

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA A CICLO UNICO

IN MEDICINA VETERINARIA

DIPARTIMENTO DI BIOMEDICINA COMPARATA E ALIMENTAZIONE

TESI DI LAUREA

**VALUTAZIONE ISTOLOGICA DELL'APPLICAZIONE DI MSCs
(CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI) E PRP (CONCENTRATO
PIASTRINICO) IN LESIONI TENDINEE DELLA PECORA**

**HISTOLOGICAL EVALUATION OF MSCs (MESENCHYMAL STEM
CELLS) AND PRP (PLATELET RICH PLASMA) IN LESIONS OF SHEEP
TENDONS**

Relatore: Prof. Marco Patruno

Correlatore: Dott.ssa Tiziana Martinello

Laureando: Arianna Costa

Matricola n.544899

ANNO ACCADEMICO 2011-2012

*Dedico questo lavoro ai miei
genitori, che negli anni hanno
accompagnato ogni mio passo.*

INDICE

<u>RIASSUNTO</u>	1
<u>1. INTRODUZIONE</u>	3
1.1 Anatomia del tendine	3
<i>Anatomia macroscopica</i>	
<i>Anatomia microscopica</i>	5
<i>Caratteristiche biomeccaniche</i>	7
1.2 Patologie tendinee	9
<i>Protocolli terapeutici</i>	10
<i>Nuovi procolli terapeutici</i>	11
1.3 Concentrato piastrinico autologo (PRP)	12
<i>Metodiche di preparazione</i>	13
<i>Meccanismo d'azione del PRP</i>	16
<i>Utilizzo terapeutico del PRP</i>	17
1.4 Cellule staminali	19
<i>Cluster di differenziamento</i>	22
<i>Plasticità delle cellule staminali</i>	22
<i>Utilizzo delle cellule staminali</i>	22
<i>Associazione MSCs e PRP</i>	24
<u>OBIETTIVO DELLO STUDIO</u>	25
<u>2. MATERIALI E METODI</u>	27
2.1 Selezione dei soggetti	27
2.2 Isolamento delle cellule staminali mesenchimali (MSCs)	27
2.3 Coltura delle MSCs	28
2.4 Preparazione del PRP	29
2.5 Induzione della lesione sperimentale	30
2.6 Trattamento della lesione sperimentale	31
2.7 Valutazioni cliniche ed ecografiche	31
2.8 Prelievo post-mortem	32

2.9 Preparazione dei campioni	33
2.10 Colorazione dei campioni	34
2.11 Valutazioni istologiche	37
<u>3. RISULTATI</u>	39
3.1 Valutazioni cliniche	39
3.2 Valutazioni ecografiche	40
3.3 Valutazioni istologiche	42
3.4 Valutazioni immunoistochimiche	45
<u>4. DISCUSSIONE</u>	49
<u>5. BIBLIOGRAFIA</u>	55

RIASSUNTO

In medicina umana e veterinaria le patologie teno-desmiche rivestono grande interesse per l'elevata incidenza con cui si verificano, per la difficoltà di ottenere una guarigione completa con un pieno recupero funzionale delle strutture coinvolte e perché comportano lunghi periodi di inattività. La formazione del tessuto cicatriziale non permette infatti un recupero funzionale completo: la rigidità della cicatrice provoca un aumento delle sollecitazioni in tutto il resto della struttura, soprattutto a carico delle porzioni adiacenti alla lesione. Le strutture teno-legamentose sono caratterizzate da un processo ripartivo lungo, vista l'elevata percentuale di collagene e il ridotto numero di cellule in esse contenute. Le terapie mediche e chirurgiche normalmente impiegate agiscono con l'intento di bloccare il processo infiammatorio, prevenire ulteriori danni al tessuto tendineo e ai tessuti circostanti, diminuire le tensioni e aumentare la vascolarizzazione a livello della lesione. Tuttavia i protocolli terapeutici convenzionali hanno solo effetti marginali sulla riparazione delle lesioni teno-legamentose e il fattore che influenza maggiormente la prognosi è la gravità della lesione iniziale. In questi ultimi anni si è investito molto sulla ricerca al fine di comprendere se sia possibile ottenere dei vantaggi dall'impiego di sostanze come cellule staminali o il concentrato piastrinico nel trattamento di lesioni teno-desmiche.

Attualmente si ritiene che l'impiego di MSCs e/o PRP per la terapia delle patologie tendinee e legamentose sia in grado di accelerare i processi fisiologici di guarigione, in quanto stimolano una più rapida e corretta riparazione tissutale. L'obiettivo di questa tesi è studiare l'utilità dell'applicazione intralesionale di MSCs e PRP per il trattamento di tendinopatie sperimentalmente indotte, attraverso un meccanismo patogenetico il più possibile sovrapponibile a quello reale. Il fine ultimo è stabilire un protocollo sperimentale adeguato ad essere impiegato in tutte le specie di interesse veterinario.

E' stata quindi valutata l'efficacia delle cellule mesenchimali autologhe, isolate da sangue venoso periferico, associate o meno a concentrato piastrinico autologo e l'efficacia di quest'ultimo da solo nell'incrementare il processo di guarigione di lesioni tendinee sperimentali.

Lo studio è stato condotto su nove pecore, nelle quali, tramite l'enzima collagenasi, è stata indotta una lesione a livello di tendine flessore profondo delle falangi degli arti posteriori. Dopo la lesione, i soggetti sono stati trattati ad un arto: tre pecore con sole cellule staminali mesenchimali ricavate dal loro sangue periferico; tre pecore con l'associazione MSCs e PRP; ed infine tre pecore unicamente con PRP. L'arto controlaterale è stato trattato con soluzione fisiologica ed utilizzato come controllo lesionato e non trattato. Dopo quattro mesi dal trattamento, in cui con regolarità sono stati eseguiti controlli clinici ed ecografici, le pecore sono state sacrificate. I tendini sono stati

prelevati e allestiti per essere valutati tramite analisi istologica ed immunoistochimica. Attraverso questo tipo di analisi sono stati osservati alcuni parametri quali: la densità cellulare, la morfologia delle cellule, l'organizzazione della matrice, la neovascolarizzazione, l'espressione del collagene di tipo I e III e di COMP. Questa valutazione qualitativa ha permesso di constatare la buona risposta tissutale ai trattamenti con un apporto fondamentale delle cellule staminali mesenchimali. L'esito di tale ricerca, confermato da rilievi clinici, morfologici ed istologici, potrà fornire, negli animali di interesse veterinario, maggiori informazioni ed ulteriori prospettive nell'applicazione di queste terapie, volte a migliorare sia il tipo che le caratteristiche della guarigione.

1.INTRODUZIONE

In medicina umana e veterinaria le patologie teno-desmiche rivestono grande interesse per l'elevata incidenza con cui si verificano, per la difficoltà di ottenere una guarigione completa ed un pieno recupero funzionale delle strutture coinvolte e perché comportano lunghi periodi di inattività. I protocolli terapeutici attualmente utilizzati nel trattamento di queste patologie sono lontani da una reale *restituito ad integrum*. Le attuali ricerche stanno dunque convergendo verso lo studio di terapie che abbiano lo scopo di stimolare la riparazione endogena e la formazione di un tessuto con caratteristiche morfo-funzionali sovrapponibili a quelle di un tendine sano.

1.1 ANATOMIA DEL TENDINE

I tendini sono formazioni anatomiche di consistenza fibroelastica e con notevole resistenza alle sollecitazioni meccaniche ed ai processi autolitici. Sono interposti tra i muscoli e le ossa e provvedono a trasmettere la forza prodotta dalla contrazione muscolare alle leve scheletriche, consentendo così il movimento nonché il mantenimento della postura del corpo.

Anatomia macroscopica

Macroscopicamente appaiono lisci, di colore biancastro; hanno forma di cordoni o nastri e in sezione trasversale appaiono rotondi o ovali (Adamo, 2002). La forma dei tendini è strettamente correlata alla funzione che essi devono svolgere in rapporto all'azione specifica dei muscoli dai quali dipendono: muscoli deputati a compiere movimenti delicati e di precisione possiedono tendini lunghi e sottili, mentre quelli che svolgono azioni di potenza e resistenza hanno tendini più brevi e robusti (Denoix, 1996). I tendini possiedono strutture satelliti che hanno come compito principale quello di facilitare lo scorrimento del tessuto tendineo sulle strutture anatomiche circostanti e di evitare che il tendine stesso perda la sua linea d'azione durante la contrazione muscolare. Gli annessi tendinei (fig.2) sono rappresentati da: guaine fibrose, guaine sinoviali, foglietti peritendinei, e borse tendinee.

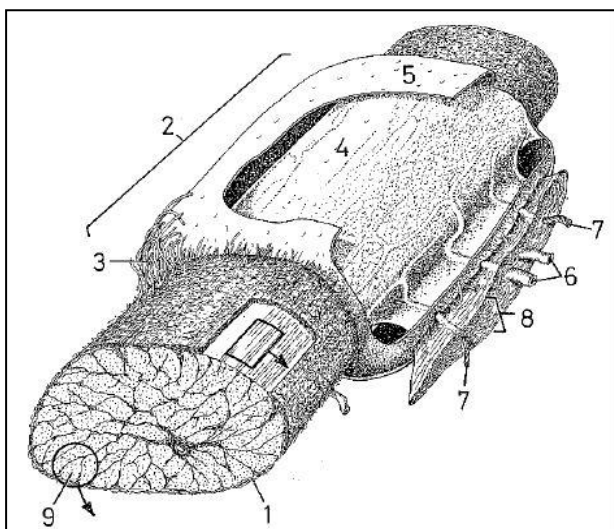
Le guaine fibrose o retinacoli rappresentano i canali di scorrimento dei tendini, entro i quali i tendini scorrono avvolti da una guaina sinoviale.

Le guaine sinoviali hanno il compito di agevolare lo scorrimento del tendine all'interno della guaina fibrosa. Esse sono costituite da due sottili foglietti sierosi: il foglietto parietale che tappezza le pareti della guaina fibrosa e il foglietto viscerale che riveste la superficie del tendine. Lo spazio chiuso

delimitato dai due foglietti contiene un sottile velo di liquido, il liquido peritendineo, che possiede all'incirca la stessa composizione del liquido sinoviale. Esso ha principalmente una funzione lubrificante in quanto il tessuto tendineo, a differenza della cartilagine articolare, possiede una vascolarizzazione propria. Peduncoli di tessuto fibrillare lasso si distaccano dalle pareti dei canali osteo-fibrosi e terminano sul ventre tendineo recando al tendine vasi e nervi. Queste strutture costituiscono il mesotenonio e sono anch'esse rivestite dalla sinoviale e possono essere più o meno numerose a seconda della lunghezza del tendine stesso.

Non tutti i tendini posseggono tuttavia delle vere e proprie guaine sinoviali; queste infatti si riscontrano solo nelle zone in cui un repentino cambiamento di direzione ed un aumento dell'attrito richiedono una lubrificazione molto efficiente. La maggior parte dei tendini sono invece circondati da foglietti peritendinei di tessuto connettivo lasso che nel loro complesso costituiscono il peritenonio. Il peritenonio concorre a ridurre la frizione e funziona come una sorta di manicotto elastico che consente il libero movimento del tendine rispetto alle strutture circostanti.

Le borse tendinee concorrono a minimizzare l'attrito tra il tendine e le strutture ossee adiacenti. Si tratta di piccole vescicole sierose, localizzate nei siti ove una prominenza ossea può comprimere e quindi logorare il tendine. Al di sotto del peritenonio, l'intero tendine è circondato da una sottile guaina di tessuto connettivo denso denominata epitenonio. Sulla sua superficie esterna l'epitenonio è contiguo al peritenonio e sulla superficie interna è invece in continuità con l'endotenonio, una



sottile membrana di tessuto connettivo lasso che provvede a rivestire le singole fibre del tendine e a raggrupparle in unità più grandi

Fig.2: Il peritenonio (1) emette delle proiezioni di tessuto connettivo fibroso lasso all'interno del tendine; il tendine si connette alla guaina sinoviale (2) tramite fibre di reticolina (3); la guaina sinoviale presenta uno strato interno e uno esterno che delimitano la cavità sinoviale (4); vasi (6) e nervi (7) penetrano la guaina sinoviale

rappresentate da fasci di fibre di vario ordine. La

funzione dell'endotenonio è quella di circoscrivere, individualizzandoli, i vari ordini di fasci ma anche quella di permettere la penetrazione e la distribuzione capillare di strutture vascolo-nervose all'interno del tendine

Tendini e legamenti hanno un consumo di ossigeno molto più basso rispetto ai muscoli. Questo rappresenta un vantaggio notevole poiché consente a tali strutture di sopportare carichi e tensioni

per lunghi periodi, superando entro certi limiti il rischio di ipossia e di necrosi. I tendini sono caratterizzati da un apporto vascolare inferiore agli altri tessuti metabolicamente attivi ai quali sono associati; questa peculiarità è responsabile della caratteristica opalescenza che contraddistingue tali strutture dai muscoli (Cook J.L.,2005).

La quantità di sangue che giunge al tendine è variabile, ma in generale è inversamente proporzionale all'età del soggetto e al carico sopportato. Il tendine riceve la maggior parte del flusso ematico dall'inserzione muscolare, dall'inserzione periostale e, all'interno della guaina, è raggiunto dai vasi che decorrono nel connettivo. Questi ultimi sono spesso associati a fibre nervose in grado di regolare il flusso ematico diretto al tendine attraverso la secrezione di diverse sostanze ad azione vasocostrittrice (neuro peptide Y e noradrenalina) o vasodilatatrice (vasoactive intestinal polipeptide o Vip).



Fig.1: tendine flessore superficiale e profondo di cavallo.

Anatomia microscopica

I tendini appartengono alla categoria dei tessuti connettivi e sono perciò costituiti da tre parti fondamentali: matrice, fibre collagene e cellule. Questi tre elementi, compenstrandosi e agendo sinergicamente, sono in grado di conferire al tendine elasticità e resistenza alla tensione e alla pressione. Tendini e legamenti sono strutture anatomiche costituite da tessuti biologicamente attivi e devono le loro proprietà biomeccaniche all'organizzazione molecolare, morfologica e cellulare che li caratterizza.

Come tutti i tessuti connettivi, i tendini sono costituiti dalla sostanza o matrice extracellulare (ECM), al cui interno sono disperse le cellule. La ECM è formata da una componente fibrosa e da una sostanza amorfa o sostanza fondamentale (Adamo, 2002) che si presenta come un gel viscoso in grado di intrappolare grandi quantità di acqua e di diffondere nutrienti, metaboliti e ormoni attraverso la sostanza intercellulare. La ECM è l'elemento principale del tendine ed è formata per il

70% da acqua e per il 30% da sostanza secca; quest'ultima risulta a sua volta costituita per il 75-90% dalle diverse molecole di collagene, per lo 0,2-5% da glicosamminoglicani (GAG) e proteoglicani e per l'1-2% da elastina (Sharma, 2006). La matrice extracellulare presenta, insieme alle classiche fibre che compongono il tessuto connettivo (collagene, reticolari ed elastiche), delle proteine dette fibrose di connessione o adesive (come la fibronectina) che collegano le cellule alle componenti della matrice extracellulare. I rapporti tra cellule e matrice sono complessi: le macromolecole contenute nella ECM sono sintetizzate e secrete dalle cellule connettivali che regolano la disposizione tridimensionale di queste molecole nello spazio extracellulare; la matrice extracellulare invece regola e influenza le funzioni delle cellule che vi sono immerse (Adamo, 2002). La maggior parte del peso secco del tendini è fornita dal collagene.

Le fibre collagene sono flessibili, ma assai poco estensibili e offrono una grande resistenza alla trazione (Adamo, 2002). Il collagene è un elemento fondamentale dei tendini e ne garantisce la forza meccanica mentre le fibre elastiche permettono ai tendini di riprendere la loro conformazione originale dopo uno stress tendineo. Nei tendini e nei legamenti i fasci di fibre collagene sono fittamente stipati tra loro e disposti tutti nella direzione della trazione e la sostanza amorfa è quantitativamente scarsa (Adamo, 2002). La particolare disposizione dei fasci di fibre garantisce elevata resistenza alle forze di tensione. Il collagene è costituito da triplici eliche di tropocollagene. Dall'associazione di più molecole di tropocollagene si originano le fibrille di collagene che presentano diametro variabile tra 20 e 150nm. Le fibrille di diametro maggiore presentano una maggiore resistenza alla trazione grazie all'elevato numero di legami tra le molecole, mentre le fibrille con diametro inferiore si prestano più facilmente allo scorrimento delle une sulle altre e sono molto più flessibili. Dall'unione di più fibre collagene origina il fascio primario e più fasci primari, circondati dal tessuto connettivo dei setti endotenonici, aggregandosi formano il fascio secondario. Un gruppo di fasci secondari forma poi il fascio terziario e l'insieme di più fasci terziari costituisce il tendine. I principali tipi di collagene presenti nei tessuti connettivo sono: I, II, III, IV, V, XI. Il tipo I è quello più diffuso ed è distribuito nelle ossa, nella cute, negli organi interni, nei legamenti e nei tendini. Nei tendini normali circa il 95% del collagene totale è costituito dal tipo I, mentre i tipi III, IV, V rappresentano il restante 5%. Il collagene di tipo I è responsabile della fitta architettura delle fibre e rende il tessuto molto resistente; il collagene di tipo IV è il costituente principale delle membrane basali; i tipi III e V formano fibrille più sottili e rendono il tendine più elastico. Nel tendine immaturo, nel tendine lesionato e nei tendini sani con l'avanzare dell'età sono rilevabili livelli sempre più alti di collagene di tipo III. Quest'ultime infatti vengono sintetizzate rapidamente nelle prime fasi di riparazione di una lesione e garantiscono una certa elasticità, ma non presentano la stessa resistenza allo stiramento del collagene di tipo I. Per questo

motivo il processo di guarigione prosegue con la sostituzione delle fibrille di tipo III con fibrille di tipo I (Carmona, 2006). Nel tendine circa il 95% della componente cellulare è rappresentato dai tenociti, mentre il restante 5% è formato da cellule endoteliali, sinoviali e condrociti. I tenociti sono le cellule responsabili della secrezione dell'ECM, dell'assemblaggio e del suo ricambio all'interno del tendine (Sharma, 2006). Queste cellule sono dei fibroblasti specializzati e sono disposti in lunghe file parallele negli interstizi che si trovano tra i fasci di fibre collagene.

Caratteristiche biomeccaniche

La funzione dei tendini è quella di trasmettere gli impulsi meccanici derivanti dalla contrazione muscolare alle leve scheletriche. E' facilmente intuibile che per svolgere questa funzione deve esistere un rapporto costante tra forza di contrazione muscolare e resistenza alla tensione del tendine. Tale rapporto deve mantenersi invariato per tutta la vita e l'unità muscolo-tendinea deve di conseguenza adattarsi di volta in volta alle richieste funzionali dell'apparato locomotore. Il tendine quindi deve possedere in ogni momento una forza tensoria tale da poter resistere alla massima potenza sviluppata da una contrazione muscolare.

