

# Cellule staminali mesenchimali dell'amnios equino per il trattamento delle tendinopatie del cavallo sportivo: prima segnalazione

Anna Lange Consiglio<sup>1</sup>, Stefano Tassan<sup>2</sup>, Bruna Corradetti<sup>3</sup>, Davide Bizzaro<sup>3</sup>,  
Andrea Bignotti<sup>1</sup>, Fausto Cremonesi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Università degli Studi di Milano, Ospedale Grandi Animali, Azienda "Polo Veterinario" di Lodi, Sezione di Riproduzione, Lodi Italia

<sup>2</sup> Libero professionista

<sup>3</sup> Università Politecnica Marche, Dipartimento Biochimica Biologia e Genetica, Ancona Italia

## RIASSUNTO

La medicina rigenerativa si basa sulla biologia e la manipolazione cellulare per lo sviluppo di strategie atte a mantenere o ripristinare la funzione di organi e tessuti che sono stati compromessi da patologie. Grazie alla loro capacità di differenziare in diverse linee cellulari, le cellule staminali giocano, indubbiamente, un ruolo fondamentale nello sviluppo di questi obiettivi. Le cellule staminali embrionali sono totipotenti, ma il loro isolamento implica la distruzione dell'embrione e la loro applicazione è limitata dall'alto indice oncogenico. Le cellule staminali mesenchimali di origine adulta prevedono tecniche di prelievo invasive, non prive di complicazioni, la loro coltura ed espansione *in vitro* richiede diverse settimane e, inoltre, possiedono limitate capacità di proliferazione e differenziazione che sono inversamente proporzionali all'età del donatore. Da queste considerazioni emerge l'interesse, per il clinico, di fonti alternative di elementi multipotenti. Le cellule provenienti dagli annessi fetali potrebbero rappresentare una possibilità per superare alcune di queste limitazioni, aprendo nuove prospettive per lo sviluppo della medicina rigenerativa. Scopo di questo studio è stato quello di isolare, caratterizzare e differenziare per la prima volta cellule mesenchimali di amnios nella specie equina, valutandone l'impiego nella terapia delle lesioni tendinee. Dai risultati emerge che è stata isolata una popolazione di elementi multipotenti di origine fetale extra-embriale caratterizzati dall'espressione dei marker di staminalità, dall'assenza di espressione di marker di immunogenicità, da un'intensa capacità proliferativa e differenziativa nella linea mesodermica ed ectodermica, ed in grado di tollerare la crioconservazione. Queste proprietà rendono la popolazione cellulare derivata dagli annessi fetali extra-embriali una fonte ideale per i trattamenti rigenerativi. Nel presente lavoro, per la prima volta, è segnalato il trattamento di lesioni tendinee acute nel cavallo con cellule mesenchimali allogeneiche amniotiche. Nei soggetti trattati è stato riscontrato un quadro ecografico indicativo di una rapida evoluzione, probabilmente stimolata anche da un'intrinseca attività antinfiammatoria di questa popolazione cellulare. La possibilità di trattare aree lesionali in tempo reale, prima del verificarsi di alterazioni ultrastrutturali, e l'assenza di reazioni al trapianto allogenico rappresentano i punti di maggior interesse di quest'innovativo approccio biotecnologico alle tendinopatie equine.

## INTRODUZIONE

Il cavallo atleta è continuamente sottoposto a sollecitazioni meccaniche che spesso possono determinare lesioni all'apparato muscolo-scheletrico, in particolare tendini e legamenti, che costituiscono la più comune causa di ritiro dei soggetti sportivi dall'attività agonistica (Lam *et al.*, 2007). Per queste lesioni muscolo-tendinee le terapie tradizionali conservative mediante, per esempio, iniezioni intralesionali di steroidi (Kapetanios 1982), di acido ialuronico (Foland *et al.*, 1992) o di glicosaminoglicani polisolfati (PSGAG) (Marr *et al.*, 1993), nonché terapie chirurgiche quali lo *splitting* transcutaneo accompagnato da desmotomia della briglia radiale, associate a riposo dell'animale per diversi mesi, conseguono nella formazione di tessuto cicatriziale con matrice connettivale povera e fibrille collagene con diametri ridotti che ne compromettono la guarigione (Woo *et al.*, 1999). Infatti, in seguito a lesioni tendinee, il tessuto cicatriziale che si forma nel focolaio di rottura rappresenta una causa di calo di prestazioni e di aumento del rischio di recidiva che ammonta al 56% per i cavalli da salto e al 66% per quelli da corsa (Dyson 2004).

Poiché è noto che il tessuto cicatriziale non consente il ripristino di una condizione anatomico-funzionale prossima a quella precedente il trauma, nel corso di questi ultimi anni sono state sviluppate numerose strategie terapeutiche finalizzate ad accelerare i tempi e, soprattutto, la qualità dei processi riparativi tendinei. In quest'ottica, del tutto innovativo e promettente è il recente ricorso, anche in medicina veterinaria, alla terapia rigenerativa, nuovo emergente campo multidisciplinare, che sfrutta la biologia e la manipolazione cellulare per lo sviluppo di strategie atte a ripristinare la funzione di organi o tessuti compromessi da eventi patologici.

La terapia cellulare è basata sulla capacità delle cellule staminali mesenchimali (MSCs) ottenute da midollo osseo (BM) o tessuto adiposo, di differenziare in diverse linee cellulari. In medicina veterinaria, approcci terapeutici

"Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione l'11/02/2011 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 16/09/2011".

ci per trattare danni ai tessuti muscolo-scheletrici sono stati sviluppati usando MSCs multipotenti (Smith *et al.*, 2003; Pacini *et al.*, 2007; Crovace *et al.*, 2007; Fortier e Smith, 2008; Guest 2008).

Si ipotizza che le MSCs impiantate in una lesione tendinea possano influire sulla rigenerazione tissutale secondo due meccanismi: differenziandosi in tenociti e secernendo matrice extracellulare tendinea, oppure, secernendo fattori di crescita che inducano le cellule impiantate o quelle residenti a produrre tale matrice (Murphy *et al.*, 2003; Caplan e Dennis 2006). I risultati ottenuti da diverse prove di applicazione delle MSCs per la rigenerazione di tessuti danneggiati di varia natura sono positivi, sia dal punto di vista della ricostituzione della struttura sia del recupero della funzionalità. Diversi studi hanno dimostrato che, in seguito ad inoculazione di MSC da BM in lesioni tendinee del tendine flessore superficiale delle falangi, in tempi relativamente brevi (40-100 giorni) si è verificata la completa ricostituzione dell'architettura e della struttura del tessuto, valutata mediante tecnica ultrasonografica, istologica ed immunohistochimica (Smith *et al.*, 2003; Koch *et al.*, 2008; Lacitignola *et al.*, 2008; Crovace *et al.*, 2010).

Nonostante l'incremento della terapia cellulare per trattare problemi di natura ortopedica nell'equino, molte problematiche rimangono senza risposta relativamente alla fonte ottimale di cellule mesenchimali, ai tempi ed alle modalità di trattamento in base al tipo di lesione, alla valutazione della sicurezza delle terapie in termini di potenziale tumorigenico ed all'efficacia del trattamento (Berg *et al.*, 2009).

Il BM è stato considerato, per lungo tempo, la principale fonte di MSCs adulte. In numerosi studi è stato dimostrato come l'inoculo di cellule provenienti da BM in tendini anche gravemente danneggiati producesse una significativa rigenerazione in luogo di una riparazione cicatriziale (Caplan 2007). Per queste loro attitudini, l'uso di cellule staminali mesenchimali isolate da BM o talvolta, in modo più empirico, l'impiego di BM tal quale, è stato introdotto tra le terapie delle tendinopatie e delle desmopatie del cavallo (Smith *et al.*, 2003; Crovace *et al.*, 2007; Pacini *et al.*, 2007; Wilke *et al.*, 2007; Fortier e Smith 2008; Guest 2008). Il BM tal quale contiene, però, anche derivati e precursori ossei e cellule adipose che potrebbero essere deleteri per la guarigione innescando la formazione di mineralizzazioni distrofiche o metaplasie nella sede di inoculo. Inoltre, è riportato in letteratura che le cellule derivanti da BM mostrano una limitata capacità di proliferazione (circa 32 giorni per l'espansione fra l'isolamento e l'impianto) e differenziamento (Guest *et al.*, 2010) che aumenta con l'età del donatore ed il numero di passaggi *in vitro* (Digirolamo *et al.*, 1999; Guillot *et al.*, 2007) e non danno miglioramenti funzionali a lungo termine (Paris e Stout, 2010). Infine, la raccolta di BM ri-

chiede una procedura invasiva che è stata associata occasionalmente nell'equino a pneumopericarditi (Durando *et al.*, 2006). Altra fonte di MSCs è rappresentata dal tessuto adiposo, ma alcuni ricercatori hanno evidenziato che queste cellule posseggono un minor potenziale osteogenico e condrogenico (Winter *et al.*, 2003; Muschler *et al.*, 2004; Im *et al.*, 2005).

Le cellule provenienti dagli annessi fetali potrebbero rappresentare una valida alternativa per superare alcune di queste limitazioni, aprendo nuove prospettive per lo sviluppo della medicina rigenerativa. In medicina umana, la membrana amniotica isolata dalla placenta a termine è una fonte particolarmente attraente di cellule staminali mesenchimali perché è solitamente eliminata alla nascita, il suo utilizzo non comporta conflitti etici e permette un recupero molto efficiente di MSCs senza richiedere procedure invasive. Il fatto che la placenta sia fondamentale per il mantenimento della tolleranza materno-fetale durante la gravidanza suggerisce, inoltre, che le cellule presenti nel tessuto placentare possano avere caratteristiche immunomodulatorie che riducono i rischi del rigetto immunologico delle cellule staminali trapiantate da parte del ricevente (Evangelista *et al.*, 2008). Infatti, la membrana amniotica umana e le cellule epiteliali amniotiche isolate da essa hanno mostrato la capacità di sopravvivere per lungo tempo in animali immunocompetenti quali conigli (Avila *et al.*, 2001), ratti (Kubo *et al.*, 2001), porcellini d'India (Yuge *et al.*, 2004) e scimmie (Sankar e Muthusamy, 2003). Recenti studi hanno anche dimostrato che cellule mesenchimali di amnios umano possono fortemente inibire la proliferazione dei linfociti T (Magatti *et al.*, 2008) e mostrare bassa immunogenicità (Bailo *et al.*, 2004). Inoltre, è stato riportato che tali cellule posseggono l'abilità di differenziarsi in più linee cellulari (Ilancheran *et al.*, 2007; Evangelista *et al.*, 2008) ed avere funzioni anti-infiammatorie (Sarugaser *et al.*, 2005).

