

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA
CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA A CICLO UNICO
IN MEDICINA VETERINARIA

TESI DI LAUREA

**IMPIEGO DI MSCs DA SOLE O IN ASSOCIAZIONE A PRP
NEL TRATTAMENTO DI LESIONI
TENDINEE SPERIMENTALMENTE INDOTTE NELLA PECORA**

**USE OF MSCs ALONE OR IN ASSOCIATION WITH PRP
IN THE TREATMENT OF TENDON INJURIES
EXPERIMENTALLY INDUCED IN SHEEP**

Relatore: Prof.ssa Ilaria Iacopetti

Correlatore: Dott. Marco Patruno

Laureando: Ariella Casanova
Matricola n. 526370/MV

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

Alla mia Famiglia

e

a Patrizia

*Chi ha pazienza
può ottenere ciò che vuole
(Benjamin Franklin)*

INDICE

<u>CAPITOLO 1 INTRODUZIONE</u>	pag. 1
1.1 ANATOMIA MACROSCOPICA	pag. 2
1.1.1 Tendine flessore superficiale del dito	pag. 3
1.1.2 Tendine flessore profondo del dito	pag. 4
1.1.3 Apparato sospensore del nodello	pag. 7
1.1.4 Strutture connettivali annesse ai tendini	pag. 8
1.2 ANATOMIA MICROSCOPICA	pag. 10
1.2.1 La matrice extracellulare	pag. 10
1.2.2 Il collagene	pag. 12
1.2.3 La componente cellulare	pag. 14
1.2.4 Organizzazione vascolare	pag. 15
1.3 CARATTERISTICHE MECCANICHE DEI TENDINI	pag. 16
1.4 EZIOPATOGENESI DELLE LESIONI TENDINEE	pag. 18
1.4.1 Principali meccanismi eziopatogenetici	pag. 21
1.5 DIAGNOSI DI TENITE	pag. 23
1.5.1 Esame ecografico	pag. 24

1.6 TERAPIA DELLE TENITI	pag. 29
1.6.1 Terapia fisica	pag. 29
1.6.2 Terapia farmacologica	pag. 31
1.6.3 Trattamento chirurgico	pag. 32
1.6.4 Nuovi protocolli terapeutici	pag. 34
1.7 GUARIGIONE DELLE LESIONI TENDINEE	pag. 36
1.8 LE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI (MSCs)	pag. 38
1.8.1 I cluster di differenziamento	pag. 40
1.8.2 Plasticità delle cellule staminali	pag. 40
1.8.3 Associazione di MSCs e PRP	pag. 41
1.8.4 Impiego delle MSCs nel cavallo	pag. 41
Trattamento di lesioni tendinee nel cavallo con MSCs	
Trattamento di lesioni cartilaginee nel cavallo	
Trattamento di patologie ossee nel cavallo	
Altri possibili impieghi	
1.9 IL CONCENTRATO PIASTRINICO (PRP)	pag. 45
1.9.1 Le piastrine	pag. 47
La morfologia delle piastrine	
La membrana delle piastrine	
Il citoplasma delle piastrine	

I granuli piastrinici e il loro contenuto	
1.9.2 Meccanismo d'azione delle piastrine	pag. 52
Adesione e attivazione piastrinica	
Cambiamento di forma e secrezione dei granuli	
Aggregazione piastrinica	
1.9.3 Caratteristiche e meccanismo d'azione del PRP	pag. 55
1.9.4 Metodiche di preparazione del PRP	pag. 58
I sistemi manuali	
I sistemi semi-automatizzati	
1.9.5 Impiego del PRP nel cavallo	pag. 62
Trattamento di ferite cutanee nel cavallo	
Trattamento di patologie osteo-articolari nel cavallo	
Trattamento di patologie tenodesmiche nel cavallo	

CAPITOLO 2 STUDIO SPERIMENTALE **pag. 67**

2.1 OBIETTIVO DELLO STUDIO	pag. 67
2.2 MATERIALI E METODI	pag. 68
2.2.1 Selezione dei soggetti	pag. 69
2.2.2 Estrazione, caratterizzazione e coltura delle cellule staminali	pag. 69
2.2.3 Induzione della lesione sperimentale	pag. 70

2.2.4 Trattamenti della lesione sperimentale	pag. 71
2.2.5 Valutazioni cliniche ed ecografiche	pag. 73
2.2.6 Prelievo post-mortem del tessuto tendineo	pag. 75
2.2.7 Preparazione dei campioni per l'esame istologico e immunoistochimico	pag. 77
2.2.8 Colorazione delle sezioni istologiche	pag. 78
Colorazione ematossilina-eosina	
Colorazione tricromica di Masson	
Tecnica immunoistochimica	
2.2.9 Valutazione dell'esame istologico e immunoistochimico	pag. 80

CAPITOLO 3 RISULTATI **pag. 83**

3.1 VALUTAZIONI CLINICHE ED ECOGRAFICHE	pag. 83
---	---------

3.2 ESAMENISTOLOGICO E IMMUNISTOCHEMICO	pag. 96
---	---------

CAPITOLO 4 DISCUSSIONE **pag. 105**

BIBLIOGRAFIA **pag. 113**

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

La struttura fisica del cavallo e le sue capacità motorie sono il risultato di una lenta e progressiva serie di mutamenti verificatisi nel corso del processo evolutivo. Questi cambiamenti hanno portato allo sviluppo d'individui dotati di arti lunghi e potenti, che consentono all'animale di muoversi con agilità e rapidità (Tagliapietra, 2006).

Il cavallo comparve sulla Terra circa trenta milioni di anni prima dell'uomo e dalle ricostruzioni storiche si evince che il suo progenitore fu molto diverso dagli esemplari odierni. Si trattava, infatti, di un animale alto circa trenta centimetri al garrese, con quattro dita sugli arti anteriori e tre su quelli posteriori. In seguito a questo primo esemplare, nel corso dei millenni si sono presentate diverse forme evolutive, caratterizzate da soggetti sempre più robusti e abili nel reperire il cibo e sfuggire ai predatori. Più tardi comparvero individui in grado di poggiare tutto il peso della crescente struttura scheletrica e muscolare su un solo dito centrale. Essi appartenevano al Genere *Equus* e raggiungevano i centotrenta centimetri di altezza al garrese; sarà proprio l'*Equus* a lasciare i propri discendenti (il cavallo della steppa, il cavallo della foresta e il cavallo dell'altipiano) nei vari continenti ed è in questo modo che hanno avuto origine le razze equine che oggi apprezziamo e che sono state selezionate dall'uomo con scopi ben precisi: la velocità, la robustezza, la forza, l'agilità o la bellezza.

Per consentire al cavallo di muoversi con velocità e scioltezza, nel corso della filogenesi gli arti hanno sviluppato uno speciale adattamento, ossia la notevole semplificazione dell'estremità distale fino a ottenere un unico e solido dito, la riduzione della componente muscolare e lo sviluppo dei legamenti accessori molto resistenti (Spinabella, 2002).

I tendini del cavallo sono divenuti, perciò, delle strutture anatomiche molto forti, in grado di sostenere un lavoro notevole sia durante la fase di riposo che durante il movimento. (Goodship, 1994). Questi, operando come elementi elastici, sono in grado di assorbire le forze che si sprigionano al momento dell'impatto dell'arto con il terreno e hanno la capacità di immagazzinare e liberare tale potenza in momenti successivi,

limitando così il dispendio energetico da parte dell'apparato locomotore (Spinabella, 2002).

I tendini flessori delle falangi hanno una notevole importanza funzionale, infatti, il loro ruolo, durante il momento di carico del peso, è duplice:

- fornire supporto al nodello e prevenire l'iperestensione del carpo;
- restituire l'energia accumulata durante l'impatto con il terreno e durante il momento di pieno carico del peso, per favorire la propulsione e il successivo distacco del piede dal terreno (Spinabella, 2002).

I tendini flessori delle falangi sono anche di grande interesse clinico, poiché le tenopatie sono problemi comuni nei cavalli e coinvolgono soggetti di tutte le età e di tutte le attitudini, perciò, costituiscono un danno per il mondo dell'ippica poiché determinano un relativo peggioramento delle performance sportive dell'animale che ne è affetto (Denoix, 1994; Assirelli, 2008)

I tendini e legamenti dell'arto del cavallo sono molto resistenti e contribuiscono all'efficienza della locomozione nelle diverse discipline sportive. Tuttavia, il carico di allenamento e la frequenza delle competizioni cui i cavalli sono sottoposti, sono spesso eccessivi in rapporto all'intensità di lavoro che possono fisiologicamente sostenere. Questo tipo di lesioni rappresenta un problema dal punto di vista del benessere animale, dei costi per le terapie e del tempo necessario per la riabilitazione cui i soggetti sono sottoposti per tornare all'attività sportiva (Wilson, 2004).

1.1 ANATOMIA MACROSCOPICA

I tendini costituiscono la parte terminale dei muscoli degli arti e sono responsabili della loro inserzione allo scheletro (Lin, 2005). Macroscopicamente appaiono lisci e di colore biancastro, nastriformi e, in sezione trasversale, rotondi o ovali (Fig.1). La forma dei tendini è strettamente correlata alla funzione che essi devono svolgere, in rapporto all'azione specifica dei muscoli dai quali dipendono; i muscoli responsabili di 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 (Williams, 1985). Le strutture che soddisfano queste necessità nella porzione distale dell'arto del cavallo, sono principalmente il tendine flessore superficiale del dito (TFS), il tendine

flessore profondo del dito (TFP), e l'apparato di sospensione (LS), composto dal terzo muscolo interosseo (TMI), dallo scudo prossimale e dai legamenti sesamoidei distali (Figg. 2 e 3).

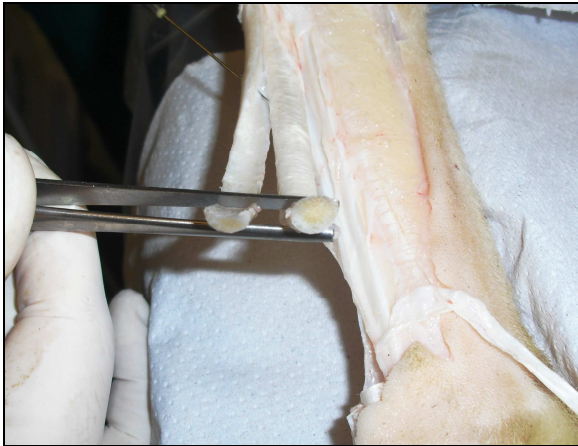


Fig. 1: Sezione trasversale dei tendini flessori delle falangi; il TFS a forma semilunare e il TFP a forma circolare.

1.1.1 Tendine flessore superficiale del dito

Il corpo del muscolo flessore superficiale del dito origina prossimalmente dall'epicondilo mediale dell'omero, con una robusta inserzione tendinea, continua distalmente come tendine flessore superficiale del dito (TFS). Si trova profondamente al capo ulnare del flessore profondo del dito e al flessore ulnare del carpo e contro l'origine del muscolo flessore profondo del dito (Kainer 1990).

Questo tendine origina anche da un capo radiale, o legamento accessorio, che s'inserisce nella porzione caudo-mediale del radio, da sette a dieci centimetri prossimalmente all'articolazione antebrachio carpica (Figg. 11 e 12). Il TFS e il legamento accessorio si fondono in posizione leggermente prossimale rispetto a quest'articolazione (Denoix, 1996). Il TFS in questo punto ha una sezione arrotondata e si porta distalmente attraversando il retinacolo dei flessori (Fig. 3); questo è uno spesso legamento con direzione trasversale che forma il canale del carpo e che ne impedisce l'iperestensione.

Il tendine attraversa il canale del carpo assieme al tendine flessore profondo del dito (TFP) ed è avvolto dalla guaina sinoviale del carpo che si estende da sette a dieci centimetri prossimalmente all'articolazione antebrachio carpica fino al terzo prossimale del metacarpo (Denoix, 1996; Schaller, 1999).

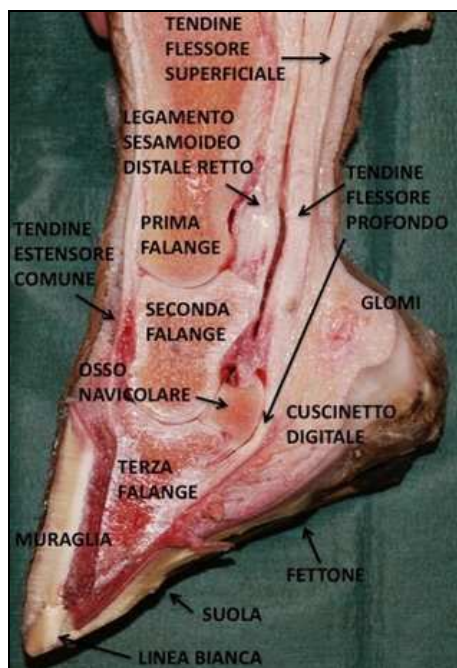


Fig. 2: Preparato anatomico del piede equino; le frecce consentono di identificare le diverse componenti. “Adams’ lameness in horses” (Fifth edition, Lippincott Williams and Wilkins, STASHAK TS, 2002).

Nella regione metacarpale il tendine si appiattisce e assume una sezione a mezzaluna (Fig. 3) con i margini laterali assottigliati; si trova profondamente alla cute e alla fascia sottocutanea e dorsalmente al tendine flessore profondo (Denoix 1996; Kainer 1990). Il TFS raggiunge l’articolazione metacarpofalangea allargandosi e, prossimalmente all’osso sesamoideo prossimale, stacca dai suoi margini una lamina fibrosa, detta manica flessoria. La manica flessoria circonda il tendine flessore profondo e, distalmente all’osso sesamoideo prossimale, diviene sottile nella porzione centrale e si allarga in quelle abassiali (Denoix 1996). Nella porzione distale della falange prossimale il tendine si divide in due branche che si assottigliano distalmente. (Denoix 1996). Le branche s’inseriscono sull’estremità distale della falange prossimale e sull’estremità prossimale della seconda falange, palmarmente ai legamenti collaterali dell’articolazione interfalangea prossimale (Kainer 1990).

1.1.2 Tendine flessore profondo del dito

Il muscolo flessore profondo è costituito da tre capi. Il capo principale, quello omerale, origina sull’epicondilo mediale dell’omero e continua in un robusto tendine. Questo tendine ha inserzione da otto a dieci centimetri prossimalmente all’articolazione

antebrachiocarpica e si unisce agli altri due capi, l'ulnare e il radiale, a livello dell'articolazione antebrachiocarpica (Figg. 11 e 12) (Kainer 1990; Denoix 1996).

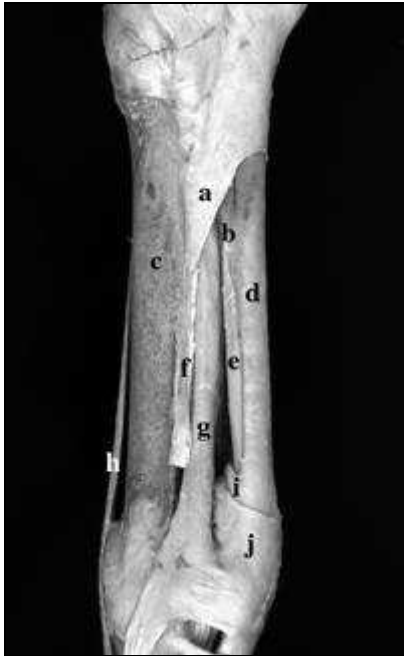


Fig. 3: Veduta mediale della regione carpometacarpica, mostra: a) retinacolo dei flessori; b) legamento accessorio del TFP; c) osso metacarpale terzo; d) TFS; e) TFP; f) osso metacarpale secondo; g) muscolo interosseo; h) tendine estensore digitale comune; i) manica flessoria; j) legamento anulare palmare. (Courtesy-Jean-Marie-Denoix)

Il capo ulnare origina lungo l'ulna mentre quello radiale è un esile capo che origina dalla parte media della faccia caudale del radio e dalla superficie adiacente dell'ulna. (Kainer 1990; Schaller 1999). Il TFP in questo punto ha una sezione trasversale triangolare e scorre nel canale carpale; avvicinandosi al metacarpo, assume una forma più stretta e arrotondata (Fig. 3) (Denoix 1996). Nel canale del carpo il tendine scorre avvolto dalla guaina sinoviale del carpo insieme al tendine flessore superficiale. La guaina avvolge i due tendini fino al terzo prossimale del metacarpo (Denoix 1996). A metà metacarpo nel tendine s'inserisce anche il suo legamento accessorio, o briglia carpica, che origina dal legamento comune palmare del carpo. A questo punto il TFP è formato da una componente laterale robusta e da una mediale più sottile che si fondono completamente nel terzo distale del metacarpo. In seguito alla fusione dei due capi il tendine assume una sezione ovale e passa attraverso la manica flessoria (Denoix 1996). Palmarmente allo scudo prossimale, il tendine si allarga e assume una consistenza fibrocartilaginea. Nella metà prossimale della prima falange il tendine si divide in due porzioni simmetriche, in cui le fibre si dispongono a spirale, e portandosi distalmente alle branche del TFS attraversa la sinoviale della guaina digitale; quest'ultima avvolge

entrambi tendini. All'altezza della metà prossimale della seconda falange, la porzione dorsale del tendine diviene un cuscinetto fibrocartilagineo e distalmente si adatta alla superficie palmare dell'osso sesamoideo distale.

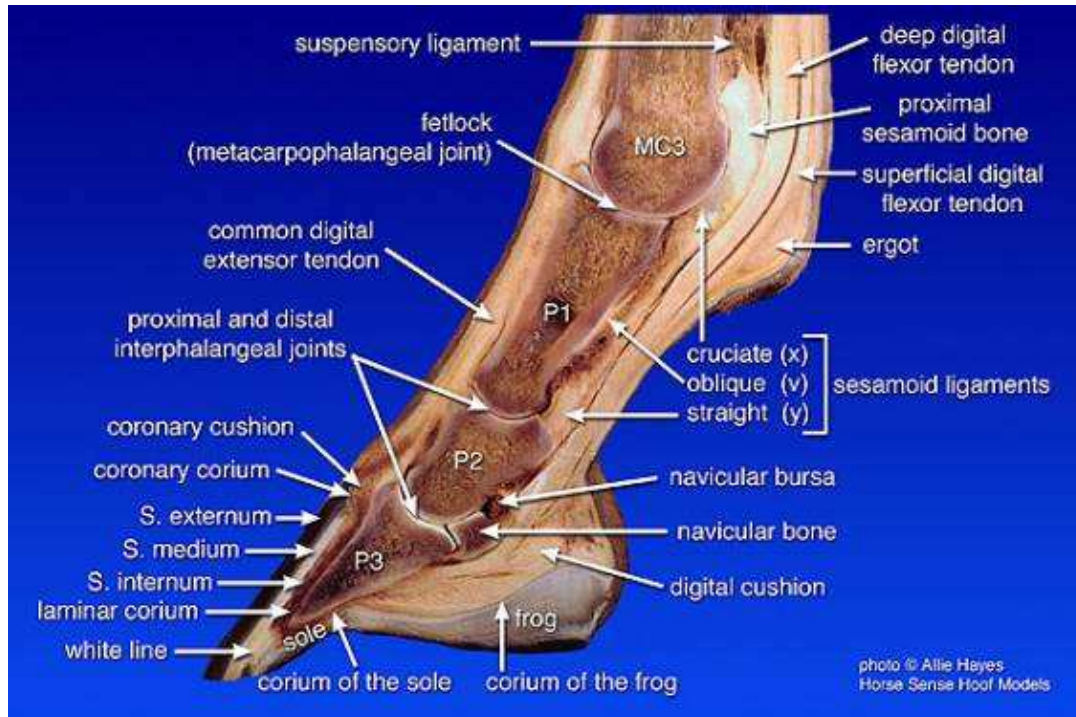


Fig. 4: Preparato anatomico delle principali strutture anatomiche del piede equino in una sezione lungo il piano sagittale dello zoccolo. (Traduzione. Corium of the frog: Corion del fettone; Corium of the sole: Corion della suola; Sole: Suola; Frog: Fettone; Digital Cushion: Cuscinetto digitale; Navicular Bone: Osso navicolare; Navicular Bursa: Borsa navicolare; P3: Terza Falange; White line: Linea alba; Laminar Corium: Corion Laminare; S. internum - S. medium - S. externum: Strato interno - Strato medio - Strato esterno; Coronary corium: Organo cheratogeno del piede; Coronary cushion: Cercine coronario; Proximal and distal interphalangeal joints: Articolazioni interfalangee prossimale e distale; Common Digital Extensor Tendon: Tendine Estensore Digitale Comune; Deep digitale flexor tendon: Tendine Flessore Digitale Profondo) (<http://magazine.alpitrek.com/numero1/pag5.>)

A questo punto tendine si allarga assumendo una forma a ventaglio e occupa l'intero spazio tra il processo palmare mediale e quello laterale della falange distale (Denoux 1996).

In prossimità della sua inserzione sulla falange distale, il tendine è tenuto *in situ* dal legamento anulare distale.

Il TFP termina sulla faccia flessoria della falange distale (Kainer 1990).

1.1.3 Apparato sospensore del nodello

L'apparato sospensore del nodello include il muscolo interosseo terzo, o medio, e i legamenti sesamoidei distali (Kainer 1990). Nel cavallo, il muscolo interosseo terzo si è modificato al punto da prendere il nome di legamento sospensore del nodello (LS) (Fig.5). Il LS è rappresentato principalmente da una robusta fascia tendinea rettangolare, lunga da venti a venticinque centimetri costituita da quantità variabili di tessuto muscolare (soprattutto nella porzione prossimale).

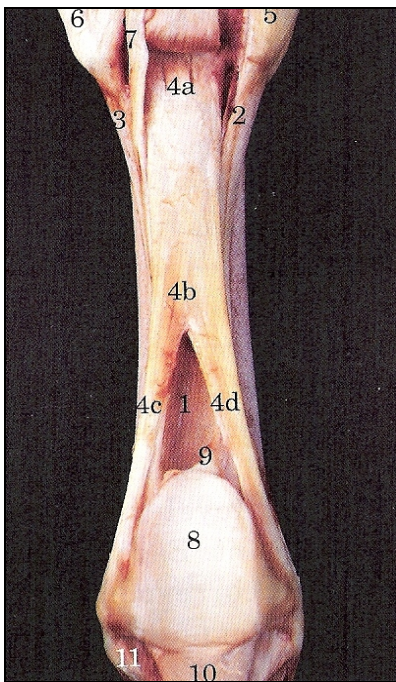


Fig. 5: Veduta palmare metacarpo: 4 a) inserzione del LS; 4 b) corpo del LS; 4 c) branca laterale del LS; 4 d) branca mediale del LS (Denoix 1996 modificata)

Il legamento sospensore origina dal legamento palmare del carpo, prossimalmente alla fila distale delle ossa del carpo, e dalla superficie palmare delle ossa metacarpali, in particolar modo dal terzo osso metacarpale. Il corpo del LS scorre tra il secondo e il quarto osso metacarpale e gradualmente si separa dalla faccia palmare del metacarpo (Denoix, 1996). All'altezza del quarto distale del metacarpo il legamento si divide in

due branche che s'inseriscono sulla faccia abassiale del corrispondente osso sesamoideo prossimale. Da ogni branca si stacca un sottile ramo che corre lungo la falange prossimale e si unisce al tendine estensore dorsale del dito appena prossimalmente all'articolazione interfalangea prossimale (Denoix, 1996). I legamenti sesamoidei distali (Fig. 4) rappresentano la continuazione funzionale del terzo muscolo interosseo nel dito e sono il legamento sesamoideo retto, i legamenti sesamoidei obliqui e i legamenti sesamoidei crociati (Fig. 4). Tutti questi legamenti originano dall'osso sesamoideo prossimale e dal legamento palmare. Il legamento sesamoideo retto è il più palmare e s'inserisce sullo scudo medio. I legamenti sesamoidei obliqui s'inseriscono sull'area triangolare rugosa della superficie palmare della falange prossimale e terminano tra le inserzioni prossimali dei legamenti palmari dell'articolazione interfalangea prossimale. I legamenti sesamoidei crociati sono due sottili fasci di fibre che s'incrociano rispettivamente e terminano sulla porzione prossimo-palmare della tuberosità della falange prossimale (Fig. 11) (Denoix, 1996).

L'organizzazione delle strutture menzionate può essere considerata pressoché sovrapponibile sia per quanto riguarda gli arti anteriori sia per il treno posteriore.

1.1.4 Strutture connettivali annesse ai tendini

I tendini sono strettamente avviluppati in uno strato sottile di tessuto connettivo lasso chiamato peritenonio (Fig. 6), che espandendosi invia delle trabecole tra i fasci tendinei incorporando vasi ematici, nervi e vasi linfatici (McIlwrait, 1990). All'esterno del peritenonio, il tendine, inoltre, nei punti in cui avvengono variazioni di direzione o aumenti delle forze di attrito, è rivestito da una guaina di tessuto connettivo lasso vascolarizzato detto strato paratendineo o guaina tendinea. Lo strato paratendineo è elastico e flessibile con lunghe fibre che permettono al tendine di muoversi avanti e indietro. E' paragonabile alla capsula articolare, con una superficie esterna fibrosa e una membrana sinoviale interna. Il rivestimento sinoviale si riflette attorno al tendine, perciò si possono distinguere uno strato parietale e uno viscerale. I due strati si continuano lungo una piega detta mesotendine, la cui presenza non è sempre evidente. La guaina tendinea è presente, assieme al mesotendine a livello del canale del carpo mentre distalmente a questo, a livello della porzione media del metacarpo, il tendine è

circondato esclusivamente dallo strato paratendineo; a livello di guaina sinoviale digitale il mesotendine non è presente.

Nella superficie flessoria del carpo, i tendini flessori sono avvolti dalla guaina tendinea prossimale dei flessori o carpale dei flessori e tenuti in posizione dal retinacolo dei flessori (Fig. 2) (Nickel, 1979). La guaina è molto ampia e origina da otto a dieci centimetri prossimalmente al carpo estendendosi distalmente sotto il punto di fusione della briglia carpica con il TFP. A livello metacarpale la sua parete si fonde con il TFS.

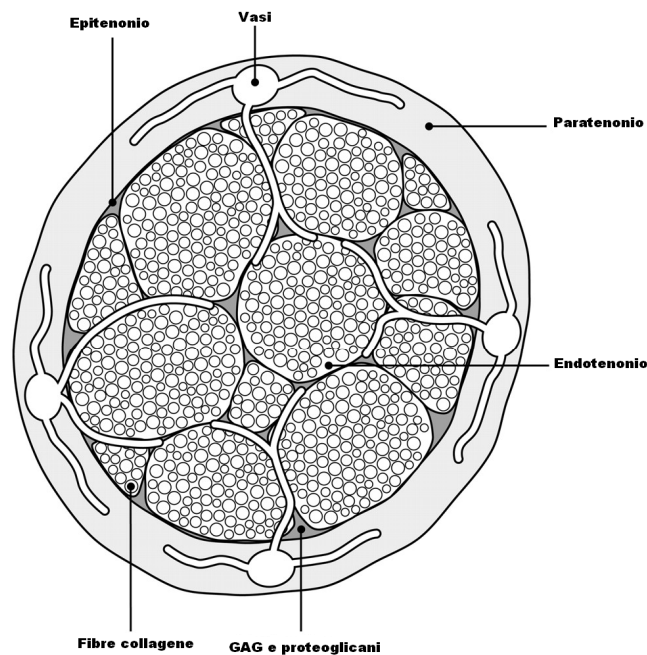


Fig. 6: Rappresentazione schematica del tendine in sezione trasversale (<http://ajpregu.physiology.org/content/286/5/R952.full>)

A livello dell'articolazione metacarpofalangea e della superficie flessoria del pastorale, i due tendini flessori sono avvolti dalla guaina tendinea comune distale, o guaina digitale. La guaina digitale origina a livello del terzo distale del metacarpo, avvolge il TFS e il TFP e si estende distalmente verso la parte distale della prima falange avvolgendo a questo livello solo il flessore profondo (Spinabella, 2002).

1.2 ANATOMIA MICROSCOPICA

Le strutture tendinee in generale, e i tendini flessori delle falangi in particolare, sono in grado di svolgere le loro funzioni grazie alla particolare architettura istologica.

I tendini appaiono microscopicamente come strisce di tessuto connettivo denso e compatto che connettono i ventri muscolari alle ossa e questo può spesso mascherare la vera natura di strutture in realtà estremamente complesse (Goodship, 1994).

I tendini appartengono alla categoria dei tessuti connettivi e sono perciò costituiti da tre parti fondamentali: matrice, fibre collagene e cellule. Questi tre elementi compenetrandosi 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.

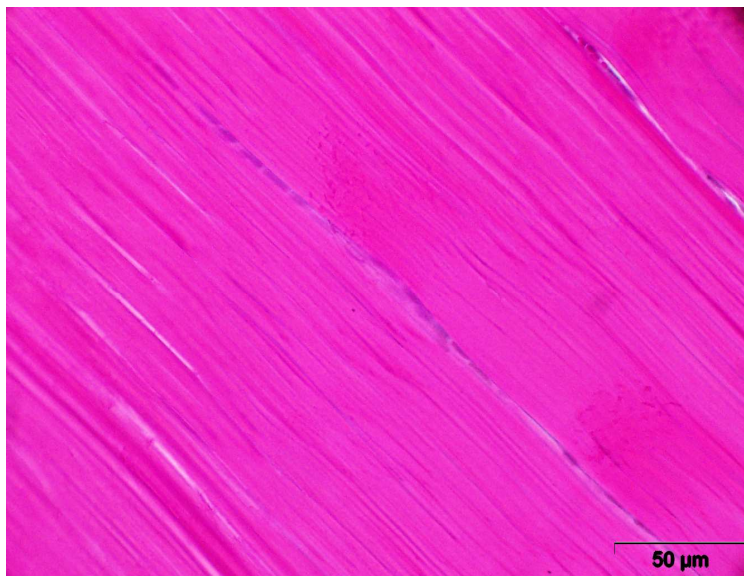


Fig. 7: rappresentazione istologica del tendine colorato con ematossilina-eosina, ingrandimento 40X

1.2.1 La matrice extracellulare

Come tutti i tessuti connettivi, i tendini sono costituiti dalla sostanza o matrice extracellulare (ECM), al cui interno sono disperse le cellule. A sua volta, 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, che consentono la diffusione di nutrienti, metaboliti e ormoni attraverso la sostanza intercellulare. La ECM è l'elemento principale del tendine ed è formata per il 70% da acqua (Sharma, 2006) e per 30% da sostanza secca, a sua volta costituita per il 75-90% dalle diverse molecole di collagene, lo 0,2-5% è rappresentato da glicosamminoglicani (GAG) e proteoglicani e l' 1-2% da elastina (Sharma, 2006; Güngörmüş, 2008).

La COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) è una proteina costituita da cinque subunità che agisce sulla resistenza del tessuto legando tra loro le fibrille di collagene. Si è sempre pensato che si trovasse solo all'interno di tessuti cartilaginei ma si è visto in seguito che è ampiamente presente nei tessuti sottoposti a notevoli carichi. Possiamo quindi ritrovarla all'interno di tendini, legamenti, cartilagine, dischi intervertebrali e menischi. Il suo ruolo non è stato ancora chiarito del tutto ma è stato dimostrato (Smith, 1997) che potrebbe avere uno scopo nel legare le molecole di collagene per formare le fibrille e potrebbe intervenire nell'organizzazione strutturale del tendine; inoltre, è stato ipotizzato che possieda anche una funzione metabolica oltre che strutturale, infatti, è in grado di interagire sia con le proteine della matrice extracellulare che con le cellule, correlando in tal modo il carico applicato al tendine con la risposta cellulare (Smith, 1997). Nel tendine la COMP è tra le proteine presenti in quantità maggiore dopo il collagene e la sua distribuzione varia in funzione di diversi fattori: alla nascita i livelli di questa proteina sono bassi, aumentano rapidamente durante la crescita, raggiungendo il picco massimo a due anni di vita, e si riducono gradualmente nel cavallo adulto. Il ruolo di questa proteina nello sviluppo delle tenite non è ben chiaro, ma la sua riduzione nel corso degli anni potrebbe favorirne l'insorgenza (Smith, 1997).

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, infatti, 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 influenza e regola le funzioni delle cellule che vi sono immerse (Adamo 2002).

1.2.2 Il collagene

Come accennato in precedenza, la maggior parte del peso secco del tendine equino 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. Le fibrille di collagene di diametro maggiore presentano una migliore 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. Pertanto, in relazione alle dimensioni delle fibrille i tendini svolgeranno ruoli meccanici differenti. Il diametro medio delle fibre in una determinata area è direttamente proporzionale al carico che quell'area sopporta (Sese, 2007).

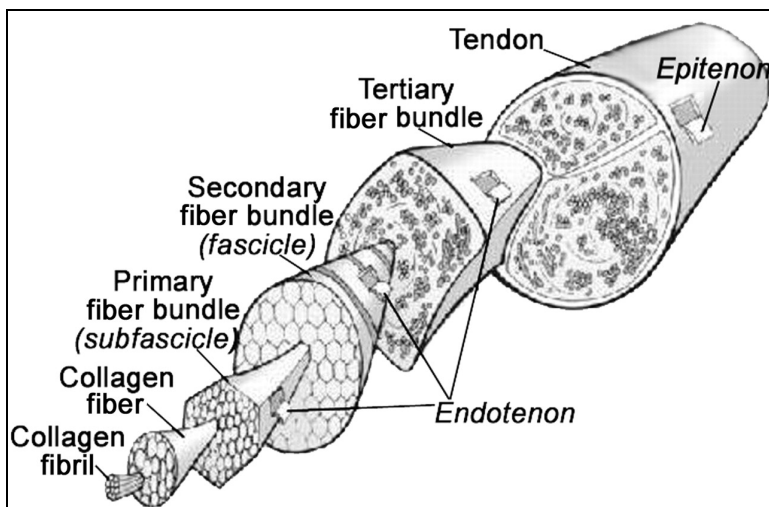


Fig. 8: Rappresentazione schematica della struttura del collagene

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 elevate resistenze alle forze di tensione.

La struttura dei tessuti appena descritta cambia notevolmente nei punti d'inserzione del tendine o del legamento sull'osso, dove il connettivo denso regolare si trasforma in fibrocartilagine, che mineralizza prima di entrare nell'osso, e le fibre collagene s'inseriscono nella matrice ossea come fibre di Sharpey (Eurell, 2000; Boothe, 2001).

Il collagene è costituito da triplici eliche di tropocollagene. Il tropocollagene è considerato l'unità fondamentale del tendine ed è responsabile dell'alta resistenza alla trazione e della stabilità meccanica del tessuto tendineo (Fig. 8).

Dall'associazione di più molecole di tropocollagene si originano le fibrille di collagene che presentano un diametro variabile, generalmente tra 20 e 150 nm. La fibra di collagene è la più piccola unità del tendine visibile al microscopio ottico. Dall'unione di più fibre collagene si forma il fascio primario, detto anche sub-fascicolo (15-400 μm), e più fasci primari, circondati dal tessuto connettivo dei setti endotenonici, si aggregano a loro volta in fasci più cospicui a formare il fascio secondario o fascicolo (20-1000 μm). Un gruppo di fasci secondari forma poi un fascio terziario (1-3 mm) e l'insieme di più fasci terziari costituisce il tendine (2-12 mm), che è rivestito dall'epitenonio (Fig. 9) (Kastelic, 1978). In sezione trasversale i tendini presentano dei setti che separano fasci di grandezza e forma variabili;

I principali tipi di collagene presenti nei tessuti connettivi sono i tipi I, II, III, IV, V e XI. Il collagene 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 e V rappresentano il restante 5% (Von der Mark, 1981; Boothe, 2001). 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 elastico.

Nel tendine immaturo, nel tendine lesionato e nei tendini sani con l'avanzare dell'età, sono rilevabili livelli sempre più alti di collagene III. Nelle prime fasi di riparazione di una lesione, le fibrille di collagene III vengono sintetizzate rapidamente per garantire una certa forza ed elasticità ma esse non presentano la stessa resistenza allo stiramento del collagene I. Per questo motivo il processo di guarigione prosegue con la sostituzione delle fibrille di tipo III con fibrille di tipo I (Carmona, 2006).

Le molecole di collagene dei tipi I e III sono in realtà molto simili tra loro, ma il diametro delle fibre differisce, essendo quelle di tipo III più piccole rispetto a quelle di tipo I, che possono raggiungere diametri notevoli.

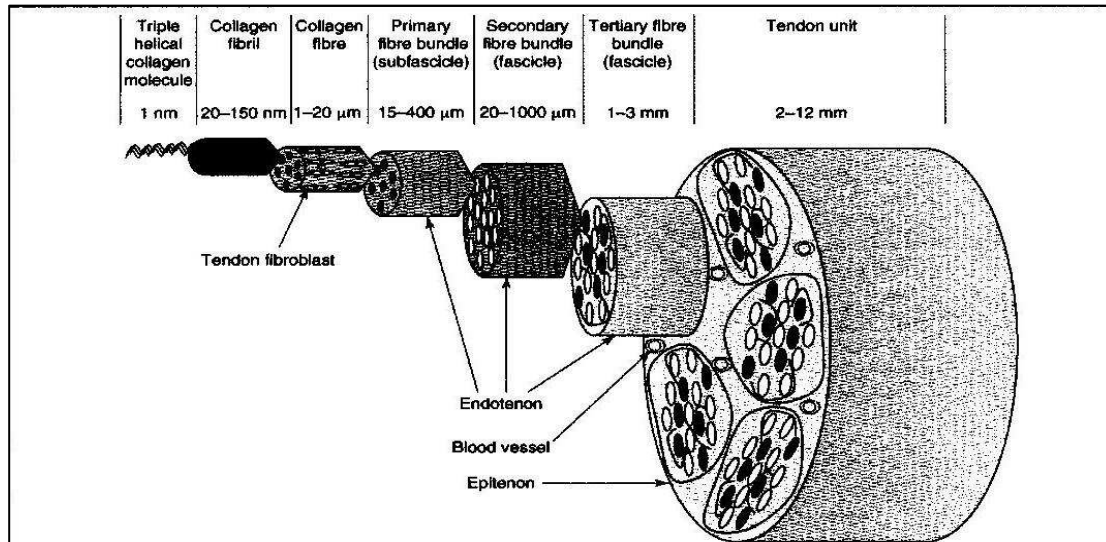


Fig. 9: La struttura gerarchica del tendine (Richardson 2007 modificata).

