



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI e SALUTE

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN: Scienze Veterinarie

CICLO: 30°

**Realizzazione di un protocollo di coltura *in vitro* di tessuto endometriale equino e studio dell'espressione di geni correlati alla produzione di citochine infiammatorie dopo co-coltura dei campioni con due diverse dosi di cellule staminali mesenchimali.**

**Coordinatore:** Ch.mo Prof. Alessandro Zotti

**Supervisore:** Ch.ma Prof.ssa Maria Elena Falomo

**Dottorando:** Melissa Rossi

## **INDICE**

|   |    |
|---|----|
| ABSTRACT  | 1  |
| ABSTRACT (English version)  | 3  |
| 1. CELLULE STAMINALI  | 5  |
| 1.1 Introduzione generale   | 6  |
| 1.2 Cellule Staminali Mesenchimali (MSCs)   | 8  |
| 1.2.1 Modalità d'azione delle MSCs  | 12 |
| 1.2.2 Effetti delle MSCs nell'infiammazione   | 13 |
| 2. USO TERAPEUTICO DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI<br>NEL CAVALLO                             | 18 |
| 2.1 Introduzione generale   | 19 |
| 2.2 Utilizzo delle MSCs nelle patologie uterine equine  | 20 |
| 2.3 La biopsia endometriale nel cavallo   | 21 |
| 2.4 Coltura <i>in vitro</i> di biopsie endometriali equine                                      | 28 |
| 3. OBIETTIVI  | 29 |
| 4. MATERIALI E METODI   | 31 |
| STUDIO I: Valutazione delle alterazioni nel tempo di biopsie uterine in coltura <i>in vitro</i> | 32 |
| A- STUDIO PRELIMINARE   | 32 |
| 4.A.1 Scelta degli animali e valutazione degli uteri  | 32 |
| 4.A.2 Prelievo, trattamento e trasporto del campione in laboratorio                             | 33 |
| B- STUDIO DEFINITIVO  | 34 |
| 4.B.1 Prelievo, trattamento e trasporto del campione in laboratorio                             | 34 |
| 4.B.2 Preparazione e messa in coltura dei campioni in laboratorio                               | 35 |
| 4.B.3 Valutazione delle biopsie   | 36 |
| 4.B.3.1 Valutazione della funzionalità mitocondriale tramite MTT assay                          | 36 |
| 4.B.3.2 Estrazione e quantificazione del DNA  | 37 |
| 4.B.3.3 Esame istologico  | 38 |
| STUDIO II: Co-coltura di biopsie incisionali e ADSCs  | 39 |
| 4.1 Produzione di ADSCs   | 39 |
| 4.1.1 Prelievo e trasporto di grasso in laboratorio   | 39 |
| 4.1.2 Estrazione di ADSCs   | 39 |
| 4.1.3 Coltura di ADSCs  | 40 |
| 4.1.4 Congelamento e scongelamento  | 41 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 4.1.5 | Caratterizzazione delle ADSCs mediante citofluorimetria   | 42  |
| 4.1.6 | Differenziazione trilineare di ADSCs  | 43  |
| 4.2   | Co-coltura <i>in vitro</i> di biopsie incisionali con ADSCs                                     | 45  |
| 4.2.1 | Produzione di biopsie incisionali   | 45  |
| 4.2.2 | Co-coltura di biopsie incisionali e ADSCs   | 45  |
| 4.3   | Creazione di librerie geniche per i fattori dell'infiammazione                                  | 47  |
| 4.3.1 | Estrazione, purificazione e quantificazione dell'RNA  | 47  |
| 4.3.2 | Retrotrascrizione dell'RNA  | 48  |
| 4.3.3 | Real Time PCR   | 49  |
| 5.    | ANALISI STATISTICA  | 53  |
|       | STUDIO I: Valutazione delle alterazioni nel tempo di biopsie uterine in coltura <i>in vitro</i> | 54  |
| 5.1   | MTT assay e quantificazione del DNA   | 54  |
| 5.2   | Esame istologico  | 55  |
|       | STUDIO II: Co-coltura di biopsie incisionali e ADSCs  | 56  |
| 6.    | RISULTATI   | 57  |
|       | STUDIO I: Valutazione delle alterazioni nel tempo di biopsie uterine in coltura <i>in vitro</i> | 58  |
| 6.1   | MTT assay   | 58  |
| 6.2   | Quantificazione del DNA   | 58  |
| 6.3   | Esame istologico  | 60  |
|       | STUDIO II: Co-coltura di biopsie incisionali e ADSCs  | 62  |
| 6.4   | Caratterizzazione delle ADSCs mediante citofluorimetria   | 62  |
| 6.5   | Analisi dei $\Delta\Delta C_T$ dei dati ottenuti dalle Real Time PCR                            | 63  |
| 6.5.1 | Analisi delle chemochine e dei loro recettori   | 63  |
| 6.5.2 | Analisi delle interleuchine e dei loro recettori  | 66  |
| 6.5.3 | Analisi di altre citochine e recettori  | 69  |
| 6.5.4 | Riassunto della sovra e sotto espressione dei geni per le varie citochine                       | 71  |
| 7.    | DISCUSSIONE   | 75  |
| 8.    | CONCLUSIONI   | 98  |
| 9.    | APPENDICE A: Protocolli di preparazione e valutazione di  | 101 |
|       | biopsie uterine equine  |     |
| 9.1   | Prelievo, trattamento e trasporto del campione in laboratorio                                   | 102 |
| 9.2   | Valutazione della funzionalità mitocondriale tramite MTT assay                                  | 103 |
| 9.3   | Estrazione e quantificazione del DNA  | 104 |

|   |     |
|---|-----|
| 9.4 Esame istologico  | 106 |
| 10. APPENDICE B: Protocolli di estrazione, coltura,<br>congelamento/scongelo e caratterizzazione di ADSCs | 108 |
| 10.1 Estrazione di ADSCs  | 109 |
| 10.2 Cambio di fiasca per le ADSCs  | 111 |
| 10.3. Congelamento e scongelamento di ADSCs   | 113 |
| 10.4 Caratterizzazione delle ADSCs mediante citofluorimetria  | 114 |
| 10.5 Differenziazione trilineare di ADSCs   | 116 |
| 11. APPENDICE C: Protocolli per la creazione di librerie geniche  | 120 |
| 11.1 Estrazione, purificazione e quantificazione dell'RNA   | 121 |
| 11.2 Retrotrascrizione dell'RNA   | 123 |
| 11.3 Real Time PCR  | 124 |
| 12. BIBLIOGRAFIA  | 125 |

## ABSTRACT

Negli ultimi decenni, nonostante si sia registrata un'intensa attività di ricerca nell'ambito della riproduzione equina, non si è verificato un significativo aumento della fertilità della popolazione. A oggi, le terapie disponibili per il trattamento di patologie della sfera riproduttiva sono limitate a pochi protocolli sia per le peculiarità di specie ma soprattutto per le difficoltà etiche, cliniche ed economiche che si devono affrontare per la sperimentazione di nuovi trattamenti *in vivo*. Un campione facilmente reperibile per eseguire tests da utilizzare in ambito riproduttivo è la biopsia endometriale; tuttavia, la mancanza di studi riguardanti il mantenimento della vitalità di questo tipo di campione quando coltivato *in vitro* rappresenta ancora un ostacolo. A questo scopo, il presente lavoro si è posto come primo obiettivo l'ideazione di un protocollo di coltura di tessuto endometriale equino e la valutazione della sopravvivenza di due diversi tipi di biopsia endometriale (incisionale ed escissionale) mediante stima dell'attività mitocondriale, della quantità di DNA e dell'aspetto istologico del campione a 3 e 7 giorni di coltura *in vitro* a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. I risultati dimostrano che con il protocollo testato le biopsie incisionali mantengono un livello adeguato di vitalità fino ai 3 giorni rappresentando un campione valido da utilizzare per prove *in vitro*. Inoltre, la metodica consente la valutazione di innovativi fronti terapeutici come quello delle cellule staminali mesenchimali (MSCs). Tali cellule si sono dimostrate capaci di favorire la rigenerazione tissutale e modulare i processi infiammatori. In quest'ottica le MSCs potrebbero trovare impiego nella terapia di cavalle affette da endometrite e/o endometriosi, patologie su base infiammatoria che rappresentano uno dei principali problemi in ambito riproduttivo andando a ridurre la fertilità dell'animale e ad aumentare i costi per gli allevatori. Tuttavia, le conoscenze riguardanti il loro meccanismo d'azione e il loro impiego pratico richiede ulteriori approfondimenti. A tal

scopo, la seconda parte di questo progetto ha valutato l'espressione di geni correlati alla produzione di citochine infiammatorie dopo co-coltura per 3 giorni di biopsie incisionali endometriali con due diverse dosi di cellule staminali equine di origine adiposa (ADSCs) ( $1 \times 10^5$  e  $3 \times 10^5$  cellule). I risultati, seppur preliminari, permettono di ipotizzare che la presenza delle ADSCs modifichi l'espressione di geni coinvolti nella produzione di citochine con effetto finale immunomodulante e con possibile attivazione di meccanismi anti-batterici e anti-fibrotici che potrebbero essere alla base del ripristino della funzionalità endometriale. Inoltre, per alcune citochine questo effetto immunomodulatorio sembra essere dose-dipendente e merita ulteriori approfondimenti.

## **ABSTRACT (English version)**

Despite the presence of an intense research in the field of the equine reproduction over recent decades, there has been no significant increase in the population's fertility. To date, few therapeutic protocols are available for the treatment of equine reproductive disorders because of the peculiarities of species but also for the ethical, clinical and economical reasons addressed to the *in vivo* tests. An easily obtainable sample for performing reliable *in vitro* tests is the endometrial biopsy; however, the lack of studies regarding the maintenance of the vitality for this sample is still an obstacle. For this purpose, the first aim of the present work has been the creation of a protocol for the culture of equine endometrial biopsies; moreover, we assessed the survival of two different kind of biopsy (incisional and excisional) by the estimation of mitochondrial activity, DNA quantity and the histology of the samples at 3 and 7 days of *in vitro* culture at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Results show that incisional biopsies maintain an adequate level of vitality up to 3 days, representing a valid sample to be used for *in vitro* testing. In addition, the method allows the evaluation of innovative therapies such as mesenchymal stem cells (MSCs). MSCs have been shown to support tissue regeneration and to modulate inflammatory processes. For these reasons, MSCs could be used in equine endometritis and/or endometriosis, inflammatory-based pathologies that represent one of the major reproductive diseases for horse because of reducing the fertility of the animal and increasing costs for breeders. However, further insights are needed to improve the knowledge about their mechanism of action and their practical use. On the light of that, the second aim of this project has been the evaluation of the expression of genes related to the production of inflammatory cytokines after co-culture for 3 days of incisional endometrial biopsies with two different doses of adipose derived stem cells (ADSCs) ( $1 \times 10^5$  and  $3 \times 10^5$  cells). The preliminary results allow us to hypothesize that

the presence of ADSCs modifies the expression of genes involved in the production of cytokines with an immunomodulatory effect and possible activation of anti-bacterial and anti-fibrotic mechanisms that could be the starting point for the restoration of damaged endometrium. In addition, for some cytokines this immunomodulatory effect seems to be dose-dependent and deserves further studies.



# 1. CELLULE STAMINALI

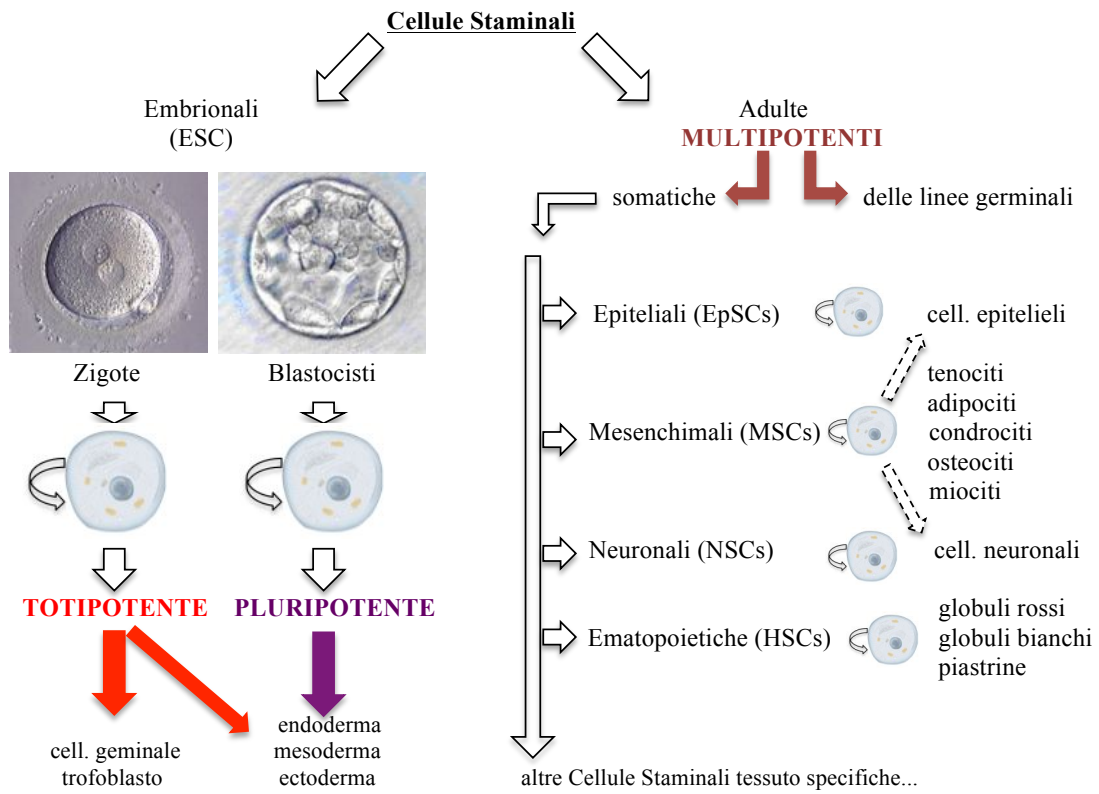
## 1.1 Introduzione Generale

L'uso scientifico del termine "cellule staminali" è stato proposto nel 1908. Le cellule staminali si ritrovano negli organismi multicellulari, vengono prodotte dal midollo osseo e, una volta mature, vengono rilasciate nel circolo periferico (Kumar et al., 2010). Sono cellule che posseggono la capacità di auto-replicarsi e andare incontro a numerosi cicli di divisione cellulare pur mantenendo uno stato indifferenziato; inoltre, possono essere espanse *in vitro* e, sotto determinate condizioni, dar luogo a diversi tipi cellulari (Koch et al., 2008; Mambelli et al., 2013). Si differenziano due tipi di cellule staminali:

- le cellule staminali embrionali che si rintracciano nelle blastocisti e che possono differenziarsi in tutti i tessuti embrionali
- le cellule staminali adulte che si rintracciano nei tessuti adulti già differenziati e hanno il compito di riparare i danni rimpiazzando le cellule specializzate e mantenendo un regolare *turn over* degli organi in continua rigenerazione (p.e. sangue, pelle) (Kumar et al., 2010).

L'abilità di differenziarsi è definita "potenza" ed è classificata in uni-, multi-, pluri- e toti- potenzialità (Figura 1). Le cellule staminali unipotenti sono le cellule staminali residenti di un determinato tessuto all'interno di un organo specifico e che hanno la capacità di differenziarsi in un unico tipo cellulare. Il termine multipotente indica la capacità delle cellule staminali di differenziarsi in un numero limitato di tipi cellulari all'interno di un tessuto (p.e. una cellula ematopoietica può svilupparsi in diversi tipi di cellule del sangue ma non può differenziarsi in tipi cellulari non tipici di quel tessuto). Le cellule staminali embrionali sono definite come pluripotenti poiché sono in grado di differenziarsi in un qualsiasi tessuto derivante dai tre strati germinali, in linea di principio possono dare origine a tutto l'organismo ma non a tessuti extraembrionali (p.e. placenta). Una cellula staminale totipotente è in grado di originare ogni cellula

dell'organismo, inclusi i tessuti extra-embryonari, quelli fetali e l'unità placentare. L'unico tipo cellulare totipotente conosciuto fino ad oggi è lo zigote ma si possono considerare totipotenti anche le cellule in una primissima fase di sviluppo embrionale (Koch et al., 2008).



**Figura 1.** Classificazione delle cellule staminali in base alla loro potenzialità.

## **1.2 Cellule Staminali Mesenchimali (MSCs):**

Le MSCs sono state rintracciate per la prima volta nel midollo osseo (Fortier et al., 1998; Renzi et al., 2013). Sono cellule multipotenti, di origine mesodermica, che possiedono un potenziale di differenziazione trilineare in cellule della linea adipogenica, osteogenica e condrogenica (Figura 1). Possono essere isolate da diversi tessuti ed espanse *in vitro* (Koch et al., 2008; Mambelli et al., 2013). Hanno una forma a fuso e crescono in mono strati ma possono mostrare una morfologia cellulare varia. Possono apparire molto snelle e allungate o più cuboidali con estensioni citoplasmatiche più corte (De Schauwer et al., 2011). Le MSCs sono:

- altamente proliferative
- aderenti alla plastica
- capaci di rinnovare loro stesse e dar luogo a tipi cellulari differenziati (Carrade et al., 2012; Mambelli et al., 2013; Marx et al., 2015; Schwarz et al., 2012).

Queste cellule sono state isolate da numerose specie, incluse: uomo, roditori, cani, conigli e cavalli (Penny et al., 2012), e possono essere facilmente raccolte da diverse fonti come: il midollo osseo, il sangue, il grasso, la membrana amniotica, il sangue del cordone ombelicale, la cornea, il derma, l'epidermide, i follicoli piliferi, le blastocisti, ecc. (Broeckx et al., 2015; Carrade et al., 2012; Carvalho et al., 2013; Corradetti et al., 2014; Kang et al., 2013; Koch et al., 2008, 2007; A Lange-Consiglio et al., 2013; Lopez and Jarazo, 2015; Mambelli et al., 2009; Moriyama et al., 2014; Seo et al., 2013; Vidal et al., 2007). Nonostante vi siano diverse fonti da cui estrarre le MSCs, il tessuto adiposo rappresenta quella preferibile vista la relativa abbondanza e la facilità di prelievo (Mambelli et al., 2009; Schwarz et al., 2011). Inoltre, le MSCs derivate da tessuto adiposo (ADSCs) presentano capacità proliferative e potenziale di differenziamento simile a quelle che originano dal midollo osseo (BMSCs) (Mambelli

et al., 2009). Nel cavallo è riportata anche l'estrazione di MSCs derivanti da sangue periferico; tuttavia, l'utilizzo di questa fonte permette di ottenere solo un limitato numero di cellule con capacità proliferativa e vitalità post scongelamento inferiore rispetto agli altri tipi di MSCs (Mambelli et al., 2009).

Nel cavallo, l'adesività alla plastica è l'unico metodo comunemente impiegato per separare le MSCs dagli altri tipi cellulari (Corradetti et al., 2014; Ferris et al., 2014) e l'analisi dell'espressione dei markers di superficie per le MSCs equine è ancora poco standardizzata. L'identificazione di uno o più markers che identificano positivamente le MSCs equine è difficoltosa per due motivi:

- ci sono differenze interspecifiche nell'espressione dei markers superficiali
- l'espressione dei markers di superficie varia a seconda del tempo di cultura delle MSCs (Carvalho et al., 2013).

Ad oggi, non vi è ancora una linea guida principale per l'identificazione delle MSCs equine; comunque, alcuni autori richiedono la caratterizzazione delle MSCs mediante la valutazione di markers multipli al citofluorimetro e mediante differenziazione trilineare in cellule della linea adipogenica, osteogenica e condrogenica (Carvalho et al., 2013).

Come caratteristiche di base, le MSCs isolate:

- devono essere aderenti alla plastica in condizioni di coltura standard, l'aderenza si presenza <48 h
- dovrebbero essere in grado di svolgere differenziazione trilineare quando debitamente stimulate
- dovrebbero rispondere positivamente ai markers CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, e negativamente a CD14, CD31, CD45, CD79, MHC-II (Braun et al., 2010; Carvalho et al., 2013; De Mattos Carvalho et al., 2011; Marx et al., 2015; Pascucci

et al., 2011; Raabe et al., 2011; Ranera et al., 2012). Tuttavia, l'espressione di alcuni markers dipende da fattori multipli ed è possibile che alcuni siano presenti in cellule appena isolate ma vengano persi lungo la coltura *in vitro* (Marx et al., 2015). Per esempio, è dimostrato che alcuni markers di superficie, precisamente il CD44 e il CD90, possono essere danneggiati dalla tripsina o dallo stoccaggio provocando una perdita di funzione o la loro rimozione. Tuttavia, CD44 sembra essere l'unico marker di superficie fortemente positivo in cellule staminali derivanti da tutte le fonti (Iacono et al., 2015; Mercati et al., 2014). Inoltre, la positività al CD44 è fortemente correlata alla mancanza di espressione dell'MHC-II, meccanismo che permette alle cellule staminali di non essere riconosciute e attaccate in un organismo non self (De Schauwer et al., 2012). Tra quelli citati, i principali markers utilizzati per la caratterizzazione delle ADSCs sono il: CD29, CD44, CD90, CD105 e MHC-II (Carvalho et al., 2013). Il CD90 viene espresso in più del 90% delle ADSCs equine (Carvalho et al., 2013). Gli studi condotti sui markers di superficie delle ADSCs equine sono riassunti in Tabella 1.

| Authors                                | Markers (%) |       |       |       |       |       |       |        |         |                               |
|--|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|---------|-------------------------------|
|  | CD 14       | CD 29 | CD 34 | CD 44 | CD 45 | CD 73 | CD 90 | CD 105 | MH C II | Others                        |
| <b>De Mattos Carvalho et al., 2009</b> |             |       |       | 70.3  |       |       | 95.1  |        |         | CD13: 6.3                     |
| <b>Brahun et al., 2010*</b>            | +           |       | -     |       | ±     | -     | +     | +      |         |                               |
| <b>Pascucci et al., 2011</b>           |             |       |       | 79    |       |       | 93.5  |        |         | STRO-1: 24.7                  |
| <b>Raabe et al., 2011</b>              |             |       |       |       |       |       | 99    |        |         |                               |
| <b>Ranera et al., 2011</b>             |             | 97.2  |       |       | 0.07  |       | 95.1  |        |         |                               |
| <b>Carrade et al., 2012</b>            |             | 92.2  |       | 94.6  |       |       | 91.3  |        | -       | CD86: -<br>F6B: -<br>MHC-I: - |
| <b>Carvalho et al., 2013</b>           |             |       |       | 64.3  |       |       | 90.5  | 45.8   | 1       |                               |
| <b>Barberini et al., 2014</b>          |             |       | 1.2   | 92.4  |       |       | 99.2  | 94.2   | 3.8     |                               |
| <b>Iacono et al., 2015</b>             | 0.6         |       | 5.8   | 91.9  | 3     | 0.2   | 69.5  | 70.5   |         |                               |

\*Studi in cui viene riportata solo un'espressione evidente (+), debole (±) o assente (-).

**Tabella 1.** Espressione dei markers di superficie in ADSCs equine valutata mediante citofluorimetria in studi precedenti.

### ***1.2.1 Modalità d'azione delle MSCs:***

Le MSCs sono utilizzate in campo clinico per trattare problemi degenerativi, immuno-mediati e infiammatori nell'uomo ma anche nel cavallo e in altre specie (Carrade et al., 2012; Mambelli et al., 2013). Una volta inoculate, le MSCs agiscono principalmente in tre modi:

- integrazione diretta nel tessuto contribuendo al rimodellamento e alla rigenerazione fisica e funzionale mediante meccanismi multipli come l'attecchimento e la differenziazione
- immunosoppressione dei linfociti
- secrezione di molecole bioattive (Koch et al., 2008).

Queste molecole bioattive posseggono effetto trofico, anti-apoptotico, angiogenico, anti-cicatriziale e immunomodulatore (Eirin et al., 2014; Mambelli et al., 2014; Marx et al., 2015). Sono rilasciate in vescicole definite "extracellulari" (extracellular vesicles o EVs) che sono classificate in:

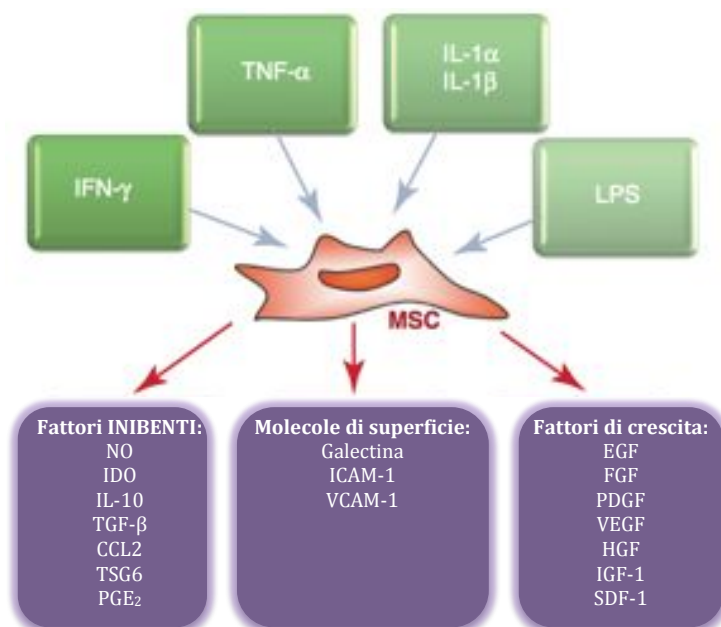
- esosomi: prendono origine dall'interno della membrana endosomiale, si accumulano in corpi multivescicolari e vengono secreti attraverso il processo di esocitosi, dimensioni di 10–120 nm
- microvescicole o vescicole sparse: derivano dalla membrana plasmatica, dimensioni di 80–1000 nm (Eirin et al., 2014; Tetta et al., 2012).

Il liquido contenente le EVs viene definito "medium condizionato" (conditioned medium o CM) ed è stato positivamente utilizzato nel trattamento *in vivo* di lesioni tendinee e legamentose nel cavallo (Anna Lange-Consiglio et al., 2013) spostando il focus su un suo possibile utilizzo come terapia rigenerativa cell-free.

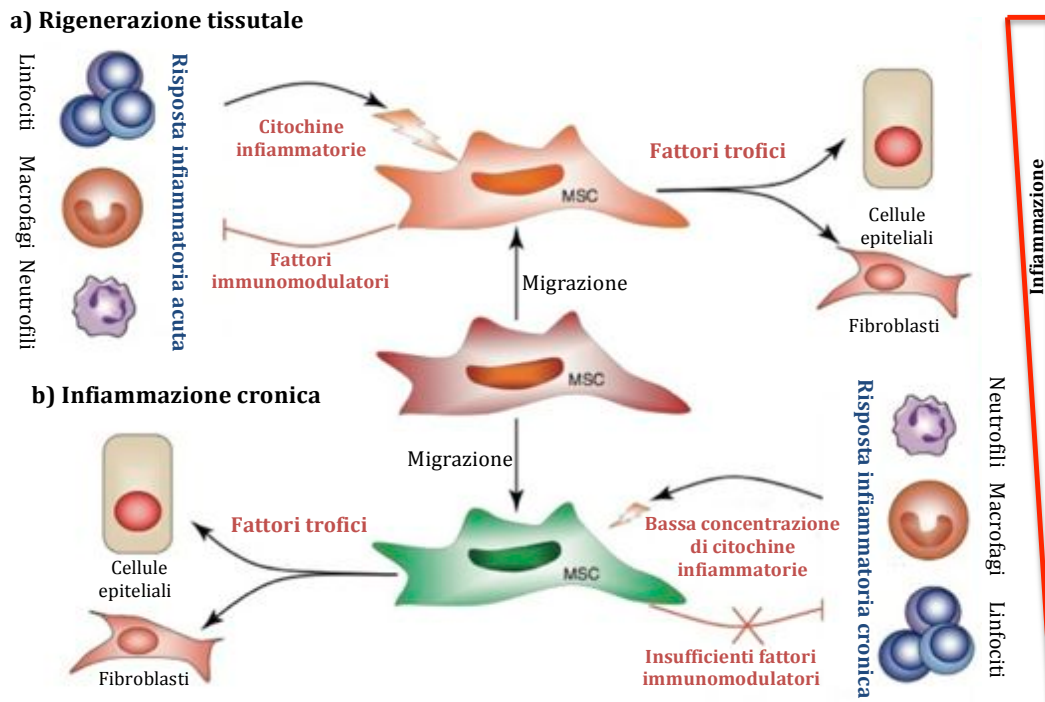


### 1.2.2 Effetti delle MSCs nell'infiammazione:

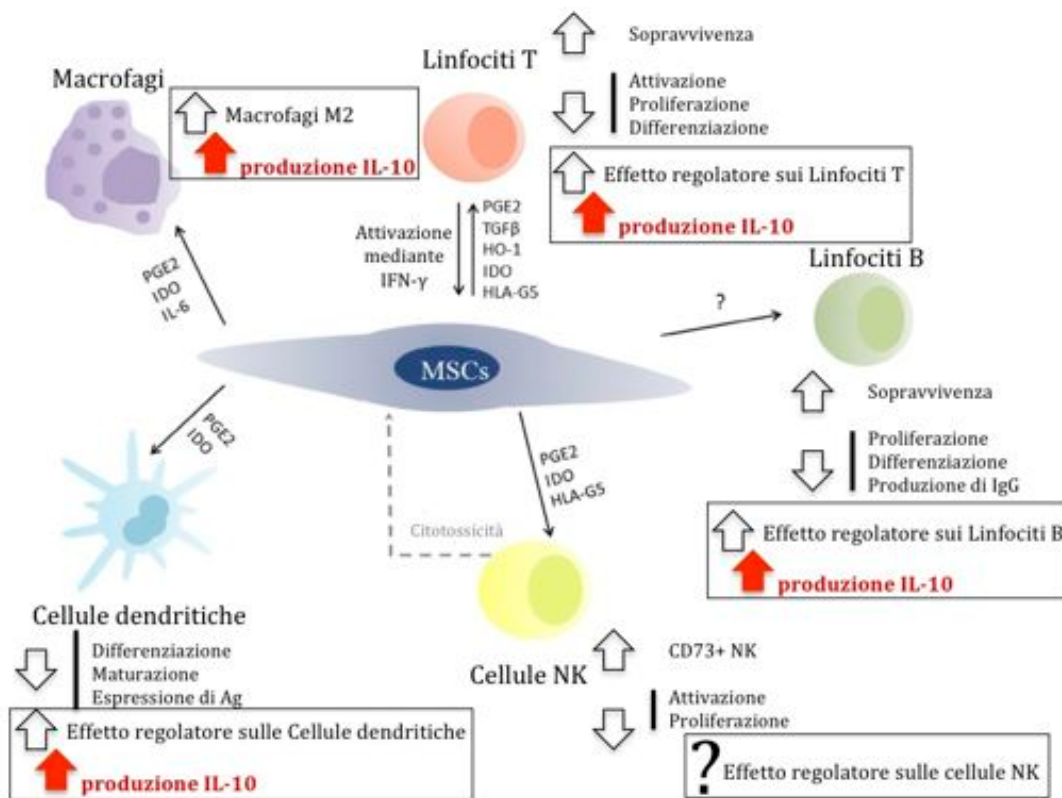
Il verificarsi di un danno tissutale provoca una serie di reazioni che favoriscono l'aumento della permeabilità dei vasi con conseguente infiltrazione di macrofagi, neutrofilili, Linfociti B, Linfociti T CD4+ e CD8+, e altri tipi cellulari. A seguito del meccanismo di fagocitosi, che permette la "pulizia" dell'area danneggiata, avviene il rilascio di molecole pro infiammatorie come: il TNF $\alpha$ , l'IL1, varie chemochine e leucotrieni (Shi et al., 2012). Nell'area danneggiata cominciano ad affluire anche le MSCs provenienti dal midollo osseo. Il rilascio di TNF $\alpha$  e l'IFN $\gamma$  causa l'attivazione e la stimolazione delle MSCs che cominciano a rilasciare diversi fattori di crescita tra cui quello per l'epidermide (EGF), per i fibroblasti (FGF) e per l'endotelio vascolare (VEGF) (Kol et al., 2013; Shi et al., 2012) (Figura 2). Le molecole rilasciate dalle MSCs svolgono un ruolo fondamentale nella modulazione della risposta infiammatoria e nella rigenerazione del tessuto (Figura 3).



**Figura 2.** Attivazione delle MSCs da parte di alcuni fattori dell'infiammazione, con conseguente: i) rilascio di fattori immunosoppressivi, ii) alterata espressione di molecole di superficie, iii) produzione di fattori di crescita.



**Figura 3.** Rappresentazione schematica del ruolo delle MSCs nella rigenerazione tissutale e nell'infiammazione cronica.



**Figura 4.** Azione di regolazione di vari tipi cellulare da parte delle MSCs.

In particolar modo, le MSCs possono ostacolare l'azione di: Linfociti B, Linfociti T, cellule natural killer (NK) e di cellule che presentano antigeni superficiali (antigen-presenting cell o APCs) (Najar et al., 2016) (Figura 4). Il TGF- $\beta$ 1 è prodotto dalle MSCs equine indipendentemente dalla loro attivazione, inoltre la sua quantità non aumenta a seguito dell'attivazione delle cellule. Invece, quando attivate, le MSCs producono PGE2 e IL6 che svolgono un effetto inibitorio sulla proliferazione dei linfociti T e regolano la produzione delle citochine TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  e di altre molecole come: IL10, HLA-G, LIF, IL1Ra, e iNOS (Carrade et al., 2012; Ferris et al., 2014). L'IL10, indotta dalle PGE2, svolge un ruolo principale nella modulazione della risposta infiammatoria effettuata dalle MSCs (Najar et al., 2016) mentre l'IL6 sembra influenzare drammaticamente la natura della risposta immunitaria dettando l'assunzione, l'attivazione e la clearance apoptotica delle singole sub-popolazioni di leucociti (p.e. neutrofili, monociti e linfociti); quest'interleuchina ha un effetto anti infiammatorio durante l'infiammazione acuta (Gabay, 2006).

Tuttavia, ci sono alcune variazioni tra MSCs originate da fonti diverse; per esempio, il monossido di azoto (NO) viene secreto solo da MSCs derivanti da midollo osseo o sangue di cordone ombelicale, ma non da quelle derivanti da tessuto adiposo o da tessuti del cordone ombelicale; inoltre, questa molecola agisce solo entro distanze ridotte a qualche diametro cellulare (Carrade et al., 2012; Shi et al., 2012). Per sopperire a questa "limitata" funzione immunosoppressiva dell'NO, le MSCs producono molecole di adesione come: CXCR3-ligand chemokine, CCR5-ligand chemokine, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 e il vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1. Grazie alla loro attività, le cellule infiammatorie vengono accumulate in prossimità delle MSCs dove si trova una più alta concentrazione di NO che può sopprimere la risposta

infiammatoria (Shi et al., 2012). Quest'attività di "attrazione" verso le molecole infiammatorie è sfruttata anche dall'indoleamina 2,3-diossigenasi (IDO). L'IDO è un enzima che catalizza la conversione dell'aminoacido essenziale triptofano in chinurenina. La sua proprietà immunosoppressiva è legata al fatto che riduce il triptofano, indispensabile per la proliferazione e l'espansione dei linfociti T, e produce metaboliti che possono causare l'apoptosi dei linfociti T (Mellor and Munn, 2004; Shi et al., 2012). L'effetto dannoso nei confronti dei linfociti T sembra essere rafforzato dalla produzione congiunta di PGF2 che svolge un ruolo inibente verso la proliferazione, la citotossicità e la produzione di citochine da parte delle cellule NK (Shi et al., 2012). Inoltre, l'IDO sembra stimolare la produzione di Macrofagi M2, di tipo anti infiammatorio, che a loro volta svolgono un importante effetto immunosoppressivo verso i Linfociti T (Najar et al., 2016).