In medicina veterinaria, la membrana amniotica *in toto* è stata usata in terapie cliniche per la ricostruzione della superficie oculare in cavalli (Ollivier *et al.*, 2006; Plummer 2009) e cani (Arcelli *et al.*, 2009) poiché è una struttura avascolare, promuove la ripitelizzazione, decresce infiammazione e fibrosi (Solomon *et al.*, 2005) e modula l'angiogenesi (Dua *et al.*, 2004). Considerando che il processo di guarigione richiede fattori di crescita che stimolano l'angiogenesi, la mitogenesi e la formazione di matrice, le cellule derivanti dall'amnios potrebbero rappresentare un prezioso strumento per la terapia cellulare in ambito veterinario.

Lo scopo di questa sperimentazione è stato la messa a punto di un protocollo per l'isolamento di cellule mesenchimali dalla membrana amniotica e la caratterizzazione delle presunte cellule staminali sulla base della loro capacità proliferativa e differenziativa in senso osteogenico, adipogenico,

condrogenico e neurogenico, anche in seguito a crioconservazione. Inoltre, per la prima volta, un ulteriore obiettivo di questo studio è stato l'impiego di cellule mesenchimali allogeniche di derivazione amniotica per il trattamento delle patologie dell'apparato muscolo-scheletrico nel cavallo.

## MATERIALI E METODI

Tutti i reagenti impiegati in questa sperimentazione, se non diversamente indicato, sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich, Milano, Italia.

### Raccolta della membrana allanto-amniotica

Per questo studio sono stati lavorati cinque campioni di membrana amniotica prelevati al momento del parto. I campioni sono stati posti a 4°C in tampone fosfato salino privo di calcio e magnesio (PBS, Euroclone, Milano, Italia), supplementato con 100 U/ml penicillina, 100 µg/ml streptomina e 0,25 µg/ml amfotericina B e processati entro 12 ore dal prelievo.

La membrana amniotica, sottile e trasparente, è stata separata meccanicamente dall'allantoide vascolarizzata (Fig. 1) e sottoposta a digestione enzimatica.

### Isolamento di cellule amniotiche mesenchimali

I frammenti di ogni campione di amnios sono stati incubati per 9 minuti a 37°C in PBS contenente 2,4 U/ml dispasi (Becton Dickinson and Company, Milano, Italia). Dopo un periodo di 5-10 minuti a temperatura ambiente in High Glucose - Dulbecco's Modified Eagle's Medium (HG-DMEM; Euroclone), addizionato con 10% di siero fetale bovino (FBS, Fetal Bovine Serum) e 2 mM L-glutamina, i frammenti sono stati digeriti con 0,93 mg/ml collagenasi tipo I e 20 µg/ml DNAsi (Roche, Mannheim, Germany) per circa 3 ore a 37°C. Il prodotto della digestione è stato filtrato utilizzando un filtro da 100 µm. Il filtrato è stato centrifugato a 200xg per 10 minuti per raccogliere le cellule mesenchimali



FIGURA 1 - La membrana amniotica è separata meccanicamente dalla sovrastante membrana allantoidea. La freccia indica il punto di sovrapposizione delle membrane.

isolate. Queste cellule sono state denominate cellule mesenchimali amniotiche (AMCs).

Il numero delle cellule vitali isolate è stato contato mediante saggio di esclusione con il colorante Trypan blue, usando la camera di Bürker.

### Coltura, espansione e conta cellulare

Successivamente all'isolamento, le AMCs sono state seminate alla densità di  $1 \times 10^5$  cell/cm<sup>2</sup> e le colture cellulari sono state mantenute con HG-DMEM addizionato con 10% FBS, 10 ng/ml epidermal growth factor (EGF), 100 U/ml penicillina, 100 µg/ml streptomina, 0,25 µg/ml amfotericina B e 2 mM L-glutamina.

Le colture cellulari sono state mantenute in incubatore ad un'atmosfera al 5% CO<sub>2</sub> e 90% umidità, ed alla temperatura di 38,5°C per gli esperimenti descritti in seguito. Il terreno di coltura è stato cambiato per la prima volta dopo 72 ore dalla semina per eliminare le cellule non aderenti. Il mantenimento delle colture cellulari ha previsto la rimozione del terreno di coltura due volte la settimana.

Al raggiungimento di una confluenza pari a circa l'80% della superficie della fiasca a passaggio 0 (P0) la coltura primaria è stata espansa, staccando le cellule dal fondo della fiasca con 0,05% tripsina/0,02% EDTA in tampone fosfato (Euroclone) a 37°C per 2-3 minuti.

Dopo la conta, la sospensione cellulare è stata ridistribuita in fiasche di coltura più ampie in rapporto 1:2 (P1) seminando circa  $1 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup> al fine di mantenere ed espandere la coltura fino al decimo passaggio.

### Analisi della proliferazione cellulare

#### Doubling Time (DT)

Per l'analisi del DT è stata utilizzata la metodica della conta seriale, cioè le cellule sono state contate a passaggi successivi da P1 a P10. Per questo scopo, le AMCs sono state seminate alla densità di  $3 \times 10^3$  cell/cm<sup>2</sup> ed il cambio di terreno è stato eseguito ogni tre giorni sino al raggiungimento di circa l'80% di confluenza, momento in cui le cellule sono state tripsinizzate, contate e seminate alla stessa densità.

Il DT è stato ottenuto a ciascun passaggio accordandosi alle formule  $CD = \log(N_f/N_i)/\log_2$ , e  $DT = CT/CD$ , dove CD rappresenta il fattore di duplicazione cellulare, N<sub>f</sub> è il numero finale di cellule a confluenza, N<sub>i</sub> è il numero iniziale di cellule seminate, CT rappresenta il tempo di mantenimento della coltura.

#### Analisi delle unità formanti colonie fibroblastoidi (CFU-F)

Per il test delle CFU-F, le AMCs sono state seminate, subito dopo il loro isolamento (P0) a densità

tà differente (100, 250, 500 e 1000 cell/cm<sup>2</sup>) e mantenute in incubatore a 38,5°C, in un'atmosfera con il 5% CO<sub>2</sub> e 90% umidità, per 2 settimane in terreno HG-DMEM arricchito come descritto precedentemente. Le colonie sono state fissate in formalina al 4%, colorate con 1% di Blu di Metilene (Serva, Heidelberg, Germania) in tampone borato 10mM (pH 8,8; Fluka, BioChemika, Buchs, Svizzera) a temperatura ambiente e lavate con acqua distillata per due volte. Le colonie comprendenti un numero di cellule nucleate maggiore di 16-20 sono state contate utilizzando un microscopio rovesciato Olympus BX71.

### Differenziamenti in vitro

Lo studio prevedeva di analizzare il potenziale plastico delle cellule isolate, mediante induzione del differenziamento osteogenico, adipogenico, condrogenico e neurogenico.

Per tale studio, le cellule isolate da amnios sono state espanse e a P3 sono state seminate alla densità di 3x10<sup>3</sup> cellule/cm<sup>2</sup> per il trattamento differenziativo e ad una densità di 1x10<sup>3</sup> cellule/cm<sup>2</sup> per il controllo. Per i primi 3-4 giorni, le cellule sono state incubate con il terreno utilizzato per la loro espansione (HG-DMEM arricchito) in modo da permetterne l'adesione ed il raggiungimento della confluenza, momento in cui sono stati avviati i trattamenti differenziativi.

### Differenziamento osteogenico

Per il differenziamento osteogenico, le colture cellulari sono state incubate in HG-DMEM addizionato con 10% FBS, 100 U/ml penicillina, 100 µg/ml streptomina, 0,25 µg/ml amfotericina B, 2 mM L-glutamina, 10 mM β-glicerofosfato, 0,1 µM desametasone, 250 µM acido ascorbico.

Il differenziamento osteogenico è stato condotto incubando le cellule per 3 settimane a 38,5°C in un'atmosfera con il 5% CO<sub>2</sub>. Per il controllo è stato utilizzato il terreno di espansione cellulare di base per il mantenimento delle cellule amniotiche in coltura. Al 21° giorno, l'osteogenesi è stata valutata con la convenzionale colorazione von Kossa usando 1% di nitrato d'argento e 5% di tiosolfato di sodio per la determinazione dei depositi di calcio.

### Differenziamento adipogenico

Per indurre il differenziamento adipogenico, le cellule sono state stimolate con tre cicli di induzione/mantenimento. Ogni ciclo prevedeva una coltura di 3 giorni con un terreno di induzione specifico per l'adipogenesi ed un altro periodo di 3 giorni con un terreno di mantenimento.

Il terreno di induzione era costituito da HG-DMEM, supplementato con il 10% FBS, 100 U/ml penicillina, 100 µg/ml streptomina, 0,25 µg/ml amfotericina B, 2 mM L-glutamina, 10 µg/ml insulina, 150 µM indometacina, 1 µM desametasone

e 500 µM 3-isobutil-metil-xantina (IBMX). Il terreno di mantenimento era costituito da HG-DMEM, supplementato con il 10% FBS e 10 µg/ml insulina. Le cellule di controllo sono state coltivate per lo stesso periodo di tempo unicamente nel terreno di mantenimento. Dopo 3 settimane, il trattamento differenziativo è stato bloccato e l'adipogenesi è stata analizzata usando la colorazione convenzionale Oil red O (0,1% di Oil red O in 60% di isopropanolo) per visualizzare le gocce lipidiche.

