

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

Sede Amministrativa: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento: SCIENZE CLINICHE VETERINARIE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : SCIENZE VETERINARIE

INDIRIZZO: SCIENZE CLINICHE VETERINARIE

CICLO: XXIII

***Utilizzo di
concentrato piastrinico (PRP) autologo
per il trattamento di lesioni tenodesmiche:
esperienze cliniche e sperimentali***

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Massimo Morgante

Coordinatore d'Indirizzo: Ch.mo Prof. Maurizio Isola

Supervisore :Ch.ma Prof. ssa Ilaria Iacopetti

Dottorando : Dr.ssa Anna Perazzi

Ad Flavia

Indice

<u>Abbreviazioni</u>	1
<u>Riassunto</u>	3
<u>Summary</u>	7
<u>Scopo della tesi</u>	11

PRIMA PARTE

Introduzione generale

<u>Cap. 1 PRP: concentrato piastrinico</u>	17
1.1 le piastrine	17
1.1.1 introduzione	17
1.1.2 genesi, anatomia e fisiologia delle piastrine	18
- genesi	18
- anatomia e fisiologia	20
✧ membrana piastrinica	20
✧ citoplasma delle piastrine	22
✧ granuli piastrinici e fattori di crescita	23
1.1.3 risposta piastrinica	29
✧ adesione ed attivazione piastrinica	29
✧ cambiamento di forma delle piastrine	30
✧ secrezione dei granuli	31
✧ trasduzione del segnale	31
✧ aggregazione piastrinica	32
1.2 il concentrato piastrinico	32
1.2.1 definizione	32
1.2.2 caratteristiche e meccanismo d'azione	33
1.2.3 il ruolo del PRP nel meccanismo di guarigione delle ferite	36
✧ il ruolo nella guarigione del tessuto tenodesmico	37
✧ il ruolo nella guarigione del tessuto osteocartilagineo	38
✧ il ruolo nella guarigione dei tessuti molli	38
1.2.4 metodiche di preparazione	39
✧ produzione di gel piastrinico	44

1.3 utilizzo terapeutico del PRP	45
1.3.1 introduzione	45
1.3.2 campi di applicazione in medicina umana	46
1.3.3 utilizzo del PRP in medicina equina	54
✧ utilizzo nel trattamento di ferite cutanee	54
✧ utilizzo nel trattamento di patologie osteoarticolare	55
✧ utilizzo nel trattamento di patologie tenodesmiche	56
1.3.4 utilizzo del PRP in associazione a cellule staminali mesenchimali	58
1.4 l'importanza terapeutica del PRP, le controindicazioni ed i rischi legati al suo utilizzo	64
<u>Cap. 2 Il processo di guarigione tissutale</u>	67
2.1 le fasi del processo di guarigione	67
2.2 cenni di anatomia funzionale delle strutture tenodesmiche	71
2.2.1 introduzione	71
2.2.2 anatomia dei tendini flessori del dito e del legamento sospensore del nodello	73
✧ anatomia macroscopica	73
✧ anatomia microscopica	78
2.3 eziopatogenesi delle lesioni tenodesmiche	85
2.4 fisiopatologia del processo di guarigione nel tessuto tenodesmico	93
2.5 strategie terapeutiche per le patologie tenodesmiche	104

SECONDA PARTE

Applicazioni cliniche di concentrato piastrinico
per la guarigione del tessuto tenodesmico

<u>Cap. 3 Applicazioni cliniche di concentrato piastrinico e cellule staminali per il trattamento di lesioni tenodesmiche nel cavallo</u>	113
--	------------