Altri effetti immunosoppressivi svolti dalle MSCs, o dalle molecole prodotte da esse, sono:

- inibizione del recettore Toll-like receptor (TLR)2/NF-kB dei macrofagi da parte del TSG6
- inibizione della produzione di IL17 secreto dai linfociti T attivati e dell'immunoglobuline prodotte dalle plasma cellule da parte del CCL2
- induzione dell'IL10, potente citochina anti-infiammatoria
- produzione di molecole inibitorie come: PD-L1, HO-1, LIF, galectine e TGF- $\beta$  (Shi et al., 2012).

Le cellule staminali derivanti dalla membrana amniotica (AMSCs) sono capaci di inibire la proliferazione delle cellule mononucleate del circolo periferico (PBMC) sia quando sono in contatto con esse sia quando sono separate da una membrana semi

permeabile. Inoltre, l'effetto inibitorio sulle PBMC viene amplificato all'aumentare del numero di AMSCs utilizzate, suggerendo un effetto dose-dipendente (Anna Lange-Consiglio et al., 2013).

Nonostante le differenze citate, le cellule che derivano dal midollo osseo, dal tessuto adiposo, dal sangue del cordone ombelicale e dal tessuto del cordone ombelicale presentano caratteristiche e funzioni simili *in vitro* (Barberini et al., 2014; Carrade et al., 2012). Tuttavia, sono richiesti ulteriori studi per poter comprendere in modo più esaustivo il modo in cui le MSCs interagiscono con le molecole che regolano il processo infiammatorio.

2. USO TERAPEUTICO DI  
CELLULE STAMINALI  
MESENCHIMALI  
NEL CAVALLO

## 2.1 Introduzione generale

A oggi, le cellule staminali sono considerate un promettente aiuto terapeutico grazie alla loro abilità di:

- non essere rigettate dai tessuti anche se allogeniche (non self, cioè derivanti da un soggetto diverso da quello in cui si andranno ad utilizzare)
- aumentare la vascolarizzazione, favorendo la guarigione piuttosto che la cicatrizzazione
- riparare i danni ai tessuti mediante auto replicazione, secrezione di fattori di crescita e molecole bioattive (Broeckx et al., 2015; Burk et al., 2013; Carrade et al., 2012; Mambelli et al., 2009; Pacini et al., 2007; Renzi et al., 2013; Schnabel et al., 2013; Schwarz et al., 2011).

Tuttavia, in Italia è consentito soltanto l'utilizzo di cellule autologhe (self) cioè derivanti dallo stesso soggetto nel quale si andrà ad effettuare il trattamento ("Linee guida concernenti i requisiti sanitari minimi per l'impiego delle cellule staminali in medicina veterinaria", repertorio atti n. 147/CSR, 13A09488, GU Serie Generale n.277 del 26-11-2013). L'utilizzo di cellule autologhe ha come conseguenza un ritardo nell'attuazione della terapia di almeno 2-3 settimane necessarie all'estrazione, l'isolamento e l'espansione delle cellule *in vitro*. In uno studio recente sull'utilizzo di cellule staminali di origine epiteliale utilizzate come trattamento di ferite cutanee, è stato registrato un aumento di velocità della guarigione conseguentemente all'utilizzo di cellule autologhe piuttosto che allogeniche. Tuttavia, gli autori concludono che gli effetti delle cellule sono simili, indipendentemente dalla loro origine, e che è necessario tenere in considerazione che l'utilizzo di cellule autologhe, anche se velocizza il processo, richiede del tempo per la produzione delle cellule come indicato precedentemente (Broeckx et al., 2015). Inoltre, la possibilità di utilizzare cellule staminali allogeniche

permetterebbe l'utilizzo di cellule che posseggono un miglior effetto terapeutico, come quelle provenienti da animali giovani o da tessuti fetali, in soggetti anziani (Watts, 2014).

Attualmente, l'uso di MSCs nel cavallo è implicato nel trattamento di lesioni sportive come: artriti, lesioni tendinee, lesioni o rotture del legamento sospensore del nodello o a ferite cutanee. Le dosi di cellule staminali che hanno apportato miglioramenti sono di  $1-3 \times 10^6$  cellule per cm di diametro di una lesione tendinea e  $15 \times 10^6$  cellule in articolazione (Carter-Arnold et al., 2014; Pigott et al., 2013). Per quanto riguarda le lesioni tendinee, l'inoculazione di MSCs nella sede della lesione migliora la deposizione di ECM con un miglior rapporto tra collagene I e III e un miglior orientamento delle fibre (Schwarz et al., 2011).

Per le abilità elencate nelle pagine precedenti e per i risultati conseguiti in diversi tessuti, diventa sempre più immaginabile un utilizzo delle cellule staminali in campo riproduttivo equino.

## **2.2 Utilizzo delle MSCs nelle patologie uterine equine**

L'endometrite è una comune causa di infertilità nella cavalla ed è stata riportata come una delle tre principali patologie di questa specie assieme alle coliche e ai problemi respiratori (Troedsson, 1999). Rasmussen et al. (2015) hanno dimostrato come il 28.6% delle cavalle clinicamente normali, in realtà siano affette da endometrite sub-clinica (Rasmussen et al., 2015). Questa patologia è caratterizzata da un'inflammatione dell'endometrio che riduce la fertilità dell'animale (Schlafer, 2007; Watson, 2000) causando: impossibilità al concepimento, morte embrionale precoce, accorciamento



della fase luteinica con estri irregolari (Diel de Amorim et al., 2016). A seconda della sua eziologia, l'endometrite viene così suddivisa:

- Endometrite post-coitale persistente (persistent mating-induced endometritis: PMIE)
- Endometriosi (endometrite degenerativa cronica)
- Malattie sessualmente trasmissibili
- Endometriti infettive croniche.

Diverse terapie possono essere messe in atto per risolvere i processi infiammatori dell'utero equino; tuttavia, questi non sono sempre risolutivi e per l'endometriosi, patologia degenerativa e progressiva associata all'età e caratterizzata da fibrosi endometriale, non ci sono trattamenti efficaci e le lesioni che si vengono a creare sono considerate irreversibili (Abd-Elnaeim et al., 2006; Falomo et al., 2015; Mambelli et al., 2013). Il meccanismo alla base dello sviluppo dell'endometriosi nella cavalla non è ancora del tutto chiaro (Cadario et al., 2002) anche se processi infiammatori e traumi giocano ruoli importanti (Kovacs and DiPietro, 1994). Questa patologia viene diagnosticata tramite esame istologico di biopsie uterine e, in base alle lesioni riscontrate, le cavalle possono rientrare in quattro categorie:

- I (endometrio normale): nessun segno di fibrosi o ipoplasia ghiandolare. Eventuali alterazioni infiammatorie di lieve entità. Possibilità di gravidanza a termine 90%
- IIa (lieve endometriosi): moderata infiltrazione nello strato compatto. La fibrosi riguarda ramificazioni ghiandolari con  $n^{\circ} < 2$  nidi fibrotici per campo, moderata distensione cistica ghiandolare e presenza di alcune lacune linfatiche. Possibilità di gravidanza a termine 40-50%
- IIb (moderata endometriosi): diffusa moderata infiltrazione dello strato compatto. La fibrosi è più accentuata con  $n^{\circ} 2-4$  nidi fibrotici per campo e occasionali lacune

linfatiche. Distensione e atrofia ghiandolare più evidenti. Possibilità di gravidanza a termine 10-40%

- III (severa endometriosi): flogosi diffusa con grave infiltrazione dello strato compatto. Fibrosi diffusa con nidi fibrotici in numero >4. Diffusa e severa degenerazione cistica, atrofia ghiandolare e presenza di molte lacune linfatiche. Possibilità di gravidanza a termine minore del 10% (Keller et al., 2006; Snider et al., 2011).

Per il loro effetto sulla risposta infiammatoria e sul rimodellamento/guarigione dei tessuti danneggiati, si è cominciato a valutare l'utilizzo delle MSCs come possibile terapia per i vari tipi di endometrite equina.

Il primo studio sull'utilizzo delle MSCs nell'utero equino è stato svolto da Mambelli et al. (2013). ADSCs equine allogeniche, marcate con un colorante a fluorescenza, sono state inoculate nell'utero di alcune cavalle con una tecnica simile a quella dell'inseminazione artificiale (AI) (Mambelli et al., 2013). Lo studio è stato condotto in 6 cavalle con endometriosi: 3 appartenenti alla classe IIb e 3 alla classe III; una cavalla di ciascuna classe è stata usata come controllo. La cavalla di controllo ha ricevuto un'infusione di 20 mL di soluzione fisiologica al 0.9% mentre le altre cavalle hanno ricevuto un'infusione contenente  $2 \times 10^7$  cellule staminali marcate e diluite in 20 mL di soluzione fisiologica al 0.9%; per entrambi i gruppi sono stati inoculati 10 mL per ogni corno uterino. Dopo il trattamento, la presenza delle cellule staminali è stata rilevata mediante il rintracciamento della fluorescenza tramite microscopio su biopsie del corpo e di entrambe le corna uterine; i prelievi sono stati eseguiti dopo 7, 21 e 60 giorni dal trattamento. Nessuna fluorescenza è stata rintracciata dopo i 60 giorni, fenomeno

ascritto alla diluizione del colorante a seguito della divisione cellulare. Alla valutazione delle biopsie prelevate a 7 e 21 giorni post trattamento, delle 4 cavalle trattate, 3 hanno presentato fluorescenza in tutti i campioni. La quarta cavalla, colpita da una severa endometriosi, non ha mostrato alcuna fluorescenza. Nessuna fluorescenza è stata rintracciata nel gruppo controllo. L'esame istopatologico e immunohistochimico eseguito sui campioni ha evidenziato un positivo rimodellamento dei tessuti nelle cavalle che hanno ricevuto il trattamento con le ADSCs dimostrando che le cellule staminali sono in grado di integrarsi nel tessuto uterino equino. A seguito della mancanza di fluorescenza nella cavalla colpita da una grave endometriosi, gli autori hanno concluso che l'adesione e l'attività delle cellule staminali in tessuti fortemente compromessi appare ridotta o addirittura assente per l'incapacità delle stesse di integrarsi al tessuto.

Uno studio successivo, svolto usando la stessa tecnica, è stato effettuato nel 2014 per valutare l'espressione di alcune proteine correlate con l'endometriosi (Laminina, Vimentina, antigene ki-67,  $\alpha$ -SMA e CK18) prima e dopo il trattamento con ADSCs (Mambelli et al., 2014). Gli autori hanno usato cavalle con le stesse caratteristiche dello studio precedente, sempre divise in 2 gruppi a seconda dello stato di endometriosi e utilizzando una cavalla per gruppo come controllo. Il grado di espressione delle proteine sopra citate è stato valutato prima e dopo il trattamento con ADSCs mediante il prelievo di biopsie uterine. I risultati hanno dimostrato che le ADSCs sono in grado di modulare l'espressione di queste proteine. Infatti, nel confronto tra il gruppo controllo e quello dei trattati la Vimentina, la  $\alpha$ -SMA e il CK18 sono risultate non più espresse mentre l'espressione della Laminina subiva modificazione a partire dai 21 giorni post trattamento e non veniva più rintracciata dopo 60 giorni dal trattamento. Anche in questo studio, sono stati confermati gli effetti positivi delle ADSCs nell'aspetto istologico del tessuto endometriale.

L'effetto delle cellule staminali sul processo infiammatorio uterino equino è stato approfondito nello studio di Falomo et al. (2015) attraverso uno studio *in vitro*. Gli autori hanno analizzato l'espressione di alcune proteine coinvolte nel processo infiammatorio (ACTB, IL10, IL1Ra, IL1 $\beta$ , IL6, IL8, MMP14, MMP2, MMP9, TIMP-2 and TNF $\alpha$ ) prima e dopo trattamento con  $5 \times 10^5$  ADSCs allogene in biopsie endometriali mantenute in coltura a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> per 3 giorni. Lo studio ha incluso 12 cavalle, 6 cavalle di età inferiore ai sei anni (gruppo di classe I o IIa di endometriosi) e 6 di età superiore ai 15 anni (gruppo di classe IIb o III di endometriosi). Gli esiti delle Real Time PCR hanno dimostrato come l'espressione delle proteine testate pretrattamento con ADSCs fosse maggiore nelle cavalle anziane rispetto a quelle giovani, con particolare significatività per IL10 e TNF $\alpha$ . In seguito al trattamento con ADSCs, in entrambi i gruppi è stata individuata una generale riduzione dei livelli di espressione di IL1 $\beta$ , IL10, TNF $\alpha$ , IL1Ra e un'aumentata espressione di IL6 e IL8.

La possibilità di utilizzo delle cellule staminali come terapie per le patologie infiammatorie dell'utero equino è stata confermata dallo studio di Ferris et al. (2014) sulla PMIE. Conseguentemente all'accoppiamento, nell'utero equino si attiva una cascata infiammatoria fisiologica volta alla clearance dell'organo da agenti microbici, aria e spermatozoi. Questa risposta infiammatoria è necessaria al mantenimento delle capacità riproduttive dell'animale; tuttavia, un eccessivo prolungarsi di essa impedisce la sopravvivenza dell'embrione (Christoffersen et al., 2010; Troedsson, 2006). Le cavalle differiscono tra loro per l'abilità nel ridurre questo processo infiammatorio e un 15% della popolazione non è in grado di regolare correttamente l'infiammazione incorrendo in PMIE. Le ragioni per questa differente abilità di modulare il processo infiammatorio uterino tra i vari animali non sono ancora note, ma di sicuro è implicata una scarsa o difettosa risposta infiammatoria (Christoffersen et al., 2010). Come

possibile terapia alla PMIE, Ferris et al. (2014) hanno indotto un processo infiammatorio uterino, mediante l'utilizzo di una dose inseminante costituita da spermatozoi morti, e hanno comparato gli effetti del "siero condizionato autologo" (ACS) a quello di BMSCs allogeniche prelevate dall'ala dell'ileo di una cavalla di due anni. Lo studio ha preso in considerazione dodici Quarter horse aventi un grado I o IIa di endometriosi, assenza di fluido intra-uterino ed esame batteriologico negativo. Le cavalle sono state divise in due gruppi di sei animali ciascuno; ogni gruppo conteneva animali controllo e animali trattati. In un primo esperimento, le cavalle sono state trattate con un'infusione intrauterina di 20 mL di ACS o con 20 mg of Dexametasone in 20 mL di PBS, per il gruppo controllo sono stati utilizzati 20 mL di PBS. In un secondo esperimento, le cavalle sono state trattate con  $20 \times 10^6$  BMSCs allogeniche in 20 mL di Ringer Lattato o con 20 mL di PBS. In entrambi gli esperimenti, le cavalle sono state trattate ogni tre settimane, in estro e 24 h prima dell'AI effettuata con aliquote standardizzate di spermatozoi morti. I dati sono stati raccolti mediante lavaggi uterini effettuati 24 h prima, 6 e 24 h dopo l'AI. Lo studio ha dimostrato che sia l'ACS che le BMSCs sono state in grado di ridurre il numero di neutrofili nell'utero già a partire dalle 6 h post AI per un valore superiore al 50%. Questo risultato è stato associato all'aumento dell'IL1Ra indotto dal trattamento con le BMSCs mentre per le cavalle trattate con l'ACS è stata ipotizzata la presenza di un agente immunomodulante diverso dall'IL1Ra (Ferris et al., 2014).

Anche i medium condizionati hanno dato prova di poter aiutare nella rigenerazione endometriale. Infatti, uno studio recente ha dimostrato che cellule staminali derivanti da membrana amniotica (AMSCs) e il medium condizionato derivato da queste cellule (AMSCs-CM) sono in grado di aumentare la proliferazione di colture di cellule endometriali (Corradetti et al., 2014). Tuttavia, ulteriori studi risultano necessari in tal

senso, anche se AMSCs e AMSCs-CM sono già stati utilizzati come trattamento di lesioni tendinee e legamentose nel cavallo con buoni risultati ipotizzando che l'azione inibitoria delle cellule staminali sul processo infiammatorio non è dipendente dal contatto cellula-cellula ma potrebbe essere dose-dipendente (Anna Lange-Consiglio et al., 2013). Il numero ideale di MSCs da utilizzare in un trattamento è, al momento, sconosciuto ma sono stati registrati risultati positivi conseguentemente all'infusione di  $2 \times 10^7$  e  $20 \times 10^6$  cellule in utero (Ferris et al., 2014; Mambelli et al., 2013) e all'utilizzo di  $1-3 \times 10^6$  cellule per cm di diametro di una lesione tendinea e  $15 \times 10^6$  cellule in articolazione (Carter-Arnold et al., 2014; Pigott et al., 2013).

### **2.3 La biopsia endometriale nel cavallo**

La maggior parte degli studi sopracitati ha utilizzato come campione di base la biopsia uterina. La biopsia endometriale è un valido strumento per l'identificazione di possibili cause di infertilità nella cavalla. Infatti, nonostante si possano ottenere svariate informazioni dalla palpazione e dall'ecografia trans-rettale, l'esame istologico del tessuto uterino mediante biopsia endometriale è rimasto l'esame alla base della valutazione della funzionalità uterina (Aresu et al., 2012; Snider et al., 2011). Inoltre, la tecnica è sicura, facile da effettuare e può essere messa in pratica con un equipaggiamento minimo; un debole sanguinamento dell'area del prelievo è l'unico effetto collaterale riportato (Snider et al., 2011). Negli ultimi anni, nuove tecniche sono state utilizzate per valutare le caratteristiche endometriali come la morfometria computerizzata, l'immunoistochimica, la Real Time PCR, l'ELISA e test genetici ma tutte queste tecniche richiedono costi elevati e macchinari appositi (Buczowska et al., 2014; Schlafer, 2007).

Le biopsie endometriali possono essere prelevate in qualsiasi momento, grazie alla facilità di dilatazione della cervice, e sono classificate in base al grado d'infiammazione cronica, fibrosi e attività ghiandolare. Tuttavia, bisognerà tenere presente che esistono delle differenze nelle caratteristiche delle cellule endometriali a seconda del momento del ciclo estrale in cui si trova la cavalla (Snider et al., 2011). Una singola biopsia riflette le condizioni dell'intero utero solo se il campione possiede un'appropriata dimensione e forma, e solo se viene valutato in modo appropriato (Buczowska et al., 2014). Tuttavia, ci sono ancora preoccupazioni riguardanti l'utilizzo di un'unica biopsia e per migliorare la rappresentatività del campione è stato proposto di usare l'endoscopia, per raccogliere il campione da quella parte di organo che presenta maggiori irregolarità, o dalla giunzione tra corpo e corna uterine, zona di fissazione embionale, che viene considerata uno dei punti più accurati per determinare le condizioni infiammatorie dell'organo (Keller et al., 2006; McKinnon et al., 2011; Snider et al., 2011).

Il prelievo di un numero di biopsie multiple, fino a sei, durante l'estro non interferisce con il tasso di gravidanza in cavalle sane (Snider et al., 2011). Inoltre, l'effetto di ripetute biopsie endometriali non sembra avere effetto su una potenziale risposta infiammatoria dell'organo (Christoffersen et al., 2010). Quindi, biopsie endometriali ripetute fatte allo scopo di valutare la risposta infiammatoria endometriale possono essere eseguite all'interno dello stesso ciclo estrale senza causare traumi all'endometrio o inficiare i risultati; inoltre, biopsie ripetute entro le 72 h non hanno alcun effetto né in ambito clinico né nell'espressione delle citochine infiammatorie o dell'SAA (Mette Christoffersen et al., 2012).

## **2.4 Coltura *in vitro* di biopsie endometriali equine**

Diversi studi hanno utilizzato la coltura *in vitro* di biopsie endometriali equine per valutare la risposta a diverse sostanze (p.e. indometacina, plasma seminale, seme congelato, extender) o per studiare le condizioni fisiologiche dell'organo (Nash et al., 2010; Nelis et al., 2014; Watson and Sertich, 1989). Il protocollo generalmente utilizzato prevede l'incubazione delle biopsie per un massimo di 3 giorni con l'utilizzo di diversi medium di coltura e piattaforme di sostegno del campione (Falomo et al., 2015; Nash et al., 2008). I sostegni dovrebbero facilitare la distribuzione del medium attorno al campione e stabilizzarlo all'interno del pozzetto (Nash et al., 2008; Trujano and Wrathall, 1985); tuttavia, l'utilizzo di questi supporti non risulta indispensabile (Falomo et al., 2015). Anche se diversi studi hanno utilizzato colture *in vitro* di biopsie endometriali, nessuno di loro ha valutato la reale sopravvivenza del campione, o come variano le caratteristiche del tessuto, all'aumentare del tempo di coltura. Nella maggior parte dei casi, il mantenimento di un colore rosato e di un'apparenza "normale" sono stati utilizzati come markers non specifici di vitalità del campione. Pochi sono gli studi che hanno valutato, anche se in modo blando, la sopravvivenza, o la funzionalità, di biopsie endometriali coltivate *in vitro*. Per esempio, biopsie endometriali di maiale sono state valutate macroscopicamente e istologicamente per valutarne la sopravvivenza (Trujano and Wrathall, 1985) mentre, nella cavalla, la produzione di PGF $\alpha$  e IL8 è stata utilizzata come marker di funzionalità (Nash et al., 2008, 2010). Più recentemente, l'utilizzo di un saggio colorimetrico per la valutazione della funzionalità degli enzimi mitocondriali (saggio MTT) in biopsie endometriali equine ha dimostrato che questi campioni sarebbero in grado di sopravvivere fino a 4 giorni di coltura (Penrod et al., 2013a). Tuttavia, risultano necessari studi che approfondiscano il decadimento della vitalità nel tempo di questo tipo di campione.



# **3. OBIETTIVI**

Alla luce di quanto detto, gli scopi prefissati in questo studio sono:

- Ideare un protocollo di prelievo, lavaggio e messa in coltura di biopsie uterine equine
- Valutare la sopravvivenza di due tipi di biopsia uterina equina (biopsie incisionali ed escissionali) mantenute in coltura *in vitro* per 7 giorni al fine di determinare quale sia il miglior campione da utilizzare nella co-coltura con ADSCs
- Analizzare l'effetto della co-coltura di biopsie endometriali equine con due diverse dosi di ADSCs nell'espressione di 84 geni correlati alla produzione di citochine infiammatorie e dei loro recettori.

# **4. MATERIALI E METODI**

## **STUDIO I: Valutazione delle alterazioni nel tempo di biopsie uterine in coltura *in vitro***

### **A- STUDIO PRELIMINARE**

#### **4.A.1 Scelta degli animali e valutazione degli uteri**

Al macello sono stati selezionati soggetti di sesso femminile con età compresa tra i 4-6 anni. I soggetti sono tutti appartenenti a razza TPR (Tiro Pesante Rapido).

Per ridurre la variabilità, si è scelto di utilizzare uteri di cavalle in diestro; dopo isolamento, utero e ovaie sono state sottoposte ad esame macroscopico e ecografico come descritto in altri studi (Nash et al., 2008).

L'esame ecografico delle ovaie è stato svolto mettendo l'organo all'interno di una bacinella d'acqua e procedendo con la valutazione delle ovaie al fine di:

- individuare la presenza di un corpo luteo (Figura 5a)
- verificare l'assenza di follicoli di dimensioni >25 mm di diametro.

In seguito, l'organo è stato disteso su di un telino sterile e sottoposto a ispezione visiva dove è stata effettuata:

- identificazione del corpo luteo mediante taglio (Figura 5b)
- valutazione della cervice.



**Figura 5.** Identificazione ecografica (a) e al taglio (b) del corpo luteo.

Sono stati ritenuti in diestro cervici con le seguenti caratteristiche (Figura 6):

- colore pallido
- aspetto a "bocciolo di rosa"
- risultare chiusa (impossibilità a farvi passare un dito all'interno).



**Figura 6.** Aspetto tipico di una cervice in fase diestrale.

#### **4.A.2 Prelievo, trattamento e trasporto del campione in laboratorio**

Una volta individuati gli uteri con le caratteristiche desiderate, si è proceduto al prelievo del campione. Una sezione di 10x10 cm di corpo uterino, prelevata mediante l'utilizzo di strumenti sterili, è stata sottoposta a tre lavaggi, di almeno due minuti ciascuno, in una soluzione fisiologica contenente penicillina-streptomina (P/S) e gentamicina. In seguito, la sezione è stata trasportata in laboratorio in una soluzione contenente PBS (Lonza, Walkersville, MD, USA) addizionato con 2% P/S (EuroClone, Milan, Italy) e anfotericina B (EuroClone). In laboratorio, la sezione è stata utilizzata per prelevare biopsie incisionali ed escissionali dell'organo; le prime sono costituite esclusivamente da endometrio, le seconde da endometrio, miometrio e perimetrio. Le biopsie sono state incubate con DMEM completo (cDMEM) costituito da Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Lonza) addizionato con 10% FBS (FBS, Bidachem S.p.A., Milano, Italy) e 2% P/S, a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> fino a 7 giorni. Tuttavia, il 14% dei campioni prelevati e coltivati hanno mostrato segni d'inquinamento microbico dopo 3 giorni di incubazione. La percentuale di campioni contaminati a 7 giorni risultava essere del 35%. Si è quindi deciso di incrementare i processi di selezione e trattamento del campione in modo da abbattere la carica microbica iniziale.

## **B- STUDIO DEFINITIVO**

### **4.B.1 Prelievo, trattamento e trasporto del campione in laboratorio**

Gli uteri sono stati selezionati come descritto in precedenza. Sono stati inclusi nello studio tutti gli uteri risultati:

- negativi a tamponi batteriologici e micologici
- aventi un grado di endometriosi di I e privi d'infiltrato infiammatorio a seguito di esame istologico.

Sono stati selezionati 6 uteri aventi le caratteristiche desiderate.

Rispetto al protocollo precedente, il trattamento dei campioni è stato implementato con:

1. scrub chirurgico di una sezione di 15x15 cm del perimetro del corpo uterino (Figura 7a)
2. prelievo sterile di una sezione di 10x10 cm della parte trattata
3. 1 flushing e 3 lavaggi, di almeno 2 minuti ciascuno, con una soluzione così costituita (Figura 7b, 7c):
  - a. 1L di soluzione fisiologica
  - b. 10 ml di Combiotic<sup>®</sup> Vet, Pfizer Italia s.r.l. (penicillina-streptomina)
  - c. 10 ml di Aagent, Fatro (gentamicina)
  - d. 600 mg acetilcisteina (Fluimucil<sup>®</sup>, Zambon)
4. trasporto in laboratorio in una soluzione di PBS, 2% P/S e Anfotericina B a temperatura ambiente (Figura 7d).

Il protocollo è ampiamente descritto nell'Appendice A punto 9.1.



**Figura 7.** Rappresentazione del trattamento della sezione uterina prelevata al macello:  
a) scrub chirurgico, b) flushing della sezione, c) lavaggi, d) trasposto.

#### **4.B.2 Preparazione e messa in coltura dei campioni in laboratorio**

Le sezioni di utero sono state trasportate in laboratorio e processate entro 3 h dalla raccolta. Per ciascun utero sono state prodotte 18 biopsie incisionali (BI) del peso di 30 mg, contenenti esclusivamente endometrio, e 18 biopsie escissionali (BE) delle dimensioni di 0.5x0.5 cm, contenenti endometrio, miometrio e perimetrio. Il lavoro è stato eseguito sotto cappa a flusso laminare e durante la lavorazione il tessuto uterino è stato mantenuto nel liquido di trasporto.

In seguito, le biopsie sono state messe in piastre da 12 pozzetti, una biopsia per pozzetto, immerse in cDMEM e mantenute in incubatore a 37°C e 5%CO<sub>2</sub> per 7 giorni. Il terreno di coltura è stato cambiato una volta al giorno fino alla fine dell'esperimento.

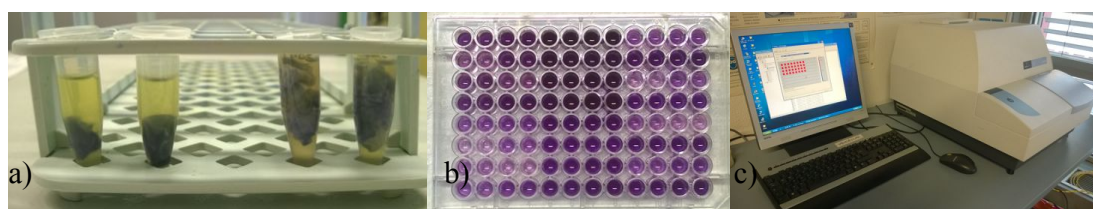
### 4.B.3 Valutazione delle biopsie

Ogni giorno, prima del cambio di terreno, le biopsie sono state sottoposte a controllo visivo per il rintracciamento di muffe o lieviti. A 0, 3 e 7 giorni di coltura, 2 BI e 2 BE per ogni utero sono state sottoposte a valutazione dell'attività mitocondriale, quantificazione del DNA e esame istologico. Inoltre, negli stessi giorni di prelievo sono stati effettuati dei tamponi da sottoporre ad esame batteriologico.

#### 4.B.3.1 Valutazione della funzionalità mitocondriale tramite MTT assay

Il test del MTT permette di valutare l'attività degli enzimi mitocondriali. Essi sono in grado di trasformare il composto bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) in cristalli di formazano modificando il colore della soluzione iniziale da giallo a blu-violetto. L'intensità della colorazione è direttamente proporzionale all'attività degli enzimi mitocondriali (Denizot and Lang, 1986; Hansen et al., 1989; Sittampalam et al., 2004; Tada et al., 1986).

Brevemente, dopo un'incubazione dei campioni per 3 h a 37°C nella soluzione di MTT, si è proceduto all'estrazione dei cristalli di formazano e alla lettura dell'assorbanza della soluzione ottenuta allo spettrofotometro Victor<sup>3</sup> 1420 (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA) con il software Wallac 1420 Manager ad una lunghezza d'onda di 570 nm (Figura 8). Il protocollo è stato descritto nell'Appendice A punto 9.2.



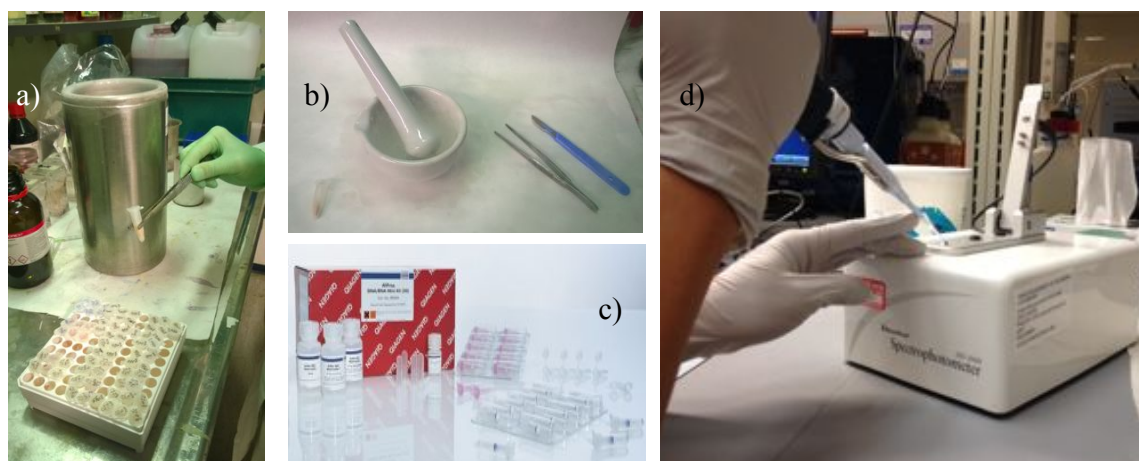
**Figura 8.** Rappresentazione del protocollo del MTT assay:

a) aspetto dei campioni dopo incubazione con Soluzione MTT (BI a sinistra e BE a destra), B) piastra da 96 pozzetti pronta per la lettura, d) lettura allo spettrofotometro.



#### 4.B.3.2 Estrazione e quantificazione del DNA

Ai giorni 0, 3 e 7 di coltura, 2 BI e 2 BE per utero sono state congelate in azoto liquido e mantenute a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'analisi. L'estrazione del DNA è stata effettuata con il kit AllPrep<sup>®</sup> DNA/RNA (QIAGEN<sup>®</sup>, Germany) secondo il protocollo descritto nell'Appendice A punto 9.3. Brevemente, il campione è stato lisato, digerito e purificato mediante l'utilizzo di apposite soluzioni e filtri. Una volta ottenuto il DNA, è stato quantificato allo spettrofotometro NanoDrop1000 (NanoDrop products, Termoscientific). La quantità di DNA è stata valutata in ng di DNA/mg di tessuto (Figura 9).

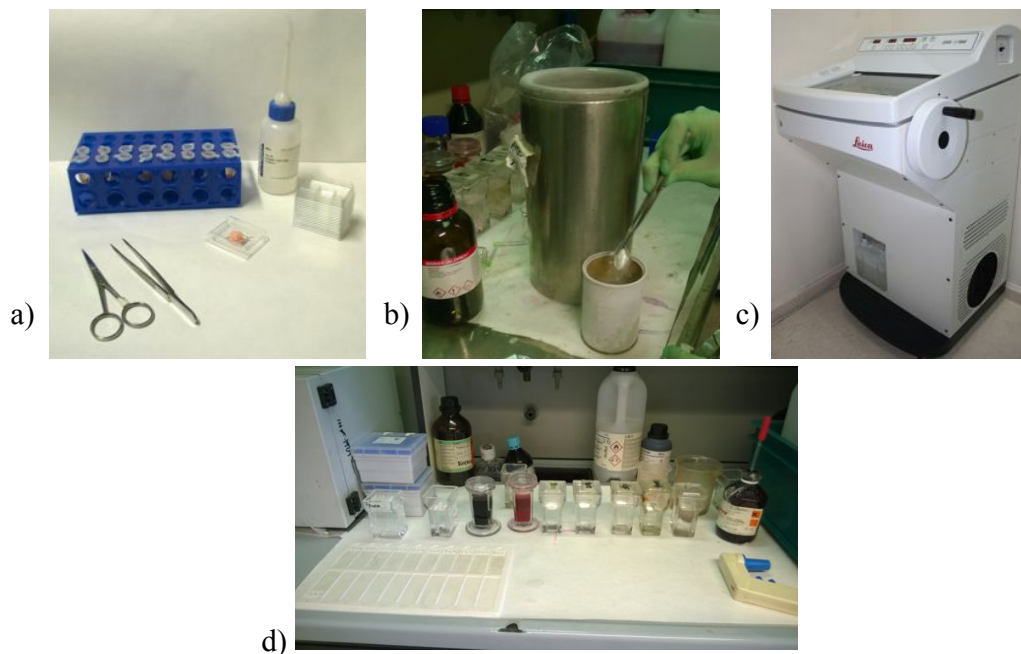


**Figura 9.** Rappresentazione del protocollo di estrazione e quantificazione del DNA:

a) congelamento in azoto liquido, b) polverizzazione, c) estrazione del DNA, d) quantificazione al NanoDrop.

#### 4.B.3.3 Esame istologico

Ai giorni 0, 3 e 7 di coltura, 2 BI e 2 BE per utero sono state utilizzate per l'allestimento di vetrini istologici. Le biopsie sono state incluse in Killik frozen section medium (Bio-Optica, Milano, Italia) all'interno di vassoi di plastica delle dimensioni di 15x15x6 mm (Kaltek, Base Mould Disposable, Padova, Italia), raffreddate con isopentano e azoto liquido, e tagliate al criostato (Leica CM1950, Leica Biosystems, Nußloch, Germany) in sezioni da 5  $\mu$ m. E' stata effettuata una colorazione manuale con ematossilina-eosina. I vetrini sono stati osservati a ingrandimento 4-10-20 e 40x con microscopio Olympus BX40 (Figura 10; Appendice A punto 9.4).