### Differenziamento condrogenico

Il differenziamento condrogenico è stato indotto incubando le cellule in monostrato per 2-3 settimane in DMEM low-glucose (LG-DMEM, Euroclone), supplementato con 100 nM desametasone, 50 µg/ml acido-L-ascorbico-2-fosfato, 1 mM sodio piruvato (BDH Chemicals Ltd., Poole, UK), 40 µg/ml prolina, ITS (insulina 5 µg/ml, transferrina 5 µg/ml, selenito di sodio 5 ng/ml) e 5 ng/ml TGF-β3 (Peprov, DBA Italia). Le cellule di controllo sono state coltivate per lo stesso periodo di tempo nel terreno di crescita standard per le cellule amniotiche (HG-DMEM supplementato). Dopo 3 settimane, la presenza di matrice metacromatica è stata dimostrata dalla colorazione con Alcian Blue pH 2,5.

### Differenziamento neurogenico

Il differenziamento neurogenico è stato eseguito con una pre-induzione di 24 ore in un terreno costituito da HG-DMEM addizionato con 20% FBS e 1 mM β-mercaptoetanolo (BME) (Mitchell et al., 2003). Successivamente, l'induzione neurogenica è stata effettuata con un terreno costituito da HG-DMEM supplementato con 2% FBS, 2% DMSO e 200 µM idrossianisolo butilato (BHA) per 3 giorni. Le cellule di controllo sono state mantenute per lo stesso periodo di tempo nel terreno di coltura standard delle cellule amniotiche. Il differenziamento neurogenico è stato valutato attraverso la morfologia delle cellule e la colorazione di Nissl (0,1% Cresyl violetto) che mostra l'incremento di corpi tigroidi.

### Analisi dei marker di espressione attraverso RT-PCR

Mediante RT-PCR, è stata indagata sia l'espressione di marker specifici (CD34, CD29, CD44, CD166, CD105, MHC I e MHC II) caratterizzanti le AMC's indifferenziate a P1 e P5, sia l'espressione di marker specifici espressi dalle cellule differenziate ottenute dopo specifica induzione.

L'RNA totale è stato estratto a P1 e P5 dalle AMC's indifferenziate usando TRIZOL® Reagent (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) seguito da un trattamento con DNasi accordandosi alle specifiche tecniche del produttore. La concentrazione e la purezza di RNA sono state misurate usando lo spettrofotometro NanoDrop (NanoDrop

ND1000). Il cDNA è stato sintetizzato dall'RNA totale usando il kit iScript retrotranscription kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). La PCR convenzionale è stata effettuata in un volume finale di 25 µl con DreamTaq DNA Polymerase (Fermentas GmbH, St. Leon Rot, Germany). I primer oligonucleotidici specifici per l'equino sono stati disegnati tramite il software PerlPrimer v.1.1.17, basandosi sulle sequenze disponibili presso l'NCBI per la specie *Equus caballus* o su sequenze consenso costruite mediante multi-allineamento di geni omologhi di interesse nei mammiferi. Le sequenze oligonucleotidiche sono state disegnate a cavallo tra esoni, con lo scopo di evitare l'amplificazione del DNA genomico.

Per gli esperimenti di differenziamento, l'RNA totale è stato estratto da cellule indifferenziate (cellule di controllo) e da cellule indotte ai differenziamenti. L'analisi della RT-PCR è stata effettuata come precedentemente descritto. Tessuti di equino adulto (osseo, adiposo, cartilagineo e midollo spinale) sono stati impiegati come controllo positivo per analizzare l'espressione dei marker osteogenici (osteocalcina [BGLAP] ed osteopontina [OPN]), adipogenici (peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$  [PPAR- $\gamma$ ] e adiponectina [ADIPQ]), condrogenici (collagene tipo 2 $\alpha$ 1 [COL2A1] ed aggrecano [ACAN]) e neurogenici (Nestina [NES] e Proteina Acida Glio Fibrillare [GFAP]).

I primer sono stati utilizzati ad una concentrazione finale pari a 200 nM. Il GAPDH è stato utilizzato come gene di riferimento.

### Immunocitochimica

Sono stati valutati gli antigeni Oct-4, TRA 1-60 e SSEA-4, a P3, in quanto marker di pluripotenza tipici delle cellule staminali embrionali (ESCs). Gli anticorpi sono stati scelti sulla base dei risultati ottenuti da Hoynowski *et al.* (2007). Gli anticorpi primari sono stati acquistati dalla ditta Abcam, (Cambridge, UK), mentre quelli secondari sono stati forniti da Invitrogen.

Per l'immunocitochimica le cellule sono state fissate in 3,7% paraformaldeide per 15 minuti e lavate tre volte in PBS. Per valutare la presenza dell'antigene Oct-4, le cellule sono state permeabilizzate in 0,4% Triton-X100 diluito in PBS per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo tre lavaggi con PBS, tutte le cellule sono state bloccate in PBS addizionato con il 2% di albumina sierica bovina (BSA) per 4 ore a 4°C, e sono state, quindi, incubate con gli anticorpi primari per 12 ore a 4°C. Successivamente, sono stati effettuati tre lavaggi e le cellule sono state incubate con gli anticorpi secondari coniugati con il fluoroforo AlexaFluor-488 (Invitrogen, diluizione 1:250) per 1 ora. Infine, per la colorazione nucleare, l'Hoechst 33342 (1 mg/ml) è stato diluito 1:100 in PBS e caricato sui campioni per 15 minuti. Tutte le analisi sono state basate su cellule di controllo incubate con isotipi

specifici IgGs per stabilire il segnale di background. Le immagini sono state visualizzate attraverso il microscopio Olympus BX 51.

### Istologia dell'allantoamnios

Opportuni campioni di allantoamnios sono stati fissati in 10% formalina a temperatura ambiente per 24 ore, inclusi in paraffina e tagliati con microtomo (Leica Instruments GmbH) per ottenere sezioni dello spessore di 5-7 µm. I vetrini sono stati colorati con Ematossilina/Eosina col metodo di Mallory.

### Crioconservazione

Le cellule sono state congelate a P0 in HG-DMEM con il 50% di FBS ed il 10% di DMSO per 6 mesi a -80°C. Dopo scongelamento alcune cellule sono state usate per lo studio del doubling time, mentre altre cellule sono state espanse fino a P3 per gli studi di immunocitochimica e per valutare l'espressione dei marker specifici di mesenchimalità e di differenziamento multilineare. I risultati sono stati confrontati con quelli delle cellule fresche.

### Casi clinici

In questo studio sono stati impiegati 3 cavalli ai quali è stata diagnosticata una lesione spontanea a livello delle strutture teno-legamentose degli arti. Nello specifico sono riportati i seguenti casi: il primo cavallo (caso 1) era affetto da una lesione traumatica acuta del tendine flessore superficiale del dito (SDFT) coinvolgente l'80% della sezione trasversale del tendine (Fig. 10, caso 1 A, B); nel secondo caso (caso 2) è stata individuata una lesione severa di 0,58 cm<sup>2</sup> nel medesimo tendine (Fig. 10, caso 2 A, B); il terzo caso era rappresentato da un cavallo con una lesione acuta del legamento accessorio del tendine flessore profondo (AL-DDFT) la cui area danneggiata è stata quantificata in 2,32 cm<sup>2</sup> (Fig. 10, caso 3 A, B).

### Impianto delle MSCs all'interno della struttura teno-legamentosa

Previo consenso informato dei proprietari, 1 milione di cellule mesenchimali allogene a P3 diluite in 100 µl di plasma autologo sono state inoculate per via intradermica in alcuni cavalli con anamnesi conosciuta, per valutare eventuali reazioni avverse. L'osservazione è durata 6 mesi.

In seguito, nelle lesioni dei tre casi clinici precedentemente descritti, sono state impiantate aliquote di 1 milione di AMC's allogene sempre a P3, diluite in 800 µl di plasma autologo.

La procedura prevedeva la tricotomia della regione in cui era presente la lesione, in modo da poter effettuare un'ecografia di controllo prima di procedere all'impianto. I soggetti sono stati sedati con Detomidina (0,01 mg/kg) e successivamente si è proceduto alla preparazione del campo chi-

urgico previa anestesia tronculare, o cerchiante, prossimale rispetto al sito di lesione impiegando una soluzione di Mepivacaina al 2%. La sonda dell'ecografo è stata inserita all'interno di una guaina sterile o all'interno di un guanto sterile e l'area veniva cosparsa di alcool a 90% per permettere la diffusione delle onde ultrasonore. Le iniezioni sono state eseguite sotto controllo ecografico. I tendini flessori superficiali delle falangi (SDFT) sono stati iniettati con tecnica longitudinale (preferita in questi casi dall'operatore) con un ago 20 gauge e 70 mm, in direzione prossimale-distale. Le lesioni a carico di tutte le altre strutture sono state eseguite con tecnica trasversale usando un ago 21 gauge e 40 mm, inserito lateralmente.

L'arto è stato poi fasciato con cotone garzato sterile e fasce elastiche (Vetrap®). Tale fasciatura è stata mantenuta per 48 h ed i cavalli sono stati confinati in box, prima di consentire 15 minuti di passo a mano per 15 giorni, aumentati a 30 minuti per un medesimo periodo. Non sono stati mai somministrati antibiotici o farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS).

## RISULTATI

### Raccolta delle membrane amniotiche ed isolamento di AMC's

Dalla porzione lavorata di ciascun amnios equino a termine sono state generalmente isolate circa

$25 \times 10^6$  di AMC's. La vitalità iniziale è stata pari al 75%. Tutte le cellule isolate sono state seminate e durante la coltura si sono selezionate cellule in base alla loro capacità di aderire alla piastra. Le AMC's hanno mostrato una morfologia fibroblast-like (Fig. 2A). Le colonie cellulari, osservate ai primi stadi di coltura, hanno avuto la capacità di formare cluster (Fig. 2B).

Dopo scongelamento (a P0), la vitalità delle cellule è stata dell'80% per le AMC's che hanno conservato la loro forma fibroblast-like.