Il comportamento biomeccanico di un tendine è correlato non soltanto all'entità della sollecitazione tensoria, ma anche alla forma del tendine stesso; così muscoli deputati a compiere movimenti delicati e di precisione, possiedono tendini lunghi e sottili, mentre quelli che svolgono azioni di potenza e resistenza, hanno tendini più brevi e robusti. Un tendine corto infatti possiede una maggior resistenza alla trazione di un tendine lungo, perché il carico richiesto per produrre la rottura è molto più grande nel tendine corto a parità di diametro. Tuttavia un tendine lungo è in grado di subire una deformazione maggiore di quella di un tendine corto prima di andare incontro a rottura. Quindi, sebbene siano leggermente più deboli dei tendini corti per unità di lunghezza, i tendini lunghi possono assorbire una quantità di energia maggiore e risultare nel complesso più resistenti alla rottura dei tendini corti di uguale diametro. Forza e resistenza di un tendine sono dunque due entità diverse e dipendono dal diametro e dalla lunghezza del tendine stesso. Più precisamente le proprietà biomeccaniche del tendine sono collegate al diametro e all'arrangiamento delle fibrille collagene che lo costituiscono. Infatti, tendini sottoposti ad alti carichi tensili sono costituiti da fibrille di diametro elevato, meno flessibili di quelle di piccolo calibro presenti in altri tessuti connettivi, come la cute o le pareti dei vasi. Il comportamento meccanico del tendine può essere visto come la sovrapposizione di tre distinti comportamenti fondamentali:

- elasticità: la tendenza di un materiale a deformarsi in maniera proporzionale ai carichi applicati e ad assumere le medesime condizioni iniziali una volta cessata la forza deformante;

- plasticità: un materiale si dice plastico quando, sottoposto ad una sollecitazione meccanica, non subisce alcuna deformazione finchè la sollecitazione meccanica non raggiunge un determinato valore che prende il nome di carico limite. Al di là di esso la deformazione prosegue indefinitivamente finchè la sollecitazione non viene rimossa;

- viscosità: un materiale ha comportamento viscoso quando esiste proporzionalità tra la velocità di deformazione del materiale e la forza applicata. Mentre nel comportamento elastico la deformazione è proporzionale alla forza, nel comportamento viscoso la deformazione risulta proporzionale non solo alla forza, ma anche al tempo in cui essa viene applicata.

Il comportamento biomeccanico del tendine è bene illustrato dalla curva tensione-deformazione. Inizialmente si verificano modificazioni relativamente grandi del tendine che forniscono un'immagine "a punta" non lineare, la cosiddetta *toe region* (Herrick, 1978). Se lo stimolo persiste segue una regione lineare o *linear region*, nella quale ad ogni incremento di carico corrisponde un aumento equivalente della distensione del tendine; all'interno di questa regione, quando viene rimosso il carico, il tendine è in grado di tornare alla sua forma iniziale senza aver subito nessun tipo di danno (si comporta in maniera elastica).

Quando sono applicati carichi elevati si osservano dei cambiamenti non lineari del tendine, nel quale avvengono delle estensioni più grandi del previsto; il punto in cui si verificano questi cambiamenti è noto come *yield point* o punto di carico. Carichi che superano questo punto determinano una deformazione plastica del tendine che va incontro ad un danno strutturale irreversibile (Goodship, 1994). Un successivo incremento del carico comporta un completo cedimento della struttura e la rottura del tendine (Fig.3).

Da un punto di vista ultrastrutturale, è stato dimostrato che le fibre ondulate della regione centrale dei tendini dei cavalli adulti, si tendono precocemente rispetto alle fibre ondulate della regione periferica e ciò suggerisce che la regione centrale è più predisposta al cedimento strutturale (Wilmink, 1992). Questo consente di comprendere per quale motivo, in corso di tendinopatia, l'esame ecografico del tendine danneggiato mostra le tipiche *core lesion* (lesione concentrica).

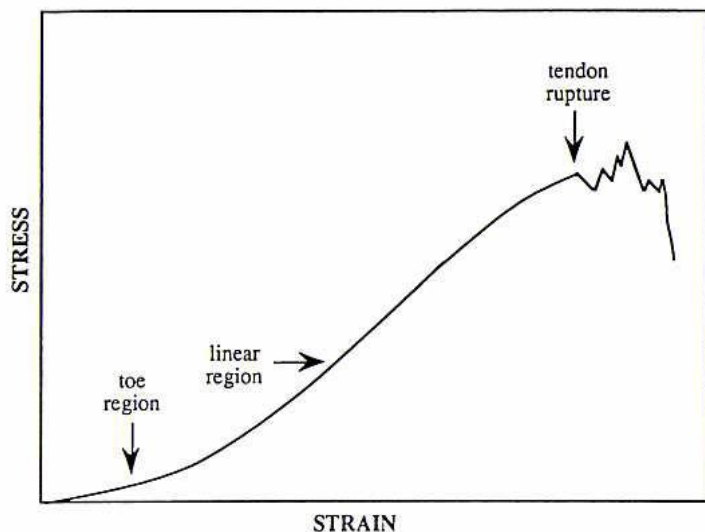


Fig.3: grafico della deformazione non lineare del tendine sottoposto a carico.

1.2 PATOLOGIE TENDINEE

Le lesioni più frequenti che si possono riscontrare nelle strutture tenodesmiche sono l'iperestensione da lesione attiva causata da una contrazione muscolare troppo forte, l'iperestensione da lesione passiva non causata da contrazione muscolare, ferite penetranti, sepsi, lacerazioni, lussazioni. L'esito del trauma sul tendine può avere diverse conseguenze tra le quali la frattura da avulsione dell'osso su cui prende inserzione, avulsione dell'inserzione del tendine sull'osso o rottura del tendine. In seguito all'evento traumatico o a microtraumi ripetuti si verifica un processo infiammatorio del tendine e/o delle giunzioni muscolo-scheletriche. Il quadro clinico di tenite è molto variabile ed è condizionato dalla sede e dal tipo di lesione, oltre che dal tempo intercorso dal momento del trauma a quello della prima visita. L'esame ecografico è essenziale per confermare il sospetto diagnostico e per valutare l'estensione e l'evoluzione della lesione a carico del tendine ma solo dopo aver affrontato le varie tappe che compongono l'esame clinico (segnalamento, anamnesi, EOG, EOP).

Da un punto di vista ecografico si possono riscontrare diversi tipi di lesioni:

- lesione concentrica o *core-lesion*: è la più frequente e si presenta come un immagine ipoecoica o anecoica al centro del tendine;
- lesione eccentrica: di aspetto simile alla precedente ma non concentrica in sezione trasversale e meno frequente della precedente;
- tendine diffusamente ingrossato o ipoecogeno: rappresenta un danno diffuso del tendine ed edema intratendineo;

-ecogenicità mista: si osserva generalmente in caso di recidive o nei tendini in via di guarigione ed è caratterizzata da una combinazione di iso- o iperecogenicità, data da tessuto sano o guarito, e di ipoecogenicità focale che rappresenta le zone danneggiate;

-rottura: è rara e si presenta come una zona quasi completamente anecogena lungo tutta la sezione del tendine.

Indipendentemente dal trauma subito si sviluppa quindi un processo infiammatorio; le fasi che seguono poi l'infiammazione sono: la fase ripartiva e la fase di rimodellamento (Goodship, 2004). La fase ripartiva comincia entro pochi giorni e inizialmente si sovrappone alla fase infiammatoria. È caratterizzata da angiogenesi, sintesi di collagene di tipo III e aumento locale dei fibroblasti; questi ultimi possono arrivare dai capillari del tessuto peritendineo oppure dall'endotenonio. Al termine della fase ripartiva si forma un tessuto debole e meno elastico. Il tendine danneggiato si ripara naturalmente, ma il tessuto fibroso che sostituisce quello perso in seguito all'evento traumatico, presenta una morfologia diversa da quella normale. Le fibre collagene del tessuto cicatriziale non sono allineate e compatte come quelle del tendine sano e sono per la maggior parte di collagene di tipo III; questi cambiamenti conferiscono al tendine minor resistenza agli insulti (Dowling, 2000). La fase di rimodellamento inizia alcuni mesi dopo ed è caratterizzata dalla trasformazione del collagene in tipo I. In questa fase si va ad avere un miglior orientamento delle fibre anche se il risultato conclusivo è comunque un tendine meno funzionale per la ridotta resistenza finale alle forze di tensione.

Protocolli terapeutici

Negli anni sono stati sviluppati molti protocolli terapeutici per il trattamento delle tenopatie ma gran parte di essi sono inefficaci. In generale è importante ricordare che la scelta del tipo di terapia deve essere fatta considerando la gravità della lesione, l'età, la specie, la razza, il tipo di lavoro e il valore economico dell'animale. Nello scegliere il protocollo terapeutico adatto ad ogni caso si deve ricordare che gli obiettivi sono: diminuire la risposta infiammatoria locale, ridurre al minimo la formazione di tessuto cicatriziale e di aderenze fibrose e promuovere la riparazione tendinea fino a sviluppare un' adeguata elasticità e resistenza alla trazione. La terapia fisica può essere usata soprattutto nella fase acuta delle teniti, dove la riduzione del processo infiammatorio è necessaria per limitare l'azione degenerativa a carico della matrice tendinea causata dagli enzimi proteolitici liberati durante la flogosi (Dowling, 2000). Il primo accorgimento da adottare subito dopo la diagnosi di tenite è assicurare all'animale un periodo di riposo, allo scopo di evitare l'estensione della lesione e l'alterazione delle fibre in via di formazione (Henninger, 1994). Durante le prime fasi post trauma si può utilizzare l'idroterapia fredda, che aiuta ad alleviare il dolore e previene la

formazione di edema e la tumefazione, ma soprattutto un programma di esercizio controllato al fine di promuovere la circolazione, il drenaggio linfatico e il riassorbimento di eventuali raccolte ematiche ed essudative. Nel cavallo si possono effettuare delle ferrature correttive che riducono la tensione interna al tendine ed indurre un progressivo allungamento della struttura tendinea. Altri tentativi per la terapia delle teniti sono stati fatti utilizzando gli ultrasuoni che, emettendo vibrazione meccanica permettono lo sviluppo di calore nei tessuti nei quali sono applicati favorendo la vasodilatazione, il metabolismo delle cellule e il flusso linfatico locale. Anche la terapia con il laser sembra dare risultati positivi nel trattamento delle lesioni tendinee, stimolando il metabolismo cellulare e il rilascio di sostanze che intensificano la fase infiammatoria e ripartiva del processo di guarigione (Henninger, 1994).

La terapia fisica, pur essendo un valido ausilio per raggiungere la guarigione del tendine non è sufficiente per raggiungere la completa remissione del processo patologico perciò si ricorre alla somministrazione di farmaci soprattutto durante la flogosi acuta. I protocolli terapeutici preposti per il trattamento delle lesioni teno-legamentose prevedono l'uso di corticosteroidi, FANS tra cui Fenilbutazone, Flunixinmeglumine e Naproxene, Glicosamminoglicani Polifosfati e il Dimetilsulfossido. Ciascuna classe di farmaco possiede vantaggi terapeutici, ma non bisogna tralasciare gli effetti collaterali.

Le lesioni teno-legamentose croniche o resistenti alla terapia possono essere trattate con la chirurgia.

Nuovi protocolli terapeutici

Le terapie descritte finora portano alla formazione di tessuto cicatriziale all'interno della struttura tendinea lesa che limita il ripristino dell'elasticità tendinea. Per questo motivo sono stati studiati nuovi protocolli terapeutici. Particolare attenzione è stata rivolta ai fattori di crescita o Growth Factors (GFs). La guarigione del tessuto tendineo patologico è caratterizzata da una cascata di eventi mediati da fattori di crescita peptidici, secreti da diversi elementi cellulari, che regolano il metabolismo cellulare. I GFs incrementano il processo ripartivo dei tendini stimolando la sintesi ECM che a sua volta promuove la proliferazione e la differenziazione cellulare e stimola lo sviluppo della vascolarizzazione (Dahlgren, 2005).

Recentemente si è posta particolare attenzione all'uso di plasma ricco di piastrine (PRP) per la terapia delle lesioni tendinee. Il PRP è una fonte di elevate concentrazioni di PDGF (Platelet Derived Growth Factors) e TGF- β (Transforming Growth Factors), di cui le piastrine sono ricche, e apporta molti altri fattori di crescita. Il PDGF e il TGF- β svolgono un ruolo primario nel reclutamento dei progenitori del tessuto connettivo e in questo modo stimolano la formazione della

matrice e migliorano la velocità di guarigione del tendine. L'iniezione di PRP è preceduta da diagnosi ecografica di *core-lesion*. Si somministrano 4-7ml di plasma ricco di piastrine in base alle dimensioni della lesione; in lesioni tendinee molto piccole sono sufficienti 1-2ml (Maia, 2009). Negli ultimi anni, l'attenzione rivolta all'uso delle cellule staminali (MSCs) per la terapia delle lesioni tendinee e legamentose, è stata sempre maggiore. Con questa tecnica si assiste a un più rapido ritorno all'efficienza funzionale e alla guarigione del tendine, al miglioramento ecografico e alla riduzione dell'incidenza di recidive, rispetto a quanto avviene nei trattamenti conservativi (Smith, 2003). L'uso iniziale di steroidi associati alle MSCs potrebbe essere appropriato per velocizzare la risoluzione dell'infiammazione e contemporaneamente rallentare la fibrosi (Smith, 2004). Le MSCs possono essere impiegate da sole o unitamente a biomateriali di supporto, nel caso in cui siano innestate in lesioni molto vaste. L'uso di 10-20 milioni di MSCs in coltura miscelate a PRP o ad aspirato midollare sembrerebbe una soluzione promettente da un punto di vista tecnico (Nixon, 2008).

1.3 CONCENTRATO PIASTRINICO (PRP)

Il concentrato piastrinico o plasma arricchito di piastrine (PRP, Platelet Rich Plasma) è un prodotto ricavato dal sangue che si presenta come un concentrato autologo di piastrine sospese in un piccolo volume di plasma ed è pertanto considerato un emoderivato, secondo quanto definito dalla vigente normativa in materia (Marx, 2004; Sutter, 2004; Everts, 2007; Nixon, 2008; Maia, 2009).

Il PRP, per essere definito tale, deve essere di origine autologa; in caso contrario la presenza di membrane cellulari di prodotti omologhi, che fungerebbero da elementi antigenici, scatenerebbero una reazione immunitaria (Marx, 2004; Everts, 2007). Le piastrine svolgono un ruolo fondamentale nell'emostasi e possiedono inoltre proprietà pro-infiammatorie, regolatrici e rigenerative mediate dall'interazione con alcune cellule (es. neutrofili, cellule endoteliali) e dalla liberazione di fattori di crescita (GFs), chemochine e altre molecole regolatrici (Chaer, 2006; Everts, 2007). Per questo motivo il PRP contiene numerose molecole che rivestono un ruolo fondamentale nel processo di riparazione dei tessuti; alcune di queste molecole sono fattori contenuti negli alfa granuli delle piastrine, altri invece sono proteine del sangue, come la fibrina, la fibronectina e la vitronectina (Everts, 2007; Nixon, 2008; Maia, 2009).

Numerosi studi sperimentali e clinici (Anitua, 2005; Carmona, 2006; Everts, 2007; Marx, 2004), realizzati in questi anni sia in medicina umana sia in medicina veterinaria, hanno permesso di investigare in modo approfondito l'efficacia del concentrato piastrinico e la possibilità di utilizzarlo routinariamente come supporto terapeutico per diverse patologie. Il vantaggio dell'impiego del PRP

potrebbe essere dovuto alla concentrazione soprafisiologica di fattori di crescita che pare sia in grado di incrementare la velocità di riparazione delle ferite, di ridurre l'infiammazione associata al trauma e di ridurre al minimo la produzione di tessuto cicatriziale.

Metodiche di preparazione

Durante la fase infiammatoria la piastrina agisce su diversi fronti: ad esempio ha effetto antimicrobico, d'induzione della cascata della coagulazione e di retrazione del coagulo, rilascia fattori di crescita e citochine. La secrezione di fattori di crescita è stimolata dalla cascata della coagulazione, pertanto il PRP deve essere ottenuto da sangue trattato con anticoagulante, in modo che le piastrine rimangano vitali un tempo sufficiente a consentire il trattamento. Generalmente il trattamento con anticoagulante garantisce un mantenimento del PRP per circa otto ore, ma è comunque consigliabile effettuare il trattamento quanto prima (Marx, 2004).

La preparazione del PRP deve avvenire in modo da separare efficacemente le piastrine dagli eritrociti e concentrarle senza danneggiare le piastrine stesse. Il metodo scelto è importante poiché i fattori di crescita contenuti all'interno degli alfa granuli si attivano nel momento in cui i granuli stessi si fondono con la membrana piastrinica (Marx, 2004; Everts, 2007). Questa fusione si può verificare anche nel caso in cui le piastrine vengano danneggiate durante la produzione del PRP.

Applicando particolari trattamenti al sangue periferico è possibile ricavare diversi prodotti: PRP puro, PRP ricco di leucociti, PRP povero di leucociti ma ricco di fibrina, PRP ricco di leucociti e di fibrina (Dohan, 2009).

Questi sistemi sono stati sviluppati in medicina umana e ciascuno presenta i propri vantaggi e svantaggi; pertanto non è ancora stato sviluppato un metodo ottimale per ottenere PRP da pazienti umani. È stato dimostrato che per la produzione di PRP in veterinaria ci si può avvalere degli stessi sistemi impiegati in umana senza modificare sostanzialmente i protocolli (Sutter, 2004; Carmona, 2006).

I sistemi manuali.

Attualmente i sistemi manuali comprendono il metodo dell'aferesi, il metodo del *buffy coat* e il *tube metode*.

–il metodo dell'aferesi permette di ottenere, con l'ausilio di un apposita macchina, una specifica componente del sangue. Generalmente è necessario un volume di sangue maggiore rispetto alle altre tecniche (circa 450ml). È molto efficace nel concentrare piastrine e fattori di crescita, presenta un bassissimo rischio di contaminazione batterica del prodotto (Sutter, 2004; Carmona, 2006) e l'unico svantaggio risiede nel fatto che sono richiesti operatori esperti e l'impiego di una tecnologia

avanzata; pertanto non è applicabile in ambito ambulatoriale. L'apparecchiatura impiegata immette il sangue in un circuito sterile e, mediante centrifugazione e filtrazione separa il plasma e le piastrine dagli altri emocomponenti. Le piastrine a questo punto vengono concentrate tramite un processo discontinuo di centrifugazione che consente il ricircolo del sangue in modo da aumentare l'efficienza di raccolta di piastrine. Dopo l'aferesi è possibile filtrare le piastrine per ottenere una concentrazione ancora maggiore (Sutter,2004).

– il metodo del *buffy coat* consente mediante centrifugazione, la separazione del sangue in tre fasi (plasma povero, *buffy coat* ed eritrociti) e un'ottima concentrazione delle piastrine e dei leucociti. In commercio sono reperibili kit monouso che permettono di ottenere il PRP in modo semplice e veloce; pertanto sono adatti a un impiego ambulatoriale ma sono ancora molto costosi (Sutter, 2004; Carmona, 2006; Dohan, 2009). Inoltre presentano un rischio di contaminazione batterica maggiore, ma comunque limitato, rispetto a quello dell'aferesi (Sutter, 2004).

–il *tube metode* manuale prevede la raccolta del sangue in apposite provette contenenti anticoagulante e la sua centrifugazione. Il sangue viene processato con diverse centrifugazioni a diverse velocità per ottenere la separazione degli emocomponenti. È una tecnica semplice ed economica, ma richiede il rispetto di una stretta asepsi per evitare le contaminazioni batteriche del prodotto.

La scelta della metodica per la preparazione del PRP dipende dalla capacità della tecnica di concentrare le piastrine e i singoli fattori di crescita; sono disponibili in commercio appositi kit ELISA (Quantikine, R&D System, Minneapolis USA) che consentono di dosare i singoli GFs (Everts,2006). In uno studio eseguito da Sutter nel 2004, il metodo dell'aferesi e del *buffy coat* sono descritti come sistemi validi in egual misura per ottenere la concentrazione di piastrine e GFs utilizzando campioni di sangue intero equino. Il *tube metode* consente la concentrazione di un minor numero di piastrine e fattori di crescita, rispetto al *buffy coat* e all'aferesi, ma anche di un minor numero di leucociti (Carmona, 2006; Dohan, 2009).

I sistemi semi-automatizzati

In commercio sono disponibili numerosi sistemi semi-automatizzati per concentrare le piastrine e, normalmente, sono composti di un sistema di centrifugazione e di kit monouso. Sono di norma più rapidi e pratici di quelli manuali. I diversi dispositivi di centrifugazione utilizzano la forza centrifuga e una tecnica di elutriazione contro corrente (consente di purificare una sostanza mediante aggiunta di un solvente alla soluzione iniziale che in seguito viene travasata per separare il prodotto desiderato dalle sostanze indesiderate non disciolte) oppure un sistema di separazione basato sul peso specifico. I primi sono dispositivi monouso e di conseguenza molto costosi.