**Figura 10.** Rappresentazione del protocollo di allestimento di vetrini istologici:

a) inclusione dei campioni, b) congelamento, c) taglio al criostato, d) colorazione.

## **STUDIO II: Co-coltura di biopsie incisionali e ADSCs**

Le valutazioni effettuate sulle BI e sulle BE hanno dimostrato che la BI mantiene un livello di vitalità statisticamente inalterato nel confronto tra il giorno 0 e il giorno 3 di coltura *in vitro*. Al contrario, la BE mostra differenze statisticamente significative per le variabili prese in esame (funzionalità mitocondriale, quantità di DNA e aspetto istologico del tessuto) già a partire dal confronto tra il giorno 0 e il giorno 3. A seguito di questi risultati, che verranno ampiamente discussi in seguito, nello Studio II si è scelto di procedere alla co-coltura *in vitro* di due diverse dosi di ADSCs con BI per 3 giorni.

### **4.1 Produzione di ADSCs**

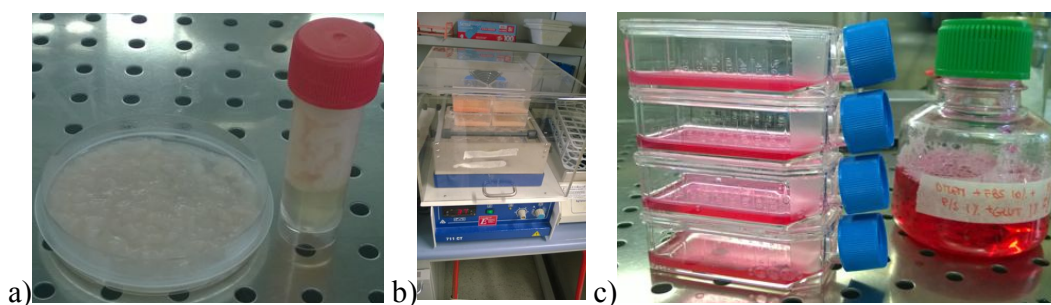
#### *4.1.1 Prelievo e trasporto di grasso in laboratorio*

In sede di macellazione, è stato prelevato del grasso retroperitoneale. Per evitare eventuali contaminazioni, il grasso è stato posato su un telino sterile e sciacquato in superficie con soluzione fisiologica sterile. Con strumenti sterili si è prelevato il *core* del blocco di grasso di partenza. Il grasso prelevato è stato trasportato in laboratorio a temperatura ambiente in un contenitore sterile contenente PBS addizionato con P/S 2% e Anfotericina B (2,5 mg/L).

#### *4.1.2 Estrazione di ADSCs*

L'estrazione di ADSCs è stata eseguita in laboratorio, sotto cappa a flusso laminare, mediante l'utilizzo di strumenti sterili. In breve, il grasso è stato sottoposto a digestione meccanica ed enzimatica. Dopo una prima filtrazione e diversi lavaggi, le cellule

staminali ottenute sono state messe in coltura in fiasche T75, a 37°C e 5%CO<sub>2</sub> (Figura 11; Appendice B punto 10.1).



**Figura 11.** Rappresentazione del protocollo di estrazione di ADSCs :

a) digestione meccanica, b) digestione enzimatica, c) semina in fiasche T75.

#### 4.1.3 Coltura di ADSCs

Le fiasche contenenti ADSCs sono state controllate giornalmente, visivamente e al microscopio ottico, per individuare eventuali contaminazioni. Quando le cellule stavano per entrare in confluenza, sono state divise in più fiasche sotto cappa a flusso laminare. Dopo due lavaggi con PBS, le cellule sono state staccate dalla fiasca mediante l'utilizzo di tripsina. In seguito, sono state raccolte, contate, lavate e seminate in un numero adeguato di fiasche assieme al del nuovo cDMEM. Nelle fiasche T75 utilizzate, sono state seminate dalle 700 alle 800x10<sup>3</sup> cellule. Le fiasche sono state mantenute in incubatore a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

Le cellule sono state utilizzate a un passaggio 2 o 3 (P2 o P3: le cellule sono state incubate fin quasi a confluenza, staccate con tripsina e seminate in nuove fiasche per 2 o 3 volte). Ogni fiasca è stata sempre identificata con il nome dell'operatore, la tipologia di cellule contenute, la data di semina e il numero di passaggio delle cellule (Appendice B punto 10.2).

#### 4.1.4 Congelamento e scongelamento

Nel caso in cui fosse stato necessario stoccare e congelare le cellule, le ADSCs sono state staccate con tripsina, lavate e sospese in una soluzione costituita da FBS + DMSO 10% in Cryovials identificate con la data, il tipo cellulare, il numero di passaggio delle cellule e il numero di fiasche congelate. Le Cryovials sono state stoccate in Mr. Frosty™ Freezing Container (Thermo Scientific) mantenuto a -80°C, per favorire un congelamento lento, e poi immerse in azoto liquido (Figura 12; Appendice B punto 10.3).



**Figura 12.** Contenitori utilizzati per il congelamento di Cryovials contenenti ADSCs: Mr. Frosty™ a sinistra, contenitore di azoto liquido a destra.

Lo scongelamento è stato effettuato 5 giorni prima della messa in coltura con BI, in modo da poter controllare la vitalità delle ADSCs e ottenere il numero di cellule desiderato. Lo scongelamento è stato eseguito a bagno maria (37°C) e, dopo un lavaggio, le cellule sono state seminate con del cDMEM in un numero di fiasche T75 pari al numero di fiasche congelate + 1. Le fiasche sono state incubate a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> (Appendice B punto 10.3).

#### 4.1.5 Caratterizzazione delle ADSCs mediante citofluorimetria

Prima di essere state co-incubate con BI, le ADSCs estratte sono state caratterizzate mediante citofluorimetria. Questo procedimento richiede almeno l'utilizzo di due markers positivi e di uno negativo. A seguito di quanto descritto precedentemente, si è scelto di utilizzare i makers CD44 (CD44 Monoclonal Antibody (IM7) eFluor 450, eBioscience, REF. 48-0441-80), CD90 (CD90 (Thy-1) Antibody, VMRD, REF. DH24A) e MHC-II (Mouse anti-horse MHC-II FITC, Bio-Rad, REF. MCA1085-F). In breve, un numero standard di cellule (100.000) sono state incubate con i markers appositi, eventuali anticorpi secondari, e i controlli per essere poi sottoposte a citofluorimetria. Per incrementare la specificità di legame, è stato utilizzato un Fc Receptor Block originato da topo, diluito in FBS. L'analisi è stata svolta con un citofluorimetro BD FACSCalibur™ e il software BD CellQuest™ Pro (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) (Figura 13). Il procedimento dettagliato è descritto in Appendice B punto 10.4.



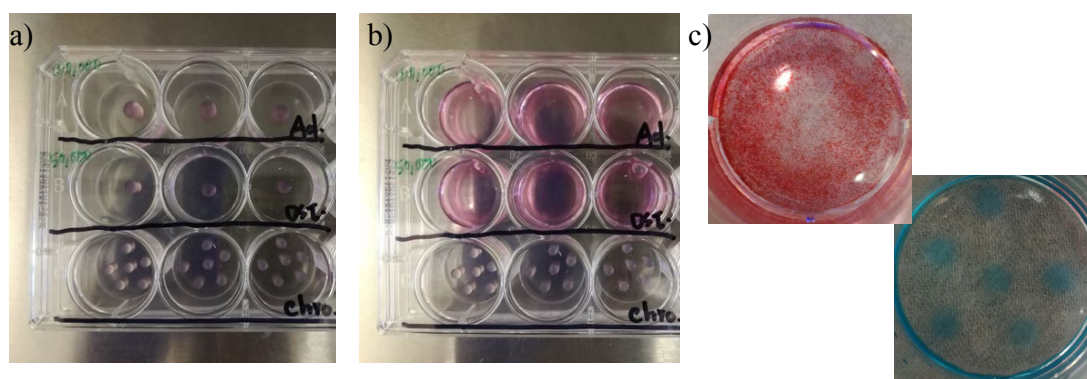
**Figura 13.** Rappresentazione del protocollo di caratterizzazione delle ADSCs mediante citofluorimetria:

a) materiale necessario, b) centrifuga per piastre da 96 pozzetti, c) lavaggio dei pellets.

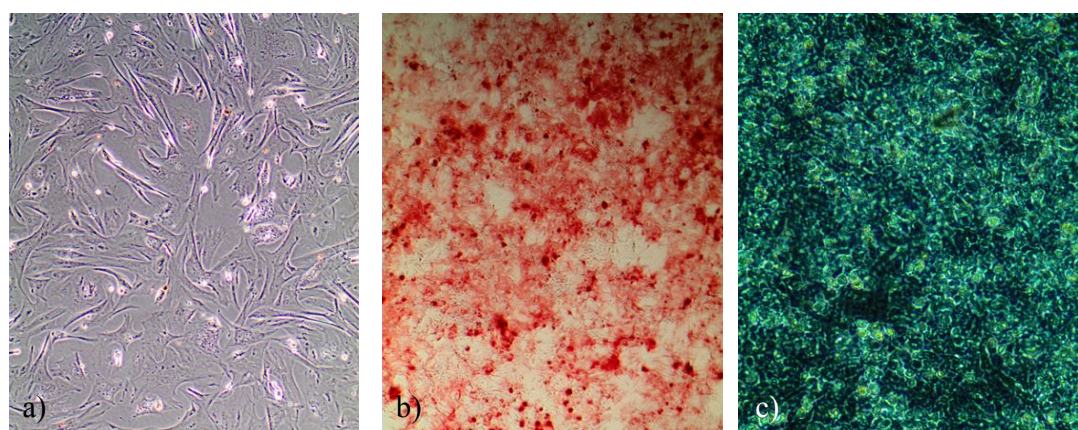
#### *4.1.6 Differenziazione trilineare di ADSCs*

Le cellule staminali mesenchimali devono essere in grado di differenziarsi, sotto l'azione di determinati stimoli, in cellule della linea adipogenica, osteogenica e condrogenica. La differenziazione è stata stimolata mediante l'utilizzo di: StemPro<sup>®</sup> Adopogenesis Differentiation Kit, StemPro<sup>®</sup> Osteogenesis Differentiation Kit, StemPro<sup>®</sup> Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA; REF. A10410-01 e A10069-01). Brevemente, in una piastra da 12 pozzetti sono state seminate diverse quantità di cellule: 100.000 cellule nei pozzetti destinati alla differenziazione in cellule della linea adipogenica, 50.000 cellule nei pozzetti destinati alla differenziazione in cellule della linea osteogenica, 6 gocce da 5 µL ottenute da una soluzione con una concentrazione di  $1.6 \times 10^6$  ADSCs in ciascun pozzetto destinato alla differenziazione in cellule della linea condrogenica (Figura 14a). Sono stati allestiti 3 pozzetti per ciascun tipo di differenziazione e le cellule sono state stimulate con le soluzioni ottenute dai kit sopra citati per 14 giorni (Figura 14b). Le cellule sono state mantenute a 37°C e 5%CO<sub>2</sub> e controllate al microscopio giornalmente. Il medium di differenziazione è stato cambiato ogni 2 giorni. Alla fine delle due settimane, le cellule sono state fissate e colorate in modo diverso a seconda della linea cellulare ottenuta (Figura 14c). Le cellule sono state osservate al microscopio ottico (Figura 15). Il procedimento è dettagliatamente descritto nell'Appendice B punto 10.5.





**Figura 14.** Rappresentazione del protocollo di differenziazione trilineare delle ADSCs:  
 a) b) piastra in varie fasi di preparazione c) particolare di un pozzetto per la  
 differenziazione in cellule della linea osteogenica (sopra) e la condrogenica (sotto) post  
 colorazione.



**Figura 15.** Immagini ottenute da ADSCs dopo stimolazione al differenziamento in  
 cellule della linea a) adipogenica, b) osteogenica, c) condrogenica.



## 4.2 Co-cultura *in vitro* di biopsie incisionali con ADSCs

### 4.2.1 Produzione di biopsie incisionali

La scelta degli animali, il prelievo, il lavaggio e il trasporto di sezioni uterine dal macello al laboratorio, nonché la produzione di BI, è stata effettuata come descritto precedentemente. Per questo esperimento sono stati utilizzati 6 uteri.

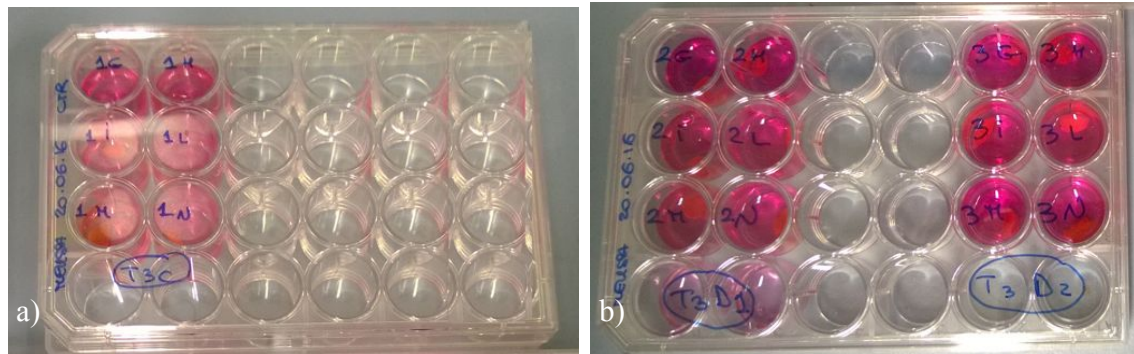
### 4.2.2 Co-cultura di biopsie incisionali e ADSCs

Per valutare un possibile effetto dose-dipendente delle ADSCs nell'espressione dei geni responsabili della produzione di alcune citochine infiammatorie, e dei loro recettori, sono state scelte due dosi di cellule (D1:  $1 \times 10^5$  e D2:  $3 \times 10^5$  cellule) da co-incubare *in vitro* con BI provenienti da 6 uteri fino a 3 giorni, visto che come dimostrato dallo Studio I le BI subiscono una riduzione significativa della loro vitalità dopo i 3 giorni di coltura *in vitro*.

Il giorno della messa in co-cultura, le ADSCs sono state staccate dalle fiasche, contate e utilizzate per creare diverse eppendorf contenenti le due dosi di cellule sospese in una quantità di cDMEM standard di 330  $\mu$ L.

Le sezioni di utero sono state trasportate in laboratorio. Sotto cappa a flusso laminare, per ciascuna sezione uterina sono state ottenute tre BI. Una BI è stata utilizzata come campione controllo ed è stata coperta da cDMEM. Una BI è stata seminata con i 330  $\mu$ L di cDMEM contenenti  $1 \times 10^5$  ADSCs. La terza BI è stata seminata con i 330  $\mu$ L di cDMEM contenenti  $3 \times 10^5$  ADSCs. Per evitare una possibile contaminazione con cellule staminali, le BI di controllo sono state incubate in una piastra separata rispetto alle BI trattate. Le piastre ottenute sono state incubate a 37°C e 5%CO<sub>2</sub> per 30 min in modo da

favorire l'adesione delle ADSCs ai campioni trattati e, successivamente, le BI trattate sono state coperte con cDMEM (Figura 16).



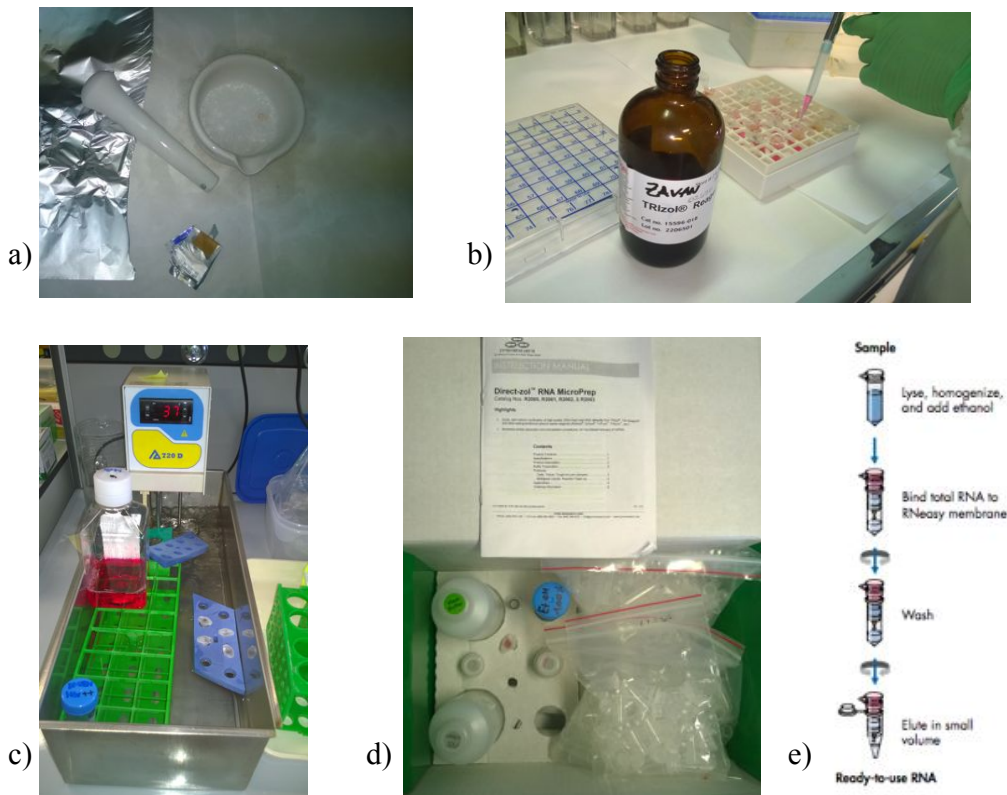
**Figura 16.** Biopsie incisionali: a) controllo, b) seminate con la D1 ( $1 \times 10^5$ ) (sinistra) o con la D2 ( $3 \times 10^5$ ) (destra) di ADSCs in piastre da 24 pozzetti.

Le piastre sono state incubate a  $37^\circ\text{C}$  e 5% di  $\text{CO}_2$ . Sono state controllate visivamente e al microscopio ottico tutti i giorni. A 3 giorni di coltura è stato effettuato un tampone da sottoporre ad esame batteriologico e le BI sono state raccolte, congelate in azoto liquido e stoccate a  $-80^\circ\text{C}$  fino alle analisi.

### 4.3 Creazione di librerie geniche per i fattori dell'infiammazione

#### 4.3.1 Estrazione, purificazione e quantificazione dell'RNA

L'estrazione dell'RNA è stata effettuata mediante l'utilizzo del Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen) e del kit Direct-col<sup>™</sup> RNA MicroPrep (REF. R2062, Zymo Research, The Epigenetics Company, USA). La quantificazione dell'RNA è stata effettuata con lo spettrofotometro NanoDrop1000 (NanoDrop products, Termoscientific). Il settaggio della macchina è stato eseguito utilizzando 1  $\mu$ L di DNase/RNase-Free water, soluzione fornita dal kit utilizzato (Figura 17; Appendice C punto 11.1). I campioni sono stati conservati a -20°C fino alla retrotrascrizione.



**Figura 17.** Rappresentazione del protocollo di estrazione dell'RNA:

a) polverizzazione, b) aggiunta del Trizol, c) incubazione a 37°C, d) kit di estrazione Direct-col<sup>™</sup> RNA MicroPrep Zymo Research, e) schematica rappresentazione dell'estrazione dell'RNA.

#### 4.3.2 Retrotrascrizione dell'RNA

La retrotrascrizione dell'RNA è stata effettuata mediante l'utilizzo del kit RT<sup>2</sup> First Strand Kit (12) (cod. 330401, QIAGEN, Germany). I campioni sono stati conservati a -20°C fino alla Real Time PCR (Figura 18; Appendice C punto 11.2).

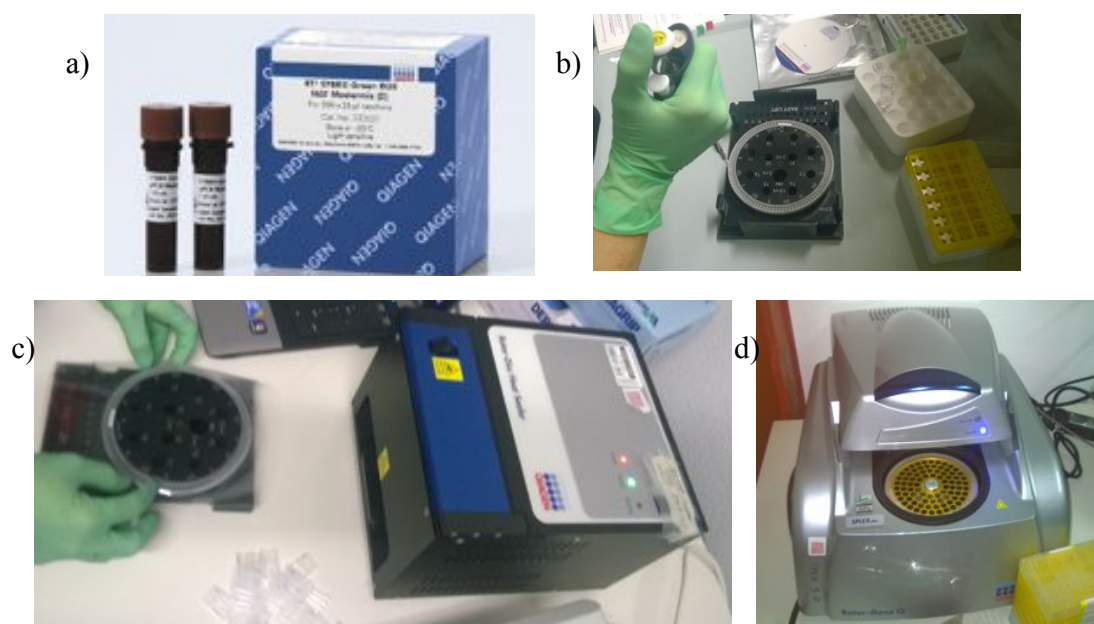


**Figura 18.** Rappresentazione del protocollo di retrotrascrizione dell'RNA:

- a) RT<sup>2</sup> First Strand Kit (12), b) piastra a 0°C con le soluzioni di retrotrascrizione,
- c) termociclatore a 42°C.

### 4.3.3 Real Time PCR

La Real Time PCR è stata effettuata mediante l'utilizzo dei kit: RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Horse Inflammatory Cytokines and Receptors (12) (cod. PAEC-011Z, QIAGEN, Germany) e RT<sup>2</sup> SYBR Green ROX FAST Mastermix (12) (cod. 330622, QIAGEN, Germany). Una volta pronti, i rotori sono stati sigillati con le apposite pellicole e lo strumento Rotor-Disc Heat Sealer (QIAGEN, Germany). Le Real Time PCR sono state effettuate con il macchinario Rotor-Gene Q (QIAGEN, Germany). (Figura 19; Appendice C punto 11.3).



**Figura 19.** Rappresentazione del protocollo di Real Time PCR:

- a) RT<sup>2</sup> SYBR Green ROX FAST Mastermix, b) caricamento dell'RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array, c) sigillatura dell'RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array mediante Rotor-Disc Heat Sealer, d) caricamento dell'RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array sul Rotor-Gene Q.

Descrizione degli acronimi e delle sigle dei geni analizzati tramite il kit RT<sup>2</sup> Profiler™

PCR Array Horse Inflammatory Cytokines and Receptors (QIAGEN):

| <b>Chemochine</b> |  |
|-------------------|--|
| C5                | Complement C5-like   |
| CCL11             | Chemokine (C-C motif) ligand 11  |
| CCL13             | Chemokine (C-C motif) ligand 13  |
| CCL2              | Chemokine (C-C motif) ligand 2   |
| CCL20             | C-C motif chemokine 20-like  |
| CCL22             | C-C motif chemokine 22-like  |
| CCL24             | C-C motif chemokine 24-like  |
| CCL3              | Chemokine (C-C motif) ligand 3   |
| CCL4              | C-C motif chemokine 4-like   |
| CCL5              | Chemokine (C-C motif) ligand 5   |
| CCL8              | Chemokine (C-C motif) ligand 8   |
| CXCL1             | Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha) |
| CXCL10            | Chemokine (C-X-C motif) ligand 10  |
| CXCL11            | Chemokine (C-X-C motif) ligand 11  |
| CXCL13            | C-X-C motif chemokine 13-like  |
| CXCL2             | Chemokine (C-X-C motif) ligand 2   |
| CXCL6             | Chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)           |
| CXCL9             | Chemokine (C-X-C motif) ligand 9   |
| MIP-2BETA         | CXCL3  |
| PF4               | Platelet factor 4-like   |

| <b>Recettori delle chemochine</b> |                                     |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| <b>CCR2</b>                       | Chemokine (C-C motif) receptor 2    |
| <b>CCR5</b>                       | Chemokine (C-C motif) receptor 5    |
| <b>CX3CR1</b>                     | Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1 |

| <b>Interleuchine</b> |   |
|----------------------|---|
| <b>CXCL8</b>         | Interleukin 8   |
| <b>EBI3</b>          | Interleukin-27 subunit beta-like  |
| <b>IL10</b>          | Interleukin 10  |
| <b>IL12B</b>         | Interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40) |
| <b>IL13</b>          | Interleukin 13  |
| <b>IL15</b>          | Interleukin 15  |
| <b>IL16</b>          | Interleukin 16  |
| <b>IL17A</b>         | Interleukin 17A   |
| <b>IL17B</b>         | Interleukin-17B-like  |
| <b>IL17C</b>         | Interleukin-17C-like  |
| <b>IL17F</b>         | Interleukin-17F-like  |
| <b>IL18</b>          | Interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)   |
| <b>IL1A</b>          | Interleukin 1, alpha  |
| <b>IL1B</b>          | Interleukin 1, beta   |
| <b>IL21</b>          | Interleukin-21-like   |
| <b>IL23A</b>         | Interleukin 23, alpha subunit p19   |
| <b>IL24</b>          | Interleukin-24-like   |
| <b>IL3</b>           | Interleukin-3-like  |
| <b>IL33</b>          | Interleukin-33-like   |
| <b>IL4</b>           | Interleukin 4   |
| <b>IL5</b>           | Interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)   |
| <b>IL6</b>           | Interleukin 6 (interferon, beta 2)  |
| <b>IL7</b>           | Interleukin-7-like  |
| <b>IL9</b>           | Interleukin-9-like  |

| <b>Recettori delle interleuchine</b> |  |
|--------------------------------------|--|
| <b>IL10RA</b>                        | Interleukin-10 receptor subunit alpha-like                     |
| <b>IL10RB</b>                        | Interleukin-10 receptor subunit beta-like                      |
| <b>IL18R1</b>                        | Interleukin 18 receptor 1                                      |
| <b>IL1R1</b>                         | Interleukin 1 receptor, type I                                 |
| <b>IL1RN</b>                         | Interleukin 1 receptor antagonist                              |
| <b>IL2RB</b>                         | Interleukin-2 receptor subunit beta-like                       |
| <b>IL4R</b>                          | Interleukin 4 receptor   |
| <b>IL5RA</b>                         | Interleukin 5 receptor, alpha                                  |
| <b>IL6ST</b>                         | Interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor) |
| <b>IL7R</b>                          | Interleukin 7 receptor   |
| <b>IL9R</b>                          | Interleukin 9 receptor   |



| <b>Altre chemochine e recettori</b> |   |
|-------------------------------------|---|
| <b>AIMP2</b>                        | Aminoacyl tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 2 |
| <b>BMP2</b>                         | Bone morphogenetic protein 2  |
| <b>CD40LG</b>                       | CD40 ligand-like  |
| <b>CD70</b>                         | CD70 antigen-like   |
| <b>CSF1</b>                         | Colony stimulating factor 1 (macrophage)                                |
| <b>CSF2</b>                         | Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)                    |
| <b>CSF3</b>                         | Colony stimulating factor 3 (granulocyte)                               |
| <b>FASLG</b>                        | Fas ligand (TNF superfamily, member 6)                                  |
| <b>FLT3LG</b>                       | Fms-related tyrosine kinase 3 ligand                                    |
| <b>IFNG</b>                         | Interferon, gamma   |
| <b>LIF</b>                          | Leukemia inhibitory factor-like   |
| <b>LTA</b>                          | Lymphotoxin-alpha-like  |
| <b>LTB</b>                          | Lymphotoxin-beta-like   |
| <b>MIF</b>                          | Macrophage migration inhibitory factor-like                             |
| <b>NAMPT</b>                        | Nicotinamide phosphoribosyltransferase                                  |
| <b>OSM</b>                          | Oncostatin-M-like   |
| <b>TGFB2</b>                        | Transforming growth factor beta-2-like                                  |
| <b>TNF</b>                          | Tumor necrosis factor   |
| <b>TNFRSF11B</b>                    | Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b                  |
| <b>TNFSF10</b>                      | Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10-like                 |
| <b>TNFSF11</b>                      | Tumor necrosis factor ligand superfamily member 11-like                 |
| <b>TNFSF13</b>                      | Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13                   |
| <b>TNFSF13B</b>                     | Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b                  |
| <b>TNFSF14</b>                      | Tumor necrosis factor ligand superfamily member 14-like                 |
| <b>TNFSF4</b>                       | Tumor necrosis factor ligand superfamily member 4-like                  |
| <b>VEGFA</b>                        | Vascular endothelial growth factor A                                    |



# **5. ANALISI STATISTICA**

## **STUDIO I: Valutazione delle alterazioni nel tempo di biopsie uterine in coltura *in vitro***

### **5.1 MTT assay e quantificazione del DNA**

L'analisi statistica è stata eseguita elaborando i dati inerenti l'MTT assay e la quantificazione del DNA attraverso l'utilizzo di un modello lineare misto per dati ripetuti mediante la PROC MIXED del SAS. Il modello ha considerato, oltre all'effetto fisso della Biopsia (Incisionale o Escissionale), del Tempo di coltura (0, 3 o 7 giorni) e la loro interazione, l'effetto casuale dell'Utero prelevato, usato come linea di errore per i precedenti effetti. A livello dell'interazione Biopsia x Tempo, sono stati realizzati dei contrasti mirati a identificare la significatività dei seguenti confronti:

1. Biopsia Incisionale a Tempo 0 vs. Biopsia Incisionale a Tempo 3;
2. Biopsia Incisionale a Tempo 0 vs. Biopsia Incisionale a Tempo 7;
3. Biopsia Incisionale a Tempo 3 vs. Biopsia Incisionale a Tempo 7;
4. Biopsia Escissionale a Tempo 0 vs. Biopsia Escissionale a Tempo 3;
5. Biopsia Escissionale a Tempo 0 vs. Biopsia Escissionale a Tempo 7;
6. Biopsia Escissionale a Tempo 3 vs. Biopsia Escissionale a Tempo 7.

## 5.2 Esame istologico

Per una corretta valutazione del campione, si è valutata la presenza delle 3 principali componenti del tessuto in esame:

- a. epitelio
- b. endotelio
- c. tessuto mesenchimale di sostegno.

Al fine di ottenere una valutazione confrontabile tra i campioni ottenuti tramite tecnica biotica incisionale ed escissionale, il miometrio e il perimetrio non sono stati presi in considerazione, poiché mancanti nel campione proveniente da biopsia incisionale.

E' stato in seguito effettuato un grading di ciascuna componente valutando:

- a. la capacità di conservazione delle cellule tramite il riconoscimento di nucleo e citoplasma;
- b. nell'epitelio, la capacità di mantenere l'adesione alle cellule adiacenti;
- c. la presenza di segni di degenerazione o autolisi;
- d. il mantenimento della citoarchitettura tissutale.

Per ciascuna componente è stato assegnato un punteggio da 1 a 5 (Tabella 2).

| Punteggio | Descrizione   |
|-----------|---|
| 5         | Eccellente conservazione dell'architettura del tessuto, assenza di segni di degenerazione         |
| 4         | Ottima conservazione dell'architettura del tessuto, lievi e isolati segni di degenerazione        |
| 3         | Buona conservazione dell'architettura del tessuto, lievi ma diffusi segni di degenerazione        |
| 2         | Scarsa conservazione dell'architettura del tessuto, moderati e diffusi segni di degenerazioni     |
| 1         | Completa perdita dell'architettura del tessuto, gravi e diffusi segni di degenerazione e autolisi |

**Tabella 2.** Grading istologico dei campioni

## **STUDIO II: Co-coltura di biopsie incisionali e ADSCs**

L'analisi statistica è stata eseguita elaborando i dati inerenti le Real Time PCR mediante un modello di regressione multipla sviluppato per derivare il  $\Delta\Delta C_T$  con la normalizzazione dei dati grezzi sugli housekeeping per stimare l'interazione tra i geni e gli effetti dei trattamenti (Yuan et al., 2006). I geni sono stati identificati come sovra espressi con valori da  $<2$  a  $+\infty$ , mentre sono stati considerati sotto espressi per valori da  $>2$  a  $-\infty$ .

# **6. RISULTATI**

## **STUDIO I: Valutazione delle alterazioni nel tempo di biopsie uterine in coltura *in vitro***

### **6.1 MTT assay**

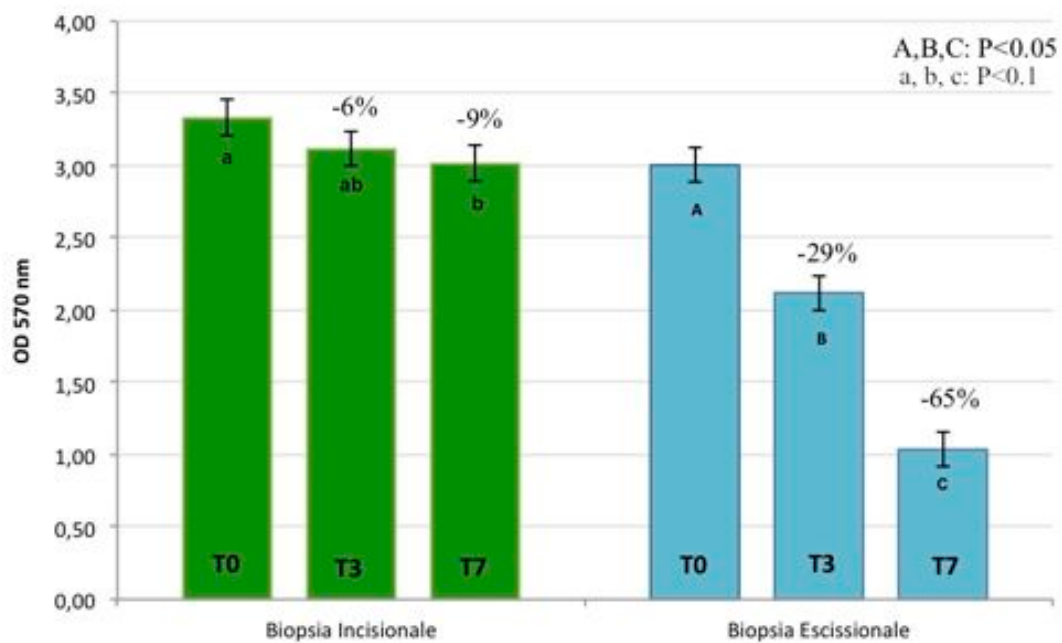
I risultati sono riassunti nel Grafico 1. La variazione dell'attività mitocondriale nelle biopsie incisionali al procedere del tempo non mostra differenze statisticamente significative ( $P>0.05$ ). T7 mostra il più basso livello di attività mitocondriale, che tende a essere statisticamente significativo rispetto a T0 ( $P=0.073$ ), ma non differente rispetto a T3. La riduzione dell'attività mitocondriale, nel confronto con il valore iniziale di T0, risulta essere del 6% in T3 e del 9% in T7.

