può rappresentare un approccio complementare nel trattamento delle diverse forme di mastite negli animali da latte. In ambito veterinario, le cellule staminali mesenchimali (CSM) sono ampiamente utilizzate con successo nel trattamento di varie malattie acute, croniche e degenerative negli animali d'affezione e nel cavallo sportivo, ma finora scarsamente applicate nel settore zootecnico.

Le CSM sono cellule che hanno una grande capacità di differenziarsi e riparare vari tessuti. Sono presenti in una moltitudine di tessuti come il tessuto adiposo, il midollo osseo, il cordone ombelicale, ecc.

In particolare, quelle derivate dal cordone ombelicale (cCSM) e dal tessuto adiposo (aCSM) sono candidate ideali per il trattamento delle mastiti, grazie alla plasticità, alla bassa immunogenicità, alla facilità di prelievo e all'alto potenziale antinfiammatorio. Inoltre, le CSM producono tipicamente mediatori bioattivi e molecole di adesione che aiutano a inibire la formazione di cicatrici e l'apoptosi, aumentano l'angiogenesi e stimolano le cellule progenitrici intrinseche a rigenerare la loro funzionalità.

In considerazione del grande impatto economico della mastite sugli allevamenti, lo scopo di questo progetto di ricerca è stato quello di valutare gli effetti rigenerativi delle CSM in una terapia cellulare intramammaria in ovini con un processo infiammatorio infettivo della ghiandola mammaria.

Nel caso di mastiti, risulta fondamentale l'inoculo di CSM nel sito della lesione in tempi brevi al fine di avere un ottimale recupero anatomico-funzionale della ghiandola mammaria. È evidente quanto lo sviluppo di una metodica in grado di azzerare il fattore tempo assuma notevole rilevanza in questa patologia, in cui è necessario intervenire in tempi rapidissimi. In questi casi, l'assenza di