L'utilizzo del sistema di separazione basato sul peso specifico è molto diffuso anche nella pratica veterinaria. Questa tecnica mantiene la massa eritrocitaria durante la decantazione del plasma e del *buffy coat* poi, grazie alla centrifugazione, il PRP si concentra tra il plasma povero di piastrine sovrastante e il *buffy coat* leucocitario (Nixon, 2008).

Solitamente i diversi dispositivi disponibili in commercio permettono di ottenere dei PRP con concentrazioni piastriniche variabili da due a sei volte rispetto ai normali valori ematici. Tuttavia, poiché le piastrine sono suscettibili a ogni tipo di evento stressante, durante la fase di lavorazione e applicazione del PRP anche la concentrazione dei GFs può essere influenzata dalla manipolazione. Pertanto sarebbe importante valutare non solo la capacità di concentrare la popolazione piastrinica nel prodotto finale, ma anche l'effettiva concentrazione dei singoli fattori di crescita, per verificare che siano presenti in numero sufficiente a ottenere l'effetto terapeutico desiderato.

Produzione di gel piastrinico

Addizionando trombina al concentrato piastrinico è possibile gelificare il composto: il prodotto che ne deriva ha una residua capacità adesiva, dovuta in gran parte ai livelli elevati di fibrinogeno (Nixon, 2008). Per evitare reazioni anticorpali legate all'utilizzo della trombina bovina, si utilizzano di norma metodi alternativi per ottenere gel piastrinico, come la trombina bovina sottoposta ad ulteriore purificazione, la trombina umana ricombinante, la trombina autologa o altre sostanze come il cloruro di calcio (Everts, 2007). Una volta ottenuto il gel può essere posizionato direttamente sulla lesione e fungere come supporto per l'applicazione di ulteriori medicinali (Everts, 2007). Il prodotto può essere aliquotato e congelato a meno 40° C per utilizzarlo in diverse applicazioni nel tempo. Il gel piastrinico viene utilizzato anche in campo veterinario sotto forma di spray superficiale nelle ferite o nella riparazione della cartilagine, in modo da sfruttare le sue caratteristiche di autoaderenza e malleabilità (Nixon, 2008). Per il trattamento di lesioni tenodesmiche invece si preferisce utilizzare il concentrato piastrinico in forma liquida: il PRP viene infatti attivato dal contatto con il collagene e da altri fattori di attivazione apportati dalle piastrine presenti nel coagulo fisiologico (Nixon, 2008).

Meccanismo d'azione del PRP

Il concentrato piastrinico, oltre ad essere fonte di GFs, mima lo stadio finale della cascata coagulativa: infatti, in presenza di trombina, è in grado di convertire il fibrinogeno in fibrina e stimolare ulteriormente l'aggregazione piastrinica (Nixon, 2008). In realtà non è corretto sostenere che in assoluto maggiori sono le concentrazioni di fattori di crescita nel PRP maggiore sarà l'efficacia del trattamento: per esercitare la loro funzione, i fattori di crescita devono legarsi a dei

recettori target e, se questi sono già saturi, un incremento della quantità di GFs non darebbe alcun beneficio (Chaer, 2006). Nel corso di un trattamento con PRP è molto importante evitare di somministrare farmaci antinfiammatori ai pazienti, poiché l'azione di tali farmaci inibisce quella delle COX responsabili della sintesi di prostaglandine (PGs) e interferisce con il funzionamento piastrinico (Chaer, 2006). La concentrazione minima necessaria affinché un PRP possa esercitare un efficace effetto terapeutico a livello tissutale è di 300×10^6 alla terza piastrine per microlitro (Maia, 2009). Il PRP è un prodotto autologo, perciò è esente da rischi di trasmissione di malattie veicolate dal sangue; inoltre ha un ph di 6.5-6.7 rispetto ad un ph di 7-7.2 di un coagulo maturo, perciò potrebbe inibire la crescita batterica. Nonostante ciò, è di fondamentale importanza rispettare i principi di sterilità durante la fase di preparazione e somministrazione del concentrato piastrinico (Marx, 2004; Nixon, 2008). In conclusione, l'impiego di PRP presenta alcuni vantaggi che sono dati dalla sua natura autologa, dall'elevata concentrazione di fattori di crescita, dalla sicurezza del preparato, dal basso costo, dall'attrezzatura pratica e poco ingombrante e dalla facilità di preparazione e applicazione. Lo svantaggio principale è costituito dalla scarsa ripetibilità del prodotto ottenuto per quanto riguarda il contenuto in piastrine e leucociti (Marx, 2004; Nixon, 2008).

Utilizzo terapeutico del PRP

L'utilizzo del concentrato piastrinico a scopo terapeutico rappresenta una tecnologia relativamente nuova nel campo della medicina rigenerativa: il concetto che sta alla base dell'uso clinico del concentrato piastrinico è basato sulla capacità delle piastrine di rilasciare i fattori di crescita (peptidi che promuovono la proliferazione e la differenziazione cellulare, la chemotassi e la migrazione di varie cellule coinvolte nei meccanismi di guarigione tissutale). Attualmente, nell'uomo, il PRP viene impiegato con successo in odontoiatria (Rodzman, 2007), chirurgia dei tessuti duri e molli (inclusa chirurgia maxillofacciale, cardiovascolare e plastica), in ortopedia e per il trattamento delle ferite, soprattutto piaghe da decubito (Max, 2004). Il PRP viene impiegato sempre con maggior frequenza e efficacia per il trattamento di molte patologie muscolo-scheletriche, sia acute che croniche: tendinopatie, tendinosi, strappi e fibrosi muscolare, stiramenti legamentosi, lassità di capsula articolare, artrite, artrofibrosi, difetti della cartilagine articolare, lesione ai menischi, sinoviti croniche e flogosi articolare. Oltre al beneficio apportato ai meccanismi di guarigione il PRP sembra anche avere le capacità di alleviare il dolore muscolo scheletrico, permettendo una precoce ripresa dell'attività fisica. Si suppone che quest'effetto sia apportato dalla serotonina presente nei granuli densi piastrinici (Everts, 2008). È stato notato inoltre che l'uso del concentrato piastrinico elimina la necessità di drenaggi e di bendaggi compressivi ed elastici al termine dell'operazione. Il

PRP ha proprietà anti-infiammatorie, battericide, rigenerative ed emostatiche. Il PRP infine è anche usato nella riparazione retinica in pazienti con fori maculari idiopatici dato che aumenta la proliferazione cellulare durante la guarigione di lesioni retiniche (Korobelnik, 1966). I riscontri positivi ottenuti nell'uomo nel trattamento di diverse patologie ne hanno indotto l'impiego negli animali domestici in particolar modo nel cavallo. Lo scopo dell'applicazione di tali terapie in campo veterinario è di ottenere una completa rigenerazione del tessuto con ripristino completo della sua funzionalità. Nel cavallo il PRP trova applicazione soprattutto nel trattamento di ferite cutanee e patologie muscolo-scheletriche (Carmona, 2006). È particolarmente utile per la tenite flessoria, la desmite sospensoria la bursite e la sinovite, nonché per l'erosione cartilaginea (Nixon, 2008).

Utilizzo nel trattamento di ferite cutanee

Nel cavallo danni a carico del tessuto cutaneo sono relativamente frequente ed il processo di guarigione richiede generalmente tempi di recupero molto lunghi, portando spesso ad un risultato estetico scadente con la formazione di tessuto cicatrizzale esuberante (Monteiro, 2008; De Rossi, 2009). Tali riscontri si rilevano soprattutto a carico delle lesioni che coinvolgono le porzioni distali degli arti o del collo (Monteiro, 2008). Le ferite che coinvolgono le porzioni distali degli arti del cavallo presentano notevoli difficoltà di guarigione. Le cause sono molteplici e i trattamenti terapeutici tradizionalmente proposti e utilizzati non consentono di ottenere un buon risultato estetico e funzionale. Per tale ragione negli ultimi anni è stato testato, con ottimi risultati, un approccio terapeutico basato sulla medicina rigenerativa mediante l'utilizzo di concentrato piastrinico (Monteiro, 2008; De Rossi, 2009). I risultati ottenuti hanno evidenziato velocizzazione della differenziazione epiteliale e presenza di tessuto di granulazione maturo nelle lesioni trattate con gel piastrinico.

Utilizzo nel trattamento di patologie tenodesmiche

Il PRP oggi trova l'impiego più diffuso nel trattamento di lesioni tenodesmiche (Sutter, 2008). L'iniezione di PRP è raccomandata per il trattamento di lesioni tendinee e legamentose recenti e di quelle lesioni che non sono guarite in modo soddisfacente con i trattamenti tradizionali. In particolare si raccomanda di trattare lesioni recenti, che si sono verificate entro i trenta giorni precedenti: il trattamento può essere effettuato con il cavallo in stazione utilizzando una leggera sedazione e il blocco locale del nervo; al termine del trattamento, che viene effettuato generalmente per via eco-guidata, si procede applicando un bendaggio leggero all'arto che viene lasciato in situ per i primi tre giorni. Il trattamento sarà dunque seguito da controlli clinici ed ecografici periodici

del soggetto e da un importantissimo periodo di riabilitazione graduale e controllato. Il trattamento con il concentrato piastrinico riduce il numero di aderenze peritendinee e migliora l'organizzazione della matrice extracellulare e favorisce un corretto allineamento delle fibre collagene. Infine il PRP viene anche utilizzato come veicolo per le cellule staminali di derivazione midollare o adiposa nel trattamento di lesioni particolarmente gravi a carico di tendini, legamenti o articolazioni (Nixon, 2008; Sutter, 2008).

1.4 CELLULE STAMINALI

Le cellule staminali vengono definite tali in base ad alcune peculiari caratteristiche: la capacità di auto-mantenersi, ovvero possono generare una cellula figlia identica alla madre, caratteristica fondamentale per mantenere costante il *pool* di cellule staminali, e a dar luogo a cellule con una minore potenzialità (cellule differenziate). Naturalmente questa definizione di staminalità deve tener conto della potenzialità differenziativa di una cellula che è diversa tra una cellula staminale di origine embrionale ed una cellula staminale che si origina da un tessuto adulto per il rinnovamento continuo del tessuto stesso. Per potenzialità si intende la capacità di una cellula di dare origine a diversi tipi cellulari se esposta a differenti ambienti. Si può parlare di:

-totipotenza: se le cellule sono capaci di originare sia l'embrione che l'extraembrione inteso come formazione degli annessi embrionali (nei Mammiferi i blastomeri sono totipotenti fino allo stadio di otto cellule);

-pluripotenza: se le cellule sono capaci di originare tutti e tre i foglietti embrionali (es. le cellule della massa cellulare interna della blastocisti);

-multipotenza: se le cellule possono originare solo una certa classe o categoria di cellule correlate (es. le cellule emopoietiche del midollo osseo, capaci di originare diversi tipi cellulari del sangue);

-unipotenza: se le cellule sono già determinate in un'unica direzione cellulare (un esempio di questo tipo sono le cellule satelliti del muscolo striato che rimangono quiescenti per lungo tempo e sono riattivate, dopo un evento traumatico o degenerativo, per fornire unicamente nuovi mioblasti che si fonderanno per dare miotubi; la staminalità di queste cellule sta nel fatto che sono capaci di auto-rinnovarsi oltre che di fornire mioblasti).

In base alle conoscenze attuali le cellule staminali vengono divise in due gruppi: cellule staminali embrionali e cellule staminali adulte. Le cellule staminali embrionali ai primi stadi di sviluppo sono

totipotenti, cioè hanno conservato la capacità di differenziarsi in tutti i tessuti dell'animale (anche quelli extraembrionali); l'origine delle cellule staminali embrionali è conosciuta, mentre quella delle cellule staminali adulte non è ancora ben chiara. Si pensa che le cellule staminali adulte riescano a evitare il processo differenziativo tipico delle cellule durante lo sviluppo embrionale e colonizzare appropriate nicchie; queste ultime avrebbero la funzione di mantenere la potenzialità delle cellule nella vita adulta sia di limitarne i processi di differenziamento (Lanza, 2004). La funzione primaria delle cellule staminali adulte è di mantenere l'omeostasi interna all'organismo e di sostituire le cellule danneggiate o morte a causa dell'invecchiamento, di disfunzioni o di danni. Le cellule staminali adulte, secondo la loro localizzazione, possono essere:

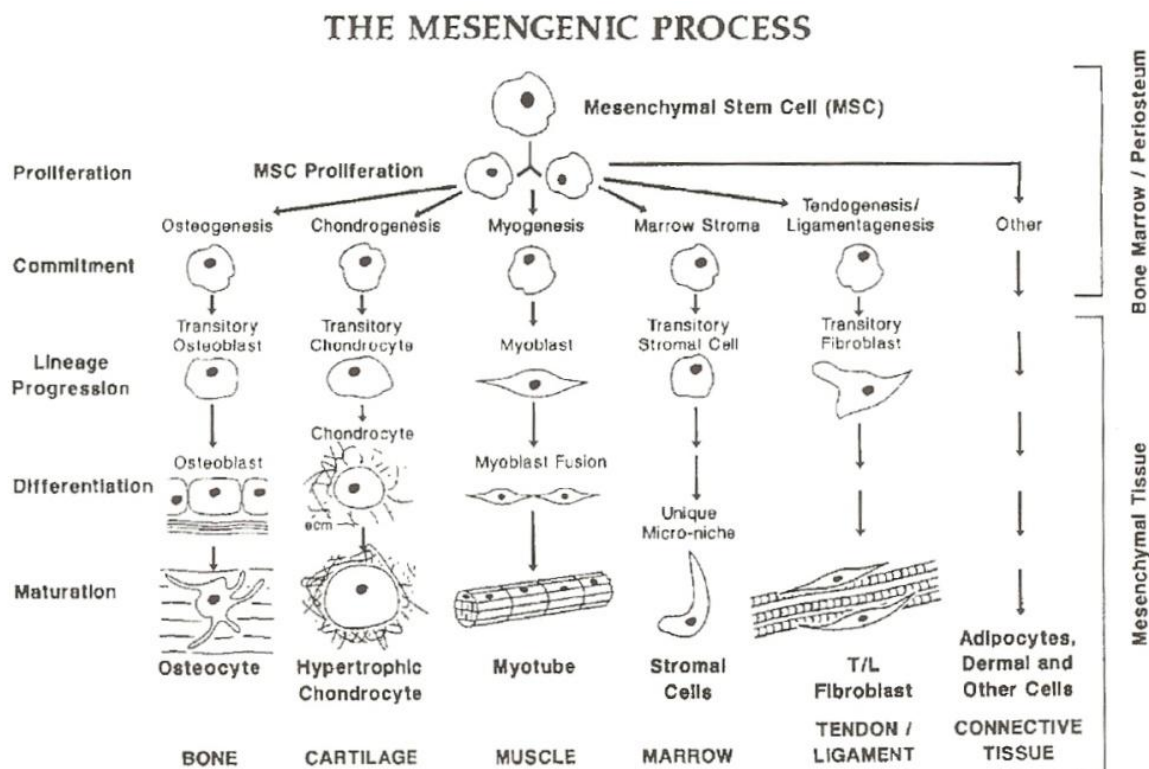
-cellule staminali presenti negli organi: le cellule staminali multipotenti possono essere prelevate dalla maggior parte dei tessuti dell'adulto; queste proliferano e differenziano in condizioni traumatiche o di stress per mantenere l'omeostasi dei tessuti (Labat, 2001).

Esistono, infatti, le cellule staminali del muscolo scheletrico, le cellule staminali neuronali, le cellule ovali del fegato, le cellule staminali delle cripte gastrointestinali e dello strato germinativo della cute;

-cellule staminali midollari: il midollo osseo contiene una popolazione eterogenea di cellule staminali che comprende cellule staminali emopoietiche (HSC, Hematopoietic Stem Cell) e cellule staminali mesenchimali (MSCs); esistono inoltre vari progenitori multipotenti che rappresentano vari stadi differenziativi delle HSC e sono denominati cellule progenitrici adulte multipotenti (CPAM).

A differenza delle cellule staminali embrionali (ES), che hanno la capacità di differenziarsi in tutti i tipi di cellule, le cellule staminali adulte, isolate dal midollo osseo e dai tessuti adiposo, muscolare e del sistema nervoso, hanno una potenzialità differenziativa più limitata. Inoltre la vitalità in coltura delle cellule staminali adulte è più limitata rispetto alle ES cells. Le cellule staminali adulte sembrano non avere una tendenza ad originare neoplasie, caratteristica negativa evidenziata dalle cellule ES. Inoltre le cellule staminali adulte, ottenute le quantità sufficienti, potrebbero servire per auto trapianti senza nessun rischio di risposta da parte del sistema immunitario. Al momento attuale non è ancora possibile stabilire quale dei due tipi cellulari sia il migliore, infatti sembrerebbe che le ES siano adatte per creare nuovi organi seguendo protocolli innovativi che possano superare sia i problemi di etica che le innumerevoli difficoltà tecniche, mentre le cellule staminali adulte sono più utili per riparare danni tissutali da trauma e da alcune malattie degenerative. Ad avvalorare quest'ultima tesi ci sono sempre maggiori evidenze che dimostrano come le cellule staminali adulte siano un sistema naturale per la riparazione dei tessuti: la risposta iniziale ad un danno tissutale sembra essere la proliferazione e differenziazione di cellule

simili alle staminali (stem-like cells) endogene e che nel momento in cui queste si esauriscono, vengono richiamate dal midollo osseo cellule staminali non ematopoietiche. Le cellule staminali mesenchimali adulte (MSCs) sono caratterizzate da una morfologia simile a quella dei fibroblasti (Pittenger, 1999; Chamberlain, 2007), sono cellule multipotenti in grado di replicarsi e, se stimolate opportunamente, differenziarsi in specifiche e diverse popolazioni cellulari (ossee, cartilaginee, tendinee, muscolari etc) e sono capaci di auto replicarsi e di proliferare illimitatamente (Gobbi, 2007; Horwitz, 2002). Queste caratteristiche hanno causato un crescente interesse verso quelle prospettive terapeutiche basate sulla capacità rigenerativa e riparativa di organi e tessuti. Le MSCs possono essere ottenute da diversi tessuti come il midollo osseo, il sangue periferico, il cordone ombelicale, il tessuto adiposo e il derma (Fig.4). Il midollo osseo contiene cellule mesenchimali e cellule staminali ematopoietiche; queste ultime risultano presenti in quantità maggiori rispetto alle MSCs e sono responsabili della genesi di tutte le cellule ematopoietiche. La fonte di staminali maggiormente utilizzata è il midollo osseo, ma poiché questa tipologia di prelievo risulta scomoda, richiede un certo grado di preparazione e competenza, è dolorosa e può comportare dei rischi nell'ottenere il campione, la ricerca si è indirizzata verso nuove fonti di MSCs. Recentemente è stato dimostrato che il sangue venoso periferico può essere considerato una fonte alternativa di MSCs (Koerner, 2006; Martinello, 2009).



Cluster di differenziamento

I *cluster of differentiation* (CD) costituiscono un sistema di identificazione delle molecole di superficie cellulare (per lo più glicoproteine), usati comunemente come *marker* cellulari. I CD possono agire in numerosi modi, ed avere diverse funzioni per la cellula: sono capaci di innescare tutta quella serie di segnali a cascata che sono in grado di modificare il comportamento della cellula, possono essere molecole di adesione o avere altre funzioni. Il sistema CD viene usato come metodo di marcatura cellulare; questo comporta che le cellule vengono definite a seconda di quali molecole vengono espresse nella loro membrana di superficie. Mentre è raro poter identificare una popolazione cellulare con un solo tipo di CD, è comune che una combinazione di *marker* cellulari caratterizzino e siano comuni ad un “tipo cellulare”, che viene quindi descritto come avente questi *marker*. I CD sono utilizzati nella classificazione cellulare utilizzando diversi metodi, incluso la citofluorimetria a flusso. Con questa tecnica la popolazione cellulare viene definita usando un “+” o un “-” per indicare quali cellule esprimano o meno i CD. La classificazione cellulare mediante l’uso di CD è stata applicata anche alle cellule staminali (Smith, 2004).