Nelle biopsie escissionali, T0 possiede il valore più elevato di attività mitocondriale, significativamente più alto che in T3 e T7 ( $P<0.0001$ ). La riduzione dell'attività mitocondriale, nel confronto con il valore iniziale di T0, risulta essere del 29% in T3 e del 65% in T7.

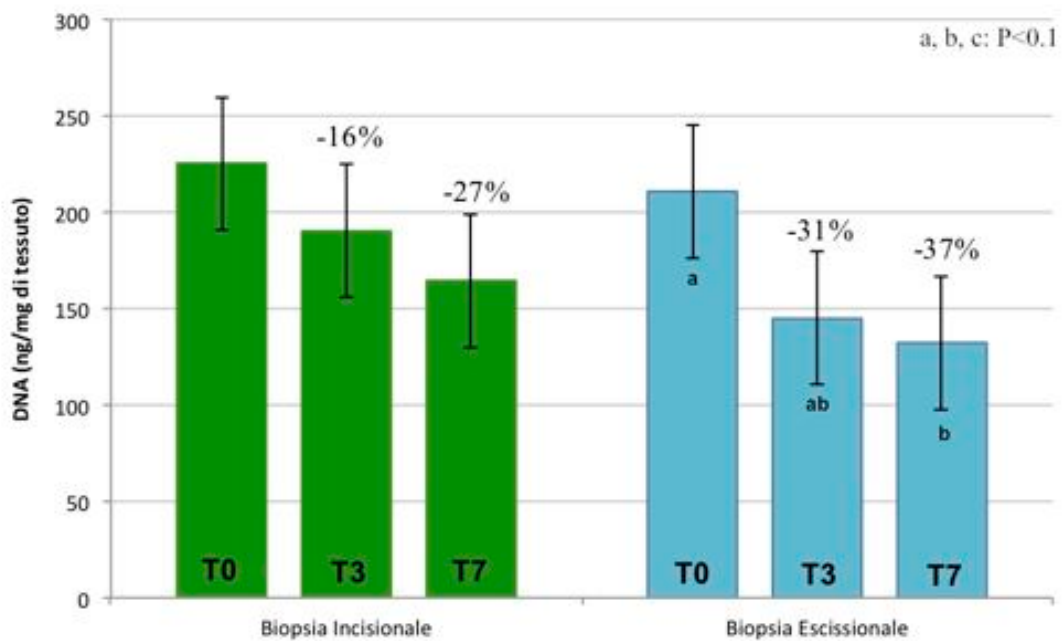
### **6.2 Quantificazione del DNA**

Non sono presenti differenze statisticamente significative nel contenuto di DNA al procedere del tempo di coltura (dai 0 ai 7 giorni) per entrambi i tipi di biopsia ( $P>0.5$ ).

Nelle biopsie incisionali ed escissionali, T0 mostra il quantitativo più alto di DNA, che tende ad essere statisticamente significativo solo nel confronto tra T0 e T7 nelle biopsie escissionali ( $P=0.064$ ; Grafico 2). La riduzione del contenuto di DNA, nel confronto con il valore iniziale di T0, risulta essere del 16% in T3 e del 27% in T7 per le biopsie incisionali, e del 31% in T3 e del 37% in T7 per le biopsie escissionali.



**Grafico 1.** Rappresentazione dell'andamento dell'attività mitocondriale all'aumentare del tempo di coltura *in vitro* per le biopsie incisionali ed escissionali.



**Grafico 2.** Rappresentazione dell'andamento della quantità di DNA all'aumentare del tempo di coltura *in vitro* per le biopsie incisionali ed escissionali.

### 6.3 Esame istologico

Sui campioni analizzati è apparsa evidente la mancanza dello strato epiteliale superficiale e la presenza di molti artefatti. La perdita di tale strato può essere dovuta al metodo di conservazione del campione e alla tecnica di preparazione del vetrino istologico (montaggio in oct e congelamento con isopentano, taglio al criostato, colorazione manuale). Si è quindi proceduto alla valutazione della componente epiteliale prendendo in considerazione l'epitelio della porzione ghiandolare (strato compatto e strato spugnoso) dell'endometrio. Un riassunto delle alterazioni dei tessuti rispetto al tempo di coltura *in vitro* è presentato nel Grafico 3.

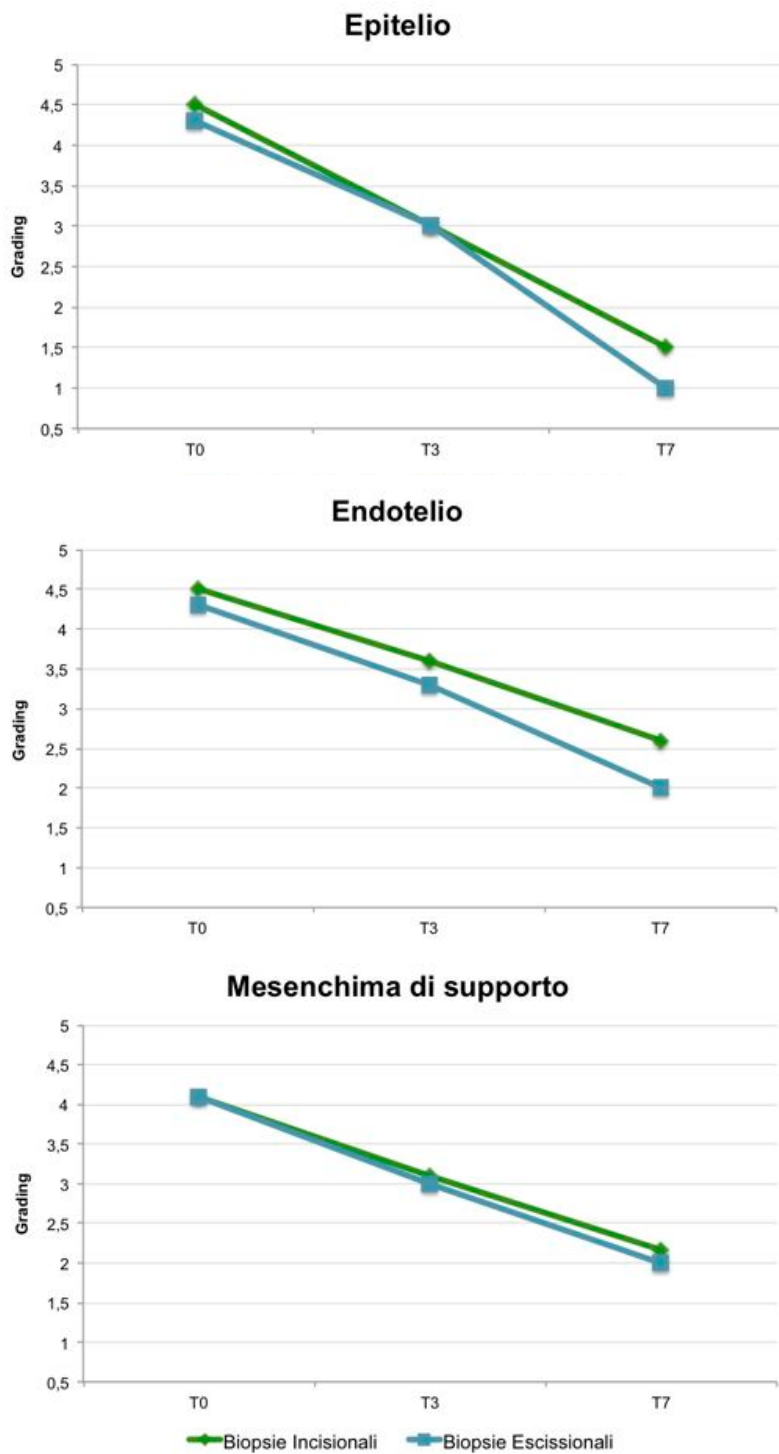
A T0, tutti i campioni presentano caratteristiche istologiche ottimali e tipiche del tessuto uterino equino. Lo strato epiteliale e fibro-vascolare mantengono una corretta adesione tra le cellule e posseggono una buona distinzione della componente citoplasmatica da quella nucleare .

Nei campioni mantenuti in coltura per 3 giorni compaiono lievi segni di degenerazione caratterizzati da isolati fenomeni di perdita di adesione cellulare e di perdita del rapporto nucleo-citoplasma. I fenomeni degenerativi appaiono più diffusi nelle biopsie escissionali rispetto alle biopsie incisionali.

Infine, a T7 è evidente una perdita dell'architettura del tessuto, con fenomeni di autolisi e degenerazione, rappresentata dalla completa perdita della tipica struttura ghiandolare dell'endometrio, dalla perdita di coesione tra le fibre connettivali e dal distacco delle cellule dell'endotelio. Anche a T7 i danni risultano maggiormente diffusi nelle biopsie escissionali rispetto alle biopsie incisionali.

Il miometrio ed il perimetrio risultano ben conservati in tutte le biopsie escissionali e a tutti i tempi.



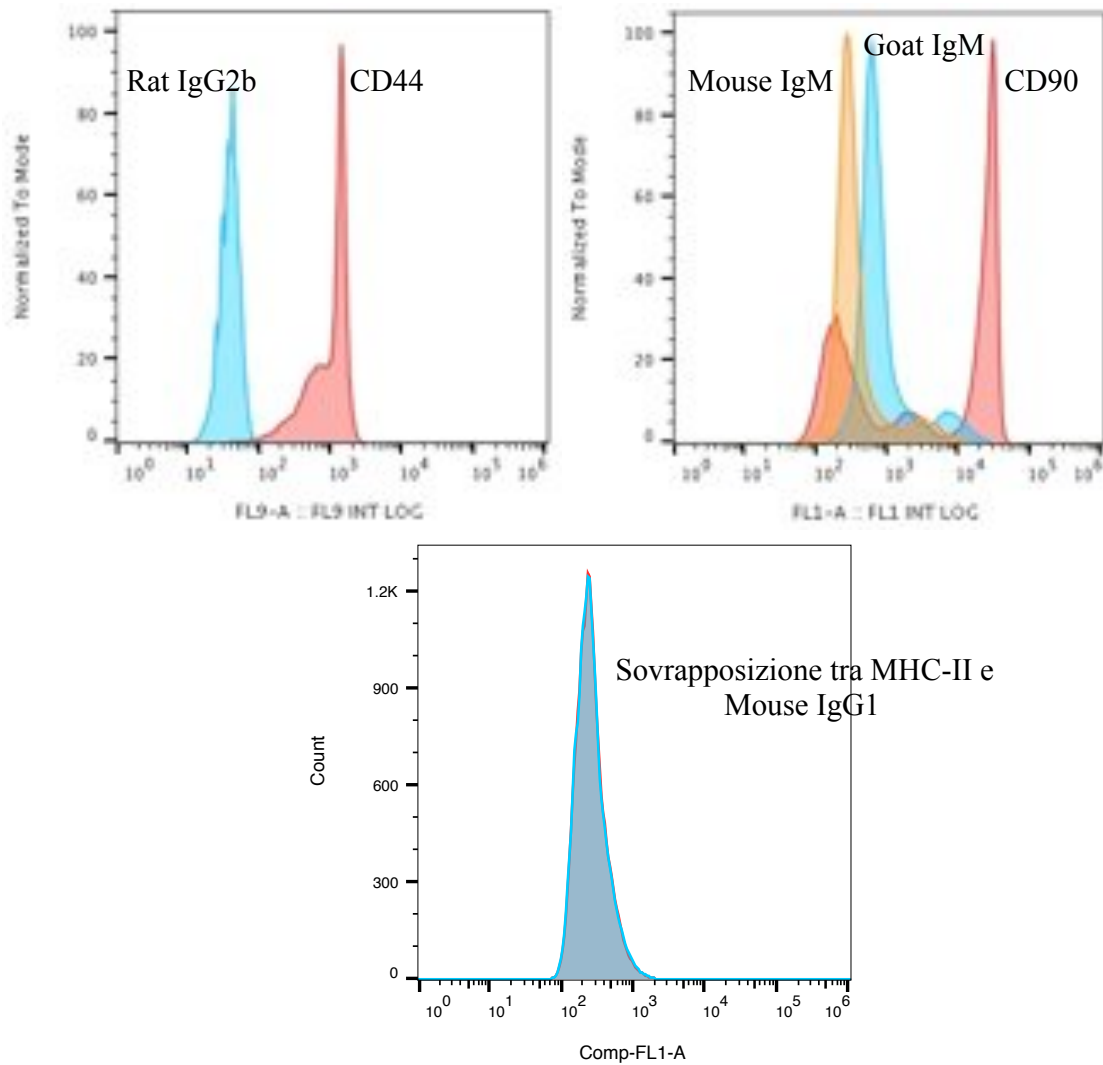


**Grafico 3.** Rappresentazione grafica dell'andamento delle varie componenti tissutali esaminate all'aumentare del tempo di coltura *in vitro*. I valori  $\geq 3$  indicano il mantenimento di buone caratteristiche tissutali.

## STUDIO II: Co-cultura di biopsie incisionali e ADSCs

### 6.4 Caratterizzazione delle ADSCs mediante citofluorimetria

A seguito dell'analisi condotta al citofluorimetro, le cellule estratte sono risultate positive ai markers CD44 e CD90 mentre non c'è stata alcuna interazione con il marker MHC-II (Istogramma 1).



**Istogramma 1.** Rappresentazione grafica, ottenuta tramite citofluorimetria, dell'espressione dei markers di superficie CD44, CD90 e MHC-II delle ADSCs utilizzate.

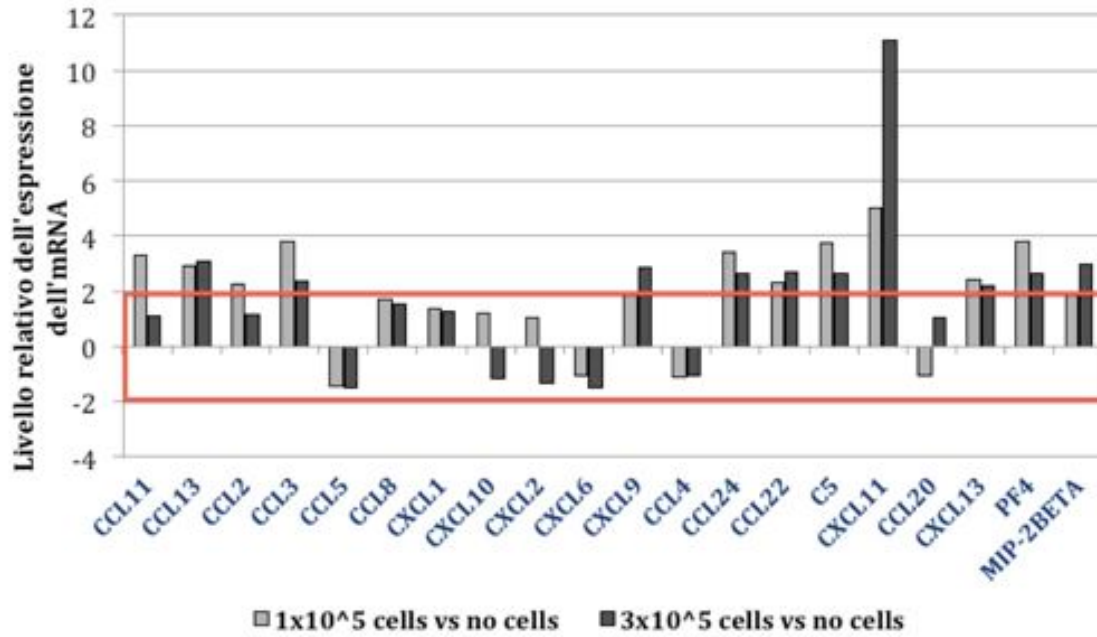
## **6.5 Analisi dei $\Delta\Delta C_T$ dei dati ottenuti dalle Real Time PCR**

In quest'analisi, vengono identificati come risultati significativi quelli che, confrontando i livelli di espressione di un gene in due condizioni (ciascuna dose vs il controllo o le due dosi tra di loro), risultano essere superiori di almeno 2 volte (da +2 a  $+\infty$  idealmente) o inferiori di almeno 2 volte (da -2 a  $-\infty$  idealmente) tra di loro.

### *6.5.1 Analisi delle chemochine e dei loro recettori*

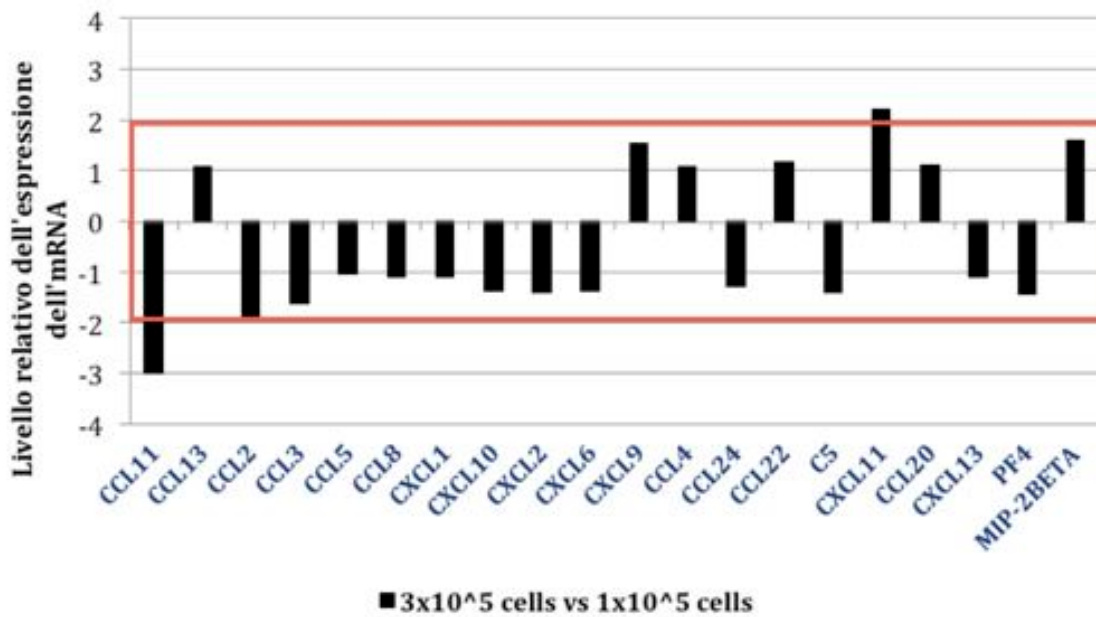
Dall'Istogramma 2 è possibile notare che la co-coltura di cellule staminali in biopsie uterine provoca la sovra espressione dei geni di diverse chemochine (CCL11, CCL13, CCL2, CCL3, CXCL9, CCL24, CCL22, C5, CXCL11, CXCL13, PF4, MIP-2BETA) con particolare rilevanza per CXCL11 che risulta sovra espresso di 5.01 e 11.1 volte nel confronto tra il controllo e il trattamento con  $1 \times 10^5$  e  $3 \times 10^5$  ADSCs, rispettivamente (Tabella 3). Nel confronto tra le due diverse dosi di ADSCs utilizzate, il gene per CCL11 e quello per CXCL11 risultano rispettivamente sotto espresso e sovra espresso all'aumentare della dose utilizzata (-3 e +2.22 volte, rispettivamente) (Istogramma 3).

### 1x10<sup>5</sup> e 3x10<sup>5</sup> ADSCs vs Controllo



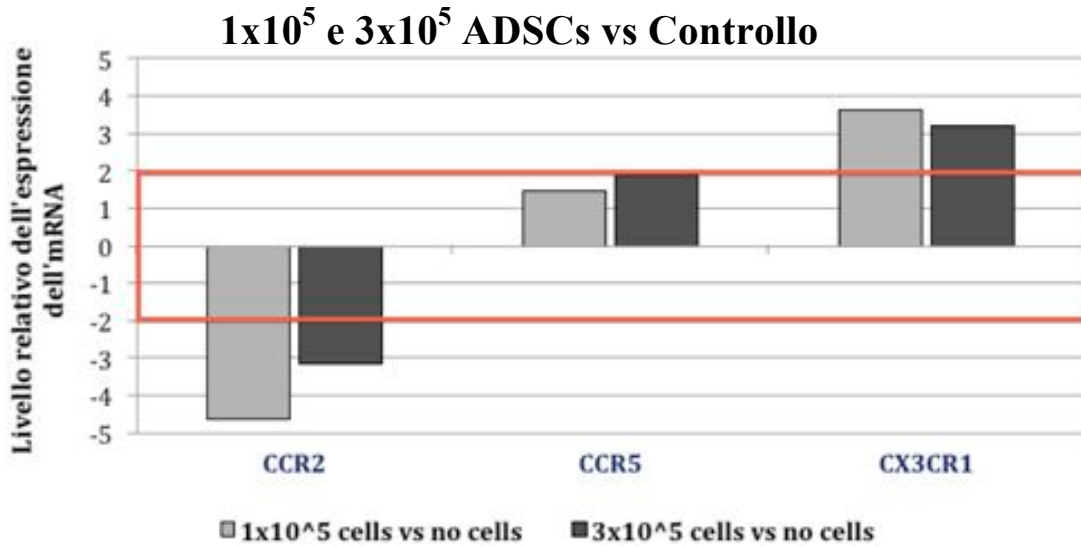
**Istogramma 2.** Effetto della presenza di ADSCs nell'espressione dei geni di alcune chemochine. Confronto tra il campione controllo e i campioni trattati con 1x10<sup>5</sup> e 3x10<sup>5</sup> ADSCs.

### 3x10<sup>5</sup> vs 1x10<sup>5</sup> ADSCs

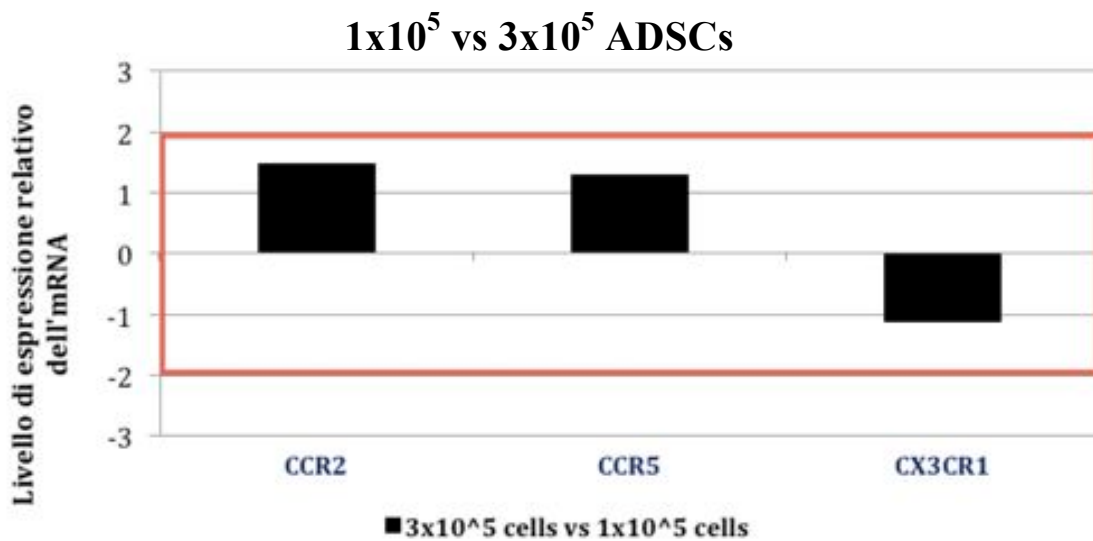


**Istogramma 3.** Effetto della presenza di ADSCs nell'espressione dei geni di alcune chemochine. Confronto tra i campioni trattati con 1x10<sup>5</sup> e 3x10<sup>5</sup> ADSCs.

Per quanto riguarda i recettori delle chemochine, la presenza di ADSCs provoca la sotto espressione del gene per CCR2 e la sovra espressione di quello per CX3CR1 in modo non dipendente dalla dose di ADSCs utilizzata (Istogramma 4 e 5).



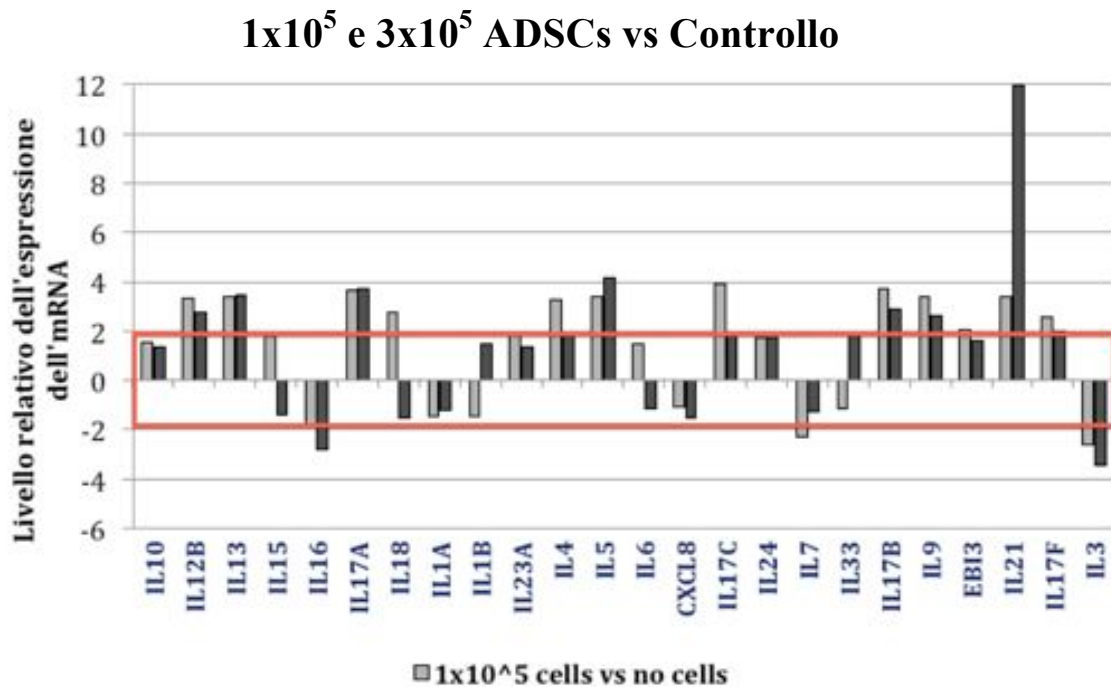
**Istogramma 4.** Effetto della presenza di ADSCs nell'espressione dei geni di alcuni recettori delle chemochine. Confronto tra il campione controllo e i campioni trattati con 1x10<sup>5</sup> e 3x10<sup>5</sup> ADSCs.



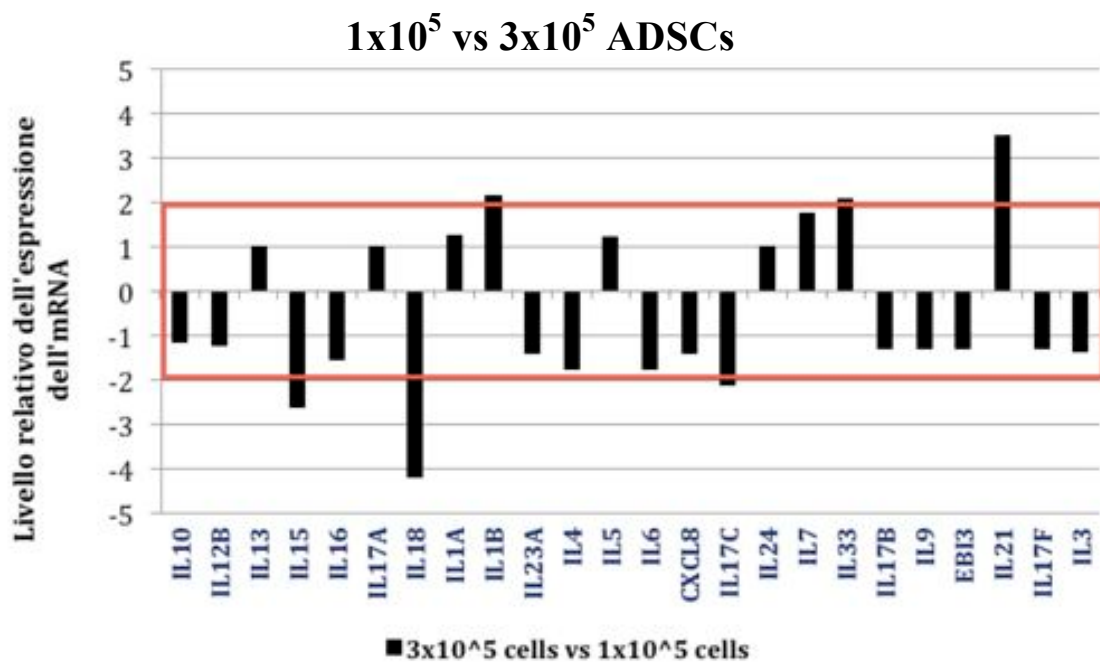
**Istogramma 5.** Effetto della presenza di ADSCs nell'espressione dei geni di alcuni recettori delle chemochine. Confronto tra i campioni trattati con 1x10<sup>5</sup> e 3x10<sup>5</sup> ADSCs.

### 6.5.2 Analisi delle interleuchine e dei loro recettori

La presenza di ADSCs in culture di biopsie uterine modifica l'espressione dei geni di alcune interleuchine. Come visto per le chemochine, i geni di alcune interleuchine vengono sovra espressi (IL12B, IL13, IL17A, IL4, IL5, IL17C, IL17B, IL9, IL21, IL17F) mentre altri risultano sotto espressi (IL16, IL7 e IL3) (Istogramma 6). La sovra espressione del gene per l'IL21 risulta essere quella più marcata, +3.42 volte nel trattamento con  $1 \times 10^5$  ADSCs e +11.97 in quello con  $3 \times 10^5$  ADSCs rispetto al controllo non trattato (Tabella 3). Nel confronto tra le due dosi di ADSCs utilizzate, all'aumentare della dose di cellule i geni per IL15, IL18 e IL17C risultano sotto espressi (-2.59, -4.17 e -2.11, rispettivamente) mentre quelli per IL1B, IL33 e IL21 risultano sovra espressi (+2.17, +2.08 e +3.5, rispettivamente) (Istogramma 7; Tabella 3).

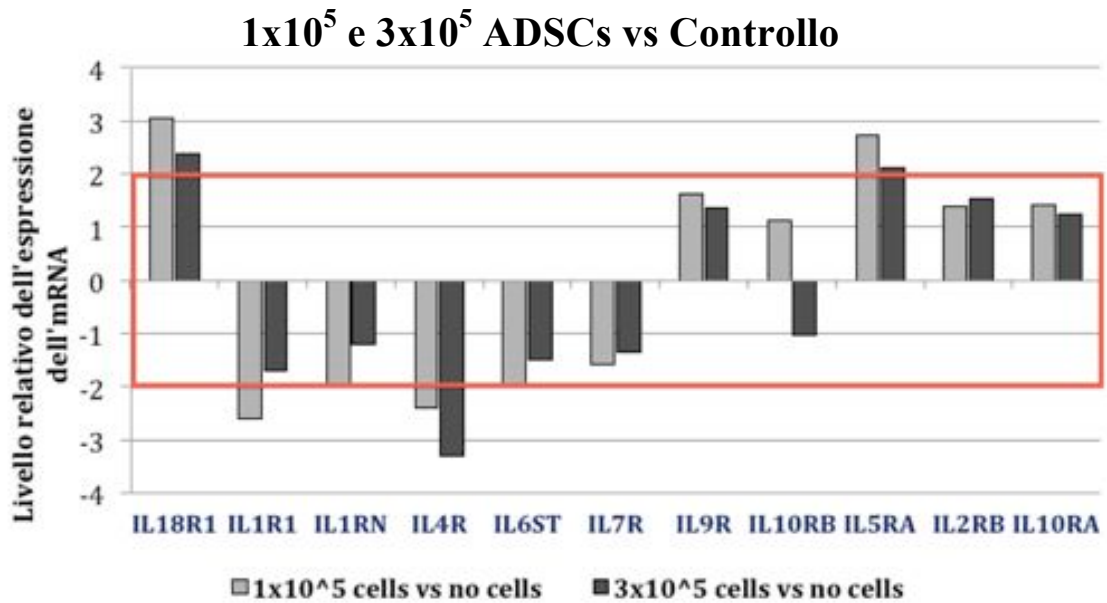


**Istogramma 6.** Effetto della presenza di ADSCs nell'espressione dei geni di alcune interleuchine. Confronto tra il campione controllo e i campioni trattati con  $1 \times 10^5$  e  $3 \times 10^5$  ADSCs.

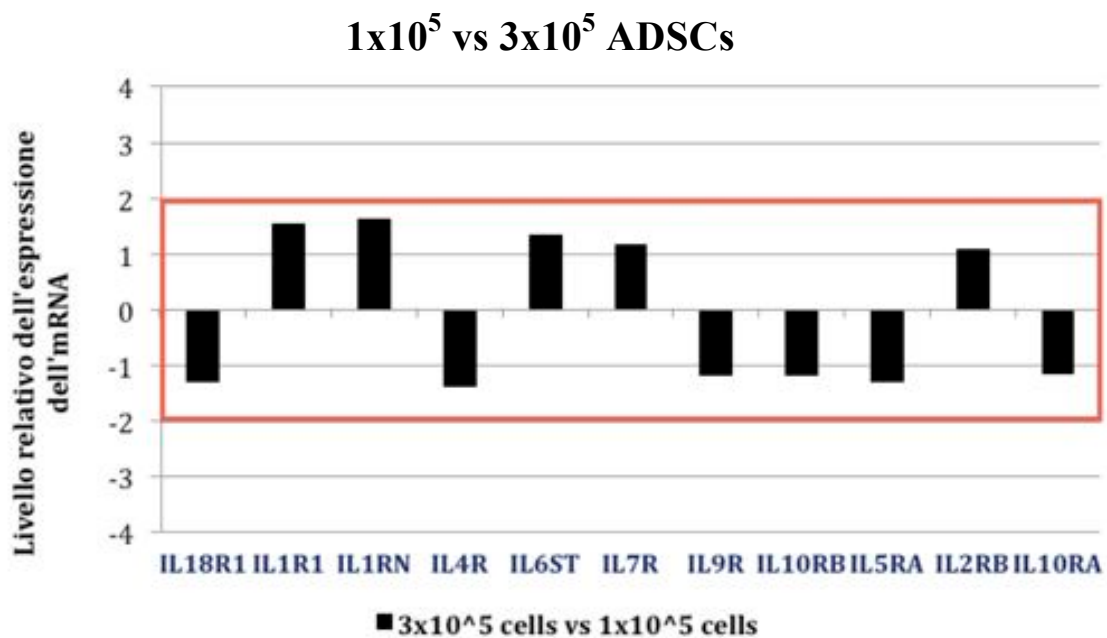


**Istogramma 7.** Effetto della presenza di ADSCs nell'espressione dei geni di alcune interleuchine. Confronto tra i campioni trattati con 1x10<sup>5</sup> e 3x10<sup>5</sup> ADSCs.

I geni per la produzione dei recettori per le interleuchine IL18R1 e IL5RA subiscono una sovra espressione a seguito della presenza di ADSCs, mentre quelli per la produzione di IL1R1 e IL4R risultano sotto espressi conseguentemente all'incubazione con le cellule staminali (Istogramma 8). Nel confronto tra le due dosi utilizzate, non vi è alcuna differenza di espressione per i geni responsabili della produzione dei vari recettori per le interleuchine (Istogramma 9).