1.2.3 La componente cellulare

Nel tendine il 90-95% circa della componente cellulare è rappresentato dai tenociti (Wang, 2006; Goodman, 2005) mentre il restante 5-10% è formato da cellule endoteliali, sinoviali e condrociti. I tenociti sono le cellule responsabili della secrezione della ECM, dell'assemblaggio del collagene e del suo ricambio all'interno del tendine (Sharma, 2006). Queste cellule sono dei fibroblasti specializzati e sono disposte in lunghe file parallele negli interstizi che si trovano tra i fasci di fibre collagene.

In una struttura tenodesmica si riconoscono tre tipi di tenociti (Smith, 1996; Patterson-Kane, 2009; Hosaka, 2009):

- Tipo I: sono chiamati anche tenociti e presentano un nucleo affusolato e citoplasma sottile; sono molto attivi nella sintesi di proteine e di componenti della ECM, come le metalloproteinasi e le citochine (Smith, 1996; Patterson-Kane, 2009; Hosaka, 2009).

- Tipo II: detti anche tenoblasti e sono cellule con un nucleo arrotondato a forma di sigaro e organelli citoplasmatici ben sviluppati che sono indice dell'intensa attività metabolica che caratterizza queste cellule (Patterson-Kane, 2009).
- Tipo III: cellule simili a condrociti, con un nucleo arrotondato e diversi nucleoli visibili, che predominano nelle porzioni di tendine sottoposte a forze compressive (Patterson-Kane, 2009).

L'orientamento delle cellule influenza l'accorpamento e l'allineamento delle macromolecole che compongono la matrice (Goodship, 1980) e, a sua volta, la matrice esercita un'influenza sulle cellule. E' proprio con questo feedback che la sintesi di nuova matrice può essere modulata; infatti, è stato provato (Giori, 1993) che la forma delle cellule e le forze pressorie possono influire sul controllo meccanico della composizione della matrice, soprattutto nelle parti generalmente sottoposte a pressione dove si ha un aumento della porzione cartilaginea nella composizione.

1.2.4 Organizzazione vascolare

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 d'ipossia e di necrosi.

I carichi pressori influenzano meccanicamente il metabolismo dei tenociti ma esercitano anche un'influenza diretta sull'apporto ematico, causando di conseguenza modificazioni della tensione di ossigeno e delle concentrazioni dei nutrienti all'interno del tessuto connettivale, che portano a un'alterazione nella sintesi di matrice da parte dei tenociti.

Contrariamente a quanto si credeva in passato (il tendine era reputato una struttura relativamente avascolare) il flusso ematico è notevole all'interno del tessuto tendineo e, se misurato in funzione della tensione di ossigeno, si ottengono anche valori prossimi a quelli del tessuto muscolare.

Il tendine riceve la maggior parte del flusso ematico dall'inserzione muscolare, dall'inserzione periostale e, all'interno della guaina, è raggiunto da vasi che decorrono nel connettivo (Peakok, 1959). In realtà l'apporto ematico proveniente dalle inserzioni, provvede alla perfusione del tessuto solo localmente e la regione del terzo medio del

metacarpo, priva di guaina, è nutrita da una ricca rete vascolare proveniente dal circostante paratenonio (Peakok, 1959). La vascolarizzazione intratendinea è rappresentata da una rete intrecciata di vasi longitudinali che decorrono all'interno del tendine tra i fasci di fibre collagene e che si anastomizzano perpendicolarmente con le sottili arteriole, alcune delle quali provenienti dal paratenonio.

Tuttavia, diversamente da ciò che accade fisiologicamente nel muscolo, nel tendine non si osserva nessun incremento significativo di flusso ematico durante l'esercizio fisico (Stomberg, 1997). Pertanto, un eventuale incremento delle richieste metaboliche, dovuto all'esercizio fisico o a eventuali patologie, potrebbe portare a una compromissione del sistema tissutale (Goodship, 1994).

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 l'apporto ematico è inversamente proporzionale all'età del soggetto e al carico sopportato. Nel tendine i vasi corrono all'interno dell'endotenonio longitudinalmente e parallelamente ai fasci e sono spesso associati a fibre nervose (Brockis J. G., 1953) in grado di regolare il flusso ematico diretto al tendine attraverso la secrezione di diverse sostanze ad azione vasocostrittrice (neuropeptide Y e noradrenalina) o vasodilatatrice (Vasoactive intestinal polipeptide o Vip). Nei tendini danneggiati, le fibre nervose si sviluppano in associazione con i vasi sanguigni all'interno delle rotture tendinee.

1.3 CARATTERISTICHE MECCANICHE DEI TENDINI

I tendini sono dotati di resistenza alla tensione, flessibilità ed elasticità elevate. Queste caratteristiche sono garantite dai singoli elementi costitutivi di questi tessuti. Il tessuto tendineo quando è sottoposto a un carico risponde deformandosi in maniera non lineare. Inizialmente si verificano modificazioni relativamente grandi del tendine che, rappresentate su un grafico cartesiano (Fig. 10), 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 a 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).

Se il tendine è sottoposto a un modello ciclico di allenamento che lo mette ripetutamente sotto pressione, una certa parte di energia viene persa sotto forma di calore, come avviene quando allunghiamo ripetutamente una striscia di gomma.

Una volta terminata la fase iniziale, in cui il tendine risponde in maniera elastica, inizia una fase di risposta lineare visco-elastica, dove il tendine diviene più resistente all'allungamento e si ha un rapporto direttamente proporzionale tra tensione, pressione e allungamento.

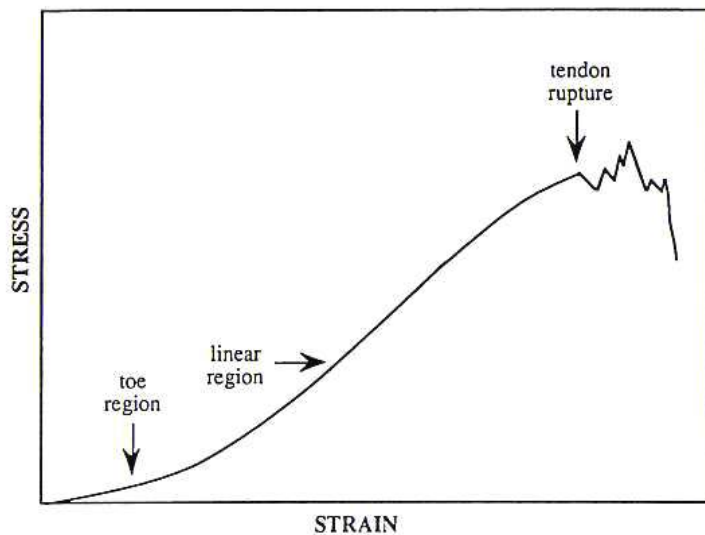


Fig. 10: Grafico della deformazione non lineare del tendine sottoposto a carico.

Quando sono applicati carichi elevati, si osservano dei cambiamenti non lineari del tendine nel quale avvengono delle estensioni più grandi del previsto come risposta ad aumenti di carico noti. Il punto in cui si verificano questi cambiamenti è noto come *yeld point*, o punto di carico, e indica che sono avvenuti dei cambiamenti nella struttura tendinea.

Carichi che superano questo punto determinano una deformazione plastica del tendine che va incontro a un danno strutturale irreversibile (Goodship, 1994). Un successivo incremento del carico comporta un completo cedimento strutturale e la rottura del tendine.

Da un punto di vista ultrastrutturale, sembra che la regione iniziale della curva sia dovuta all'allungamento dell'ondulatura o *crimp* delle fibre di collagene (Butler, 1978). È stato dimostrato che le fibre ondulate della regione centrale del TFS si tendono precocemente rispetto alle fibre ondulate della regione periferica dei tendini di cavalli adulti e ciò suggerisce che la regione centrale è più predisposta al cedimento strutturale (Wilmink, 1992). Questo consente di comprendere per quale motivo, in caso di tendinopatia, l'esame ecografico del tendine danneggiato mostra le tipiche *core-lesions*.

1.4 EZIOPATOGENESI DELLE LESIONI TENDINEE

Nei cavalli, come nell'uomo, la maggior parte delle patologie ortopediche è legata a processi degenerativi a carico di una o più strutture annesse all'apparato muscolo-scheletrico (articolazioni, tendini, legamenti).

Le patologie tendinee sono frequenti nel cavallo e il meccanismo patogenetico che vi è alla base è simile a quello anche nell'uomo.

Con il termine *tenite* s'intende un processo infiammatorio del tendine e/o delle giunzioni muscolo-scheletriche causato da un trauma acuto o da microtraumi ripetuti. Nel cavallo si riferisce specificamente all'infiammazione dei tendini flessori delle falangi e in particolare di quella porzione circondata dallo strato paratendineo ma non dalla guaina tendinea; se è coinvolta anche la guaina tendinea si usa il termine *tenosinovite* (Mc Ilwraith, 1983).

Le teniti possono colpire cavalli in attività appartenenti a qualsiasi razza ma soprattutto cavalli Purosangue Inglese, trottatori, cavalli da salto e cavalli di razze americane impiegati nelle gare di agilità e di precisione dove devono compiere cambi improvvisi di direzione.

Come si può intuire da questo elenco, generalmente i soggetti affetti da teniti sono cavalli sottoposti a un allenamento giornaliero, a tenori di esercizio notevoli e cui sono richieste prestazioni esagerate al momento della gara (Dowling, 2000; Nickel, 1991).

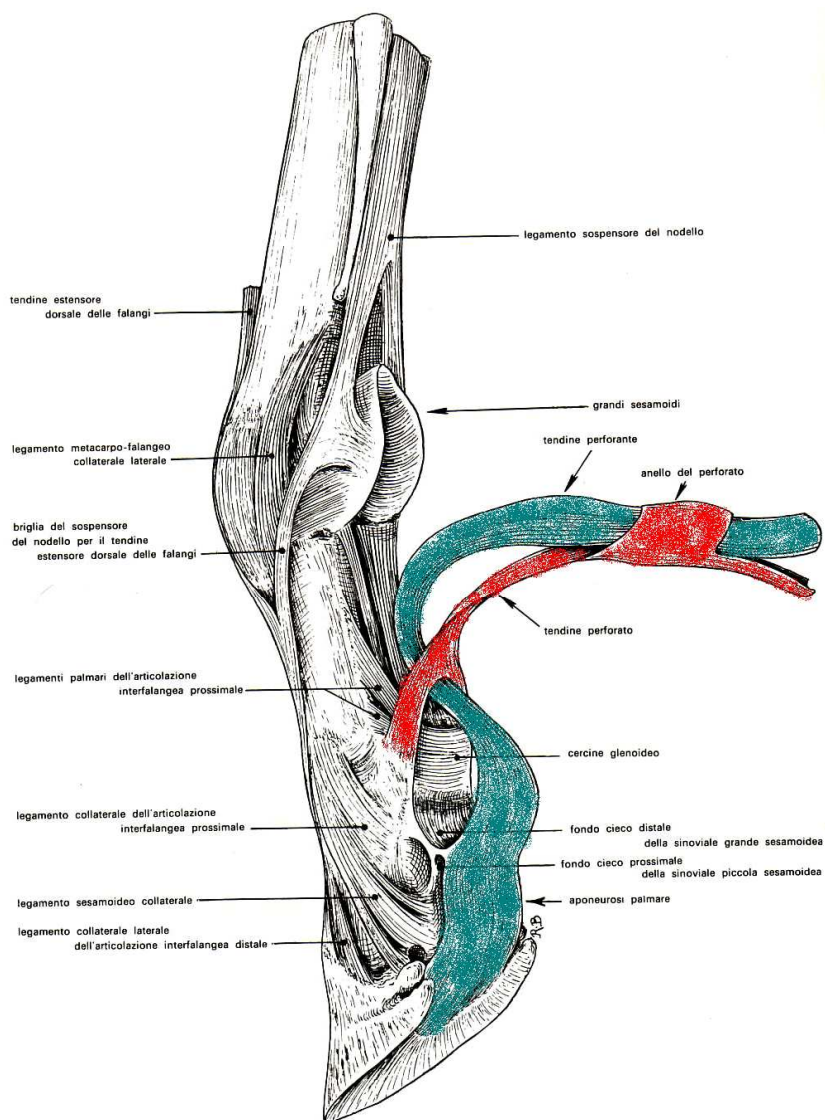


Fig. 11. Inserzioni ossee distali dei tendini flessori delle falangi del cavallo; in rosso: TFS; in blu: TFP. (Da R. Barone 1981 EDAGRICOLE modificata).

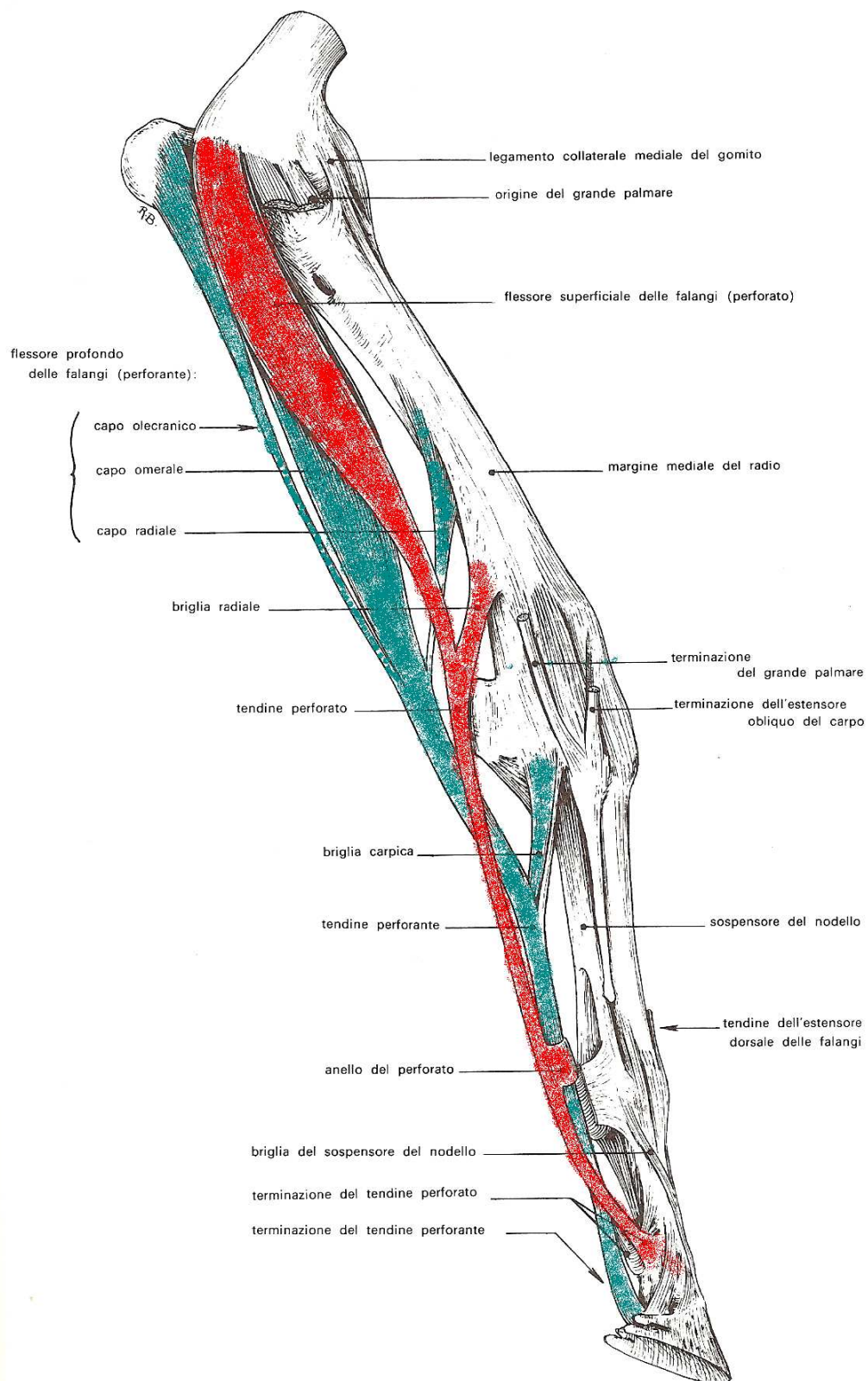


Fig. 12: Componente flessoria dell'avambraccio di cavallo; in rosso: TFS; in blu: TFP (da R. Barone 1981, EDAGRICOLE modificata).

1.4.1 Principali meccanismi eziopatogenetici

L'insorgenza delle teniti è influenzata da vari fattori:

- Fattori fisici: tra tutti il più importante è sicuramente l'eccessiva sollecitazione cui le strutture tendinee sono sottoposte durante il galoppo e il salto. I galoppatori sono i cavalli più colpiti poiché le elevate velocità che raggiungono durante la corsa determinano un eccessivo stiramento dei tendini nel momento in cui i soggetti scaricano tutto il peso a terra; inoltre il galoppo è un tipo di andatura a quattro tempi molto particolare (Yamasaki, 2001).

La frequenza delle teniti nei trottatori è minore rispetto ai galoppatori perché il trotto, anche se effettuato a velocità notevoli, è un tipo di andatura più equilibrato rispetto al galoppo; al trotto, infatti, il soggetto poggia a terra, tra una fase di sospensione e l'altra, due arti (un anteriore e un posteriore), per cui il peso viene distribuito in modo più proporzionato.

- Età: i cavalli destinati a una carriera agonistica sono avviati alla doma, e quindi all'allenamento quotidiano, allo scadere dei diciotto mesi di età. In questa fase di vita, anche se fisicamente appaiono come soggetti adulti, lo sviluppo scheletrico non è ancora giunto a compimento, pertanto le sollecitazioni fisiche eccessive cui è sottoposto il soggetto saranno scaricate sui muscoli e sui tendini (McIlwraith, 1990).

A differenza dei muscoli, i tendini non sono in grado di ipertrofizzarsi in risposta a stimoli fisici crescenti e vanno incontro a un precoce affaticamento.

Inoltre la maturità strutturale dei tendini è raggiunta intorno al secondo anno di età (Parry, 1978; Reiser, 1994). È stato dimostrato che il diametro delle fibre collagene aumenta durante lo sviluppo corporeo e si riduce con la senescenza (Patterson-Kane, 1996). Contemporaneamente alla riduzione fisiologica del diametro medio delle fibre si assiste anche al loro cambiamento di forma, soprattutto nella parte centrale del tendine. (Patterson-Kane, 1995). Perciò la parte centrale del tendine, a parità di tensione applicata, è maggiormente soggetta ad alterazioni strutturali rispetto alla parte periferica, in cui non si registrano cambiamenti significativi con il passare del tempo.

Ciò permette di dare una spiegazione scientifica della formazione delle *core-lesions*, che si rinvencono nella regione centrale dei tendini lesionati quando questi sono esaminati con l'ecografo.

- Fattori vascolari: risultati ottenuti da numerosi studi (Rigby, 1977; Fackelman, 1973; Stromberg, 1969; Webbon, 1977) fanno sospettare che la vascolarizzazione giochi un ruolo precoce importante nella patogenesi delle teniti.

L'architettura vascolare dei tendini è visibilmente disturbata in caso di trauma. Uno studio specifico (Kraus-Hansen, 1992) ha dimostrato che, eliminando l'apporto vascolare fornito al tendine dal paratenonio, non si registrano dei cambiamenti nell'irrorazione. Risultati completamente diversi si ottengono con la legatura dei due maggiori rami vascolari intratendinei. Il tessuto acquista subito una colorazione violacea che indica un sovraccarico a livello venoso. La lesione focale al centro del tendine, le alterazioni a livello di microcircolo, la degenerazione delle fibre e la diminuzione della popolazione di tenociti attivi, che avvengono sperimentalmente eliminando l'apporto vascolare intratendineo, risultano essere molto simili alle alterazioni che si possono notare nei casi di tenite spontanea (Kraus-Hansen, 1992). Sembra quindi chiaro che il danneggiamento delle strutture vascolari interne al tendine costituisca il primo passo verso la degenerazione del tessuto e la proliferazione del paratenonio.

La degenerazione del tessuto tendineo si verifica perché i tenociti non sono più in grado di sintetizzare né di secernere molecole di collagene o altri elementi della matrice senza un adeguato apporto ematico (Dowling, 2000; Spinabella, 2002).

Solitamente, quando il tendine è sottoposto alla massima tensione durante cicli ripetuti di carico, si realizza una riduzione dell'afflusso di sangue che è responsabile della formazione di radicali liberi. Infatti, un altro fattore predisponente all'insorgenza di teniti, strettamente legato all'ischemia e all'ipossia dei tessuti, è il *reperfusion injury* o danno da riperfusione. Con questo termine s'intende una serie di danni cellulari locali causati dalla liberazione di radicali liberi in circolo. Questi danni cellulari determinano una compromissione nella corretta sintesi di ECM (Goodship, 1994).

Il danno iniziale al carico del tendine causa un'inflammatione locale che viene tamponata all'interno della struttura tendinea. Questo fenomeno però ostruisce il flusso di sangue, creando un ambiente poco confortevole per i tenociti e per la componente di collagene che di conseguenza indebolisce il tendine. Inoltre il sovraccarico ripetuto a frequenze elevate rilascia calore da frizione all'interno del tendine e ciò causa danni alla struttura; se il flusso locale di sangue non è adeguato a raffreddare il tendine, si può raggiungere una temperatura interna molto alta che aggrava la situazione già poco favorevole per le fibre collagene e per il tendine stesso.

- Altri fattori possono provocare sollecitazioni eccessive sui tendini: un'esagerata inclinazione della pastoia, una ferratura non corretta e punte troppo lunghe (Dowling, 2000).

Riassumendo, i fattori principali che determinano l'insorgenza di tenite sono i sovraccarichi ripetuti accompagnati e aggravati da una circolazione ematica relativamente deficitaria.

1.5 DIAGNOSI DI TENITE

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 (Mc Ilrwaith, 1990). Talvolta i primi segni e sintomi clinici possono comparire in ritardo di giorni o di settimane rispetto al momento in cui si è verificata la lesione. Inoltre ci può essere un'incongruenza fra la severità della lesione e la gravità delle manifestazioni cliniche, specialmente nelle classiche *core-lesions* (Spinabella, 2007).

L'esame ecografico è essenziale per confermare il sospetto clinico e per valutare l'estensione e l'evoluzione della lesione a carico del tendine ma prima di considerare metodologie diagnostiche più specifiche, che ci permettono di emettere diagnosi di tenite, è importante affrontare le varie tappe che compongono l'esame clinico (segnalamento, anamnesi, EOG, EOP), poiché i sintomi clinici in caso di tenite non sono patognomonic.

1.5.1 Esame ecografico

Lo studio delle lesioni tendinee è generalmente eseguito tramite l'impiego della tecnica ecografica che rappresenta il metodo più diffuso in tale ambito, poiché fornisce risultati sicuri e in tempo reale. Inoltre si tratta di un'indagine diagnostica ben tollerata dall'animale e i risultati ottenuti possono essere registrati e in seguito confrontati con quelli dei controlli successivi (Dowling, 2000).

L'avvento dell'ecografia come mezzo diagnostico in caso di sospetto danno tendineo ha reso obsolete altre tecniche diagnostiche diffuse in passato come la termografia, la xerografia, la scintigrafia, la radiografia.

Solitamente, per eseguire un'ecografia è necessario un ecografo provvisto di sonda lineare, con una frequenza d'onda di almeno 7,5 MHz, che consenta di visualizzare con un'alta risoluzione le strutture sottostanti.

Prima di procedere alla valutazione ecografica la superficie cutanea su cui poggierà la sonda, deve essere accuratamente rasata e pulita per eliminare il pelo, lo sporco e il grasso che ostacolerebbero il passaggio delle onde sonore. In seguito la cute deve essere spalmata con un gel specifico che consente di aumentare la superficie di contatto tra la sonda e la cute, evitando che tra queste si formino delle bolle d'aria che ostacolano il passaggio degli ultrasuoni. Eventualmente è possibile usare dei distanziatori in silicone da porre tra la sonda e la cute; questi consentono di ottenere un'immagine ancora più definita delle strutture superficiali.

Appoggiando la sonda perpendicolarmente alla cute, sul monitor appaiono delle immagini che rappresentano la superficie di taglio delle strutture attraversate in quel momento dal fascio di ultrasuoni. Con il sistema di lettura delle immagini "B-Mode" (brightness-mode) gli echi riflessi sono convertiti in segnali luminosi d'intensità variabile in funzione all'ampiezza dell'eco (Spinabella, 2002).

Per valutare correttamente la condizione dei tendini flessori è importante conoscerne i rapporti anatomici, le forme, i diametri trasversi e l'andamento longitudinale delle fibre che variano procedendo dal carpo al nodello.

Il TFS sano ha un aspetto omogeneo ed è leggermente meno ecogeno del TFP. Nelle porzioni più prossimali della regione metacarpale, in scansione trasversale (Fig. 13), il tendine presenta un contorno ovoidale ed è situato un leggermente medialmente rispetto

al TFP. Il TFS è separato dal TFP da una linea diagonale anecogena che ha andamento dorsomediale-palmarolaterale. Procedendo in senso distale il TFS diventa più largo e appiattito e all'altezza del nodello la porzione dorsale della manica flessoria è visibile come una sottile linea ecogena posta dorsalmente al TFP. A livello della regione pastorale il tendine si divide nelle branche laterale e mediale (Fig. 14) che assumono una forma a lacrima e che si possono visualizzare adeguatamente spostando la sonda dalla linea mediana. In scansione longitudinale, sono ben rilevabili ecogenicità e l'andamento parallelo e ben organizzato delle fibre.



Fig. 13: rappresentazione ecografica del TFP e del TFS in scansione trasversale.

Il TFP sano in scansione trasversal, ha un profilo tondeggiante nella regione metacarpale prossimale mentre distalmente diventa nettamente ovalare (Fig. 14).

L'ecogenicità del tendine generalmente è omogenea per tutta la sua lunghezza e leggermente maggiore rispetto al TFS. A livello della regione metacarpale prossimale è situato medialmente rispetto alla linea sagittale e in scansione trasversale ha un profilo tondeggiante (Fig. 13). All'altezza del pastorale la superficie trasversale del TFP mantiene un profilo ovoidale nel tratto prossimale, mentre distalmente assume un caratteristico profilo bilobato (Fig. 14). A questo livello è possibile creare degli artefatti se la sonda non è posta perpendicolarmente alle fibre tendinee, pertanto è opportuno

cambiare l'angolazione della sonda fino a quando non si riesce ad ottenere un'immagine normale o la certezza di aver individuato la lesione.

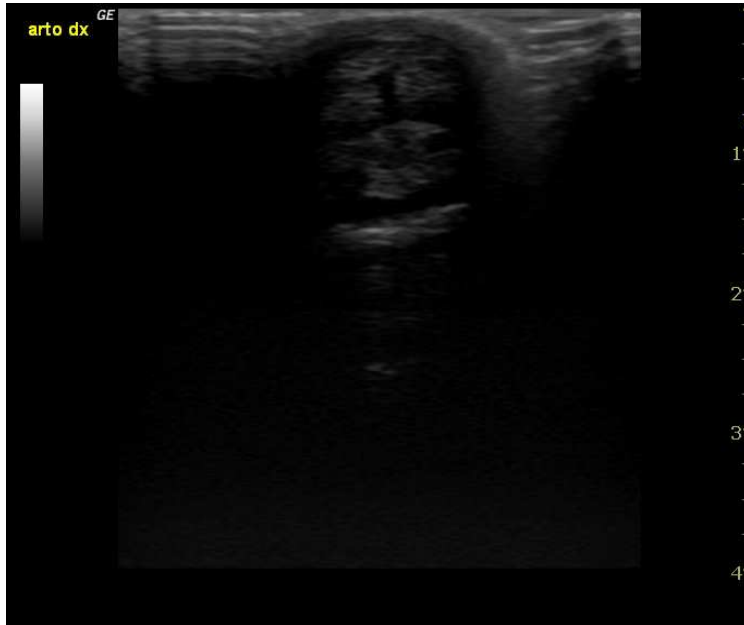


Fig. 14: rappresentazione ecografica del TFP e del TFS in scansione trasversale.

Dal punto di vista ecografico si possono riscontrare diversi tipi di lesione:

- lesione concentrica o *core-lesion*: è la più frequente e si presenta come un'immagine ipoecoaica o anecoica al centro del tendine, di dimensioni ed estensione prossimo-distale variabile;
- lesione eccentrica: di aspetto simile alla precedente, ma non concentrica in sezione trasversale e meno frequente della precedente;
- tendine diffusamente ingrossato e ipoecogeno: rappresenta un danno diffuso del tendine e 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 dal 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; in alcune immagini si può osservare una sottile linea ecogena che rappresenta il peritenonio.

Un tipo particolare di lesione è quello che si osserva in tendini colpiti da tenite cronica, in cui le strutture si presentano ingrossate e con ecogenicità variabile. In questi casi è più utile la scansione longitudinale, che permette di apprezzare la perdita di organizzazione parallela delle fibre e un disegno particolarmente grossolano (Spinabella, 2002).

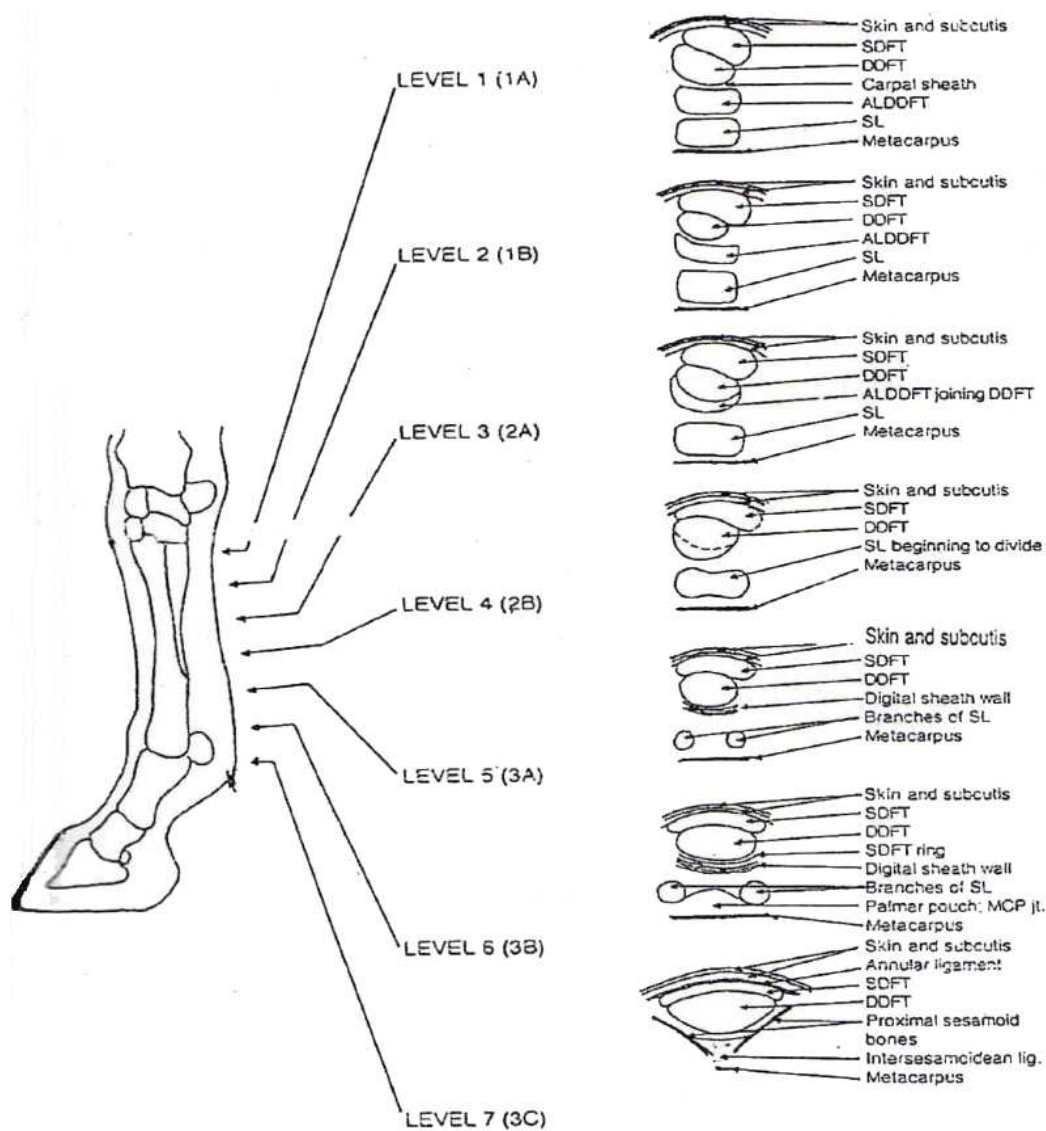


Fig. 15 - Schema dei sette livelli in cui si divide ecograficamente il metacarpo con le relative sezioni trasversali (da Smith, 2003; modificato).

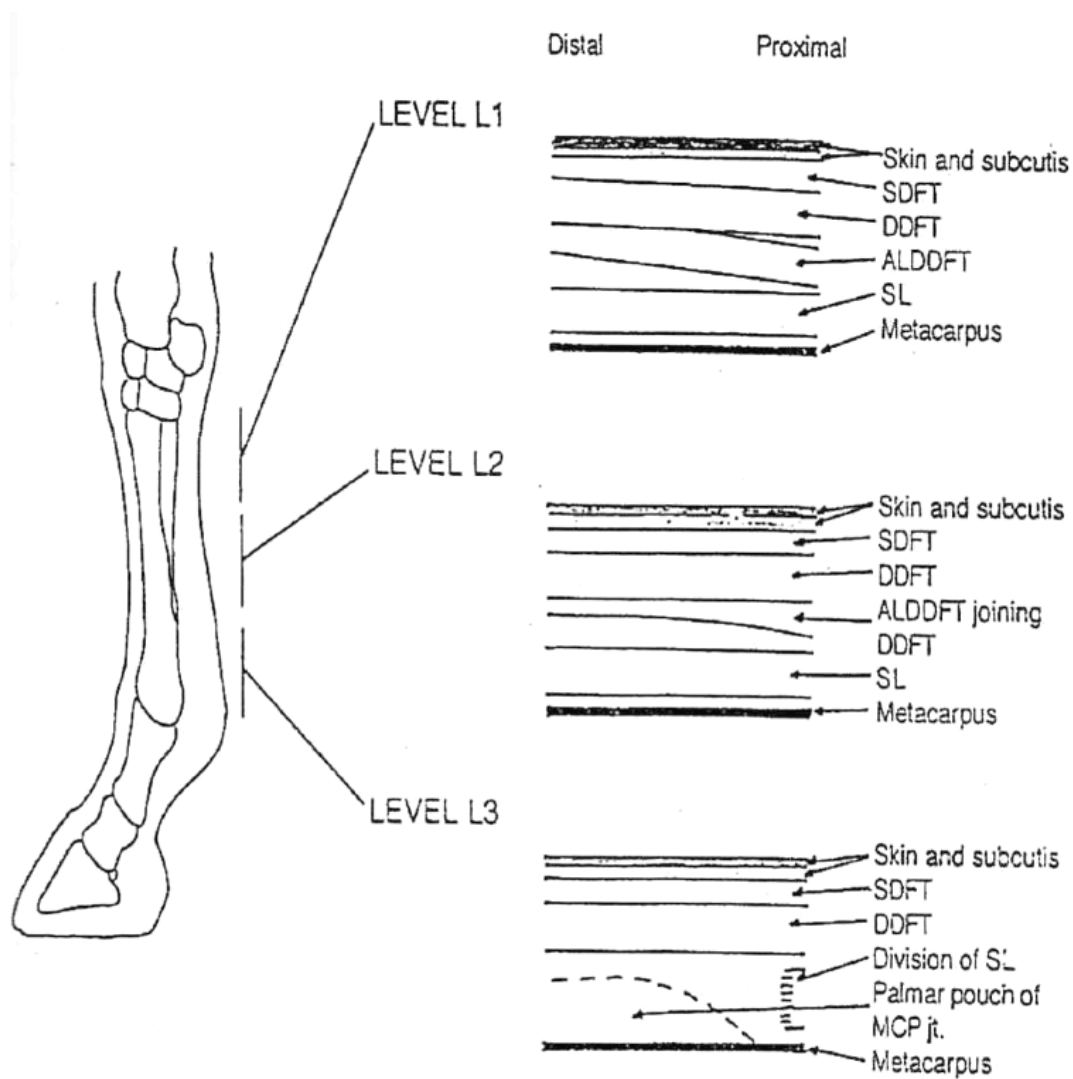


Fig. 16 - Schema dei tre livelli in cui si divide ecograficamente il metacarpo con relative sezioni longitudinali (da Smith, 2003; modificato).

1.6 TERAPIA DELLE TENITI

Negli anni sono stati sviluppati molti protocolli terapeutici per il trattamento delle tenopatie ma per gran parte di essi è stata dimostrata la scarsa efficacia.

In generale è importante ricordare che la scelta del tipo di terapia deve essere fatta tenendo in considerazione numerosi fattori tra cui la gravità della lesione, l'età, la razza, il tipo di lavoro che il cavallo svolge e il suo valore economico.