Le MSCs esprimono un certo numero di marcatori che non sono però specifici per ciascuna MSCs.; esse non esprimono i marcatori delle cellule ematopoietiche e non esprimono molecole co-stimolatorie o di adesione.

Plasticità delle cellule staminali

Cellule staminali adulte del midollo osseo, che normalmente danno origine a cellule mature del sangue, possono, in opportune condizioni e con bassa frequenza, dare origine a cellule muscolari scheletriche, cardiache o lisce, neuroni, epatociti e cellule epiteliali. Per di più cellule staminali neurali possono dare origine a cellule del sangue, cellule muscolari scheletriche e a molti altri tipi cellulari quando trapiantate in un embrione di pollo. Questo fenomeno, definito plasticità ed esteso anche ad altri tipi di cellule staminali (mesenchimali, o isolate dal derma o dalla sinovia) ha importanti implicazioni applicative.

Utilizzo delle cellule staminali

Le cellule staminali mesenchimali sono già state isolate da diversi tessuti e testate per il differenziamento in diverse linee cellulari. Attualmente l’impiego di cellule staminali si sta diffondendo anche in medicina veterinaria per quanto riguarda:

-riparazione dei tessuti scheletrici. Il risultato più eclatante dell'utilizzo in vivo delle MSC è stato ottenuto con il trapianto diretto, al fine di riparare un danno del tessuto osseo o cartilagineo. Le MSC adese ad una matrice, accelerano la neoformazione di osso in vari modelli animali quando vengono impiantate nella sede di un difetto osseo cranio-facciale o di una lesione delle ossa lunghe. Le MSCs consentono di ottenere un miglioramento dell'organizzazione, della sintesi e della qualità della matrice extracellulare del tessuto osseo e possono essere impiegate per agevolare l'integrazione di protesi, per stimolare la riparazione ossea in fratture e per la sostituzione di resezioni ossee. Grazie alle loro caratteristiche di auto-replicazione e differenziamento, le MSCs potrebbero quindi rappresentare un importante contributo nel trattamento delle lesioni ossee, assicurando la restituzione alla normalità anatomica e funzionale del tessuto danneggiato (Bianco, 2001). Inoltre, le MSC sono state utilizzate con successo per rigenerare la cartilagine articolare (Raghunath, 2005). Nel cavallo le cellule staminali mesenchimali sono state studiate anche per la terapia delle lesioni cartilaginee e in particolare per il trattamento di lesioni causate da osteocondrosi, di cisti sub condrali e di tutte le patologie responsabili del deterioramento della cartilagine articolare (Fuchs, 2000; Horwitz, 2002);

-cardiologia. Molti lavori riportano un miglioramento della funzionalità miocardica dopo infusione di cellule staminali mesenchimali in modelli animali di infarto acuto del miocardio. Tuttavia, il meccanismo di quest'effetto benefico rimane oscuro: diversi lavori riportano l'attecchimento delle cellule del donatore nella zona peri-infartuale, ma raramente è stata dimostrata una convincente differenziazione in cardiomiociti e una integrazione funzionale delle cellule differenziate (Lanza, 2004). Diversi meccanismi alternativi sono stati proposti per spiegare il miglioramento della funzionalità cardiaca: ad esempio l'induzione dell'angiogenesi, la diminuzione dei fenomeni apoptotici e l'aumentata produzione di collagene (Lanza, 2004).

-oculistica. La superficie oculare genera due tipi distinti di cellule epiteliali, la congiuntiva e la cornea, benché esse siano anatomicamente continue sul limbo sclero-corneale. Le cellule staminali della cornea risiedono proprio nel limbo sclero-corneale, dove è molto importante anche il microambiente per il mantenimento delle stesse. Le cellule staminali del limbo agiscono da barriera contro le cellule epiteliali della congiuntiva e normalmente prevengono la loro migrazione sulla superficie della cornea. In certe condizioni, comunque, le cellule staminali del limbo possono essere parzialmente o totalmente deplete, provocando vari gradi di anormalità corneale. Tale carenza di cellule staminali limbiche conduce alla "congiuntivizzazione" della cornea con aumento della vascolarizzazione, presenza di cellule caliciformi e formazione di un epitelio irregolare e instabile; tutto questo porta alla riduzione della vista. La parziale carenza di cellule staminali può essere

gestita rimuovendo l'epitelio anormale, denudando la cornea (specialmente l'asse visivo) e di conseguenza ripristinando la superficie con cellule derivate dal restante epitelio limbico intatto o prelevate da altri tessuti (Dua, 2000; Arnalich-Montiel, 2008);

-dermatologia. L'epidermide si rinnova tramite una popolazione di cellule staminali che è caratterizzata da un turnover lento, dalla localizzazione nell'epidermide, dalla possibilità di coltivarle in vitro con l'arricchimento di β -1 integrina e di altri fattori di crescita clonogenici per una rapida adesione alla matrice extracellulare (Kolodka, 1998);

-lesioni tendinee. Le attuali terapie delle lesioni tendinee non garantiscono una riparazione tissutale soddisfacente. Il tendine danneggiato si ripara naturalmente, ma il tessuto fibroso che sostituisce quello perso in seguito all'evento traumatico, presenta una morfologia diversa da quella normale. Le fibre collagene del tessuto cicatriziale non sono allineate e compatte come quelle del tendine sano e sono per la maggior parte di tipo III; questi cambiamenti conferiscono al tendine minor resistenza agli insulti. Le MSCs sono in grado di indurre una miglior distribuzione delle fibre collagene e una buona rigenerazione del tessuto tendineo; inoltre il loro utilizzo in una lesione tendinea attribuisce al tessuto delle caratteristiche ecografiche, istologiche e biomeccaniche migliori rispetto a quanto ottenuto dalla guarigione spontanea o dall'utilizzo di altre terapie (Crovace, 2010; Nixon, 2008; Richardson, 2007).

Associazione di MSCs e PRP

Recentemente è stato proposto l'utilizzo di concentrato piastrinico, sia nella sua forma liquida sia in quella gelatinosa, come matrice per l'applicazione di cellule staminali (Everts, 2007; Gobbi, 2007). Lo scopo è di ottenere dalle piastrine attivate la liberazione di diversi fattori di crescita necessari per la differenziazione delle cellule multi potenti. I fattori di crescita liberati dalle piastrine favoriscono la crescita e l'impianto delle cellule staminali e promuovono l'angiogenesi. L'utilizzo combinato di MSCs e PRP ha come importante vantaggio che entrambi i biomateriali sono due composti autologhi, non tossici e biodegradabili.

OBIETTIVO DELLO STUDIO

In medicina umana e veterinaria le patologie teno-desmiche rivestono grande interesse per l'elevata incidenza con cui si verificano, per la difficoltà di ottenere una guarigione completa con un pieno recupero funzionale delle strutture coinvolte e perché comportano lunghi periodi di inattività. I protocolli terapeutici attualmente utilizzati per il trattamento di queste patologie, sono lontani dalla potenzialità di una reale "*restituito ad integrum*". Per tale ragione vi è una continua ricerca di terapie in grado di migliorare la rigenerazione corretta del tessuto danneggiato, stimolando la risposta fisiologica a livello cellulare con l'obiettivo di ottimizzare la qualità della risposta riparativa. L'utilizzo di cellule staminali come strumento di riparazione tissutale costituisce un'importante prospettiva di ricerca in medicina umana e veterinaria. Sempre con maggior interesse ci si avvicina alle prospettive terapeutiche basate sulla capacità rigenerativa e riparativa di organi e tessuti che le cellule staminali offrono.

Un altro biomateriale con potenzialità promettenti nel campo dell'ingegneria tissutale è il concentrato piastrinico. Quest'ultimo contiene infatti un'alta concentrazione di piastrine che, nella loro forma attiva, sono in grado di secernere una grande quantità di fattori di crescita. I fattori di crescita sono in grado di migliorare la guarigione tissutale.

Questa tesi si è posta l'obiettivo di valutare se un utilizzo associato di concentrato piastrinico (PRP) e cellule mesenchimali autologhe (MSCs) può determinare un miglior effetto sinergico sul meccanismo di guarigione tissutale, rispetto all'utilizzo di sole MSCs e di solo PRP. È stato dimostrato che i fattori di crescita liberati dalle piastrine possiedono la capacità di favorire la differenziazione delle cellule staminali verso il destino cellulare e di promuovere l'angiogenesi. Il nostro studio è stato effettuato su un gruppo di nove pecore, nelle quali sono state indotte delle lesioni tendinee a livello del tendine flessore profondo delle falangi. Ciascuna pecora ha subito un trattamento diverso: con MSCs, PRP e infine con l'associazione dei due biomateriali. Uno degli obiettivi che ci siamo posti è di cercare di comprendere la reale efficacia di questi trattamenti attraverso analisi istologiche ed immunoistochimiche dei tessuti trattati. L'esito positivo di tale ricerca, confermato dai rilievi clinici, ecografici ed istologici potrà gettare le basi per aumentare la casistica e la numerosità sperimentale nell'applicazione di queste nuove terapie, volte a migliorare la guarigione tissutale, che sembrano riscuotere risultati sempre più promettenti.

2. MATERIALI E METODI

2.1 SELEZIONE DEI SOGGETTI

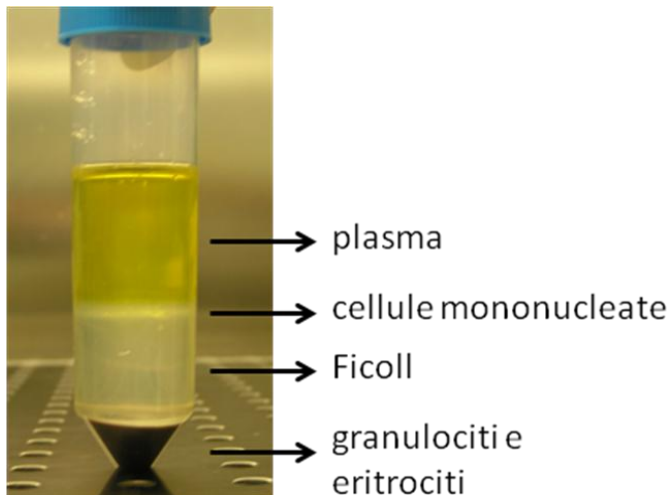
Per questo studio è stata utilizzata la pecora come modello animale nel quale eseguire lesioni sperimentali attraverso un meccanismo il più possibile sovrapponibile a quello che si verifica in vivo permetterà quindi di studiare un protocollo adattabile ad animali d'affezione e di interesse economico, come ad esempio il cavallo.

Sono state trattate in totale 9 pecore adulte, simili per peso, sesso ed età, giudicate sane sulla base di controlli clinici, emato-biochimici e parassitologici completi eseguiti prima dello studio sperimentale. Prima di iniziare lo studio sperimentale tutti i soggetti sono stati stabulati presso le scuderie del Dipartimento di Scienze Cliniche per un periodo di 30 giorni per consentire un buon adattamento degli animali e favorire il loro benessere.

Lo studio sperimentale oggetto del nostro lavoro è stato approvato dal Comitato Etico di Ateneo per la Sperimentazione Animale (CEASA- Ateneo Patavino) ed approvato ai sensi dell'art.9 del D.Lgs. 116/92 con trasmissione del Decreto Ministeriale n.97/2010B rilasciato dal Ministero della Sanità in data 17 maggio 2010.

2.2 ISOLAMENTO DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI (MSCs)

Il protocollo impiegato per ottenere MSCs da sangue periferico è quello già standardizzato nel cavallo grazie ad un lavoro condotto da Martinello et al. 2009. Per eseguire l'estrazione e la caratterizzazione delle MSCs da utilizzare a scopo terapeutico sono stati prelevati circa 100ml di sangue periferico dalla vena giugulare delle pecore da trattare un mese prima del trattamento. Il sangue è stato trattato con un anticoagulante (litio-eparina) e diluito con soluzione fisiologica. L'isolamento delle cellule mononucleate dal resto della popolazione cellulare presente nel sangue periferico è stato eseguito mediante l'utilizzo di Ficoll-paque (GE Healthcare Bio-Sciences AB) che permette di formare, dopo centrifugazione, una densità di gradiente. Il sangue è stato deposto molto



delicatamente su 15 ml di Ficoll-paque precedentemente preparato in una provetta conica da 50 ml. Dopo l'iniziale eliminazione della maggior parte dei globuli rossi per semplice sedimentazione, la provetta è stata centrifugata per 20 minuti a 1600g a 10°C.

Grazie alla centrifugazione si è ottenuto un gradiente formato da 4 fasi distinte:

una fase sovrastante con il plasma, un anello opaco intermedio con le cellule mononucleate tra cui anche i linfociti, il Ficoll ed infine una fase con i granulociti e gli eritrociti. La fase di nostro interesse è l'anello con le cellule mononucleate, questo è stato quindi prelevato e lavato un paio di volte con PBS 1X (*phosphate buffer saline*). Il pellet è stato infine risospeso in DMEM (*Dulbecco's modified Egle's medium* D5671 Sigma) con 20% di FCS, 1% di penicillina-streptomina, 1% di glutammina. Le cellule sono state deposte in fiasche ed incubate in un ambiente umido ad una temperatura costante di 37°C e CO₂ al 5%. I campioni vengono lasciati due settimane senza cambiare il mezzo di coltura per consentire l'adesione cellulare e la formazione di colonie. Successivamente quando sono visibili le colonie di HSCs queste vengono separate ed amplificate. I linfociti presenti nella coltura vengono persi per la loro incapacità di aderire alla plastica.

2.3 COLTURA DELLE MSCS.

Le MSCs ottenute dal sangue periferico di cavallo sono state mantenute in coltura nel terreno di crescita DMEM (*Dulbecco's modified Egle's medium* D5671 Sigma) con 20% FCS, 1% penicillina-streptomina, 1% di glutammina. Durante l'amplificazione non si è mai lasciato che le cellule raggiungessero la confluenza per non ridurre la loro capacità proliferativa, per cui venivano staccate mediante tripsinizzazione (tripsina 0,05%, EDTA 0,02% in PBS 1X). Dopo tripsinizzazione una parte delle cellule ottenute sono state rispese nel terreno di congelamento, composto da: DMEM 80%, DMSO 0.5% (*Dimethyl sulphoxide* Sigma D2650), FCS 20%. Mantenate per almeno 2 giorni a -80° e trasferite successivamente in azoto liquido. Le cellule staminali presenti nel sangue circolante si trovano in uno stato di quiescenza e per attivarle e rendere possibile la proliferazione in coltura si aggiunge il lipopolisaccaride (LPS), che si comporta da agente mitogeno.

2.4 PREPARAZIONE DEL PRP

La preparazione del concentrato piastrinico è stata effettuata presso il Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie dell'Università di Padova.

La metodica di preparazione di cui si sono avvalsi prevede l'impiego di kit sterili dotati di provette con una doppia camera di decantazione e di una centrifuga (SmartPreP2 APC+, Harvest®).



Fig. 1: L'immagine rappresenta in successione: la provetta con doppia camera di decantazione contenente il campione di sangue periferico; l'apposita centrifuga; la provetta a doppia camera di decantazione contenente il campione dopo centrifugazione.

Sono disponibili in commercio tre tipologie di kit: da 20ml, da 60ml, da 120ml. In questo caso è stato scelto di utilizzare il kit da 20ml (18ml di sangue e 2ml di anticoagulante) che permette di raccogliere un volume di 3-5ml di PRP e di raggiungere una concentrazione di piastrine, all'interno di questo volume, 4-5 volte il valore iniziale di plasma.

Il PRP da inoculare alle pecore dello studio è stato preparato il giorno stesso del trattamento e ha richiesto circa un'ora di tempo. Su ciascun soggetto da trattare con PRP è stato eseguito un prelievo di sangue periferico, dalla vena giugulare, di circa 18ml. In seguito al campione sono stati aggiunti 2ml di anticoagulante ACD, ovvero una soluzione di acido citrico, citrato di sodio e destrosio. La soluzione così ottenuta è stata versata, rispettando i principi di sterilità, in un'apposita provetta dotata di doppia camera di decantazione. La provetta presenta una membrana semipermeabile che consente, durante la centrifugazione, la separazione del plasma povero e di quello ricco di piastrine dagli eritrociti e dai leucociti.

Terminata la centrifugazione del campione è seguito il trattamento delle pecore.

2.5 INDUZIONE DELLA LESIONE SPERIMENTALE.

In tutte le pecore, poste in anestesia generale con 0,2 mg/Kg di metadone e 5µg di medetomidine (Domosedan), in decubito laterale, sono state indotte le lesioni per via eco guidata (Ecografo GE Medical System LOGIO P5, con sonda elettronica lineare intracavitaria 6-10MHz, modello I739).

L'induzione della lesione è stata preceduta da un accurato esame ecografico degli arti sia in scansione longitudinale sia trasversale. Per indurre la lesione tendinea è stato deciso di utilizzare l'enzima collagenasi batterio-derivante; tale enzima è già stato utilizzato in diversi studi sperimentali nel ratto, nella pecora e nel cavallo e induce una lesione tendinea con meccanismo simile a quello che si verifica naturalmente (Muttini,2009; Crovace,2010).

Sono state dunque ottenute lesioni tendinee focali con l'ausilio di collagenasi di tipo IA (collagenasi type IA: C-9891, Sigma, Milan, Italy). 500 U.I., diluite in soluzione fisiologica con un volume finale di 0.13ml, sono state inoculate, per via eco-guidata, nel tendine flessore profondo delle falangi degli arti posteriori.

Prima dell'inoculazione, l'arto è stato adeguatamente tricotomizzato e preparato in modo asettico per procedere con l'induzione della tendinopatia.

Per l'iniezione della collagenasi è stato utilizzato un ago 23G sterile, inserito per via percutanea ad una distanza di 15cm, in senso prossimo-distale, dalla sommità calcaneare (Fig.2). Durante la procedura l'arto è stato posizionato in modo che l'articolazione del tarso presentasse un angolo di flessione di circa 90° e che il nodello risultasse iperesteso. L'ago è stato fatto penetrare mantenendo un'inclinazione obliqua della punta caudo-prossimale e cranio-distale. Al termine della procedura è stato applicato, nell'arto trattato, un punto di sutura cutaneo sulla superficie mediale dell'arto alla stessa altezza del punto di inoculo in modo da individuare il punto esatto della lesione nel corso dei controlli ecografici postoperatori.



Fig. 2: Induzione della lesione tendinea tramite iniezione della collagenasi per via ecoguidata

È stata infine applicata una fasciatura leggera nella regione metatarsale, lasciata in situ per 48 ore in modo da limitare l'eventuale edema postoperatorio dei tessuti trattati. Una terapia antibiotica ed antidolorifica (5mg/kg of phenilbutazone) è stata somministrata nei cinque giorni postoperatori.

2.6 TRATTAMENTO LESIONE SPERIMENTALE

Dopo 7 giorni dall'induzione della lesione le pecore sono state trattate.

Le nove pecore sono state suddivise in 3 diversi gruppi, e a ciascun animale è stato trattato l'arto posteriore destro con:

- 1×10^6 cellule staminali mesenchimali in 1 ml di acido ialuronico
- 970×10^3 piastrine μl^{-1}
- 1×10^6 cellule staminali mesenchimali e 970×10^3 piastrine μl^{-1}

L'arto posteriore controlaterale è stato trattato con 1ml di soluzione fisiologica sterile (arto lesionato e non trattato) e un arto anteriore è stato prelevato come controllo ro. in modo da sfruttare l'arto come controllo dei fisiologici processi di riparazione, della velocità e delle modalità di guarigione del tessuto tendineo.

Al termine di ciascun trattamento ogni pecora è stata sottoposta ad una terapia antibiotica e ad una terapia analgesica; non è stata effettuata nessuna terapia antinfiammatoria per evitare l'eventualità che l'azione dei farmaci potesse inibire l'effetto del trattamento.