**Istogramma 8.** Effetto della presenza di ADSCs nell'espressione dei geni di alcuni recettori per le interleuchine. Confronto tra il campione controllo e i campioni trattati con 1x10<sup>5</sup> e 3x10<sup>5</sup> ADSCs.

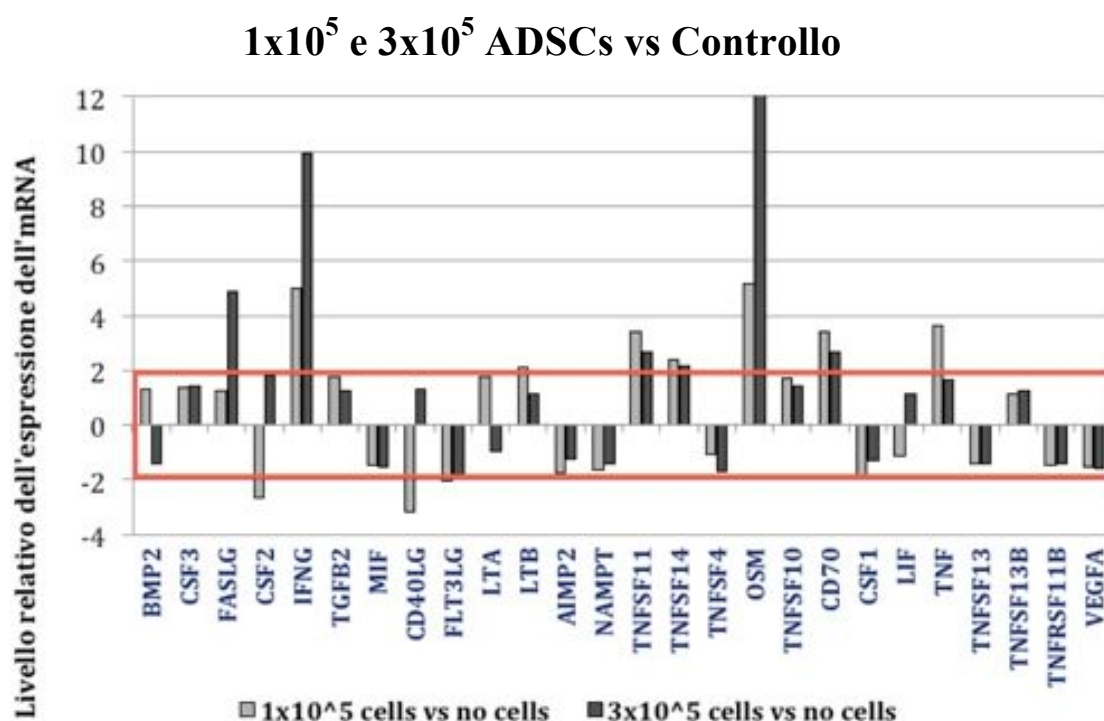


**Istogramma 9.** Effetto della presenza di ADSCs nell'espressione dei geni di alcuni recettori per le interleuchine. Confronto tra i campioni trattati con 1x10<sup>5</sup> e 3x10<sup>5</sup> ADSCs.

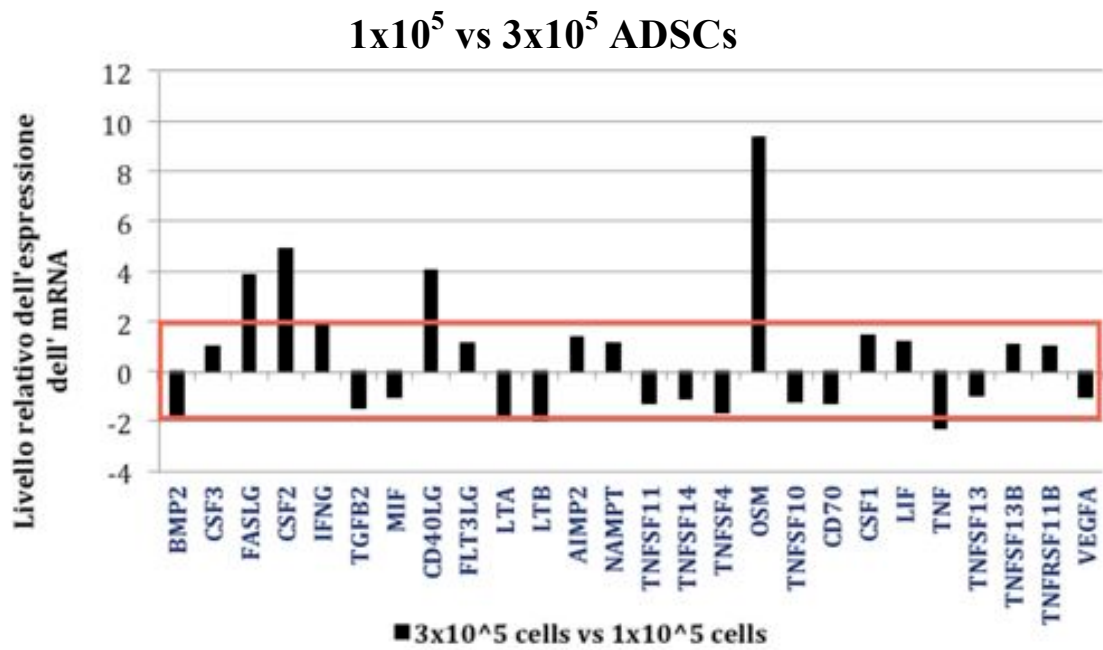


### 6.5.3 Analisi di altre citochine e recettori

La presenza di ADSCs in biopsie endometriali equine causa la sovra espressione dei geni per la produzione delle citochine FASLG, IFN- $\gamma$ , TNFSF11, TNFSF14, OSM, CD70, TNF e la sotto espressione di quelli per CSF2 e CD40LG (Istogramma 10; Tabella 3). I geni per FASLG, IFN- $\gamma$  e OSM vengono sovra espressi di 4.84, 9.91 e 48.62 volte, rispettivamente, nel confronto tra il controllo e il trattamento con  $3 \times 10^5$  ADSCs (Tabella 3). Nel confronto tra le dosi, all'aumentare della dose di cellule utilizzata risulta esserci sovra espressione dei geni per FASLG, CSF2, CD40LG e OSM mentre viene lievemente sotto espresso il gene per TNF (Istogramma 11). Il gene per OSM risulta essere 9.37 volte sovra espresso nel trattamento con  $3 \times 10^5$  ADSCs rispetto al trattamento con  $1 \times 10^5$  MSCs (Tabella 3).



**Istogramma 10.** Effetto della presenza di ADSCs nell'espressione dei geni di altre citochine e recettori. Confronto tra il campione controllo e i campioni trattati con  $1 \times 10^5$  e  $3 \times 10^5$  ADSCs.



**Istogramma 11.** Effetto della presenza di ADSCs nell'espressione dei geni di altre citochine e recettori. Confronto tra i campioni trattati con 1x10<sup>5</sup> e 3x10<sup>5</sup> ADSCs.

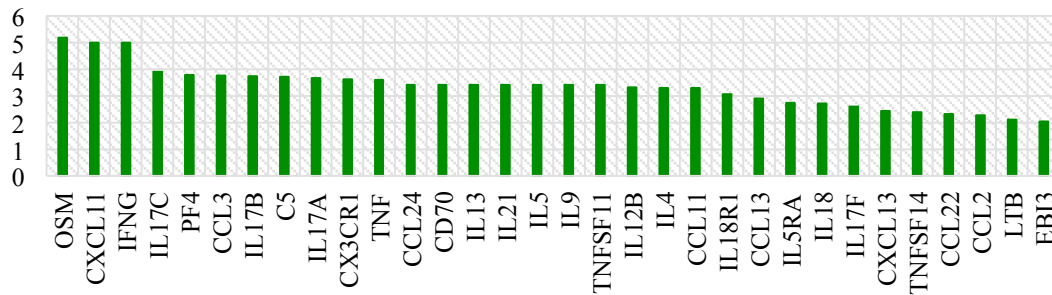
#### 6.5.4 Riassunto della sovra e sotto espressione dei geni per le varie citochine

A seguito della complessità e dell'elevato numero di dati ottenuti, si è ritenuto necessario un riassunto dei risultati di sovra e sotto espressione a seguito della presenza di due diverse dosi di ADSCs (Tabella 3; Istogrammi da 12 a 17).

| Citochina     | 3x10 <sup>5</sup><br>ADSCs<br>vs Ctr | 1x10 <sup>5</sup><br>ADSCs<br>vs Ctr | 3x10 <sup>5</sup><br>vs 1x10 <sup>5</sup><br>ADSCs | Citochina        | 3x10 <sup>5</sup><br>ADSCs<br>vs Ctr | 1x10 <sup>5</sup><br>ADSCs<br>vs Ctr | 3x10 <sup>5</sup><br>vs 1x10 <sup>5</sup><br>ADSCs |
|---------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--|------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--|
| <b>C5</b>     | +2.66                                | +3.72                                |  | <b>IL17A</b>     | +3.71                                | +3.67                                |  |
| <b>CCL11</b>  |                                      | +3.29                                | -3.00  | <b>IL17B</b>     | +2.91                                | +3.75                                |  |
| <b>CCL13</b>  | +3.10                                | +2.90                                |  | <b>IL17C</b>     |                                      | +3.90                                | -2.11  |
| <b>CCL2</b>   |                                      | +2.27                                |  | <b>IL17F</b>     | +2.02                                | +2.59                                |  |
| <b>CCL22</b>  | +2.68                                | +2.31                                |  | <b>IL18</b>      |                                      | +2.73                                | -4.17  |
| <b>CCL24</b>  | +2.66                                | 3.42                                 |  | <b>IL18R1</b>    | +2.39                                | +3.06                                |  |
| <b>CCL3</b>   | +2.34                                | 3.77                                 |  | <b>IL1B</b>      |                                      |                                      | +2.17  |
| <b>CCR2</b>   | -3.14                                | -4.64                                |  | <b>IL1R1</b>     |                                      | -2.60                                |  |
| <b>CD40LG</b> |                                      | -3.16                                | +4.04  | <b>IL21</b>      | +11.97                               | +3.42                                | +3.50  |
| <b>CD70</b>   | +2.66                                | +3.42                                |  | <b>IL3</b>       | -3.47                                | -2.59                                |  |
| <b>CSF2</b>   |                                      | -2.69                                | +4.88  | <b>IL33</b>      |                                      |                                      | +2.08  |
| <b>CX3CR1</b> | +3.21                                | +3.62                                |  | <b>IL4</b>       |                                      | +3.30                                |  |
| <b>CXCL11</b> | +11.10                               | +5.01                                | +2.22  | <b>IL4R</b>      | -3.30                                | -2.40                                |  |
| <b>CXCL13</b> | +2.19                                | +2.43                                |  | <b>IL5</b>       | +4.19                                | +3.42                                |  |
| <b>CXCL9</b>  | +2.87                                |                                      |  | <b>IL5RA</b>     | +2.13                                | +2.74                                |  |
| <b>EBI3</b>   |                                      | +2.04                                |  | <b>IL7</b>       |                                      | -2.28                                |  |
| <b>FASLG</b>  | +4.84                                |                                      | +3.84  | <b>IL9</b>       | +2.66                                | +3.42                                |  |
| <b>FLT3LG</b> |                                      | -2.06                                |  | <b>LTB</b>       |                                      | +2.11                                |  |
| <b>IFNG</b>   | +9.91                                | +5.00                                |  | <b>MIP-2BETA</b> | +2.95                                |                                      |  |
| <b>IL12B</b>  | +2.74                                | +3.31                                |  | <b>OSM</b>       | +48.62                               | +5.19                                | +9.37  |
| <b>IL13</b>   | +3.49                                | +3.42                                |  | <b>PF4</b>       | +2.66                                | +3.79                                |  |
| <b>IL15</b>   |                                      |                                      | -2.59  | <b>TNF</b>       |                                      | +3.61                                |  |
| <b>IL16</b>   | -2.79                                |                                      |  | <b>TNFSF11</b>   | +2.66                                | +3.42                                |  |
|               |                                      |                                      |  | <b>TNFSF14</b>   | +2.11                                | +2.39                                |  |

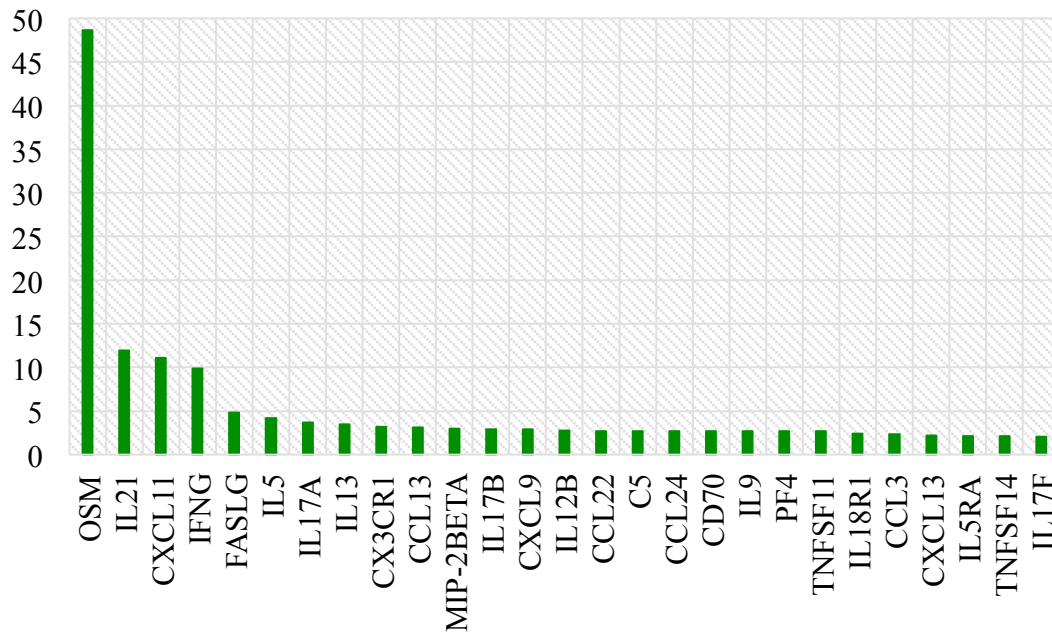
**Tabella 3.** Riassunto dei valori di sovra e sotto espressione dei geni presi in esame.

### 1x10<sup>5</sup> ADSCs vs Controllo



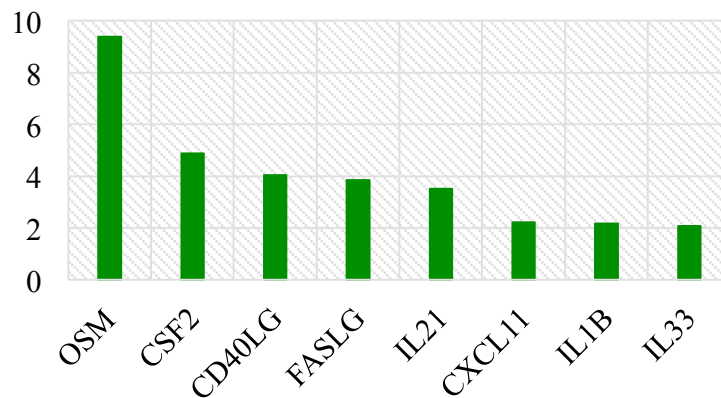
**Istogramma 12.** Geni responsabili della produzione di alcuni fattori dell'infiammazione sovra espressi a seguito dell'incubazione con 1x10<sup>5</sup> ADSCs rispetto al controllo.

### 3x10<sup>5</sup> ADSCs vs Controllo



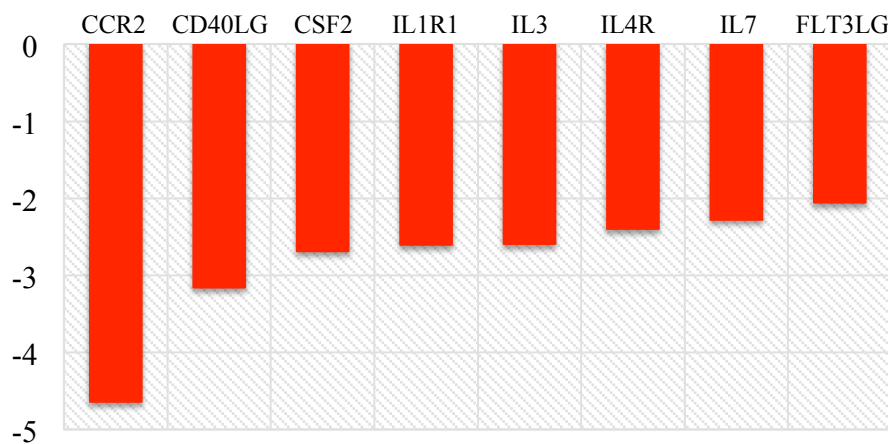
**Istogramma 13.** Geni responsabili della produzione di alcuni fattori dell'infiammazione sovra espressi a seguito dell'incubazione con 3x10<sup>5</sup> ADSCs rispetto al controllo.

### 3x10<sup>5</sup> vs 1x10<sup>5</sup> ADSCs

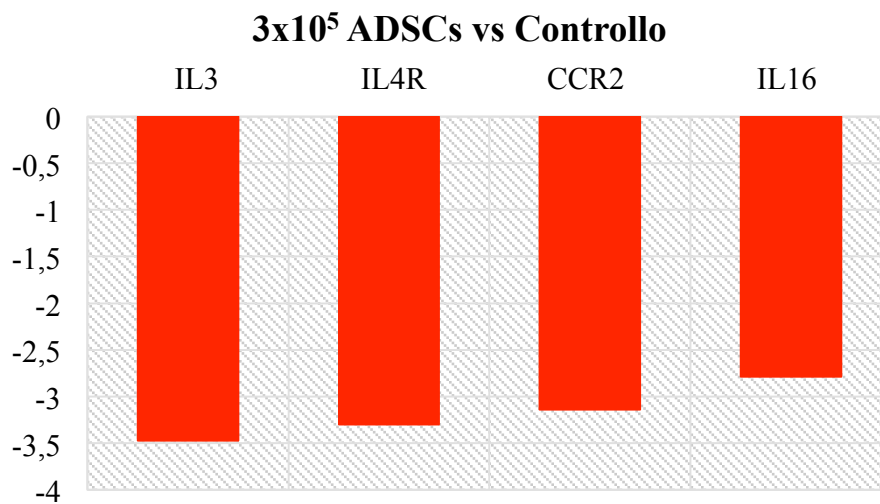


**Istogramma 14.** Geni responsabili della produzione di alcuni fattori dell'infiammazione sovra espressi, confronto tra 3x10<sup>5</sup> e 1x10<sup>5</sup> ADSCs.

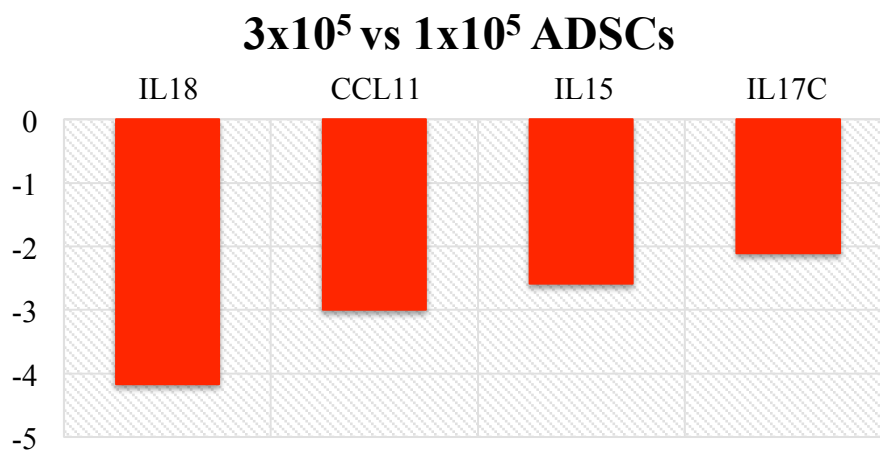
### 1x10<sup>5</sup> ADSCs vs Controllo



**Istogramma 15.** Geni responsabili della produzione di alcuni fattori dell'infiammazione sotto espressi a seguito dell'incubazione con 3x10<sup>5</sup> ADSCs rispetto al controllo.



**Istogramma 16.** Geni responsabili della produzione di alcuni fattori dell'infiammazione sotto espressi a seguito dell'incubazione con  $3 \times 10^5$  ADSCs rispetto al controllo.



**Istogramma 17.** Geni responsabili della produzione di alcuni fattori dell'infiammazione sotto espressi, confronto tra  $3 \times 10^5$  e  $1 \times 10^5$  ADSCs.

# **7. DISCUSSIONE**

Lo scopo principale di questo studio è stato quello di approfondire le conoscenze riguardanti l'interazione tra le cellule staminali e l'endometrio equino monitorando l'espressione di geni correlati alla produzione di citochine infiammatorie, e dei loro recettori, al fine di valutare un loro possibile utilizzo come terapia per alcune patologie uterine equine come l'endometrite e l'endometriosi. A tal fine, si è resa necessaria l'ideazione di un protocollo di raccolta e coltura *in vitro* di biopsie endometriali equine, campione facilmente utilizzabile come modello sperimentale. Infatti, è ormai nota la capacità "modulatoria" che le cellule staminali svolgono nei processi infiammatori delle varie specie e nei vari tessuti. Ciò ha portato al loro utilizzo nella pratica clinica con buoni risultati sia nell'uomo sia in altre specie, cavallo compreso. Tuttavia, le conoscenze a riguardo sono ancora limitate. Il modo in cui le cellule staminali svolgono la loro funzione, come influenzano l'espressione di alcune citochine pro o anti infiammatorie, la quantità di cellule necessarie ad ottenere un effetto clinico, sono tutte incognite ad oggi presenti. A tale scopo, la valutazione delle modificazioni di espressione di un intero panel di citochine infiammatorie tipiche del cavallo, conseguentemente all'esposizione a due differenti dosi di cellule staminali, potrebbe permettere di far luce su alcuni di questi punti.

A causa della facilità di prelievo, della ripetibilità e dell'assenza di effetti indesiderati sull'animale, la biopsia uterina ci è sembrata fin da subito un campione ottimale per lo svolgimento di test *in vitro*. La raccolta e la coltura *in vitro* di biopsie uterine equine è già stata utilizzata da diversi autori (Ealy et al., 2010; Falomo et al., 2015; Nash et al., 2008, 2010, Penrod et al., 2013a, 2013b). Tuttavia, non esistono informazioni riguardanti la sopravvivenza di questo tipo di campione quando mantenuto in coltura *in vitro*. L'MTT assay e l'esame istologico sono stati utilizzati separatamente per la



valutazione della vitalità cellulare di questi campioni (Penrod et al., 2013a; Trujano and Wrathall, 1985) ma non possono essere considerati sufficienti.

Questo è il primo studio che ha valutato la sopravvivenza di due diversi tipi di biopsia uterina all'aumentare del tempo di coltura *in vitro* con diversi tests. Nello Studio I è stato ideato un protocollo di raccolta, lavaggio e messa in coltura di biopsie endometriali. Nella fase preliminare, i campioni prelevati sono stati sottoposti a 3 lavaggi, di 2 minuti ciascuno, in una soluzione fisiologica addizionata con P/S e gentamicina. Questa tecnica di lavaggio non è stata sufficiente a garantire una riduzione efficace degli agenti microbici che fisiologicamente risiedono a livello dell'utero equino. Infatti, molti campioni sono risultati positivi al test batteriologico e mostravano la crescita di muffe e/o lieviti quando esaminati visivamente a 7 giorni di coltura. Per tale motivo, si è proceduto a modificare la fase di lavaggio del campione inserendo uno scrub chirurgico del perimetrio e un flushing; inoltre, nella soluzione di lavaggio è stata aggiunta l'acetilcisteina allo scopo di favorire la liquefazione del muco endometriale e l'eliminazione del biofilm. Questo nuovo protocollo ha permesso di ottenere campioni privi di contaminazioni fino a 7 giorni. L'ottimizzazione di questa fase dello studio si è dimostrato un metodo efficace per la prevenzione di contaminazioni batteriche o fungine rispetto all'aggiunta di antibiotici nel medium di coltura (Trujano and Wrathall, 1985).

Con il protocollo ideato, le biopsie incisionali possono essere mantenute in coltura *in vitro* fino a 3 giorni senza incorrere in cambiamenti significativi della vitalità del campione. Infatti, l'attività mitocondriale, la quantità di DNA e l'aspetto istologico non hanno subito variazioni nel confronto tra 0 e 3 giorni. Questo studio è in accordo con quello di Penrod et al. (2013) dove biopsie incisionali hanno dimostrato una significativa riduzione dell'attività mitocondriale dopo 4 giorni di coltura *in vitro*

(Penrod et al., 2013a). Tuttavia, ulteriori studi dovrebbero essere effettuati tra 3 e 7 giorni per approfondire i cambiamenti che avvengono in questo preciso intervallo di tempo. Infatti, il fattore limitante per l'utilizzo di biopsie incisionali non è stato il decadimento dell'attività mitocondriale o della quantità di DNA, che non hanno subito riduzioni significative fino a 7 giorni, ma la comparsa di alterazioni a livello istologico tra i 3 e i 7 giorni. Questo studio dimostra che le varie componenti esaminate (mitocondri, DNA e organizzazione del tessuto) reagiscono in modo diverso alla coltura *in vitro*. Inoltre, anche a livello istologico è possibile notare come le varie parti del tessuto (epitelio, endotelio, mesenchima di supporto) siano "diversamente sensibili". Infatti, dopo 3 giorni di coltura la componente epiteliale e quella mesenchimale risultano maggiormente compromesse. A 7 giorni, la componente epiteliale è risultata quella più vulnerabile alla coltura *in vitro*. Lo Studio I ha confermato che l'utilizzo di un unico test per la valutazione della vitalità di un campione non può rappresentare un metodo attendibile; è desiderabile combinare l'utilizzo di più metodiche per ottenere una maggior comprensione dei cambiamenti che avvengono a livello delle varie componenti del tessuto.

Al contrario, la coltura *in vitro* di biopsie escissionali necessita di ulteriori approfondimenti riguardo ai cambiamenti che intercorrono tra il giorno 0 e 3. Infatti, nonostante la quantità di materiale genetico risulti preservata, in questo periodo di tempo l'attività mitocondriale si riduce in modo statisticamente significativo. Il più rapido degrado di questi campioni, rispetto a quello delle biopsie incisionali, potrebbe essere associato al più elevato rapporto superficie-volume posseduto con conseguente maggior sofferenza dei tessuti a seguito dell'incapacità delle cellule di venire a contatto con i nutrienti del medium di coltura. Inoltre, all'esame istologico questi campioni presentano alterazioni maggiormente diffuse rispetto alle biopsie incisionali.

Tuttavia, le biopsie escissionali potrebbero trovare utilizzo in studi che richiedono tempi di coltura *in vitro* fino a 24 h.

In futuro, qualsiasi esperimento effettuato su biopsie endometriali dovrebbe tenere in considerazione quale componente tissutale è oggetto di studio e dovrebbe essere svolta una valutazione completa della vitalità del campione, in modo da creare delle curve di decadimento che permettano di interpretare in modo più pertinente i risultati ottenuti.

In conclusione, questa prima parte del progetto ci ha permesso di creare e applicare un protocollo per la coltura *in vitro* di biopsie uterine equine. Le biopsie incisionali, pretrattate con soluzioni antibiotiche, antimicotiche e mucolitiche e mantenute in coltura a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> in cDMEM, possono essere utilizzate per studi futuri farmacologici e/o tossicologici fino a 3 giorni. Tuttavia, i cambiamenti che avvengono tra i 3 e i 7 giorni dovrebbero essere oggetto di ulteriori studi al fine di ottenere un più preciso limite di utilizzo di questi campioni.

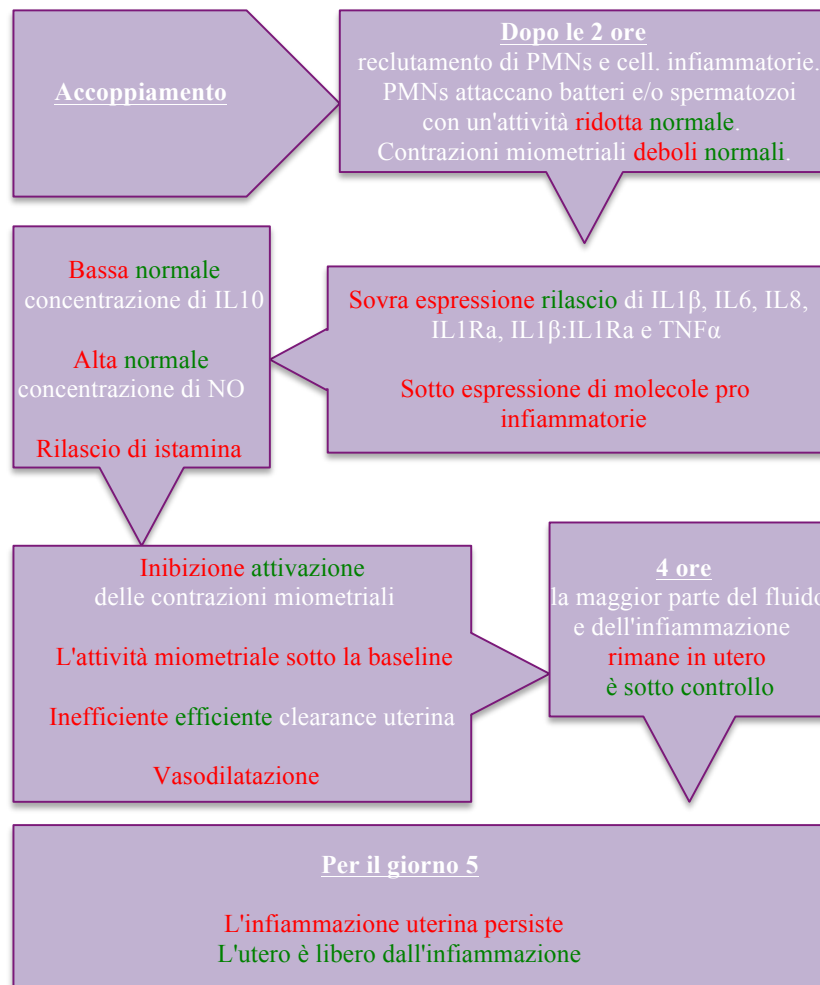
Alla luce di tali risultati, il nostro studio è proceduto con la co-coltura *in vitro* per 3 giorni di biopsie incisionali con 2 diverse dosi di ADSCs e la creazione di librerie geniche per una più ampia valutazione dell'espressione di geni correlati alla produzione di citochine infiammatorie e dei loro recettori. Essendo questo il primo studio ad aver preso in considerazione l'espressione di una così vasta gamma di geni in un tessuto trattato con cellule staminali, si è scelto di utilizzare uteri provenienti da animali giovani e privi di processi infiammatori in atto per ottenere campioni che possedessero un'espressione genica iniziale il più possibile standardizzata. Inoltre, l'utilizzo di uteri interessati da un processo infiammatorio avrebbe creato una variabilità iniziale dei campioni tale da rendere difficile ogni successiva considerazione sui risultati ottenuti. Lo scopo finale è stato quello di valutare: i) come si modifica l'espressione di geni

correlati alla produzione di citochine infiammatorie e dei loro recettori a seguito della presenza di ADSCs in uteri "sani", ii) la presenza di un effetto dose-dipendente delle ADSCs sull'espressione di tali geni.

Nel presente studio, non è stata creata una libreria genica per la valutazione dell'espressione di base dei geni correlati alla produzione delle citochine infiammatorie, e dei loro recettori, sulle sole cellule staminali messe in coltura senza la presenza di biopsie incisionali poiché è noto che le cellule staminali si attivano, modificando l'espressione di tali geni, e producono molecole bioattive a seconda degli stimoli che ricevono (Kol et al., 2013; Shi et al., 2012). Quindi, l'espressione di questi geni in cellule staminali "pure" è per principio diversa da quella di cellule staminali co-coltivate con biopsie incisionali. L'utilizzo di un sistema con membrana Transwell, che permette di mantenere separate le cellule staminali dal resto del campione, potrebbe essere preso in considerazione in studi futuri. Tuttavia, alla luce delle conoscenze a oggi presenti sul meccanismo d'azione delle cellule staminali, non è da escludere che sia necessario un contatto diretto tra le cellule e i tessuti per ottenere una maggiore o diversa attivazione delle stesse. Infatti, una parte dell'effetto delle MSCs è dovuto all'integrazione diretta con conseguente rimodellamento e rigenerazione fisica e funzionale del tessuto; inoltre, alcune molecole rilasciate dalle MSCs, come l'NO, agiscono solo entro distanze ridotte a qualche diametro cellulare (Carrade et al., 2012; Koch et al., 2008; Shi et al., 2012). Per questo motivo abbiamo svolto un confronto tra biopsie non trattate e biopsie trattate con le due diverse dosi di cellule staminali. Questo confronto ci ha permesso di determinare quali siano gli effetti legati alla presenza delle ADSCs nel tessuto, anche se non ci ha permesso di differenziare gli effetti originati direttamente dalle ADSCs da quelli originati dal tessuto in risposta alla presenza delle ADSCs. Lo scopo finale è quello di ampliare le conoscenze riguardanti il meccanismo d'azione delle ADSCs per

valutare un loro possibile utilizzo in patologie endometriali equine a carattere infiammatorio come l'endometrite e l'endometriosi. Di particolare interesse clinico per la grande prevalenza nella popolazione equina risulta essere l'endometrite post-coitale, intesa come processo infiammatorio causato dall'incapacità da parte dei meccanismi di difesa dell'utero di eliminare gli antigeni (Schlafer, 2007; Watson, 2000). A seguito dell'accoppiamento, l'entrata di agenti microbici, urina, aria e spermatozoi scatena una risposta infiammatoria innata e fisiologica caratterizzata dall'arrivo in sede dei neutrofili polimorfonucleati (PMNs) e dal richiamo di citochine che provocano un accumulo di fluido infiammatorio in utero (M Christoffersen et al., 2012). Le citochine modulano la risposta infiammatoria acuta in modo da minimizzare i danni ai tessuti e promuovere i processi di riparazione (M Christoffersen et al., 2012) mentre i PMNs attivano meccanismi volti all'eliminazione del fluido accumulato (Christoffersen et al., 2010; Troedsson, 2006). Le cavalle differiscono tra loro per l'abilità nel ridurre questo processo infiammatorio. Alcune cavalle risolvono questa infiammazione fisiologica nel giro di 24-48h venendo definite resistenti allo sviluppo di PMIE (*resistant mare* o RM) e altre, circa un 15% della popolazione, non sono in grado di regolare in modo corretto il processo infiammatorio e presentano un'infiammazione persistente dell'endometrio, vengono quindi definite sensibili (*susceptible mare* o SM) allo sviluppo di PMIE (Christoffersen et al., 2010; Troedsson, 2006). Rispetto alle RM, le SM mostrano: i) sotto espressione della citochina anti infiammatoria IL10 e del TNF $\alpha$ , ii) scarsa contrazione miometriale per aumentata produzione di NO e sotto espressione di IL10, potente inibitore del NO, iii) maggior numero di mastociti con conseguente rilascio di istamina e vasodilatazione, iv) maggior produzione di molecole pro infiammatorie (IL1 $\beta$ , IL1Ra, IL6, IL8 e TNF $\alpha$ ). L'IL8 è responsabile della continua migrazione dei PMNs nel lume uterino che causano il perdurare del processo infiammatorio, l'IL1 $\beta$  e

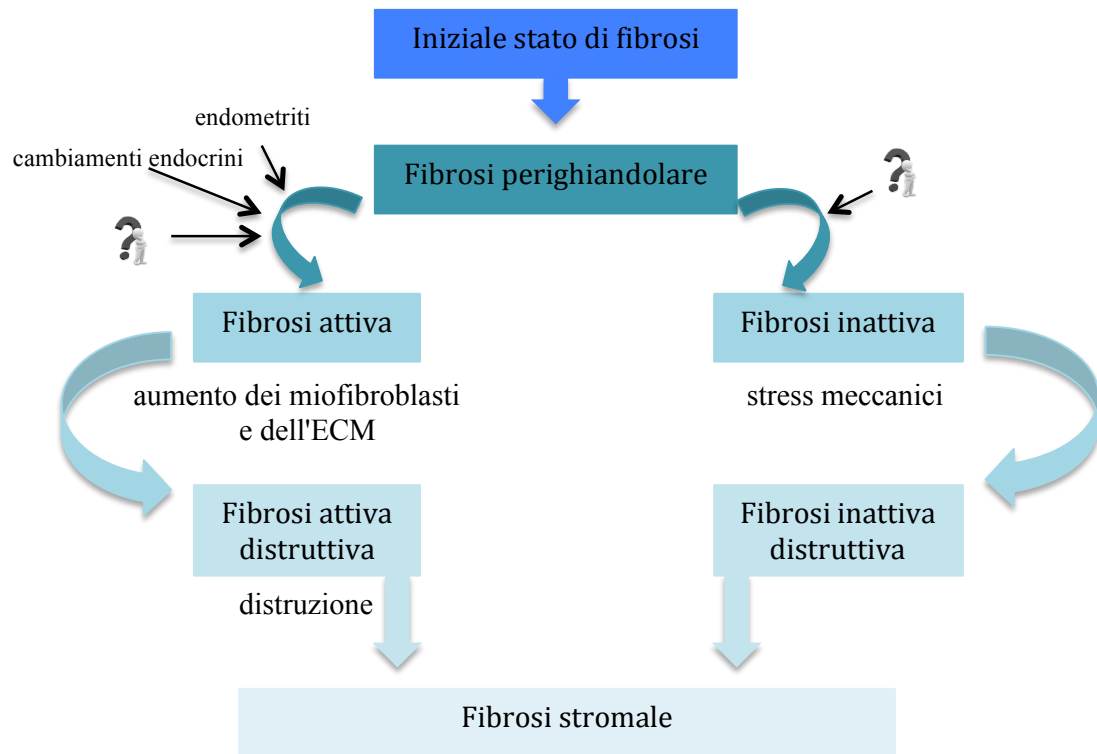
l'IL1Ra sono responsabili dell'inizio e della sotto espressione del processo infiammatorio (M Christoffersen et al., 2012; Mette Christoffersen et al., 2012; Fumuso et al., 2006, 2003, 2007; Troedsson, 2006; Troedsson and Woodward, 2016; Woodward, 2012) (Figura 20).