Nello scegliere il protocollo terapeutico adatto a 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.

Ogni schema terapeutico deve essere adeguato alla fase di riparazione che si rinviene nel tessuto interessato da lesione. Nella riparazione del tendine si possono, infatti, distinguere tre fasi:

- fase traumatica: comprende il periodo che va dal momento del trauma (giorno 0) a circa trenta giorni dopo l'evento ed è caratterizzata da una risposta infiammatoria intensa con edema, emorragia, calore e dolore alla palpazione;
- fase di guarigione acuta: va all'incirca dal giorno trenta al centoventesimo post-trauma ed è caratterizzata dalla formazione di nuove fibrille collagene (prevalentemente di tipo III) che vanno a sostituire quelle lese, il tessuto necrotico ed emorragico;
- fase di guarigione cronica: si protrae oltre il centoventesimo giorno fino ad arrivare anche a un anno dal trauma e in questa fase si ha la formazione di tessuto cicatriziale.

Recentemente, sono stati suggeriti nuovi approcci terapeutici per il trattamento delle lesioni articolari e teno-legamentose.

1.6.1 Terapia fisica

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 in box per 2-4 settimane (che generalmente corrisponde alla fine della fase traumatica e all'inizio di quella di guarigione acuta) 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, un altro accorgimento fondamentale, è l'utilizzo dell'idroterapia fredda, che aiuta ad alleviare il dolore e previene la formazione di edema e la tumefazione (McIlrwaith, 1990; Spinabella, 2002).

Sia durante la fase infiammatoria sia durante quella di guarigione acuta, è raccomandato un programma di esercizio controllato al fine di promuovere la circolazione, facilitare il drenaggio linfatico e incrementare il riassorbimento di eventuali raccolte ematiche ed essudative.

L'esercizio controllato é particolarmente indicato in questi casi poiché un leggero carico sulla struttura facilita l'allineamento delle cellule e delle fibre, riducendo i tempi di ripresa del tendine (Ketchum, 1979).

E' fondamentale procedere a una riabilitazione graduale dell'animale, in modo da evitare che un esercizio troppo intenso e/o precoce possa compromettere la guarigione.

La mobilizzazione passiva controllata dell'arto interessato, favorendo la separazione fra le strutture tendinee in via di riparazione dal circostante strato paratendineo o dalla guaina tendinea, può influenzare positivamente il processo di riparazione intrinseca del tendine, l'orientamento delle fibrille e probabilmente anche evitare la formazione di aderenze (Ketchum, 1979).

Le ferrature correttive possono rappresentare un valido ausilio terapeutico poiché accompagnano il cavallo sia durante il periodo di riposo sia in quello di riabilitazione. Sono in grado di ridurre la tensione interna al tendine e indurre un progressivo allungamento della struttura tendinea, per aumentare la deformabilità del tessuto cicatriziale impedendo il peggioramento della lesione e promuovendo la fase di riparazione iniziale (Stashak, 1990).

Altri tentativi per la terapia delle tenite sono stati fatti usando gli ultrasuoni con lo scopo di determinare il riassorbimento di tumefazioni causate da sangue o da siero (Stashak, 1990). Gli ultrasuoni producono una vibrazione meccanica e permettono lo sviluppo di

calore nei tessuti sui 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 e si basa sul concetto che l'emissione di una luce costante, in un range specifico di energia, è in grado di penetrare nei tessuti stimolando direttamente il metabolismo cellulare e il rilascio di sostanze che intensificano la fase infiammatoria e ripartiva del processo di guarigione (Henninger, 1994).

Infine, la terapia elettromagnetica può influenzare il potenziale piezoelettrico dei tessuti e incrementarne il metabolismo cellulare. (Spinabella, 2002).

1.6.2 Terapia farmacologica

La terapia fisica, pur essendo un valido ausilio per raggiungere la guarigione del tendine, non è sufficiente per ottenere la completa remissione del processo patologico perciò si ricorre alla somministrazione di farmaci, soprattutto durante la flogosi acuta.

Durante la fase traumatica è possibile somministrare il Dimetilsulfossido (DMSO), una sostanza comunemente utilizzata come antinfiammatorio e antiedemigeno (Stashak, 1990). Il DMSO favorisce il passaggio trans-cutaneo dei farmaci cui è associato, per cui è spesso utilizzato come veicolo per l'applicazione locale di corticoidi. L'uso del DMSO può avere effetti negativi evidenti soprattutto nel caso in cui sia usato in formulazione pura e quotidianamente, infatti, può provocare infiammazione cutanea transitoria e diminuire il carico di rottura medio dei tendini, favorendone la lacerazione spontanea nei cavalli da corsa (Albrechtsen, 1982; Grant 1992).

Altri farmaci somministrabili durante la fase traumatica sono i FANS, come ad esempio Fenilbutazone, Flunixin meglumine e Naprossene, che hanno effetto antinfiammatorio, antipiretico e analgesico (Stashak, 1990). Tra i possibili effetti collaterali di questa classe farmacologica ricordiamo soprattutto le ulcere gastrointestinali e, più raramente, la necrosi delle papille renali, l'ipoproteinemia e le alterazioni ematologiche (Booth, 1999).

Altri protocolli terapeutici proposti per il trattamento delle lesioni teno-legamentose prevedono l'uso di corticosteroidi che sono farmaci antinfiammatori potenti che possono essere somministrati per via sistemica o locale soprattutto nella fase traumatica

(Stashak, 1990). Tra gli effetti collaterali più importanti ricordiamo la soppressione della risposta immunitaria, l'effetto vasocostrittore che può esitare nello sviluppo di laminite, e la ritenzione di sodio a causa della loro azione mineralcorticoide; inoltre, inibiscono la fibroplasia, ossia la sintesi di nuovo collagene e di GAG che sono fondamentali per il processo di riparazione tendinea (Kapetanos, 1982).

I Glicosamminoglicani Polifosfati (PSGAG) sono complessi polisaccaridici solforati con una struttura molto simile al condroitinsolfato e sono coinvolti nella maturazione delle fibre collagene (Dowling, 2000). La somministrazione intralesionale di PSGAG sembra dare i risultati migliori, infatti, con questo trattamento molti soggetti tornano in attività, anche se è comunque possibile una certa percentuale di recidive (Marr, 1993).

Inoculazioni intralesionali di beta-Aminoprionitrile (BAPN), un inibitore della lisil-ossidasi (enzima coinvolto nella formazione del collagene), permettono un rapido miglioramento della lesione dal punto di vista ecografico (Spinabella, 2002). Studi sperimentali (Dahlgren, 2001) hanno evidenziato anche possibili effetti collaterali del BAPN, pertanto l'utilizzo di questo farmaco deve essere prudente e associato a un accurato programma di esercizio per evitare serie conseguenze.

In letteratura è riportato anche l'utilizzo di vescicanti che, applicati localmente, producono vescicazione e infiammazione della cute e dei tessuti molli sottostanti. Di solito sono impiegati nel caso in cui il processo di guarigione tardi a concludersi e hanno la funzione di stimolare la riacutizzazione di un processo infiammatorio ormai cronicizzato. I risultati che si ottengono sono comunque discutibili, poiché il miglioramento sembra essere legato principalmente al periodo di riposo successivo all'applicazione di tali sostanze, inoltre sono possibili effetti collaterali come la necrosi cutanea (Stashak, 1990). L'uso dei vescicanti dovrebbe essere quindi evitato.

1.6.3 Trattamento chirurgico

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

La focatura o cauterizzazione terapeutica è un metodo revulsivo molto energico che ha la funzione di riacutizzare il processo infiammatorio nel caso in cui sia presente una flogosi subacuta o cronica, nella speranza di rendere più rapida la guarigione. Prevede

l'applicazione circoscritta di alte temperature al fine di causare la distruzione del tessuto patologico. Il risultato finale però è la formazione di tessuto cicatriziale scarsamente vascolarizzato (Stashak, 1990), infatti, secondo Mc Ilrwaith (1990) questo trattamento non influenza la guarigione tendinea ma protegge l'animale da recidive.

Il tendon splitting era un intervento chirurgico impiegato con lo scopo di promuovere la riacutizzazione del processo infiammatorio, la neovascolarizzazione e la crescita di fibroblasti lungo la linea d'incisione in modo da facilitare la soluzione delle cicatrici e favorire il ripristino di una funzionalità tendinea normale (Stashak, 1990, Asheim, 1967). Oggi si preferisce utilizzare questa pratica per favorire la fuoriuscita dei liquidi dalla lesione in caso di teniti in fase acuta e in particolare in quelle con un'immagine ecografica di *core-lesion*, dove l'ematoma ostacola la rivascularizzazione e la successiva guarigione del tessuto tendineo. I risultati post-operatori sono comunque contraddittori (Asheim, 1967; Henniger, 1993; Stromberg, 1974).

La desmotomia della briglia radiale è una tecnica chirurgica che coinvolge tutta l'unità funzionale tendinea con lo scopo di preservare l'elasticità della struttura piuttosto che aumentarne la resistenza. Data la sua localizzazione anatomica, durante la fase di supporto del peso il LA-TFS trasferisce il carico dalla porzione tendinea del muscolo flessore delle falangi alla parte distale del radio, prevenendo il sovraccarico e l'eventuale rottura sia del muscolo sia del tendine (Hogan, 1995). La desmotomia della briglia radiale sembra dare buoni risultati permettendo al cavallo il ritorno all'attività sportiva e riducendo i rischi di recidiva (Watkins, 1995).

La desmotomia del legamento anulare è un altro trattamento che può essere impiegato per il trattamento delle teniti. Solitamente è usata per evitare che i tendini infiammati ed edematosi possano essere danneggiati ulteriormente dalla compressione da parte del legamento anulare. Questo tipo d'intervento è molto utile nel caso in cui la patologia si limiti a una reazione infiammatoria notevole, con minime lesioni interne che possono risolversi mediante riposo e impiego di farmaci antinfiammatori, senza la necessità di intervenire direttamente sulla struttura tendinea. In presenza di teniti gravi o di fenomeni aderenziali diffusi la prognosi è peggiore, nonostante l'intervento di desmotomia del legamento anulare abbia di per sé una buona prognosi (Spinabella, 2002).

Un'altra possibilità chirurgica per il trattamento delle teniti consiste nell'impiego d'impianti di fibre flessibili di carbonio come sostitutivi del tessuto tendineo. Questo

materiale induce la formazione di un tessuto cicatriziale che presenta una struttura istologica molto simile a quella originale del tendine (Hannas, 1995).

L'utilizzo di questo tipo d'impianto dovrebbe essere ulteriormente approfondito, dato che Valdez (1980) ha riportato buoni risultati, tra i quali una maggiore elasticità del tendine, mentre altri autori (Brown, 1983; Pool, 1983) non hanno riscontrato, nel loro studio, alcuna prova del fatto che le fibre di carbonio agiscano come un'impalcatura in grado di facilitare la disposizione longitudinale delle fibre collagene nella formazione della cicatrice.

1.6.4 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 (grandi polipeptidi e glicoproteine). Questi fattori sono secreti da diversi elementi cellulari, presenti sia nei tessuti sia nel sangue, e sono in grado di regolare il metabolismo cellulare. Esistono numerosi fattori di crescita e ognuno di essi presenta delle peculiarità.

I GFs incrementano il processo riparativo dei tendini stimolando la sintesi di ECM che a sua volta promuove la proliferazione e la differenziazione cellulare e stimola lo sviluppo della vascolarizzazione (Dahlgren, 2005).

L'uso di un solo fattore di crescita non è comunque sufficiente per permettere un'ottimale rigenerazione della lesione, quindi sarebbe opportuno procedere con l'impiego di un insieme di fattori di crescita in modo da favorire una rigenerazione di tutte le costituenti tendinee (Dowling, 2000).

Recentemente si è posta particolare attenzione all'uso di plasma ricco di piastrine (PRP) per la terapia delle lesioni tendinee. Il plasma arricchito è una fonte di elevate concentrazioni di PDGF (Platelet Derived Growth Factor) e TGF- β (Transforming Growth Factor β), di cui le piastrine sono ricche, e apporta molti altri fattori di crescita come l'EGF (Epidermal Growth Factor) e il PAF, il Trombossano A₂ (TXA) e la

fibronectina/vitronectina. 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. Le concentrazioni di PDGF e TGF β sono significativamente più alte nel plasma arricchito rispetto all'aspirato midollare, al sangue intero e al plasma povero di piastrine. Inoltre il PRP contiene anche l'IGF-I in percentuale simile a quella del plasma non concentrato. Il PRP trova grande applicazione in medicina umana (Everts, 2007), è un metodo economico e accessibile ed è una fonte di fattori di crescita autologhi e di frazioni ricche di cellule.

Il concetto di base prevede l'utilizzo di sangue in anticoagulante che viene in seguito separato tramite centrifugazione. L'iniezione del PRP è preceduta da diagnosi di una *core-lesion* tramite esame ecografico. Si somministrano 4-7 ml di plasma ricco di piastrine, in base alle dimensioni della lesione, ma in caso di lesioni tendinee molto piccole sono sufficienti 1-2 ml. Il PRP può essere usato anche come veicolo di MSCs per il trattamento più aggressivo delle tendiniti (Nixon, 2008).

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 con i trattamenti conservativi (Smith, 2003). È stato ipotizzato che le cellule staminali mesenchimali pluripotenti, i fattori di crescita contenuti nel midollo osseo e la fibrina della matrice possano essere la ragione del precoce e maggiore miglioramento della risoluzione clinica della lesione (Rosenbrock, 2004).

Tuttavia, l'inoculazione di notevoli volumi di midollo osseo (30-50 ml) all'interno della struttura teno-legamentosa potrebbe distruggere le fibre collagene ancora intatte. Inoltre, il midollo può contenere piccolissimi frammenti di osso e cellule adipose che sono elementi negativi ai fini della guarigione poiché potrebbero provocare la calcificazione del tendine o l'alterazione della struttura in cui viene introdotto. Infine, l'alta concentrazione di TGF- β nel fluido aspirato, potrebbe esitare in un'eccessiva formazione di tessuto cicatriziale non elastico, indesiderabile nella guarigione del tendine (Dalhgren, 2005).

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 su lesioni molto vaste. L'uso di 10-20 milioni di MSCs in coltura miscelate a PRP o ad aspirato midollare sembrerebbe la soluzione più promettente da un punto di vista tecnico (Nixon, 2008).

Questa tecnica necessita ancora di ulteriori studi e approfondimenti e presenta come limite maggiore quello di dover istituire una banca di cellule staminali mesenchimali per la specie equina (Consiglio, 2008).

1.7 GUARIGIONE DELLE LESIONI TENDINEE

Pur attribuendo la rottura delle fibre tendinee a un evento generalmente singolo, acuto e secondario a un improvviso sovraccarico del tendine (Evans, 1975; McCullagh, 1979), è stato ipotizzato da alcuni autori (Stromberg, 1969; Fackelman, 1973) che la rottura sia in realtà preceduta da modificazioni degenerative del tessuto tendineo stesso. Generalmente, il tendine danneggiato guarisce attraverso la formazione di una cicatrice fibrosa che si sviluppa in circa 1-2 anni (Goodship, 1994; Maia, 2009).

I fattori che influenzano il risultato finale sono numerosi e tra i più significativi vi è il tipo di lesione, il tipo di tendine leso, lo stato dei tessuti circostanti e il trattamento scelto.

Una buona guarigione mira alla minor compromissione possibile della funzionalità del tendine. Per ottenere tale scopo, l'area lesionata deve essere riempita da fibroblasti maturi che operino un'adeguata sintesi di collagene, in modo da ripristinare le caratteristiche di elasticità e resistenza e da ridurre al minimo la comparsa di aderenze fibrose con le strutture circostanti.

Il processo di guarigione avviene in due modi: estrinseco e intrinseco. La via estrinseca, che rappresenta la tipologia predominante, è caratterizzata da una risposta da parte dei fibroblasti provenienti dalla guaina tendinea e dai tessuti adiacenti, da un afflusso di sangue extratendineo e dalla formazione di aderenze (Weiner, 1971; Matthews, 1979; Sharma, 2006; Andia, 2010). Durante questo processo, la cellularità del tendine

aumenta e i fibroblasti che infiltrano la ferita appaiono morfologicamente diversi dai tenociti nativi (Mc Ilwraith, 2002). Il processo intrinseco invece deriva dalla proliferazione delle cellule presenti nell'endotenonio e nell'epitenonio; la diffusione dei nutrienti avviene grazie al liquido sinoviale e non si verifica la formazione di aderenze tipiche, invece, del processo estrinseco (Manske, 1988; Kim, 2010).

Per capire quali possono essere le scelte terapeutiche in caso di lesioni teno-legamentose si deve porre l'attenzione sui processi che avvengono durante la riparazione tendinea.

La guarigione del tendine inizia con una reazione flogistica caratterizzata dalla produzione di fibrina e di cellule infiammatorie in quantità proporzionale all'ampiezza della lesione e alla gravità del trauma. La risposta infiammatoria del tessuto lesso ha un ruolo importante nel processo di guarigione di tendini e legamenti, in quanto stimola la fibroplasia che permette la formazione di tessuto di granulazione e la deposizione di nuovo collagene. La risposta infiammatoria però esercita anche effetti negativi sui tessuti circostanti, sulle fibre collagene e sulla matrice del tendine, che spiegano lo sviluppo di protocolli terapeutici volti alla sua riduzione (Henninger, 1994).

Un altro elemento fondamentale che caratterizza il processo di guarigione è la neovascolarizzazione della zona colpita. Questa origina dai capillari peritendinei ed è responsabile dell'apporto di ossigeno e sostanze nutritive, molto importanti per la sopravvivenza cellulare e per la produzione di nuovo tessuto, e di cellule infiammatorie (in particolare neutrofili e macrofagi) che sono responsabili della rimozione dei detriti dal sito della lesione.

Nonostante un adeguato apporto ematico sia determinante per la riparazione tissutale, è altresì necessario ridurre al minimo l'emorragia e l'edema conseguenti al trauma che provocherebbero la separazione dei fasci di fibre collagene, prolungherebbero la fase acuta di guarigione e promuoverebbero la formazione di tessuto cicatriziale.

Durante la fase di guarigione acuta, i fibroblasti dello strato peritendineo e dell'endotenonio migrano verso la zona lacerata e infiammata. Il loro allineamento e quello delle fibre da essi sintetizzate dipendono dalla disposizione della fibrina che si è depositata a livello della lesione (Woo, 1999).

Il processo di guarigione comporta la formazione di tessuto cicatriziale, composto prevalentemente da collagene di tipo III, che conferisce stabilità e resistenza meccanica

al sito della lesione mediante formazione di legami crociati. Nel focolaio si possono riscontrare incrementi anche nella quantità di collagene dei tipi IV e V.

In seguito alla fase acuta inizia a comparire il collagene di tipo I che assieme al collagene di tipo III è quello che predomina fino a sei mesi dopo il trauma. Nei mesi successivi prevale il collagene di tipo I che è rappresentato da fibrille ordinate linearmente grazie al progressivo rimodellamento cui è sottoposto il tendine. In questa fase, tuttavia, è comunque possibile ritrovare quantità anomale di collagene tipo III, costituito da fibre collagene di piccolo calibro, e aree prive di tessuto (Manske, 1984).

Nella guarigione dei tendini, quindi, sono di fondamentale importanza sia i fattori estrinseci, rappresentati da fibroblasti e capillari di origine peritendinea, sia quelli intrinseci, costituiti dalle cellule dell'endotenonio che possono agire come fibroblasti attivi (Manske, 1984).

La composizione e l'organizzazione della ECM che costituisce la cicatrice fibrosa rappresentano gli elementi responsabili della diminuzione delle proprietà meccaniche nel tendine guarito. Generalmente, la riduzione di tali caratteristiche è alla base della maggiore incidenza di recidive a livello della zona di transizione tra il tendine sano e quello riparato.

1.8 LE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI (MSCs)

Le cellule mesenchimali adulte 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; Perin, 2003; Strauer, 2002; Zhang, 2004; Sugaya, 2003; Chapel, 2003).

Queste caratteristiche hanno causato un crescente interesse verso quelle prospettive terapeutiche basate sulla capacità rigenerativa e riparativa di organi e tessuti, che le cellule staminali offrono (Ferrari, 2007; Crovace, 2010).

Alcuni studi hanno dimostrato che le MSCs sono dotate di potere rigenerativo (El Tamer, 2009; Miyahara, 2006; Suzuki, 2008; Harris, 2009; Arnalich-Montiel, 2008; Ferrari, 1998) e che possono essere attestate da diversi tessuti, come midollo osseo,

sangue periferico, cordone ombelicale, tessuto adiposo e derma (Jiang, 2002; Kuznetsov, 2001; Biebak, 2004; Koch, 2007; Yamamoto, 2007; Crigler, 2007).

Il midollo osseo contiene cellule staminali mesenchimali o stromali (MSCs) e cellule staminali ematopoietiche (HSCs). Le MSCs sono presenti nel midollo in quantità minore rispetto alle HSCs e sono responsabili della genesi di tutte le cellule non emopoietiche che risiedono nel midollo osseo.

Per molti anni il midollo osseo è stato considerato la principale fonte di cellule staminali mesenchimali (Smith, 2005; Richardson, 2007; Crovace, 2007; Nixon, 2008; Crovace, 2008), che sono in grado di rispondere a stimoli provenienti da lontano ed essere richiamate da tessuti danneggiati. (Chamberlain, 2007; Sordi, 2009).

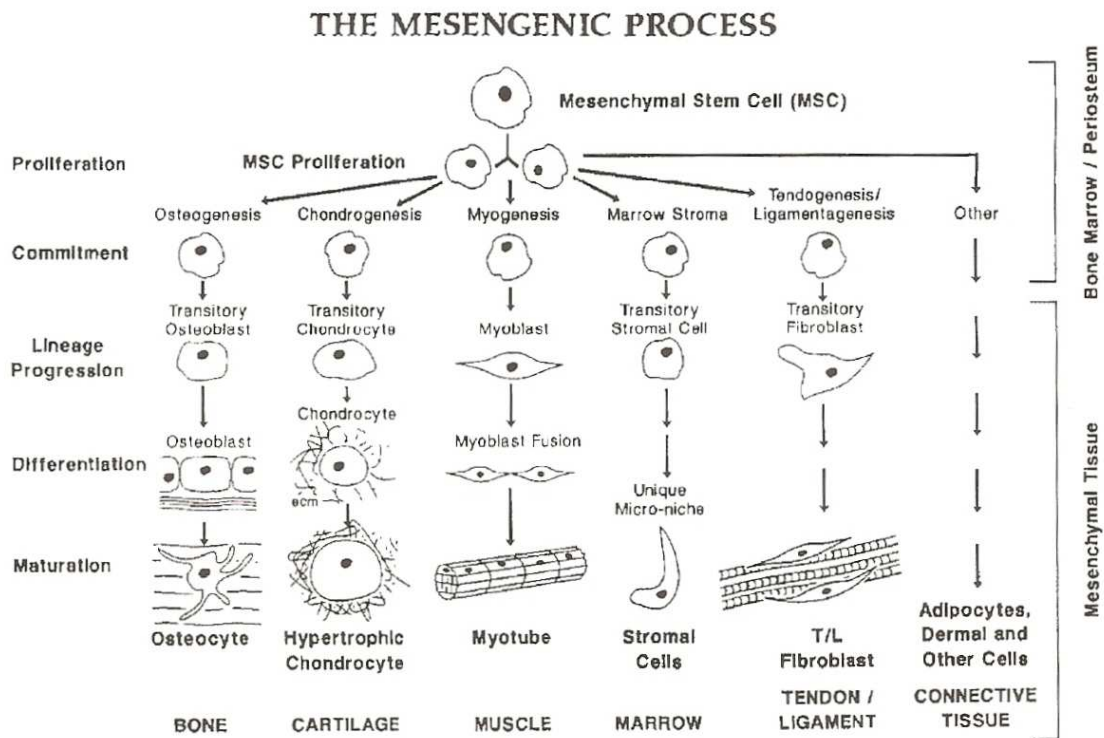


Fig. 17: Capacità differenziali delle cellule staminali.

Tuttavia, a causa dell'invasività delle procedure di prelievo e della progressiva riduzione con l'età del numero di cellule isolate e del loro potenziale differenziativo, i ricercatori si sono indirizzati verso la ricerca di nuove fonti di MSCs.

Recentemente è stato dimostrato che il sangue venoso periferico può essere considerato una fonte alternativa di cellule staminali mesenchimali (Koerner, 2006; Martinello, 2009).

1.8.1 I cluster di differenziamento

Le cellule sono definite in funzione alle molecole di superficie, per lo più glicoproteine, espresse sulla loro membrana cellulare. Queste molecole sono usate comunemente come marker cellulari e sono dette “cluster di differenziazione” (CD). A oggi sono stati identificati più di 320 CD. Generalmente una combinazione di marker è in grado di caratterizzare un solo tipo cellulare, che viene quindi descritto come avente questi marker.

La classificazione cellulare mediante l’uso di CD è stata applicata anche alle cellule staminali (Smith L. G. 2004).

Fenotipicamente le MSCs esprimono un certo numero di marcatori che, sfortunatamente però, non sono specifici per ciascuna MSC.

Le MSCs adulte non esprimono i marcatori delle cellule ematopoietiche (CD45, CD34, CD14, CD11). Inoltre non esprimono le molecole co-stimolatorie CD80, CD86, CD40 o molecole di adesione CD31 (platelet/endothelial cell adhesion molecule [PECAM]-1), CD18 (leukocyte function-associated antigen-1 [LFA]-1), o CD56 (neuronal cell adhesion molecule-1).

Possono esprimere i marker CD105 (SH2), CD73 (SH3/a), CD44, CD90 (Thy-1), CD71, Stro-1, molecole di adesione CD106 (vascular cell adhesion molecule [VCAM]-1), CD166 (activated leukocyte cell adhesion molecule [ALCAM]), molecole di adesione intracellulare (ICAM)-1 e CD29 (Lee, 2004; Kern, 2006; Chamberlain, 2007; Hoynowski, 2007; Guest, 2009; Martinello, 2009)

1.8.2 Plasticità delle cellule staminali

L’origine delle cellule staminali embrionali è conosciuta mentre quella delle cellule staminali adulte non è ancora ben chiara. Si pensa che le MSCs riescano a evitare il processo differenziativo tipico delle cellule durante lo sviluppo embrionale e a

colonizzare appropriate nicchie; queste ultime avrebbero la funzione sia di mantenere la potenzialità delle cellule nella vita adulta sia di limitarne i processi di differenziamento (Lanza, 2004).

Le cellule staminali embrionali sono totipotenti, ossia possono differenziarsi in tutti i tessuti (anche extraembrionali), fino allo stadio di morula a 8 blastomeri, dopodiché diventano pluripotenti, che sono in grado di differenziarsi in uno qualsiasi dei tre foglietti embrionali ma non negli annessi embrionali. Sono pluripotenti le cellule della massa interna della blastocisti rivestita dal trofoblasto. Le cellule staminali multipotenti sono in grado di differenziare in un numero di tipi cellulari limitato al tessuto in cui risiedono; appartengono a questa classe le cellule ematopoietiche (HSCs) e le cellule mesenchimali (MSCs).

1.8.3 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. Lo scopo è di ottenere, dalle piastrine debitamente attivate, la liberazione di diversi fattori di crescita necessari per la differenziazione delle cellule multipotenti in modo da accelerare la crescita e l'impianto delle cellule staminali (Lucarelli, 2003; Kilian, 2004; Doucet, 2005; Del Bue, 2006; Gobbi, 2007; Everts, 2007). I fattori di crescita liberati dalle piastrine, infatti, hanno dimostrato di possedere la capacità di favorire la differenziazione delle cellule staminali verso il destino cellulare e di promuovere l'angiogenesi (Fotia, 2008).

L'utilizzo combinato di MSCs e di PRP ha come importante vantaggio entrambi i biomateriali sono due composti autologhi, non tossici e biodegradabili.

1.8.4 Impiego delle MSCs nel cavallo

Le cellule staminali mesenchimali sono già state isolate da diversi tessuti (Jiang, 2002; Kuznetsov, 2001; Biebak, 2004; Koch, 2007; Yamamoto, 2007; Crigler, 2007) e testate per il differenziamento in diverse linee cellulari (Zuk, 2002; Seggewiss, 2004; Vidal, 2008; Rebellato, 2008).

In medicina equina il tessuto maggiormente scelto come fonte di cellule staminali è ancora il midollo osseo, ma il sangue periferico può rappresentare uno strumento promettente per l'ottenimento di buoni risultati clinici (Koerner, 2006; Martinello, 2009), grazie alla bassa invasività del prelievo ematico, alla facile accessibilità e alla plasticità delle cellule.

Trattamento di lesioni tendinee nel cavallo con MSCs

Attualmente, l'impiego di cellule staminali si sta diffondendo anche in medicina veterinaria. Esistono, infatti, degli esempi di applicazione delle MSCs nella specie equina (Smith, 2003; Goodship, 2004; Smith, 2004; Richardson, 2007; Barriera, 2008; Nixon, 2008), generalmente per la terapia delle lesioni tendinee poiché le soluzioni terapeutiche proposte finora 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 fibre di tipo III; questi cambiamenti conferiscono al tendine maggior elasticità ma minor resistenza agli insulti.

Già nel 2003, Smith descrisse per primo l'uso di MSCs autologhe in una lesione spontanea di un tendine flessore superficiale del dito; lo studio evidenzia l'efficacia di questa terapia e l'assenza di reazioni avverse nelle settimane successive all'iniezione. Richardson nel 2007 ha dimostrato, con degli esperimenti in vitro, che le cellule staminali sono in grado di produrre una ECM con caratteristiche simili a quelle del tendine intatto. Nixon et al., invece, nel 2008 hanno dimostrato che l'impiego di MSCs ottenute dal tessuto adiposo in una lesione tendinea indotta nel cavallo con un'iniezione locale di collagenasi, è in grado di determinare una migliore architettura tendinea; inoltre, i tendini trattati con cellule staminali presentano una diminuzione nell'entità dell'infiltrato infiammatorio.

Questi risultati avvalorano l'ipotesi che le MSCs siano in grado di indurre una miglior distribuzione delle fibre collagene e buona rigenerazione del tessuto tendineo, inoltre, fanno presupporre che le cellule staminali siano dotate di una discreta attività antinfiammatoria.

Infine, è stato dimostrato in vivo che l'utilizzo di cellule staminali mesenchimali in una lesione tendinea, attribuisce al tessuto delle caratteristiche ecografiche, istologiche e biomeccaniche migliori rispetto a quanto ottenuto dalla guarigione spontanea o dall'utilizzo altre terapie (Richardson 2007, Barriera 2008).

Trattamento di lesioni cartilaginee nel cavallo

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 (OC), di cisti subcondrali e di tutte le patologie responsabili del deterioramento della cartilagine articolare. Le principali opzioni terapeutiche in queste patologie consistono nella medicazione dell'articolazione associata a riposo, nell'iniezione intrarticolare ecoguidata di steroidi, nell'artroscopia o nel curettage chirurgico dell'articolazione coinvolta. Tuttavia, la cartilagine articolare raramente torna alla funzionalità originaria dopo aver subito insulti traumatici o degenerativi.

L'impiego di MSCs come supporto al pool di cellule staminali locali fornisce il vantaggio della presenza di una riserva di cellule staminali autologhe che possono essere ricavate da diversi tessuti dell'organismo.

In realtà, la maggior parte degli studi presenti in letteratura descrive l'attività delle cellule staminali in vitro ma non ci sono molti studi precisi riguardo alla loro efficacia nelle lesioni cartilaginee spontanee nel cavallo (Kisiday, 2008; Koch, 2009). In vitro si è visto che, mantenendo una bassa tensione di ossigeno, un'alta densità cellulare e un'esposizione a desametasone, le MSCs possono essere indotte verso il differenziamento in condrociti.

In uno studio condotto nel 2007, Wilke ha dimostrato che il trattamento di lesioni articolari indotte nel cavallo, con MSCs associate a fibrina comporta un netto miglioramento della guarigione rispetto al trattamento con la sola fibrina.

Trattamento di patologie ossee nel cavallo

Normalmente, la riparazione del tessuto osseo è determinata da cambiamenti nella composizione molecolare e nell'organizzazione strutturale che normalmente

caratterizzano la ECM; queste alterazioni portano alla formazione un tessuto cicatriziale che limita le fisiologiche caratteristiche meccaniche dell'osso.

Le MSCs possono essere indotte a differenziarsi ed espandersi secondo una linea osteoblastica (usando desametasone, ascorbato o β -glicerolfosfato). Questa stimolazione indirizza le cellule verso una sequenza predeterminata di eventi, ossia proliferazione, differenziazione, maturazione e mineralizzazione (Lucarelli, 2003).

In uno studio condotto nel 2000, Lennon ha dimostrato che la terapia con MSCs in fratture da *non-union* è in grado di dare una migliore riparazione della soluzione di continuo rispetto all'innesto di *scaffold* privi di cellule staminali. Vidal, nel 2006, ha dimostrato che le cellule staminali possano essere efficaci nella rigenerazione del tessuto osseo.

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 da non unione e per la sostituzione d'importanti resezioni ossee.

Grazie alle loro caratteristiche di auto-replicazione e differenziazione, le MSCs potrebbero quindi rappresentare un importante contributo nel trattamento delle lesioni ossee, assicurando la restituzione alla normalità anatomica e funzionale del tessuto danneggiato.

Altri possibili impieghi

Le cellule staminali miogeniche mononucleate, localizzate tra membrana basale e sarcolemma delle fibre muscolari, conosciute anche come *cellule satelliti*, sono essenziali per la riparazione muscolare.

Recentemente è stata scoperta una popolazione cellulare con caratteristiche simili alle cellule staminali ematopoietiche isolate dal muscolo scheletrico (ms-HSCs). Non è ancora ben chiaro il loro ruolo ma dati recenti suggeriscono che possano avere, come le cellule satelliti, potenziali ematopoietici e miogenici (McKinney-Freeman, 2002).

Nel 2004 Sampaolesi, tentando di ottenere cellule staminali da diverse fonti (midollo osseo, muscolo scheletrico, tessuto adiposo, sinovia e tessuto nervoso), ha dimostrato che le cellule che presentano migliore efficienza nel ripristinare la struttura muscolare in

modelli murini sono le ms-HSCs; tuttavia, anche le HSCs (cellule staminali ematopoietiche) e le MSCs hanno mostrato questa potenzialità.

Uno studio, condotto nel 2007 da Ohnishi, dimostra che le MSCs possono essere indotte a differenziare in cardiomiociti e in cellule endoteliali, quindi le cellule staminali potrebbero offrire un'interessante prospettiva terapeutica anche nell'ambito delle patologie cardiache.

1.9 IL CONCENTRATO PIASTRINICO (PRP)

La guarigione delle ferite è un processo molto complesso che vede coinvolti numerosi meccanismi cellulari e molecolari. In condizioni fisiologiche, le cellule implicate nella guarigione delle ferite producono una serie di molecole che consentono la rigenerazione tissutale e che, a loro volta, influenzano le cellule che intervengono in questo processo.(Anitua, 2004).

Le piastrine sono frammenti citoplasmatici fondamentali nella guarigione poiché possiedono, oltre che di un ruolo nell'emostasi, proprietà pro-infiammatorie, regolatrici e rigenerative mediate dall'interazione con alcune cellule (es. neutrofili e cellule endoteliali) e dalla liberazione di fattori di crescita (GFs), chemochine e altre molecole regolatrici (Bessis, 1973; Aguggini, 1992; Chaer, 2006; Everts, 2007).

Le piastrine rilasciano numerosi GFs e altre molecole coinvolte nella guarigione (Anitua, 2004; Anitua, 2007). I GFs principalmente secreti dalle piastrine sono il Platelet-derived Growth Factor (PDGF), il Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1), il Transforming Growth Factor β 2 (TGF- β 2), l'Epidermal Growth Factor (EGF), il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), l'Insulin-like Growth Factor di tipo 1 (IGF-I) e l'Hepatocyte Growth Factor (HGF) (Marx, 2004). Questi peptidi inducono chemiotassi, proliferazione e differenziazione cellulare, neovascolarizzazione e sintesi di ECM che favoriscono la risoluzione della flogosi e del processo di guarigione.

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 normativa vigente 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, scatenerrebbe una reazione immunitaria (Marx, 2004; Everts, 2007).

Contiene numerose molecole che rivestono un ruolo di fondamentale importanza nel processo di riparazione tissutale; alcune di queste molecole sono rappresentate dai fattori contenuti nei granuli α piastrinici mentre altre da proteine del sangue, come la fibrina, la fibronectina e la vitronectina (Anitua, 2007; Everts, 2007; Nixon, 2008; Maia, 2009).

Il vantaggio dato dall'impiego del PRP potrebbe essere dovuto alla concentrazione sopra fisiologica 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. (Prades, 2006).

Numerosi studi sperimentali e clinici (Everts, 2007; Rožman, 2007), 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.

Recentemente, l'impiego di PRP autologo per stimolare la rigenerazione tissutale, è aumentato in ambito chirurgico in medicina umana (Everts, 2007).

L'uso del PRP in medicina equina sembra mostrare risultati incoraggianti, in particolare per il trattamento delle ferite cutanee e delle patologie muscolo-scheletriche (Carmona, 2006).

Per questo motivo è importante conoscere i processi responsabili della genesi delle piastrine (PLT), i meccanismi biochimici e cellulari coinvolti alla riparazione tissutale, i metodi impiegati per la preparazione e l'impiego clinico del PRP.

1.9.1 Le piastrine

La morfologia delle piastrine

Le piastrine sono dei frammenti cellulari (Everts, 2007) che originano da precursori chiamati megacariociti (MKs).