2.7 VALUTAZIONI CLINICHE ED ECOGRAFICHE.

Dopo il trattamento delle pecore con MSCs e/o PRP è seguito il monitoraggio dei processi di guarigione. Questo è avvenuto tramite visite cliniche ed esami ecografici pianificati ad intervalli regolari (30, 60 e 90 giorni dal trattamento) che si sono protratti fino al momento del sacrificio degli animali.

Durante le visite cliniche sono stati valutati la presenza di zoppia, tumefazioni, calore o altre alterazioni a carico degli arti, postura e andatura degli animali.

Nei controlli ecografici eseguiti dopo il trattamento, i parametri oggetto di valutazione sono stati: l'allineamento delle fibre collagene, l'ecogenicità delle immagini e le dimensioni delle alterazioni tissutali.

2.8 PRELIEVO POST-MORTEM.



Fig. 3: Prelievo post-mortem dei tendini per l'esame istologico

Dopo 4 mesi biomateriale dal trattamento, ciascun animale è stato sacrificato. Da ogni pecora è stato prelevato il tendine flessore profondo delle falangi dell'arto trattato comprendendo le porzioni prossimali e distali alla lesione, in modo da poter valutare microscopicamente il processo di guarigione. E' stato prelevato anche l'arto contro laterale, lesionato e non trattato e valutato come controllo del fisiologico processo di guarigione.

Durante il prelievo post-mortem dei tendini flessori è stato applicato, su ciascun tendine, un punto di sutura ad una distanza prestabilita dal punto di inoculo dell'enzima collagenasi; in questo modo, dopo l'asportazione del tendine, è stato possibile individuare l'esatta posizione della lesione e indirizzare i tagli istologici nel punto in cui con maggior probabilità sarebbe stato possibile rinvenire le alterazioni tissutali. Mediante analisi istologica ed immunohistochimica sono stati valutati l'andamento delle fibre collagene presenti, il grado di neovascolarizzazione, la cellularità del tessuto e l'espressione dei diversi tipi di collagene (tipo I e III).



Fig. 4 e 5: applicazione del punto di sutura ai tendini per facilitare la successiva localizzazione della lesione

2.9 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI.

I tendini prelevati da ciascun animale sono stati suddivisi in segmenti da 1 cm ciascuno e ogni parte è stata posta all'interno di una biocassetta e numerata procedendo in direzione prossimo-distale.

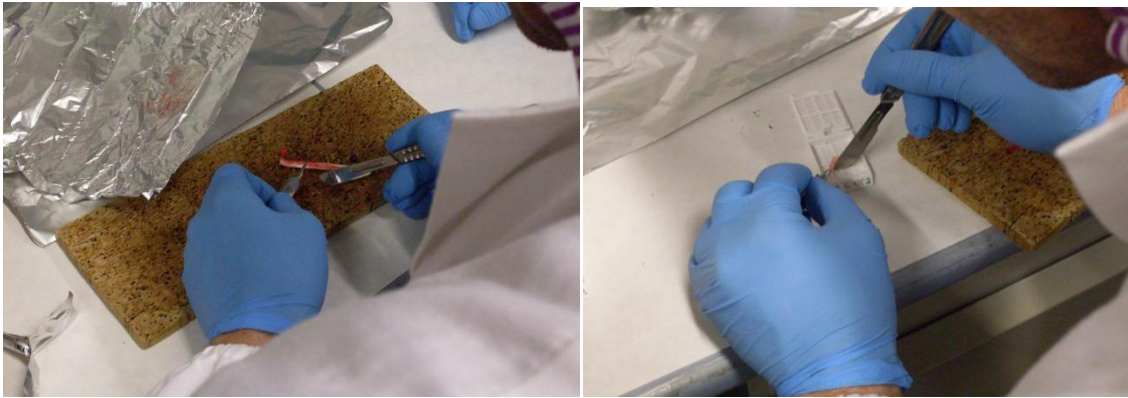
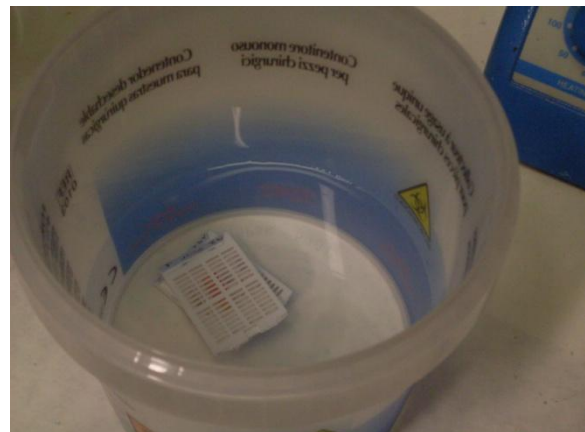


Fig. 6 e 7: preparazione dei segmenti tendinei: ogni tendine è stato tagliato in segmenti che sono poi stati alloggiati all'interno di biocassette

In seguito, tutti i segmenti sono stati fissati tramite immersione della biocassetta in una soluzione di paraformaldeide al 4% ad una temperatura di 4°C per una notte. Dopo questa fase, i segmenti sono stati disidratati attraverso passaggi seriali in soluzioni sempre più concentrate di etanolo (70°, 90°, 95° e 100°). Avvenuta la completa disidratazione dei segmenti, i campioni sono stati sottoposti a dei bagni di chiarificazione tramite xilolo e alla successiva inclusione in paraffina liquida a 60°. La paraffina è in grado di penetrare completamente nel tessuto e di sostituire in modo stabile e duraturo tutti gli spazi che prima erano occupati dallo xilolo.

Fig.8: biocassetta, contenente il segmento tendineo, immersa in para formaldeide al 4%



La processazione dei tendini è stata eseguita automaticamente con l'ausilio dell'apparecchio "Shandon Cittadel 1000". I segmenti inclusi in paraffina sono stati sottoposti al taglio al microtomo per ottenere delle sezioni longitudinali dello spessore di 5µm, anch'esse numerate; quest'ultime sono state raccolte su vetrini portaoggetti e poi destinate alle colorazioni ematossilina-eosina, tricromica di Masson e tricromica di Mallory e alla metodica immuno-istochimica.

2.10 COLORAZIONE DEI CAMPIONI.

Per l'indagine istologica dei campioni tendinei sono state utilizzate le colorazioni ematossilina-eosina, tricromica di Masson e tricromica di Mallory.

Colorazione ematossilina-eosina.

La colorazione ematossilina-eosina viene effettuata in modo manuale e consta di diverse fasi: sparaffinatura, idratazione, colorazione e disidratazione. Per sparaffinatura s'intende l'eliminazione della paraffina mediante trattamento con il solvente xilolo per 15 minuti. Successivamente si elimina il solvente con l'etanolo, facendo percorrere ai vetrini la serie discendente degli alcoli (100°, 95°, 75° e 50° C). Dopo un risciacquo in acqua distillata, i vetrini si colorano con l'ematossilina di Harris, immergendoli nel colorante per circa 12 minuti. Si prosegue con un lavaggio in acqua di fonte per 5 minuti per eliminare il colorante in eccesso, un risciacquo con acqua distillata ed infine alcuni secondi in HCl 1% per farne virare la tonalità verso il viola. Dopo aver ripetuto il lavaggio in acqua di fonte e i risciacqui in acqua distillata, si procede con la colorazione mediante eosina per circa 40 secondi. A questo segue la scala ascendente degli alcoli (50°, 75°, 95° e 100°C) e la chiarificazione in xilolo. Dopo quest'ultima fase i vetrini sono pronti per essere montati in balsamo sintetico (EUKITT, Kartell).

Nelle sezioni colorate con ematossilina-eosina sono stati analizzati l'organizzazione tissutale, la densità e le caratteristiche dei fibroblasti e la neovascolarizzazione.

Colorazione tricromica di Masson.

La colorazione tricromica di Masson è stata utilizzata per visualizzare le fibre collagene e la neovascolarizzazione in modo più evidente. In tale colorazione si procede alla sparaffinatura e all'idratazione con la scala discendente degli alcoli come nella colorazione con ematossilina-eosina.

I vetrini vengono trattati con il mordente in soluzione di Bouin preriscaldato a 56°C per 15 minuti. Si raffreddano in acqua corrente per rimuovere l'eccesso di colorante dalle sezioni e si colora con l'ematossilina di Harris. Dopo un lavaggio in acqua corrente per 5 minuti e un risciacquo in acqua distillata, i vetrini si colorano nella soluzione Ecarlate di Biebrich-Fucsina acida per 5 minuti.

Si prosegue con un risciacquo in acqua distillata e si collocano i vetrini nella soluzione acido fosfotungstico/acido fosfomolibdico per 5 minuti; si prosegue poi con la colorazione nella soluzione blu di anilina per 5 minuti ed infine nella soluzione acido acetico 1% per 2 minuti.

La disidratazione avviene con la scala ascendente degli alcoli e infine si chiarifica in xilolo per 15 minuti; a questo punto i vetrini possono essere montati in balsamo sintetico.

Con questa colorazione i nuclei si colorano di nero, i citoplasmi di rosso e le fibre collagene di blu.

Colorazione tricromica di Mallory.

La colorazione tricromica di Mallory viene utilizzata per la visualizzazione del tessuto connettivo su sezioni istologiche ed è particolarmente indicata per l'evidenziazione delle fibre collagene. Ad una colorazione nucleare ottenuta con carbolfucsina si associa una colorazione del citoplasma con arancio G ed una colorazione estremamente elettiva del collagene con blu di anilina. L'elettività del metodo si basa sul diverso grado di affinità chimica dei coloranti utilizzati per le macromolecole tissutali. In particolare è fondamentale il ruolo dell'acido fosfomolibdico che agisce da ponte fra le strutture tissutali ai cui selettivamente si lega (fibrille del collagene, membrane cellulari ecc.) e il blu di anilina (colorante anfotero). L'altro componente della miscela di Mallory, l'arancio G, non avendo alcuna affinità per l'acido fosfomolibdico colora le restanti strutture (che non hanno formato legami con l'acido fosfomolibdico). Come per le altre colorazioni il primo passaggio è la sparaffinatura e l'idratazione attraverso la scala discendente degli alcoli; si procede con la colorazione in fucsina (10 minuti), il passaggio in acido fosfomolibdico (5 minuti) e infine nella miscela di Mallory (2 minuti). Si disidratano le sezioni con la scala ascendente degli alcoli, si chiarificano in xilene e si montano in balsamo sintetico. Il risultato di questa colorazione è che i nuclei si colorano di rosso e le fibre collagene di blu.

Tecnica immunoistochimica.

L'immunoistochimica rappresenta la metodica di elezione per la localizzazione e l'evidenziazione di molecole e/o strutture intra ed extracellulari su campioni tissutali. In particolare è stata studiata l'espressione del collagene I e III e COMP. La tecnica immunoistochimica adottata si basa sull'utilizzo di anticorpi specifici verso gli antigeni che si desiderano individuare e di opportuni marker coniugati con gli anticorpi stessi in modo diretto o indiretto. Questi marcatori, con diverse

modalità, permettono all'avvenuta reazione tra antigene e anticorpo di rendersi visibile e di essere individuati attraverso la microscopia ottica.

I preparati tendinei inclusi, fissati e tagliati come precedentemente descritto sono stati utilizzati per l'analisi immunoistochimica. Sezioni di 5 µm di tessuto sono state sparaffinate in xilolo e idratate attraverso passaggi nella scala discendente degli alcoli. Dopo un lavaggio in PBS 1X sono stati bloccati i siti di legame non specifici incubando le sezioni con del siero fetale bovino al 5%. Successivamente le sezioni sono state incubate per una notte alla temperatura di 4°C in ambiente umido, con i seguenti anticorpi primari:

- anticollagene I, monoclonale (1:500, Sigma, C2456);
- anticollagene III, monoclonale (1:500, Sigma, C7805);
- antiCOMP, policlonale (1:100, abcam, ab74524).

Dopo l'incubazione si inoculano le sezioni con l'anticorpo secondario, che si lega al primario e ne permette la visualizzazione, e si lascia in incubazione per 1 ora.

Dopo alcuni lavaggi in PBS l'anticorpo secondario viene rilevato mediante il Vector Kit (Vector laboratories, PK7800). Lo sviluppo è avvenuto in una soluzione di 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂ per 3 minuti; dopo un lavaggio in acqua di fonte le sezioni sono state disidratate tramite la scala ascendente degli alcoli e successivamente montate con Crystal Mount-Aqueous Mounting Medium (Sigma) e sono state osservate mediante microscopio ottico Olympus BX50.

2.11 VALUTAZIONI ISTOLOGICHE

Lo studio dei preparati istologici è stato eseguito servendoci di un criterio di valutazione utilizzato in due studi pubblicati recentemente (Nixon, 2008; Maia, 2009) e dai noi modificato per garantire una maggiore uniformità dei rilievi raccolti (Tab.1).

Per ciascuna sezione colorata con ematossilina-eosina sono stati osservati diversi campi per valutare: la densità cellulare e la neovascolarizzazione; ad ogni parametro è stato attribuito un punteggio medio in base alle osservazioni qualitative effettuate: 0 (normale), 1 (lieve aumento), 2 (moderato aumento) e 3 (notevole aumento). Infine è stata valutata l'organizzazione cellulare e, in base a quanto osservato per ogni sezione, è stato attribuito un punteggio: 0 (nessuna), 1 (discreta), 2 (media), 3 (normale). Le colorazioni tricromica di Masson e tricromica di Mallory sono state utilizzate per valutare in modo più approfondito le fibre collagene, in modo particolare la loro

organizzazione e la loro uniformità. Tramite la tecnica immunohistochimica è stato possibile valutare l'espressione del collagene di tipo I, collagene di tipo III e la COMP, analizzando al microscopio ottico le sezioni precedentemente preparate.

PARAMETRI ANALIZZATI	PUNTEGGI
Densità cellulare	0=normale 1=lieve aumento 2=moderato aumento 3=notevole aumento
Morfologia cellulare	Valutazione della tipologia predominante di fibroblasti (tondo o allungata)
Neovascolarizzazione	0=normale 1=lieve aumento 2=moderato aumento 3=notevole aumento
Organizzazione cellulare	0=nessuna 1=discreta 2=media 3=normale

Tab.1: criterio di valutazione utilizzato per dare una valutazione qualitativa delle sezioni.

3.RISULTATI

I risultati ottenuti nei soggetti sottoposti ai tre diversi trattamenti sono stati analizzati e confrontati. In particolare sono stati valutati gli effetti della terapia con MSCs, PRP e associazione di MSCs e PRP paragonandoli ai risultati ottenuti dall'arto di controllo (lesionato e non trattato) e dall'arto anteriore sano.

3.1 VALUTAZIONI CLINICHE

Tutte le pecore sono state sottoposte a controlli clinici ed ecografici ad intervalli regolari. In particolare, al momento della lesione con l'enzima collagenasi è stato effettuato un controllo ecografico con misurazione della circonferenza del tendine flessore profondo. Nelle successive visite cliniche sono stati osservati la presenza di zoppia, di dolore, di tumefazione, calore ed edema nella zona lesionata. Tramite controlli ecografici sono stati valutati il processo di guarigione, l'ecogenicità del tessuto, le dimensioni del tendine in toto e della *core-lesion*. La cadenza con cui sono stati effettuati i controlli è stata: al momento della lesione (contr.-7), il giorno del trattamento, ovvero una settimana dopo l'induzione della lesione (contr.0) e dopo un mese (contr.30), due mesi (contr.60), tre mesi (contr.90) e quattro mesi (contr.120) dal trattamento.

Nell'arto dei soggetti trattati con le cellule staminali mesenchimali è stato osservata una leggera zoppia, scarsa tumefazione e presenza di calore nei controlli clinici effettuati nelle prime due settimane dal trattamento. Al controllo eseguito dopo due mesi dal trattamento questa sintomatologia non era più evidente. La sintomatologia per gli arti trattati con l'associazione di cellule staminali e concentrato piastrinico è stata, anche in questo caso, lieve con moderata zoppia, calore e tumefazione della parte. Dopo 30 giorni dal trattamento si poteva già notare la completa remissione dei sintomi. Infine i soggetti tratti con PRP presentavano, nei primi 15 giorni, zoppia leggermente più intensa rispetto ai soggetti che hanno ricevuto trattamento con le MSCs, calore della parte e dolore. Questa sintomatologia è andata scemando, infatti già al controllo dopo 30 giorni dal trattamento non era più manifesta. Clinicamente sia la tumefazione che calore, zoppia e dolore sono stati invece ben più evidenti e duraturi nell'arto lesionato, ma non trattato (arto controllo).

Riassumendo quindi, nei giorni successivi alla provocazione del danno tissutale con collagenasi sono state osservate, in tutti e nove i soggetti coinvolti, le manifestazioni cliniche caratteristiche di una reazione infiammatoria acuta, ovvero una tumefazione locale da moderata a intensa, calore e dolore alla palpazione della regione colpita. Inoltre, nei primi giorni successivi all'induzione della

lesione tendinea gli animali hanno manifestato una modesta zoppia risoltasi spontaneamente entro breve. Dalle valutazioni cliniche è stato anche possibile notare che l'arto trattato ha avuto una remissione più rapida dei segni clinici rispetto all'arto di controllo. Il trattamento sperimentale è stato ben tollerato da tutti gli animali, che non hanno manifestato disagio o segni clinici sfavorevoli. In particolare la sintomatologia nei soggetti appartenenti al gruppo trattato con MSCs non si discosta molto dai rilievi clinici dei soggetti trattati con MSCs e PRP e da quelli trattati esclusivamente con PRP.

3.2 VALUTAZIONI ECOGRAFICHE

Attraverso un esame ultrasonografico sono stati valutati l'aspetto ecografico delle lesioni tendinee e l'evoluzione della guarigione tissutale. Qui di seguito sono riportate delle immagini ecografiche rappresentative rilevate nel corso dei controlli effettuati a -7, 0, 30, 60, 90 e 120 giorni dal trattamento delle lesioni (Fig.1).

Grazie alle osservazioni ecografiche è stato possibile notare, fin dai primi giorni successivi all'induzione della lesione con collagenasi, edema peritendineo e perdita di ecogenicità del tessuto tendineo in corrispondenza del sito di infusione della collagenasi e in prossimità di questo. A sette giorni dall'iniezione di collagenasi (Contr.0) è stato possibile rilevare delle aree focali ipoecogene in corrispondenza del sito di lesione a carico del flessore profondo delle falangi; queste aree erano caratterizzate nella maggior parte dei casi da una perdita di allineamento più o meno evidente delle fibre collagene. Nei controlli successivi è stato possibile osservare, a carico dell'arto trattato di tutte le pecore, un progressivo aumento dell'ecogenicità dei flessori profondi delle falangi. Inoltre, nella maggior parte dei soggetti, in prossimità del punto di inoculo sono state rilevate, al prelievo dei tendini dopo soppressione degli animali, aderenze peritendinee del tendine flessore profondo sia con la guaina tendinea sia con il tendine flessore superficiale. Nelle pecore trattate con MSCs (Fig. 1, colonna B) ecograficamente il tendine trattato presentava edema nei controlli eseguiti entro il primo mese, ma già dopo 30 giorni si poteva constatare una buona ecogenicità dei tessuti. L'arto non trattato (Fig. 1, colonna A) invece ha mostrato fino al controllo ecografico eseguito dopo due mesi, una estesa *core-lesion* e dimensioni della circonferenza tendinea maggiori rispetto al trattato. Seguendo l'andamento della guarigione del tessuto nei controlli ecografici della Fig.1, si può notare come la *core-lesion* si riduce quasi completamente già al controllo dopo 30 giorni dal trattamento. Dai controlli ecografici eseguiti nelle pecore trattate solo con PRP (Fig. 1, colonna D), si può notare che il processo di guarigione è stato simile a quello delle altre pecore.