### Analisi della proliferazione cellulare

#### Doubling Time

La capacità proliferativa delle AMC's è diminuita a partire dal P8 ( $p < 0,05$ ), ma è stata molto intensa tra P4 e P6. Il valore medio di DT è stato di  $1,17 \pm 0,15$  giorni (Fig. 3).

Dopo scongelamento il DT medio osservato è stato di  $1,88 \pm 0,51$  giorni.

#### Analisi delle unità formanti colonie fibroblastoidi

Nelle AMC's è stato osservato un incremento statisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) della frequenza di CFU-F all'aumentare della densità di semina (Tabella 1). Un esempio di colonia è rappresentato nella Fig. 4.

#### Differenziamenti in vitro

È stato valutato il potenziale multidifferenziativo delle AMC's (Fig. 5).

#### Differenziamento osteogenico

Dopo 10 giorni di induzione il differenziamento osteogenico delle AMC's è stato confermato dalla colorazione Von Kossa, che ha evidenziato i depositi di calcio. Le cellule, inoltre, hanno modificato la propria morfologia aumentando anche le proprie dimensioni. Il controllo è risultato, invece, negativo alla colorazione non mostrando matrice mineralizzata. L'analisi dell'espressione dei marker

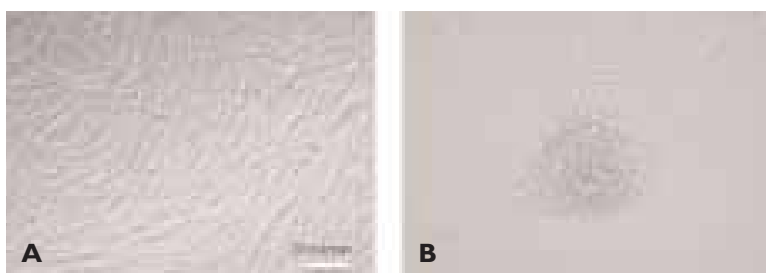


FIGURA 2 - (A) Monostrato di AMC's, 10X e (B) AMC's con un piccolo cluster, 20X. Scale bar 20 microns

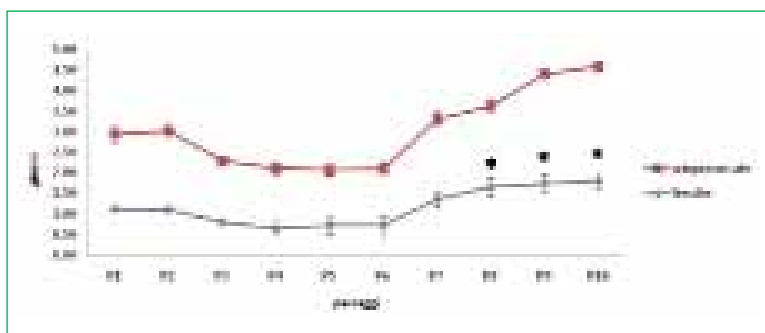


FIGURA 3 - DT a differenti passaggi durante la coltura cellulare delle AMC's. Legenda: asterischi all'interno del grafico indicano differenze statisticamente significative ( $P < 0,05$ ) rispetto a P1 per le cellule fresche.



FIGURA 4 - Colonia cellulare (CFU-F, 20x).

osteogenici *BGLAP* e *OPN* attraverso RT-PCR ha confermato l'induzione osteogenica.

**Differenziamento adipogenico**

Le AMC<sub>s</sub> hanno mostrato la capacità di differenziare nella linea adipogenica, come dimostrato dal risultato positivo della colorazione con Red Oil O effettuata dopo 3 settimane di coltura nel terreno adipogenico. Le cellule mantenute nel terreno standard non hanno mostrato depositi lipidici e, quindi, la colorazione è risultata negativa. L'analisi dell'espressione dei marker adipogenici *PPAR-γ* e *ADIPQ* attraverso RT-PCR ha confermato l'induzione adipogenica. Le cellule indotte al differenziamento hanno rivelato un'aumentata espressione di *PPAR-γ* e adiponectina rispetto al controllo. Il tessuto adiposo è stato usato come controllo positivo di espressione dei marker adipogenici.

**Differenziamento condrogenico**

Le AMC<sub>s</sub> hanno mostrato la capacità di differenziare nella linea condrogenica, come è risul-

TABELLA I CFU-F per le AMC <sub>s</sub> a P0		
Densità cell/cm <sup>2</sup>	CFU-F	I CFU-F ogni
100	1,33±0,58	712,50 <sup>a</sup>
250	20,33±2,52	116,80 <sup>b</sup>
500	59,67±4,93	79,61 <sup>c</sup>
1000	74,67±2,52	127,23 <sup>d</sup>

Legenda: lettere diverse all'interno della stessa colonna indicano differenze statisticamente significative per P<0,05.

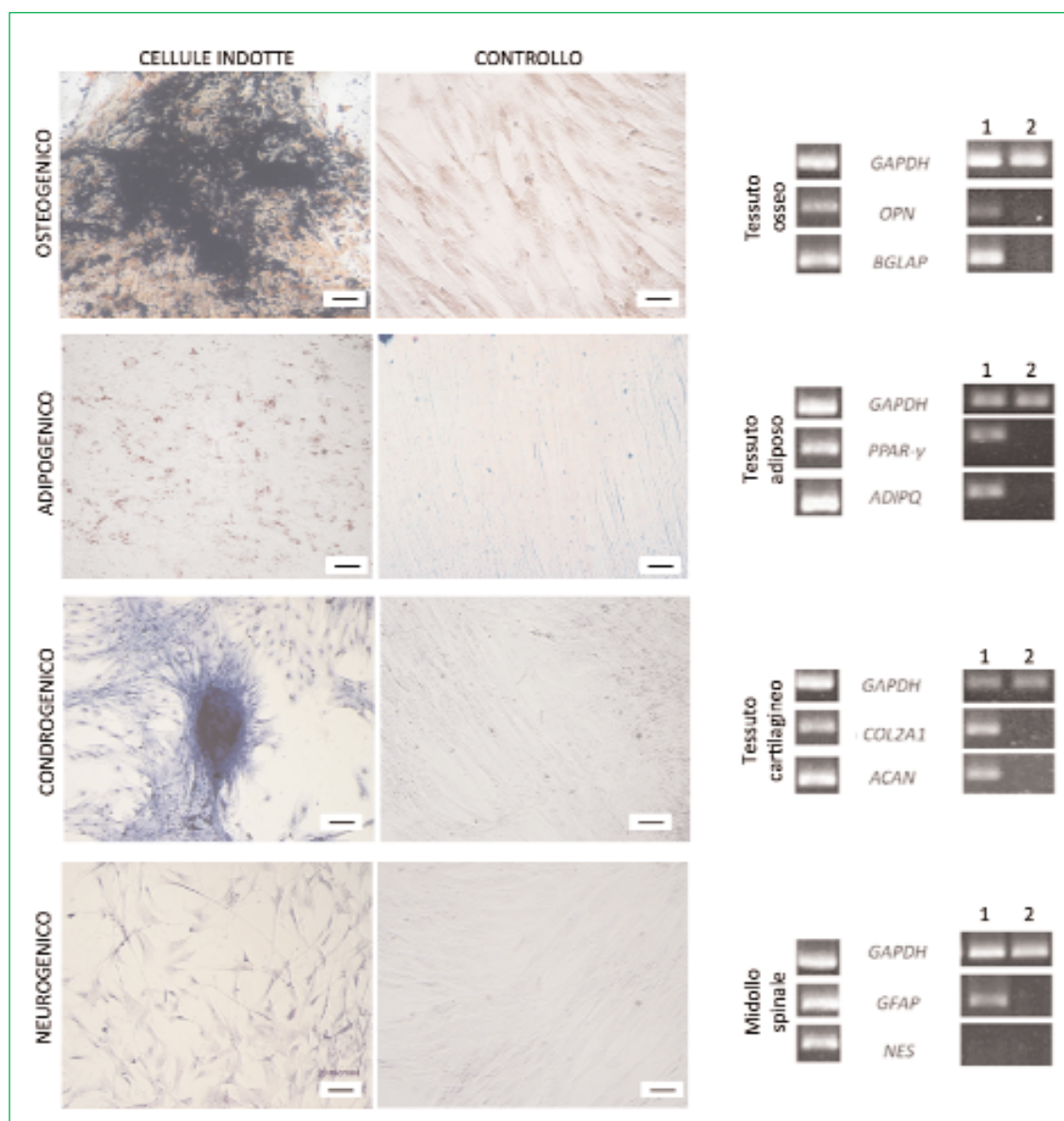


FIGURA 5 - Differenziamenti nelle linee mesodermiche ed ectodermica confermate da colorazioni morfologiche ed espressione genica dei geni specifici delle linee cellulari di induzione.

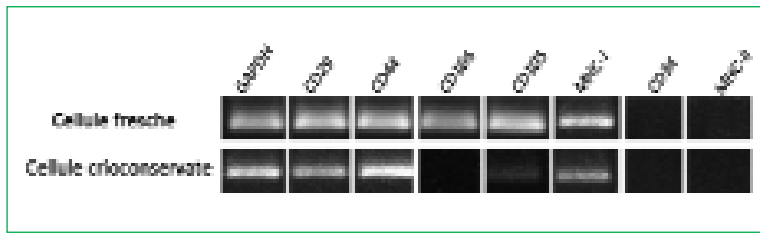


FIGURA 6 - Analisi con RT-PCR per l'espressione di specifici marker di mesenchimalità (*CD105*, *CD29*, *CD166*, *CD44* e *CD34*) e di immunogenicità (*MHC-I* e *MHC-II*) su AMCs prima e dopo criopreservazione. Il *GAPDH* è stato usato come gene di riferimento.



FIGURA 7 - Presenza degli antigeni associati alla pluripotenza (Oct-4, SSEA-4 e TRA-1-60) nelle cellule mesenchimali amniotiche equine. 20X. Scala: 20 micron.

tato dalla colorazione con Alcian Blue. Il controllo ha dato esito negativo alla colorazione, come atteso.