**Figura 20.** Sequenza di eventi che si realizzano a seguito di un accoppiamento in SM e RM. Il testo in rosso si riferisce alle SM, quello verde alle RM. Il testo in bianco si riferisce a entrambe, SM e RM.

Processi infiammatori cronici, traumi, angiosclerosi con carenza localizzata di ossigeno e ritardata guarigione delle ferite giocano ruoli importanti nello sviluppo dell'endometriosi. L'endometriosi è una patologia degenerativa cronica associata all'età e caratterizzata dalla deposizione di tessuto fibrotico con conseguente perdita di funzionalità dell'organo e difficoltà a portare a termine una gravidanza (Christine Hoffmann et al., 2009; Kovacs and DiPietro, 1994). L'infiammazione cronica è in grado di attivare una complessa reazione tissutale che risulta in un aumento della deposizione della matrice extracellulare (ECM) da parte dei fibroblasti (Aresu et al., 2012; Buczkowska et al., 2014). Successivamente, si verificano alterazioni a livello delle cellule endometriali perighiandolari stromali, che stimolano la deposizione di fibre di collagene (Christine Hoffmann et al., 2009). Nel tessuto compaiono anche i miofibroblasti che sono i principali produttori delle proteine dell'ECM (p.e. collagene di tipo IV, laminina e fibronectina) e delle citochine (Cadario et al., 2002; Walter et al., 2001). Diversi studi hanno correlato l'aumento o l'espressione errata delle citochine nella patogenesi della fibrosi patologica (Cadario et al., 2002; Walter et al., 2001). Inoltre, ghiandole endometriali compromesse dall'infiammazione e dalla deposizione di tessuto fibrotico sono caratterizzate dall'assenza di espressione dell'mRNA per l'epidermal grow factor (EGF) (Gerstenberg et al., 1999), da una sovra espressione dei geni per IL1 $\beta$ , IL6, *serum amyloid A* (SAA) e da un aumento del rapporto IL1 $\beta$ :IL1Ra (M Christoffersen et al., 2012). Anche l'espressione dell'uteroglobina (UGL), uno dei più potenti fattori immunomodulatori e anti infiammatori endogeni che sembra influenzare la deposizione di tessuto fibrotico, appare alterato in cavalle che soffrono di endometriosi (C. Hoffmann et al., 2009; Szóstek et al., 2012). Queste cellule alterate non sono più in grado di reagire correttamente ai cambiamenti endocrini ciclici e divengono indipendenti dal meccanismo di controllo ormonale dell'utero con un

meccanismo anche definito come “differenziazione asincrona” delle ghiandole fibrotiche (Aupperle et al., 2004; Christine Hoffmann et al., 2009). E' infine opportuno ricordare che la degradazione dell'ECM è debitamente regolata in condizioni fisiologiche normali ma, quando questo equilibrio viene alterato, la persistenza dell'ECM diventa una causa di fibrosi (Nagase et al., 2006) (Figura 21).



**Figura 21.** Rappresentazione schematica della possibile patogenesi dell'endometriosi.

Alla luce di quanto descritto, è evidente che le citochine svolgono un ruolo fondamentale nel mantenimento della funzionalità dell'utero equino e una loro mancata regolazione può favorire l'instaurarsi, il persistere, o addirittura l'aggravarsi di un processo infiammatorio. In base ai risultati ottenuti da questo studio, la presenza di ADSCs ha un effetto nell'espressione di geni correlati alla produzione di citochine infiammatorie nel cavallo e causa la sovra e la sotto espressione di diversi geni, fenomeno in accordo con quanto riscontrato nello studio di Falomo et al. (2015);



inoltre, questo studio è il primo a dimostrare che l'espressione di alcune citochine in presenza di ADSCs è regolata da un meccanismo dose-dipendente. Tuttavia, i risultati qui discussi sono da considerarsi, a oggi, parziali. Vista l'elevata variabilità tra i soggetti, e il ristretto numero di campioni esaminati, in futuro sarà necessario aumentare la casistica in modo da poter eseguire una più precisa analisi statistica dei risultati.

I primi risultati mostrano che il gene maggiormente sovra espresso in tessuto endometriale equino a seguito della co-coltura con ADSCs è quello responsabile della produzione dell'oncostatina M (OSM). L'OSM è una citochina pro infiammatoria che appartiene alla classe delle Interleuchine-6 (IL6) ed è prodotta dai linfociti T attivati, dai neutrofili, dalle cellule dendritiche, dai monociti e dai macrofagi; inoltre, è riportata la produzione di OSM da parte delle cellule staminali (Pan et al., 2016; Ryan et al., 2015) e potrebbe essere questa la causa della sua sovra espressione dose-dipendente. L'OSM svolge un'azione pro infiammatoria nelle articolazioni, a livello della pelle, dei polmoni e nei disturbi vascolari; tuttavia, la sua azione dipende dalla specie, dal contesto in cui si trova il tessuto/organo e dalle altre citochine presenti (Ko et al., 2012; Richards, 2013). La varietà degli effetti biologici indotti dall'OSM rimane ancora poco nota; nella Figura 22 sono riassunti i "signaling pathways" ad oggi conosciuti per questa molecola. Nell'uomo, l'OSM è nota per regolare l'espressione di 322 geni; è coinvolta nell'infiammazione, nella regolazione della proliferazione cellulare, nel differenziamento, nella rigenerazione e nel rimodellamento di vari tessuti attraverso la modulazione di diversi geni coinvolti nella chemiotassi, nell'ematopoiesi, nella differenziazione delle MSCs, nella nocicezione, nel metabolismo, nella biologia dei vasi sanguinei, nella morte cellulare e nell'induzione dell'adesione di diverse molecole alle cellule (Arshad et al., 2015; Dey et al., 2013; Hermanns, 2015; Ko et al., 2012; Ryan et al., 2015; Sun et al., 2015; M. Zhang et al., 2015; X. Zhang et al., 2015). Inoltre, recluta

molecole coinvolte nell'iniziale rimodellamento di condizioni patologiche come l'artrite, l'osteoporosi e le fratture con effetti positivi anche nella riparazione dei danni al Sistema Nervoso Centrale (Slaets et al., 2014). In aggiunta, possiede effetti anti-fibrotici che svolge attraverso la sotto espressione del *transforming growth factor-β1* (TGF-β1) e del *connective tissue growth factor* (CTGF) (Dey et al., 2013). In diverse specie, l'OSM è correlata alla rigenerazione/differenziazione del fegato, aumento delle funzioni cardiache dopo infarto, inibizione dell'apoptosi e della fibrosi attraverso l'induzione dell'angiogenesi per sovra espressione del *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e del *basic fibroblast growth factor* (bFGF), fattori che vengono rilasciati anche direttamente dalle MSCs attivate (Arshad et al., 2015; Kol et al., 2013; Pöling et al., 2014; Shi et al., 2012; M. Zhang et al., 2015; X. Zhang et al., 2015). Inoltre, migliora la funzione dei mitocondri (M. Zhang et al., 2015; X. Zhang et al., 2015). Nel presente studio, l'espressione del gene responsabile della produzione dell'OSM ha subito una sovra espressione di 5 e 48 volte a seconda della dose di ADSCs utilizzata ( $1 \times 10^5$  e  $3 \times 10^5$  vs controllo, rispettivamente; Tabella 3) suggerendo una presenza dose-dipendente dell'OSM che potrebbe essere conseguente ad una sua diretta produzione da parte delle ADSCs (Pan et al., 2016); tuttavia, non è da escludere che questo aumento non sia associato anche ad una maggior espressione di questo gene a livello tissutale come conseguenza della presenza delle cellule staminali. Vista la correlazione tra OSM, fattori anti-fibrotici come il TGF-β1 e CTGF, VEGF e angiogenesi, l'aumento nel tessuto dell'OSM potrebbe rappresentare lo *starting point* per la risoluzione di uno stato di endometriosi utilizzando un meccanismo forse simile a quello che attua nel favorire l'annidamento del trofoblasto durante la gravidanza cioè un aumento delle metalloproteinasi (MMPs) MMP2 e MMP9 (Ko et al., 2012). Le MMPs sono coinvolte nel turnover del collagene e nel rimodellamento/degradazione dell'ECM che viene

progressivamente depositata nel corso di endometriosi (Aresu et al., 2012; Wynn, 2008) e il loro aumento conseguente al trattamento con ADSCs in endometri equini è già stato verificato (Falomo et al., 2015). Inoltre, l'espressione dell'MMP9 appare sovra espressa in uteri colpiti da endometriosi rispetto a uteri di cavalle sane (Falomo et al., 2015), questo fenomeno potrebbe rappresentare un tentativo dell'organo di rimodellare l'ECM depositata che però non trova supporto a seguito di un mancato controllo delle citochine tipico di questa patologia (Aupperle et al., 2004; Christine Hoffmann et al., 2009). Nel presente studio, le MMPs non sono state prese in considerazione ma il loro aumento potrebbe essere conseguente alla sovra espressione dell'OSM. Anche se l'OSM stimola la produzione di VEGF, i valori di VEGF- $\alpha$  misurati in questo studio non risultano modificati dalla presenza delle ADSCs. Questo fatto potrebbe essere associato al limitato tempo di co-cultura tra le ADSCs e le biopsie incisionali. Infatti, gli effetti benefici dell'OSM in topi con problemi cardiaci è stato verificato dopo 28 giorni (X. Zhang et al., 2015). La necessità di un maggior tempo di contatto è in accordo anche con lo studio di Mambelli et al. (2013) dove un positivo rimodellamento dell'endometrio equino, osservato tramite esame istologico di biopsie endometriali, è risultato evidente dopo 7 giorni dal trattamento con cellule staminali. In accordo con altri studi, i risultati mostrano una correlazione tra aumento dell'OSM e aumento dell'espressione dei geni per CCL2, CCL13 e IL33 (Arshad et al., 2015; Richards, 2013). Il presente studio evidenzia anche una sovra espressione dose-dipendente del gene per l'IL33; infatti, l'IL33 è 2 volte maggiormente espresso nei campioni trattati con  $3 \times 10^5$  rispetto a quelli trattati con  $1 \times 10^5$  ADSCs. Questa sovra espressione potrebbe essere correlata all'aumento dell'OSM. Invece, il gene per CCL2 appare sovra espresso di 2 volte solo nel confronto tra il campione controllo e quello trattato con la dose di  $1 \times 10^5$  ADSCs.

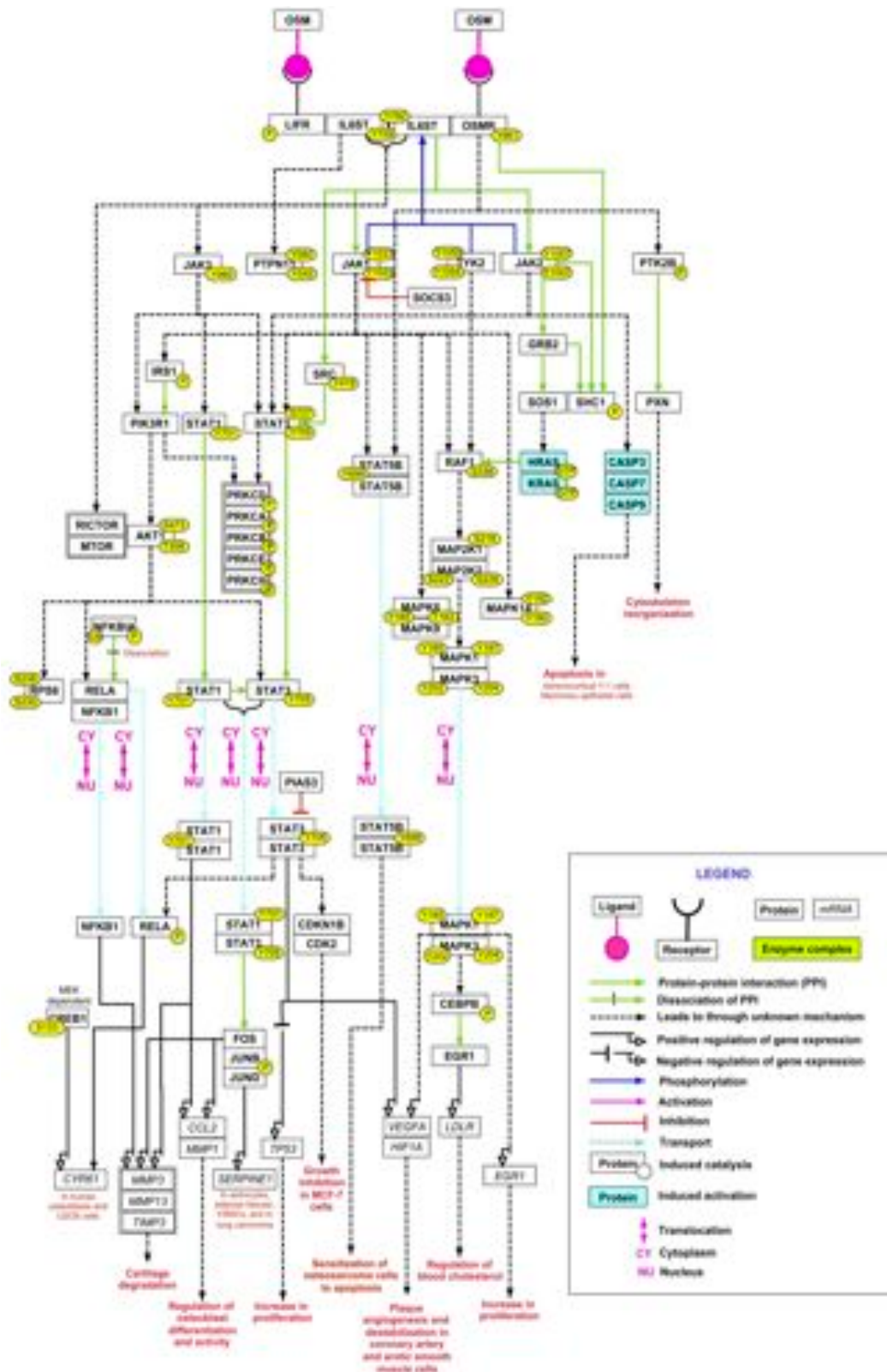


Figura 22. Rappresentazione dei "signaling pathways" dell'oncostatina M. Immagine ottenuta dal sito: [http://www.netpath.org/netslim/NetSlim\\_114](http://www.netpath.org/netslim/NetSlim_114).

L'interleuchina 21 (IL21) appartiene alla famiglia dell'IL1 e svolge un ruolo pro infiammatorio; in questo studio il gene responsabile della sua produzione è sovra espresso in modo dose-dipendente (3.42 e 11.97 per le due diverse dosi di ADSCs utilizzate vs il controllo, rispettivamente; Tabella 3). L'IL21 è prodotta dai linfociti CD4+ attivati, dalle cellule *natural killer* (NK) e dai T helper. Il suo recettore, IL21R, è espresso sia da cellule del sistema immunitario che non (p.e fibroblasti, cellule epiteliali e endoteliali) (Campbell et al., 2014; MacDonald et al., 2011). A seguito della sua azione pro infiammatoria, la sotto espressione del gene per l'IL21 viene indicata come una possibile terapia per i fenomeni infiammatori cronici (Davami et al., 2016). Tuttavia, in patologie infiammatorie croniche dell'intestino l'effetto pro infiammatorio dell'IL21 stimola la produzione di MMPs, come già osservato per l'OSM, che quindi potrebbe stimolare un rimodellamento del tessuto fibrotico in caso in endometriosi (MacDonald et al., 2011). Inoltre, la sovra espressione del gene per l'IL21 sembra essere correlata anche alla sovra espressione del gene per l'IFN $\gamma$  (Booty et al., 2016; MacDonald et al., 2011). Infatti, a seguito del trattamento con ADSCs, l'espressione del gene per l'IFN $\gamma$  risulta sovra espresso di 5 e 9.91 volte a seguito dell'utilizzo di  $1 \times 10^5$  e  $3 \times 10^5$  ADSCs, rispettivamente (Tabella 3). L'IFN $\gamma$  è prodotto da diverse cellule del sistema immunitario (p.e. cellule NK, linfociti T CD4+ e CD8+, linfociti B, cellule APC) e stimola le cellule staminali a produrre diversi fattori inibenti e di crescita (Figura 2) (Carrade et al., 2012; Ferris et al., 2014; Schroder et al., 2004). Un suo aumento viene generalmente associato ad una maggior resistenza nei confronti di batteri e virus (Schroder et al., 2004). Questo suo effetto anti-batterico e pro infiammatorio potrebbe essere molto importante in cavalle sensibili allo sviluppo di PMIE; infatti, un abbassamento della carica batterica presente in utero e un'attivazione del processo infiammatorio potrebbe favorire la rapida risoluzione dell'evento flogistico che in queste

cavalle persiste tanto da sfavorire l'instaurarsi di una gravidanza (Card, 2005; Katila, 2012). Inoltre, nell'uomo è stata ipotizzata una funzione anti-fibrotica dell'IFN $\gamma$ . Infatti, sembrerebbe che questa citochina sia in grado di attivare monociti e macrofagi stimolandoli a ridurre la fibrosi associata a processi neoplastici. Assieme al CCL2, il cui gene è anch'esso sovra espresso nel confronto tra il controllo e il trattamento con  $1 \times 10^5$  ADSCs di 2.27 volte, l'IFN $\gamma$  sembra controllare l'attivazione di alcune MMPs che sono in grado di degradare il collagene, la fibronectina e diverse altre proteine dell'ECM. Una delle principali MMPs indotte dall'IFN $\gamma$  e dal CCL2 è la MMP13. L'azione di questa MMPs sembra ridurre il livello di fibrosi epatica (Long et al., 2016). Tuttavia, è descritta anche un'attività anti-fibrotica diretta dell'IFN $\gamma$  tramite l'inibizione della sintesi di collagene da parte dei fibroblasti e la diminuzione della produzione di ECM (Wu et al., 2011); tutti questi meccanismi potrebbero avere un ruolo nel controllo, se non nell'involutione, dell'endometriosi equina. In aggiunta, l'IFN $\gamma$  è in grado di stimolare la produzione di CXCL11 mediante l'attivazione di STAT2 (Johansen et al., 2017). Nell'uomo, queste 2 citochine risultano facilitare l'impianto dell'embrione nelle prime fasi di gravidanza (Hirota et al., 2006). CXCL11 svolge azione pro infiammatoria, descritta anche a livello endometriale, mediante il richiamo dei linfociti T helper 1 e delle cellule NK che a loro volta producono IFN $\gamma$  (Johansen et al., 2017; Johnstone et al., 2016; Moafi et al., 2017). Recentemente, è stato dimostrato che pazienti con lesioni cutanee conseguenti a Leishmaniosi sono in grado di guarire più velocemente se presentano alti livelli di espressione di IFN $\gamma$ , CXCL11 e IL17A; in questo studio, tutti i geni responsabili della produzione di queste citochine risultano sovra espressi a seguito della presenza di ADSCs (Moafi et al., 2017). Inoltre, nell'uomo CXCL11 sembra in grado di promuovere la proliferazione delle cellule stromali endometriali controllando un'azione bi-fasica di p42/44 MAPK (Hirota et al., 2006). Nel cavallo, la CXCL11

sembra svolgere un ruolo antibatterico aiutando la clearance uterina a seguito dell'inoculazione di E. Coli (Marth et al., 2016), questo fenomeno è stato osservato anche nella pecora dove questa citochina sembra essere coinvolta nel richiamo di leuciti, linfociti e monociti nell'utero (Imakawa et al., 2006).

Appare quindi evidente, che le ADSCs svolgono un ruolo pro infiammatorio nell'utero equino. Inoltre, le citochine pro infiammatorie sovra espresse a causa della presenza delle ADSCs sono differenti da quelle sovra espresse nelle SM. Infatti, le SM presentano una sovra espressione di IL1 $\beta$ , IL1Ra, IL6, IL8 e TNF $\alpha$  e una sotto espressione della citochina anti infiammatoria IL10 mentre le ADSCs non modificano il modo significativo l'espressione di queste citochine; al contrario, le ADSCs sovra esprimono i geni per la produzione di OSM, IL21, IL33, IFN $\gamma$  e CXCL11. Fatto importante è che in studi precedenti sull'azione delle cellule staminali, l'IL10 viene descritta come una delle principali citochine che svolgono un ruolo nella modulazione della risposta infiammatoria a seguito della presenza delle MSCs (Najar et al., 2016) ma questo non avviene nel presente studio dove IL10 non viene né sovra né sotto espressa in modo significativo (Figura 4; Istogramma 6-7). Tuttavia, questo fenomeno sembrerebbe supportare ancora una volta la nostra teoria: nell'utero equino le ADSCs causano la sovra espressione di citochine con azione pro infiammatoria, alcune delle quali posseggono anche attività anti-batterica e anti-fibrotica innescando meccanismi volti alla rigenerazione e al rimodellamento dei tessuti mediante l'attivazione delle MMPs il cui compito principale è quello di degradare l'ECM, come discusso in precedenza. Questa attivazione selettiva di alcune citochine, in correlazione alla patogenesi di malattie come l'endometrite e l'endometriosi equina, rappresenta un'importante scoperta andando ad ampliare le conoscenze riguardanti il meccanismo d'azione delle cellule staminali nell'endometrio equino e dando possibili spiegazioni sui

miglioramenti osservati in studi precedenti come quelli di Mambelli et al. (2013, 2014) e Ferris et al. (2014). Tuttavia, un incremento del numero dei campioni esaminati risulta necessario per confermare quanto ipotizzato.

Al contempo, sembra ipotizzabile anche la presenza di un effetto immunomodulatore delle ADSCs nel tessuto uterino equino. Questo effetto, anche se più blando, è messo in atto mediante la sotto espressione di citochine con azione pro-fibrotica e di chemiotassi. Il blocco di questi processi è utile in caso di endometrite, poiché viene limitato l'arrivo in sede di ulteriori citochine che con la loro azione potrebbero danneggiare l'endometrio, e di endometriosi, limitando la deposizione di nuova ECM. I principali geni pro infiammatori sotto espressi risultano essere: CCR2 e CD40LG nel confronto tra il controllo e il trattamento con  $1 \times 10^5$  ADSCs (-4.64 e -3.16, rispettivamente); IL3, IL4R e CCR2 nel confronto tra il controllo e il trattamento con  $3 \times 10^5$  ADSCs (-3.47, -3.30 e -3.14, rispettivamente); IL18 e CCL11 nel confronto tra  $1 \times 10^5$  e  $3 \times 10^5$  ADSCs (-4.17 e 3, rispettivamente) (Tabella 3).

CCR2 è maggiormente espresso sulla superficie di macrofagi, monociti e fibrociti ed è un recettore funzionale per le *Monocyte chemotactic protein 1, 2 e 3* (MCP-1, MCP-2 e MCP-3) (Moore et al., 2005; Seki et al., 2009). Un'inibizione a livello endometriale del gene per il recettore CCR2 potrebbe svolgere azione anti infiammatoria e anti-fibrotica. Infatti, la sua inibizione sembra ridurre l'espressione di TGF $\beta$ , del collagene di tipo I e della MCP-1, principali responsabili della chemiotassi dei macrofagi e dei fibrociti che a livello tissutale possono rispettivamente creare danni e depositare ECM (Kitagawa et al., 2004; Moore et al., 2005; Wynn, 2008; Zhou et al., 1999). Infatti, una volta attivati, i fibrociti possono causare fibrosi mediante diverse vie d'azione: i) deposizione di collagene, ii) liberazione di TGF $\beta$ 1 che recluta i fibroblasti residenti nel tessuto, iii)



differenziazione diretta in fibroblasti con conseguente sovra espressione delle molecole dell'ECM (Moore et al., 2005). Il blocco del CCR2 è già stato correlato alla riduzione della fibrosi in diversi organi (p.e. polmoni, reni e fegato) di varie specie e ad un miglioramento in caso di aterosclerosi (Estep et al., 2009; Kitagawa et al., 2004; Mitchell et al., 2009; Moore et al., 2005; Seki et al., 2009). Dai risultati ottenuti dal presente studio, si potrebbe ipotizzare un'azione di sotto espressione del gene per CCR2 da parte delle ADSCs con un meccanismo dipendente dalla sovra espressione del gene per IFN $\gamma$  come già descritto nell'uomo. Infatti, sembra che IFN $\gamma$  sia in grado di inibire velocemente e selettivamente l'espressione di CCR2, lasciando inalterata l'espressione di altri recettori come il CCR1, CCR4 e CCR5 (Penton-Rol et al., 1998). Questo fenomeno sembra confermato anche nel nostro studio, dove l'espressione di CCR5 rimane invariata a seguito del trattamento con ADSCs. L'effetto di sotto espressione dell'IFN $\gamma$  sul CCR2 sembra avere la funzione di fermare il reclutamento di ulteriori monociti e di bloccare nel sito dell'infiammazione quelli già presenti (Penton-Rol et al., 1998). Inoltre, la sotto espressione di CCR2 ha come conseguenza anche la riduzione dell'attività di CCL2, indicata come mediatore pro fibrotico che risulta sovra espressa a seguito dell'azione di OSM, come descritto precedentemente (Arshad et al., 2015; Richards, 2013; Wynn, 2008). La sotto espressione di CCR2, con conseguente mancanza di effetto di CCL2, innesca un meccanismo anti-fibrotico e uno di blocco della chemiotassi per nuove molecole infiammatorie; entrambe queste azioni supportano ancora una volta il possibile utilizzo delle ADSCs come terapia per le endometriti e le endometriosi equine.

Il CD40LG, *ligand receptor* per CD40, è una glicoproteina di membrana di tipo II appartenente alla superfamiglia dei *tumor necrosis factor ligand* (TNFL); è espresso sulla superficie dei linfociti T CD4+, nei basofili, negli eosinofili e nei granulociti, nelle

cellule NK, nei macrofagi, nelle cellule dendritiche, nelle piastrine, nelle cellule endoteliali e nei megacariociti (Horrillo et al., 2014; Liu et al., 2017). La sua interazione con CD40 è necessaria per l'attivazione della risposta immunitaria sia umorale che cellulo mediata (Teruel et al., 2012). Nel cavallo, è riconosciuto il suo ruolo come regolatore della risposta infiammatoria (Liu et al., 2017). L'attivazione del recettore CD40LG sembra svolgere un ruolo chiave nello sviluppo di patologie autoimmuni mentre il suo ruolo in patologie su base fibrotica è controverso (Estep et al., 2009; Teruel et al., 2012); tuttavia, una sotto espressione del gene che ne controlla la produzione a livello uterino potrebbe avere il compito di ridurre il richiamo di ulteriori cellule infiammatorie come avviene per la sotto espressione del gene per il CCR2 e per l'IL3. Infatti, l'IL3, detta anche *hemopoietic growth factor*, promuove l'ematopoiesi, contribuisce alla produzione, la proliferazione e la sopravvivenza dei leucociti, induce la proliferazione *in vivo* delle cellule endoteliali e la formazione di nuovi vasi, potenzia il processo infiammatorio; è prodotta principalmente dai linfociti T CD4 presenti nel tessuto infiammato (Brizzi et al., 2001; Weber et al., 2015). L'IL3 potenzia il processo infiammatorio poiché induce, nelle cellule endoteliali, l'espressione di molecole come la E e la P selectina che promuovono l'adesione dei linfociti T; questo fenomeno facilita il passaggio di cellule infiammatorie attraverso l'endotelio (Brizzi et al., 2001) e quindi sembrerebbe in grado di causare un persistere del processo infiammatorio endometriale. L'IL4 è una citochina prodotta da diversi tipi cellulari inclusi i linfociti T attivati, i mastociti e i basofili; è una citochina immunomodulatoria che attua azioni multiple a livello del sistema immunitario ma la sua funzione principale è quella di attivare i linfociti T helper (Solberg et al., 2004; Traub et al., 2017). Nell'uomo, l'IL4 e il suo recettore IL4R sono stati correlati alla trasformazione maligna di alcuni tipi di tumori in quanto IL4 sembra stimolare la crescita e l'invasività di alcune cellule tumorali; inoltre,

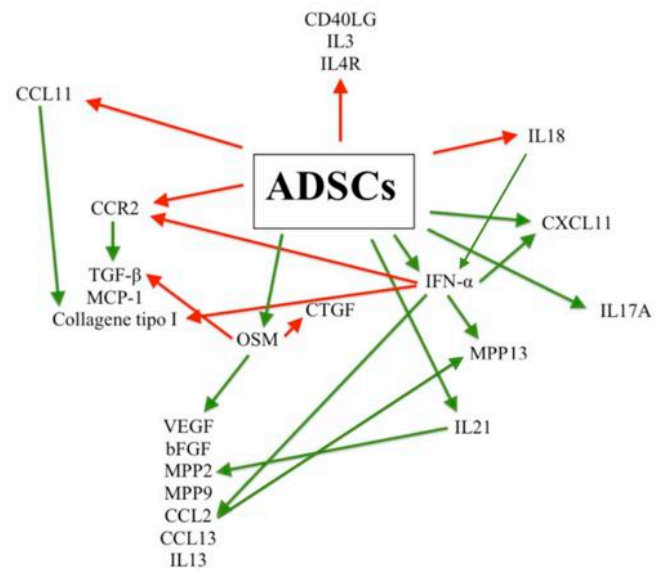
è stata anche associata alla deposizione di tessuto fibroso (Takayama et al., 2006; Traub et al., 2017; Wynn, 2008). Infatti, tramite studi *in vitro* è stata evidenziata la capacità dell'IL4 di regolare alcune funzione dei fibroblasti come la chemiotassi, la proliferazione, la sintesi di collagene e la differenziazione dei miofibroblasti (Huaux et al., 2003).

Un altro gene sotto espresso a seguito del trattamento con ADSCs è quello responsabile della produzione di IL18, una citochina appartenente alla famiglia dell'IL1 che possiede effetto pro infiammatorio e fornisce importanti segnali per la comunicazione all'interno del sistema immunitario; una sua sovra espressione è stata correlata a patologie fibrotiche e a lesioni ischemiche dei tessuti (Artlett et al., 2011; Kroeger et al., 2009; Puthumana et al., 2017). L'IL18 è considerata un importante mediatore di infiammazione cronica in diversi tessuti (Wang et al., 2002). Originariamente chiamata *Interferon-Gamma-Inducing Factor*, la sua funzione principale è quella di promuovere la produzione di IFN $\gamma$  da diversi tipi cellulari ma primariamente dai linfociti T helper CD4+ e delle cellule NK (Markowitz et al., 2016). Questa citochina è prodotta da macrofagi, cellule epiteliali, cellule del Kupffer, cellule dendritiche (Kroeger et al., 2009; Markowitz et al., 2016). E' stato dimostrato che la sovra espressione di IL18 porta a citotossicità cellulare da CD8+; inoltre, una sua sovra espressione nei tessuti e nel siero di pazienti affetti da epatocarcinoma è associata a infiammazione e persistenza di danni ai tessuti con conseguente fibrosi epatica (Markowitz et al., 2016).

Infine, evidenziamo anche una sotto espressione del gene per CCL11, anche nota come eotassina, svolge un ruolo pro infiammatorio ed è coinvolta nella chemiotassi e nell'attivazione degli eosinofili e dei mastociti nei tessuti infiammati (Menzies-Gow et al., 2002; Puxeddu et al., 2006). L'espressione di CCL11 è stata correlata alla comparsa di fibrosi promuovendo la migrazione e la proliferazione dei fibroblasti e la deposizione

di collagene (Puxeddu et al., 2006; Zweifel et al., 2010). Infatti, sembra svolgere una funzione simile a CCL2 andando a sovra esprimere il gene per la produzione del pro collagene I (Puxeddu et al., 2006). Tuttavia, il suo ruolo nella deposizione di ECM è ancora controverso. Infatti, sembra che CCL11 sia in grado di indurre MMP2, ma non MMP9; per questa citochina viene ipotizzato un effetto diverso a seconda del tipo cellulare con cui entra in contatto e un ruolo solo nella fase iniziale dello sviluppo di fibrosi (Puxeddu et al., 2006).

In Figura 23 sono riassunti gli effetti immunomodulatori che le ADSCs hanno su tessuto endometriale sano di cavalla. Alla luce di quanto scoperto, l'utilizzo delle cellule staminali come terapia per le endometriti e le endometriosi equine sembra una concreta possibilità. Infatti, le ADSCs sembrano svolgere azione sia pro sia anti infiammatoria. L'azione pro infiammatoria viene svolta aumentando la produzione di citochine con attività anche anti-batterica e anti-fibrotica, come le MMPs; mentre, l'azione anti infiammatoria è caratterizzata dalla sotto espressione di citochine con azione pro-fibrotica e di chemiotassi. Appare quindi evidente la presenza di una complessa modulazione della risposta infiammatoria del tessuto che sembra gettare le basi per l'attivazione di meccanismi utili alla risoluzione di patologie endometriali equine come l'endometrite e l'endometriosi e che in parte spiegano quanto osservato in studi precedenti che dimostrano la validità dei trattamenti delle cellule staminali in cavalle affette da tali patologie.