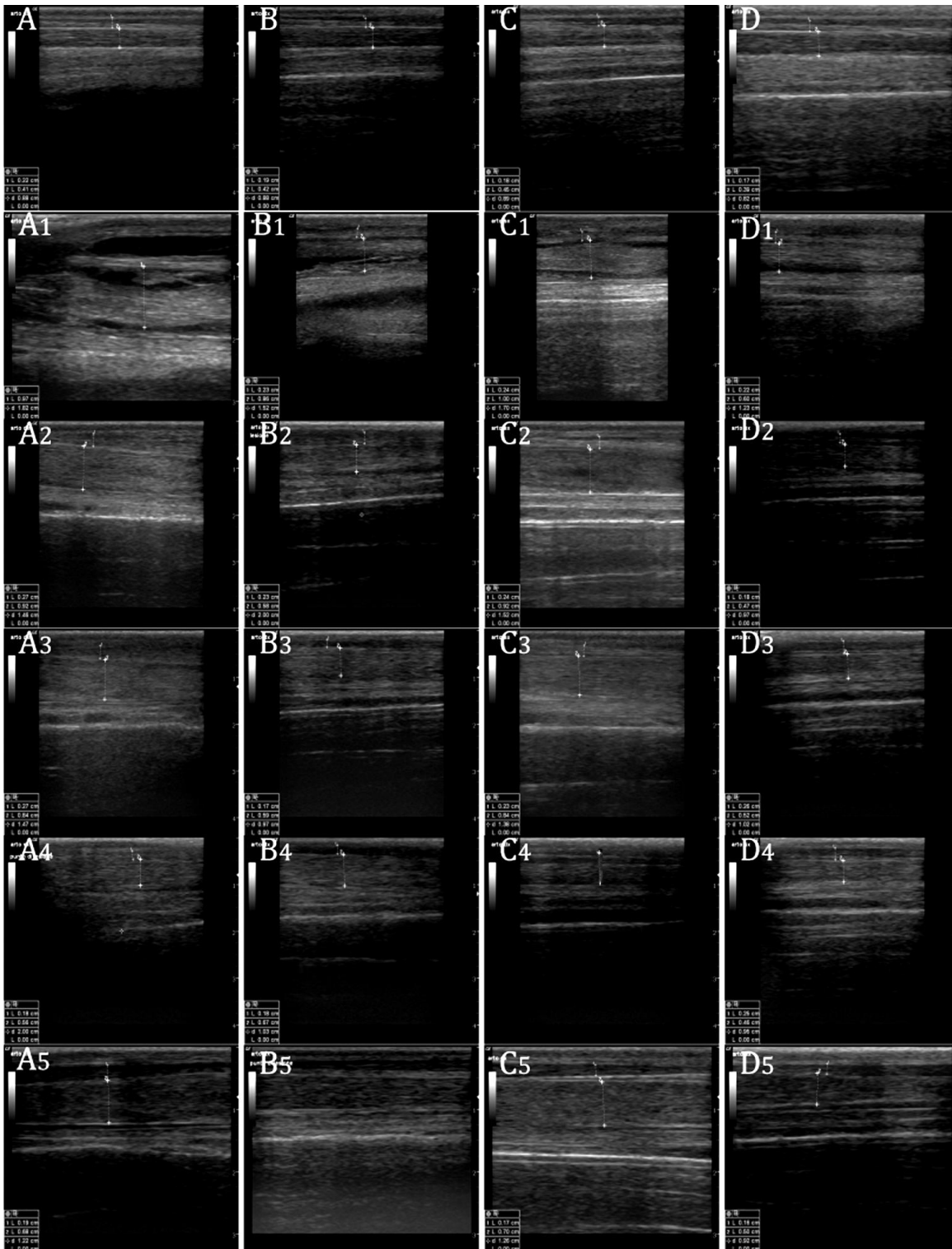


Fig.1: esame ecografico che mostra il processo di guarigione tendinea, dal controllo -7 al controllo 120. A-A5: lesionato-non trattato; B-B5: MSCs; C-C5: MSCs-PRP; D-D5: PRP.

3.3 VALUTAZIONI ISTOLOGICHE

Le sezioni tendinee colorate con le metodiche ematossilina-eosina, tricromica di Masson e tricromica di Mallory , sono state valutate al microscopio ottico, dedicando particolare attenzione

alla struttura della matrice e all'organizzazione delle fibre, alla densità e alla morfologia dei tenociti, alla neovascolarizzazione (Tab.1).

All'esame istologico dei tendini dei soggetti trattati con MSCs (Fig. 2B) si osserva, rispetto ad un tendine sano (Fig 8A), un aumento moderato della cellularità; le cellule hanno nucleo allungato e sono ben distribuite. La matrice appare ordinata, con fibre organizzate e la neovascolarizzazione è molto scarsa. Le sezioni tendinee dei soggetti trattati con l'associazione delle MSCs con PRP (Fig. 2C), mostrano un lieve aumento del numero di cellule, maggiore sia rispetto al tendine sano sia al tendine trattato con sole cellule staminali. La presenza di neovascolarizzazione è esigua e anche in questo caso l'organizzazione tissutale appare buona, con cellule a nucleo allungato e fibre orientate omogeneamente. All'analisi dei tendini trattati unicamente con PRP (Fig. 2D), si constata un aumento poco maggiore del numero di cellule rispetto agli altri due trattamenti, con organizzazione della matrice e morfologia cellulare pressoché sovrapponibile.

In tutti i soggetti la guaina tendinea presenta una vascolarizzazione maggiore rispetto al tessuto sano e anche la densità cellulare è notevole.

Completamente diverso si presenta, invece, il tendine utilizzato come controllo (Fig. 2A), ovvero il tendine lesionato come gli altri, ma che a differenza di questi non ha subito alcun trattamento. Dalle immagini che seguono è possibile osservare come tutti i parametri oggetto di valutazione siano profondamente diversi rispetto ai tendini che hanno subito i tre trattamenti. La quantità di cellule è notevolmente maggiore e la matrice si presenta disorganizzata, sebbene in alcune zone cominci ad apparire una lieve organizzazione.

PARAMETRI VALUTATI	Soggetti trattati con MSCs	Soggetti trattati con MSCs ePRP	Soggetti trattati con PRP	Arto controllo Lesionato	Tendine sano
Densità cellulare	1	1.5	1.75	2.5	0
Morfologia cellulare	allungata	Allungata- tonda	tonda	tonda	allungata
Neovascolarizzazione	1	1.5	2	2	0
Organizzazione della matrice	2	1.75	1.55	1	3

Tab.1: valutazione morfologica qualitativa media delle sezione colorate con ematossilina-eosina.

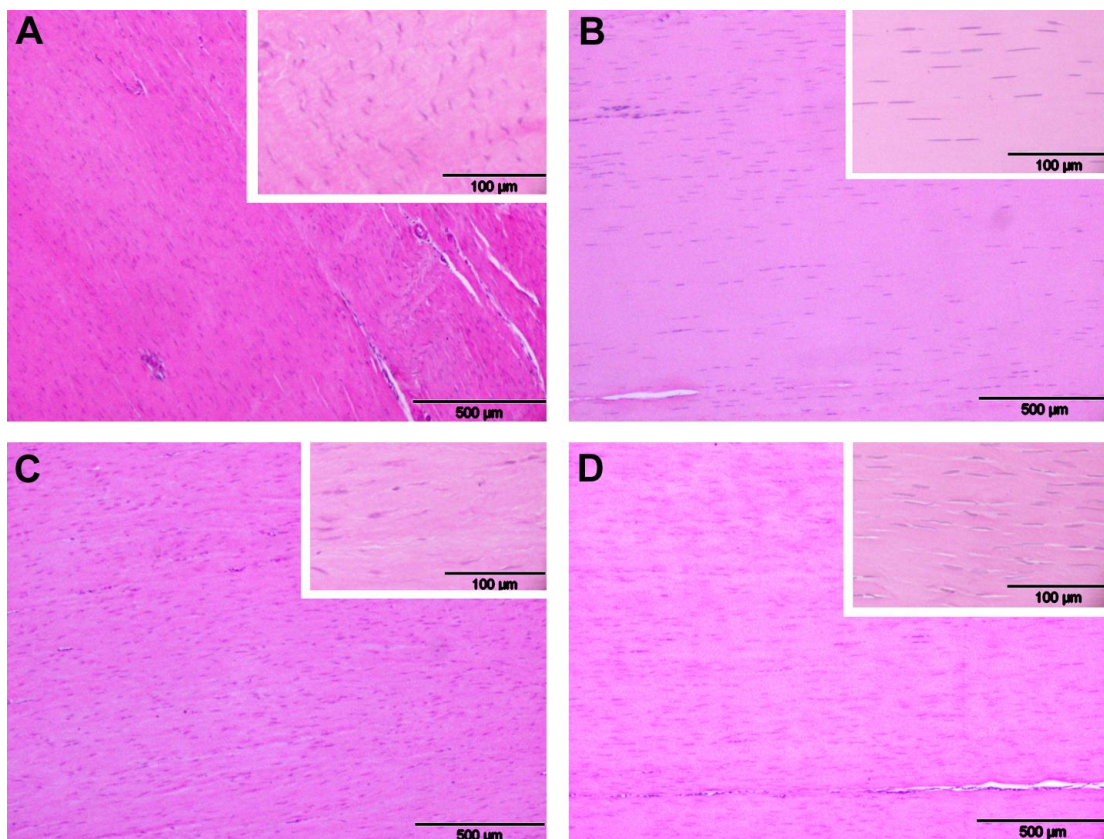


Fig.2: esame istologico dei tendini colorati con ematossilina-eosina. A: lesionato-non trattato; B: MSCs; C: MSCs-PRP; D: PRP.

Le immagini che seguono, mostrano le sezioni tendinee colorate mediante colorazione tricromica di Masson (Fig. 3) e colorazione di Mallory (Fig. 4). Entrambe le colorazioni mostrano come i tendini lesionati e non trattati dopo 4 mesi presentino un'elevata produzione di collagene (in blu) (Fig. 3,4 A) mentre il tendine sano (Fig. 8) ne presenta una ridottissima produzione ed un'elevata presenza di citoplasma cellulare (in rosso). Le immagini relative ai tendini trattati sia con MSCs (Fig. 3,4 B) che con l'associazione delle MSCs e PRP (Fig. 3,4 C) mostrano una colorazione simile al tendine sano, ovvero una ridotta produzione di collagene. I tendini trattati con solo PRP (Fig. 3,4 C) presentano invece ancora una moderata produzione di collagene.

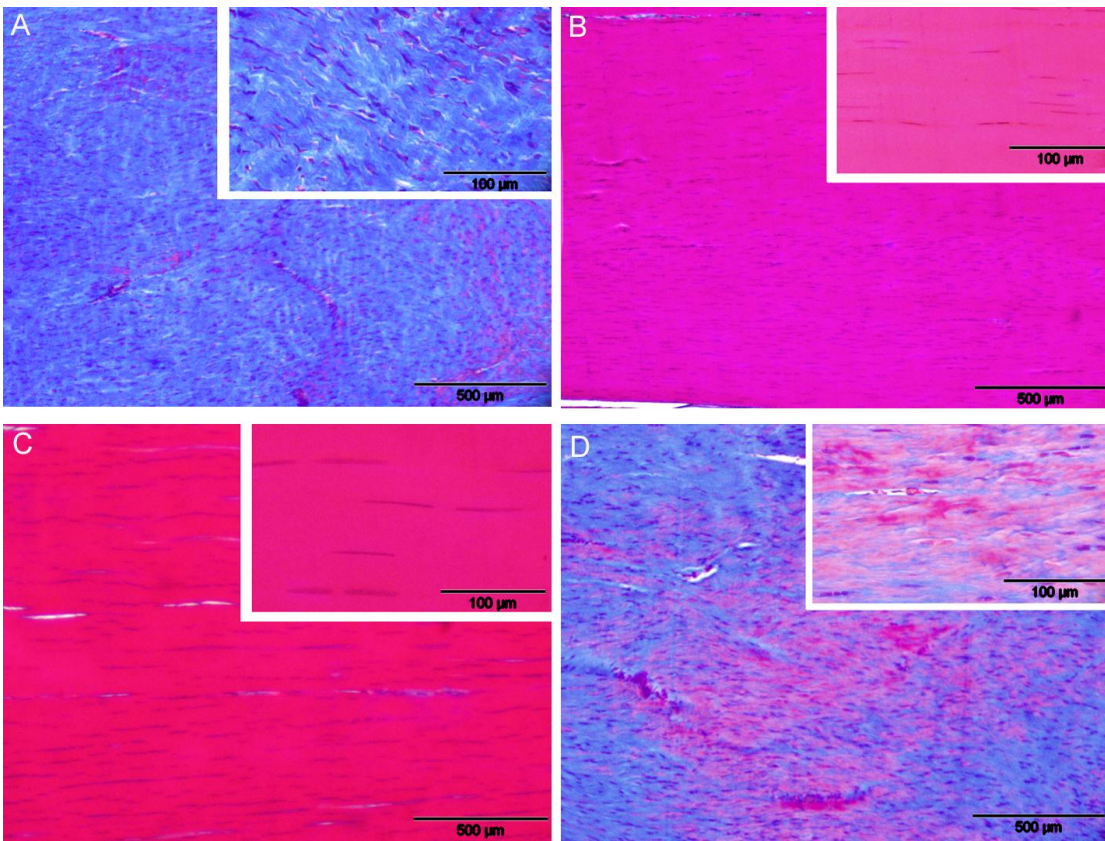


Fig.3: sezioni tendinee colorate con la metodica tricromia di Masson. A: lesionato-non trattato; B: MSCs; C: MSCs-PRP; D: PRP.

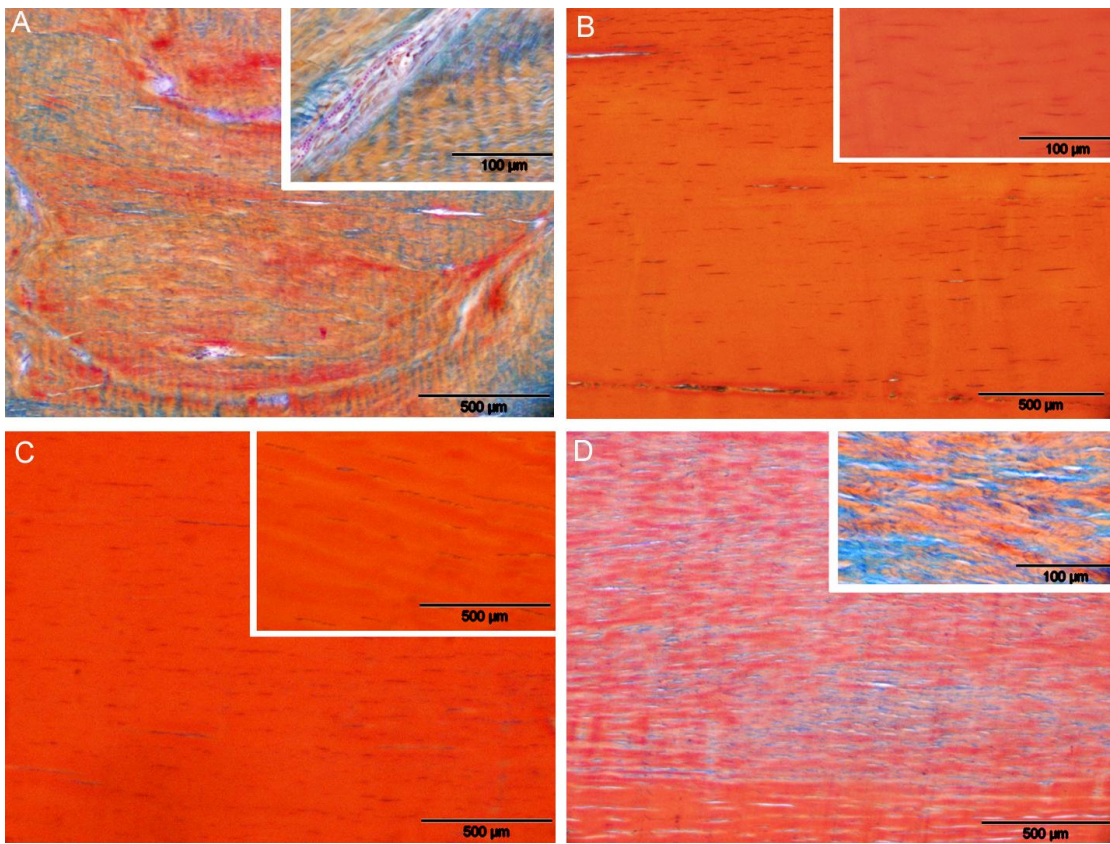


Fig.4: tendini sottoposti a colorazione tricromica di Mallory. A: lesionato-non trattato; B: MSCs; C:MSCs-PRP; D: PRP.

3.4 VALUTAZIONI IMMUNOISTOCHEMICHE

I dati ottenuti mediante le colorazioni istologiche sono confermati dai risultati osservati con le colorazioni di immunohistochemica.

Il collagene di tipo I è poco espresso nel tendine sano (Fig. 8B) e nei tendini trattati con i tre diversi trattamenti (Fig. 5 B,C,D), mentre la sua espressione è maggiore nel tendine lesionato ma non trattato (Fig. 5A).

Il collagene di tipo III non è rilevabile nel tendine sano (Fig. 8C) così come nei tendini trattati con MSC, con l'associazione di MSC e PRP e con solo PRP, mentre è espresso nel tendine lesionato ma non trattato (Fig. 6).

Infine è stata analizzata l'espressione della COMP (*cartilage oligomeric matrix protein*) la quale risulta ben espressa nel tendine lesionato e non trattato (Fig. 7A) mentre non è presente né nel tendine sano (Fig. 8D) né nei tendini che hanno subito i tre diversi trattamenti (Fig. 7 B,C,D).

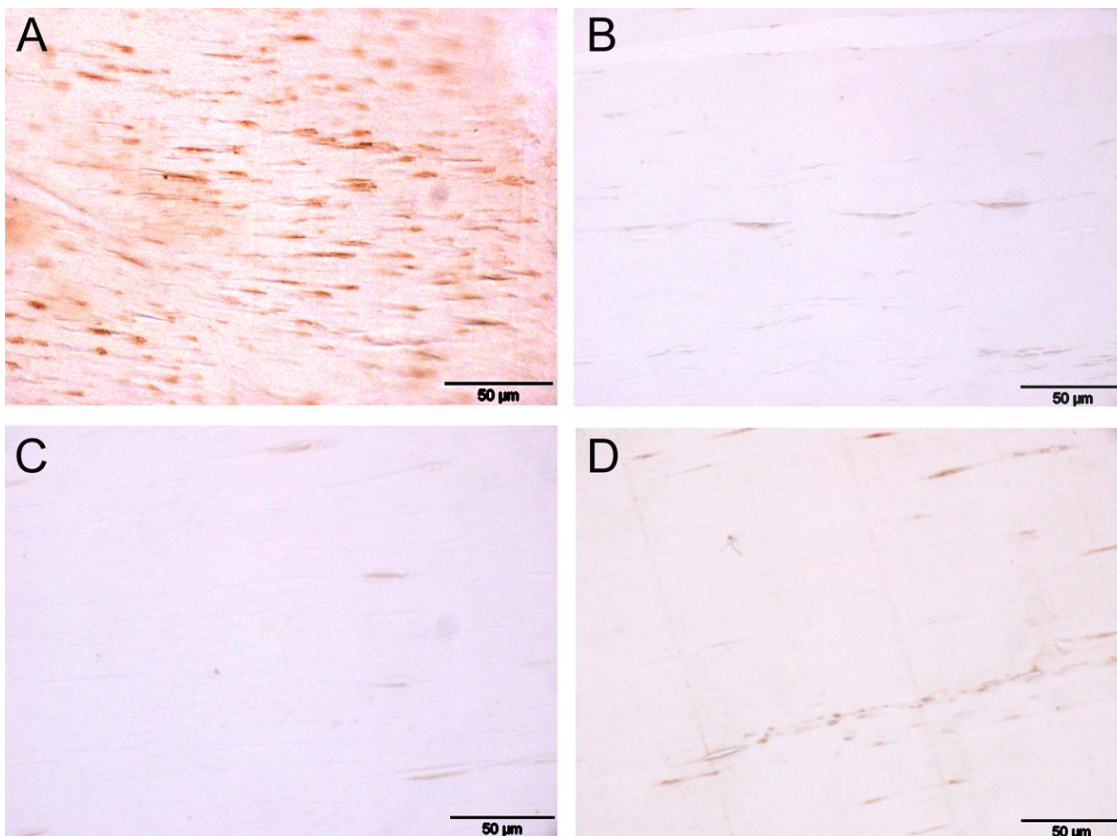


Fig.6: sezioni tendinee che mostrano l'espressione del collagene I. A: lesionato-non trattato; B: MSCS; C: MSCS-PRP; D: PRP.