3.1 utilizzo di concentrato piastrinico per il trattamento di lesioni tenodesmiche nel cavallo: esperienza clinica	113
3.1.1 obiettivo dello studio clinico	113
3.1.2 materiali e metodi	114
✧ criteri di selezione dei soggetti	114
✧ visita clinica e valutazione della lesione	115
✧ metodica di preparazione del concentrato piastrinico	119
✧ applicazione del concentrato piastrinico	119
✧ follow up clinico ed ecografico	120
3.1.3 risultati	121
3.1.4 discussione	124
3.2 utilizzo combinato di concentrato piastrinico e cellule staminali per il trattamento di lesioni tenodesmiche nel cavallo: esperienza clinica	127
3.2.1 obiettivo dello studio clinico	127
3.2.2 materiali e metodi	127
✧ criteri di selezione dei soggetti	127
✧ visita clinica e valutazione della lesione	129
✧ metodica di estrazione, caratterizzazione e coltura delle cellule staminali	130
✧ metodica di preparazione del concentrato piastrinico	131
✧ applicazione del concentrato piastrinico in associazione alle cellule staminali	132
✧ follow up clinico ed ecografico	132
3.2.3 risultati	133
3.2.4 discussione	136

TERZA PARTE

Applicazioni sperimentali di concentrato piastrinico
per la guarigione del tessuto tenodesmico

<i>Cap. 4 Valutazioni cliniche, ecografiche ed istologiche dell'efficacia terapeutica di concentrato piastrinico (PRP) e cellule staminali mesenchimali adulte (MSCs) nel trattamento di lesioni tendinee sperimentamente indotte nella pecora</i>	145
---	------------

4.1 introduzione ed obiettivi della ricerca	145
4.1.1 la gestione della pecora come animale sperimentale in linea con il principio delle "3R"	145
4.1.2 obiettivo dello studio	148
4.2 materiali e metodi	150
4.2.1 criteri di selezione dei soggetti	150
4.2.2 metodica di estrazione, caratterizzazione e coltura delle cellule staminali	151
4.2.3 induzione della lesione sperimentale	152
4.2.4 procedura di applicazione di PRP e MSCs	154
4.2.5 follow up clinico ed ecografico	155
4.2.6 prelievo post-mortem del tessuto tendineo	156
4.2.7 esame istologico ed immunohistochimico del tessuto tendineo	157
4.3 risultati	160
4.3.1 preparazione del PRP e delle MSCs	160
4.3.2 valutazione clinica ed ecografica	160
4.3.3 valutazione istologica ed immunohistochimica	164
4.4 discussione	171
<u>Discussione e considerazioni personali</u>	177
<u>Glossario</u>	181
<u>Bibliografia</u>	187

Abbreviazioni

CSA	CROSS SECTIONAL AREA
DSL	DESMITE DEL LEGAMENTO SOSPENSORE DEL NODELLO
EGF	EPIDERMAL GROWTH FACTOR
ECM	MATRICE EXTRACELLULARE
FANS	FARMACI ANTINFIAMMATORI NON STEROIDEI
FGF	FIBROBLAST GROWTH FACTOR
GAGs	GLICOSAMINOGLICANI
GFs	FATTORI DI CRESCITA
HGF	HEPATOCTE GROWTH FACTOR
IGF	INSULIN LIKE GROWTH FACTOR
LS	LEGAMENTO SOSPENSORE
MMPs	METALLOPROTEINASI
MCSs	MESENCHIMAL STEM CELLS
PAF	FATTORE DI ATTIVAZIONE PIASTRINICO
PDGF	PLATELET DERIVED GROWTH FACTOR
PLT	PIASTRINE
PRP	PLATELET RICH PLASMA
RBC	GLOBULI ROSSI
TFS	TENDINE FLESSORE SUPERFICIALE
TFP	TENDINE FLESSORE PROFONDO

TGFβ	TRANSFORMING GROWTH FACTOR β
WBC	GLOBULI BIANCHI
VEGF	VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR

Riassunto

In medicina umana e veterinaria le patologie teno-desmiche rivestono grande interesse per l'elevata incidenza con cui si verificano, per la difficoltà di ottenere una guarigione completa con un pieno recupero funzionale delle strutture coinvolte e perché comportano lunghi periodi di inattività. I protocolli terapeutici attualmente utilizzati nel trattamento di queste patologie sono lontani dalla potenzialità di una reale "restitutio ad integrum".