I MKs sono cellule multinucleate (Bessis, 1973; Sellon, 2004; Everts, 2007) situate nel midollo osseo ed emettono delle proiezioni citoplasmatiche attraverso le fenestrature dei capillari sinusoidi, che vengono frammentate dal flusso ematico formando così le piastrine, che sono rilasciate nel torrente circolatorio (Sellon, 2004; Everts, 2007).

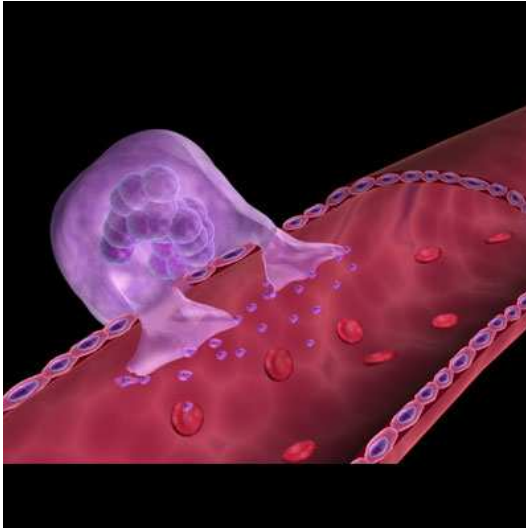


Fig. 19: La genesi delle piastrine
(www.taramrusso.com).

La morfologia delle piastrine è variabile, infatti, possono essere di grandezza differente secondo la specie (le PLT equine sono di forma discoidale, anucleate, lunghe 5-7 μm e larghe 1-3 μm), l'età e il loro momento funzionale (Weiss, 2010). Si possono distinguere due forme in funzione del momento funzionale: la forma cosiddetta stimolata, provvista di pseudopodi e un granulomero diffuso nel citoplasma (dato dalla fusione degli alpha-granuli), e la forma in riposo, con il granulomero addensato e circoscritto (Fig. 18) (Maia 2009).

Hanno una vita relativamente breve, di 7-12 giorni, e le forme senescenti sono rimosse dal torrente circolatorio ad opera di macrofagi tissutali della milza, del fegato e del midollo osseo (Carmona, 2006; Everts, 2007; Weiss, 2010).

La membrana delle piastrine

La membrana delle piastrine è composta di tre strati: il glicocalice, il doppio strato fosfolipidico e lo strato sottomembranoso (Tablin, 2000; Carmona, 2006; Weiss, 2010). Il glicocalice è lo strato più esterno ed è caratterizzato dalla presenza di molecole, come le integrine, le leucine-rich proteins e le selectine (Deldar, 2001; Carmona, 2006; Weiss, 2010), che svolgono una funzione recettoriale nell'attivazione e nell'adesione delle piastrine e rappresentano gli antigeni di membrana. (Carmona, 2006; Weiss, 2010).

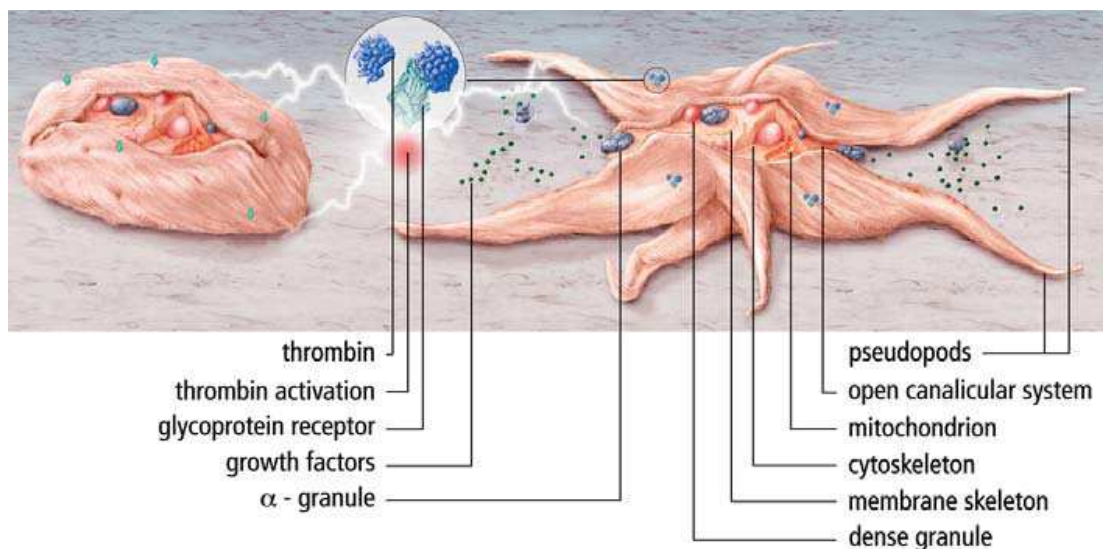


Fig. 18: Rappresentazione schematica della piastrina a riposo e della piastrina attivata. (Everts, 2007).

Il doppio strato fosfolipidico è quello centrale, è dotato di proprietà anticoagulanti e contiene domini transmembrana e periferici che agiscono da recettori. E' costituito internamente da aminofosfolipidi carichi negativamente (fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina) ed esternamente da fosfolipidi neutri (fosfatidilcolina e sfingosina); inoltre sono presenti il fosfatidilinositolo e la lisolecitina (Carmona, 2006; Weiss, 2010).

Lo strato sottomembranoso è parte del citoscheletro e si lega ad alcune glicoproteine dello strato esterno.

Il citoplasma delle piastrine

Il citoplasma piastrinico è formato da diversi elementi: microfilamenti, microtubuli, mitocondri, lisosomi, sistemi di membrana, glicogeno e numerosi granuli (Deldar 2001, Everts 2007, Weiss 2010).

Il sistema canalicolare aperto, o di membrana, origina dalla membrana lipidica che, invaginandosi nel citoplasma, costituisce un sistema di canalicoli responsabili dell'aumento di superficie disponibile per gli scambi con l'esterno (Deldar; 2001; Sellon, 2004).

Il sistema tubulare denso rappresenta un ulteriore complesso di canalicoli e costituisce il sito di sequestro del calcio e di accumulo degli enzimi necessari per il metabolismo dell'acido arachidonico (Deldar, 2001; Sellon, 2004).

I microfilamenti e i microtubuli formano il citoscheletro, che è alla base del mantenimento della normale forma delle piastrine, e sono responsabili dei cambiamenti di forma piastrinici, dell'emissione di pseudopodi durante l'attivazione, della centralizzazione e della conseguente secrezione di granuli citoplasmatici e, infine, della retrazione del coagulo (Deldar, 2010).

I filamenti di actina forniscono un supporto strutturale ai granuli e ai mitocondri (Rosati e Colombo 199; Carmona 2006).

Granuli piastrinici e loro contenuto

All'interno delle piastrine sono presenti numerosi granuli che contengono una quantità notevole e varia di sostanze biologicamente attive (Rožman, 2007).

1. Gli α -granuli sono i più numerosi e contengono citochine, chemochine e fattori di crescita. Alcune molecole sono specifiche delle piastrine, ossia il Fattore Piastrinico 4 (PF-4) e le β -tromboglobuline (β -TG), mentre altre non lo sono, come i fattori della coagulazione (V e VIII), le proteine adesive (fibrinogeno, fibronectina, vitronectina, trombospondina), le albumine e i proteoglicani (Deldar, 2001; Anitua, 2004; Mitchell, 2005; Carmona, 2006; Everts, 2007). Queste proteine sono essenziali per tutte le funzioni piastriniche quali lo sviluppo di trombi, la

modulazione dell'inflammatione e la sintesi di ECM durante la riparazione delle lesioni.

Le piastrine rilasciano eicosanoidi, che derivano dall'acido arachidonico dei fosfolipidi di membrana: il TXA₂ (Thromboxane A₂) è un potente vasocostrittore che è rilasciato in seguito a un danno vascolare; il PAF (Platelet Activating Factor) è un lipide chemiotattico che media l'arresto e l'attivazione leucocitaria sulle cellule endoteliali o sulle piastrine (Anitua, 2004; Carmona, 2006).

I principali fattori di crescita contenuti negli α -granuli e liberati durante la fase di attivazione piastrinica sono:

- L'EGF (Epidermal Growth Factor), che stimola la proliferazione di cellule epiteliali ed epidermiche, fibroblasti e cellule embrionali, ha un'azione chemiotattica nei confronti di fibroblasti e cellule epiteliali, stimola la riepitelizzazione e l'angiogenesi e influenza la sintesi e il turn-over della matrice extracellulare;
- Il PDGF (Platelet-derived Growth Factor), le cui isoforme A e B sono potenti mitogeni per fibroblasti, cellule della muscolatura vasale liscia, condrociti, cellule epiteliali ed endoteliali, ha una potente azione chemiotattica per cellule emopoietiche e mesenchimali, fibroblasti e miociti, attiva il TGF- β , stimola neutrofili e macrofagi, la mitogenesi di fibroblasti e cellule della muscolatura liscia, la sintesi di collagene, l'angiogenesi e l'attività della collagenasi;
- Il TGF- α (Transforming Growth Factor α), che mima l'EGF occupandone i recettori, stimola la crescita di cellule mesenchimali, epiteliali ed endoteliali, la chemiotassi endoteliale, controlla lo sviluppo dell'epidermide, stimola la proliferazione di cellule endoteliali in maniera maggiore rispetto all'EGF, promuove la generazione di osteoblasti influenzando il rilascio di matrice ossea durante l'osteogenesi, influenza la formazione dell'osso e il suo rimodellamento inibendo la sintesi di collagene e il rilascio di calcio;
- Il TGF- β 1 (Transforming Growth Factor β 1) stimola la proliferazione e la chemiotassi dei fibroblasti, stimola la sintesi di collagene, inibisce la crescita di cellule epiteliali, endoteliali, fibroblasti, cellule neuronali, emopoietiche e cheratinociti, antagonizza l'attività biologica di EGF, PDGF, FGF- α , FGF- β ;

- Il KGF o FGF-7 (Keratinocyte Growth Factor) e il CTGF (Connective Tissue Growth Factor) sono i più potenti GFs per i cheratinociti della pelle, promuovono la guarigione delle ferite tramite proliferazione, differenziazione, angiogenesi e migrazione, sono mitogeni per molte cellule epiteliali, esclusi fibroblasti e cellule endoteliali;
- Il'FGF- α o FGF-1 (Fibroblast Growth Factor α o acido) partecipa ai processi cellulari di proliferazione, differenziazione, angiogenesi, e migrazione ed è mitogeno per cheratinociti della pelle, fibroblasti dermici e cellule endoteliali vascolari;
- Il FGF- β o FGF-2 (Fibroblast Growth Factor β o basico) che stimola la crescita di fibroblasti, mioblasti, osteoblasti, cellule neurali, endoteliali, cheratinociti, condrociti e l'angiogenesi, la sintesi di collagene, la proliferazione endoteliale, la contrazione delle ferite, la sintesi di matrice, l'epitelizzazione e la produzione di KGF;
- Il VEGF/VEP (Vascular Endothelial Growth Factor) stimola la proliferazione di cellule endoteliali macrovascolari, induce neovascolarizzazione (è una forte proteina angiogenica) e sintesi di metalloproteinasi (MPP), che degradano il collagene interstiziale di tipo 1, 2, e 3;
- Il GM-CSF o CSF- α (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor) induce la proliferazione, la migrazione, l'angiogenesi e la formazione di endotelio vascolare, è un potente stimolatore della proliferazione e della differenziazione degli osteoblasti e stimola la mineralizzazione della matrice;
- L'IGF (Insuline-like Growth Factor) è un GF per i fibroblasti, promuove la sintesi di collagenasi e PGE₂ nei fibroblasti, stimola la sintesi di collagene e matrice da parte degli osteoblasti e regola il metabolismo della cartilagine articolare;
- Il TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) è un GF per i fibroblasti e promuove l'angiogenesi;
- L'IL-1 β (Interleuchina 1 β), inibisce la crescita di epatociti e cellule endoteliali, attiva gli osteoclasti, sopprimendo la formazione di nuovo osso, supporta l'angiogenesi ed è mitogena per le cellule epidermiche, in bassa concentrazione

favorisce la crescita di nuovo tessuto osseo e migliora le reazioni infiammatorie e l'attività della collagene (Rožman 2007).

2. I granuli lisosomiali contengono enzimi idrolitici e proteolitici, come idrolasi acide (fosfatasi e β -glucuronidasi), guanina, fosfolipasi e chinasi (Deldar, 2001; Carmona, 2006).
3. I granuli elettrondensi, o granuli δ , contengono ADP, ATP, calcio ionizzato, serotonina, istamina, catecolamine e fosforo. L'ADP è responsabile della stimolazione delle piastrine alla migrazione e, in combinazione con la serotonina, della contrazione delle arterie, mentre l'ATP ha azione antagonizzante quella dell'ADP (Deldar, 2001; Anitua, 2004; Mitchell, 2005; Carmona, 2006; Everts, 2007).

1.9.2 Meccanismo d'azione delle piastrine

In seguito a un danno vascolare, le piastrine vengono a contatto con la ECM sottostante l'endotelio e in particolare con le molecole che la compongono, come collagene, proteoglicani, fibronectina e altre glicoproteine adesive. Questo determina l'adesione delle piastrine alla ECM e la loro attivazione; di conseguenza si verificano il cambiamento di forma, la secrezione di granuli e l'aggregazione piastrinica (Mitchell, 2005; Everts, 2007; Nixon, 2008; Maia, 2009).

Adesione e attivazione piastrinica

L'adesione delle piastrine all'ECM esposta, e in particolare al collagene, determina l'attivazione piastrinica e l'avvio della trasduzione del segnale. L'attivazione è mediata da molecole di adesione (soprattutto integrine), alcune delle quali sono esposte sulla superficie della piastrina in seguito ad attivazione mentre altre sono già presenti in forma funzionale sulla superficie delle piastrine circolanti. Oltre al collagene, le piastrine si legano anche alla fibronectina, alla laminina e ad altri elementi della ECM (Mitchell, 2005; Fasce, 2008).

Il legame delle piastrine a queste molecole porta alla formazione del cosiddetto "tappo piastrinico", ma questo non è abbastanza forte da resistere al flusso ematico. Pertanto si

rende necessaria l'attivazione di un meccanismo in grado di rafforzare i legami tra piastrina e piastrina e tra piastrina ed ECM.

Un'adesione più stabile è assicurata dal legame della Glicoproteina Ib (GpIb), presente sulla superficie piastrinica (Sellon, 2004; Mitchell, 2005), al fattore di von Willebrand; quest'ultimo è una glicoproteina presente nell'endotelio vascolare in conformazione lineare e complessata con il fattore della coagulazione VIII, ma anche libera nel plasma e di conformazione raggomitolata.

Si genera, quindi, un ponte tra la molecola GpIb delle piastrine e la ECM esposta e da questa interazione si attiva l'enzima fosfolipasi C piastrinico che genera due mediatori, il diacilglicerolo e l'inositotrilfosfato. Il diacilglicerolo regola la secrezione dei granuli piastrinici e sembra essere associato alla fusione delle glicoproteine Ib e IIIa che porta alla formazione di un complesso glicoproteico fondamentale per l'aggregazione (Chaer, 2006; Everts, 2007; Fasce, 2008). L'inositotrilfosfato induce il rilascio di ioni calcio nel citoplasma, che è fondamentale per il cambiamento di forma delle piastrine e la secrezione del contenuto dei granuli all'esterno.

Cambiamento di forma e secrezione dei granuli

In seguito all'adesione delle piastrine alla ECM, si osserva il passaggio da una classica forma discoidale ad una forma più sferica, resa irregolare dall'estroflessione di pseudopodi che è mediata dall'ATP; gli pseudopodi permettono il contatto con le altre piastrine (Fig. 20) (Everts, 2007, Maia, 2009).

Un'altra modificazione che subiscono le piastrine è la secrezione dei granuli piastrinici (Mitchell, 2005; Carmona, 2006; Everts, 2007) che dipende dalla presenza di ATP. Questa avviene secondo tempi e modalità differenti: inizialmente si ha il rilascio del contenuto dei granuli α , poi quello dei granuli elettrodensi e infine quello dei granuli lisosomiali (Carmona, 2006; Nixon, 2008).

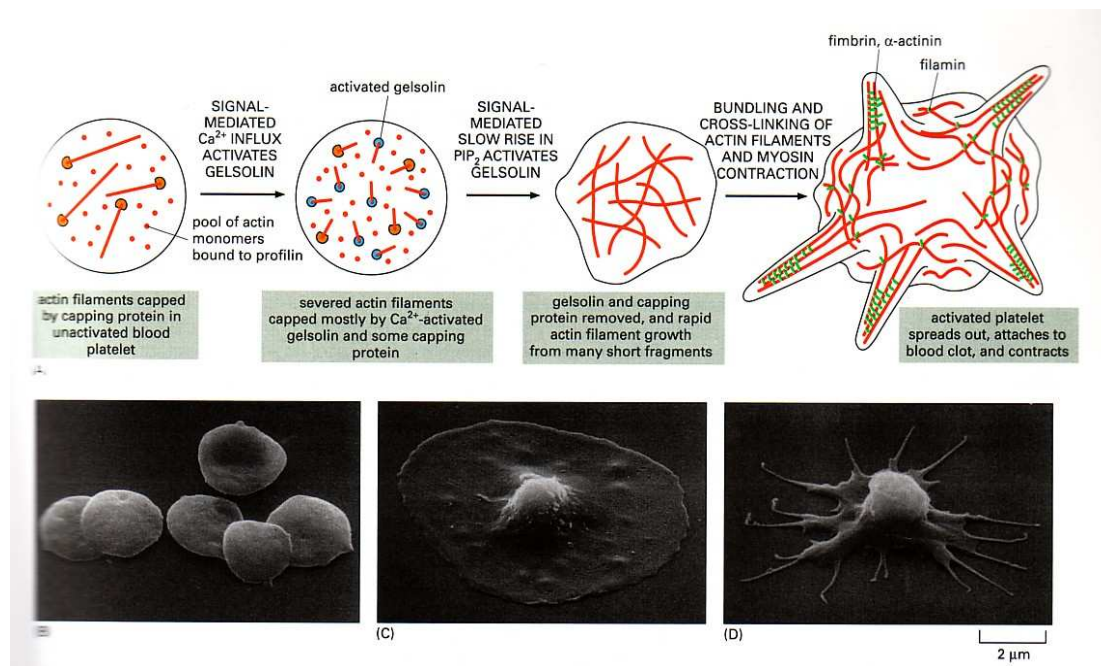


Fig. 20: modificazioni morfologiche della piastrina durante l'attivazione (http://personalpages.manchester.ac.uk/staff/j.gough/lectures/the_cell/cytoskeleton/platelet.jpg).

Aggregazione piastrinica

Questo fenomeno può essere suddiviso in due fasi:

1. aggregazione primaria: è reversibile e non è associata a rilascio di granuli piastrinici (Sellon, 2004);
2. aggregazione secondaria: segue il rilascio di elevate quantità di ADP e di TXA_2 da parte delle piastrine attivate (Mitchell, 2005; Fasce, 2008).

Le piastrine si aggregano tra loro grazie al legame dei complessi GpIIb-IIIa con il fibrinogeno, che porta alla formazione di veri e propri ponti tra le piastrine.

In seguito all'aggregazione ha inizio la cascata della coagulazione, un complessa via enzimatica che porta alla formazione di trombina e che è in grado di convertire il fibrinogeno in fibrina (Fig. 21).

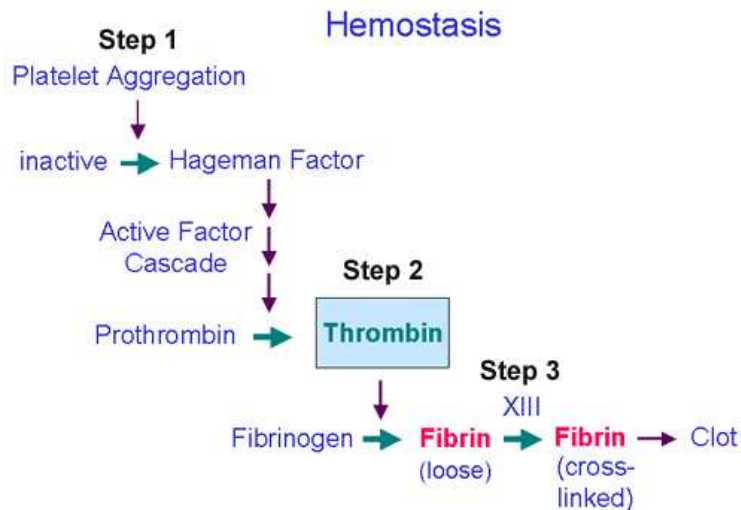


Fig. 21: La cascata della coagulazione. (Copyright © 2005 Mariya Pachman, Kristina Wittstrom).

La fibrina viene polimerizzata e stabilizzata per garantire una maggiore solidità del tappo piastrinico e stimolare direttamente l'adesione di neutrofili e monociti (Mitchell, 2005).

1.9.3 Caratteristiche e meccanismo d'azione del PRP

Durante la fase infiammatoria la piastrina agisce su diversi fronti, ad esempio ha effetto antimicrobico, d'induzione della coagulazione e di retrazione del coagulo; agisce inoltre sulla segnalazione da parte delle citochine e sul rilascio di chemochine e fattori di crescita (Fig. 22) (Crane, 2008). 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 il prima possibile (Marx, 2004).

La preparazione del PRP deve avvenire in modo da separare efficacemente le piastrine dagli eritociti e concentrarle senza danneggiare le piastrine stesse. Il metodo scelto è importante poiché i fattori di crescita contenuti all'interno dei granuli α 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.

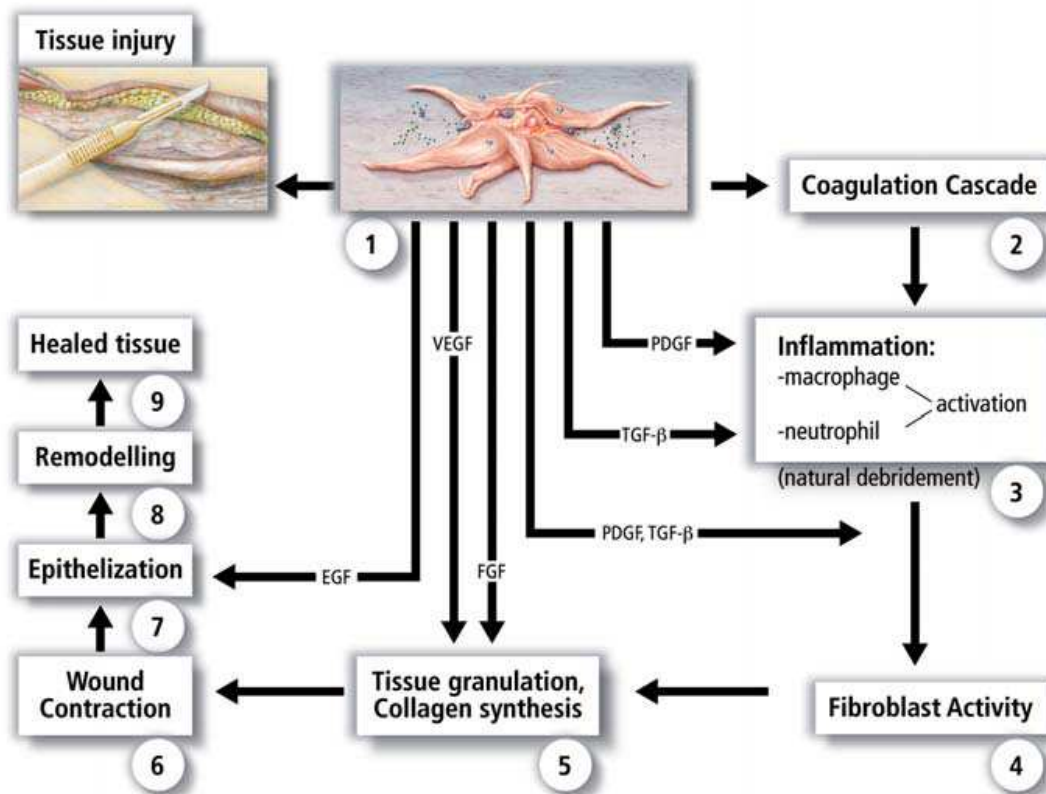


Fig. 22: Ruolo delle piastrine nel meccanismo di guarigione del danno tissutale (Everts 2007 modificato).

Durante la fase infiammatoria, i fattori di crescita liberati dalle piastrine si legano a recettori transmembrana situati sulla superficie delle cellule target (cellule staminali mesenchimali, endoteliali, epidermiche e fibroblasti). Poiché i GFs non entrano nella cellula e agiscono mediante stimolazione dei meccanismi di guarigione fisiologici, si ritiene che il PRP non possieda capacità mutageniche (Marx, 2004; Sampson, 2008).

Il concentrato piastrinico, oltre a 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).

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, quindi, con il funzionamento piastrinico (Chaer, 2006).

Recenti studi hanno dimostrato come concentrazioni piastriniche soprafisiologiche siano in grado di stimolare la proliferazione e la differenziazione di cellule staminali umane, la proliferazione fibroblastica e la sintesi di collagene di tipo I (Lu, 2001; Marx, 2004; Everts, 2007; Mazzucco, 2008; Monteiro, 2008; Maia, 2009).

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 darà alcun beneficio.

In alcuni studi è stato osservato che il PRP, in determinati tessuti, può avere effetto antinfiammatorio o proinfiammatorio in base alla concentrazione piastrinica, al contrario, altri studi hanno dimostrato gli effetti benefici di concentrazioni maggiori di piastrine (Weibrich, 2002; Crane ed Everts, 2008).

La concentrazione minima necessaria affinché un PRP possa esercitare un efficace effetto terapeutico a livello tissutale è di 300×10^3 piastrine per μl (Anitua, 2004; Maia, 2009).

Il PRP, poiché è un prodotto autologo, è un presidio medico 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 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 (importante per la riduzione del rischio di *Graft Versus Host Disease*), dall'elevata concentrazione di fattori di crescita, dalla sicurezza del preparato (per l'assenza di capacità mutageniche e di trasmissione di malattie veicolate dal sangue e per il rischio remoto di reazioni o effetti collaterali), dal basso costo, dall'attrezzatura pratica e poco ingombrante, dalla facilità di preparazione e applicazione. Lo svantaggio principale dell'uso di PRP è costituito dalla scarsa ripetibilità del prodotto ottenuto per quanto riguarda il contenuto in piastrine e leucociti (Marx, 2004; Nixon, 2008; Sampson, 2008; Fortier, 2008).

1.9.4 Metodiche di preparazione 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 e PRP ricco di leucociti e di fibrina (Dohan, 2009).

La produzione di PRP puro può essere ottenuta tramite diverse metodiche che possono essere classificate in due categorie: i *sistemi manuali* e i *sistemi semi-automatizzati* (Sutter, 2004).

Questi sistemi sono stati sviluppati in medicina umana e ciascuno presenta i propri vantaggi e svantaggi. Pertanto, si può dire che non è ancora stato sviluppato il metodo ottimale per ottenere i PRP da pazienti umani.

E' 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; Arguelles, 2006, Fasce, 2008; Kaneps, 2008).

I sistemi manuali

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

- 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 450 ml).

E' 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 della 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 method* manuale prevede la raccolta del sangue in apposite provette contenenti anticoagulante e la sua centrifugazione. Poi il sangue viene processato con diverse centrifugazioni a differenti velocità per ottenere la separazione degli emocomponenti (Fig. 23).

E' una tecnica semplice ed economica (prevede l'impiego di attrezzature poco complesse) ma richiede il rispetto di una stretta asepsi per evitare le contaminazioni batteriche del prodotto (Prades, 2006).

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; Schmidmaier, 2006).

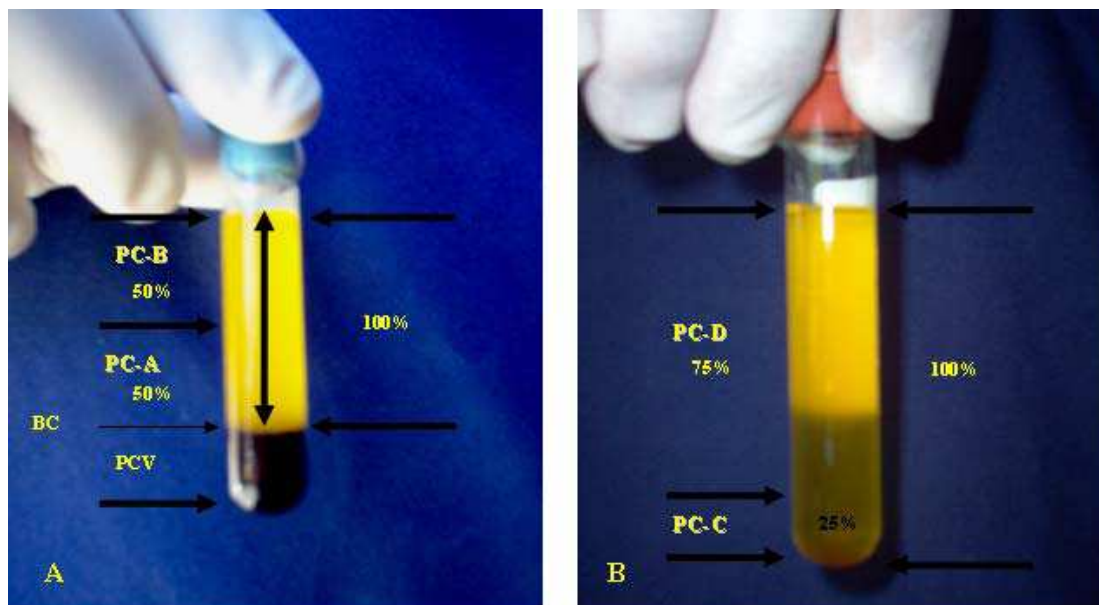


Fig. 23: Rappresentazione dei primi due concentrati piastrinici (PC-A e PC-B) ottenuti con la singola concentrazione mediante “tube method” (A). Rappresentazione delle altre due frazioni (PC-C e PC-D) di concentrati piastrinici ottenuti mediante la doppia centrifugazione tramite “tube method”(B); BC = Buffy coat. PC = Platelet concentrate. (Jorge Uriel Carmona Ramírez).

In uno studio eseguito da Sutter nel 2004, i metodi dell’afèresi e del *buffy coat* sono descritti come sistemi validi in egual misura per ottenere la concentrazione di piastrine e GFs (nello specifico TGF- β e IGF) utilizzando campioni di sangue intero equino.

Il *tube method* consente la concentrazione di un minor numero di piastrine e fattori di crescita, rispetto al *buffy coat* e all’afèresi, ma anche di un minor numero di leucociti (Anitua, 2004; 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.

Tra le diverse tipologie di kit disponibili in commercio si ricordano:

- Platelet Concentrate Collection System (PCCS®, Biomet-Merck, Bridgend, UK)
- Platelet Concentrate Collection System II (PCCS® II, Biomet-Merck, Bridgend, UK)

- Gravitational Platelet System (GPSTM, Biomet-Merck, Bridgend, UK)
- Curasan Kit® (PRP Kit, Fa.Curasan, Kleinostheim, Germany)
- Smart PreP System TM (Harvest Technologies, Munich, Germany)
- Smart PreP® 2 APC + TM (Harvest Technologies, Munich, Germany)
- Friadent Schütze PRP Kit® (Friadent Schütze, Vienna, Austria)
- Secquire PRP System® (PPAI Medical, FL, USA)
- Fibrinet® (Cascade Medical Enterprises LLL, NJ, USA)
- RegenPRP-Kit® (RegenLab, Mollens-VD, CH)
- Plateltex® (Plateltex, Bratislava, SK)
- GPS™ II system (Cell Factor Technologies, Warsaw, IN)

Sono di norma più rapidi e pratici di quelli manuali.

I diversi dispositivi di centrifugazione utilizzano la forza centrifuga e una tecnica di elutriazione controcorrente (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 trattiene 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 particolarmente 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.



Fig. 24: Alcuni dei dispositivi disponibili per la produzione del PRP (Mazzucco modificato).

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 (Borzini, 2004; Mazzucco, 2008).

Non vi sono dati che accertino se l'azione dei leucociti sia benefica o meno per la riparazione tissutale, pertanto si consiglia la scelta di un PRP con un'elevata concentrazione di piastrine e una bassa concentrazione di leucociti (Sutter, 2004; Dijkstra-Tiekstra, 2005).

L'influenza dei leucociti sulla biologia del PRP e i potenziali benefici di questo prodotto sulla guarigione tissutale, dovrebbero essere approfonditi in modo da poter chiarire i vari dati presenti in letteratura.

1.9.5 Impiego del PRP nel cavallo

Il PRP fu introdotto inizialmente in medicina trasfusionale, ma negli anni lo sviluppo di nuove tecniche laboratoristiche ha consentito di estendere l'impiego del concentrato piastrinico in diversi campi della medicina (Gobbi, 2007).

In medicina umana (Everts, 2007) il PRP è utilizzato soprattutto in odontoiatria (Rožman, 2007) e chirurgia maxillo-facciale (Dean, 1997; Anitua, 2004; Marx, 2004; Del Corso, 2006), in chirurgia plastica (Anitua, 2004; Eppley, 2006), nel trattamento delle ulcere (Anitua, 2004), in chirurgia ortopedica (Aldegheri, 2002; Sanchez, 2003; Anitua, 2004; Marx, 2004; Everts, 2007; Gobbi, 2007; Crane, 2008; Sampson, 2008) e oftalmica (Korobelnik, 1966; Anitua, 2004; Gimeno, 2006).

In ambito veterinario il PRP rappresenta un potenziale ausilio al trattamento delle patologie teno-desmiche.

Nel cavallo è utilizzato soprattutto nel trattamento di ferite cutanee e patologie muscolo-scheletriche. L'obiettivo è ottenere una completa rigenerazione del tessuto e il ripristino della sua funzionalità (Carmona, 2006; Nixon, 2008).

Il PRP può essere impiegato nel trattamento di lesioni muscolo-scheletriche particolarmente gravi anche come veicolo per le cellule staminali (Nixon, 2008; Kaneps, 2008, Sutter, 2008).

Trattamento di ferite cutanee nel cavallo

Le soluzioni di continuo cutanee nel cavallo rappresentano un problema comune, aggravato dalla loro lenta guarigione che porta frequentemente a un esito cicatriziale esuberante, e sono caratterizzate generalmente da un risultato esteticamente scadente. Queste lesioni presentano una maggiore difficoltà a rimarginarsi se coinvolgono l'estremità distale degli arti (Monteiro, 2008; De Rossi, 2009).

Questo problema è influenzato da numerosi fattori tra cui l'eccessiva distanza tra i margini della ferita, l'elevata tensione superficiale e la scarsa vascolarizzazione cutanea della regione; quest'ultima è alla base del ridotto apporto di ossigeno, della bassa temperatura, e della scarsità dei fattori di crescita.

I trattamenti terapeutici proposti finora (interventii di chirurgia plastica, come i trapianti o gli innesti tissutali) non consentono di ottenere, nella maggior parte dei casi, un buon risultato estetico e funzionale e sono vincolati dalla necessità di sottoporre i pazienti a un'anestesia generale (Monteiro, 2008; De Rossi, 2009).

Per tutte queste ragioni negli ultimi anni sono stati studiati dei nuovi trattamenti, basati sulla medicina rigenerativa, che prevedono l'impiego di PRP (Monteiro, 2008; De Rossi, 2009).

Da un primo studio, condotto da Carter nel 2003, si evince che l'impiego di PRP da sangue equino, nello specifico di gel piastrinico, su lesioni situate all'estremità distale degli arti di un cavallo, determina l'accelerazione nella differenziazione epiteliale e la presenza di tessuto di granulazione maturo nelle lesioni trattate rispetto ai controlli.

Trattamento di patologie teno-desmiche nel cavallo

Le patologie teno-desmiche rappresentano le affezioni che più frequentemente richiedono l'impiego di PRP (Sutter, 2008). In uno studio recente, condotto sul topo come modello animale, è stato dimostrato, attraverso degli esami istologici, che il trattamento di lesioni tendinee con il concentrato piastrinico riduce la quantità di aderenze peritendinee, migliora l'organizzazione della matrice extracellulare e induce un corretto allineamento delle fibre collagene (Maia, 2009).

L'iniezione di PRP è raccomandata per il trattamento di lesioni tendinee e legamentose recenti e di quelle che non sono guarite in modo soddisfacente con i trattamenti tradizionali. (Kaneps, 2008).

I risultati dell'applicazione di PRP su espunti tendinei equini in vitro indicano che tale emocomponente sostiene attivamente la riparazione del tendine (Nixon, 2008). In uno studio, condotto da Schnabel nel 2007, è stato osservato che le concentrazioni di PDGF e TGF- β sono maggiori nel PRP rispetto ad altri prodotti, i tendini coltivati in PRP dimostrano un incremento dell'espressione genica delle molecole di collagene I a discapito del collagene III e che il PRP induce un effetto anabolico sulla sintesi della matrice tendinea.

Nel 2008, in uno studio clinico intrapreso presso l'Università di Barcellona, sono stati ottenuti risultati positivi in seguito all'impiego di PRP su lesioni teno-desmiche acute e croniche (Prades, 2008).

Trattamento di patologie osteo-articolari nel cavallo

Anche le patologie articolari sono molto comuni nel cavallo e le cause sono numerose (traumi ripetuti, instabilità articolare, infezioni, osteocondrosi).

A oggi non esistono ancora dati certi sull'efficacia del PRP nel trattamento delle patologie osteo-articolari, in quanto gli studi clinici pubblicati mostrano numerose variabili. Tuttavia, da studi condotti di recente si deduce che l'impiego del PRP ha un impatto positivo sulla funzione metabolica dei condrociti equini, conduce verso un miglioramento della zoppia e una diminuzione dell'effusione articolare e determina miglioramenti clinici e istologici in generale (Carmona, 2006; Prades, 2006; Prades, 2008; Gobbi, 2007; Nixon, 2008; Fortier, 2009).