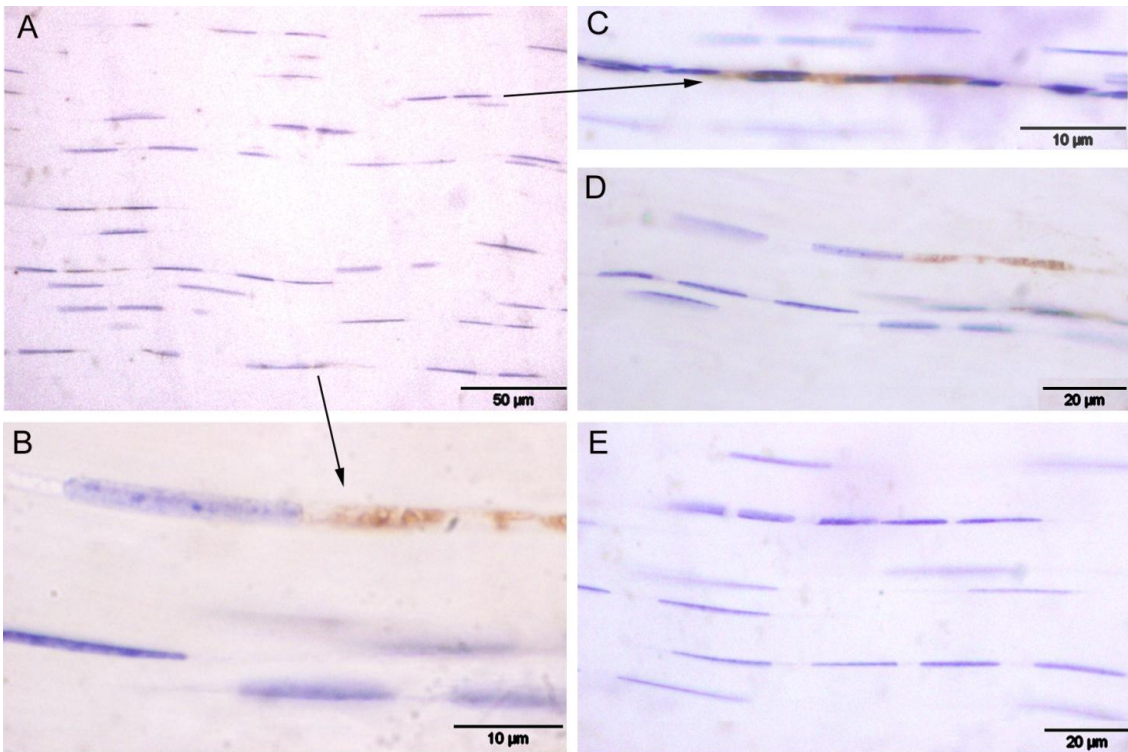


Fig.6: sezioni tendinee che mostrano l'espressione del collagene III del tendine lesionato-non trattato; B, C e D: ingrandimenti significativi di A; E: controllo negativo della reazione istochimica.

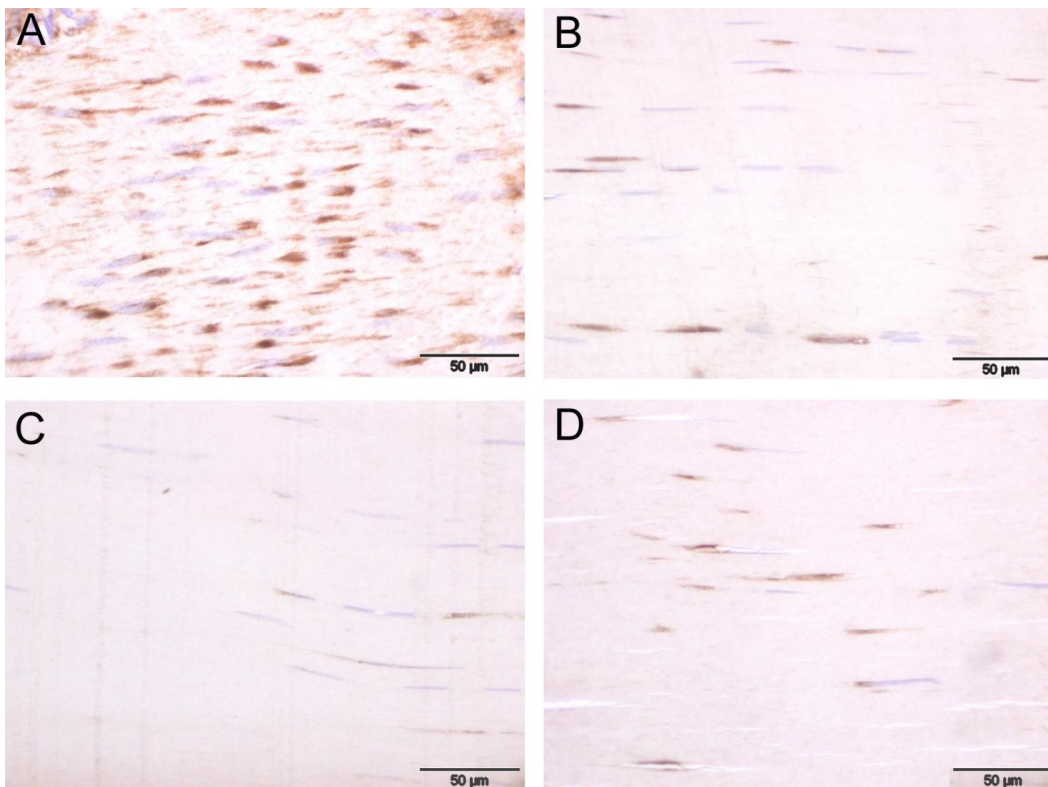


Fig.7: sezioni tendinee rappresentative dell'espressione della comp. A: tendine lesionato-non trattato; B: MSCS; C:MSCS-PRP; D:PRP.

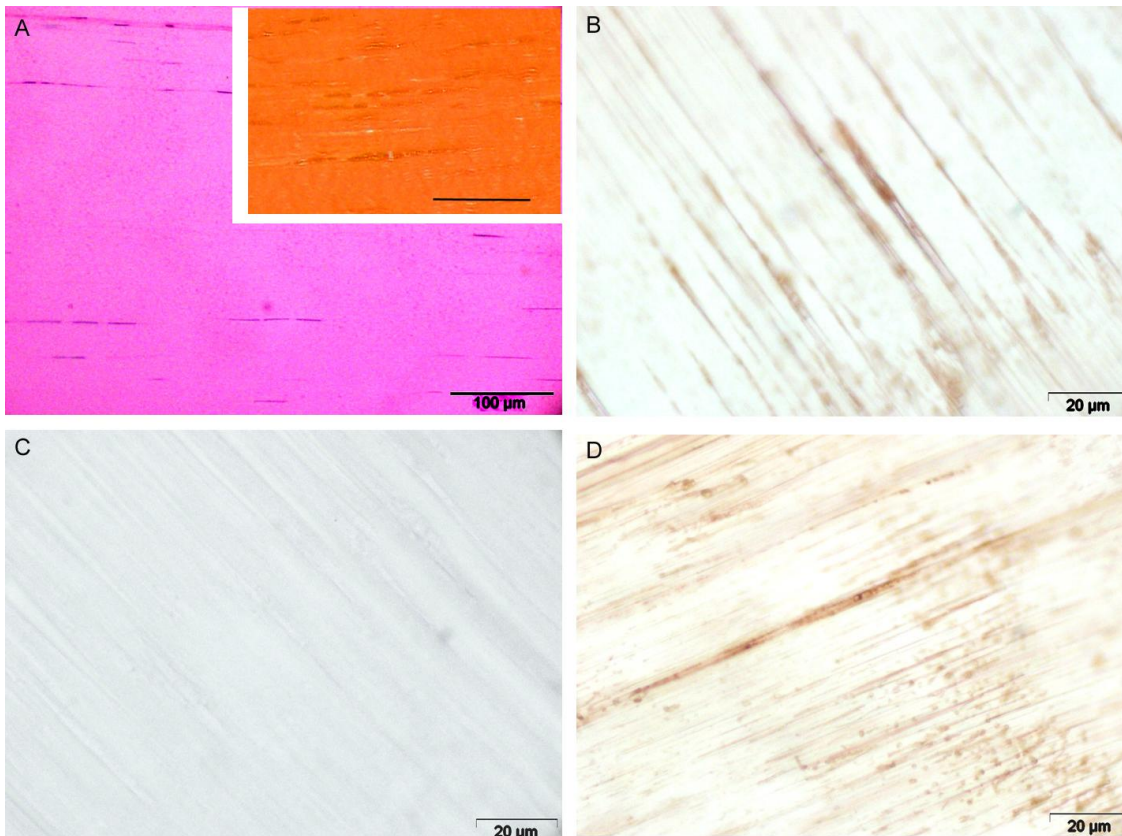


Fig.8: immagini rappresentative del tendine sano. A: colorazione ematossilina-eosina e in rilievo tricromica di Mallory. B: tecnica immunohistochimica che evidenzia l'espressione del collagene I; C: tecnica immunohistochimica che mostra l'espressione del collagene III; D: espressione della COMP con tecnica immunohistochimica.

4. DISCUSSIONE

Negli animali di interesse veterinario, in modo particolare nel cavallo sportivo, le lesioni tendinee e legamentose possono essere conseguenti a un trauma acuto, causato da uno sforzo eccessivo cui è sottoposto il tendine, oppure possono derivare da sollecitazioni ripetute. In genere questo tipo di lesioni comporta lunghi periodi di invalidità e di inattività fisica per l'animale. La guarigione di queste lesioni non sempre è accompagnata da *restitutio ad integrum* delle caratteristiche funzionali e morfologiche tipiche dei tessuti colpiti, per questo motivo spesso si osserva un calo delle performance atletiche del paziente e un'elevata incidenza di recidive.

Le strutture teno-legamentose sono caratterizzate da un processo riparativo lungo, vista l'elevata percentuale di collagene e il ridotto numero di cellule in esse contenute. Le terapie mediche e chirurgiche normalmente impiegate, agiscono con l'intento di bloccare il processo infiammatorio, prevenire ulteriori danni all'interno del tendine, diminuire la tensione e aumentare la vascolarizzazione a livello della *core-lesion*. Tuttavia i protocolli terapeutici convenzionali hanno solo effetti marginali sulla riparazione delle lesioni teno-legamentose e il fattore che influenza maggiormente la prognosi è la gravità della lesione iniziale (Dowling, 2000). In questi anni si è investito molto sulla ricerca al fine di comprendere se sia possibile ottenere dei vantaggi dall'impiego di sostanze come le cellule staminali o il concentrato piastrinico nel trattamento delle lesioni teno-desmiche.

Le cellule staminali forniscono un'interessante prospettiva circa il trattamento clinico di alcuni tipi di patologie degenerative o traumatiche in virtù dei loro peculiari caratteri di differenziazione e plasticità. Per quanto concerne il loro impiego nel campo della medicina equina esso, negli ultimi anni, è stato posto al centro di numerose attività di ricerca e studio, le quali hanno permesso di dimostrare compiutamente l'azione rigenerativa delle cellule staminali, principalmente per quanto attiene alle tipologie di danno tendineo o legamentoso (Crovace, 2007; Smith, 2003; Smith, 2008). Ulteriori e più recenti ricerche condotte sulle cellule staminali di tipo adulto hanno permesso, inoltre, di definire come esse siano multipotenti, in quanto capaci di replicarsi e differenziarsi in numerose popolazioni cellulari (Gobbi 2007); nonché munite di capacità di auto-replicazione e di proliferazione illimitata (Arnalich-Montiel, 2008; Harris, 2009; El, Tamer, 2009). Infine, è altresì emerso come esse siano reperibili in una molteplicità di diversi tessuti quali il midollo osseo, il tessuto adiposo ed il sangue periferico (Jiang, 2002; Koch, 2009, Koerner, 2006; Martinello, 2009). È stato dimostrato in vivo che le cellule staminali mesenchimali sono in grado di attribuire al tendine danneggiato caratteristiche ecografiche, istologiche e biomeccaniche migliori rispetto a quanto ottenuto dalla guarigione spontanea o dall'utilizzo altre terapie (Richardson 2007). Queste

scoperte sono responsabili del crescente interesse da parte della ricerca nei confronti di nuove possibilità terapeutiche, basate sull'impiego di cellule staminali per la terapia rigenerativa (Pittenger, 1999; Crovace, 2010).

Un'ulteriore prospettiva divenuta interessante, nell'ultimo decennio, per il trattamento di alcune patologie traumatiche è l'impiego di concentrato autologo di piastrine (PRP). Le piastrine sono molto importanti nella guarigione tissutale poiché hanno proprietà pro-infiammatorie, regolatrici e rigenerative (Marx, 2004; Anitua, 2004; Anitua, 2007; Chaer 2006; Everts 2007). Il vantaggio procurato dall'impiego del PRP potrebbe essere dovuto alla secrezione da parte delle piastrine, in esso contenute, di fattori di crescita in concentrazioni elevate che pare siano in grado di incrementare la velocità di riparazione delle ferite e di ridurre l'infiammazione associata al trauma. (Prades, 2006). In medicina umana l'impiego di PRP per stimolare la rigenerazione tissutale è aumentato notevolmente nel ambito chirurgico (Everts, 2007), in odontoiatria (Rožman, 2007) e chirurgia maxillo-facciale (Anitua, 2004; Marx, 2004), in chirurgia plastica (Anitua, 2004), nel trattamento delle ulcere (Anitua, 2004), in chirurgia ortopedica (Anitua, 2004; Marx, 2004; Everts, 2007; Gobbi, 2007) e oftalmica (Korobelnik, 1966; Anitua, 2004). In medicina veterinaria il PRP trova diverse applicazioni soprattutto in chirurgia equina dove si sono ottenuti risultati incoraggianti per il trattamento di lesioni di varia natura, comprese le patologie muscolo-scheletriche (Carmona, 2006).

L'obiettivo di questo lavoro consiste nel definire e confrontare l'efficacia dell'impiego di cellule staminali mesenchimali autologhe (MSCs), di MSCs associate a concentrato piastrinico (PRP) e di PRP da solo nel trattamento di lesioni indotte sperimentalmente nel tendine flessore profondo delle falangi della pecora. sfruttando un meccanismo patogenetico in grado di creare una lesione quanto più possibile analoga a quella che si sviluppa nella realtà. La lesione tendinea è stata indotta mediante iniezione transcutanea di collagenasi; questa metodica, secondo quanto descritto in letteratura (Muttini 2009, Crovace 2008, Maia 2009 Crovace 2010), consente di indurre un tipo di lesione tendinea detta *core lesion*, che generalmente è possibile riscontrare a carico delle strutture tendinee che vanno incontro a un danno strutturale a causa di un trauma acuto o di microtraumi ripetuti nel tempo. Per ottenere una corretta visualizzazione dell'infissione dell'ago per via transcutanea e dell'iniezione dell'enzima collagenasi tutti i trattamenti sono stati eseguiti per via eco-guidata

La metodica per indurre la lesione e quella per effettuare il trattamento hanno causato in tutti i soggetti una vascolarizzazione della guaina maggiore rispetto al tessuto sano e ad una densità cellulare notevole. Questo è probabilmente dovuto alla manualità con cui sono stati effettuati la

lesione e poi il trattamento, infatti l'ago utilizzato per l'iniezione della collagenasi e quello per il trattamento, provocano un certo traumatismo, oltre che al tendine stesso, anche ai tessuti circostanti. Come già evidenziato da Maia,2009 gli animali manifestano segni clinici di zoppia, calore, dolore e tumefazione nel sito di inoculo nei cinque giorni successivi all'iniezione di collagenasi, questi effetti possono essere conseguenti alla formazione di un ematoma e dell'edema associato alla flogosi conseguente al trattamento.

7 giorni dopo l'induzione della lesione mediante collagenasi è stato eseguito il trattamento su i tre diversi gruppi di tre pecore ciascuno con MSCs e/o PRP. In tutti i soggetti è stato osservato un progressivo miglioramento della sintomatologia clinica e dopo circa 30 giorni dal trattamento l'edema, il calore e dolorabilità alla palpazione sono scomparsi. Inoltre, è stato possibile determinare che in nessun animale il trattamento ha provocato effetti collaterali locali o sistemici.

Per valutare la risposta dei soggetti, l'evoluzione e l'estensione della guarigione in funzione delle diverse terapie applicate sono stati eseguiti dei controlli clinici ed ecografici nei mesi successivi al trattamento, precisamente dopo 30, 60, 90 e 120 giorni. .

Il monitoraggio ecografico della guarigione ha permesso di apprezzare le dimensioni, la localizzazione e la gravità delle lesioni in base all'ecogenicità delle immagini e all'allineamento delle fibre. In particolare, è stato osservato in tutti i soggetti un miglioramento progressivo delle lesioni a carico dell'arto trattato, senza evidenziare significative differenze tra i tre diversi trattamenti.

120 giorni dopo il trattamento sono stati prelevati i tendini trattati con MSCs e/o PRP , i tendini controlaterali lesionati ma non trattati ed il tendine anteriore sano da sottoporre alle valutazioni istologiche e immunoistochimiche. Le sezioni istologiche marcate con ematossilina-eosina, con la colorazione tricromica di Masson e tricromica di Mallory hanno permesso di valutare qualitativamente l'organizzazione della matrice extra-cellulare e la distribuzione della componente cellulare per stimare la qualità e la velocità del processo di guarigione tissutale.

E' stato possibile osservare che i tendini di controllo, lesionati e non trattati dopo quattro mesi dall'iniezione di collagenasi sono caratterizzati da un quadro istologico alterato rispetto ai tendini sani. Le fibre collagene non sono disposte in modo regolare, vi è una perdita dell'organizzazione tissutale, un'elevata cellularità, caratterizzata da fibroblasti di forma circolare e pochi di forma allungata, ed è presente una elevata neovascolarizzazione maggiore rispetto ai trattati e al tendine sano. La colorazione di Masson e di Mallory indicano, inoltre, un'elevata produzione di collagene, dovuta probabilmente alla rigenerazione tissutale ancora in atto.

All'esame istologico dei tendini dei soggetti trattati con MSCs si osservano, rispetto al tendine sano, un aumento molto moderato della densità dei fibroblasti ed una scarsissima, quasi nulla neovascolarizzazione. Inoltre è possibile evidenziare una buona organizzazione tissutale con fibre collagene disposte regolarmente e infiltrate da fibroblasti allungati, mentre la produzione di collagene non è evidente come si osserva anche nel tendine sano.

Nel gruppo trattato con PRP e MSCs l'esame istologico dei tendini mostra un'organizzazione tissutale e una disposizione di fibre collagene secondo l'asse longitudinale del tendine e una neovascolarizzazione qualitativamente simili a quelle del gruppo precedente; la cellularità presente è di entità leggermente superiore rispetto al gruppo trattato con solo MSCs, la morfologia cellulare rimane comunque in prevalenza allungata. I livelli di produzione di collagene sono simili a quelli osservati nei tendini sani

La valutazione delle sezioni ottenute dalle pecore trattate con PRP ha evidenziato una neovascolarizzazione maggiore rispetto ai gruppi precedenti ma un'organizzazione tissutale discreta e un moderato aumento della densità cellulare rispetto al tendine sano dove però le cellule presentano una morfologia prevalentemente tondeggianti. In queste sezioni è evidente la produzione di collagene e quindi una rigenerazione tissutale ancora in atto.

Nelle tendinopatie l'alterazione della matrice extracellulare, responsabile delle proprietà strutturali e fisiologiche del tessuto, risulta essere il rilievo più evidente; per questo motivo è stata valutata l'espressione di proteine della matrice come il collagene di tipo I, III e la COMP.