Nel cavallo utilizzato per fini sportivi le lesioni dei tendini e dei legamenti rappresentano la principale causa di zoppia e comportano lunghi periodi di riposo; spesso il processo di guarigione non porta ad un completo recupero delle caratteristiche funzionali e morfologiche di queste strutture, soprattutto se l'entità della lesione è grave. Per tale ragione vi è una continua ricerca di terapie in grado di migliorare la rigenerazione corretta del tessuto danneggiato, stimolando la risposta fisiologica a livello molecolare e cellulare con l'obiettivo di ottimizzare la qualità della risposta riparativa.

Il fine delle attuali ricerche è quello di ottenere un recupero totale delle prestazioni atletiche degli animali riducendo al minimo il rischio di recidive. Negli ultimi anni grande attenzione è stata posta nel valutare la possibilità di utilizzare il concentrato piastrinico (PRP) come trattamento per le lesioni muscolo-scheletriche del cavallo: il PRP infatti contiene un'alta concentrazione di piastrine, che, nella loro forma attiva, sono in grado di secernere una grande quantità di fattori di crescita. Già da alcuni decenni infatti è stato dimostrato che i fattori di crescita sono in grado di migliorare la risposta di guarigione dei tessuti.

In questa tesi verranno illustrati due studi clinici ed uno sperimentale realizzati presso il Dipartimento di Scienze Cliniche dell'Università di Padova in collaborazione con il laboratorio di Anatomia del Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie, l'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia

Romagna di Brescia, la Clinica dell'Ippodromo di Merano e veterinari liberi professionisti.

Scopo del primo studio è stato di valutare l'efficacia clinica dell'iniezione intralesionale ecoguidata di PRP autologo per il trattamento di lesioni tenodesmiche in 9 cavalli. In tutti i cavalli trattati non sono stati registrati effetti collaterali, né locali né sistemici dopo l'iniezione di PRP. Nei diversi soggetti le valutazioni cliniche ed ecografiche eseguite ad intervalli regolari hanno confermato la progressione favorevole del processo di guarigione del tessuto con un corretto ri-allineamento delle fibre neoformate. In nessun caso è stata rilevata la formazione di tessuto cicatriziale o di aderenze tra il tendine danneggiato ed i tessuti adiacenti. Al termine del periodo di riabilitazione (9-12 mesi) 7 dei 9 cavalli trattati (77.7%) sono tornati alle competizioni, con prestazioni atletiche paragonabili a quelle raggiunte prima del verificarsi del danno tissutale.

Il secondo studio clinico si è posto invece l'obiettivo di valutare se un utilizzo combinato di PRP e di cellule staminali mesenchimali autologhe potesse determinare un miglior effetto sinergico sul meccanismo dei guarigione tissutale. L'utilizzo delle cellule staminali come strumento per la riparazione tissutale costituisce un'importante prospettiva di ricerca in clinica veterinaria. Sempre con maggior interesse ci si avvicina alle prospettive terapeutiche basate sulla capacità rigenerativa e riparativa di organi e tessuti che le cellule staminali offrono, come la capacità di auto-replicazione e di proliferazione illimitata. La capacità differenziativa di tali cellule ha reso soprattutto nell'ultimo decennio le MSCs una componente potenzialmente promettente nel campo dell'ingegneria tissutale. Recentemente diversi studi hanno proposto l'utilizzo di concentrato piastrinico, sia nella sua forma liquida che in quella gelatinosa, come matrice per l'applicazione di cellule staminali, con l'obiettivo che le piastrine debitamente attivate potessero liberare i diversi fattori di crescita necessari per la differenziazione delle cellule multipotenti. 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. L'associazione delle cellule mesenchimali con i