L'analisi dell'espressione dei marker condrogenici, *COL2A1* e *ACAN* attraverso RT-PCR ha confermato l'avvenuta induzione. Le cellule indotte al differenziamento hanno mostrato un'augmentata espressione di *COL2A1* e *ACAN* rispetto al controllo, che non ha mostrato l'espressione dei marker. Il tessuto cartilagineo è stato usato come controllo positivo di espressione dei marker condrogenici.

### Differenziamento neurogenico

Dopo 3 giorni di induzione, il differenziamento neurogenico è stato confermato non solo dalla morfologia assunta dalle cellule in piastra, ma anche dalla positività alla colorazione di Nissl. Le AMCs hanno mostrato la tipica morfologia dei neuroni con processi axon-like e dendrite-like e la presenza dei processi primitivi tipici, come quelli osservati nei neuroni. L'espressione del gene *GFAP* ha indicato, però, che in queste condizioni di coltura le cellule amniotiche probabilmente sono state indotte a differenziare in cellule gliali per la mancata espressione della *nestina (NES)*.

Il *GAPDH* è stato impiegato come gene riferimento. Le cellule scongelate sono state in grado di differenziarsi verso le stesse linee testate per le cellule fresche isolate (dati non mostrati).

### Analisi dei marker di espressione attraverso RT-PCR

L'analisi RT-PCR ha permesso di evidenziare, a differenti passaggi (a P1 e P5), la presenza degli RNA messaggeri di marker specifici per le MSCs

(*CD29*, *CD44*, *CD166*, *CD105*) e l'assenza del marker ematopoietico (*CD34*) (Fig. 6). Tuttavia, le cellule hanno cominciato ad esprimere quest'ultimo marker a P5 (dati non mostrati). Le AMCs hanno espresso l'antigene di immunoistocompatibilità I (*MHC-I*) sino a P5, mentre non si è manifestata espressione dell'antigene di immunoistocompatibilità II (*MHC-II*) a P1, che si è espresso al passaggio P5. Il *GAPDH* è stato usato come gene di riferimento. Nei campioni congelati è stata osservata una ridotta espressione del *CD105* rispetto alle cellule fresche e l'assenza di espressione del *CD166* (Fig. 6).

### Immunocitochimica

È stata indagata l'espressione dei marker di pluripotenza: Oct-4, SSEA-4 e TRA 1-60. Le AMCs hanno rivelato gli antigeni studiati, come mostrato nella Fig. 7.

Oct-4 è espresso nel citoplasma e nel nucleo mentre SSEA-4 e TRA 1-60 sono espressi sulla superficie cellulare come riportato in Fig. 7. L'espressione di TRA 1-60 è risultata molto debole. La presenza combinata degli antigeni Oct-4, SSEA-4 e TRA 1-60 attribuisce alle cellule amniotiche un fenotipo primitivo.

Gli stessi risultati sono stati ottenuti dopo scongelamento (dati non mostrati).

### Istologia dell'allantoamnios

L'amnios e l'allantoide delle membrane fetali a termine sono caratterizzati ciascuno da uno strato epiteliale e da uno strato mesenchimale (Fig. 8). L'amnios è un unico tessuto privo di vasi sanguigni, costituito da cellule epiteliali cuboidali nello strato epiteliale (Fig. 9A) e da cellule stromali nello strato mesenchimale (Fig. 9B). Le cellule amniotiche epiteliali, sul versante esterno dell'amnios, sono a diretto contatto con il liquido amniotico.

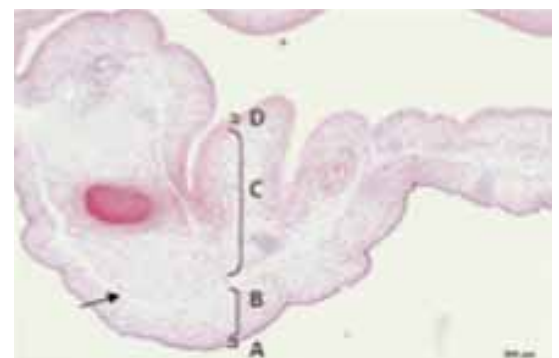


FIGURA 8 - Morfologia delle membrane fetali equine a termine (colorazione con ematossilina-eosina). (A) foglietto amniotico epiteliale; (B) foglietto amniotico mesenchimale; (C) foglietto allantoideo mesenchimale; (D) foglietto allantoideo epiteliale. La regione di contatto tra amnios e allantoide è mostrata dalla freccia. Si può osservare la presenza di un vaso sanguigno nella parte allantoidea della membrana.



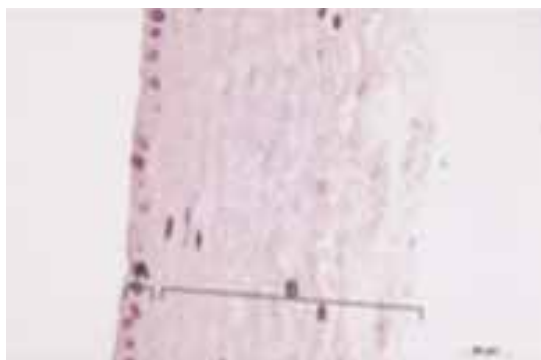


FIGURA 9 - Sezione istologica della membrana amniotica con la regione epiteliale (A) e mesenchimale (B).

### Impianto delle MSCs nella struttura teno-legamentosa

A seguito delle iniezioni intradermiche, effettuate per valutare eventuali reazioni avverse, non si sono verificate alterazioni, quindi, dopo questa fase si è proceduto agli impianti intralesionali.

I soggetti hanno ben tollerato gli impianti intralesionali di cellule mesenchimali allogene isolate da amnios equino. Non si sono verificate reazioni algiche o infiammatorie. Si è verificata, inoltre, già

dai primi giorni, una sostanziale riduzione di volume, una diminuita algia alla palpazione del tratto interessato ed una significativa riduzione del grado di zoppia. Ad un primo controllo ecografico a 15 giorni si è evidenziata, in tutti i casi, una precoce riduzione dell'area totale di sezione (T-CSA). Specificatamente, nel caso 1 l'area anecoica rappresentativa della lesione è migliorata marcatamente. L'aspetto ecogenico e l'architettura tissutale nella sezione longitudinale dell'ecografia rivelano un chiaro processo di evoluzione dopo un periodo di 70 giorni (Fig. 10, caso 1 C, D).

Nel secondo caso la lesione anecoica che misura  $0,58 \text{ cm}^2$  si è ridotta in un'area ipoecoica di  $0,18 \text{ cm}^2$  unitamente ad un aspetto soddisfacente dell'architettura delle fibre in scansione longitudinale dopo i primi 60 giorni (Fig. 10, caso 2 C, D). Nel terzo caso un'acuta e severa lesione di  $2,32 \text{ cm}^2$  del legamento accessorio del tendine flessore profondo delle falangi (AL-DDFT) presentava un aspetto ecografico strutturato ed organizzato a circa 60 giorni (Fig. 10, caso 3 C, D).

Inoltre, un follow up è stato condotto, dopo la ripresa dell'attività agonistica, in tutti i casi fino a 12 mesi dopo il trattamento e non sono state osservate recidive.