La matrice di un tendine sano è principalmente composta da collagene di tipo I, mentre non è espresso il collagene di tipo III; nelle tendinopatie invece predomina la presenza del collagene di tipo III. Nel nostro studio l'immunoistochimica ha permesso di evidenziare, nei tendini controllo lesionati e non trattati, la presenza di produzione di collagene di tipo I e di tipo III; mentre nei tendini sottoposti ai tre diversi trattamenti si evidenzia una scarsa presenza di produzione collagene di tipo I e una completa assenza di collagene di tipo III.

La COMP è una glicoproteina pentamerica che lega il collagene I e possiede funzioni strutturali e metaboliche; la quantità di COMP è direttamente proporzionale alle proprietà meccaniche del tendine, quali la forza tensile e la robustezza. Nelle tendinopatie si verifica una perdita dei componenti della matrice, come la COMP la cui produzione aumenta durante la rigenerazione tissutale. Le nostre analisi immunologiche dimostrano che nei tendini lesionati e non trattati è in atto una elevata produzione di questa proteina, non presente invece né nei tendini sani né in quelli sottoposti ai trattamenti.

Le analisi immunoistochimiche indicano, quindi, che i trattamenti accelerano notevolmente il processo di guarigione, rispetto a quanto accadrebbe fisiologicamente.

Il lavoro di questa tesi è stato preceduto da un medesimo studio dove però i risultati del trattamento venivano valutati dopo solo un mese; il progetto e il modello sperimentale è stato lo stesso. Confrontando i risultati delle sezioni istologiche e immunohistochimiche dopo 1 e 4 mesi, si può constatare come l'efficacia di questi tre trattamenti si manifesti dopo pochi mesi: infatti migliora notevolmente l'organizzazione del tessuto, intesa come distribuzione e allineamento delle fibre e come numero e morfologia cellulare; inoltre la riduzione dell'espressione del collagene I e III ai 4 mesi rispetto ad 1 mese indica che l'organizzazione del tessuto procede in modo positivo. Infatti, come dimostrato negli studi riportati (Carmona, 2006; Wang, 2006), nelle prime fasi di riparazione di una lesione le fibrille collagene di tipo III vengono rapidamente sintetizzate per garantire una certa forza ed elasticità, ma esse non presentano la stessa resistenza allo stiramento del collagene I e di conseguenza non riescono a sopportare un carico massimale. Il processo di guarigione continua nel corso dei mesi successivi con la progressiva sostituzione delle fibrille di tipo III con quelle di tipo I.

Concludendo i risultati ottenuti da questo studio non evidenziano differenze né inconvenienti nell'applicazione clinica delle MSCs sole o associate al PRP in quanto entrambi i trattamenti hanno portato ad un miglioramento della lesione tendinea dopo 4 mesi sia per quanto riguarda l'organizzazione strutturale sia il numero ridotto di cellule presenti.

BIBLIOGRAFIA

- Adamo S.** 2002 *Tessuti connettivi. Tessuto connettivo propriamente detto* in “Istologia” di V.Monesi Piccin editore 2002 V edizione III ristampa 435-498
- Anitua E.** 1999 *Plasma rich in Growth Factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants* The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants,14, 529-535
- Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT.** 2004 *Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration* Thromb Haemost, 91, 4-15.
- Anitua E, Andia I, Sanchez M, et al.** 2005 *Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture* Journal of Orthopaedics Research 23, 281-286.
- Anitua E., Sanchez M., Nurden A.T., Nurden P., Orive G., Andia I.** 2006 *New insights into and novel application for platelet-rich fibrin therapies* Trends in Biotechnology 24, 227-234
- Anitua E., Sanchez M., Orive G., Andia I.** 2007 *The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields* Biomaterials 28, 4551-4560
- Arnalich-Montiel F., Pastor S., Blazquez-Martinez A., Fernandez Delgado J., Nistal M., Alio JL et al.** 2008 *Adipose-derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma* STEM CELLS; 26, 570-579
- Bianco P., Robey P.G.** 2001 *Stem cell in tissue engineering* Stem cell 19,180-192
- Carmona J.U., Arguelles D., Climent F., Prades M.** 2006 *Autologous platelet rich plasma injected intra-articularly diminished synovial effusion and degree of lameness in horses affected with severe joint disease* VCOT
- Chaer R.A., Graham J.A., Mureebe L.** 2006 *Platelet function and pharmacologic inhibition* Vascular and Endovascular Surgery 40, 261-267
- Chamberlain G., Fox J., Ashton B., Middleton J.** 2007 *Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing* STEM CELLS; 25, 2739-2749.
- Cook JL., Kiss ZS., Ptasnik R., Malliaras** 2005 *Is vascularity more evident after exercise? Implications of tendon imaging* AJR 13,157-164

- Crovace M., Francioso E., Hendry J., Valentini V., Potena A.** 2004 *Riparazione di gravi perdite di sostanza ossea nel cane con sostanze osteoinduttiva e cellule stromali di midollo*. In Atti del XI Congresso Nazionale SICV 10-12 giugno 2004 Grugliasco (TO)
- 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 Accepted 9 January 2010
- Dahlgren L.A., Mohammed H.O., Nixon A.J.** 2005 *Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions* Journal of Orthopaedic Research 23, 84- 92
- Dahlgren L.A.** 2005 *Review of treatment options for equine tendon and ligament injuries: what's new and how do they work?* 51 Annual Convention of the American association of Equine Practitioners- AAEP.
- Denoux J.M.** 1996 *Functional anatomy of tendons and ligaments in the distal limb (manus and pes)* Vet. Clin. Of North Am.: Eq. Pract. 1, 10: p 273-322; 1994
- De Rossi R., Ancillero de Oliveira Coelho A.C.** 2009 *Effect of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses*. Acta cirùrgica Brasileira 24(4), 276-281
- Dohan Ehrenfest D.M., Rasmusson L., Albrektsson T.** 2009 *Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF)* Trends in Biotechnology 27(3), 158-167
- Dowling B.A., Dart A.J., Hodgson D.R., Smith R.K.W.** 2000 *Superficial digital flexor tendonitis in the horse* Equine Veterinary Journal 32, 369-378
- Dua H.S** 2000 *Limbal stem cells of the corneal epithelium* Survey of ophthalmology 44, 415-425
- El Tamer MK, Reis RL.** 2009 *Progenitor and stem cells for bone and cartilage regeneration* Journal of tissue Engineering Regenerative Medicine 3,327-337
- Everts P.A., Hoffmann J., Weibrich G., Mahoney C.B., Schonberg J.P., van Zundert A.** 2006 *Differences in platelet growth factor release and leucocyte kinetics during autologous platelet gel formation* Transfusion Medicine 16(5), 363-368
- Everts P.A.** 2007 *Autologous platelet-leucocyte enriched gel basics and efficacy: a novel method to support soft tissue and bone healing* PhD Thesis Catharina Hospital Eindhoven, Netherlands

- Everts P.A., Devilee R.J., Oosterbos C.J., Mahoney C.B., Schattenkerk M.E., Knape J.T., Van Zundert A.** 2007 *Autologous platelet gel and fibrin sealant enhance the efficacy of total knee arthroplasty: improved range of motion, decreased length of stay and a reduced incidence of arthrofibrosis* Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy 15, 888-894
- Everts P.A.M., van Zundert A., Schonberger J.P.A.M., Devilee R.J.J., Knape J.T.A.** 2008 *What do we use: platelet-rich plasma or platelet-leucocyte gel?* Journal of Biomedical Materials Research Part A 85, 1135-1136
- Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G. et al.** 1998 *Muscle re generation by bone marrow-derived myogenic progenitors* Science; 279: 1528-1530
- Ferrari M., Corradi A., Lazzaretti M., De Cillà M., Losi C.G., Villa R., Lanfranchi A.** 2007 *Adult stem cells: prospective for therapeutic application* Veterinary Research Commun 31(1)1-8
- Fotia C., Perut F., Cenni E., Savarino L., Dallari D., Cenacchi A., Fornasari P.M., Giunti A., Baldini N.** 2008 *In vitro effect of platelet gel on human bone marrow stromal cells and endothelial cells for bone engineering precursors* In Atti del X Congresso nazionale IORS, Messina 12-13 settembre, 16
- Fotia C., Cenni E., Avnet S., Salerno M., Baldini N.** 2009 *Effect of platelet rich plasma on differentiation and activation of osteoclast obtained from human blood precursors* In Atti del XI Congresso nazionale IORS, Ancona 12-13 giugno, 33
- Fuchs E., Segre J.A.** 2000 *Stem cells: a new lease on life* Cell 100 (1): 143-55
- Gobbi A.** 2007 *L'impiego delle cellule mesenchimali autologhe e del gel piastrinico per il trattamento delle lesion cartilaginee* Comunicazioni dell'Oasi BioResearch Foundation Gobbi Onlus, Milano, 29-31
- Goodship A.E., Birch H.L., Wilson A.M.** 2004 *The pathobiology and repair of tendons and ligament injury* Vet. Research. 106, 217-221
- Goodship A.E., Brown P.N., Yeats J.J., Jenkins D.H., Silver I.A.** 1980 *An assessment of filamentous carbon fibre for the treatment of tendon injury in the horse* Veterinary Clinical North Am Equine Practice 10, 323-349

- Harris JR, Fisher R, Jorgensen M, Kaushal S, Scott EW et al.** 2009 *CD133 progenitor cells from the bone marrow contribute to retinal pigment epithelium repair* STEM CELLS; 27: 457- 466.
- Henninger** 1993 *Tendon splitting as a treatment for equine superficial digital flebo tendinitis accompanied by structural lesions* Submitted for publication in J.of American Veterinary Medicine
- Henninger** 1994 *Treatment of superficial digital flexor tendonitis* Vet. Clin, of North Am; Eq. Pract. 10,409-424
- Hertel D.J.** 2001 *Enhance suspensory ligament healing in 100 horses by stem cell and other bone marrow components* Proc AAEP 47,319- 321
- Hertel D.J.** 2003 *Clinical use of stem cell and bone marrow components to stimulate suspensory ligament regeneration, diagnosis and management of lameness in the horses* Edited by Ross M.W. – Dyson S.J. Saunders, Philadelphia
- Horwitz E.M.** 2002 *Stem cell plasticity: the growing potential of cellular therapy* Archives of medical research 34, 600-606
- Iacopetti I., Perazzi A., Martinello T., Bronzini I., Busetto R.** 2010 *Utilizzo di concentrato piastrinico autologo (PRP) e cellule staminali mesenchimali autologhe isolate da sangue periferico (e-PB-MSc) in un caso di OCD in un puledro: risultati clinici preliminari* In Atti del XVI Congresso Nazionale SIVE Marina di Carrara 29-31 gennaio 2010
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR et al.** 2002 *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult bone marrow.* Nature; 418: 41-49
- Kahn K.M., Cook J.L., Bonar F., Harcourt P., Astrom M.** 1999 *Histopathology of common tendinopathies: update and implications for clinical management* Sport Med 27(6), 393-408
- Kainer R.A.** 1990 *Anatomia funzionale degli organi di locomozione del cavallo* In Stashak T, Adams', La zoppicatura nei cavalli. Quarta edizione. Edizioni SBM 1-70
- Kaneps A.J.** 2008 *Platelet Rich Plasma: a new treatment for tendon and ligament injuries in horses* Proceeding of New England Equine Medical and Surgical Center
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K.** 2006 *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue.* STEM CELLS; 24: 1294-1301.
- Koch TG, Heerkens T, Thomsen PD, Dean HB.** 2007 *Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood* BMC Biotechnology, 7:26.

- Koch T.G., Berg L.C., Betts D.H.** 2009 *Current and future regenerative medicine — Principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine* The Canadian Veterinary Journal 50, 155-165
- Koerner J., Nesic D., Romero J.D., Brehm W., Mainil-Varlet P., Grogan S.P.** 2006 *Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells* Stem Cells 24, 1613-1619
- Korobelnik J.F.** 1966 *Autologous platelet concentrate as an adjunct in macular hole healing* Ophthalmology; 103, 590-594
- Labat M.L.** 2001 *Stem cells and the promise of eternal youth: embryonic versus adult stem cells* Biomedicine and Pharmacotherapy 54,146-162
- Lanza R.** 2002 *Handbook of Stem Cells* Vol 2 “Adult and Fetal Stem Cells” Edited by R. Lanza. Elsevier Inc. 2004
- Lanza R., Moore M.A.S., Wakayama T., Perry A.C.F.** 2004 *Regeneration of the Infarcted Heart With Stem Cells Derived by Nuclear Transplantation* Circulation research 94,820-827
- Maia L., de Souza M.V., Ribeiro J.I., de Oliveira A.C., Silveira Alves G.E., Benjamin L., Silva Y.F.R., Zandim B.M., Moreira J.** 2009 *Platelet-rich plasma in the treatment of induced tendinopathy in horses: histologic evaluation* Journal of Equine Veterinary Science 29(8), 618-626
- Martinello T., Bronzini I., Decaminada M., Maccatrozzo L., Perazzi A., Iacopetti I., Mascarello, Sampaolesi M., Patruno M.** 2009 *Isolation and characterization of equine peripheral blood-derived mesenchymal stem cells* In Atti del VII Congresso Nazionale Associazione Italiana Morfologi Veterinari Perugia 4-6 giugno 2009
- Martinello T., Bronzini I., Maccatrozzo L., Iacopetti I., Mascarello F., Sampaolesi M., Patruno M.** 2010 *Characterization, differentiation and cryopreservation of equine peripheral blood-derived mesenchymal stem cells (ePB-MSc)* In Atti del XVI Congresso Internazionale Multisala SIVE, Marina di Carrara 29-31 gennaio 2010
- Marx R.E.** 2004 *Platelet-rich plasma: evidence to support its use* J Oral Maxillofacial Surgery 62, 489-496
- Mazzucco L., Balbo V., Cattana E., Guaschino R., Borzini P.** 2008 *Not every PRP-gel is born equa. Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: Fibrinet®, ReagenPRP-kit®, Plateltex® and one manual procedure* Comunicazioni del Centro TrASFusionale e Laboratorio Biotecnologie, Ospedale SS Antonio e Biagio, Alessandria 1-18
- McCullagh K.G., Goodship A.E., Silver I.A.** 1979 *Tendon Injuries and their treatment in the horse* Veterinary Research 105 (3), 54-57

- Monteiro S.** 2008 *Wound cicatrisation and platelet rich plasma* In Atti del 14th ESVOT Congress Munich 10th-14th September 2008 258-260
- Monteiro S., Lepage O., Theoret C.** 2008 *Effects of platelet rich plasma (PRP) on the repair of wounds on the distal limb in horses* In Atti del 14th ESVOT Congress Munich 10th-14th September 2008 306-307
- Muttini A., Mattioli M., Petrizzi L., Varavano V., Sciarrini C., Russo V., Mauro A., Coccolone D., Turriani M., Barboni B.** 2009 *Studio sperimentale sull'allografting di cellule epiteliali amniotiche in lesioni del tendine calcaneale nell'ovino* Atti del XVI Congresso Soc. It. Di Chir. Vet (SICV) Parma 18-19 giugno 2009
- Nickel R.** 1991 *Trattato di anatomia degli animali domestici* Casa Editrice Ambrosiana Milano
- Nixon A.J., Haupt J.L., Dahlgren LA et al.** 2007 *Adipose-derived nucleated cell fractions improve tendon repair in a collagenase-induced tendonitis model*
- Nixon A.J.** 2008 *Come preparare ed applicare il plasma arricchito di piastrine* Atti del XIV Congresso SIVE-FEEVA, Venice (Italy) 332-339
- Nixon A.J.** 2008 *Terapie iniettabili per la tenite: fattori di crescita, aspirato midollare, plasma arricchito o cellule staminali: cosa scegliere?* Atti del XIV Congresso SIVE-FEEVA, Venice (Italy) 332-339
- Nixon A.J., Dahlgren L.A., Haupt J.L., Yeager A.E., Ward D.L.** 2008 *Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendonitis* AJVR 89(7), 928-937
- Nixon A.J., Schnabel L.V., Lynch M.E.** 2009 *Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-I gene-enhance: mesenchymal stem cell improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendons* Journal of Orthopaedic Research 1392-1398
- Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S, Marshak D.R.** 1999 *Multilineage potential of adult Human mesenchymal stem cells* Science 284,143-147
- Prades M.** 2007 *Current trends in OA therapy in horses* in Atti del SECV Proceedings.
- Prades M.** 2007 *Current trends in regenerative medicine for soft tissue musculo-skeletal injury* in Atti del SECV Proceedings.
- Prades M.** 2007 *Platelet rich plasma: a realistic alternative in tissue repair* in Atti del SECV Proceedings.
- Raghunath J., Salacinsky H.J., Butler P.E., Selfalian A.M.** 2005 *Advancing cartilage tissue engineering: the application of stem cell technology* Current opinion in biotechnology 16,503-506

- Richardson L.E., Dudhia J., Clegg P.D., Smith R.** 2007 *Stem cells in veterinary medicine-attempts at regenerating equine tendon after injury* Trends in Biotechnology 25(9), 409-416
- Rosati P., Colombo R.** 1997 *I tessuti* Ermes edizioni, Milano
- Rožman P., Bolta Z.** 2007 *Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries* Acta Dermatoven APA 16, 156-165
- Sharma P., Maffulli N.** 2006 *Biology of tendon injury: healing, modelling and remodelling* Journal musculoskeletal Neuronal Interact 6,181-190
- Smith L. G. Weissman I. L. Heimfeld S.** 1991 *Clonal analysis of hematopoietic stem cell differentiation in vivo* in Proc Natl Acad Sci USA 88, 2788-2792.
- Smith R.K.W., Jones R., Webbon P.M.** 1994 *The cross-sectional areas of normal equine digital flexor tendons determined ultrasonographically* Equine Veterinary Journal 26, 460-465.
- Smith R.K.W, Webbon P.M.** 1996 *The physiology of normal tendon and ligament* In *The equine athlete: tendon, ligament and soft tissue injuries* Proceedings Dubai International Equine Symposium , 55-82
- Smith R.K.W., Zunino L., Webbon P.M., Heinegard D.** 1997 *The Distribution of Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) in Tendon and Its Variation with Tendon Site* Matrix Biology 16,255-271
- Smith R, Schramme M.** 2003 *Tendon injury in the horse: current theories and therapies* in Practice 25,529-539
- Smith R.K.W.** 2003 *Pathophysiology of Tendon injury* In Ross M.V., Dyson S. *Diagnosis and management of lameness in the horse* Ed WB Saunders Philadelphia 616-627
- Smith R.K.W., Korda M., Blunn G.W., Goodship A.E.** 2003 *Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment* Equine Veterinary Journal 35, 99-102
- Smith R.K.W.** 2004 *Stem cell therapy for tendon and ligament injuries-Clinical results* In Proceedings 12 ESVOT Congress, Munich, 187-189
- Smith J.J., Ross M.W., Smith R.K.** 2006 *Anabolic effects of acellular bone marrow, platelet rich plasma and serum on equine suspensory ligament fibroblasts in vitro* Veterinary Orthopaedics Traumatology 19, 43-47
- Smith R.K.W.** 2008 *Mesenchymal stem cell for equine tendinopathy* Disability and Rehabilitation 30, 1752-1758
- Smith R.K.W.** 2008 *Tendon and Ligament Injury* In Proceedings of the Annual Convention of the AAEP. San Diego, CA, USA, 475-501

- Sutter W.W., Kaneps A.J., Bertone A.L.** 2004 *Comparison of hematologic values and transforming growth factor- β and insulin-like growth factor concentrations in platelet concentrates obtained by use of buffy coat and apheresis methods from equine blood* AVJR 65(7), 924-930
- Sutter W.** 2008 *Platelet-rich plasma: an aid to soft tissue healing* Newswire of Edmonton Equine Veterinary Service
- Wang J.H.C.** 2006 *Mechanobiology of tendon* Journal of Biomechanics 39,1563-1582
- Wilmink** 1992 *Functional significance of the morphology and macromechanics of collagen fibres in relation to partial rupture of the superficial digital flexor tendon in racehorse* Research Veterinary Science 53,354- 359