fattori di crescita piastrinici permette di accelerare l'impianto e la crescita in vivo delle cellule impiantate. Il nostro studio è stato effettuato in un gruppo di 17 cavalli purosangue inglesi affetti da lesioni teno-desmiche. Anche in questo secondo gruppo di cavalli, il protocollo terapeutico scelto non ha evidenziato effetti collaterali locali né sistemici. Il follow up rilevato, in termini di valutazione clinica ed ecografica, ha evidenziato un soddisfacente miglioramento dei soggetti. Non sono state osservati fenomeni cicatriziali né aderenze a livello del tessuto neoformato ed al termine della fase di riabilitazione 13 dei 17 cavalli trattati (76.5%) sono tornati all'attività sportiva con buoni risultati e senza manifestare recidive. I risultati ottenuti durante questi due studi clinici vanno a sostenere l'utilizzo a scopo terapeutico del PRP nel trattamento di lesioni tenodesmiche: infatti PRP non ha causato effetti collaterali locali o sistemici o la comparsa di segni di rigetto, inoltre può essere ottenuto in breve tempo e quindi utilizzato sul paziente in anestesia locale. Inoltre, il PRP ha dimostrato di essere una terapia promettente, in quanto migliora la rigenerazione dei tessuti, favorendo la formazione di tessuto sano e funzionale, invece di tessuto cicatriziale. L'utilizzo combinato di PRP e MSC, sulla base delle valutazioni cliniche, ecografiche e dei risultati ottenuti a breve e a lungo termine risulta essere molto promettente nel trattamento delle lesioni tenodesmiche del purosangue inglese. Comparando i risultati ottenuti nei due studi clinici, possiamo osservare un effettivo apporto benefico del PRP sia da solo che in associazione alle MSCs sia in termini di miglioramento clinico dei soggetti sia in termini di riduzione dei casi di recidiva rispetto ai trattamenti convenzionali. Rimane di fondamentale importanza il protocollo riabilitativo dei cavalli, che deve tener conto dei lunghi tempi di recupero associati alla guarigione del tessuto: i trattamenti studiati nel nostro lavoro, sembrano apportare effettivamente un'ottimale stimolo per la guarigione tissutale per quanto riguarda le caratteristiche del tessuto neoformato ma non consente di accorciare i tempi di recupero dei soggetti trattati.

Un importante aspetto di questo progetto è stato infine quello di verificare, in vivo ed in animali sperimentali, l'efficacia da un punto di vista clinico, ecografico ed istologico, dell'applicazione di PRP da solo o in associazione a MSCs

autologhe. Questo protocollo è stato utilizzato nel trattamento di lesioni tendinee sperimentalmente indotte nella pecora: uno degli obiettivi che ci siamo posti è di cercare di comprendere maggiormente la reale efficacia di questi trattamenti attraverso approfondimenti istologici ed immunoistochimici dei tessuti trattati. L'esito positivo di tale ricerca, confermato dai rilievi clinici, ecografici ed istologici ha permesso di ottenere maggiori informazioni sull'andamento del processo di guarigione di lesioni trattate con PRP e con PRP e MSCs nel breve periodo.

Tale studio potrà quindi gettare le basi per aumentare la casistica e la numerosità sperimentale nell'applicazione di nuove terapie, volte a migliorare sia il tipo che le caratteristiche della guarigione, che sembrano riscuotere, secondo quanto riportato in letteratura, risultati sempre più promettenti.

Summary

In veterinary as well as human medicine the tenodesmic lesions play a great interest because of their high incidence, the difficult wound healing and therefore an incomplete full functional recover with long periods of inactivity. The therapeutical protocols recently used in the treatment of these lesions are not able to reach a real “restitutio ad integrum”.

In sport horses, tendon and ligament injuries are a frequent cause of lameness and entail long periods of rest. Often the healing process does not achieve a complete recovery of the functional and morphologic characteristics of these structures, especially if the entity of the lesion is severe. In equine medicine, there is a continuous research of therapies that enhance a correct regeneration of the injured tissue, stimulating the physiological response on a molecular and cellular level, with the aim of improving the quality of the healing response.