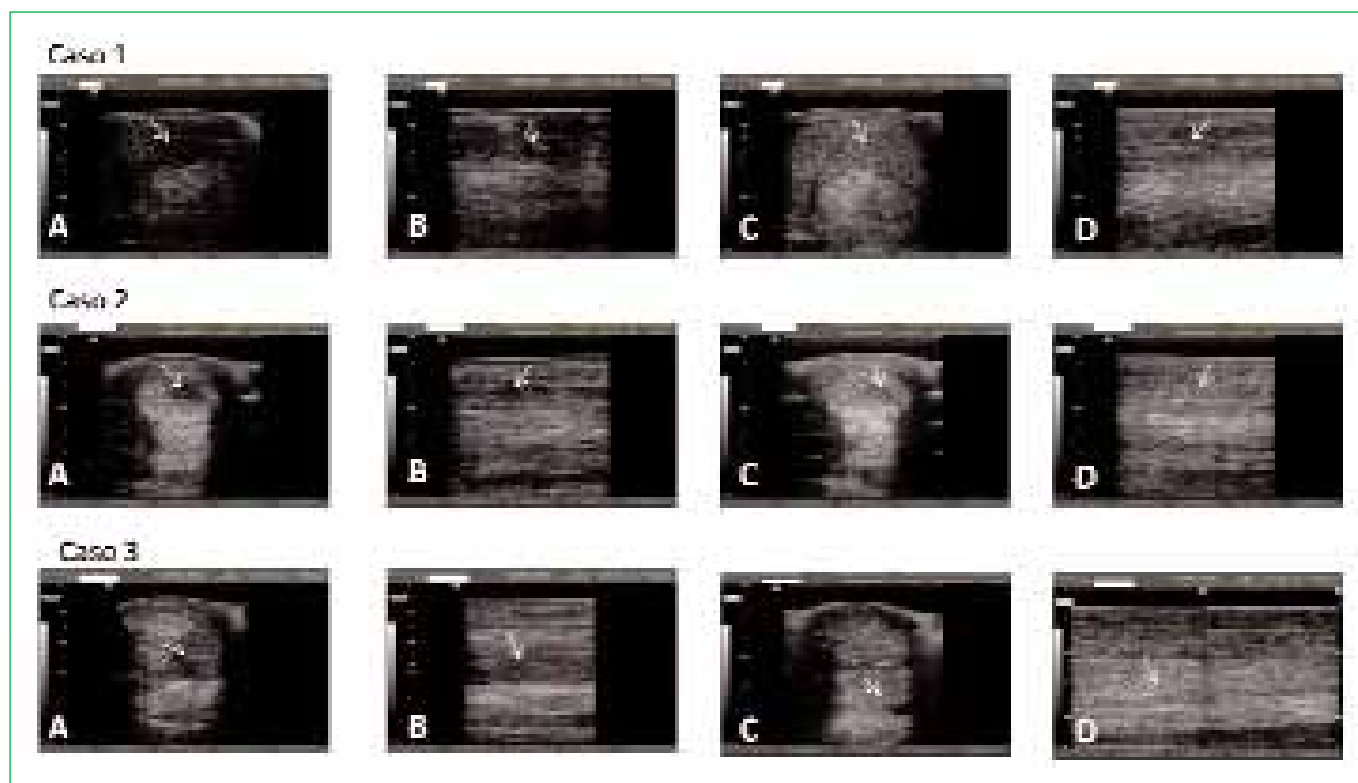


FIGURA 10 - Tre casi di lesioni tendinee prima e dopo trapianto di cellule mesenchimali allogene di derivazione amniotica. Caso 1: lesione traumatica acuta del tendine flessore superficiale del dito (SDFT). Le frecce mostrano un'ampia area anecogena nell'ecografia in sezione trasversale (A) e longitudinale (B). Le frecce in C e D mostrano un'omogenea area ecogenica rispettivamente nell'immagine ecografica trasversale e longitudinale nella stessa lesione dopo 50 giorni dall'impianto. Caso 2: lesione severa del SDFT. Le frecce indicano un'area anecoica nell'ecografia in sezione trasversale (A) e longitudinale (B), ed una leggera area ipoecoica rispettivamente nella sezione trasversale (C) e longitudinale (D) della stessa lesione dopo 50 giorni dall'impianto. Case 3: Lesione acuta del legamento accessorio del tendine flessore profondo (AL-DDFT). Le frecce mostrano un'area ipoecoica nell'ecografia in sezione trasversale (A) e longitudinale (B) e un'area ecogenica in sezione trasversale (C) e longitudinale (D) rilevabile dopo 50 giorni dall'impianto.

## DISCUSSIONE

Terapie basate sul trapianto cellulare sono emerse come un nuovo potenziale approccio negli ultimi anni in svariati settori della medicina rigenerativa.

Le MSCs possono essere isolate da molteplici tessuti e possiedono proprietà differenti, in base alla fonte di origine ed al loro grado di differenziamento. Le MSCs ottenute dal BM sono le più studiate e conosciute, come dimostrano i lavori scientifici dell'ultimo decennio (Digirolamo et al., 1999; Gronthos et al., 2003; Vidal et al., 2011). Per tale motivo, esse sono anche le più utilizzate per la terapia rigenerativa tissutale ed, in particolare, in medicina veterinaria, per trattare le patologie dell'apparato muscolo-scheletrico e del sistema ematopoietico.

Le problematiche relative al prelievo ed alle caratteristiche delle cellule mesenchimali isolate da BM hanno portato, però, alla necessità di individuare nuove fonti di cellule staminali.

La recente scoperta in campo umano dell'esistenza di MSCs in annessi fetali, di facile accesso e privi di controversie etico-morali, rende queste cellule interessanti agli occhi dell'intera comunità scientifica e questo vale soprattutto per il fatto che questa popolazione cellulare si colloca in una posizione ontogenetica intermedia tra le ESCs e le cellule staminali adulte (Bajada et al., 2008; Siegel et al., 2007). Infatti, le cellule isolate da queste fonti, in campo umano, sono caratterizzate da proliferazione più rapida, una maggiore espansione *in vitro*, dall'espressione dell'enzima telomerasi (Mitchell et al., 2003) e da un notevole potenziale differenziativo, rispecchiando, quindi, i criteri di staminalità definiti dal Comitato delle cellule staminali.

È con questi obiettivi che è stato affrontato questo studio, nel quale, per la prima volta nella specie equina, la membrana amniotica a termine, che solitamente è scartata ed è di facile raccolta, è stata da noi considerata come una fonte alternativa di cellule con proprietà staminali in campo medico-veterinario. In medicina veterinaria, la membrana amniotica è usata in terapia clinica per la ricostruzione della superficie oculare come membrana *in toto*, ma a parte quest'uso non sono mai state ottenute cellule amniotiche dall'amnios equino per possibile uso terapeutico. In seguito a digestione enzimatica del tessuto amniotico, sono state isolate cellule amniotiche equine di natura mesenchimale che sono state espanse in coltura per 10 passaggi, sono state caratterizzate, differenziate e, dopo inoculo nei siti di lesione, valutate per la loro potenzialità rigenerativa. Essendo questa una prima indagine conoscitiva su quest'invoglio fetale, è stato effettuato uno studio dettagliato relativo alla morfologia di questa membrana ed alla caratterizzazione delle sue cellule.

Dallo studio istologico è emerso che la membrana amniotica equina è composta da uno strato epiteliale e da uno stroma avascolare nel quale è presente una rete di cellule mesenchimali fibroblastoidi. Nelle nostre condizioni, dopo digestione, la vitalità iniziale delle cellule isolate è stata più alta del 75%, che è considerata un ottimo valore della qualità a lungo termine di queste cellule sia in vista dell'efficienza di semina sia per la crescita cellulare. Durante le fasi di coltura, le cellule che sono rimaste adese alle piastre sono state espanse fino al passaggio P10 ed i nostri risultati hanno dimostrato la presenza di un gruppo di cellule capaci di aderire tenacemente al substrato colturale e di proliferare intensamente *in vitro*.

Le cellule amniotiche equine, in generale, hanno dimostrato un'alta capacità proliferativa fino al 6°-8° passaggio. Dopo questo periodo, la proliferazione è diminuita, anche se il DT si è attestato, comunque, a valori non superiori alle 48 ore. Comunque, una robusta proliferazione fino al passaggio P6 è stata riportata anche da altri autori per le cellule amniotiche umane (Soncini et al., 2007; Miki et al., 2010).

Le AMC mantenenute in coltura in alta densità hanno sviluppato strutture sferoidali senza mostrare inibizione da contatto. Queste strutture sferoidali si sono sviluppate tridimensionalmente al di sopra del monostrato e sono state descritte nella coltura delle ESCs (Miki e Strom, 2006) ed individuate anche da Carlin et al., (2006) nella coltura delle cellule della matrice del cordone di suino. Miki et al. (2005) hanno suggerito che il monostrato di cellule amniotiche, adese alla piastra di coltura, potrebbe giocare il ruolo di monostrato cellulare di sostegno autologo servendo come substrato per l'adesione del cluster o per fornire fattori che potrebbero indurre o mantenere indifferenziate le cellule amniotiche che costituiscono le strutture sferoidali.

Le cellule amniotiche *in vitro* hanno mostrato anche l'abilità di formare cloni, popolazioni omogenee di cellule generate da un unico capostipite. Questa caratteristica, definita *clonogenicità*, è un attributo essenziale delle cellule staminali le quali, contrariamente a quanto avviene con cellule differenziate, sono in grado di ripristinare in tempi brevi una popolazione di cellule uguali tra loro anche quando seminate a diluizioni estremamente elevate. La frequenza di formazione delle CFU-F è aumentata con l'incrementare della densità di semina indicando l'esistenza di qualche segnale paracrino, fra le cellule amniotiche, che avrebbe potenziato la formazione delle CFU-F nella coltura primaria a P0 (Sarugaser et al., 2005).

Le cellule amniotiche equine hanno rivelato il caratteristico modello di espressione degli antigeni delle MSCs espanse in coltura. L'analisi è stata eseguita mediante RT-PCR basata su un pannello di primer oligonucleotidici specificatamente di-

segnati sulla sequenza genica di questa specie. Il pannello di marker realizzato rappresenta un utile strumento nella ricerca delle cellule staminali equine, poiché molti anticorpi, marker di staminalità descritti nelle altre specie, mostrano poca o nulla reattività nella specie equina, rendendo così difficoltoso il loro utilizzo in questo campo.

Queste cellule hanno manifestato positività ai più comuni marker che definiscono le MSCs: *CD29*, *CD44*, *CD105*, *CD166* e *MHC-I* ma non *MHC-II*. La natura non ematopoietica delle cellule staminali è stata suggerita dalla mancata espressione del marker *CD34* che ha iniziato ad esprimersi a P5. Quest'ultimo dato potrebbe essere un'evidenza che le cellule amniotiche hanno un potenziale angiogenico così come è stato riportato in medicina umana da Alviano *et al.* (2007). A P5 anche il marker *MHC-II* ha iniziato ad essere espresso mentre il marker *CD105* non era più espresso. La scarsa stabilità dei marker di superficie potrebbe indicare fenomeni epigenetici associati con la coltura cellulare che potrebbero influenzare le presunte cellule staminali amniotiche. Ulteriori caratterizzazioni di queste cellule saranno necessarie per comprendere meglio questi cambiamenti.

È importante sottolineare come l'assenza di espressione del marker *MHC-II*, almeno fino al quinto passaggio, renda queste cellule ipo-immunogene e, quindi, possibilmente utilizzabili nei passaggi precoci per terapie cellulari di tipo allogenico.

In aggiunta ai caratteristici marker di superficie, le cellule amniotiche hanno mostrato immunopositività a Oct-4, TRA-1-60 e SSEA-4. Questi marker sono tipici delle ESCs, ma rilevati anche in altre popolazioni cellulari derivanti da annessi fetali quali il cordone ombelicale (Carlin *et al.*, 2006; Hoynowsky *et al.*, 2007), la membrana amniotica ed il liquido amniotico umani (Miki *et al.*, 2005; Portmann-Lanz *et al.*, 2006; De Coppi *et al.*, 2007; Ilancheran *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Wolbank *et al.*, 2007). È stato ipotizzato che la presenza di popolazioni cellulari con tali caratteristiche possa essere messa in relazione ad uno stato di "primitività" del tessuto stesso e ad uno stadio cellulare privo di differenziamento, ma caratterizzato da pluripotenza (Miki *et al.*, 2005; Portmann-Lanz *et al.*, 2006; De Coppi *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Ilancheran *et al.*, 2007; Wolbank *et al.*, 2007). Le nostre positività potrebbero ricalcare queste ipotesi. Lo studio del differenziamento *in vitro* suggerisce che queste cellule hanno fenotipo pluripotente, come supportato dalle differenziazioni nelle linee mesodermica ed ectodermica. In particolare, da questo lavoro emerge la capacità di queste cellule amniotiche di differenziarsi nelle linee osteogenica, adipogenica e condrogenica, come riportato da In't Anker *et al.* (2004) per l'amnios umano, ma anche in cellule della linea gliale come mostrato da Miki *et al.* (2005) sempre in campo umano, dove il 95% delle cellule stromali amniotiche ha espresso

immunolocalizzazione di *GFAP*. Osservando i dati relativi al potenziale proliferativo e differenziativo delle cellule amniotiche mesenchimali, si può pensare che questa membrana possa offrire vantaggi come una straordinaria fonte di presunte cellule staminali disponibili per i futuri sforzi nell'ambito della terapia cellulare. È per queste caratteristiche che ci è sembrato di notevole interesse un primo studio di queste cellule *in vivo*, per capirne gli eventuali meccanismi riparativi. Gli effetti benefici di queste cellule in questo test iniziale sottolineano il loro potenziale applicativo nella medicina rigenerativa veterinaria.