CAPITOLO 2

STUDIO SPERIMENTALE

2.1 OBIETTIVO DELLO STUDIO

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 d'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 osservano 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 le tensioni 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.

Attualmente, si ritiene che l'impiego di MSCs e/o di PRP per la terapia delle patologie teno-legamentose sia in grado di accelerare i fisiologici processi di guarigione, in quanto responsabili della stimolazione di una più rapida e corretta rigenerazione tissutale.

Gli studi sulla rigenerazione dei tessuti che impiegano cellule staminali, solitamente vedono coinvolti mammiferi appartenenti all'Ordine dei Roditori, ossia il topo e il ratto, che però presentano una capacità rigenerativa elevata e differente da quella degli

animali d'interesse veterinario. Dal momento che i dati sperimentali ottenuti da animali di interesse veterinario sono molto scarsi in questo studio è stato scelto di impiegare la pecora come modello animale.

L'obiettivo di questa tesi è studiare e descrivere l'utilità dell'applicazione intralesionale di MSCs e/o di PRP per il trattamento di tendinopatie sperimentalmente indotte nella pecora, attraverso un meccanismo patogenetico il più possibile sovrapponibile a quello reale. Il fine ultimo è stabilire un protocollo sperimentale adeguato a essere impiegato in animali di elevato interesse economico, come ad esempio il cavallo.

Sarà quindi valutata l'efficacia delle MSC autologhe, isolate da sangue venoso periferico, associate o meno a PRP autologo e l'efficacia del PRP stesso nell'incrementare il processo di guarigione delle lesioni tendinee, e in particolare del tendine flessore profondo (TFP).

2.2 MATERIALI E METODI

Nel presente studio sono state coinvolte nove pecore che sono state suddivise in tre gruppi, ciascuno dei quali è stato destinato a un diverso trattamento delle lesioni provocate: il primo gruppo è stato trattato con un'applicazione di MSCs, il secondo gruppo ha subito un trattamento con un'associazione di MSCs e PRP e il terzo gruppo è stato trattato con un'iniezione di solo PRP.

Al fine di migliorare l'attendibilità dei risultati ottenuti, uno solo degli arti posteriori è stato trattato; quello controlaterale è stato utilizzato come "arto controllo", in modo che ciascuna pecora fungesse da controllo di sé stessa.

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

Si è articolato in una serie di fasi che possono essere suddivise in due punti principali:

- 1) la creazione, nelle nove pecore, di una lesione bilaterale a carico del tendine flessore profondo delle falangi nell'arto posteriore;
- 2) applicazione terapeutica monolaterale di MSCs, dell'associazione di MSCs e PRP o di PRP da solo, in funzione del gruppo, seguita nel periodo postoperatorio dai

monitoraggi clinico e ultrasonografico e dalla valutazione degli esami istologico e immunoistochimico.

2.2.1 Selezione dei soggetti

Le pecore sono state scelte in funzione del peso (pressappoco lo stesso all'interno di ogni gruppo), del sesso (femmine) e dell'età (adulte); la scelta si è basata anche sui risultati ottenuti dagli esami clinici, emato-biochimici e parassitologici completi, eseguiti prima di iniziare le prove sperimentali.

Questi test hanno consentito di giudicare gli animali selezionati come soggetti sani. Inoltre, per un periodo di trenta giorni antecedente all'inizio delle prove, al fine di consentire agli animali un buon adattamento al nuovo ambiente e al nuovo gruppo e per favorire il loro benessere, i soggetti sono stati stabulati presso le scuderie del Dipartimento di Scienze Cliniche.

2.2.2 Estrazione, caratterizzazione e coltura delle cellule staminali

L'isolamento e la caratterizzazione delle MSCs necessarie al progetto sono stati effettuati prima di sottoporre le pecore all'induzione delle lesioni tendinee. La fase iniziale dello studio, quindi, è stata dedicata a questo aspetto ed è stata portata a termine grazie alla collaborazione del Dr. Patruno e della Dr.ssa Martinello, del laboratorio di Anatomia del Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie di Padova.

Il protocollo impiegato in questo studio per ottenere le MSCs dal sangue periferico, è quello già standardizzato nel cavallo grazie a un lavoro condotto da Martinello et al. nel 2009.

Per eseguire l'estrazione e la caratterizzazione delle MSCs da utilizzare a scopo terapeutico è necessario un prelievo di sangue periferico dalla vena giugulare (circa 100 ml), da eseguire almeno quattro settimane prima del momento scelto per il trattamento. Le MSCs sono state estratte dal campione ematico con il metodo impiegato per l'estrazione dei linfociti.

Il sangue è stato trattato con un anticoagulante (litio-eparina) e diluito con soluzione fisiologica, dopodiché è stato depositato lentamente sopra uno strato di Ficoll

(Amersham) e centrifugato per separare i diversi elementi cellulari. Gli eritrociti e granulociti sedimentano mentre le cellule mononucleate (linfociti e MSCs), a causa della loro bassa densità, formano un'interfaccia tra il Ficoll e il plasma. In seguito tutte le cellule mononucleate sono state raccolte e piastrate.

Le MSCs ottenute sono cellule mononucleate dotate di una morfologia fibroblastoide; queste cellule, per essere impiegate a scopo terapeutico, devono essere amplificate e per ottenere ciò sono state piastrate in un medium contenente siero fetale al 10% in cui le MSCs sono capaci di proliferare. Le cellule staminali presenti nel sangue circolante si trovano in uno stato di quiescenza e per attivarle e renderne possibile la proliferazione in coltura si aggiunge il Lipopolisaccaride (LPS), che è un agente mitogeno.

Poiché solo le cellule staminali hanno la capacità di aderire alla plastica, i linfociti sono stati eliminati con successivi lavaggi.

Terminata la preparazione delle MSCs, 20×10^6 di cellule sono state diluite in 1 ml di acido ialuronico (Hyalgan).

2.2.3 Induzione della lesione sperimentale

Prima di procedere all'induzione delle lesioni tendinee, tutte le pecore coinvolte nello studio sono state premedicate e indotte in anestesia generale per via endovenosa.



In seguito, con l'animale mantenuto in decubito laterale, dopo accurata tricotomia della parte, è stato condotto un attento esame ecografico per via ecoguidata.

dopo accurata tricotomia della parte, è stato condotto un attento esame ecografico (Ecografo GE, Medical System

LOGIO P5, con sonda elettronica lineare intracavitaria da 6-10 MHz modello I739) della faccia plantare degli arti posteriori per tutta la lunghezza del metacarpo, sia in scansione longitudinale sia trasversale, dopodiché gli arti posteriori di ciascun individuo sono stati preparati in modo asettico per procedere con l'induzione delle lesioni tendinee.

Nei soggetti da noi scelti le lesioni sperimentali sono state provocate per via ecoguidata iniettando nel tendine flessore profondo delle falangi di entrambi gli arti preparati, un

enzima collagenasi batterio-derivante. È stato impiegato un volume totale di 0,13 ml di una soluzione contenente 500 U.I. di collagenasi di tipo IA (collagenasi type IA: C-9891, Sigma, Milan Italy) diluite in soluzione fisiologica, allo scopo di ottenere delle lesioni focali a carico dei tendini (*core-lesions*).

L'iniezione di collagenasi è stata eseguita inserendo per via percutanea un ago sterile da 23 G a una distanza di quindici centimetri in senso prossimo-distale dalla sommità calcaneale (Fig. 25). Durante questo procedimento l'arto interessato è stato posizionato, con il contributo di un assistente, in modo che l'articolazione del tarso fosse mantenuta in flessione con un angolo circa 90° e che il nodello risultasse iperesteso. Mantenendo un'inclinazione obliqua dell'ago, quest'ultimo è stato fatto procedere attraverso la cute e il TFS fino a penetrare nel TFP, dopodiché è stata innestata la siringa sull'ago ed è stata iniettata la collagenasi.

Al termine della procedura, al fine di rilevare il punto esatto della lesione nel corso dei controlli ecografici postoperatori, è stato applicato un punto di sutura cutaneo sulla faccia mediale dell'arto all'altezza del punto d'inoculo ed è stato eseguito un leggero bendaggio della regione metatarsale in modo da contenere l'eventuale edema postoperatorio a carico dei tessuti trattati. Inoltre, nei primi giorni successivi all'evento traumatico sono state somministrate una terapia antibiotica e una terapia antidolorifica, per scongiurare la possibilità d'infezioni e allo scopo di ridurre la flogosi e il dolore locali. Il bendaggio è stato rimosso dopo quarantotto ore dall'iniezione di collagenasi.

2.2.4 Trattamenti della lesione sperimentale

Le pecore sono state trattate sette giorni dopo la provocazione della lesione tendinea.

Applicazione di MSCs (gruppo 1)

Le pecore da sottoporre al trattamento con MSCs (gruppo 1) sono state premedicate, indotte in anestesia generale per via endovenosa, poste in decubito laterale e, prima di procedere al trattamento, è stato preparato in maniera asettica uno degli arti lesionati. Ciascuna di queste pecore ha subito l'inoculo intralesionale per via ecoguidata di 20×10^6 di MSCs diluite in 1 ml di acido ialuronico.

Applicazione di MSCs e PRP (gruppo 2)

La metodica per la preparazione del PRP di cui ci siamo avvalsi prevede l'impiego di appropriati kit sterili dotati di provette con una doppia camera di decantazione e di un'opportuna centrifuga (SmartPREP2 APC+, Harvest®) (Fig. 26).

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



Fig. 26: 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.

Il PRP da inoculare nelle pecore appartenenti al secondo e al terzo gruppo è stato preparato nel giorno del trattamento; la sua preparazione ha richiesto circa 1 ora di tempo.

Su ciascun soggetto appartenente ai due gruppi da trattare con PRP, è stato eseguito un prelievo di sangue periferico, dalla vena giugulare, del volume di circa 18 ml. In seguito, al campione ematico sono stati aggiunti 2 ml di anticoagulante ACD (ossia una soluzione di acido citrico, citrato di sodio e destrosio) e 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.

Contemporaneamente, la pecora da sottoporre al trattamento è stata premedicata, indotta in anestesia generale per via endovenosa, posta in decubito laterale e, prima di procedere al trattamento, è stato preparato in maniera asettica uno degli arti lesionati. Terminata la centrifugazione del campione, è seguito il trattamento delle pecore. Ciascuna pecora appartenente al gruppo 2 ha subito l'inoculo intralesionale per via ecoguidata di 1 ml di PRP (contenente 972×10^3 piastrine per μl) addizionato di 15×10^6 MSCs veicolate da 1 ml di soluzione fisiologica sterile.

Applicazione di PRP (gruppo 3)

Nei soggetti facenti parte del gruppo 3, invece, è stata eseguita l'iniezione intralesionale di 1 ml di PRP (contenente 972×10^3 piastrine per μl).

Il PRP è stato inoculato sia negli animali del gruppo 2 che del gruppo 3 direttamente in forma liquida, in modo da sfruttare l'azione dei fattori della coagulazione locali che, venendo a contatto col PRP, provocano la gelificazione in situ del composto instillato.

Nell'arto controlaterale a quello trattato non è stato inoculato alcun biomateriale bensì, dopo preparazione della cute con tecnica sterile, è stato infuso 1 ml di soluzione fisiologica (placebo), in modo da sfruttare ciascun animale come il controllo di se stesso. Tale espediente ha consentito di valutare la velocità e le modalità di guarigione del tendine grazie a un raffronto dei risultati ottenuti dai due arti.

Terminato il trattamento, sono state instaurate una terapia antibiotica e una terapia analgesica ma non è stata somministrata nessuna terapia antinfiammatoria, per scongiurare l'eventualità che l'azione dei farmaci potesse inibire l'effetto del trattamento cellulare.

2.2.5 Valutazioni cliniche ed ecografiche

Il passaggio successivo al trattamento con MSCs e/o PRP è il monitoraggio della guarigione per valutarne la progressione. Quest'obiettivo è stato raggiunto mediante delle visite cliniche e degli esami ecografici pianificati a intervalli regolari, che si sono protratti fino al momento del sacrificio degli individui.



Fig. 27: Esame ecografico di controllo delle strutture tendinee.

Le visite cliniche sono state effettuate ogni giorno per tutta la prima settimana successiva al trattamento. Sono stati valutati l'eventuale presenza di zoppia, tumefazioni, dolore, calore o altre alterazioni a carico di arti, postura o andatura degli animali (Tab. 1).

A intervalli settimanali sono state effettuate delle valutazioni ecografiche per monitorare la riparazione del tessuto tendineo. E' stata posta particolare attenzione all'allineamento delle fibre collagene, all'ecogenicità delle immagini e alle dimensioni delle alterazioni tissutali.

TABELLA 1						
PECORA	PESO MEDIO (Kg)	ESAME	ARTO	GRADO ZOPPIA	ASPETTO	CIRCONFERENZA (cm)
1		Ctrl 0	SX			
			DX			
		Ctrl 7	SX			
			DX			
		Ctrl 14	SX			
			DX			
		Ctrl 21	SX			
			DX			
		Ctrl 28	SX			
			DX			
		Ctrl 35	SX			
			DX			

2		Ctrl 0	SX			
			DX			
		Ctrl 7	SX			
			DX			
		Ctrl 14	SX			
			DX			
		Ctrl 21	SX			
			DX			
		Ctrl 28	SX			
			DX			
		Ctrl 35	SX			
			DX			
3		Ctrl 0	SX			
			DX			
		Ctrl 7	SX			
			DX			
		Ctrl 14	SX			
			DX			
		Ctrl 21	SX			
			DX			
		Ctrl 28	SX			
			DX			
		Ctrl 35	SX			
			DX			

TABELLA 1: Parametri clinici valutati per ciascun gruppo di pecore ad ogni fase dello studio; Legenda: Ctrl 0: controllo al momento dell'induzione della lesione con collagenasi; Ctrl 7: controllo al momento del trattamento con MSC, MSC e PRP, PRP; Ctrl 14: controllo a 7 giorni dal trattamento; Ctrl 21: controllo a 14 giorni dal trattamento; Ctrl 28: controllo a 21 giorni dal trattamento; Ctrl 35: controllo a 28 giorni dal trattamento

2.2.6 Prelievo post-mortem del tessuto tendineo

Quattro settimane dopo l'innesto del biomateriale ciascun animale è stato sacrificato. Da ogni pecora è stato prelevato il tendine flessore profondo delle falangi dell'arto trattato e di quello controlaterale comprendendo le porzioni prossimali e distali alla zona lesionata, in modo da poter valutare microscopicamente il processo di guarigione (Fig. 28).



Fig. 28: Prelievo post-mortem dei tendini per l'esame istologico.

In seguito, da ogni soggetto è stato prelevato il tendine flessore profondo delle falangi dell'arto anteriore; questa manualità è stata eseguita allo scopo di fornire un controllo istologico di un tendine sano, in modo da poter effettuare valutazioni istologiche e immunoistochimiche il più complete possibile dell'evoluzione della guarigione e del contributo apportato dalle MSCs e dal PRP ai processi riparativi del tessuto tendineo. Durante il prelievo post-mortem dei tendini flessori è stato applicato, su ciascun tendine, un punto di sutura ad una distanza prestabilita dai punti 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 (Figg. 29 e 30).



Fig. 29

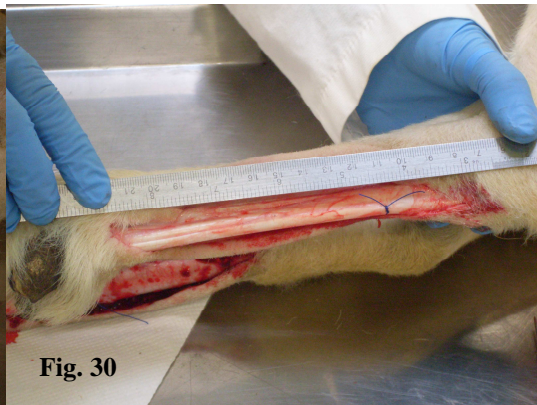


Fig. 30

Fig. 29 e 30: Applicazione del punto di sutura ai tendini per facilitare la successiva localizzazione della lesione.

2.2.7 Preparazione dei campioni per l'esame istologico e immunohistochimico

I tendini prelevati da ciascun animale sono stati suddivisi in segmenti 1 cm ciascuno e ogni parte è stata posta all'interno di una biocassetta e numerata procedendo in direzione prossimo-distale (Fig. 31 e 32).

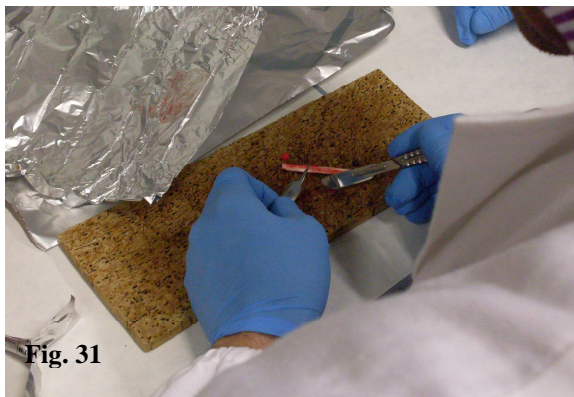


Fig. 31



Fig. 32

Fig. 31 e 32: 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% a una temperatura di 4° C per una notte (Fig. 33), dopodichè sono stati disidratati attraverso passaggi seriali in soluzioni sempre più concentrate di etanolo (70°, 90°, 95° e 100°).

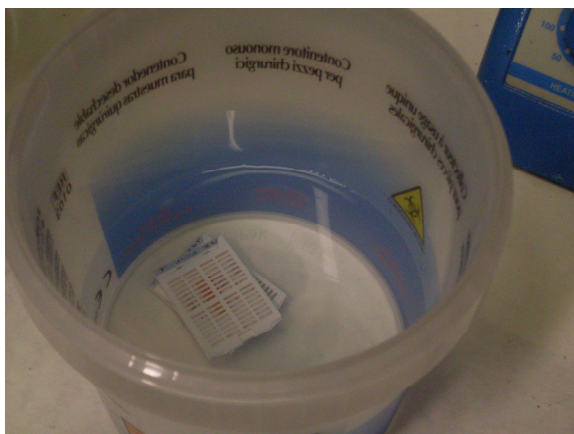


Fig. 33: Biocassetta, contenente il segmento tendineo, immersa in paraformaldeide al 4%.

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°C (impregnazione). 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.

La processazione dei tendini è stata eseguita automaticamente con l'ausilio dell'apparecchio "Shandon Cittadel 1000" presso il laboratorio di Scienze Sperimentali del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Padova.

I segmenti inclusi in paraffina sono stati sottoposti al taglio al microtomo per ottenere delle sezioni longitudinali dello spessore di 5 µm, anch'esse numerate; queste ultime sono state raccolte su vetrini portaoggetto e poi destinate alle colorazioni *ematossilina-eosina* e *tricromica di Masson* e alla metodica immunohistochimica.

2.2.8 Colorazione delle sezioni istologiche

Colorazione ematossilina-eosina

La colorazione *ematossilina-eosina* viene eseguita manualmente e consta di diversi passaggi eseguiti in successione: sparaffinatura, idratazione, colorazione e disidratazione.

Il primo step consiste nell'eliminazione della paraffina (sparaffinatura) mediante immersione dei vetrini nel solvente xilolo per 15 minuti. Poi si elimina lo xilolo immergendo le sezioni in una serie di soluzioni di etanolo a concentrazione decrescente (100°, 95°, 75°, 50°) per 5 minuti ciascuna (idratazione). Dopo un risciacquo veloce in acqua distillata, i vetrini sono immersi nel colorante *ematossilina di Harris* per 12 minuti. Poi vengono lavati in acqua di fonte e in acqua distillata per eliminare l'eccesso di colorante e immerse alcuni secondi in una soluzione di acido cloridrico all'1% per farne virare la tonalità verso il viola. In seguito si eseguono alcuni lavaggi in acqua distillata e si procede con l'immersione nel colorante *eosina* per circa 30 secondi (colorazione). In seguito si disidratano le sezioni immergendole in una serie di soluzioni di etanolo a concentrazione crescente (50°, 75°, 95° e 100°) per 5 minuti ciascuna e

nello xilolo per 15 minuti. Infine si esegue il montaggio dei vetrini in balsamo sintetico (EUKITT, Kartell) sotto cappa aspirante.

Colorazione tricromica di Masson

La colorazione *tricromica di Masson* inizia con la sparaffinatura e l'idratazione delle sezioni, come nella colorazione descritta precedentemente. Poi le sezioni vengono trattate con il mordente in *soluzione di Bouin* (preriscaldata a 56° C) per 15 minuti e in seguito raffreddate in acqua corrente per rimuovere l'eccesso di colorante. Si procede con l'immersione per 10 minuti nel colorante *ematossilina di Harris* e con un successivo lavaggio in acqua corrente per 5 minuti. Si esegue un risciacquo in acqua distillata e si colorano i vetrini con la *soluzione Ecarlate di Biebrich-Fucsina acida* immergendoveli per 5 minuti. Si risciacquano le sezioni in acqua distillata e si immergono nella soluzione acido fosfotungstico/acido fosfomolibdico per 5 minuti e nella *soluzione blu di anilina* per altri 5 minuti. In seguito si trattano i frammenti con una soluzione di acido acetico all'1% per 2 minuti e si disidratano immergendoli in una serie di soluzioni di etanolo a concentrazione crescente (50°, 75°, 95° e 100°) per 5 minuti ciascuna.

Al termine della colorazione si può procedere con la chiarificazione delle sezioni in xilolo per 15 minuti e con il montaggio in balsamo sintetico (EUKITT, Kartell) sotto cappa aspirante.

Tecnica immunoistochimica

La tecnica immunoistochimica adottata si basa sull'utilizzo di anticorpi specifici verso gli antigeni di nostro interesse e di opportuni marker, coniugati con gli anticorpi stessi in modo diretto o indiretto.

L'osservazione al microscopio ottico dei vetrini trattati con questi marker permette di riconoscere l'avvenuta reazione tra antigene e anticorpo, che si manifesta con una caratteristica fluorescenza.

Le sezioni tendinee sono state processate come descritto in precedenza, ossia sono state sparaffinate in xilolo e idratate attraverso dei passaggi in soluzioni alcoliche a concentrazione decrescente (scala discendente degli alcoli).

Dopo un lavaggio in PBS 1X (Phosphate Buffered Saline Solution), le sezioni sono state incubate con del siero fetale bovino al 5% per bloccare i siti di legame non specifici, dopodichè, sono state incubate alla temperatura di 4° C per una notte in ambiente umido, con l'anticorpo primario *Anti-collagene III, monoclonale* (1:500, Sigma, C7805).

In seguito le sezioni sono state sottoposte ad alcuni lavaggi in PBS e gli anticorpi primari sono stati rilevati mediante il "*Vector kit*" (Vector laboratories, PK7800).

Lo sviluppo si ottiene immergendo i vetrini in una soluzione di 3,3-Diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂ per 3 minuti. Dopo un risciacquo in acqua di fonte, le sezioni sono state montate con *Crystal Mount-Aqueous Mounting Medium* (Sigma) e sono state osservate e fotografate mediante microscopio ottico "Olympus BX50".

2.2.9 Valutazione dell'esame istologico e immunoistochimico

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 da noi modificato per garantire una maggiore uniformità dei rilievi raccolti (Tab. 2). A ogni parametro analizzato è stato assegnato un punteggio medio sulla base delle osservazioni qualitative effettuate.

TABELLA 2	
VARIABILI ANALIZZATE	PUNTEGGI E CRITERI
DENSITA' CELLULARE	0: NORMALE 1: LIEVE AUMENTO 2: MODERATO AUMENTO 3: NOTEVOLE AUMENTO
MORFOLOGIA DEI FIBROBLASTI NEL PUNTO DI LESIONE	Valutazione della tipologia predominante di fibroblasti (tonda o allungata) nel punto di lesione
NEOVASCOLARIZZAZIONE	0: NORMALE 1: LIEVE AUMENTO 2: MODERATO AUMENTO 3: NOTEVOLE AUMENTO
ORGANIZZAZIONE TISSUTALE	0: NESSUNA 1: DISCRETA ORGANIZZAZIONE 2: MEDIA ORGANIZZAZIONE 3: NORMALE ORGANIZZAZIONE
ESPRESSIONE DEL COLLAGENE I	0: NESSUNA 1: BASSA 2: ALTA
ESPRESSIONE DEL COLLAGENE III	0: NESSUNA 1: BASSA 2: ALTA

TABELLA. 2: Parametri valutati durante l'esame istologico e immunoistochimico (Maia, 2009 modificato).

Nelle sezioni colorate con *ematossilina-eosina* sono stati analizzati organizzazione tissutale, densità e caratteristiche dei fibroblasti, presenza e tipologia dell'infiltrato infiammatorio e neovascolarizzazione.

La colorazione *tricromica di Masson* è stata invece utilizzata per visualizzare in modo più evidente le fibre collagene e la neovascolarizzazione.

L'immunoistochimica è la metodica d'elezione per localizzare ed evidenziare molecole e/o strutture intra- ed extracellulari in campioni tissutali. Nel presente studio è stata studiata l'espressione di collagene III. Comparando le sezioni colorate con la metodica tricromica di Masson e con la tecnica immunoistochimica è stato possibile valutare indirettamente l'espressione del collagene di tipo I da parte dei tendini indagati.

La valutazione è stata effettuata esaminando 3 sezioni di 5 μm provenienti da ciascun segmento tendineo incluso in paraffina. Per ogni sezione sono stati osservati 10 campi casuali per valutare i parametri precedentemente descritti.

CAPITOLO 3

RISULTATI

Conclusa la fase di raccolta dei dati i risultati ottenuti sono stati analizzati e confrontati. In particolare sono stati valutati gli effetti delle diverse terapie paragonando i risultati ricavati dell'arto trattato con i risultati ottenuti dall'arto di controllo (controlaterale, lesionato e non trattato) e dall'arto anteriore sano.

3.1 VALUTAZIONI CLINICHE ED ECOGRAFICHE

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 bilaterale risoltasi spontaneamente entro breve (Tab. 3 - 4 - 5).

Il trattamento sperimentale è stato ben tollerato da tutti gli animali, che non hanno manifestato disagio o segni clinici sfavorevoli.

Completate le indagini cliniche, attraverso un esame ultrasonografico sono stati valutati l'aspetto ecografico delle lesioni tendinee e l'evoluzione della guarigione tissutale.

Qui di seguito sono riportate alcune delle immagini ecografiche rilevate nel corso dei controlli effettuati a 7, 14, 21 e 28 giorni dal trattamento delle lesioni (Fig. 34-35-36).

Le valutazioni ecografiche hanno permesso di osservare, fin dai primi giorni successivi all'induzione della lesione, un 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 (Ctrl 7) è stato possibile rilevare delle aree focali ipoecogene in corrispondenza del sito di lesione, caratterizzate nella maggior parte dei casi da una perdita di allineamento più o meno evidente delle fibre collagene.

Nei controlli successivi (Ctrl 14, 21, 28, 35) è stato possibile osservare, a carico dell'arto trattato di tutte le pecore, un lento e progressivo riempimento di tali aree.

Inoltre, nella maggior parte dei soggetti, in prossimità del punto di inoculo sono state rilevate delle immagini ecografiche ascrivibili ad aderenze peritendinee del TFP sia con la guaina tendinea sia con il TFS.

TABELLA 3

GRUPPO MSCs								
PECORA	PESO MEDIO (Kg)	ESAME	ARTO	GRADO ZOPPIA	ASPETTO	CIRCONFERENZA (cm)		
1	58,8	Ctrl 0	SX	0	0	9.0		
			DX	0	0	9.0		
		Ctrl 7	SX	III-IV	CAL++, DOL+++, TUM++	11.0		
			DX	III	CALDA ++, DOL +	10.7		
		Ctrl 14	SX	III	CALDA+ , TUM ++, DOL +	11.0		
			DX	II-III	CALDA +	9.5		
		Ctrl 21	SX	II	TUM. +	11.0		
			DX	II	0	9.3		
		Ctrl 28	SX	I-II	TUM +/-	10.5		
			DX	I	0	9.0		
		Ctrl 35	SX	I-II	TUM +/-	10.0		
			DX	I	0	9.0		
		2	60,9	Ctrl 0	SX	0	0	9.0
					DX	0	0	9.0
Ctrl 7	SX			II-III	CALDA +, DOL +	10.0		
	DX			II	CALDA +, DOL +	10.0		

		Ctrl 14	SX	II-III	CALDA +	9.7		
			DX	II	CALDA +/-	9.5		
		Ctrl 21	SX	I	0	9.5		
			DX	I	0	9.5		
		Ctrl 28	SX	I	0	9.0		
			DX	I	0	9.0		
		Ctrl 35	SX	I	0	9.0		
			DX	I	0	9.0		
		3	59,4	Ctrl 0	SX	0	0	9.0
					DX	0	0	9.0
Ctrl 7	SX			II	CALDA +	9.8		
	DX			II	CALDA +	9.7		
Ctrl 14	SX			II	CALDA +/-	9.5		
	DX			II	CALDA +/-	9.5		
Ctrl 21	SX			I	0	9.5		
	DX			I	0	9.0		
Ctrl 28	SX			I	0	9.0		
	DX			I	0	9.0		
Ctrl 35	SX			I	0	9.0		
	DX			I	0	9.0		

TABELLA 3: Risultati ottenuti dall'esame clinico di ogni pecora trattata con MSCs; Legenda: Ctrl 0: controllo all'iniezione di collagenasi; Ctrl 7: ctrl al trattamento; Ctrl 14: ctrl a 7 gg. dal trattamento; Ctrl 21: ctrl a 14 gg. dal trattamento; Ctrl 28: ctrl a 21 gg. dal trattamento; Ctrl 35: ctrl a 28 gg. dal trattamento.

TABELLA 4

GRUPPO MSCs/PRP								
PECORA	PESO MEDIO (Kg)	ESAME	ARTO	GRADO ZOPPIA	ASPETTO	CIRCONFERENZA (cm)		
1	64	Ctrl 0	SX	0	0	9.5		
			DX	0	0	9.5		
		Ctrl 7	SX	II	CALDA +	10.0		
			DX	II	CALDA +	10.0		
		Ctrl 14	SX	II	CALDA +	10.4		
			DX	II	CALDA +	10.3		
		Ctrl 21	SX	I	CALDA +/-	10.0		
			DX	I	CALDA +/-	10.0		
		Ctrl 28	SX	I	0	9.5		
			DX	I	0	9.8		
		Ctrl 35	SX	I	0	9.5		
			DX	I	0	9.8		
		2	63.8	Ctrl 0	SX	0	0	9.5
					DX	0	0	9.5
Ctrl 7	SX			II	CALDA +, TUM +/-	10.5		
	DX			III	CALDA+ , TUM ++	12.0		
Ctrl 14	SX			II	CALDA +/-	9.8		
	DX			II-III	CALDA +, TUM ++	12.6		

3	62.5	Ctrl 21	SX	I	0	9.5
			DX	II	CALDA +/-, TUM +	11.5
		Ctrl 28	SX	I	0	9.0
			DX	I-II	TUM +/-	11.0
		Ctrl 35	SX	I	0	9.0
			DX	I	TUM +/-	10.5
	Ctrl 0	SX	0	0	9.5	
		DX	0	0	9.5	
	Ctrl 7	SX	II	CALDA +, TUM ++	11.3	
		DX	III	CALDA+ , TUM ++	10.5	
	Ctrl 14	SX	II	CALDA +, TUM +/-	11.3	
		DX	II-III	CALDA +, TUM +	10.0	
Ctrl 21	SX	I-II	CALDA +/-	11.0		
	DX	II	CALDA +/-, TUM +/-	10.0		
Ctrl 28	SX	I	0	11.0		
	DX	I-II	TUM +/-	10.0		
Ctrl 35	SX	I	0	10.5		
	DX	I	0	9.5		

TABELLA 4: Risultati ottenuti dall'esame clinico di ogni pecora trattata con MSCs e PRP;
 Legenda: Ctrl 0: controllo all'iniezione di collagenasi; Ctrl 7: ctrl al trattamento; Ctrl 14: ctrl a 7 gg. dal trattamento; Ctrl 21: ctrl a 14 gg. dal trattamento; Ctrl 28: ctrl a 21 gg. dal trattamento; Ctrl 35: ctrl a 28 gg. dal trattamento.

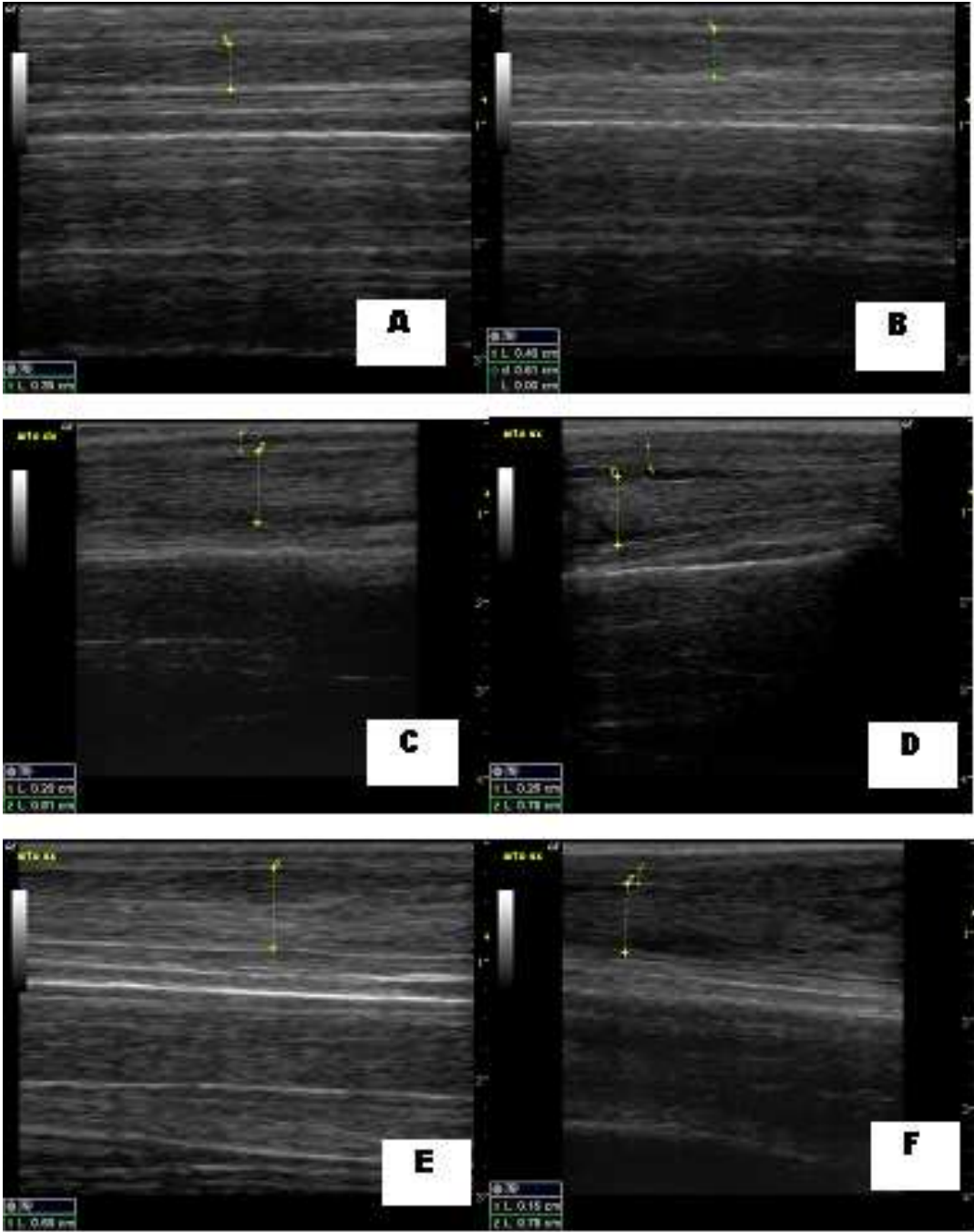
TABELLA 5

GRUPPO PRP								
PECORA	PESO MEDIO (Kg)	ESAME	ARTO	GRADO ZOPPIA	ASPETTO	CIRCONFERENZA (cm)		
1	50,2	Ctrl 0	SX	0	0	9.5		
			DX	0	0	9.5		
		Ctrl 7	SX	II-III	CAL++, DOL++, TUM++	11.5		
			DX	II	CALDA ++, DOL +	10.0		
		Ctrl 14	SX	II-III	CALDA+ , TUM ++	11.5		
			DX	II	CALDA +	10.0		
		Ctrl 21	SX	I	TUM +	11.5		
			DX	I	0	10		
		Ctrl 28	SX	I	TUM +/-	11.2		
			DX	I	0	10		
		Ctrl 35	SX	I	TUM +/-	11		
			DX	I	0	9.5		
		2	52,6	Ctrl 0	SX	0	0	9.5
					DX	0	0	9.5
Ctrl 7	SX			II	CALDA +	10.0		
	DX			II	CALDA +	10.0		
Ctrl 14	SX			II	CALDA +/-	9.7		
	DX			II	CALDA +/-	9.5		
Ctrl 21	SX			I	0	9.7		
	DX			I	0	9.5		

3	47	Ctrl 28	SX	I	0	9.5
			DX	I	0	9.5
		Ctrl 35	SX	I	0	9.5
			DX	I	0	9.5
		Ctrl 0	SX	0	0	9.5
			DX	0	0	9.5
		Ctrl 7	SX	II	CALDA +	10.0
			DX	II	CALDA +	10.0
	Ctrl 14	SX	II	CALDA +/-	10.0	
		DX	II	CALDA +/-	9.8	
	Ctrl 21	SX	I	0	9.7	
		DX	I	0	9.5	
	Ctrl 28	SX	I	0	9.5	
		DX	I	0	9.5	
	Ctrl 35	SX	I	0	9.5	
		DX	I	0	9.5	

TABELLA 5: Risultati ottenuti dall'esame clinico di ogni pecora trattata con PRP; Legenda: Ctrl 0: controllo all'iniezione di collagenasi; Ctrl 7: ctrl al trattamento; Ctrl 14: ctrl a 7 gg. dal trattamento; Ctrl 21: ctrl a 14 gg. dal trattamento; Ctrl 28: ctrl a 21 gg. dal trattamento; Ctrl 35: ctrl a 28 gg. dal trattamento.