The ultimate aim of current research is to obtain a total recovery of the animal's athletic performance, meanwhile reducing the risk of relapses. During recent years great attention has been focused on verifying the possibility of using Platelet Rich Plasma (PRP) as a treatment for musculoskeletal lesions in the horse: platelet rich plasma contains a high concentration of platelets, which, once activated, are able to secrete a great quantity of growth factors. For years it has been proven that growth factors enhance the healing response of tissues. In this thesis it will be described two clinical studies and one experimental research approach carried out in the Department of Clinical Science in collaboration with the Laboratory of Anatomy of the Department of Experimental Veterinary Sciences of the University of Padova, the *Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna* of Brescia, the *Clinica dell'Ippodromo* of Merano and veterinary doctor.

Aim of the first clinical study has been to evaluate the clinical effectiveness of intralesional ultrasonographic injections of autologous platelet rich plasma for the treatment of tendon and ligament injuries was evaluated in 9 horses. In all

the horses treated (100%) no side effects, local or systemic, were recorded following the injection of platelet rich plasma. In all cases, successive ultrasonographic evaluations, performed at regular intervals, confirmed the favourable progression of the tissue's healing process with a correct re-alignment of the new fibres.

In all cases, the formation of scar tissue or of adherences between the damaged tendon or ligament and the adjacent tissues was not reported. At the end of the rehabilitation period (9-12 months) 7 of the 9 horses treated (77.7%) returned to competition, displaying athletic performances that are comparable to the ones reached before the occurrence of injury.

The second clinical study had the aim to evaluate if a combined use of platelet rich plasma and autologous mesenchymal stem cells could determine a better effect on tissutal regenerative response. The use of mesenchymal stem cells is very promising in the veterinary field since their potency has been documented in the tissue engineering research. Recently, several studies proposed the use of platelet rich plasma as a matrix for the application of mesenchymal stem cells knowing that platelets might induce multipotent cells thanks to the great amount of growth factors delivered by these cells. Indeed platelet growth factors showed the ability to differentiate stem cells towards the proper fate and to induce angiogenesis. The combination of platelet rich plasma and stem cells should improve the quality of the regenerative response of the tissue. Our study has been conducted on a group of 17 horses affected by tenodesmic lesions. The combined association of platelet rich plasma and mesenchymal stem cells did not cause collateral side effects; the follow up, evidenced by clinical and ecographic observations, showed an amelioration of the subjects injuries. At the end of the rehabilitation period 13 of 17 horses returned to the sport activity and no sign of scar or adherences were observed at the level of new formed tissue. The results obtained from these two clinical studies substain the use of platelet rich plasma as a therapeutic useful tool since is preparation is easy and allow a better tissutal regeneration without the formation of a scar. Moreover, the combined use of platelet rich plasma and mesenchymal stem cells resulted to be very promising for ameliorate

tenodesmic lesions. Overall it has been shown that platelet rich plasma could be very effective both alone or in combination with mesenchimal stem cells at the tissue level although did not shorten the rehabiitation period.

In the experimental approach used in our study we observed the effect the use of platelet rich plasma and platelet rich plasma in association with mesenchimal stem cells in sheep. The tendon of sheep was experimentally injured and after the treatment animals were sacrificed in order to evalute also histologically the treated tissues. The positive results of this research allowed to obatin new information about the early regenerative response in lesions treated with platelet rich plasma and platelet rich plasma associated with mesenchimal stem cells. The latter study will shed light on the real efficacy of novel treatments on injured tendons that recently are becoming very popular also in the vetetinary medicine.