**Figura 23.** Riassunto schematico dell'effetto delle ADSCs sull'espressione di alcuni geni coinvolti nella produzione di citochine infiammatorie, e dei loro recettori, del cavallo a seguito della co-coltura con biopsie incisionali. Le frecce rosse indicano sotto espressione, quelle verdi sovra espressione.

# **8. CONCLUSIONI**

Questo studio nasce dalla necessità di ricercare nuove terapie per i processi infiammatori acuti o cronici dell'endometrio equino. A oggi, le terapie esistenti non risultano sempre soddisfacenti e non sono in grado di garantire un miglioramento della fertilità della fattrice. Negli ultimi anni, le cellule staminali hanno dato prova di poter essere utilizzate come trattamento per le endometriti e le endometriosi grazie alla loro capacità immunomodulatoria e rigenerativa ma vi sono ancora poche informazioni riguardanti il loro meccanismo d'azione e il modo in cui interagiscono con le molecole che regolano il processo infiammatorio.

Nella fase preliminare di questo studio, dedicato all'ideazione di un protocollo per il mantenimento *in vitro* di biopsie uterine equine, i cambiamenti che si sono verificati nelle biopsie incisionali entro i 3 giorni di coltura sono risultati irrilevanti e permettono l'utilizzo di questo campione in studi tossicologici e farmacologici futuri. Tuttavia, all'inizio di ogni studio, è consigliata una valutazione dei campioni in modo da poter comprendere meglio i risultati ottenuti. Grazie al protocollo ideato, ci è stato possibile procedere alla co-coltura di biopsie incisionali con due diverse dosi di cellule staminali equine di origine adiposa con lo scopo di valutare i cambiamenti nell'espressione di 84 geni coinvolti nella produzione di citochine infiammatorie, e dei loro recettori, tipiche del cavallo. I risultati, seppur preliminari, dimostrano che la presenza delle cellule staminali modifica l'espressione di geni coinvolti nella produzione di citochine con effetto sia pro sia anti infiammatorio con conseguente attivazione di meccanismi anti-batterici e anti-fibrotici che potrebbero essere alla base degli effetti migliorativi registrati nell'endometrio equino da studi precedenti a seguito dell'utilizzo di cellule staminali. Per alcune citochine, questo effetto immunomodulatorio risulta essere dose-dipendente (p.e. OSM, IL-21, IFN $\gamma$ , CXCL11, CCR2). Da studi precedenti effettuati

anche sul cavallo, le citochine sovra espresse sono state correlate a meccanismi che facilitano la guarigione e riducono il grado di fibrosi tissutale, anche mediante l'attivazione di diverse MMPs come la MMP2, la MMP9 e la MMP13 (Aresu et al., 2012; Falomo et al., 2015). In aggiunta, la maggior parte delle citochine prese in esame risultano correlate l'una all'altra. Infatti, la sovra espressione dei geni per OSM, IL21 e IFN $\gamma$  sembra a loro volta essere associata alla sovra espressione dei geni per CCL2, IL33, CXCL11 e IL17A e alla sotto espressione di quello per CCR2. Inoltre, la presenza di ADSCs causa una sotto espressione di geni responsabili del richiamo in sede di nuove citochine, con perdurare dell'infiammazione, e della deposizione di tessuto fibroso (CCR2, CD40LG, IL3, IL4R, IL18 e CCL11). Anche in questo caso, la sotto espressione di queste citochine può favorire meccanismi utili alla risoluzione delle endometriti o endometriosi equine.

Questi risultati sembrano fornire la chiave per una maggior comprensione dell'effetto delle cellule staminali nell'endometrio equino e per lo sviluppo di nuove terapie per le patologie infiammatorie uterine che a oggi influenzano negativamente la fertilità delle cavalle. In futuro, risulta necessario: i) confermare i risultati ottenuti ampliando i campioni esaminati, ii) attuare ulteriori studi per valutare più approfonditamente i *pathways* utilizzati dalle ADSCs nella modulazione dei geni correlati alla produzione delle diverse citochine infiammatorie. Inoltre, alla luce dei risultati ottenuti, dovrebbe essere posta particolare attenzione nell'ampliare le conoscenze riguardanti la correlazione tra le cellule staminali e l'attivazione di meccanismi connessi alla produzione/stimolazione delle MMPs e alla degradazione del tessuto fibroso.



# **9. APPENDICE A**

PROTOCOLLI DI PREPARAZIONE E  
VALUTAZIONE DI BIOPSIE UTERINE  
EQUINE

## 9.1 Prelievo, trattamento e trasporto del campione in laboratorio

### Protocollo:

1. Distendere l'organo su di un telino sterile
2. Effettuare uno scrub chirurgico di una sezione di 15x15 cm del perimetro del corpo uterino
3. Prelevare con strumenti sterili una sezione di 10x10 cm della parte sottoposta a scrub
4. Effettuare un flushing e tre lavaggi, di almeno 2 min ciascuno, con una soluzione così costituita:
  - a. 1L di soluzione fisiologica
  - b. 10 ml di Combiotic<sup>®</sup> Vet, Pfizer Italia s.r.l. (penicillina-streptomicina)
  - c. 10 ml di Aagent, Fatro (gentamicina)
  - d. 600 mg acetilcisteina (Fluimucil<sup>®</sup>, Zambon)
5. Trasportare in laboratorio in una soluzione di PBS (Lonza, Walkersville, MD, USA), 2% P/S (EuroClone, Milan, Italy) e Anfotericina B (EuroClone) a temperatura ambiente (*room temperature* o RT).

## 9.2 Valutazione della funzionalità mitocondriale tramite MTT assay

### Preparazione delle soluzioni:

Soluzione MTT: dissolvere 5 mg di MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT Powder) REF: M2128; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) per ogni mL di PBS. Filtrare la soluzione con un filtro sterile da 0.2  $\mu\text{m}$  dentro un contenitore sterile di colore scuro per proteggere la soluzione dalla luce. Questa soluzione può essere così mantenuta a 4°C o congelata a -20°C. Prima dell'utilizzo, diluire 100  $\mu\text{L}$  della soluzione in 900  $\mu\text{L}$  di PBS, ottenendo una diluizione finale di 0.5 mg/mL. Mantenere la soluzione al riparo dalla luce e a 4°C fino all'utilizzo ma per non più di 24 h.

Soluzione di solubilizzazione: è una soluzione costituita da 90% isopropanolo e 10% DMSO.

### Protocollo:

1. Spostare ciascuna biopsia in delle eppendorf da 2 mL contenenti 1 mL di soluzione MTT
2. Incubare le eppendorf a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> per 3 h
3. Vortexare e rimuovere la Soluzione MTT
4. Aggiungere 500  $\mu\text{L}$  di Soluzione di solubilizzazione a ciascuna eppendorf
5. Incubare 30 min in agitatore
6. Preparare una piastra da 96 pozzetti con 200 $\mu\text{L}$  della soluzione ottenuta da ciascun campione
7. Valutare l'assorbanza delle soluzioni alla lunghezza d'onda di 570 nm allo spettrofotometro Victor<sup>3</sup> 1420 (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA) con il software Wallac 1420 Manager.

### 9.3 Estrazione e quantificazione del DNA

Utilizzare il kit AllPrep<sup>®</sup> DNA/RNA (QIAGEN<sup>®</sup>, Germany; CAT. 80204).

#### Protocollo:

1. Polverizzare la biopsia con pestello, mortaio e azoto liquido
2. Estrarre il DNA:
  - a. Lisare e digerire il campione:
    - i. diluire 30 mg di campione in un'epENDORF da 2 mL contenente 600  $\mu$ L di Buffer RLT Plus (costituito da 1 ml di Buffer RTL e 20  $\mu$ L di  $\beta$ -mercaptoetanololo)
    - ii. centrifugare il tutto per 3 min alla massima velocità (>10.000 rpm)
  - b. Estrarre il DNA:
    - i. prelevare il liquido e spostarlo nelle AllPrep<sup>®</sup> DNA spin column inserita in un'epENDORF da 2 mL
    - ii. centrifugare per 30 sec a 10.000 rpm, il DNA viene trattenuto nel filtro della colonnina
3. Purificare il DNA:
  - a. spostare la DNA spin column in una nuova provetta da 2 mL, aggiungere 500  $\mu$ L di Buffer AW1, centrifugare 30 sec a 10.000 rpm. Gettare il liquido raccolto
  - b. aggiungere alla colonnina 500  $\mu$ L di Buffer AW2, centrifugare 2 min alla massima velocità (>10.000 rpm) e gettare il liquido raccolto

4. Eluire il DNA:
  - a. spostare la DNA spin column in una eppendorf pulita da 1.5 mL, aggiungere 70  $\mu$ L di Buffer EB (Elution Buffer), lasciare 1 min a RT e centrifugare 1 min a 10.000 rpm
  - b. prelevare l'eluato e utilizzarlo per effettuare un nuovo lavaggio della DNA spin column; centrifugare 1 min a 10.000 rpm
5. Quantificare il DNA mediante NanoDrop1000 Spectrophotometer (NanoDrop products, Termoscientific). Effettuare il settaggio della macchina con 1  $\mu$ L del liquido di Buffer EB.

## 9.4 Esame istologico

### Protocollo:

1. Includere le biopsie in Killik frozen section medium (Bio-Optica, Milano, Italia) all'interno di vassoi di plastica delle dimensioni di 15x15x6 mm (Kalttek, Base Mould Disposable, Padova, Italia)
2. Raffreddare l'isopentano in azoto liquido
3. Immergere le biopsie nell'isopentano
4. Conservare le biopsie a -80°C fino al taglio
5. Tagliare le biopsie al criostato (Leica CM1950, Leica Biosystems, Nußloch, Germany) in sezioni da 5 µm
6. Colorare i vetrini con ematossilina-eosina:
  - a. immergere in formalina 10% per 10 min
  - b. sciacquare in acqua MilliQ
  - c. immergere in ematossilina per 5 min
  - d. sciacquare con acqua MilliQ
  - e. sciacquare con acqua di fonte
  - f. sciacquare con acqua milliQ
  - g. immergere in eosina per 30 sec
  - h. sciacquare con acqua MilliQ
  - i. sciacquare con acqua di fonte
  - j. sciacquare con acqua MilliQ
  - k. immergere in alcool 50° per 5 min
  - l. immergere in alcool 70° per 5 min
  - m. immergere in alcool 96° per 5 min
  - n. immergere in alcool 100° per 5 min

- o. immergere in xilene per 5 min
- 7. Montare i copri vetrini con Pertex<sup>®</sup> mountant medium (Histolab Products AB, Göteborg)
- 8. Esaminare i vetrini a ingrandimento 4-10-20 e 40x con microscopio Olympus BX40.

# **10. APPENDICE B**

PROTOCOLLI DI ESTRAZIONE,

COLTURA,

CONGELAMENTO/SCONGELAMENTO E

CARATTERIZZAZIONE DI ADSCs



## 10.1 Estrazione di ADSCs

Eseguire l'estrazione di ADSCs in laboratorio, sotto cappa a flusso laminare, mediante l'utilizzo di strumenti sterili.

### Protocollo:

1. Pesare il grasso all'interno di una piastra petri
2. Digerire il tessuto:
  - a. digestione meccanica mediante l'utilizzo di forbici
  - b. digestione enzimatica mediante l'utilizzo di collagenasi:
    - i. spostare il grasso dalla piastra ad una fiasca T75
    - ii. aggiungere 5 mL di PBS ogni 10g di grasso
    - iii. aggiungere 160U di collagenasi per ogni mL di PBS
    - iv. agitare la fiasca a 37°C per 3 h
3. Filtrare il grasso all'interno di una Falcon<sub>50</sub> tramite un filtro da 100 µm
4. Centrifugare la Falcon<sub>50</sub> a 800 rpm per 5 min per far depositare le ADSCs sul fondo
5. Rimuovere il surnatante
6. Lavare il pellet di ADSCs:
  - a. rompere il pellet di cellule
  - b. aggiungere 7 mL di DMEM completo (cDMEM) costituito da Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Lonza) addizionato con 10% FBS (FBS, Bidachem S.p.A., Milano, Italy) e 2% P/S (EuroClone, Milan, Italy)
  - c. spostare il tutto in una Falcon<sub>15</sub>
  - d. sciacquare la Falcon<sub>50</sub> con 8 mL di cDMEM e spostare il liquido nella Falcon<sub>15</sub>
  - e. centrifugare la Falcon<sub>15</sub> 5 min a 800 rpm

- f. rimuovere il surnatante
  - g. effettuare un secondo lavaggio (rompere il pellet, diluire le cellule in 10 mL di cDMEM, centrifugare a 800 rpm per 5 min, rimuovere il surnatante)
7. Seminare le ADSCs:
- a. rompere il pellet e risospenderlo in 5 mL di cDMEM
  - b. seminare le cellule in una fiasca T75
  - c. lavare una seconda volta la Falcon<sub>15</sub> con 6 mL di cDMEM
  - d. seminare le cellule rimanenti nella fiasca
  - e. agitare leggermente la fiasca T75 in modo da distribuire le cellule sul fondo
  - f. incubare la fiasca in incubatore a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>

## 10.2 Cambio di fiasca per le ADSCs

Quando le cellule stanno per entrare in confluenza, procedere alla divisione delle cellule in un numero maggiore di fiasche. Svolgere l'operazione sotto cappa a flusso laminare.

### Protocollo:

1. Rimuovere il cDMEM con pipetta sterile in vetro, avendo cura di non toccare la superficie della fiasca con le ADSCs
2. Lavare le cellule:
  - a. versare 6 mL di PBS, precedentemente riscaldato a 37°C, nella fiasca
  - b. agitare delicatamente la fiasca in modo da far spostare il PBS sopra le cellule
  - c. aspirare e rimuovere il PBS
  - d. effettuare un secondo lavaggio con la stessa tecnica
3. Staccare le cellule dalla fiasca:
  - a. versare 2 mL di tripsina nella fiasca
  - b. agitare delicatamente la fiasca in modo da distribuire il più possibile la tripsina sopra le cellule
  - c. lasciare agire 1-2 min a RT
  - d. colpire delicatamente i lati della fiasca per favorire il distacco delle cellule
  - e. osservare al microscopio l'avvenuto distacco
4. Raccogliere le cellule:
  - a. diluire la tripsina aggiungendo 5 mL di cDMEM nella fiasca
  - b. lavare la fiasca aspirando il cDMEM ed utilizzandolo per lavare le pareti interne della fiasca
  - c. aspirare il cDMEM e versarlo in una Falcon<sub>15</sub>

- d. effettuare un nuovo lavaggio della fiasca con 5 mL di cDMEM e versare il liquido nella Falcon<sub>15</sub>
5. Contare le cellule:
  - a. prelevare 200  $\mu$ L di cDMEM contenete le ADSCs e versarli in un'eppendorf da 2 mL
  - b. contare le cellule mediante Scepter<sup>TM</sup> 2.0 (Merk Millipore, Darmstadt, Germania)
6. Lavare le cellule:
  - a. centrifugare la Falcon<sub>15</sub> contenente le ADSCs a 800 rpm per 5 min
  - b. rimuovere il surnatante
  - c. rompere il pellet
  - d. risospendere le cellule in 10 mL di cDMEM
7. Seminare le cellule:
  - a. prelevare un volume di liquido corrispondente a  $700-800 \times 10^3$  cellule e versarlo in una fiasca T75
  - b. aggiungere cDMEM fino ad ottenere una quantità totale di 12 mL in fiasca
8. Identificare ciascuna fiasca con il nome dell'operatore, la tipologia di cellule, la data di semina e il numero di passaggio delle cellule
9. Incubare le fiasche in incubatore a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

### **10.3 Congelamento e scongelamento di ADSCs**

#### Protocollo di congelamento:

1. Staccare le cellule con tripsina e metterle in una Falcon<sub>15</sub>
2. Centrifugare la Falcon<sub>15</sub> contenente le ADSCs a 800 rpm per 5 min
3. Rimuovere il surnatante
4. Rompere il pellet
5. Risospendere il pellet in 1 mL di una soluzione contenente FBS + DMSO 10%
6. Spostare tutto il contenuto in una Cryovials sterile da 2 mL
7. Identificare ciascuna Cryovials con il nome dell'operatore, la tipologia di cellule, la data di congelamento, il numero di fiasche congelate e il numero di passaggio delle cellule
8. Incubare le Cryovials in Mr. Frosty™ Freezing Container (Thermo Scientific) mantenuto a -80°C e, una volta congelate, immergerle in azoto liquido.

#### Protocollo di scongelamento:

1. Scongellare la Cryovials a bagno maria a 37°C
2. Versare il contenuto della Cryovials in una Falcon<sub>15</sub> e diluire il contenuto in 10 mL di cDMEM
3. Centrifugare 5 min a 800 rpm
4. Rimuovere il surnatante
5. Rompere il pellet e sospenderlo con 10 mL di cDMEM
6. Seminare le cellule in un numero di fiasche corrispondente al: n° di fiasche congelate + 1
7. Aggiungere cDMEM fino ad ottenere una quantità totale di 12 mL in fiasca
8. Incubare le fiasche in incubatore a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

#### 10.4 Caratterizzazione delle ADSCs mediante citofluorimetria

Protocollo:

1. Disegnare una piastra da 96 pozzetti con i markers da utilizzare più il blank (cellule staminali non marcate che fungono da controllo)
2. Preparare il FACS+PBS (PBS + 2% FBS + 0.5 g sodio azide)
3. Preparare i markers in eppendorf da 1.5 mL come segue

| Marker   | Marca       | Riferimento | Dose utilizzata | FACS +PBS aggiunto |
|--|-------------|-------------|-----------------|--------------------|
| <b>CD44 Monoclonal Antibody (IM7) eFluor 450</b> | eBioscience | 48-0441-80  | 1 µL            | 200 µL             |
| <b>CD90 (Thy-1) Antibody</b>                     | VMRD        | DH24A       | 1 µL            | 100 µL             |
| <b>Mouse anti-horse MHC-II FITC</b>              | Bio-Rad     | MCA1085-F   | 1 µL            | 100 µL             |
| <b>Rat IgG2b k Iso control eFluor 450</b>        | eBioscience | 48-4031-82  | 1 µL            | 200 µL             |
| <b>Goat anti mouse IgM FITC</b>                  | AbD         | 102002      | 1 µL            | 500 µL             |
| <b>Mouse IgM isotype control Purified</b>        | eBioscience | 14-4752-81  | 1 µL            | 500 µL             |
| <b>Mouse IgG1 k Iso Control FITC</b>             | eBioscience | 11-4714-82  | 1 µL            | 500 µL             |

4. Staccare, lavare e contare le ADSCs
5. Aggiungere 100.000 cellule a ogni pozzetto da utilizzare, centrifugare a 1800 rpm per 3 min, eliminare il surnatante
6. Lavare le cellule aggiungendo 150 µL di FACS+PBS, centrifugare a 1800 rpm per 3 min, eliminare il surnatante
7. Aggiungere 5 µL di DF (mouse block= Fc Receptor Block + FBS) a ciascun pozzetto. Incubare 5 min al buio a RT

8. Aggiungere 100  $\mu\text{L}$  di ciascun marker agli appositi pozzetti. Nel pozzetto del blank aggiungere 100  $\mu\text{L}$  di FACS+PBS. Incubare 30 minuti al buio a RT
9. Centrifugare a 1800 rpm per 3 min. Rimuovere il surnatante
10. Lavare i pellets con 150  $\mu\text{L}$  di FACS+PBS. Centrifugare a 1800 rpm per 3 min, eliminare il surnatante
11. Effettuare una seconda colorazione con 100  $\mu\text{L}$  di Goat anti mouse IgM FITC per i pozzetti contenenti le cellule precedentemente marcate con il CD90 e il Mouse IgM isotype control Purified perché richiedono l'utilizzo di un anticorpo secondario. Negli altri pozzetti aggiungere 100  $\mu\text{L}$  di FACS+PBS. Incubare 15 min al buio a RT
12. Centrifugare a 1800 rpm per 3 min. Rimuovere il surnatante e aggiungere 200  $\mu\text{L}$  di FACS+PBS a ciascun pozzetto, spostare i campioni nei tubi da citofluorimetria
13. Effettuare l'analisi con un citofluorimetro BD FACSCalibur<sup>TM</sup> ed il software BD CellQuest<sup>TM</sup> Pro (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

### 10.5 Differenziazione trilineare di ADSCs

Per stimolare la differenziazione, utilizzare: StemPro<sup>®</sup> Adopogenesis Differentiation Kit, StemPro<sup>®</sup> Osteogenesis Differentiation Kit, StemPro<sup>®</sup> Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco by LikeTechnologies, Carlsbad, CA, USA; REF. A10410-01 e A10069-01).

#### Protocollo:

1. Filtrare in una Falcon<sub>15</sub>, mediante l'utilizzo di un filtro a siringa da 0.2 µm, 9 mL di StemPro<sup>®</sup> Adopogenesis Differentiation Basal Medium e 1 mL di StemPro<sup>®</sup> Adipogenesis Supplement per ottenere il Complete Adipogenesis Differentiation Medium. Ripetere lo stesso procedimento per i kit StemPro<sup>®</sup> Osteogenesis Differentiation Kit e StemPro<sup>®</sup> Chondrogenesis Differentiation Kit, ottenendo 3 Falcon<sup>15</sup> con 10 mL ciascuna di medium di differenziazione
2. Disegnare una piastra da 12 pozzetti, utilizzare 3 pozzetti per ciascuna differenziazione
3. Staccare e lavare le cellule staminali. Centrifugarle a 1200 rpm per 5 min, rimuovere il surnatante e diluire il pellet in 1 mL di cDMEM
4. Contare le cellule:
  - a. prelevare 20 µL di cDMEM con cellule e diluirlo con 20 µL di Trypan Blue Staining (0.4%) (Gibco)
  - b. prelevare 20 µL della soluzione totale e inserirla negli appositi vetrini
  - c. contare le cellule con lo strumento Cellometer Auto T4 (Nexcelom Bioscience LLC, Lawrence, MA, USA)
5. Seminare una goccia contenente 100.000 cellule in ciascun pozzetto destinato alla differenziazione in cellule della linea adipogenica



6. Seminare una goccia contenente 50.000 cellule in ciascun pozzetto destinato alla differenziazione in cellule della linea osteogenica
7. Preparare una soluzione contenente  $1.6 \times 10^6$  ADSCs in 100  $\mu\text{L}$ . Con questa soluzione creare 6 gocce da 5  $\mu\text{L}$  su ciascuno dei 3 pozzetti destinati alla differenziazione in cellule della linea condrogenica
8. Ai pozzetti destinati alla differenziazione in cellule della linea adipogenica e osteogenica, aggiungere 500  $\mu\text{L}$  di cDMEM
9. Incubare 2 h a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$
10. Aggiungere 500  $\mu\text{L}$  di Complete Chondrogenesis medium ai pozzetti destinati alla differenziazione in cellule della linea condrogenica
11. Incubare a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$  per 24 h
12. Rimuovere il surnatante nei pozzetti destinati alla differenziazione in cellule della linea adipogenica e osteogenica e aggiungere 500  $\mu\text{L}$  di Complete Adipogenesis medium e Complete Osteogenesis medium, rispettivamente
13. Incubare a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ , controllare lo stato delle cellule giornalmente e cambiare i rispettivi medium di differenziazione ogni 2 giorni fino a 14 giorni.

Protocollo di fissazione dei pozzetti contenenti le ADSCs stimulate alla differenziazione in cellule della linea adipogenica e osteogenica:

1. Rimuovere il surnatante
2. Lavare i pozzetti con PBS
3. Aggiungere 500  $\mu\text{L}$  di formalina (10%)
4. Incubare 15 min a  $37^\circ\text{C}$
5. Rimuovere la formalina.

Protocollo di fissazione dei pozzetti contenenti le ADSCs stimolate alla differenziazione in cellule della linea condrogenica:

1. Rimuovere il surnatante
2. Lavare i pozzetti con PBS
3. Aggiungere 500  $\mu$ L di paraformaldeide (4%)
4. Incubare 15 minuti a 37°C
5. Rimuovere la paraformaldeide.

Protocollo di colorazione dei pozzetti contenenti le ADSCs stimolate alla differenziazione in cellule della linea adipogenica:

1. Sciacquare il pozzetto con acqua distillata sterile
2. Aggiungere 2 mL di isopropanolo al 60% e aspettare dai 2-5 min
3. Rimuovere l'isopropanolo e aggiungere 2 mL di Oil Red Working Solution
4. Incubare 5 min a RT
5. Sciacquare il pozzetto con acqua fino a eliminare ogni traccia di polvere derivante dalla Oil Red Working Solution
6. Osservare al microscopio.

Protocollo di colorazione dei pozzetti contenenti le ADSCs stimolate alla differenziazione in cellule della linea osteogenica:

1. Sciacquare il pozzetto con acqua distillata sterile
2. Aggiungere 500  $\mu$ L di Alizarin Red Staining Solution
3. Incubare 45 min al buio a RT
4. Sciacquare 4 volte il pozzetto con acqua distillata sterile
5. Aggiungere 500  $\mu$ L di PBS e osservare al microscopio.

Protocollo di colorazione dei pozzetti contenenti le ADSCs stimulate alla differenziazione in cellule della linea condrogenica:

1. Sciacquare il pozzetto con PBS
2. Sciacquare brevemente il pozzetto con acido cloridrico 0.1N
3. Aggiungere 500  $\mu$ L di una soluzione 1% Alcian Blue e incubare 30 min a RT e 15 min a 37°C
4. Sciacquare brevemente il pozzetto con acido cloridrico 0.1N
5. Osservare al microscopio.

# **11. APPENDICE C**

## **PROTOCOLLI PER LA CREAZIONE DI LIBRERIE GENICHE**

### 11.1 Estrazione, purificazione e quantificazione dell'RNA

Utilizzare il kit Direct-col™ RNA MicroPrep (REF. R2062, Zymo Research, The Epigenetics Company, USA).

#### Protocollo:

1. Polverizzare il campione mediante pestello e mortaio raffreddati con azoto liquido e trasferire la polvere in una eppendorf da 1.5 mL
2. Incubare il campione con 1 mL di Trizol® (Invitrogen), vortexare per 15 sec e incubare a 37°C per 20 min a bagno maria; vortexare ogni 5 min
3. Estrarre l'RNA:
  - a. aggiungere 100 µL di Cloroformio al campione in Trizol®
  - b. vortexare 15 sec
  - c. incubare a RT per 2-3 min
  - d. centrifugare a 12.000 rpm per 15 min a 4°C
  - e. trasferire la fase acquosa in una eppendorf pulita da 1.5 mL (circa 600 µL)
  - f. aggiungere un uguale volume di EtOH 100% (1:1) e vortexare
  - g. trasferire 700 µL del contenuto in una Zymo-Spin Column inserita in un Collection Tube, centrifugare a 14.000 rpm per 30 sec, eliminare il liquido raccolto nel Collection Tube ed effettuare lo stesso procedimento con la restante parte della soluzione contenente EtOH 100%
  - h. trasferire la Zymo-Spin Column in un nuovo Collection Tube
  - i. aggiungere 400 µL di RNA Wash Buffer alla Zymo-Spin Column
  - j. centrifugare a 14.000 rpm per 30 sec
  - k. in una eppendorf pulita mixare per inversione 5 µL di DNase I e 35 µL di DNA Digestion Buffer per ogni campione

- l. caricare 40  $\mu\text{L}$  della soluzione appena preparata nel filtro della Zymo-Spin Column di ciascun campione, avendo cura di non toccare direttamente il filtro
  - m. incubare 15 min a RT
  - n. aggiungere 400  $\mu\text{L}$  di Direct-Zol RNA PreWash alla Zymo-Spin Column
  - o. centrifugare a 14.000 rpm per 30 sec
  - p. eliminare l'eluito
  - q. ripetere i punti n, o, p
  - r. aggiungere 700  $\mu\text{L}$  di RNA Wash Buffer alla Zymo-Spin Column
  - s. centrifugare a 14.000 rpm per 2 min
  - t. trasferire la Zymo-Spin Column in una eppendorf RNase-free
  - u. aggiungere 30  $\mu\text{L}$  di DNase/RNase-Free water nel filtro della Zymo-Spin Column di ciascun campione, avendo cura di non toccare il filtro
  - v. centrifugare a 14.000 rpm per 30 sec
  - w. effettuare un secondo lavaggio del filtro caricando nuovamente i 30  $\mu\text{L}$  appena centrifugati
  - x. centrifugare a 14.000 rpm per 1 min
4. Quantificare l'RNA al NanoDrop1000 Spectrophotometer (NanoDrop products, ThermoScientific). Settare la macchina utilizzando 1  $\mu\text{L}$  di DNase/RNase-Free water
  5. Conservare i campioni di RNA a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 11.2 Retrotrascrizione dell'RNA

Utilizzare il kit RT<sup>2</sup> First Strand Kit (12) (cod. 330401, QIAGEN, Germany).

### Protocollo:

1. Scongellare i campioni in ghiaccio e spinarli
2. Preparare la Genomic DNA elimination mix (GE mix). Per ogni campione preparare un'eppendorf da 0.5 mL, appositamente siglata, e aggiungere:
  - a. 1000 ng di RNA del campione
  - b. 2  $\mu$ L di Buffer GE
  - c. RNase-free water fino ad arrivare a 10  $\mu$ L totali
  - d. spinare
3. Incubare a 42°C per 5 min
4. Incubare in ghiaccio per 1 min
5. Preparare la Reverse-transcription mix (RT mix). In un'eppendorf da 0.5 mL per ciascun campione aggiungere:
  - a. 4  $\mu$ L di 5xBuffer BC3
  - b. 1  $\mu$ L di Control P2
  - c. 2  $\mu$ L di Re3 Reverse-transcription mix
  - d. 3  $\mu$ L di RNase-free water
6. Pipettare delicatamente 10  $\mu$ L della RT mix nell'eppendorf contenente i 10  $\mu$ L di GE mix di ciascun campione
7. Incubare a 42°C per 15 min e a 95°C per 5 min
8. Aggiungere 91  $\mu$ L di RNase-free water a ciascun campione pipettando più volte, ottenendo il cDNA synthesis reaction (cDNA)
9. Procedere con la Real Time PCR o congelare i campioni a -20°C.

### 11.3 Real Time PCR

Utilizzare i kit: RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Horse Inflammatory Cytokines and Receptors (12) (cod. PAEC-011Z, QIAGEN, Germany) e RT<sup>2</sup> SYBR Green ROX FAST Mastermix (12) (cod. 330622, QIAGEN, Germany).

#### Protocollo:

1. Centrifugare la RT<sup>2</sup> SYBR Green ROX FAST Mastermix, il cDNA e la RNase-free water
2. Preparare la PCR Components mix (PCR mix). Per ciascun campione, in un'epENDORF da 5 mL, appositamente siglata, aggiungere:
  - a. 1150 µL di RT<sup>2</sup> SYBR Green ROX FAST Mastermix
  - b. 102 µL di cDNA del campione
  - c. 1048 µL di RNase-free water
3. Aggiungere 15 µL di PCR mix a ciascun pozzetto dell'RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array
4. Sigillare l'RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array con le apposite pellicole e lo strumento Rotor-Disc Heat Sealer (QIAGEN, Germany)
5. Effettuare la Real Time PCR utilizzando il Rotor-Gene Q (QIAGEN, Germany).



# **12. BIBLIOGRAFIA**

- Abd-Elnaeim, M.M.M., Leiser, R., Wilsher, S., Allen, W.R., 2006. Structural and Haemovascular Aspects of Placental Growth Throughout Gestation in Young and Aged Mares. *Placenta* 27, 1103–1113. doi:10.1016/j.placenta.2005.11.005
- Aresu, L., Benali, S., Giannuzzi, D., Mantovani, R., Castagnaro, M., Falomo, M.E., 2012. The role of inflammation and matrix metalloproteinases in equine endometriosis. *J. Vet. Sci.* 13, 171–177.
- Arshad, M.I., Guihard, P., Danger, Y., Noel, G., Le Seyec, J., Boutet, M.-A., Richards, C.D., L'Helgoualc'h, A., Genet, V., Lucas-Clerc, C., Gascan, H., Blanchard, F., Piquet-Pellorce, C., Samson, M., 2015. Oncostatin M induces IL-33 expression in liver endothelial cells in mice and expands ST2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> lymphocytes. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 309. doi:10.1152/ajpgi.00398.2014
- Artlett, C.M., Sassi-Gaha, S., Rieger, J.L., Boesteanu, A.C., Feghali-Bostwick, C.A., Katsikis, P.D., 2011. The inflammasome activating caspase 1 mediates fibrosis and myofibroblast differentiation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 63, 3563–3574. doi:10.1002/art.30568
- Aupperle, H., Schoon, D., Schoon, H.-A., 2004. Physiological and pathological expression of intermediate filaments in the equine endometrium. *Res. Vet. Sci.* 76, 249–255. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2003.11.003
- Barberini, D.J., Freitas, N.P.P., Magnoni, M.S., Maia, L., Listoni, A.J., Heckler, M.C., Sudano, M.J., Golim, M.A., da Cruz Landim-Alvarenga, F., Amorim, R.M., 2014. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem Cell Res. Ther.* 5, 25. doi:10.1186/scrt414
- Booty, M.G., Barreira-Silva, P., Carpenter, S.M., Nunes-Alves, C., Jacques, M.K., Stowell, B.L., Jayaraman, P., Beamer, G., Behar, S.M., 2016. IL-21 signaling is

- essential for optimal host resistance against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Sci. Rep.* 6, 36720.
- Braun, J., Hack, A., Weis-Klemm, M., Conrad, S., Treml, S., Kohler, K., Walliser, U., Skutella, T., Aicher, W.K., 2010. Evaluation of the osteogenic and chondrogenic differentiation capacities of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Am. J. Vet. Res.* 71, 1228–1236. doi:10.2460/ajvr.71.10.1228
- Brizzi, M.F., Formato, L., Dentelli, P., Rosso, A., Pavan, M., Garbarino, G., Pegoraro, M., Camussi, G., Pegoraro, L., 2001. Interleukin-3 Stimulates Migration and Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation* 103, 549 LP-554.
- Broeckx, S.Y., Borena, B.M., Van Hecke, L., Chiers, K., Maes, S., Guest, D.J., Meyer, E., Duchateau, L., Martens, A., Spaas, J.H., 2015. Comparison of autologous versus allogeneic epithelial-like stem cell treatment in an in vivo equine skin wound model. *Cytotherapy* 17, 1434–46. doi:10.1016/j.jcyt.2015.06.004
- Buczowska, J., Kozdrowski, R., Nowak, M., Raś, A., Mrowiec, J., 2014. Endometriosis – significance for horse reproduction, pathogenesis, diagnosis, and proposed therapeutic methods. *Pol. J. Vet. Sci.* 17, 547–554. doi:10.2478/pjvs-2014-0083
- Burk, J., Badylak, S.F., Kelly, J., Brehm, W., 2013. Equine cellular therapy—from stall to bench to bedside? *Cytom. Part A* 83A, 103–113. doi:10.1002/cyto.a.22216
- Cadario, M.E., Losinno, L., Giguere, S., Aguilar, J., Jack, T.J., Macpherson, M., Fitzpatrick, C., Uhl, E.W., 2002. Uterine expression of fibrogenic cytokines in the mare. *Theriogenology* 58, 449–452. doi:10.1016/S0093-691X(02)00787-2
- Campbell, A.L., Smith, N.C., Reilly, J.H., Kerr, S.C., Leach, W.J., Fazzi, U.G., Rooney, B.P., Murrell, G.A.C., Millar, N.L., 2014. IL-21 receptor expression in human tendinopathy. *Mediators Inflamm.* 2014. doi:10.1155/2014/481206
- Card, C., 2005. Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares.