GRUPPO PRP



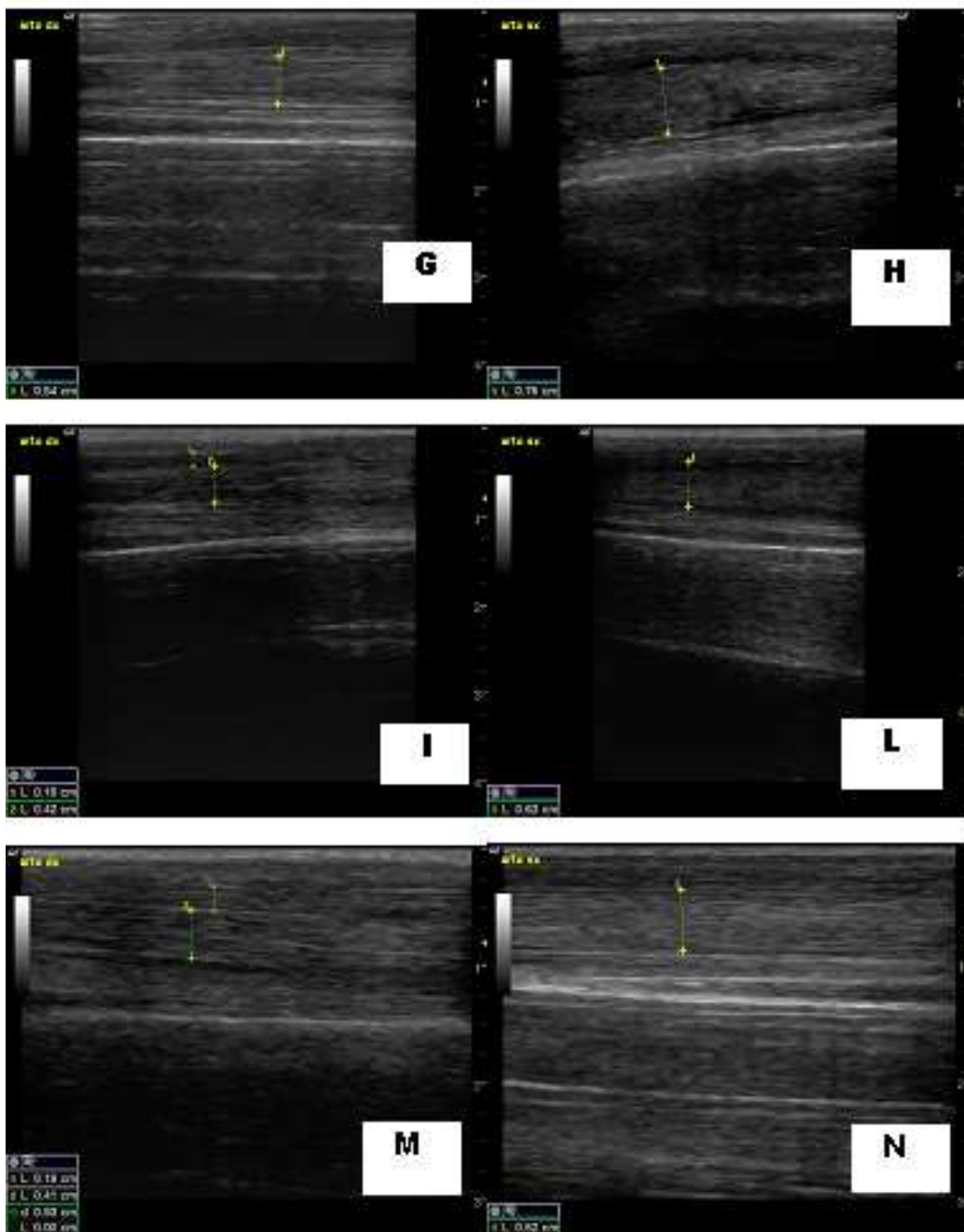
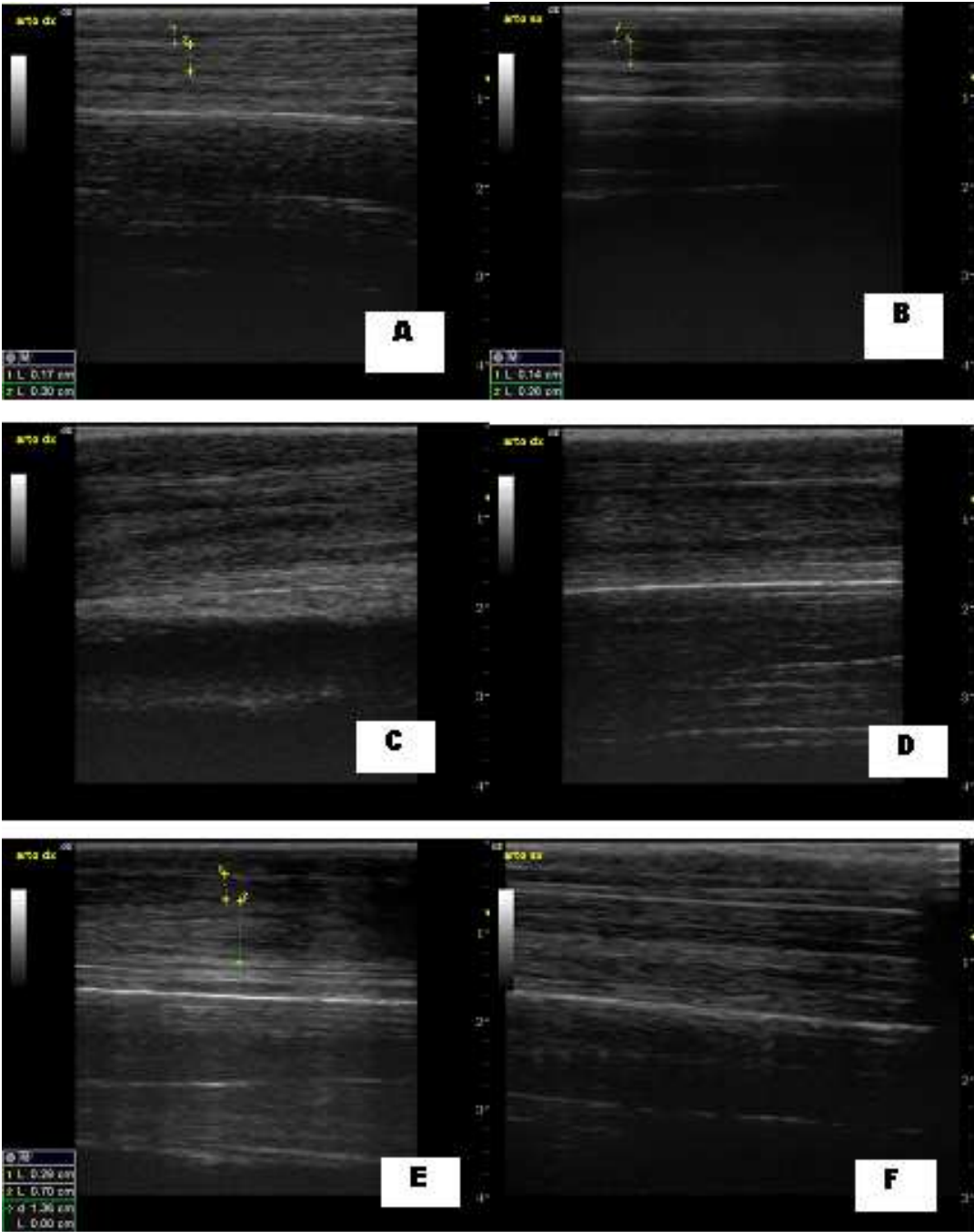


Fig 34: Gruppo MSCs A) e B) arto dx e sx, giorno 0; C) e D) arto dx e sx, giorno 7; E) e F) arto dx e sx, giorno 14; G) e H) arto dx e sx, giorno 21; I) e L) arto dx e sx, giorno 28; M) e N) arto dx e sx, giorno 35. L'arto dx è stato trattato con MSCs; l'arto sx è il controllo (iniezione di soluzione fisiologica).

GRUPPO MSCs/PRP



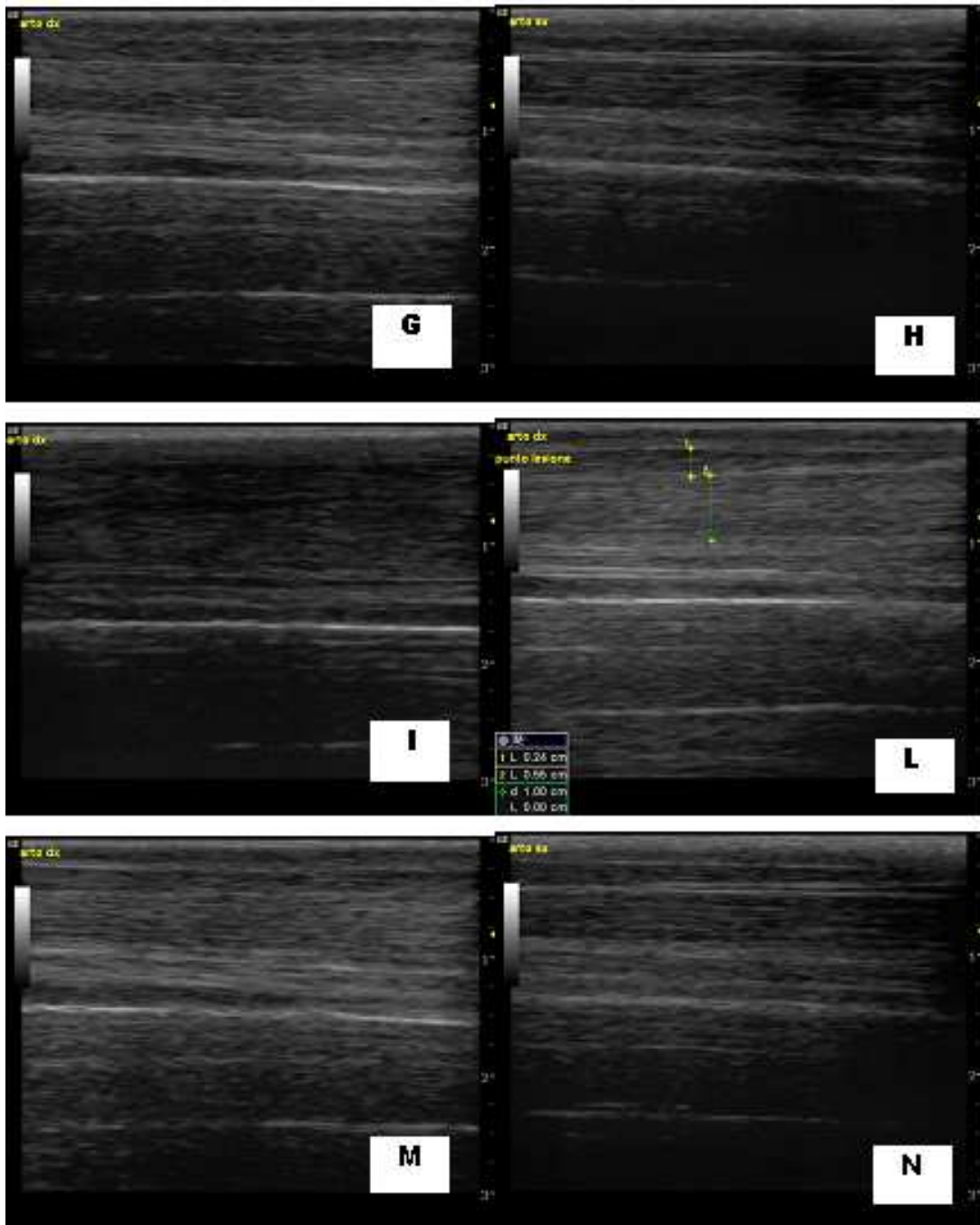
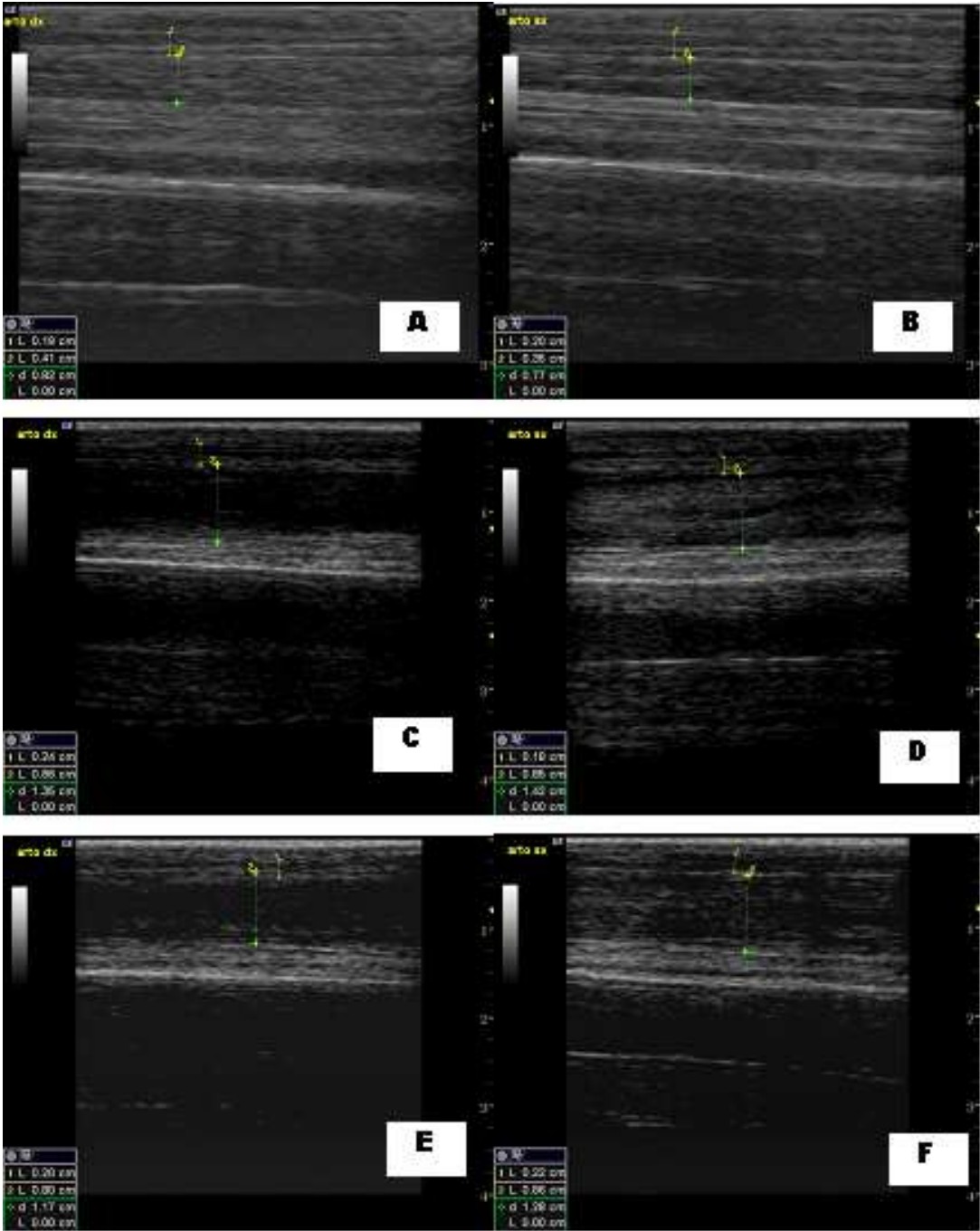


Fig 35: Gruppo MSCs/PRP A) e B) arto dx e sx, giorno 0; C) e D) arto dx e sx, giorno 7; E) e F) arto dx e sx, giorno 14; G) e H) arto dx e sx, giorno 21; I) e L) arto dx e sx, giorno 28; M) e N) arto dx e sx, giorno 35. L'arto dx è stato trattato con MSCs/PRP; l'arto sx è il controllo (iniezione di soluzione fisiologica).

GRUPPO MSCs



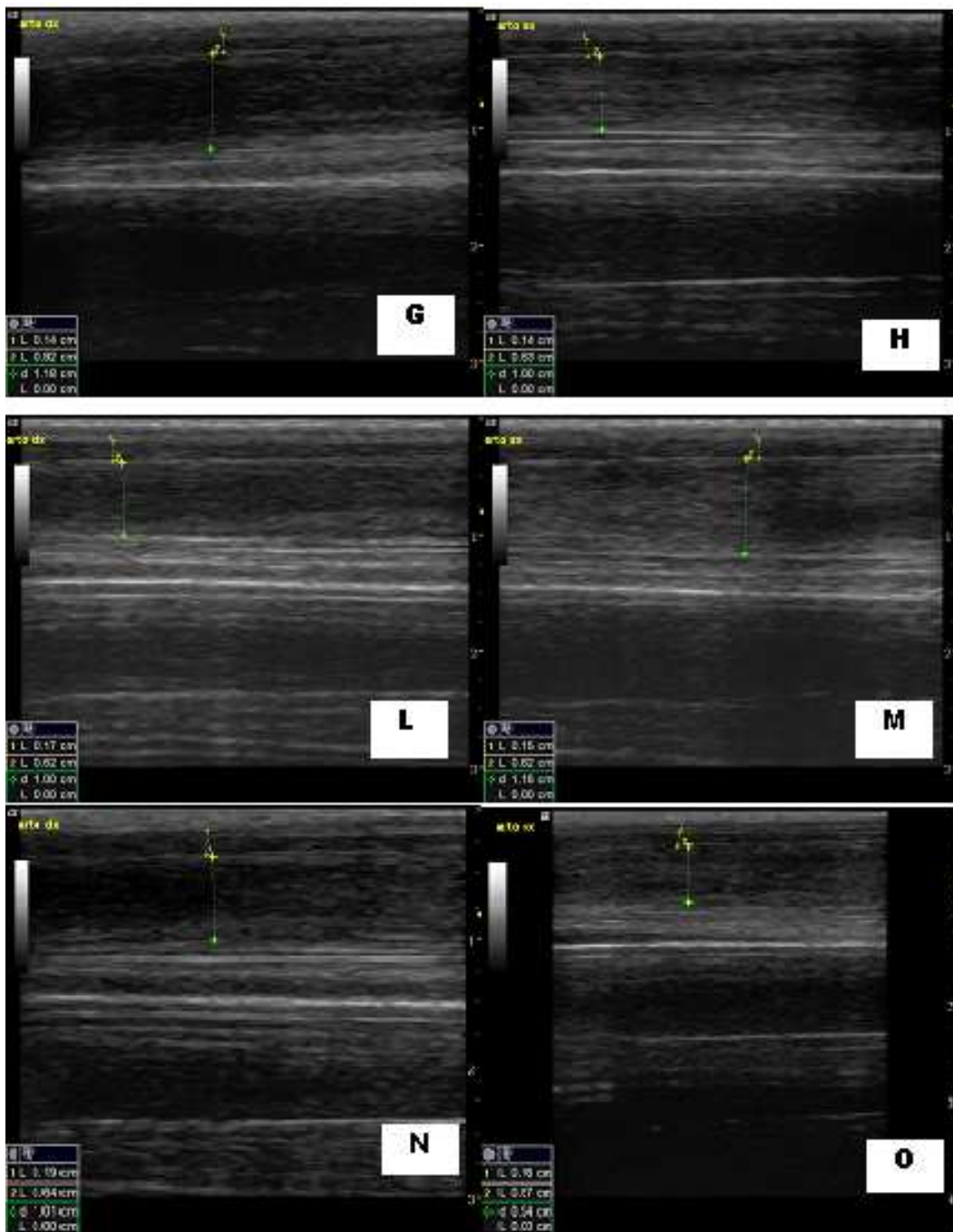


Fig 36: Gruppo PRP A) e B) arto dx e sx, giorno 0; C) e D) arto dx e sx, giorno 7; E) e F) arto dx e sx, giorno 14; G) e H) arto dx e sx, giorno 21; I) e L) arto dx e sx, giorno 28; M) e N) arto dx e sx, giorno 35. L'arto dx è stato trattato con PRP; l'arto sx è il controllo (iniezione di soluzione fisiologica).

3.2 ESAME ISTOLOGICO E IMMUNOISTOCHEMICO

Nella fase di prelievo del tessuto tendineo sono state incontrate delle difficoltà legate alla presenza di aderenze tra le strutture tendinee e le guaine peritendinee.

La valutazione al microscopio ottico delle sezioni tendinee colorate con le metodiche *ematossilina-eosina* e *tricromica di Masson* è stata condotta dedicando particolare attenzione alla struttura della matrice, all'organizzazione delle fibre e alla presenza di tenociti, cellule fibroblastoidi, infiltrato infiammatorio e neovascolarizzazione.

È stato possibile osservare che i tendini di controllo dopo quattro settimane dall'iniezione di soluzione fisiologica (Fig. 38) sono caratterizzati da fibre collagene disposte in modo non regolare, elevata cellularità (caratterizzata da fibroblasti di forma circolare) ed elevata neovascolarizzazione associata ad un moderato infiltrato infiammatorio (Tab. 7).

All'esame istologico dei tendini dei soggetti trattati con MSCs (Fig. 39) si osservano, una densità dei fibroblasti da moderata a elevata, una lieve neovascolarizzazione e un lieve infiltrato infiammatorio perivascolare. Inoltre è possibile evidenziare la presenza di fibroblasti allungati e di una moderata organizzazione tissutale, con fibre collagene disposte più regolarmente, salvo in alcune zone dove permane ancora un certa disorganizzazione con disposizione casuale delle fibre (Tab. 8).

Nel gruppo trattato con PRP e MSCs (Fig. 40) l'esame istologico dei tendini mostra, nella maggior parte dei campi istologici esaminati, un'organizzazione tissutale moderata, una disposizione regolare delle fibre collagene, una neovascolarizzazione lieve e una buona cellularità (Tab. 9).

La valutazione delle sezioni ottenute dalle pecore trattate con PRP (Fig. 41) ha permesso di osservare una neovascolarizzazione moderata, un'organizzazione tissutale discreta e una densità cellulare moderata (con fibroblasti arrotondati) (Tab. 10).

Qui di seguito sono riportati i risultati ottenuti dall'osservazione dei campi istologici analizzati dopo colorazione *ematossilina-eosina* e *tricromica di Masson* e alcuni esempi dei campi fotografati al microscopio ottico.

TABELLA 6

CONTROLLO SANO	
VARIABILI ANALIZZATE	PUNTEGGIO MEDIO E/0 VALUTAZIONE
DENSITA' CELLULARE	0
MORFOLOGIA DEI FIBROBLASTI NEL PUNTO DI LESIONE	Fibroblasti allungati
NEOVASCOLARIZZAZIONE	0
ORGANIZZAZIONE TISSUTALE	3
ESPRESSIONE DEL COLLAGENE I	3
ESPRESSIONE DEL COLLAGENE III	0

TABELLA 6: Risultati osservati all'esame istologico dei tendini di controllo sani (Maia, 2009 modificato).

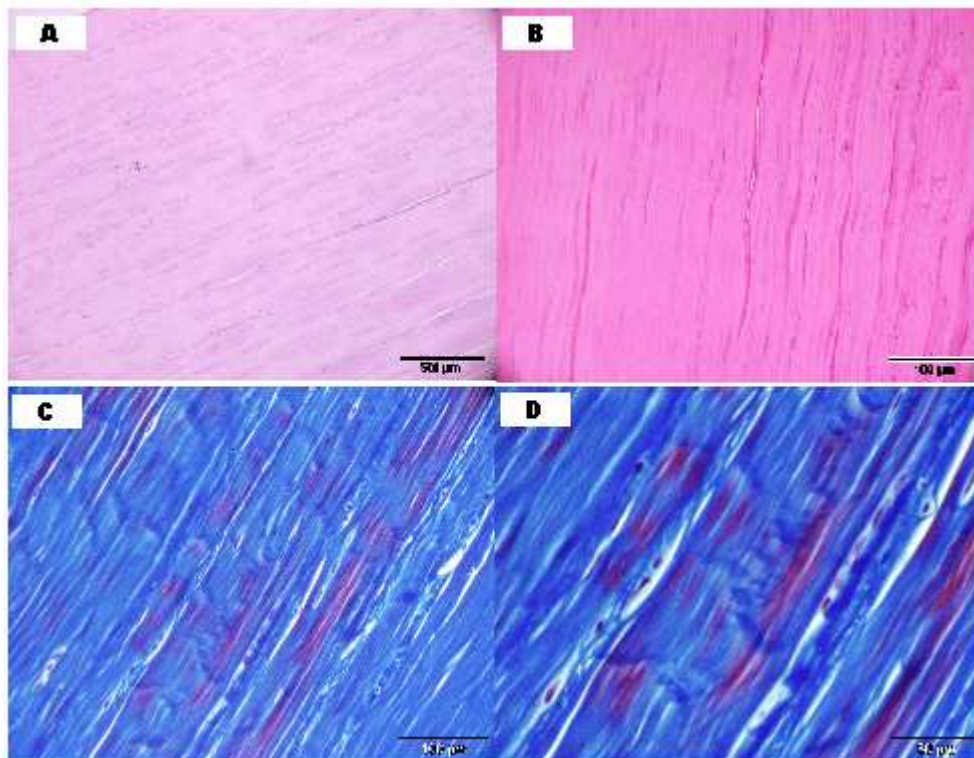


Fig. 37: Sezioni di TFP controllo sano: colorazione con ematossilina-eosina (A ingrandimento 4x, B ingrandimento 10X); colorazione con tricromica di Masson (C: ingrandimento 10x, D ingrandimento 40X).

TABELLA 7

CONTROLLO LESIONATO	
VARIABILI ANALIZZATE	PUNTEGGIO MEDIO E/O VALUTAZIONE
DENSITA' CELLULARE	3
MORFOLOGIA DEI FIBROBLASTI NEL PUNTO DI LESIONE	Fibroblasti arrotondati
NEOVASCOLARIZZAZIONE	3
ORGANIZZAZIONE TISSUTALE	0
ESPRESSIONE DEL COLLAGENE I	0
ESPRESSIONE DEL COLLAGENE III	2

TABELLA 7: Risultati osservati all'esame istologico dei tendini di controllo lesionati (Maia, 2009 modificato)

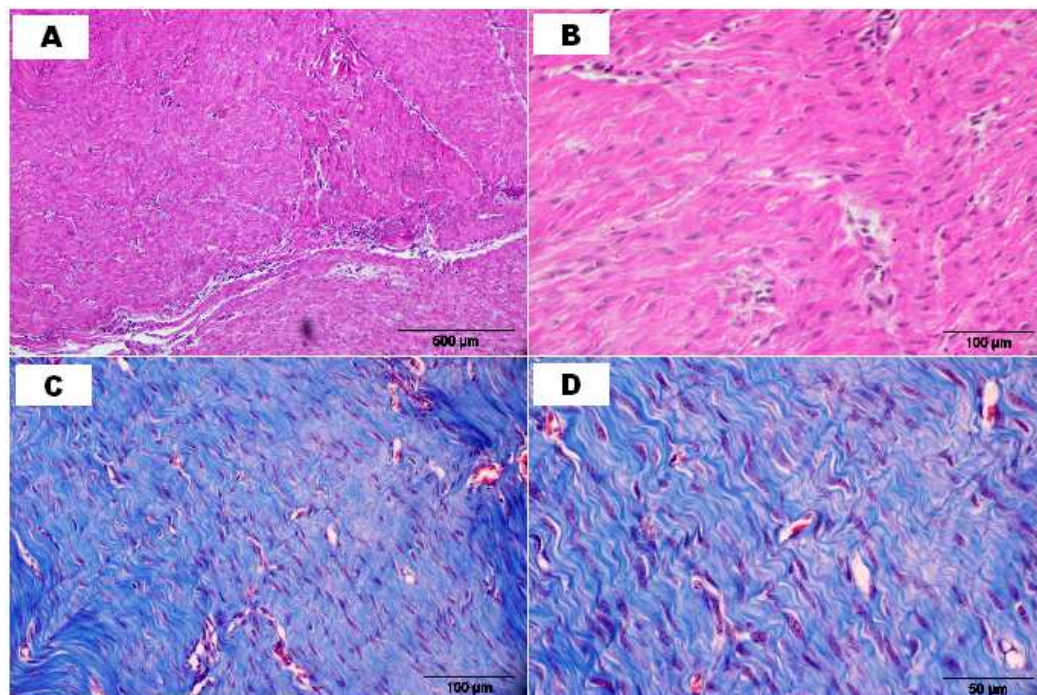


Fig. 38: Sezioni di TFP controllo lesionato: colorazione con ematossilina-eosina (A ingrandimento 4x, B ingrandimento 10X); colorazione con tricromica di Masson (C: ingrandimento 10x, D ingrandimento 20X).

TABELLA 8

GRUPPO MSCs	
VARIABILI ANALIZZATE	PUNTEGGIO MEDIO E/0 VALUTAZIONE
DENSITA' CELLULARE	2,5
MORFOLOGIA DEI FIBROBLASTI NEL PUNTO DI LESIONE	Fibroblasti allungati
NEOVASCOLARIZZAZIONE	1
ORGANIZZAZIONE TISSUTALE	2
ESPRESSIONE DEL COLLAGENE I	1
ESPRESSIONE DEL COLLAGENE III	0

TABELLA. 8: Risultati osservati all'es. istologico dei tendini trattati con MSCs (Maia, 2009 modificato)

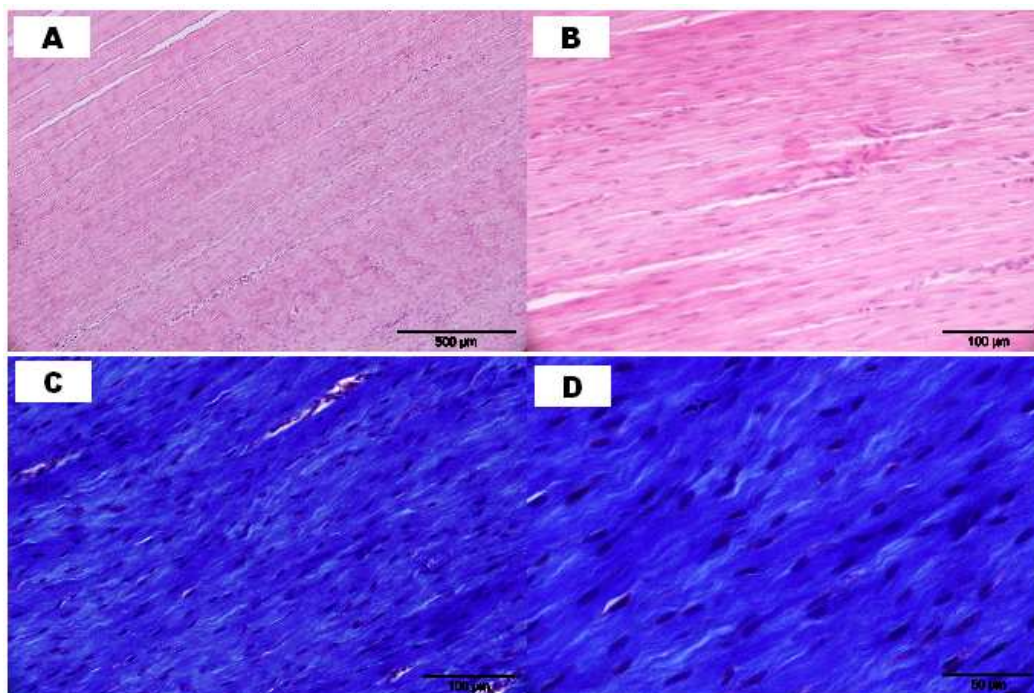


Fig. 39: Sezioni di TFP lesionato trattato con MSCs: colorazione con ematossilina-eosina (A ingrandimento 4x, B ingrandimento 10X); colorazione con tricromica di Masson (C: ingrandimento 10x, D ingrandimento 20X).

TABELLA 9

GRUPPO MSCs/PRP	
VARIABILI ANALIZZATE	PUNTEGGIO MEDIO E/O VALUTAZIONE
DENSITA' CELLULARE	2
MORFOLOGIA DEI FIBROBLASTI NEL PUNTO DI LESIONE	Fibroblasti allungati
NEOVASCOLARIZZAZIONE	1
ORGANIZZAZIONE TISSUTALE	2
ESPRESSIONE DEL COLLAGENE I	1
ESPRESSIONE DEL COLLAGENE III	0,5

TABELLA 9: Risultati osservati all'es. istologico dei tendini trattati con PRP e MSCs (Maia,, 2009 modificato)

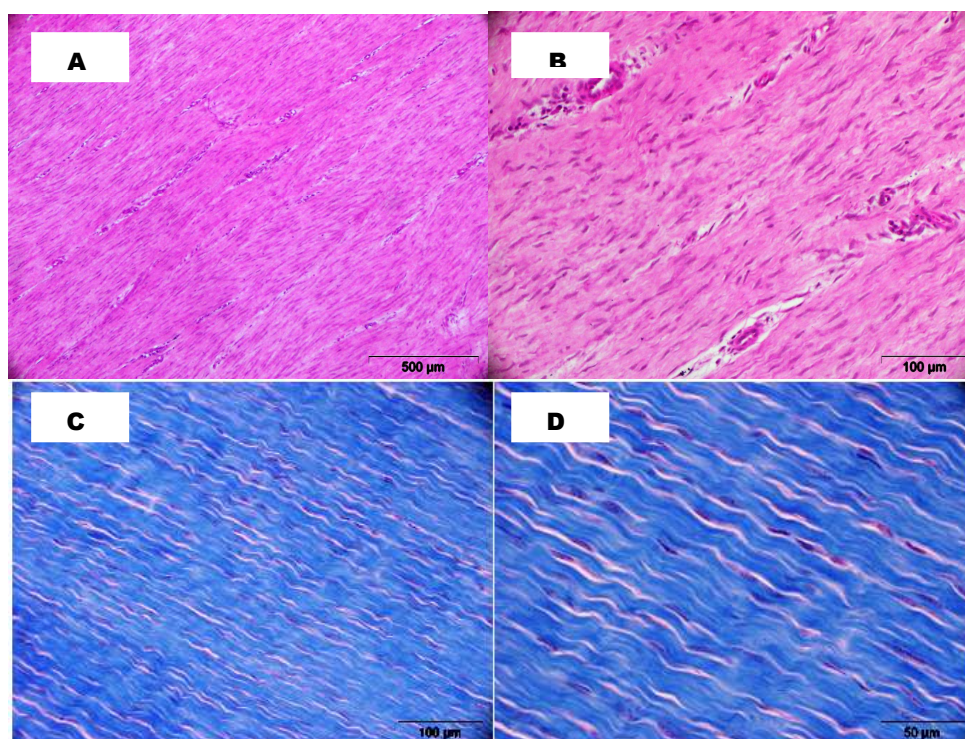


Fig. 40: Sezioni di TFP lesionato trattato con MSCs e PRP: colorazione con ematossilina-eosina (A ingrandimento 4x, B ingrandimento 10X); colorazione con tricromica di Masson (C: ingrandimento 10x, D ingrandimento 20X).

TABELLA 10

GRUPPO PRP	
VARIABILI ANALIZZATE	PUNTEGGIO MEDIO E/0 VALUTAZIONE
DENSITA' CELLULARE	2
MORFOLOGIA DEI FIBROBLASTI NEL PUNTO DI LESIONE	Fibroblasti arrotondati
NEOVASCOLARIZZAZIONE	2
ORGANIZZAZIONE TISSUTALE	1
ESPRESSIONE DEL COLLAGENE I	1
ESPRESSIONE DEL COLLAGENE III	1

TABELLA. 10: Risultati osservati all'esame istologico dei tendini trattati con PRP (Maia, 2009 modificato).

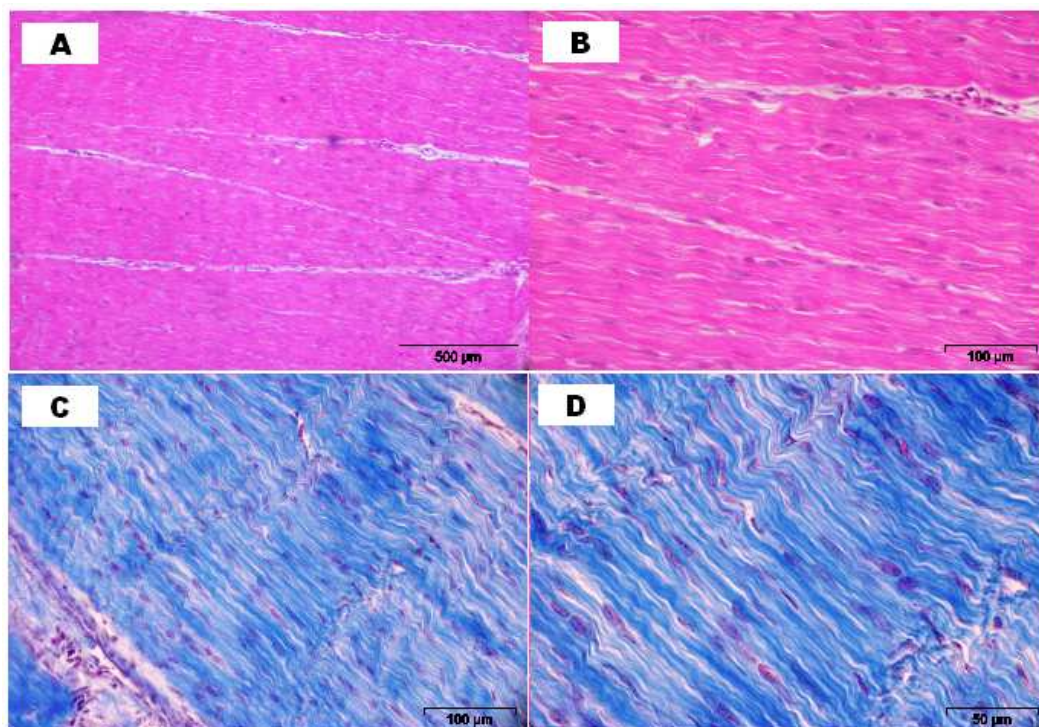


Fig. 41: Sezioni di TFP lesionato trattato con PRP: colorazione con ematossilina-eosina (A ingrandimento 4x, B ingrandimento 10X); colorazione con tricromica di Masson (C: ingrandimento 10x. D ingrandimento 20X).