Scopo della tesi

In medicina umana e veterinaria le patologie teno-desmiche rivestono grande interesse per l'elevata incidenza con cui si verificano, per la difficoltà di ottenere una guarigione completa ed un pieno recupero funzionale delle strutture coinvolte e perché comportano lunghi periodi di inattività. I protocolli terapeutici attualmente utilizzati nel trattamento di queste patologie sono lontani dalla potenzialità di una reale "restitutio ad integrum". In particolare, le lesioni muscoloscheletriche rappresentano un grave problema nel mondo delle corse sia dal punto di vista del benessere animale che dal punto di vista dei costi intesi necessari per le terapie e per la fase riabilitativa a cui i soggetti vengono sottoposti per poter tornare all'attività sportiva. Sono considerate patologie che hanno un considerevole impatto sulle performance atletiche del cavallo, in cui il disturbo funzionale può perdurare per mesi e spesso compromettere la carriera agonistica. La formazione di tessuto cicatriziale non permette infatti un recupero funzionale completo: la rigidità della cicatrice provoca un aumento delle sollecitazioni in tutto il resto della struttura, in particolare a carico delle porzioni adiacenti alla lesione. Le attuali ricerche stanno dunque convergendo verso lo studio di terapie che abbiano lo scopo di stimolare la riparazione endogena e la formazione di un tessuto con caratteristiche morfo-funzionali sovrapponibili a quelle di un tendine sano. La terapia cellulare, che in medicina umana è ormai divenuta una realtà per la cura di molte patologie genetiche e degenerative, può essere un utile supporto anche in medicina veterinaria. I progressi dell'ingegneria tissutale dell'ultimo decennio hanno consentito lo sviluppo di nuovi tipi di trattamento, il cui scopo è la ricostruzione di tessuti danneggiati con il trapianto di sospensioni o aggregati cellulari nel sito della lesione. Recentemente sono state sviluppate terapie rigenerative che, concentrando i fattori fondamentali per la ricostruzione del tessuto tendineo quali le piastrine e le cellule staminali, mirano a contrastare la formazione di tessuto cicatriziale ed a diminuire il numero di recidive. Le piastrine rivestono un ruolo di primo piano

nella riparazione/rigenerazione tissutale, non solo per le loro proprietà emostatiche ma anche per la loro capacità di rilasciare fattori di crescita stimolanti una corretta e più rapida rigenerazione tissutale. Per tale motivo l'interesse rivolto all'impiego di concentrato piastrinico (PRP), con finalità diverse da quelle classiche di supporto trasfusionale, nel corso degli ultimi anni si è rapidamente diffuso a varie applicazioni cliniche. Un altro importante ambito di ricerca riguarda lo studio delle cellule staminali ed è stimolato dalla prospettiva di poterle utilizzare a scopo terapeutico. Le cellule staminali adulte (MSCs) continuano ad incuriosire il mondo scientifico per le prospettive del loro utilizzo in situazioni cliniche in cui i naturali meccanismi di rigenerazione non consentono un pieno recupero funzionale. Recentemente diversi autori hanno proposto l'utilizzo di concentrato piastrinico, sia nella sua forma liquida che in quella gelatinosa, come matrice per l'applicazione di cellule staminali, con l'obiettivo che le piastrine debitamente attivate potessero liberare i diversi fattori di crescita necessari per la differenziazione delle cellule multipotenti. L'associazione delle cellule mesenchimali con i fattori di crescita piastrinici permette di accelerare l'impianto e la crescita in vivo delle cellule impiantate. L'utilizzo quindi di PRP associato al trattamento con MSCs autologhe sembra rappresentare una promettente opzione nel trattamento di patologie tenodesmiche sia in campo ortopedico umano che veterinario. I riscontri positivi ottenuti nell'uomo nel trattamento di diverse patologie muscolo-scheletriche ne ha indotto ad esempio l'impiego per la cura delle patologie tenodesmiche del cavallo. Lo scopo dell'applicazione di tali terapie in campo veterinario, ed in particolare nell'ambito delle patologie tenodesmiche, è di ottenere una totale rigenerazione del tendine con ripristino completo della sua funzionalità elastica. I risultati incoraggianti riportati da numerosi autori in letteratura hanno condotto alla realizzazione di questo lavoro.