- Theriogenology 64, 580–8. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.05.041
- Carrade, D.D., Lame, M.W., Kent, M.S., Clark, K.C., Walker, N.J., Borjesson, D.L., 2012. Comparative Analysis of the Immunomodulatory Properties of Equine Adult-Derived Mesenchymal Stem Cells(). Cell Med. 4, 1–11. doi:10.3727/215517912X647217
- Carter-Arnold, J.L., Neilsen, N.L., Amelse, L.L., Odoi, A., Dhar, M.S., 2014. In vitro analysis of equine, bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates differences within age- and gender-matched horses. Equine Vet. J. 46, 589–595. doi:10.1111/evj.12142
- Carvalho, A.M., Yamada, A.L.M., Golim, M.A., Álvarez, L.E.C., Jorge, L.L., Conceição, M.L., Deffune, E., Hussni, C.A., Alves, A.L.G., 2013. Characterization of mesenchymal stem cells derived from equine adipose tissue . Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec. .
- Christoffersen, M., Baagoe, C.D., Jacobsen, S., Bojesen, A.M., Petersen, M.R., Lehn-Jensen, H., 2010. Evaluation of the systemic acute phase response and endometrial gene expression of serum amyloid A and pro- and anti-inflammatory cytokines in mares with experimentally induced endometritis. Vet. Immunol. Immunopathol. 138, 95–105. doi:10.1016/j.vetimm.2010.07.011
- Christoffersen, M., Woodward, E., Bojesen, A., Petersen, M., Squires, E., Lehn-Jensen, H., Troedsson, M., 2012. Effect of immunomodulatory therapy on the endometrial inflammatory response to induced infectious endometritis in susceptible mares. Theriogenology 78, 991–1004. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.04.016
- Christoffersen, M., Woodward, E., Bojesen, A.M., Jacobsen, S., Petersen, M.R., Troedsson, M.H., Lehn-Jensen, H., 2012. Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis.

BMC Vet. Res. 8, 41. doi:10.1186/1746-6148-8-41

Corradetti, B., Correani, A., Romaldini, A., Marini, M.G., Bizzaro, D., Perrini, C., Cremonesi, F., Lange-Consiglio, A., 2014. Amniotic Membrane-Derived Mesenchymal Cells and Their Conditioned Media: Potential Candidates for Uterine Regenerative Therapy in the Horse. PLoS One 9, e111324. doi:10.1371/journal.pone.0111324

Davami, M.H., Baharlou, R., Ahmadi Vasmehjani, A., Ghanizadeh, A., Keshtkar, M., Dezhkam, I., Atashzar, M.R., 2016. Elevated IL-17 and TGF- $\beta$  Serum Levels: A Positive Correlation between T-helper 17 Cell-Related Pro-Inflammatory Responses with Major Depressive Disorder. Basic Clin. Neurosci. 7, 137–142. doi:10.15412/J.BCN.03070207

De Mattos Carvalho, A., Alves, A.L.G., de Oliveira, P.G.G., Cisneros Álvarez, L.E., Amorim, R.L., Hussni, C.A., Deffune, E., 2011. Use of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Experimental Tendinitis Therapy in Equines. J. Equine Vet. Sci. 31, 26–34. doi:10.1016/j.jevs.2010.11.014

De Schauwer, C., Meyer, E., Van de Walle, G.R., Van Soom, A., 2011. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. Theriogenology 75, 1431–43. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.11.008

De Schauwer, C., Piepers, S., Van de Walle, G.R., Demeyere, K., Hoogewijs, M.K., Govaere, J.L.J., Braeckmans, K., Van Soom, A., Meyer, E., 2012. In search for cross-reactivity to immunophenotype equine mesenchymal stromal cells by multicolor flow cytometry. Cytom. Part A 81A, 312–323. doi:10.1002/cyto.a.22026

Denizot, F., Lang, R., 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and

- reliability. *J. Immunol. Methods* 89, 271–277.
- Dey, G., Radhakrishnan, A., Syed, N., Thomas, J.K., Nadig, A., Srikumar, K., Mathur, P.P., Pandey, A., Lin, S.-K., Raju, R., Prasad, T.S.K., 2013. Signaling network of Oncostatin M pathway. *J. Cell Commun. Signal.* 7. doi:10.1007/s12079-012-0186-y
- Diel de Amorim, M., Gartley, C.J., Foster, R.A., Hill, A., Scholtz, E.L., Hayes, A., Chenier, T.S., 2016. Comparison of Clinical Signs, Endometrial Culture, Endometrial Cytology, Uterine Low-Volume Lavage, and Uterine Biopsy and Combinations in the Diagnosis of Equine Endometritis. *J. Equine Vet. Sci.* 44, 54–61. doi:10.1016/j.jevs.2015.10.012
- Ealy, A.D., Eroh, M.L., Sharp, D.C. 3rd, 2010. Prostaglandin H synthase Type 2 is differentially expressed in endometrium based on pregnancy status in pony mares and responds to oxytocin and conceptus secretions in explant culture. *Anim. Reprod. Sci.* 117, 99–105. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.03.014
- Eirin, A., Riestler, S.M., Zhu, X.-Y., Tang, H., Evans, J.M., O'Brien, D., van Wijnen, A.J., Lerman, L.O., 2014. MicroRNA and mRNA cargo of extracellular vesicles from porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Gene* 551, 55–64. doi:10.1016/j.gene.2014.08.041
- Estep, J.M., Baranova, A., Hossain, N., Elariny, H., Ankrah, K., Afendy, A., Chandhoke, V., Younossi, Z.M., 2009. Expression of Cytokine Signaling Genes in Morbidly Obese Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis and Hepatic Fibrosis. *Obes. Surg.* 19, 617–624. doi:10.1007/s11695-009-9814-x
- Falomo, M.E., Ferroni, L., Tocco, I., Gardin, C., Zavan, B., 2015. Immunomodulatory Role of Adipose-Derived Stem Cells on Equine Endometriosis. *Biomed Res. Int.* 2015, Article ID:141485, 6 pages. doi:10.1155/2015/141485

- Ferris, R.A., Frisbie, D.D., McCue, P.M., 2014. Use of mesenchymal stem cells or autologous conditioned serum to modulate the inflammatory response to spermatozoa in mares. *Theriogenology* 82, 36–42.  
doi:10.1016/j.theriogenology.2014.02.015
- Fortier, L.A., Nixon, A.J., Williams, J., Cable, C.S., 1998. Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Am. J. Vet. Res.* 59, 1182–1187.
- Fumuso, E.A., Aguilar, J., Giguère, S., Rivulgo, M., Wade, J., Rogan, D., 2007. Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: Effects of immunomodulation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 118, 30–39. doi:10.1016/j.vetimm.2007.04.009
- Fumuso, E., Aguilar, J., Gigu, S., 2006. Interleukin-8 (IL-8) and 10 (IL-10) mRNA transcriptions in the endometrium of normal mares and mares susceptible to persistent post-breeding endometritis. *Anim. Reprod. Sci.* 94, 282–285.  
doi:10.1016/j.anireprosci.2006.04.006
- Fumuso, E., Giguère, S., Wade, J., Rogan, D., Videla-Dorna, I., Bowden, R. a., 2003. Endometrial IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis: Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 96, 31–41.  
doi:10.1016/S0165-2427(03)00137-5
- Gabay, C., 2006. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res. Ther.* 8, S3.  
doi:10.1186/ar1917
- Gerstenberg, C., Allen, W., Stewart, F., 1999. Factors controlling epidermal growth factor (EGF) gene expression in the endometrium of the mare. *Mol. Reprod. Dev.* 53, 255–265.

- Hansen, M.B., Nielsen, S.E., Berg, K., 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* 119, 203–210.
- Hermanns, H.M., 2015. Oncostatin M and interleukin-31: Cytokines, receptors, signal transduction and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 26.  
doi:10.1016/j.cytogfr.2015.07.006
- Hirota, Y., Osuga, Y., Koga, K., Yoshino, O., Hirata, T., Morimoto, C., Harada, M., Takemura, Y., Nose, E., Yano, T., Tsutsumi, O., Taketani, Y., 2006. The expression and possible roles of chemokine CXCL11 and its receptor CXCR3 in the human endometrium. *J. Immunol.* 177, 8813–8821.
- Hoffmann, C., Bazer, F.W., Klug, J., Aupperle, H., Ellenberger, C., Schoon, H. a., 2009. Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium. Expression patterns for mares suffering from endometrosis. *Theriogenology* 71, 264–274.  
doi:10.1016/j.theriogenology.2008.07.008
- Hoffmann, C., Ellenberger, C., Mattos, R.C., Aupperle, H., Dhein, S., Stief, B., Schoon, H.A., 2009. The equine endometrosis: New insights into the pathogenesis. *Anim. Reprod. Sci.* 111, 261–278. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.03.019
- Horrillo, A., Fontela, T., Arias-Salgado, E.G., Llobat, D., Porras, G., Ayuso, M.S., González-Manchón, C., 2014. Generation of mice with conditional ablation of the Cd40lg gene: new insights on the role of CD40L. *Transgenic Res.* 23, 53–66.  
doi:10.1007/s11248-013-9743-2
- Huax, F., Liu, T., McGarry, B., Ullenbruch, M., Phan, S.H., 2003. Dual Roles of IL-4 in Lung Injury and Fibrosis. *J. Immunol.* 170, 2083 LP-2092.
- Iacono, E., Merlo, B., Romagnoli, N., Rossi, B., Ricci, F., Spadari, A., 2015. Equine



- Bone Marrow and Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells: Cytofluorimetric Characterization, In Vitro Differentiation, and Clinical Application. *J. Equine Vet. Sci.* 35, 130–140. doi:10.1016/j.jevs.2014.12.010
- Imakawa, K., Imai, M., Sakai, A., Suzuki, M., Nagaoka, K., Sakai, S., Lee, S.-R., Chang, K.-T., Echternkamp, S.E., Christenson, R.K., 2006. Regulation of conceptus adhesion by endometrial CXC chemokines during the implantation period in sheep. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 850–858. doi:10.1002/mrd.20496
- Johansen, C., Rittig, A.H., Mose, M., Bertelsen, T., Weimar, I., Nielsen, J., Andersen, T., Rasmussen, T.K., Deleuran, B., Iversen, L., 2017. STAT2 is involved in the pathogenesis of psoriasis by promoting CXCL11 and CCL5 production by keratinocytes. *PLoS One* 12, e0176994. doi:10.1371/journal.pone.0176994
- Johnstone, S., Barsova, J., Campos, I., Frampton, A.R., 2016. Equine herpesvirus type 1 modulates inflammatory host immune response genes in equine endothelial cells. *Vet. Microbiol.* 192, 52–59. doi:10.1016/j.vetmic.2016.06.012
- Kang, J.-G., Park, S.-B., Seo, M.-S., Kim, H.-S., Chae, J.-S., Kang, K.-S., 2013. Characterization and clinical application of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *J Vet Sci* 14, 367–371.
- Katila, T., 2012. Post-mating Inflammatory Responses of the Uterus. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 31–41. doi:10.1111/j.1439-0531.2012.02120.x
- Keller, A., Neves, A.P., Aupperle, H., Steiger, K., Garbade, P., Schoon, H.A., Klug, E., Mattos, R.C., 2006. Repetitive experimental bacterial infections do not affect the degree of uterine degeneration in the mare. *Anim. Reprod. Sci.* 94, 276–279.
- Kitagawa, K., Wada, T., Furuichi, K., Hashimoto, H., Ishiwata, Y., Asano, M., Takeya, M., Kuziel, W.A., Matsushima, K., Mukaida, N., Yokoyama, H., 2004. Blockade of CCR2 Ameliorates Progressive Fibrosis in Kidney. *Am. J. Pathol.* 165, 237–

246. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63292-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63292-0)

- Ko, H.S., Kang, H.K., Kim, H.S., Choi, S.K., Park, I.Y., Shin, J.C., 2012. The effects of oncostatin M on trophoblast cells: Influence on matrix metalloproteinases-2 and -9, and invasion activity. *Placenta* 33, 908–913. doi:10.1016/j.placenta.2012.07.014
- Koch, T.G., Berg, L.C., Betts, D.H., 2008. Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine. *Can. Vet. J.* 49, 1009–1017.
- Koch, T.G., Heerkens, T., Thomsen, P.D., Betts, D.H., 2007. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnol.* 7, 26.  
doi:10.1186/1472-6750-7-26
- Kol, A., Walker, N.J., Galuppo, L.D., Clark, K.C., Buerchler, S., Bernanke, A., Borjesson, D.L., 2013. Autologous point-of-care cellular therapies variably induce equine mesenchymal stem cell migration, proliferation and cytokine expression. *Equine Vet. J.* 45, 193–8. doi:10.1111/j.2042-3306.2012.00600.x
- Kovacs, E.J., DiPietro, L.A., 1994. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 8, 854–861.
- Kroeger, K.M., Sullivan, B.M., Locksley, R.M., 2009. IL-18 and IL-33 elicit Th2 cytokines from basophils via a MyD88- and p38 $\alpha$ -dependent pathway. *J. Leukoc. Biol.* 86, 769–778.
- Kumar, R., Sharma, A., Pattnaik, A.K., Varadwaj, P.K., 2010. Stem cells: An overview with respect to cardiovascular and renal disease. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* 1, 43–52.  
doi:10.4103/0976-9668.71674
- Lange-Consiglio, A., Corradetti, B., Meucci, A., Perego, R., Bizzaro, D., Cremonesi, F., 2013. Characteristics of equine mesenchymal stem cells derived from amnion and bone marrow: in vitro proliferative and multilineage potential assessment. *Equine Vet. J.* 45, 737–744. doi:10.1111/evj.12052

- Lange-Consiglio, A., Rossi, D., Tassan, S., Perego, R., Cremonesi, F., Parolini, O., 2013. Conditioned medium from horse amniotic membrane-derived multipotent progenitor cells: immunomodulatory activity in vitro and first clinical application in tendon and ligament injuries in vivo. *Stem Cells Dev.* 22, 3015–3024.  
doi:10.1089/scd.2013.0214
- Liu, S.A., Haque, M., Stanfield, B., Andrews, F.M., Roy, A.A., Kousoulas, K.G., 2017. A recombinant fusion protein consisting of West Nile virus envelope domain III fused in-frame with equine CD40 ligand induces antiviral immune responses in horses. *Vet. Microbiol.* 198, 51–58.  
doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.008
- Long, K.B., Gladney, W.L., Tooker, G.M., Graham, K., Fraietta, J.A., Beatty, G.L., 2016. IFN-gamma and CCL2 cooperate to redirect tumor-infiltrating monocytes to degrade fibrosis and enhance chemotherapy efficacy in pancreatic carcinoma. *Cancer Discov.*
- Lopez, M.J., Jarazo, J., 2015. State of the art: Stem cells in equine regenerative medicine. *Equine Vet. J.* 47, 145–154. doi:10.1111/evj.12311
- MacDonald, T.T., Bell, I., Monteleone, G., 2011. The opposing roles of IL-21 and TGF $\beta$ 1 in chronic inflammatory bowel disease. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1061 LP-1066.
- Mambelli, L.I., Mattos, R.C., Winter, G.H.Z., Madeiro, D.S., Morais, B.P., Malschitzky, E., Miglino, M.A., Kerkis, A., Kerkis, I., 2014. Changes in expression pattern of selected endometrial proteins following mesenchymal stem cells infusion in mares with endometriosis. *PLoS One* 9, e97889.  
doi:10.1371/journal.pone.0097889
- Mambelli, L.I., Santos, E.J.C., Frazao, P.J.R., Chaparro, M.B., Kerkis, A., Zoppa, A.L.

- V, Kerkis, I., 2009. Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. *Tissue Eng. Part C. Methods* 15, 87–94. doi:10.1089/ten.tec.2008.0186
- Mambelli, L.I., Winter, G.H.Z., Kerkis, A., Malschitzky, E., Mattos, R.C., Kerkis, I., 2013. A novel strategy of mesenchymal stem cells delivery in the uterus of mares with endometriosis. *Theriogenology* 79, 744–750. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.11.030
- Markowitz, G.J., Yang, P., Fu, J., Michelotti, G.A., Chen, R., Sui, J., Yang, B., Qin, W.-H., Zhang, Z., Wang, F.-S., Diehl, A.M., Li, Q.-J., Wang, H., Wang, X.-F., 2016. Inflammation-Dependent IL18 Signaling Restricts Hepatocellular Carcinoma Growth by Enhancing the Accumulation and Activity of Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *Cancer Res.* 76, 2394–2405. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1548
- Marth, C.D., Firestone, S.M., Glenton, L.Y., Browning, G.F., Young, N.D., Krekeler, N., 2016. Oestrous cycle-dependent equine uterine immune response to induced infectious endometritis. *Vet. Res.* 47, 110. doi:10.1186/s13567-016-0398-x
- Marx, C., Silveira, M.D., Beyer Nardi, N., 2015. Adipose-derived stem cells in veterinary medicine: characterization and therapeutic applications. *Stem Cells Dev.* 24, 803–813. doi:10.1089/scd.2014.0407
- McKinnon, A.O., Squires, E.L., Vaala, W.E., Varner, D.D., 2011. *Equine Reproduction*, second ed. ed.
- Mellor, A.L., Munn, D.H., 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 762–774. doi:10.1038/nri1457
- Menzies-Gow, A., Ying, S., Sabroe, I., Stubbs, V.L., Soler, D., Williams, T.J., Kay, A.B., 2002. Eotaxin (CCL11) and Eotaxin-2 (CCL24) Induce Recruitment of Eosinophils, Basophils, Neutrophils, and Macrophages As Well As Features of

- Early- and Late-Phase Allergic Reactions Following Cutaneous Injection in Human Atopic and Nonatopic Volunteers. *J. Immunol.* 169, 2712 LP-2718.
- Mercati, F., Pascucci, L., Curina, G., Scocco, P., Tardella, F.M., Dall'aglio, C., Marini, C., Ceccarelli, P., 2014. Evaluation of storage conditions on equine adipose tissue-derived multipotent mesenchymal stromal cells. *Vet. J.* 200, 339–42.  
doi:10.1016/j.tvjl.2014.02.018
- Mitchell, C., Couton, D., Couty, J.-P., Anson, M., Crain, A.-M., Bizet, V., Rénia, L., Pol, S., Mallet, V., Gilgenkrantz, H., 2009. Dual Role of CCR2 in the Constitution and the Resolution of Liver Fibrosis in Mice. *Am. J. Pathol.* 174, 1766–1775.  
doi:http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2009.080632
- Moafi, M., Rezvan, H., Sherkat, R., Taleban, R., Asilian, A., Hamid Zarkesh-Esfahani, S., Nilforoushzadeh, M.A., Jaffary, F., Mansourian, M., Sokhanvari, F., Ansari, N., 2017. Comparison of pro-inflammatory cytokines of non-healing and healing cutaneous leishmaniasis. *Scand. J. Immunol.* 85, 291–299. doi:10.1111/sji.12534
- Moore, B.B., Kolodsick, J.E., Thannickal, V.J., Cooke, K., Moore, T.A., Hogaboam, C., Wilke, C.A., Toews, G.B., 2005. CCR2-Mediated Recruitment of Fibrocytes to the Alveolar Space after Fibrotic Injury. *Am. J. Pathol.* 166, 675–684.  
doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62289-4
- Moriyama, H., Kasashima, Y., Kuwano, A., Wada, S., 2014. Anatomical location and culture of equine corneal epithelial stem cells. *Vet. Ophthalmol.* 17, 106–112.  
doi:10.1111/vop.12050
- Nagase, H., Visse, R., Murphy, G., 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* 69, 562–573.  
doi:10.1016/j.cardiores.2005.12.002
- Najar, M., Raicevic, G., Fayyad-Kazan, H., Bron, D., Toungouz, M., Lagneaux, L.,

2016. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. *Cytotherapy* 18, 160–171.  
doi:10.1016/j.jcyt.2015.10.011
- Nash, D., Lane, E., Herath, S., Sheldon, I.M., 2008. Endometrial explant culture for characterizing equine endometritis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 59, 105–117.  
doi:10.1111/j.1600-0897.2007.00548.x
- Nash, D.M., Sheldon, I.M., Herath, S., Lane, E.A., 2010. Endometrial explant culture to study the response of equine endometrium to insemination. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 670–676. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01328.x
- Nelis, H., D’Herde, K., Goossens, K., Vandenberghe, L., Leemans, B., Forier, K., Smits, K., Braeckmans, K., Peelman, L., Van Soom, A., 2014. Equine oviduct explant culture: a basic model to decipher embryo-maternal communication. *Reprod. Fertil. Dev.* 26, 954–966. doi:10.1071/RD13089
- Pacini, S., Spinabella, S., Trombi, L., Fazzi, R., Galimberti, S., Dini, F., Carlucci, F., Petrini, M., 2007. Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Eng.* 13, 2949–2955. doi:10.1089/ten.2007.0108
- Pan, C.-M., Wang, M.-L., Chiou, S.-H., Chen, H.-Y., Wu, C.-W., 2016. Oncostatin M suppresses metastasis of lung adenocarcinoma by inhibiting SLUG expression through coordination of STATs and PIASs signalings. *Oncotarget* 7.  
doi:10.18632/oncotarget.10939
- Pascucci, L., Curina, G., Mercati, F., Marini, C., Dall’Aglia, C., Paternesi, B., Ceccarelli, P., 2011. Flow cytometric characterization of culture expanded multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) from horse adipose tissue: towards the definition of minimal stemness criteria. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 144,

499–506. doi:10.1016/j.vetimm.2011.07.017

- Penny, J., Harris, P., Shakesheff, K., Mobasher, A., 2012. The biology of equine mesenchymal stem cells: phenotypic characterization, cell surface markers and multilineage differentiation. *Front. Biosci.* 17, 892–908.
- Penrod, L. V, Allen, R.E., Rhoads, M.L., Limesand, S.W., Arns, M.J., 2013a. Oxytocin stimulated release of PGF $\alpha$  and its inhibition by a cyclooxygenase inhibitor and an oxytocin receptor antagonist from equine endometrial cultures. *Anim. Reprod. Sci.* 139, 69–75. doi:10.1016/j.anireprosci.2013.04.010
- Penrod, L. V, Allen, R.E., Turner, J.L., Limesand, S.W., Arns, M.J., 2013b. Effects of oxytocin, lipopolysaccharide (LPS), and polyunsaturated fatty acids on prostaglandin secretion and gene expression in equine endometrial explant cultures. *Domest. Anim. Endocrinol.* 44, 46–55.  
doi:10.1016/j.domaniend.2012.09.002
- Penton-Rol, G., Polentarutti, N., Luini, W., Borsatti, A., Mancinelli, R., Sica, A., Sozzani, S., Mantovani, A., 1998. Selective Inhibition of Expression of the Chemokine Receptor CCR2 in Human Monocytes by IFN- $\gamma$ . *J. Immunol.* 160, 3869 LP-3873.
- Pigott, J.H., Ishihara, A., Wellman, M.L., Russell, D.S., Bertone, A.L., 2013. Investigation of the immune response to autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 156, 99–106. doi:10.1016/j.vetimm.2013.09.003
- Pöling, J., Gajawada, P., Richter, M., Lörchner, H., Polyakova, V., Kostin, S., Shin, J., Boettger, T., Walther, T., Rees, W., Wietelmann, A., Warnecke, H., Kubin, T., Braun, T., 2014. Therapeutic targeting of the oncostatin M receptor- $\beta$  prevents inflammatory heart failure. *Basic Res. Cardiol.* 109. doi:10.1007/s00395-013-

- Puthumana, J., Ariza, X., Belcher, J.M., Graupera, I., Gines, P., Parikh, C.R., 2017. Urine Interleukin 18 and Lipocalin 2 Are Biomarkers of Acute Tubular Necrosis in Patients With Cirrhosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 1003–1013.e3. doi:10.1016/j.cgh.2016.11.035
- Puxeddu, I., Bader, R., Piliponsky, A.M., Reich, R., Levi-Schaffer, F., Berkman, N., 2006. The CC chemokine eotaxin/CCL11 has a selective profibrogenic effect on human lung fibroblasts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 103–110. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2005.08.057
- Raabe, O., Shell, K., Wurtz, A., Reich, C.M., Wenisch, S., Arnhold, S., 2011. Further insights into the characterization of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Vet. Res. Commun.* 35, 355–365. doi:10.1007/s11259-011-9480-z
- Ranera, B., Ordovas, L., Lyahyai, J., Bernal, M.L., Fernandes, F., Remacha, A.R., Romero, A., Vazquez, F.J., Osta, R., Cons, C., Varona, L., Zaragoza, P., Martin-Burriel, I., Rodellar, C., 2012. Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Equine Vet. J.* 44, 33–42. doi:10.1111/j.2042-3306.2010.00353.x
- Rasmussen, C.D., Petersen, M.R., Bojesen, A.M., Pedersen, H.G., Lehn-Jensen, H., Christoffersen, M., 2015. Equine Infectious Endometritis—Clinical and Subclinical Cases. *J. Equine Vet. Sci.* 35, 95–104. doi:10.1016/j.jevs.2014.12.002
- Renzi, S., Riccò, S., Dotti, S., Sesso, L., Grolli, S., Cornali, M., Carlin, S., Patruno, M., Cinotti, S., Ferrari, M., 2013. Autologous bone marrow mesenchymal stromal cells for regeneration of injured equine ligaments and tendons: a clinical report. *Res. Vet. Sci.* 95, 272–7. doi:10.1016/j.rvsc.2013.01.017
- Richards, C.D., 2013. The enigmatic cytokine oncostatin m and roles in disease. *ISRN*



- Inflamm. 2013, 512103. doi:10.1155/2013/512103
- Ryan, R.E., Martin, B., Mellor, L., Jacob, R.B., Tawara, K., McDougal, O.M., Oxford, J.T., Jorcyk, C.L., 2015. Oncostatin M binds to extracellular matrix in a bioactive conformation: Implications for inflammation and metastasis. *Cytokine* 72. doi:10.1016/j.cyto.2014.11.007
- Schlafer, D.H., 2007. Equine endometrial biopsy: Enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques? *Theriogenology* 68, 413–422. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.04.040
- Schnabel, L. V, Fortier, L.A., McIlwraith, C.W., Nobert, K.M., 2013. Therapeutic use of stem cells in horses: which type, how, and when? *Vet. J.* 197, 570–7. doi:10.1016/j.tvjl.2013.04.018
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A., 2004. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75, 163–189. doi:10.1189/jlb.0603252
- Schwarz, C., Leicht, U., Drosse, I., Ulrich, V., Luibl, V., Schieker, M., Röcken, M., 2011. Characterization of adipose-derived equine and canine mesenchymal stem cells after incubation in agarose-hydrogel. *Vet. Res. Commun.* 35, 487–99. doi:10.1007/s11259-011-9492-8
- Schwarz, C., Leicht, U., Rothe, C., Drosse, I., Luibl, V., Röcken, M., Schieker, M., 2012. Effects of different media on proliferation and differentiation capacity of canine, equine and porcine adipose derived stem cells. *Res. Vet. Sci.* 93, 457–62. doi:10.1016/j.rvsc.2011.08.010
- Seki, E., de Minicis, S., Inokuchi, S., Taura, K., Miyai, K., van Rooijen, N., Schwabe, R.F., Brenner, D.A., 2009. CCR2 promotes hepatic fibrosis in mice. *Hepatology* 50, 185–197. doi:10.1002/hep.22952

- Seo, M.-S., Park, S.-B., Kim, H.-S., Kang, J., Chae, J.-S., Kang, K.-S., 2013. Isolation and characterization of equine amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells. *J Vet Sci* 14, 151–159.
- Shi, Y., Su, J., Roberts, A.I., Shou, P., Rabson, A.B., Ren, G., 2012. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol.* 33, 136–43. doi:10.1016/j.it.2011.11.004
- Sittampalam, G., Coussens, N., Nelson, H., 2004. *Assay Guidance Manual*.
- Slaets, H., Nelissen, S., Janssens, K., Vidal, P.M., Lemmens, E., Stinissen, P., Hendrix, S., Hellings, N., 2014. Oncostatin M Reduces Lesion Size and Promotes Functional Recovery and Neurite Outgrowth After Spinal Cord Injury. *Mol. Neurobiol.* 50. doi:10.1007/s12035-014-8795-5
- Snider, T. a., Sepoy, C., Holyoak, G.R., 2011. Equine endometrial biopsy reviewed: Observation, interpretation, and application of histopathologic data. *Theriogenology* 75, 1567–1581. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.12.013
- Solberg, O.D., Jackson, K.A., Millon, L. V, Stott, J.L., Vandenplas, M.L., Moore, J.N., Watson, J.L., 2004. Genomic characterization of equine Interleukin-4 receptor  $\alpha$ -chain (IL4R). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 97, 187–194. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2003.09.004
- Sun, D., Li, S., Wu, H., Zhang, M., Zhang, X., Wei, L., Qin, X., Gao, E., 2015. Oncostatin M (OSM) protects against cardiac ischaemia/reperfusion injury in diabetic mice by regulating apoptosis, mitochondrial biogenesis and insulin sensitivity. *J. Cell. Mol. Med.* 19. doi:10.1111/jcmm.12501
- Szóstek, a. Z., Siemieniuch, M.J., Lukasik, K., Galvão, a. M., Ferreira-Dias, G.M., Skarzynski, D.J., 2012. MRNA transcription of prostaglandin synthases and their products in the equine endometrium in the course of fibrosis. *Theriogenology* 78,

768–776. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.03.024

Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K., Koyama, M., Tsukamoto, K., 1986. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. Immunol. Methods* 93, 157–165.

Takayama, G., Arima, K., Kanaji, T., Toda, S., Tanaka, H., Shoji, S., McKenzie, A.N.J., Nagai, H., Hotokebuchi, T., Izuhara, K., 2006. Periostin: A novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118, 98–104.

doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2006.02.046>

Teruel, M., Simeon, C.P., Broen, J., Vonk, M.C., Carreira, P., Camps, M.T., García-Portales, R., Delgado-Frías, E., Gallego, M., Espinosa, G., Beretta, L., Airó, P., Lunardi, C., Riemekasten, G., Witte, T., Krieg, T., Kreuter, A., Distler, J.H.W., Hunzelmann, N., Koeleman, B.P., Voskuyl, A.E., Schuerwegh, A.J., González-Gay, M.Á., Radstake, T.R.D.J., Martin, J., 2012. Analysis of the association between CD40 and CD40 ligand polymorphisms and systemic sclerosis. *Arthritis Res. Ther.* 14, R154. doi:10.1186/ar3890

Tetta, C., Consiglio, A.L., Bruno, S., Tetta, E., Gatti, E., Dobрева, M., Cremonesi, F., Camussi, G., 2012. The role of microvesicles derived from mesenchymal stem cells in tissue regeneration; a dream for tendon repair? *Muscles. Ligaments Tendons J.* 2, 212–221.

Traub, B., Sun, L., Ma, Y., Xu, P., Lemke, J., Paschke, S., Henne-Bruns, D., Knippschild, U., Kornmann, M., 2017. Endogenously Expressed IL-4R $\alpha$  Promotes the Malignant Phenotype of Human Pancreatic Cancer In Vitro and In Vivo. *Int. J. Mol. Sci.* 18. doi:10.3390/ijms18040716

Troedsson, M.H., 1999. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology* 52, 461–71. doi:10.1016/S0093-691X(99)00143-0

- Troedsson, M.H.T., 2006. Breeding-Induced Endometritis in Mares. *Vet. Clin. North Am. - Equine Pract.* 22, 705–712. doi:10.1016/j.cveq.2006.07.003
- Troedsson, M.H.T., Woodward, E.M., 2016. Our current understanding of the pathophysiology of equine endometritis with an emphasis on breeding-induced endometritis. *Reprod. Biol.* 16, 8–12. doi:10.1016/j.repbio.2016.01.003
- Trujano, M., Wrathall, A.E., 1985. Observations on the survival in vitro of cultured explants of porcine endometrium. *Br. Vet. J.* 141, 372–377. doi:10.1016/0007-1935(85)90087-9
- Vidal, M.A., Kilroy, G.E., Lopez, M.J., Johnson, J.R., Moore, R.M., Gimble, J.M., 2007. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Vet. Surg.* 36, 613–622. doi:10.1111/j.1532-950X.2007.00313.x
- Walter, I., Handler, J., Reifinger, M., Aurich, C., 2001. Association of endometriosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins. *Reproduction* 121, 581–586. doi:10.1530/reprod/121.4.581
- Wang, Z.Y., Gaggero, A., Rubartelli, A., Rosso, O., Miotti, S., Mezzanzanica, D., Canevari, S., Ferrini, S., 2002. Expression of interleukin-18 in human ovarian carcinoma and normal ovarian epithelium: evidence for defective processing in tumor cells. *Int. J. cancer* 98, 873–878.
- Watson, E.D., 2000. Post-breeding endometritis in the mare. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61, 221–232. doi:10.1016/S0378-4320(00)00110-X
- Watson, E.D., Sertich, P.L., 1989. Prostaglandin production by horse embryos and the effect of co-culture of embryos with endometrium from pregnant mares. *J. Reprod. Fertil.* 87, 331–336.

- Watts, A.E., 2014. Use of stem cells in equine musculoskeletal disorders. *Equine Vet. Educ.* 26, 492–498. doi:10.1111/eve.12200
- Weber, G.F., Chousterman, B.G., He, S., Fenn, A.M., Nairz, M., Anzai, A., Brenner, T., Uhle, F., Iwamoto, Y., Robbins, C.S., Noiret, L., Maier, S.L., Zonnchen, T., Rahbari, N.N., Scholch, S., Klotzsche-von Ameln, A., Chavakis, T., Weitz, J., Hofer, S., Weigand, M.A., Nahrendorf, M., Weissleder, R., Swirski, F.K., 2015. Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis. *Science* 347, 1260–1265. doi:10.1126/science.aaa4268
- Woodward, E.M., 2012. Breeding induced endometritis in the mare: the local innate response.
- Wu, Y.-J., Cai, W.-M., Li, Q., Liu, Y., Shen, H., Mertens, P.R., Dooley, S., Weng, H.-L., 2011. Long-term antifibrotic action of interferon-gamma treatment in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int* 10, 151–157.
- Wynn, T.A., 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.* 214, 199–210. doi:10.1002/path.2277
- Yuan, J., Reed, A., Chen, F., Stewart, C.N., 2006. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7, 85. doi:10.1186/1471-2105-7-85
- Zhang, M., Wang, C., Hu, J., Lin, J., Zhao, Z., Shen, M., Gao, H., Li, N., Liu, M., Zheng, P., Qiu, C., Gao, E., Wang, H., Sun, D., 2015. Notch3/Akt signaling contributes to OSM-induced protection against cardiac ischemia/reperfusion injury. *Apoptosis* 20. doi:10.1007/s10495-015-1148-7
- Zhang, X., Zhu, D., Wei, L., Zhao, Z., Qi, X., Li, Z., Sun, D., 2015. OSM Enhances Angiogenesis and Improves Cardiac Function after Myocardial Infarction. *Biomed Res. Int.* 2015. doi:10.1155/2015/317905

Zhou, Y., Yang, Y., Warr, G., Bravo, R., 1999. LPS down-regulates the expression of chemokine receptor CCR2 in mice and abolishes macrophage infiltration in acute inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 65, 265–269.

Zweifel, M., Matozan, K., Dahinden, C., Schaffner, T., Mohacsi, P., 2010. Eotaxin/CCL11 Levels Correlate With Myocardial Fibrosis and Mast Cell Density in Native and Transplanted Rat Hearts. *Transplant. Proc.* 42, 2763–2766.  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2010.05.152>