Mediante osservazione delle sezioni colorate con tecnica immunohistochimica è stata valutata l'espressione del collagene di tipo III nei tendini prelevati.

Come si può notare dalle tabelle, 7, 8, 9 e 10 il collagene III non risulta espresso nel tendine trattato con MSCs mentre viene prodotto in maniera notevole dal tendine di controllo lesionato, in quantità scarse dai tendini trattati con MSCs associato a PRP e in quantità moderate in quelli trattati con solo PRP.

Qui di seguito sono riportati alcuni esempi (Fig. 42 e 43) dei campi fotografati al microscopio ottico delle sezioni colorate con la tecnica immunohistochimica.

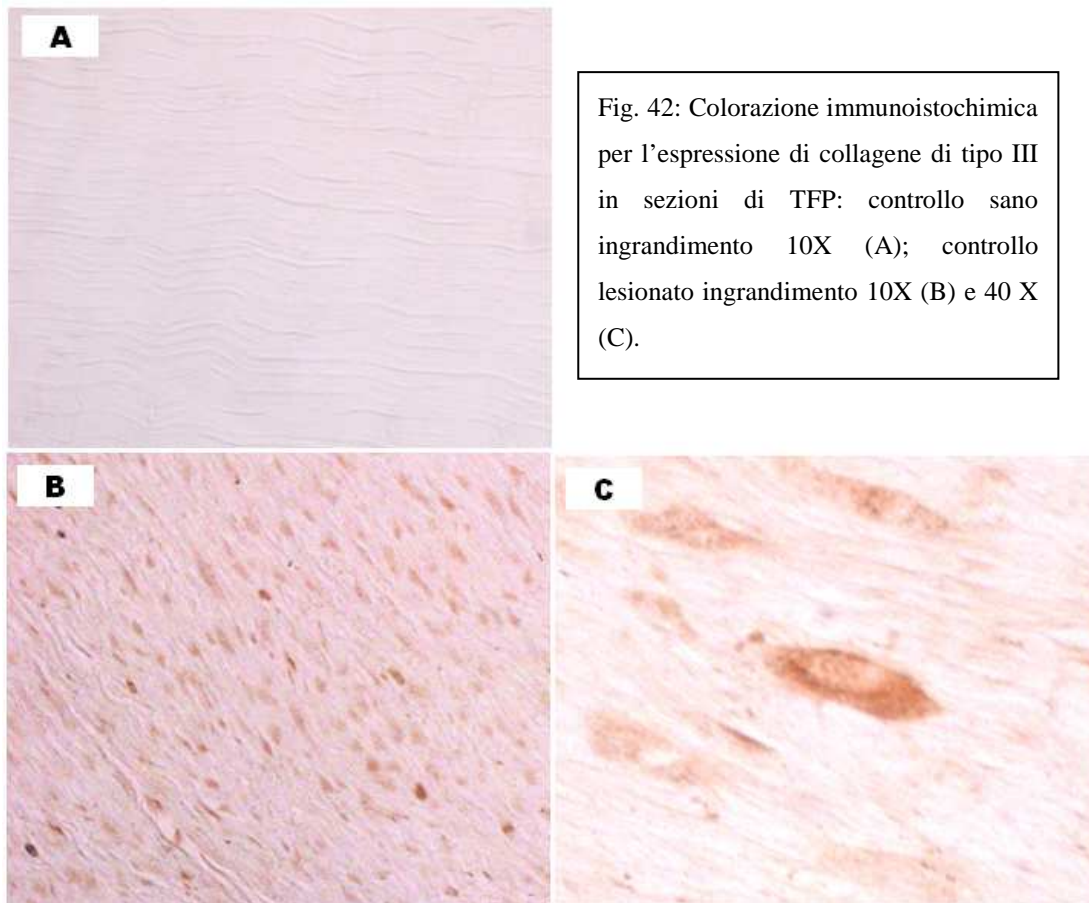




Fig. 43: Colorazione immunistochimica per l'espressione di collagene di tipo III in sezioni di TFP, ingrandimento 10X: trattamento MSCs (A); trattamento MSCs e PRP (B); trattamento PRP (C).



CAPITOLO 4

DISCUSSIONE

Le cellule staminali rappresentano una prospettiva interessante per il trattamento di alcuni tipi di patologie degenerative o traumatiche, grazie alle loro proprietà di differenziazione e plasticità. Il loro impiego in medicina equina è stato studiato approfonditamente negli ultimi anni e la loro azione rigenerativa, principalmente in caso di danno tendineo o legamentoso, è stata descritta in molti studi condotti in vivo (Crovace, 2007; Smith, 2003; Smith, 2008).

Le recenti ricerche condotte sulle cellule staminali adulte hanno permesso di definire che queste cellule sono multipotenti, ossia possono 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 (Ferrari, 1998; Horwitz, 2002; Strauer, 2002; Chapel, 2003 Perin, 2003; Sugaya, 2003; Zhang, 2004; Miyahara, 2006; Gobbi, 2007; Arnalich-Montiel, 2008; Suzuki, 2008; Harris, 2009; El Tamer, 2009).

E' 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; Barriera, 2008).

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; Ferrari, 2007; Crovace, 2010).

Recentemente è stato dimostrato che il sangue venoso periferico può essere considerato una fonte alternativa al midollo osseo per l'isolamento di cellule staminali mesenchimali (Koerner, 2006; Martinello, 2009).

Anche le piastrine sono molto importanti nella guarigione tissutale poiché sono dotate di proprietà pro-infiammatorie, regolatrici e rigenerative (Bessis, 1973; Aguggini, 1992; 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).

Recentemente, in medicina umana, l'impiego di concentrato autologo di piastrine per stimolare la rigenerazione tissutale è aumentato (Everts, 2007). Infatti, è applicato soprattutto in odontoiatria (Rožman, 2007) e chirurgia maxillo-facciale (Dean, 1997; Anitua, 2004; Marx, 2004; Del Corso, 2006), in chirurgia plastica (Anitua, 2004; Eppley, 2006), nel trattamento delle ulcere (Anitua, 2004), in chirurgia ortopedica (Aldegheri, 2002; Sanchez, 2003; Anitua, 2004; Marx, 2004; Everts, 2007; Gobbi, 2007; Crane, 2008; Sampson, 2008) e oftalmica (Korobelnik, 1966; Anitua, 2004; Gimeno, 2006).

L'uso del PRP in medicina equina sembra mostrare risultati incoraggianti per il trattamento di lesioni di varia natura, comprese le patologie muscolo-scheletriche (Carmona, 2006).

Il lavoro presentato nella mia tesi è stato condotto con l'intento di definire 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 tendinee (a carico del tendine flessore profondo delle falangi) sperimentalmente indotte nella pecora, sfruttando un meccanismo patogenetico in grado di creare una lesione quanto più possibile analoga a quella che si sviluppa nella realtà.

Lo scopo è stabilire un protocollo sperimentale adeguato a essere impiegato in animali di elevato interesse economico, come ad esempio il cavallo.

Gli studi sulla rigenerazione dei tessuti che impiegano biomateriali generalmente coinvolgono specie sperimentali che mostrano delle capacità rigenerative elevate e differenti rispetto a quelle degli animali d'interesse veterinario.

Dal momento che i dati sperimentali su animali di questo tipo sono molto scarsi, in questo studio è stato scelto di impiegare la pecora come modello animale (Dehghan, 2007; Everts, 2007; Gobbi, 2007; Fotia, 2008; Crovace 2008; Martinello, 2009; Muttini, 2009; Maia, 2009; Crovace 2010); questa scelta si è rivelata valida, poiché la pecora è un animale facile da gestire oltre a rappresentare un buon modello sperimentale per le patologie teno-desmiche del cavallo.

Le metodiche descritte in letteratura per l'isolamento delle MSCs (Martinello, 2009) e del PRP da sangue periferico sono state studiate nel cavallo, tuttavia, tali metodiche si

sono dimostrate adeguate anche se applicate nella pecora. Infatti, il procedimento utilizzato per l'estrazione e l'isolamento delle cellule staminali mesenchimali si è rivelato efficace e non invasivo, non ha comportato sofferenze agli animali e per attuarlo generalmente non è indispensabile alcuna forma di anestesia o sedazione del soggetto. Il protocollo di preparazione del concentrato piastrinico autologo è rapido, economico e anch'esso non invasivo né doloroso.

Nel nostro caso, tuttavia, gli animali sono stati anestetizzati per una questione di praticità.

Nel presente studio è stata indotta una lesione tendinea mediante iniezione transcutanea di collagenasi. Si tratta di un enzima, già utilizzato in passato in diverse procedure sperimentali (nel ratto, nella pecora e nel cavallo), che induce una lesione tendinea con un meccanismo simile a quello che si verifica naturalmente (Dehghan, 2007; Muttini, 2009; Crovace, 2010). Questa metodica, secondo quanto ampiamente descritto in letteratura (Muttini 2009, Dehghan 2007, 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 in seguito a trauma acuto o di microtraumi ripetuti nel tempo.

Tuttavia, in questo studio sono state incontrate delle difficoltà nell'induzione del danno tendineo. Infatti, contrariamente a quanto sostenuto da alcuni autori, l'impiego di tale metodica allo scopo di provocare una *core-lesion* ha portato alla formazione di lesioni non perfettamente circoscritte e con caratteristiche infiltrative tra le fibre collagene; la causa di questo inconveniente potrebbe essere il ridotto diametro dei tendini di pecora, rispetto al calibro maggiore che si riscontra nei tendini di cavallo.

Per ottenere una corretta visualizzazione dell'infissione dell'ago per via transcutanea e dell'iniezione dell'enzima collagenasi a livello tendineo (Dehghan, 2007; Reef, 1998) è stato impiegato il metodo ultrasonografico, che nel nostro caso e secondo alcuni autori si è rivelato adeguato (Crovace, 2007; Mattini, 2009; Maia, 2009).

Nei giorni successivi all'iniezione di collagenasi, come descritto anche da altri autori (Keg, 2001; Dehghan, 2007), gli animali hanno manifestato segni clinici di zoppia, calore, dolore e tumefazione nel sito di inoculo che possono essere conseguenti alla formazione di un ematoma e di edema associato a flogosi, causati dal trattamento.

Una settimana dopo la provocazione del danno tissutale è stato eseguito il trattamento delle pecore con MSCs e/o PRP. La scelta del momento adeguato per l'infusione dei biomateriali nel sito della lesione è stata fatta basandosi su risultati ottenuti nel cavallo e riportati in letteratura, in cui è stato visto che la massima estensione del danno indotto dalla collagenasi si manifesta intorno al settimo od ottavo giorno post-inoculo (Dehghan, 2007).

A cadenze prestabilite, nelle settimane successive al trattamento, sono stati eseguiti dei controlli clinici ed ecografici, allo scopo di valutare la risposta dei soggetti e l'evoluzione e l'estensione della guarigione in funzione delle diverse terapie applicate.

In tutti e tre i gruppi è stato osservato un progressivo miglioramento della sintomatologia clinica, infatti, al termine dello studio sperimentale l'edema, il calore e dolorabilità alla palpazione erano scomparsi. Dalle valutazioni cliniche è stato anche possibile notare che in tutti e tre i gruppi, l'arto trattato ha avuto una remissione più rapida dei segni clinici rispetto all'arto di controllo (arto sinistro per tutti i soggetti). In particolare la sintomatologia nei soggetti appartenenti 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, com'è possibile osservare dai dati riportati nelle tabelle 3, 4 e 5. Inoltre, è stato possibile determinare che in nessun animale il trattamento ha provocato effetti collaterali locali o sistemici.

L'indagine ultrasonografica è una metodica non invasiva e ampiamente diffusa nella pratica clinica e nel nostro studio ha rappresentato un buon ausilio diagnostico. Infatti, mediante monitoraggio ecografico è stato possibile verificare l'evoluzione della guarigione tissutale valutando le dimensioni, la localizzazione e la gravità delle lesioni in base all'ecogenicità delle immagini e all'allineamento delle fibre (Dehghan, 2007).

Come riportato da studi condotti negli ultimi anni (Carmona, 2006; Arguelles, 2008; Crovace, 2008; Fasce, 2008; Kaneps, 2008; Nixon, 2008; Prades, 2008; Sutter, 2008; Waselau, 2008; Crovace, 2010), il trattamento di lesioni tendinee con cellule staminali e/o concentrato piastrinico contribuisce al processo di guarigione tissutale, migliorandone la qualità e promuovendo la formazione di nuove fibre collagene allineate secondo l'asse longitudinale del tendine. Tuttavia, questi risultati sono più evidenti se si confrontano i dati clinici (Tabb. 3-4-5) e le immagini ecografiche (Figg. 34-35-36) raccolte all'inizio e alla fine del trattamento, ossia a distanza di quattro

settimane tra un controllo e l'altro. Infatti, le variazioni di ecogenicità dei tessuti osservabili confrontando immagini raccolte a distanza di una settimana l'una dall'altra sono apprezzabili con difficoltà. Molto probabilmente, come nel caso dell'induzione della *core-lesion*, quest'ostacolo è legato alle ridotte dimensioni dei tendini ovini.

In particolare, grazie agli esami clinici ed ecografici è stato osservato, in tutti e tre i gruppi, un miglioramento progressivo delle lesioni a carico dell'arto trattato, senza sostanziali differenze tra le tre diverse terapie per quanto riguarda la qualità del processo riparativo.

Terminate le valutazioni cliniche ed ecografiche, gli animali sono stati sacrificati e sono stati prelevati i tendini da sottoporre alle valutazioni istologiche e immunoistochimiche. Nella raccolta dei campioni, come riportato da Maia in uno studio del 2009, sono state incontrate delle difficoltà dovute la presenza di formazioni aderenziali; queste ultime erano localizzate tra tendini e strutture adiacenti, in corrispondenza del punto di inoculo della collagenasi e probabilmente sono causate dalla flogosi conseguente all'azione dell'enzima (Weiner, 1971; Matthews, 1979; Sharma, 2006; Andia, 2010).

I tendini controllo e quelli trattati sono stati raccolti e destinati alle adeguate procedure di preparazione dei campioni e alle metodiche istologiche e immunoistochimiche.

Le sezioni tendinee allestite sono state osservate al microscopio in modo da valutare la qualità e la velocità del processo di guarigione tissutale.

In particolare, le colorazioni *ematossilina-eosina* e *tricromica di Masson* hanno permesso di determinare qualitativamente l'organizzazione della ECM e degli elementi cellulari. I risultati ottenuti concordano con quanto riportato in letteratura (Maia, 2009).

Infatti, è stato possibile osservare che i tendini di controllo lesionati (Tab. 7), dopo quattro settimane dall'iniezione di collagenasi, sono caratterizzati da un quadro istologico alterato rispetto ai tendini di controllo sani (Tab. 6). Le fibre collagene non sono disposte in modo regolare poiché vi è una completa perdita dell'organizzazione tissutale, sono presenti elevata cellularità, caratterizzata da fibroblasti di forma circolare, ed elevata neovascolarizzazione associata a un moderato infiltrato infiammatorio (Fig. 38)

All'esame delle sezioni istologiche dei tendini trattati con MSCs (Fig. 39) si osservano, rispetto al tendine sano, un aumento da moderato a elevato della densità dei fibroblasti ed un lieve aumento della neovascolarizzazione e dell'infiltrato infiammatorio

perivascolare. Inoltre è possibile evidenziare una moderata organizzazione tissutale con fibre collagene disposte più regolarmente e infiltrate da fibroblasti allungati, salvo in alcune zone dove permane ancora una certa disorganizzazione con disposizione casuale delle fibre (Tab. 8) (Smith, 2005; Richardson, 2007; Lacitignola, 2008; Crovace, 2010). Nel gruppo trattato con PRP e MSCs (Fig. 40) l'esame istologico dei tendini mostra un'organizzazione tissutale, una disposizione fibre collagene e una neovascolarizzazione qualitativamente simili a quelle del gruppo precedente; anche in questo caso è evidente una buona cellularità ma di entità inferiore rispetto al gruppo trattato con MSCs (Tab. 9).

La valutazione delle sezioni ottenute dalle pecore trattate con PRP (Fig. 41) ha permesso di osservare una neovascolarizzazione maggiore rispetto ai gruppi precedenti ma un'organizzazione tissutale discreta e un moderato aumento della densità cellulare (con fibroblasti arrotondati) rispetto al tendine sano (Tab. 10).

Come riportato in alcuni studi pubblicati in letteratura (Webbon, 1978; Maia, 2009), il cambiamento di forma dei fibroblasti da tondeggianti a fusiformi è indice di una progressione del processo riparativo. Inoltre, la maggiore cellularità osservata nelle sezioni tendinee provenienti da soggetti trattati con MSCs o con associazione di MSCs e PRP, trova conferma nei risultati riportati in numerosi studi condotti negli ultimi anni, secondo cui un importante contributo al processo di guarigione tissutale è fornito dalle cellule staminali (Smith, 2005; Richardson, 2007; Lacitignola, 2008; Crovace, 2010) e dai fattori di crescita (Everts, 2007; Fotia, 2009), che sono fondamentali nello stimolare l'azione di tali cellule nei meccanismi di guarigione.

Generalmente il processo di guarigione tissutale è caratterizzato dal passaggio progressivo da un tessuto formato prevalentemente da fibre collagene tipo III a un tessuto composto soprattutto da fibre di tipo I (Manske, 1984; Carmona, 2006; Wang, 2006; Obaid, 2010). Infatti, nelle prime fasi di riparazione di una lesione, le fibrille di collagene III sono rapidamente sintetizzate per garantire forza ed elasticità al tessuto. Tuttavia, queste fibrille non garantiscono la resistenza allo stiramento che è in grado di fornire il collagene I ed è per questo motivo che il processo di guarigione progredisce con la sostituzione delle fibrille di tipo III con quelle di tipo I (Carmona 2006).

Queste modificazioni nella composizione della ECM durante la riparazione tendinea sono indagabili valutando l'espressione di del collagene di tipo I e di tipo III all'interno

del tendine e questo obiettivo è stato raggiunto sfruttando la metodica immunoistochimica.

Comparando le sezioni colorate con la metodica tricromica di Masson con quelle colorate con la tecnica immunoistochimica è stato possibile di valutare indirettamente l'espressione del collagene di tipo I, da parte dei tendini indagati.

I risultati ottenuti dall'esame immunoistochimico dei tendini di controllo lesionati (Tab. 7) rispecchiano l'effetto voluto dall'iniezione dell'enzima collagenasi a livello tendineo, ossia un'elevata espressione di collagene di tipo III, a indicare la presenza di un tendine danneggiato che però è fase di riparazione tissutale (Fig. 42 B e C). I risultati ottenuti dall'esame dei tendini trattati mostrano invece la progressiva scomparsa del collagene di tipo III a favore del collagene I (Tab. 8-9-10), ovvero che si è verificato un graduale miglioramento dell'organizzazione tissutale dei tendini trattati rispetto ai controlli (Fig. 43 A, B e C).

Da un punto di vista istologico, perciò, il trattamento con concentrato piastrinico ha determinato un'organizzazione migliore delle fibre collagene, rispetto al mancato trattamento, e l'aggiunta delle cellule staminali al PRP o l'impiego di sole MSCs ha apportato un ulteriore beneficio all'organizzazione del tessuto in via di guarigione.

Dai risultati ottenuti dalle rilevazioni cliniche, ecografiche, istologiche e immunoistochimiche, si può dedurre che:

- a) L'applicazione intraliesionale di MSC e PRP è sicura e non induce nell'ospite alcuna reazione di tipo immunitario o altri effetti collaterali locali o sistemici;
- b) La sintomatologia legata al processo flogistico, che si riscontra clinicamente in seguito all'iniezione di collagenasi, si esaurisce spontaneamente e generalmente entro la prima settimana dal trattamento;
- c) Il trattamento delle lesioni tendinee con MSCs o PRP o l'associazione di questi biomateriali determina un potenziamento del processo di guarigione, al contrario di quanto avviene nei tendini controllo;
- d) Il trattamento con MSCs è in grado di migliorare qualitativamente la capacità rigenerativa del tessuto tendineo in maniera maggiore rispetto al trattamento con PRP;

- e) L'associazione di MSCs e PRP è caratterizzata da un effetto sinergico che in grado di migliorare l'efficacia d'azione del PRP nel trattamento delle lesioni tendinee.

L'utilizzo di MSCs o dell'associazione delle MSCs e PRP risulta, perciò, una prospettiva molto interessante nel trattamento di patologie teno-desmiche, poiché induce una migliore rigenerazione del tessuto tendineo, limitando la formazione di una cicatrice fibrosa che è la causa principale dell'elevato rischio di recidiva di queste patologie.

Tuttavia, non è stato possibile valutare se le terapie da noi studiate siano in grado di accelerare il processo riparativo.

Pertanto i risultati raggiunti in questo studio, nonostante siano incoraggianti, non sono sufficienti a trarre delle conclusioni soddisfacenti e costituiscono solo parte di un progetto più ampio e complesso. Infatti, il normale processo di guarigione tendinea si protrae solitamente ben oltre le 4 settimane, perciò la fase successiva del progetto sarà approfondire ulteriormente l'argomento con un lavoro che preveda il monitoraggio clinico ed ecografico e la valutazione istologica dei tendini a 4 mesi dal trattamento, al fine di confermare i risultati raggiunti con questo studio e ottenere nuove informazioni utili riguardanti l'evoluzione del processo di guarigione tendinea e gli effetti benefici a lungo termine che si possono ottenere con l'impiego terapeutico dei biomateriali studiati.

BIBLIOGRAFIA

1. **Ackermann P.W., Li J., Finn A., Ahmed M., Kreicbergs A.** 2001 *Autonomic innervation of tendons, ligaments and joint capsules. A morphologic and quantitative study in the rat.* J Orthop Res 19, 372-378.
2. **Adamo S.** 2002 *Tessuti connettivi. Tessuto connettivo propriamente detto* in "Istologia" di V. Monesi Piccin editore 2002 V edizione III ristampa 435-488
3. **Albrechtsen S.J., Harvey J.S.** 1982 *Dimethyl sulfoxide. Biomechanical effects on tendons* Am. J. Sports Med. 10; 177.
4. **Aldegheri R., Duplicato P., Agostini S., Ferro I., De Gironzoli M., Franchini M.** 2002 *Ruolo dei fattori di crescita autologhi nella chirurgia ossea ricostruttiva.* G.I.O.T. 28, 157-165.
5. **Andia I, Sanchez M, Maffulli N.** 2010 *Tendon Healing and platelet-rich plasma therapies* Expert Opin Biol Ther 10, 1415-26.
6. **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,; n°14; p 529-535.
7. **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, n°91; p 4-15.
8. **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.* J Orthop Res, 2005; n°23; p 281-286.
9. **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 (5), 227-234.
10. **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.

11. **Arendt J., Gazdzik T.S., Szczepanski T., Bielecki T.M.** 2007 *Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study.* Journal of Bone and Joint Surgery 89(3), 417-420.
12. **Arguelles D, Carmona JU, Pastor J, Iborra A, Vinals L, Martinez P, Bach E, Prades M.** 2006 *Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets.* Research in Veterinary Science, n°81; p 237-245.
13. **Arguelles D., Carmona J.U., Climent F., Muñoz E., Prades M.** 2008 *Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses* The Veterinary Record 162, 208-211.
14. **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.
15. **Ashdown R.R., Done S.H.** 1987 *Atlante di anatomia veterinaria-* volume secondo “Il cavallo” edizioni USES Firenze.
16. **Asheim A.** 1964 *Surgical treatment of tendon injurier in the horse* J. Am. Vet. Med. Assoc. 145; p447.
17. **Asheim A. and Kundsens O.** 1967 *Percutaneous tendon splitting* Proc. 13th Ann. Meet. Am. Assoc. Equine Pract.; pp 255-257.
18. **Assirelli S.** 2008 *Plasma arricchito di piastrine (PRP) nel trattamento delle lesioni teno-desmiche del cavallo: valutazione degli effetti clinici e dell'applicazione di differenti protocolli riabilitativi;* tesi di laurea.
19. **Barone R.** 1981 *Anatomia comparata dei mammiferi domestici – vol. 2 Artrologia e Miologia.* 2^a edizione. Bologna Ed. Agricole.
20. **Barreira A.P.** 2008 *Autologous Implant of Bone Marrow Mononuclear Cells as Treatment of Induced Equine Tendinitis* Intern J Appl Res Vet Med. 6 (1), 46 - 54.
21. **Barret J., White A.** 2008 *Introduction to equine tendon injury* In Proceedings of the Annual Convention of the AAEP 464-469.
22. **Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H.** 2004 *Critical parameters for isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood.* STEM CELLS; 22: 625-634.

23. **Birch J.**, 1993 *An investigation into the cellular basis of tendon degeneration* (phD Thesis) University of Bristol.
24. **Birch H.L.** 1998 *Macroscopic degeneration of equine superficial digital flexor tendon is accompanied by a change in extracellular matrix composition* Eq. Vet J; 30; pp 534-539.
25. **Birch H.L., Bailey J.V.B, Bailey A.J., Goodship A.E.** 1999 *Age-related changes to the molecular and cellular components of equine flexor tendons* Eqine Vet. Journ. 31; 5; p 391- 396.
26. **Booth D. M.** 1999 *Farmaci analgesici, antipiretici, antinfiammatori* da Richards Adams in “Farmacologia e terapeutica veterinaria”; 484- 489.
27. **Boothe** 2001 *Struttura, funzione, metabolismo del tessuto tendineo* in “Le basi patogenetiche delle malattie chirurgiche nei piccoli animali”, Bojrab A.J. San Lazzaro di Savena (BO) Cristiano Giraldi Editore.
28. **Borzini P., Mazzucco L., Cattana E.** 2004 *Platelet gel: clinical use and unanswered question* Blood Transfusion 2, 10-14.
29. **Boudreaux M. K.** 2010 *Platelet structure* In Weiss D.J. Wardrop K.J. Schalm’s Veterinary Hematology 561-568 Wiley-Blackwell Iowa USA.
30. **Boudreaux M. K., Catalfamo J.** 2010 *Platelet biochemistry, signal transduction, and function* In Weiss D.J. Wardrop K.J. Schalm’s Veterinary Hematology 569-575 Wiley-Blackwell Iowa USA.
31. **Braun S., Auf dem Keller U., Beer H-D., Krampert M., Müller M., Werner S., Dickson C., Werner S.** 2002 *Growth factors in development, repair and disease* B.I.F. Futura 17, 61-70.
32. **Brown M.P., Pool R.R.** 1983 *Experimental and clinical investigations of the use of carbon fiber suture in equine tendon repair* J. Am. Vet. Med. Assoc. 182; p 956.
33. **Busilacchi A., del Torto M., Enea D., Manzotti S., Gigante A.** 2009 *Platelet-rich plasma nella riparazione tendinea: studio sperimentale in modello animale precursors* In Atti del XI Congresso nazionale IORS.
34. **Butler DL, Groods ES, Noyers FR, Zernicke RF.** 1978 *Biomechanics of ligaments and tendons.* Exerc. Sport Sci. Rev. 6: 125-181; 1978.

35. **Carlucci F, Spinabella S.** 2004 *La tenite nel cavallo: recenti acquisizioni, prospettive future*, Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Pisa, vol. LVII, num. 1.
36. **Carmona J.U., Arguelles D., Climent F.** 2005 *Report of the intra-articular treatment with platelet rich plasma in 7 horses with joint disease* in Atti del 14th Ann Scien Meet Europe Coll Vet Surg 2005, 68-71.
37. **Carmona Ramirez J. U.** 2006 *Use of autologous platelet concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse.* PhD Thesis.
38. **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.
39. **Carter C.A., Jolly D.G., Worden C.E., Hendren D.G., Kane C.J.** 2003 *Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regenerative during equine wound healing.* Exp Mol Pathol 74(3), 244-255.
40. **Celia** 1994 *Microwave thermography: a non invasive technique for investigation of injury of the superficial digital flexor tendon in the horse* Eq. Vet. J.; 24; 4; pp 269-273.
41. **Chaer R. A., Graham J.A., Mureebe L.** 2006 *Platelet function and pharmacologic inhibition.* Vasc Endovasc Surg 40, 261-267.
42. **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.
43. **Cheli** 1982 *Medicina Operatoria Veterinaria* Edizione UTET; pp 52-77
44. **Cook JL, Kiss ZS, Ptasnik R, Malliaras.** 2005 *Is vascularity more evident after exercise? Implications for tendon imaging.* AJR Am J Roentgenol; 13: 157-164.
45. **Copley A.L., Houlihan R.B.** 1947 *Studies on platelets: VII. The agglutination of platelets isolated from Human, Dog and Swine blood.* Blood 2, 182-198.
46. **Crane D.** 2008 *Platelet rich plasma (PRP) matrix grafts* Practical Pain Management 8, 12-27.
47. **Craychee T.J.** 1995 *Ultrasonographic Evaluation of Equine Musculoskeletal*

- Injury*. In: Nyland T.G. e J.S. Mattoon. *Veterinary Diagnostic Ultrasound*. WB Saunders Company, 265-304? Proceedings of 51th Annual Convention of AAEP, Seattle, USA.
48. **Crigler L, Kazhanie A, Yoon TJ, Zakhari J, Anders J, Taylor B et al.** 2007 *Isolation of mesenchymal stem cell population from murine dermis that contains progenitor of multiple cell lineages*. FASEB J; 21: 2050-2063.
 49. **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).
 50. **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.
 51. **Crovetti G., Martinelli G., Issi M., Barone M., Guizzardi M., Campanati B., Moroni M., Carabelli A.** 2004 *Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds*. Transfusion and Apheresis Science 30, 145-151.
 52. **Csaki C., Matis U., Shakibaei M.** 2008 *Cartilage formation of mesenchymal stem cells through co-culture with primary isolated chondrocytes: potential applications in regenerative medicine*. In Atti del 14th ESVOT Congress Munich 10th-14th September 2008 295.
 53. **Dahlgren L.A., Nixon A.J., Brower-Toland B.D.** 2001 *Effects of b-aminopropionitrile on equine tendon metabolism in vitro and on effects of insulin-like growth factor-I on matrix production by equine tenocytes* A. J. V. R.; 62; 10; pp1557-1562.
 54. **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.
 55. **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.

56. **Dallari D., Fini M., Stagni C., Torricelli P., Aldini N.N., Giavaresi G., Cenni E., Baldini N., Cenacchi A., Bassi A., Giardino R., Fornasari P.M., Giunti A.** 2006 *In vivo study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination.* Journal of Orthopaedic Research 6, 877-888.
57. **Davis C.S., Smith R.K.W.** 2005 *Diagnosis and management of tendon and ligament disorders* In Auer & Stick, Equine surgery Ed Saunders, 1086-1111
58. **Dean H. et al** 1997 *Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery* J Oral Maxillofac Surg 55, 1294-1299.
59. **Dehghan M.M., Mehrjerdi H.K., Masoudifard M., Eslaminejad M.R.B., Sharifi D., Vajhi A.R.** 2007 *Clinical and ultrasonographic findings of collagenase induced tendonitis in the horse* Iranian Journal of Veterinary Surgery 2(2), 47-57.
60. **Del Bue M., Riccò S., Volta a., Gnudi G., Grolli S., Ramoni R., Conti V., Bagnetti G.** 2006 *Le cellule mesenchimali staminali adulte da tessuto adiposo omologo per la rigenerazione tendinea nel cavallo* Praxis Vet 27(4), 2-6.
61. **Del Bue M., Riccò S., Ramoni R., Conti V., Gnudi G., Grolli S.** 2008 *Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association.* Vet Res Commun. 5, 12-17.
62. **De Mos M., Van der Windt A.E., Jahr H., Van Schie H.T.M., Weinans H., Verhaar J.A.N., Van Osch G.J.V.M** 2008 *Can Platelet-rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study.* The American Journal of Sports Medicine 36(6), 1171-1178.
63. **Denaro V., Vadalà G., Di Martino A., Papapietro N., Tirindelli M.C.** 2009 *Uso del concentrato di cellule midollari arricchito con gel di fibrina ricco in piastrine per artrodesi vertebrale posterolaterale* In Atti del XI Congresso nazionale IORS, Ancona 12-13 giugno, 25.
64. **Denoix J.M.,** 1994 *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.

65. **De Rossi R., Anciliero 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.
66. **Diamant J, Keller A, Boer E, Lutt M, Arridge RG.** 1972 *Collagen; ultrastructure and its relation to mechanical properties as a function of ageing.* Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 180: 293-315.
67. **Dijkstra-Tiekstra M.J., van der Schoot C.E., Pieterst R.N.I., Reesink H.W.** 2005 *White blood cell fragments in platelet concentrates prepared by the platelet-rich plasma or buffy-coat methods* Vox sanguinis 88, 275-277.
68. **Dohan Ehrenfest D.M., Choukroun J.** 2007 *PRP, cPRP, PRF, PRG, PRGF, FC...How to find your way in the jungle of platelet concentrates?* Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology and endodontology 103(3), 305-306.
69. **Dohan Ehrenfest D.M., de Peppo G.M., Doglioli P., Sammartino G.** 2009 *Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies.* Growth Factors 27(1), 63-69.
70. **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.
71. **Douchet C., Ernou I., Zhang Y., Ilense J.R., Begot L., Holy X., Lataillade J.J.** 2005 *Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications.* Journal of cellular physiology 205, 228-236.
72. **Dowling B.A., Dart A.J., Hodgson D.R. e Smith R.K.W.** 2000 *Superficial digital flexor tendonitis in the horse* Equine Veterinary Journal 32, 369-378.
73. **Du Toit D.F., Kleintjes W.G., Otto M.J., Masaya E.J., Page B.J.** 2007 *Soft and hard-tissue augmentation with platelet-rich plasma: tissue culture dynamics, regeneration and molecular biology perspective.* Into J Shoulder Surg 1(2), 64-73.
74. **Edwards D.A.** 1946 *Blood supply and lymphatic drainage of tendons.* J. Anta 80, 147-152.

75. **El Tamer MK, Reis RL.** 2009 *Progenitor and stem cells for bone and cartilage regeneration.* J Tissue Eng Regent Med (in press).
76. **Enemata C.S.** 1989 *Inflammation, cellularità and fibrillogenesis in regenerating tendon: implications for tendon rehabilitation.* Phys Ther 69, 816-825.
77. **Eurell J.A., Van Sickle D.C.** 2000 *Tessuti connettivi e di sostegno* In Dellmann H.D., Eurell J.A. *Istologia e Anatomia Microscopica Veterinaria* Casa Editrice Ambrosiana Milano 42-80.
78. **Evans J.H., Barbanel J.C.** 1975 *Structural and mechanical properties of tendon related to function.* Equine Vet J 7,1-2.
79. **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.
80. **Everts P.A.** 2007 *Autologous platelet-leukocyte enriched gel basics and efficacy: A novel method to support soft tissue and bone healing* PhD Thesis Catharina Hospital Eindhoven, Netherlands.
81. **Everts P.A., Devilee R.J., Oosterbos C.J., Mahoney C.B., Schattenkerk M.E., Knappe 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 Surg Sports Traumatol Arthrosc 15(7), 888-894.
82. **Everts P.A.M., van Zundert A., Schönberger J.P.A.M., Devilee R.J.J., Knappe J.T.A.** 2008 *What do we use: Platelet-rich plasma or platelet-leucocyte gel?* Journal of Biomedical Materials Research Part A 85A(4), 1135-1136.
83. **Fackelman G.E.** 1973 *The nature of tendon damage and its repair* Equine Vet J 5, 141-142.
84. **Fenwick N., Griffin G., Gauthier C.** 2009 *Welfare of animals used in science: how the "Three Rs" ethic guides improvements.* Can Vet J 50(5), 523-530.
85. **Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G et al.** 1998 *Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors.* Science; 279: 1528-1530.

86. **Ferrari M., Corradi A., Lazzaretti M., De' Cillà M., Losi C.G., Villa R., Lanfranchi A.** 2007 *Adult stem cells: prospective for therapeutic application* Vet Res Commun 31(1)1-8.
87. **Ficarelli E., Bernuzzi G., Tognetti E., Bussolanti O., Zucchi A., Adorni D., De Panfilis G.** 2008 *Treatment of chronic venous leg ulcers by platelet gel.* Dermatologic Therapy 21, 13-17.
88. **Fortier L.A., Mohammed H.O., Lust G., Nixon A.J.** 2002 *Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage.* The Journal of Bone and Joint Surgery 84(2), 276-288.
89. **Fortier L.A.** 2005 *Stem cells: classifications, controversies and clinical applications.* Veterinary Surgery 34, 415-423.
90. **Fortier L.A., Smith R.K.** 2007 *Evidence for stem cells in cartilage regeneration.* In Atti del 53th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners 2007 Orlando, Florida, USA.
91. **Fortuna et al.** 2006 *Nuove acquisizioni di fisiopatologia del tendine equino e innovativi approcci terapeutici* El.En Group.
92. **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.
93. **Fotia C., Cenni E., Avnet S., Salerno M., Baldini N.** 2009 *Effect of platelet rich plasma on differentiation and activation of osteoclasts obtained from human blood precursors* in Atti del XI Congresso nazionale IORS, Ancona 12-13 giugno, 33.
94. **Froum S.J., Fallace S.S., Tarnow D.P., Cho S.** 2002 *Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports.* The International Journal of periodontics and Restorative Dentistry 22(1), 45-54.
95. **Fuchs E., Segre J. A.** 2000 *Stem cells: a new lease on life* in Cell 100 (1): 143-55.