Attraverso studi di trapianto cellulare *in vivo*, abbiamo osservato che il trapianto allologo di cellule mesenchimali derivanti da amnios è ben tollerato dal cavallo e che tutti i dati clinici (riduzione dello spessore nelle dimensioni del tendine; sensibilità alla palpazione, misure delle aree delle sezioni trasversali nell'ecografia) forniscono completa evidenza nel supportare l'azione benefica delle cellule iniettate. L'evoluzione ecografica riportata per l'architettura di tendini e legamenti è simile a quella che è stata precedentemente riportata dopo applicazione di altre colture cellulari multipotenti mesenchimali ed autologhe (Richardson *et al.*, 2007). La possibilità di inoculo terapeutico immediato nelle lesioni di cellule che sono prontamente disponibili prima che ogni cambiamento ultrastrutturale avvenga, e l'effetto plastico dimostrato da queste cellule, rappresentano i maggiori aspetti di interesse di questo nuovo approccio biotecnologico nel campo delle tendinopatie nei cavalli. Ovviamente, questo studio non è stato un trial pre-clinico, ma un'analisi di scoperte preliminari ottenute con le cellule di derivazione amniotica nella specie equina. Inoltre, un punto debole di questo studio è la mancanza di un gruppo di controllo e di una valutazione istologica, quindi, ulteriori studi applicati ad un maggior numero di animali saranno necessari per confermare questi risultati.

Infine, abbiamo dimostrato che le cellule amniotiche equine possono essere congelate, conservate e recuperate senza la perdita della loro integrità funzionale in termini di morfologia, presenza di specifici marker e potenziale differenziativo, sebbene la capacità proliferativa sia stata più bassa di quella osservata nelle cellule fresche. Da questo punto di vista i protocolli di crioconservazione dovrebbero essere migliorati al fine di permettere la creazione di un servizio di banca cellulare.

## CONCLUSIONI

Questo studio è il primo a documentare le caratteristiche di presunte cellule staminali isolate dalla membrana amniotica equina ed il loro uso *in vivo*. Questi risultati ci conducono a sviluppare pro-

tocolli d'isolamento che possano essere utili in futuro per ottimizzare la raccolta e l'espansione di queste cellule ai fini del loro utilizzo e ad ipotizzare la costituzione di riserve crio-preservate utilizzabili in medicina rigenerativa.

## RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la prof. Silvana Arrighi, Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute Animale e la Sicurezza Alimentare, per le sezioni istologiche dell'amnios e la Clinica Veterinaria Equicenter, Monteleone (PV) per l'assistenza nel prelievo delle membrane amniotiche.

### Parole chiave

*Amnios equino, MSCs, tendinopatie, medicina rigenerativa.*

## ■ Amniotic mesenchymal-derived cells for the treatment of tendinopathy in the horse: first report

### Summary

Regenerative medicine is an emerging and multidisciplinary field which draws on biology, medicine and genetic manipulation for the development of strategies aimed at maintaining, enhancing or restoring the function of tissues or organs that have been compromised by disease or injury. Because of their ability to differentiate into different cell lines, stem cells undoubtedly play a key role in developing such strategies. The embryonic cells are totipotent, but their isolation involves the destruction of the embryo and the application is limited from their oncogenic potential. Adult stem

cells (i.e. from bone marrow, BM) have a limited potential compared to embryonic stem cells in terms of both *in vitro* proliferation ability and differentiation capacity, and do not appear to noticeably improve long-term functionality.

Stem/progenitor cells derived from extra-fetal sources may represent attractive alternative candidates with the potential to circumvent many of these limitations, opening new perspectives for developmental biology and regenerative medicine.

The aims of this work were to provide, for the first time, an isolation protocol for horse amnion-derived cells, to investigate the biological properties of these cells and to assess whether horse amnion-derived cells can be tolerated and exert beneficial effects *in vivo* when allogeneically transplanted into horses with tendon injuries.

Our results have shown that these cells have high prolificacy and plasticity, differentiating *in vitro* toward mesodermic and ectodermic lineages, and own ability to be frozen without loss of their characteristics. Through cell transplantation studies *in vivo*, we found that the transplanted equine amnion-derived cells were well-tolerated by horses, and all of the clinical findings reported provided compelling evidence to support the exertion of beneficial effects by the injected cells. The possibility of administering an immediate intralesional treatment which is available before any ultrastructural change is observed within the injured tendon, together with the plasticity effect of amniotic MSCs, represent the major features of interest for this novel biotechnological approach to equine tendinopathies.

### Key words

*Amnion, equine, MSCs, tendinopathies, regenerative medicine.*

## BIBLIOGRAFIA

- Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, Lanzoni G, Cantoni S, Cavallini C, Tazzari P L., Pasquinelli G, Foroni L, Ventura C, Grossi A, Bagnara GP (2007) Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells *in vitro*. *BMC Dev. Biol.* 7, 11.
- Arcelli R, Tibaldini P, Angeli G, Bellezza E (2009) Equine amniotic membrane transplantation in some ocular surface diseases in the dog and cat: a preliminary study. *Vet. Res. Commun.* 33 Suppl. 1, 169-171.
- Avila M, Espana M, Moreno C, Peña C. (2001) Reconstruction of ocular surface with heterologous limbal epithelium and amniotic membrane in a rabbit model. *Cornea* 20, 414-420.
- Bailo M, Soncini M, Vertua E, Signoroni P, Bonassi, Sanzone S, Lombardi G, Arienti D, Calamani F, Zatti D, Paul P, Albertini A, Zorzi F, Cavagnini A, Candotti F, Wengler GS, Parolini O (2004) Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta. *Transplantation* 78, 1439-1448.
- Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. (2008) Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J. Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2, 169-183.
- Berg L, Koch T, Heerkens T, Besonov K, Thomsen PD, Betts DH (2009) Chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells derived from equine bone marrow and umbilical cord blood. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* 22, 363-370.
- Caplan (2007) Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of Cellular Physiology* 213, 341-347.
- Caplan AI, Dennis JE (2006) Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell. Biochem.* 98, 1076-1084.
- Carlin R, Davis D, Weiss M, Schultz B, Troyer D (2006) Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4, 8.
- Cremonesi F, Violini S, Lange Consiglio A, Ramelli P, Ranzenigo G, Mariani P (2008) Isolation, *in vitro* culture and characterization of foal umbilical cord stem cells at birth. *Vet. Res. Commun.* 32, 139-142.
- Crovace A, Lacitignola L, De Siena R, Rossi G, Francioso E (2007) Cell therapy for tendon repair in horses: an experimental study. *Vet. Res. Commun.* 31, 281-283.
- Crovace A, Lacitignola L, Rossi G, Francioso E (2010) Histological and immunohistochemical evaluation of autologous cultured bone marrow mesenchymal stem cells and bone marrow mononucleated cells in