96. **Genovese R.D.** 1996 *Superficial digital Flexor Tendonitis. Long Term Sonographic and Clinical Study of Racehorses In The equine athlete: tendon, ligament and soft tissue injuries.* Proceedings Dubai International Equine Symposium 1996,187-207.
97. **Gerard D., Carlson E.R., Gotcher J.E., Jacobs M.** 2007 *Effect of platelet-rich plasma at the cellular level on healing of autologous bone-grafted mandibular defects in dogs.* J Oral Maxillofac Surg 65(4), 721, 727.
98. **Gibson K.T., Burbidge H.M., Pfeiffer D.U.** 1997 *Superficial digital flexor tendonitis in Thoroughbred race horses: outcome following non-surgical treatment and superior check desmotomy* AVJ 75, 631-635.
99. **Gigante A., del Torto M., Busilacchi A., Manzotti S., Procopio A., Greco F.** 2009 *Platelet-rich plasma nella riparazione muscolare in modello sperimentale su ratto* In Atti del XI Congresso nazionale IORS, Ancona 12-13 giugno, 24.
100. **Gillis C.** 1995 *Ultrasonographic cross-sectional area and mean echogenicity of the superficial digital flexor tendon in 50 trained thoroughbred racehorse* Am. J. Vet. Res. 56; p 1265- 1269.
101. **Gillis C., Sharkey N., Stover S.M., Poll R.R., Meagher D. M., Willits N.** 1995 *Ultrasonography as a method to determine tendon cross-sectional area* Am. J. Vet. Res.; 56; 10; pp1270- 1274.
102. **Gillis C.L.** 1997 *Rehabilitation of tendon and ligament injuries* AAEP Proceedings 43, 306-309.
103. **Gimeno F.L., Gatto S., Ferro J., Croxatto J.O., Gallo J.E.** 2006 *Preparation of platelet-rich plasma as a tissue adhesive for experimental transplantation in rabbits.* Thrombosis Journal 4, 18.
104. **Giovannini S., Brehm W., Mainil-Varlet P., Nesic D.** 2007 *Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells.* Differentiation 76, 118-129.
105. **Giusti I.** 2006 *Il gel piastrinico nella terapia adiuvante per la riparazione tissutale: il laboratorio e la clinica* in Atti del Assegno regionale di ricerca, Regione Abruzzo.

106. **Gobbi A.** 2007 *L'impiego delle cellule mesenchimali autologhe e del gel piastrinico per il trattamento delle lesioni cartilaginee.* Comunicazioni dell'Oasi Bioresearch Foundation Gobbi Onlus, Milano, 29-31.
107. **Goodman H.J. Choueka J.** 2005 *Biomechanics of the Flexor Tendons* Hand Clinics. 21,129-149.
108. **Goodship AE, Brown PN, Yeats JJ, Jenkins DH, Silver IA.** 1980 *An assessment of filamentous carbon fibre for the treatment of tendon injury in the horse.* Vet. Rec. 106: 217-221.
109. **Goodship A.E., Birch H.L., Wilson A.M.** 2004 *The pathobiology and repair of tendon and ligament injury.* Vet Clin North Am Equine Pract 10, 323-349.
110. **Hannas** 1995 *Trattamento chirurgico di alcune patologie muscolo-scheletriche dell'arto anteriore* in AUER Chirurgia del cavallo Edagricole Bologna; pp1196-1198.
111. **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.
112. **Henninegr** 1993 *Tendon splitting as a treatment for equine superficial digital flebo tendinitis accompainied by structural lesions: ultrasonographic evaluation* Submitted for publication in J. Am. Vet. Med. ASS.
113. **Henninger** 1994 *Treatment of superficial digital flexor tendonitis* Vet. Clin, of North Am; Eq. Pract. 10 (2): pp 409-424; 1994.
114. **Herrick W.C, Kingsbury and Lou D.Y.S.** 1978 *Study of the normal range of strain, strain rate and stiffnes of tendon* J. Biomed. Mater. Res, 12; p 877-894.
115. **Herthel DJ,** 2001 *Enhanced suspensory ligament healing in 100 horses by stem cell and other bone marrow components* Proc AAEP 47th Ann Mtg; 47; p 319-321; 2001.
116. **Herthel D.J.** 2003 *Clinical use of stem cells and bone marrow components to stimulate suspensory ligament regeneration, Diagnosis and management of lameness in the horse.* Edited by Ross M.W. – Dyson S.J. Saunders, Philadelphia
117. **Hildebrand K., Watanabe N., Fenwick J., Papageorgiou C., Wang J.** 1999 *Tissue engineering of ligament and tendon healing* Clin. Orthop. and pelated reser.; 1 (367S) Supplement; pp312-323; Ottobre.

118. **Hogan** 1995 *Transection of the accessory ligament of the superficial digital flexor tendon for treatment of tendinitis: long term results in 61 Standardbred racehorse (1985-1992)* Eq. Vet. J. 27 (3); pp 221- 226; 1995.
119. **Hopper S.** 2007 *Treatment Options for Hindlimb Proximal Suspensory Desmitis* Compendium Equine, September/October 2007: 266- 272.
120. **Hoynowski S.M., Fry M.M., Gardner B.M., Leming M.T., Tucker J.R., Black L., Sand T., Mitchell K.E.** 2007 *Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells.* Biochemical and Biophysical Research Communications 362, 347-353.
121. **Iacopetti I., Perazzi A., Patruno M., Martinello T., Bronzini I., Busetto R.** 2010 *Utilizzo di concentrato piastrinico autologo (PRP) e cellule staminali mesenchimali autologhe isolate da sangue periferico (ePB-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.
122. **Ishida K., Kuroda R., Miwa M., Tabata Y., Hokugo A., Kawamoto T., Sasaki K., Doita M., Kurosaka M.** 2007 *The regenerative effects of platelet-rich plasma on meniscal cells in vitro and its in vivo application with biodegradable gelatine hydrogel.* Tissue Eng. 13(5), 1103-1107.
123. **Issa J.P.M., Tiozzi R., Mello A.S., Lopes R.A., Di Matteo M.A., Iyomasa M.M.** 2007 *PRP: a possibility in regenerative therapy* Int J. Morphol. 25(3), 587-590.
124. **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.
125. **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.
126. **Kainer R.A.** 1990 *Anatomia funzionale degli organi di locomozione del cavallo* in Stashak T. Adams, "La zoppicatura nei cavalli", Quarta edizione, Edizioni SBM Noceto Parma 1-70.

127. **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.
128. **Kanno T., Takahashi T., Tsujisawa T., Ariyoshi W., Nishihara T.** 2005 *Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation.* J Oral Maxillofac Surg 63, 362-369.
129. **Kannus P.** 2000 *Structure of the tendon connective tissue.* Scand J Med Sci Sport 10, 312-320.
130. **Kapetanios** 1982 *Effect of the local corticosteroides on the healing and biomechanical properties of the partially injured tendon* Clin. Ort. 163; pp170-179.
131. **Kasashima Y.** 2004 *Prevalence of superficial digital flexor tendonitis and suspensory desmitis in Japanese Thoroughbred flat racehorses in 1999* Equine Veterinary Journal 36, 346-350.
132. **Kastelic J., Galeski A., Baer E.** 1978 *Multicomposite structure of tendon.* Connect Tissue Res 6, 11-23.
133. **Ketchum** 1979 *Tendon healing. Fundamental of wound management in surgery* Edited by T.K. Hunt New York. Appleton Century Crofts.
134. **Ker R.F.** 2002 *The implications of the adaptable fatigue quality of tendons for their construction, repair and function* Comparative Biochemistry and Physiology 133, 987-1000.
135. **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.
136. **Kilian O., Flesch I., Wenisch S., Taborski B., Jork A., Schnettler R., Jonuleit T.** 2004 *Effect of platelet growth factors on human mesenchymal stem cells and human endothelial cells in vitro* European Journal of Medical Research 9, 337-344.
137. **Kim H.M., Nelson G., Thomopoulos S., Silva M.J., Das R., Gelberman R.H.** 2010 *Technical and biological modifications for enhanced flexor tendon repair* J Hand Surg Am 35,1031-1037.

138. **Kim J.-H., Park C., Park H.-M.** 2009 *Curative effect of autologous platelet-rich plasma on a large cutaneous lesion in a dog*. The authors. Journal compilation ESVD and ACVD. 20, 123-126.
139. **Kisiday J.D., Kopesky P.W., Evans C.H., Grodzinsky A.J., McIlwraith C.W., Frisbie D.D.** 2008 *Evaluation of adult equine bone marrow- and adipose-derived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures* J Orthop Res. 26, 322–331.
140. **Knox R.L, Hunt A.R., Collins J.C. DeSmet M., Barnes S.** 2006 *Platelet-Rich plasma combined with skin substitute for chronic wound healing: a case report*. JECT 38, 260-264.
141. **Koch TG, Heerkens T, Thomsen PD, Dean HB.** 2007 *Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood*. BMC Biotechnology, 7:26.
142. **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.
143. **Koerner J., Nestic 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.
144. **Korobelnik J.F.** 1966 *Autologous platelet concentrate as an adjunct in macular hole healing* Ophthalmology; 103, 590-594.
145. **Kraus- Hansen , Fackelman G.E., Becker C, Williams R.M. and Pipers F.S.** 1992 *Preliminary studies on the vascular anatomy of the equine superficial digital flexor tendon* Eq. Vet. Journal n° 24; p46-51.
146. **Lacitignola L., Francioso E., Crovace A.** 2008 *Trattamento delle lesioni tendinee e legamentose nel cavallo mediante trapianto autologo di cellule mononucleate di midollo osseo (BMMNCs)* Ippologia 19(3), 35-40.
147. **Landesberg R., Burke A., Pinsky D., Katz R., Vo J. Easing S.B., Lu H.H.** 2005 *Activation of platelet-rich plasma using thrombin receptor agonist peptide*. J Oral Maxillofac Surg 63, 529-535.

148. **Lana R.** 2002 *Handbook of Stem Cells* Vole 2 “Adult and Fatal Stem Cells” Edited by R. Lanza. Elsevier Inc. 2004.
149. **Lee R .H., Kim B., Choi I., Kim H., Choi H. S., Suh K. et al.** 2004 *Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue.* Cell Physiol Biochem; 14: 311-324.
150. **Lindsey j., Edwards, Allen E. Goodship, Birch H.** 2005 *Effect of exercise on age-related changes in collagen fibril diameter distributions in the common digital extensor tendons of young horses* A.J.V.R. 66; 4; p 564-568.
151. **Lucarelli E., Beccheroni A., Donati D., Sangiorgi L., Cenacchi A., Del Vento A.M., Meotti C., Zambon A., Giardino R., Fornasari P.M., Mercuri M., Picci P.** 2003 *Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells.* Biomaterials 24(18), 3095-3100.
152. **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.
153. **Manes E., Manes C., Cantò L., Erasmo R.** 2005 *Le cellule staminali e i fattori di accrescimento in ortopedia e traumatologia.* G.I.O.T. 31, 197-205.
154. **Manske P.R., Gelberman R.H., Vande Berg J.S., et al.** 1984 *Intrinsic flexor tendon repair. A morphological study in vitro* J. Bone Joint Surg. 66; pp385-396.
155. **Manske P.R.** 1988 *Flexor tendon healing* J Hand Surg 1988;13, 237.
156. **Marr C.M., Love S., Boyd J.S. McKellar Q.** 1993 *Factors affecting the clinical outcome of injuries to the superficial digital flexor tendon in National Hunt and point-to-point racehorses* Vet. Rec. 132; pp476-479.
157. **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.
158. **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.
159. **Marx R.E.** 2004 *Platelet-rich plasma: evidence to support its use* J Oral Maxillofac Surg 62, 489-496.
160. **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.
161. **McCullagh K.G., Goodship A.E., Silver I.A.** 1979 *Tendon Injuries and their treatment in the horse*. Vet Rec 105 (3), 54-57.
162. **Mc Ilwraith W.** 1987 *Diseases of joints tendons ligaments and related structure*. in Stashak TS (ed) Adams' "Lameness in horses" ed 4 Philadelphia 1987 pp. 339-485.
163. **Mc Ilwraith** 1990 *Malattie e problemi dei tendini, legamenti e guaine tendinee* in Shtashac Adams "La zoppicatura nei cavalli" Edizione sbm Noceto Parma; pp 447-479.
164. **Mellwraith C.W.** 2002 *Disease and problems of tendons, ligaments and related structures*. 5th ed Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
165. **Meghoufel A., Cloutier G., Crevier-Denoix N., De Guise J.A.** 2010 *Ultrasound B-scan image simulation, segmentation and analysis of the equine tendon* American Association of Physicist in Medicine 37(3), 1038-1045.
166. **Misso S., Feola B., Marotta C., Graziano D., Concilio P., Fratellanza A., Minerva V., Minerva A.** 2001 *Sottopopolazioni leucocitarie in concentrati piastrinici da aferesi e da plasma ricco di piastrine* La trasfusione del sangue 46(4), 258-262.
167. **Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H et al.** 2006 *Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction* Nat Med; 12: 459-465.
168. **Molloy T., Wang Y., Murrell G.** 2003 *Roles of growth factors in tendon and ligament healing*. Sports Med. 33(5), 381-394.

169. **Molloy T.J.** 2005 *Gene Expression in Healing Tendon*. PhD thesis, University of South Wales, Sydney, Australia.
170. **Monash University** *Policy on the care and use of sheep for scientific purposes based on good practice* In proceeding of Workshop, Bayview Conference Centre, Clayton Victoria (Australia) 20-21 April 2005.
171. **Monteiro S.** 2008 *Wound cicatrisation and platelet rich plasma*. In Atti del 14th ESVOT Congress Munich 10th-14th September 2008 258-260.
172. **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.
173. **Murray M.M., Spindler K.P., Devin C., Snyder B.S., Muller J., Takahashi M., Ballard P., Nanney L.B., Zurakowski D.** 2006 *Use of collagen-platelet rich plasma scaffold to stimulate healing of a central defect in the canine ACL*. Journal of Orthopaedic Research 820-830.
174. **Murray M. M., Spindler K.P., Abreu E., Muller J. A., Nedder A., Kelly M., Frino J., Zurakowski D., Valenza M., Synder B. D., Connolly S. A.** 2007 *Collagen-platelet rich plasma hydrogel enhances primary repair of the porcine anterior cruciate ligament*. Journal of Orthopaedic Research 25, 81-91.
175. **Murphy D.J., Nixon A.J.** 1997 *Biochemical and site-specific effects of insuline-like growth factor I on intrinsic tenocyte activity in equine flexor tendons* A.J.V.R.
176. **Musgrave D. S., Fu F. H., Huard J.** 2002 *Terapia genica e ingegneria dei tessuti in chirurgia ortopedica*. J Am Acad Orthop Surg 10, 6-15.
177. **Muttini A., Mattioli M., Petrizzi L., Varavano V., Sciarrini C., Russo V., Mauro A., Coccolone D., Turriani M., Barboni B.** 2009 *Studio sperimentale sull'allotrapianto 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.
178. **Nickel R.** 1991 *Trattato di anatomia degli animali domestici* Casa Editrice Ambrosiana Milano; Vol 1.

179. **Nixon A. J., Haupt J. L., Dahlgren L. A. et al.** 2007 *Adipose-derived nucleated cell fractions improve tendon repair in a collagenase-induced tendonitis model.*
180. **Nixon A. J.** 2008 *Come preparare ed applicare il plasma arricchito di piastrine* in Atti del XIV Congresso SIVE-FEEVA, Venice (Italy) 332-339
181. **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.
182. **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.
183. **Nyland T.G., Mattoon J.S.** 1995 *Veterinary diagnostic ultrasound* W.B. Saunders Company Philadelphia.
184. **Oakes B.W.** 1989 *Connective tissue adaptation to loading and unloading* in Proceeding of the Pan Pacific Connective tissue Symposium Cairns, Novembre.
185. **Obaid H., Connell D.** 2010 *Cell therapy in tendon disorders: what is the current evidence?* Am J Sports Med.
186. **Ohya M., Yamada Y., Ozawa R., Ito K., Takahashi M., Ueda M.** 2005 *Sinus floor elevation applied tissue-engineered bone. Comaparative study between mesenchymal stem cells/platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with PRP complexes in rabbits.* Clin. Oral Impl 16, 622-629.
187. **Parry D. A., Barnes G.R.G., Craig A.S.** 1978 *Comparison of the size and distribution of collagen fibrils in connettive tissue as a function of age and a possible relation between fibril size and mechanical properties* Proc. R. Soc. Lond. Biol. 203; pp 305- 321.
188. **Patterson-Kane JC, Firth EC, Parry DA, Wilson AM, Goodship AE.** 1996 *Comparison of collagen fibril population in the superficial digital flexor tendon of exercised non-exercised thoroughbreds.* Eq. Vet. J.
189. **Patterson-Kane JC, Parry DA, Goodship AE, Firth EC.** 1997 *Exercise modified the age related change in crimp pattern in the core region of the equine superficial digital flexor tendon.* New Zeland Vet. J. 45: 135-139.

190. **Patterson-Kane JC, Firth EC, Parry DA, Wilson AM, Goodship AE.** 1998 *Effect of training on collagen fibril population in the suspensory ligament and deep digital flexor tendon in young thoroughbreds.* Am. Vet. Res. 59 (1): 64-68.
191. **Patterson-Kane J.C., Firth E.C.** 2009 *The pathobiology of exercise-induced superficial digital flexor tendon injury in Thoroughbred racehorses* The Veterinary Journal 181, 79-89.
192. **Peacock** 1959 *A study of circulation in normal tendons and healing grafts* Ann. Surg.; 149; pp415-428; 1959.
193. **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.
194. **Plachokova A. S., Van der Dolder J., Stoelinga P. J., Jansen J. A.** 2007 *Early effect of platelet-rich plasma on bone healing in combination with an osteoconductive material in rat cranial defects.* Clin Oral Implants Res 18(2), 244-251.
195. **Prades M.** 2007 *Current trends in OA therapy in horses* in Atti del SECV Proceedings.
196. **Prades M.** 2007 *Current trends in regenerative medicine for soft tissue musculo-skeletal injury* in Atti del SECV Proceedings.
197. **Prades M.** 2007 *Platelet rich plasma: a realistic alternative in tissue repair* in Atti del SECV Proceedings.
198. **Ramirez J.U.C.** 2006 *Use of autologous platelet concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse.* Tesi PHD University of Barcelona.
199. **Rebelatto C. K., Aguiar A. M., Moret M. P., Senegaglia A. C., Hansen P., Barchiki F. et al.** 2008 *Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue.* Exp Biol Med; 233: 901-913.
200. **Reef V.** 1998 *Musculoskeletal Ultrasonography* in Equine diagnostic ultrasound Ed WB Saunders Philadelphia 39- 186.

201. **Riemersma D. J., Schamhardt H. C.** 1985 *In vitro mechanical properties of equine tendons in relation to cross sectional area and collagen content.* Res. Vet. Sci. 39: 263-270.
202. **Riemersma D.J., Schamhardt H.C., Hartman W** 1988 *Kinetics and kinematics of the equine hind limb: in vivo tendon loads and force plate measurements in ponies* Am. J. Vet. Res; 49, 8; pp 1344-1352.
203. **Reiser K. M.** 1994 *Influence of age and long term dietary restriction on enzymatically mediated cross-link and non-enzymatic glycation of collagen in mice.* J. Geront. 49: 7-79.
204. **Reyes L. M., Gonzales G. M., Habib F. E., Gomez J. G., Villalay L. M., Sotelo L. C., De la Sancha Mondragon L. M.** 2004 *Utilizaciòn de plasma rico en plaquetas para regeneraciòn periodontal en un perro.* Revista Odontològica Mexicana 3(8), 64-69.
205. **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.
206. **Rigby C.** 1977 *The mechanical properties of the rat tail tendon* J. Gen. Physiol. 423; p 265.
207. **Rosati P., Colombo R.** 1997 *I tessuti* Ermes edizioni, Milano.
208. **Rosenbrock A. ,Jaugstetter H** 2004 *Autologous bone marrow transplantation to stimulate suspensory ligament regeneration in 24 horses-A clinical case control study* 12th ESVOT Congress, Munich; pp264-265.
209. **Rožman P., Bolta Z.** 2007 *Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries.* Acta Dermatoven APA 16(4), 156-165.
210. **Saldalamacchia G., Lapice E., Cuomo V., De Feo M. E., D'Agostino E., Rivellesse A. A., Riccardi G., Vaccaro O.** 2004 *Uso del gel di piastrine autologo per la cura delle ulcere del piede diabetico.* GIDM 24, 103-105.
211. **Sampson S., Gerhardt M., Mandelbaum B.** 2008 *Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review.* Curr Rev Musculoskeletal Med 3, 124-129.

212. **Sanchez M., Azofra J., Anitua E., Andia I., Padilla S., Santisteban J., Mujika I.** 2003 *Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report.* Med Sci Sports Exerc 35(10), 1648-1652.
213. **Sanchez A. R., Sheridan P. J., Kupp L. I.** 2003 *Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review.* Int J Oral Maxillofac Implants 18(1), 93-103.
214. **Sanchez M., Anitua E., Azofra J., Andia I., Padilla S., Mujika I.** 2007 *Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices.* Am J Sports Med 35(2), 245-251.
215. **Sanmartino G., Tia M., Marenzi G., Espedito di Lauro A., D'Agostino E., Claudio P.** 2005 *Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars.* J Oral Maxillofac Surg 63, 766-770.
216. **Sardari K., Emami M. R., Rasemi H., Movasagi A. R., Goli A. A., Lotfi A., Malekzadeh S.** 2010 *Effect of platelet-rich plasma (PRP) on cutaneous regeneration and wound healing in dogs treated with dexamethasone.* Comp Clin Pathol Published online 03 March 2010.
217. **Schmidmaier G., Herrmann S., Green J., Weber T., Scharfenberger A., Haas N.P., Wildemann B.** 2006 *Quantitative assessment of growth factors in reaming aspirate, iliac crest and platelet preparation.* Bone 39(5), 1156-1163.
218. **Schnabel V. I., Mohamed O. H., Miller J. B., Medermott G. W., Jacobson S. M., Santangelo S. K.** 2007 *Platelet rich plasma (PRP) enhanced anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons* J Orthop Res 25, 230-240.
219. **Scioli M.** 2006 *Treatment of recalcitrant enthesopathy of the hip with platelet rich plasma- a report of three cases.* Publication of the Clinical Orthopaedic Society Spring 2006 Edition.
220. **Seggewiss R., Dunbar C., E. Orlic D.** 2004 *Hematopoietic stem cells mobilization and homing* in Handbook of stem cells Vol.2.
221. **Serra C.I., Soler C., Sopena J.J., Cugat R., Redonko J.I., Rubio M., Carrillo J.M.,** 2008 *Plasma rich in growth factors (PRGF) as the treatment in*

- chondral lesions. An histological and biomechanical study.* In Atti del 14th ESVOT Congress Munich 10th-14th September 2008 314-315.
222. **Sese M.** 2007 *Characteristic of Collagene fibrils in the entire equines superficial digital flexor tendon* Okajimas Folia Anatomica Japonica 84,111-114
223. **Sharma P., Maffulli N.** 2006 *Biology of tendon injury: healing, modelling and remodelling* J musculoskeletal Neuronal Interact 6,181-190.
224. **Slater M., Patava J., Kingham K., Mason R.S.** 1995 *Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity.* J Orthop Res 13(5), 655-663.
225. **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.
226. **Smith R.K.W., Jones R., Webbon P.M.** 1994 *Cross-sectional areas of normal equine digital flexor tendons determined ultrasonographically* Eq. Vet. J.; 26; 6; pp 460-465.
227. **Smith R.K.W, Webbon P.M.** 1996 *Physiology of normal tendon and ligament in the equine athlete: tendon, ligament and soft tissue injuries.* Proceedings Dubai International Equine Symposium , 55-82.
228. **Smith R. K. W., Zunino L., Webbon P. M., Heinegard D.** 1997 *Distribution of Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) in Tendon and Its Variation with Tendon Site, Age and Load* Matrix Biology 16,255-271.
229. **Smith R, Schramme M.** 2003 *Tendon injury in the horse: current theories and therapies.* in Practice, n°25; p 529-539.
230. **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.
231. **Smith R. K. W., Korea M., Blunt 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* Eq. Vet. Journal 35; 1; pp 99-102.
232. **Smith R.K.W.** 2004 *Stem cell therapy for tendon and ligament injuries- Clinical results* In Proceedings 12 ESVOT Congress, Munich, 187-189.

233. **Smith J.J., Ross M.W., Smith R.K.** 2006 *Anabolic effects of cellular bone marrow, platelet rich plasma and serum on equine suspensory ligament fibroblasts in vitro.* Vet Comp Orthop Traumatol 19(1), 43-47.
234. **Smith R.K.W.** 2008 *Mesenchymal stem cell for equine tendinopathy* Disability and Rehabilitation 30, 1752-1758.
235. **Smith R.K.W.** 2008 *Tendon and Ligament Injury* in Proceedings of the Annual Convention of the AAEP. San Diego, CA, USA, 475-501.
236. **Sordi V.** 2009 *Mesenchymal stem cell hominig capacity* Transplantation; 87: S42-45.
237. **Spinabella S., Carlucci F.** 2004 *La tenite del cavallo: recenti acquisizioni, prospettive future.* Annali della Facoltà di Medicina veterinaria, Università di Pisa: 163-170.
238. **Spinabella S.** 2007 *Impiego delle cellule staminali nelle lesioni teno-legamentose del cavallo.* Tesi di dottorato di ricerca, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Pisa.
239. **Stashak T.** 1990 *Diagnosi di zoppicatura* In Stashak T. Adams', *La zoppicatura nei cavalli.* Quarta edizione. Edizioni SBM, 100-156.
240. **Strocchi R., De Pasquale V., Guizzardi S., Govoni P., Facchini A., Raspanti M., Girolami M., Giannini S.** 1991 *Human Achilles tendon: morphological and morph metric variations as a function of age.* Foot Ankle 2, 100-104.
241. **Stromberg B.** 1969 *Lesion of the superficial digital flexor tendon in racehorse: a microangiographic and histopathologic study.* Clin. Orthop. 62: 113-123.
242. **Stromberg B.** 1997 *Normal and diseased superficial digital flexor tendon in racehorse: a morphologic and physiologic investigation.* Acta Radiol. 305 (suppl.) 1-94.
243. **Sutter W. W., Kaneps A. J., Bert one 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.
244. **Sutter W.** 2008 *Platelet-rich plasma: an aid to soft tissue healing* Newswire of Edmonton Equine Veterinary Service.

245. **Suzuki T, Kobayashi K, Tada Y, Suzuki Y, Wada I, Nakamura T et al.** 2008 *Regeneration of the trachea using a bioengineered scaffold with adipose-derived stem cells*. *Ann Tool Rhino Laryngeal* 117: 453-463.
246. **Tablin F.** 2000 *Platelet structure and function*. In: Feldman BF, Zink JG, Jain NC. *Schulman's veterinary haematology*. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins; p 448-452.
247. **Tagliapietra S.** 2006 *Trattamento con midollo osseo delle lesioni tendinose del cavallo: esperienze cliniche*; tesi di laurea.
248. **Taylor S. D., Honnas C. M., Pasce J. R., Hoffman A. G.** 1997 *Il trattamento delle lacerazioni dei tendini flessori nel cavallo* *Ippologia* 3, 61-67.
249. **Taylor S.E., Smith R.K.W., Clegg P.D.** 2007 *Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction?* *Equine Veterinary Journal* 39(2), 172-180.
250. **Tischler M.** 2002 *Platelet rich plasma. The use of autologous growth factors to enhance bone and soft tissue grafts*. *N Y State Dent J* 68(3), 22-24.
251. **Tomohiro H., Masahito S., Yuki H., Hideki K., Satoshi T., Takashi O., Yumiko S.** 2004 *Investigation into centrifugal separation for preparation of platelet rich plasma (PRP)*. *Ohu University Dental Journal* 31(4), 243-247.
252. **Tözüm T. F., Demiralp B.** 2003 *Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry*. *Journal of the Canadian Dental Association* 69(10), 664.
253. **Trindade-Suedam I. K., Leite F. R. M., de Moraes J. A., Leite E., Marcantonio E. J., Leite A.** 2007 *Avoiding leukocyte contamination and early platelet activation in platelet-rich plasma*. *J Oral Implantol* 33(6), 334-339.
254. **Valdez H., Clark R. G., Hanselka D. V.** 1980 *Repair of digital flexor tendon lacerations in the horse using carbon fiber implants* *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; 177; p 427; 1980.
255. **Ventura A., Terzaghi C., Borgo E., Verdoia C., Gallazzi M., Failoni S.** 2005 *Use of growth factors in ACL surgery: preliminary study*. *J Orthopaed Traumatol* 6, 76-79.
256. **Vidal M. A., Kilroy G. E., Lopez M. J., Johnson J. R., Moore R. M., Gimble J. M.** 2007 *Characterization of equine adipose tissue-derived stromal*

- cells: adipogenic and osteogenic capacity and compararison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. Veterinary Surgery 36, 613-622.*
257. **Vidal M. A., Robinson S. O., Lopez M. J., Paulsen D. B., Borkhsenious O., Johnson J. R., Moore R. M., Gimble J. M.** 2008 *Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow Veterinary Surgery 37, 713-724.*
258. **Virchenko O., Grenegard M., Aspenberg P.** 2006 *Independent and additive stimulation of tendon repair by thrombin and platelets. Acta Orthopaedica 77(6), 960-966.*
259. **Virchenko O., Fahlgren A., Rundgren M., Aspenberg P.** 2008 *Early Achilles tendon healing in sheep Arch Orthop Trauma Surg 128, 1001-1006.*
260. **Vitale A., Manciocco A., Alleva E.** 2009 *The 3R principle and the use of non-human primates in the study of neurodegenerative diseases: the case of Parkinson's disease. Neurosci Biobehav Rev 33(1), 33-47.*
261. **Vogel and Koob** 1989 *Structural specialisation in tendon under compression Int. Rev. Cytol. 115; pp 267- 293; 1989.*
262. **Von der Mark K.** 1981 *Localization of collagen types in tissue Int Rev Connect Tissue Res 9, 265-324.*
263. **Wang J.H.C.** 2006 *Mechanobiology of tendon Journal of Biomechanics 39,1563-1582.*
264. **Waselau M., Sutter W. W., Genovese R. L., Bertone A.** 2008 *Intralesional injection of platelet-rich plasma followed by controlled exercise for treatment of midbody suspensory ligament desmitis in Standardbred racehorses JAVMA 232(10) 1515-1520.*
265. **Watkins J.P., Auer J.A., Gay S., Morgan S.J.** 1985 *Healing of surgically created defects in the equine superficial digital flexor tendon: collagen-type transformation and tissue morphologic reorganization Am J Vet Res 46, 209-211.*
266. **Watkins J. P.** 1995 *Principi di terapia delle malattie dei tendini in A. Auer "Chirurgia del cavallo" Edizione Edagricole- Ed.Agricole della Calderini s.r.l; pp 1085-1092.*

267. **Webbon P. M.** 1977 *A post mortem study of equine digital flexor tendons* Eq. Vet. J. 9, pp61-67; 1977.
268. **Webbon P.M.** 1978 *A histological study of macroscopically normal equine digital flexor tendons* Equine Vet J 10, 253–259.
269. **Weibrich G., Kleis W. K., Kunz-Kostomanolakis M., Loos A. H., Wagner W.** 2001 *Correlation of platelet concentration in platelet-rich plasma to the extraction method, age, sex, and platelet count of the donor.* Int J Oral Maxillofac Implants 16(5), 693-699.
270. **Weibrich G., Kleis W.K.** 2002 *Curosan PRP kit versus PCCS PRP system. Collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of platelet-rich plasma.* Clin Oral Implant Res 13(4), 437-443.
271. **Weibrich G., Kleis W. K., Hafner G.** 2002 *Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: Curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system.* Int J Oral Maxillofac Implants 17(2), 184-190.
272. **Weibrich G., Kleis W. K., Buch R., Hitzler W. E., Hafner G.** 2003 *The Harvest Smart PRePTM system versus the Friadent-Schütze platelet-rich plasma kit.* Clin Oral Implants Res 14(2), 233-239.
273. **Weiner L.J., Peacock E.E. Jr.** 1971 *Biologic principles affecting repair of flexor tendons* Adv Surg. 5, 145-88.
274. **Wilke M.M., Nydam D.V., Nixon A.J.** 2007 *Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model.* Journal of Orthopaedic Research 7, 913-925.
275. **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* Res. Vet. Sci; 53; p 354- 359.
276. **Whitman DH, Berry RL, Green DM.** 1997 *Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with Woo S., applications in oral and maxillofacial surgery.* J Oral Maxillofac Surg; n°55; p 1294-1299.
277. **Wilson LM.** 1991 *The effect of exercise intensity on biochemistry morphology and mechanical properties of tendon. (PhD thesis)* Bristol England, University of Bristol.

278. **Wilson A.M.** 2004 *Mechanical factors in musculoskeletal injury*. Havemeyer Foundation Monograph Series, Proceedings of a workshop on sporting injuries in horses and man: a comparative approach. 23-25th September, Lexington USA, 29-30.
279. **Woodell-May J. E., Pietzrak W. S.** 2006 *Platelet-rich plasma in orthopedics* Orthopedic Biology and Medicine 547-558.
280. **Wrotniak M., Bielecki T., Gazdik T. S.** 2007 *Current opinion about using the platelet-rich gel in orthopaedics and trauma surgery*. Orthop Traumatol Rehabil 9(3), 227-238.
281. **Yamamoto N, Akamatsu H, Hasegawa S, Yamada T, Nakata S, Ohkuma M et al.** 2007 *Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue*. J Dermatol Sci: 48: 43-52.
282. **Yamasaki H., Goto M., Yoshihara T., Sekiguchi M., Konno K., Momo Y., Iwasaki T.** 2001 *Exercise-Induced superficial digital flexor tendon hyperthermia and the effect of cooling sheets on thoroughbreds* J. Equine Sci. 12; 4; p 85- 91.
283. **Young R. G., Butler D. L., Weber W, Caplan A. I., Gordon S.L. and Fink D.J.** 1998 *Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair*. J. Orthop. Res. 16: 406-413.
284. **Zachos T. A., Bertone A. L.** 2005 *Growth factors and their potential therapeutic applications for healing of musculoskeletal and other connective tissues* AJVR 66(4), 727-738.
285. **Zamprognio H., Lopez P. C. M., Oliveira A. L. A., Balduino A., Fernandes M. B., Duarte M. E. L.** 2008 *Use of bone marrow stromal cells to treat bone defects in dogs*. In Atti del 14th ESVOT Congress Munich 10th-14th September 2008 328.
286. **Zavadil D. P., Satterlee C. C., Costigan J. M., Holt D. W., Shostrom V. K.** 2007 *Autologous platelet gel and platelet-poor plasma reduce pain with total shoulder arthroplasty*. J Extra Corpor Technol 39(3), 177-182.
287. **Zimmermann R., Reske S., Metzler P., Schlegel A., Ringwald J., Eckstein R.** 2008 *Preparation of highly concentrated and white cell-poor platelet-rich plasma by plateletpheresis* Vox Sanguinis 95, 20-25.

288. **Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D. A., Huang J. I., Mizuno H. et al.** 2002 *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. *Molecular Biology of the Cell*; 13: 4279-4295.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI TRATTI DA INTERNET

289. **Fortier L.A.** 2008 *Platelet Rich Plasma (PRP): background and significance in musculoskeletal regeneration* , <http://www.michvma.org/documents/MVC>.
290. **Prades M., Abellanet I., Carmona J. U.** 2008 *Platelet rich plasma: a realistic alternative in tissue repair* , **URL:** <http://minnie.uab.es/~veteri>.
291. **URL:** <http://www.cavallimania.com/Morfologia.html>.
292. **URL:** http://www.poolhousevets.co.uk/equine_tendon.html.
293. **URL:** <http://www.xenome.eu>.
294. **URL:** <http://ajpregu.physiology.org/content/286/5/R952.full>.

Ringrazio affettuosamente la Prof.ssa Jacopetti e la Dott.ssa Anna Perazzi, il Dott. Patruino, la Dott.ssa Martinello e la Dott.ssa Bronzini per il loro prezioso contributo e la loro gentilezza, la dott.ssa De Benedictis, la Dott.ssa Meneghini, la Prof.ssa Testoni ed la Dott.ssa Dalla Pria.

Un grazie a Mamma e Cate per l'Amore e la pazienza che mi hanno dimostrato, soprattutto negli ultimi anni.

Grazie ad Agnese e Antonio per la calorosa amicizia che mi hanno dimostrato e la loro ospitalità.

Grazie a Patrizia, Anna, Nicola e Iolanda, alla mia famiglia, a Marco, Alessandra, Paola, Paolo, Chiara e Shalom che hanno sempre creduto in me e che occuperanno sempre un posto speciale nel mio cuore.

Un grazie particolare ai miei Amici animali (Sisco, Spillo, Dharma, Argiulina, Vinicio,...) senza i quali tutto questo non si sarebbe realizzato.