- collagenase-induced tendinitis of equine superficial digital flexor tendon. *Veterinary Medicine International*, Epub 22 marzo, Articolo ID 250978.
- De Coppi P, Bartsch G, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S, Atala A (2007) Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat. Biotechnol.* 25, 100-106.
- Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ (1999) Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br. J. Haematol.* 107, 275-281.
- Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS (2004) The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol.* 49, 51-77.
- Durando MM, Zarucco L, Schaer TP, Ross M, Reef VB (2006) Pneumopericardium in a horse secondary to sternal bone marrow aspiration. *Equine Vet. Educ.* 18, 75-79.
- Dyson SJ (2004) Medical management of superficial digital flexor tendinitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000). *Equine Vet. J.* 36, 415-419.
- Evangelista M, Soncini M, Parolini O (2008) Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy? *Cytotechnology* 58, 33-42.
- Foland JW, Trotter GW, Powers BE (1992). Effect of sodium hyaluronate in collagenase-induced superficial digital flexor tendinitis in horses. *Am. J. Vet. Res.* 53, 2371-2376.
- Fortier LA, Smith RK (2008) Regenerative medicine for tendinous and ligamentous injuries of sport horses. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 24, 191-201.
- Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ (2003) Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J. Cell. Sci.* 116, :1827-1835.
- Guest DJ (2008) Defining the expression of marker genes in equine mesenchymal stromal cells. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications* 1, 1-9.
- Guest DJ, Smith MR, Allen WR (2010) Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon. *Equine Vet. J.* 42, 636-642.
- Guillot PV, Gotherstrom C, Chan J, Kurata H, Fisk NM (2007) Human first-trimester fetal MSC express pluripotency marker and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. *Stem Cells* 25, 646-654.
- Hoynowski SM, Fry MM, Gardner BM, Leming MT, Tucker JR, Black L, Sand T, Mitchell KE. (2007) Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 347-353.
- Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, Pera M, Manuelpillai U (2007) Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol. Reprod.* 77, 577-588.
- Im G I, Shin Y W, Lee K B (2005) Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthr. Cart.* 13, 845-853.
- In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, De Groot Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, Kanhai HH (2004) Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cell* 22, 1338-1345.
- Kapetanios G (1982) The effect of the local corticosteroids on the healing and biomechanical properties of the partially injured tendon. *Clin. Orthop.* 163, 170-179.
- Kim J, Lee Y, Kim H, Hwang KJ, Kwon HC, Kim SK, Cho DJ, Kang SG, You J (2007) Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell. Prolif.* 40, 75-90.
- Kisiday JD, Kopesky PV, Evans CH, Grodzinsky AJ, McIlwraith CW, Frisbie DD (2008) Evaluation of adult equine bone marrow- and adipose-derived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures. *J. Orthop. Res.* 26, 322-331.
- Koch GT, Berg CL, Betts DH (2008) Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine. *Can. Vet. J.* 49, 1009-1017
- Koerner J, Nestic D, Romero JD, Brehm W, Mainil-Varlet P, Grogan SP (2006) Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 1613-1619.
- Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M (2001) Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 1539-1546.
- Lacitignola L, Crovace A, Rossi G, Francioso E (2008) Cell therapy for tendinitis, experimental and clinical report. *Vet. Res. Commun.* 32 (Suppl 1), S33-S38.
- Lam K, Parkin T, Riggs C, Morgan K (2007) Content analysis of free-text clinical records: their use in identifying syndromes and analyzing health data. *Vet. Rec.* 161, 547-551.
- Magatti M, De Munari S, Vertua E, Gibelli L, Wengler GS, Parolini O (2008); Human amnion mesenchyme harbors cells with allogeneic T-cell suppression and stimulation capabilities. *Stem Cells* 26, 182-192.
- Marr C, Love S, Boyd J, McKellar Q (1993) Factors affecting the clinical outcome of injuries to the superficial digital flexor tendon in National Hunt and point-to-point racehorses. *Vet. Rec.* 132, 476-479.
- Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz D B, Strom SC (2005) Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cell* 23, 1549-1559.
- Miki T, Marongiu F, Dorko K, Ellis EC, Strom SC (2010) Isolation of amniotic epithelial stem cells. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* Chapter 1: Unit 1E 3.
- Miki T, Strom SC (2006) Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. *Stem Cell Rev.* 2, 133-142.
- Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, Helwig B, Hildreth T, Troyer D (2003) Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cell* 21, 50-60.
- Murphy AJ, Fink DJ, Hunziker EB (2003) Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthr. Rheum.* 48, 3464-3474.
- Muschler G F, Nakamoto C, Griffith L G (2004) Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J. Bone Joint Surg. Am.* 86-A, 1541-1558.
- Ollivier FJ, Kallberg ME, Plummer CE, Barrie KP, O'Reilly SO, Taylor DP, Gellatt KN, Brooks DE. (2006) Amniotic membrane transplantation for corneal surface reconstruction after excision of corneolimbus squamous cell carcinomas in nine horses. *Vet. Ophthalmol* 9, 404-413.
- 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.
- Paris DB, Stout TA. (2010) Equine embryos and embryonic stem cells: defining reliable marker of pluripotency. *Theriogenology* 74, 516-524.
- Passeri S, Nocchi F, Lamanna R, Lapi S, Miragliotta V, Giannessi E, Abramo F, Stornelli MR, Matarazzo M, Plenteda D, Urcioli P, Scatena F, Coli A (2009) Isolation and expansion of equine umbilical cord-derived matrix cells (EUCMCs). *Cell Biol. Int.* 33, 100-105.
- Plummer CE (2009) The use of amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction: a review and series of 58 equine clinical cases (2002-2008). *Veterinary Ophthalmology* 12, 17-24.
- Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A (2006) Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 194, 664-673.
- Reed SA, Johnson SE (2008) Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types. *J. Cell Physiol.* 215, 329-336.
- Richardson LE, Dudhia J, Clegg PD, Smith R (2007) Stem cells in veterinary medicine—attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends Biotechnol.* 25, 409-416.
- Sankar V, Muthusamy R (2003) Role of human amniotic epithelial cell transplantation in spinal cord injury repair research. *Neuroscience* 118, 11-17.
- Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE (2005) Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* 23, 220-229.
- Shi S, Gronthos S (2003) Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J. Bone Miner. Res.* 18, 696-704.
- Siegel N, Rosner M, Hanneder M, Valli A, Hengstschlager M (2007) Stem cells in amniotic fluid as a new tools to study human genetic diseases. *Stem Cell Review* 3, 256-264.
- Simmons PJ, Torok-Storb B (1991) Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 78, 55-62.
- Smith RK, Korda M, Blunn GW, Goodship AE (2003) Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone mar-

row into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Eq. Vet. J.* 35, 99-102.

Smith RK, Korda M, Blunn GW, Goodship AE (2003) Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Eq. Vet. J.* 35, 99-102.

Solomon A, Wajngarten M, Alviano F, Anteby I, Elchalal U, Pe'er J, Levi-Schaffer F (2005) Suppression of inflammatory and fibrotic responses in allergic inflammation by the amniotic membrane stromal matrix. *Clin. Exp. Allergy* 35, 941-948.

Soncini M, Vertua E, Gibelli L, Zorzi F, Denegri M, Alberini A, Wengler GS, Parolini O (2007) Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *J. Tiss. Eng. Regen. Med.* 1, 296-305.

Vidal MA, Kilroy GE, Johnson JR, Lopez MJ, Moore RM, Gimble JM (2006) Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity. *Vet. Surg.* 35: 601-610.

Vidal MA, Walker NJ, Napoli E, Borjesson DL. (2011) Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone mar-

row, adipose tissue, and umbilical cord tissue stem cells development. *Stem Cells and Development* doi:10.1089/scd.2010.0589.

Wilke MM, Nydam DV, Nixon AJ (2007) Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *J. Orthop. Res.* 25, 913-925.

Winter A, Breit S, Parsch D (2003) Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthr. Rheum.* 48, 418-429.

Wolbank S, Peterbauer A, Fahrner M (2007) Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tiss. Eng.* 13, 1173-1183.

Woo SL-Y, Hilebrand K, Watanabe N, Fenwick JA, Papageorgiou CD, Wang JH-C (1999) Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 367 Suppl., S312-S323.

Yuge I, Takumi Y, Koyabu K, Hashimoto S, Takashima S, Fukuyama T, Nikaido T, Usami S (2004) Transplanted human amniotic epithelial cells express connexin 26 and Na-K-adenosine triphosphatase in the inner ear. *Transplantation* 77, 1452-1454.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE - FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE NEUROLOGICHE E PSICHIATRICHE  
CATTEDRA DI NEUROPSICHIATRIA INFANTILE  
in collaborazione con ASSOCIAZIONE "LAPO" ONLUS



Anni Accademici 2011/2012-2012/2013 – VI EDIZIONE

## MASTER UNIVERSITARIO DI 1° LIVELLO IN RIABILITAZIONE EQUESTRE

Formazione del profilo professionale di "COORDINATORE TECNICO DI RIABILITAZIONE EQUESTRE"

**COORDINATORE:** Prof.ssa Anna Pasquinelli, Prof. Associato Cattedra Neuropsichiatria Infantile (NPI)

**OBIETTIVI:** Fornire la preparazione culturale ed applicativa neurologica, psichiatrica, neuropsicologica, riabilitativa e dell'equitazione necessaria per lo svolgimento della Riabilitazione Equestre (RE) e le competenze teorico-pratiche per l'integrazione multidisciplinare del lavoro in Équipe. Formazione delle competenze della figura professionale del "Coordinatore Tecnico di Riabilitazione Equestre": impianto, organizzazione, gestione operativa di Centri di RE, direzione, conduzione, verifica dell'attività di RE

**DOCENTI:** Docenti Cattedre NPI, Neurologia, Psichiatria, Audiologia, Oculistica; Fisioterapisti, Logopedisti, Tiflogisti, Terapisti di Centri di RE; Istruttori di Equitazione di II, III Livello, I.F. Volteggio, Giudici F.I.S.E.; Veterinari

**STRUTTURE PER STAGE E TIROCINI:**

Centri di RE accreditati; Centri Ippici F.I.S.E.

**MODALITÀ DIDATTICHE:** durata biennale per complessive 590 ore; inizio Febbraio 2012

• **Didattica accademica e attività teorico/pratica 440 ore:** 8 settimane full immersion in sede - Firenze - e 3 fuori sede:

1) Stage Teorico/Pratico di Volteggio e Volteggio per Disabili a Mantova

2) Stage Teorico/Pratico di approfondimento RE e Sport per Disabili a Nus (AO)

3) Stage di Equitazione e di Equitazione per Disabili a Cernusco sul Naviglio (MI)

• **Tirocinio di Riabilitazione Equestre 150 ore:** Aprile 2012 / Ottobre 2013

**TITOLI PER L'AMMISSIONE**

• Laurea vecchio ordinamento, 1° Livello, Specialistica; Diplomi Professioni Sanitarie, Assistente Sociale, ISEF, Accademia Belle Arti, Conservatorio

• Equitazione: Patenti F.I.S.E. "B" o superiori, o competenza nelle tre andature (la Patente "B" va comunque acquisita entro il 1° anno)

**POSTI DISPONIBILI: 30**

**ISCRIZIONE entro il 20/12/2011**

**QUOTA D'ISCRIZIONE** per il biennio € 4.900

**MODALITÀ DI SELEZIONE:** Valutazione requisiti curriculari e di equitazione e colloquio inerente la preparazione di base

**NUMERO CREDITI: 90 CFU**

(esenzione dall'obbligo di acquisizione dei crediti ECM per il biennio)

**TITOLO DI STUDIO:** Diploma di "Master di 1° livello in Riabilitazione Equestre" rilasciato dal Rettore

Per informazioni: Bando e modulo della domanda: [www.unifi.it](http://www.unifi.it)

Cattedra di NPI: Prof.ssa A. Pasquinelli, Dr.ssa P. Allori, Tel 055.4298433-425, Fax 055.4298432, [pasquinelli@neuro.unifi.it](mailto:pasquinelli@neuro.unifi.it)

Segreteria Master: Tel 055.4598771-775-767, Fax 055.4598928, [master@polobiomedico.unifi.it](mailto:master@polobiomedico.unifi.it)

Associazione "Lapo" ONLUS: Dr.ssa C. Mannini, Sig.ra D. Gamuzza, Tel 055.4298431, 347.5398994, [www.associazione-lapo.it](http://www.associazione-lapo.it)