Il presente progetto si prefigge di valutare, attraverso studi clinici (nel cavallo) e sperimentali (nella pecora), l'efficacia dell'applicazione intralesionale di concentrato piastrinico autologo utilizzato da solo o in associazione a cellule staminali mesenchimali autologhe nel trattamento di patologie tenodesmiche. L'esito di tale ricerca, confermato dai rilievi clinici, morfologici ed istologici, potrà

fornire, negli animali di interesse veterinario, maggiori informazioni ed ulteriori prospettive nell'applicazione di nuove terapie, volte a migliorare sia il tipo che le caratteristiche della guarigione, che sembrano riscuotere, secondo quanto riportato in letteratura, risultati sempre più promettenti.

Prima parte

Introduzione generale

Capitolo 1

PRP: concentrato piastrinico

1.1: LE PIASTRINE

1.1.1: Introduzione

Le piastrine non vengono definite come vere e proprie cellule ma come piccoli frammenti di citoplasma privi di nucleo, di forma rotondeggiante od ovale con diametro che varia da 1 a 3 μ (Everts 2007). La morfologia delle piastrine non è un elemento stabile, esse infatti possono manifestarsi in grandezza differenti a seconda della specie, dell'età e del loro momento funzionale (Weiss 2010). Si è inoltre osservato che le piastrine più giovani sono più grandi e metabolicamente più attive. (Aguggini 1992). Per quanto riguarda il momento funzionale si distinguono due forme fondamentali: le forme cosiddette *stimolate*, provviste di pseudopodi e granulomero diffuso nel citoplasma, e le forme *in riposo*, con granulomero addensato e circoscritto (Maia 2009). Il granulomero è costituito, oltre che da lisosomi, mitocondri e granuli di glicogeno, anche da differenti tipi di granulazioni: granuli α contenenti sostanze che intervengono nel processo di coagulazione e granuli δ , che contengono ATP, ADP, istamina e serotonina (Aguggini 1992, Rožman 2007).

Le piastrine rivestono un ruolo fondamentale nell'emostasi (Bessis 1973, Everts 2007) e nella riparazione tissutale (Chaer 2006, Everts 2007). Esse consentono la formazione di un tappo piastrinico e promuovono il rilascio di sostanze stimolanti i meccanismi di riparazione tissutale e la reattività delle altre cellule coinvolte nel processo di guarigione (Anitua 2004, Anitua 2007).

Le piastrine sono in grado di favorire la rigenerazione tissutale e di modulare la risposta flogistica attraverso il rilascio di fattori di crescita, citochine ed altre

molecole regolatrici. Il numero delle piastrine presenta delle variazioni individuali in funzione di diversi parametri quali l'età, il lavoro muscolare ed i momenti fisiologici (Aguggini 1992)

1.1.2: Genesi, anatomia e fisiologia delle piastrine

GENESI

La produzione delle cellule del sangue è un processo molto attivo: le cellule ematiche infatti sono elementi labili e vengono di continuo rinnovate mediante un meccanismo fisiologico indicato col nome di emopoiesi a sua volta suddiviso in eritropoiesi, leucopoiesi e piastrinopoiesi. Nell'individuo adulto la sede di produzione delle cellule del sangue è rappresentata dal midollo osseo, dai linfonodi e dal tessuto linfoide diffuso. L'elemento progenitore comune a tutte le linee cellulari è la cellula staminale totipotente (Fig. 1), cellula primitiva di origine mesenchimale che si trova nel midollo osseo; questa cellula va incontro

a mitosi differenziandosi in cellule staminali unipotenziali ognuna delle quali dà origine ad una linea cellulare ematopoietica (Aguggini 1992). I precursori piastrinici sono i megacariociti, cellule multinucleate che derivano dal progenitore multipotente delle cellule mieloidi CD34+ e che risiedono nel tessuto emopoietico: si trovano primariamente nel midollo osseo ed in altri organi quali

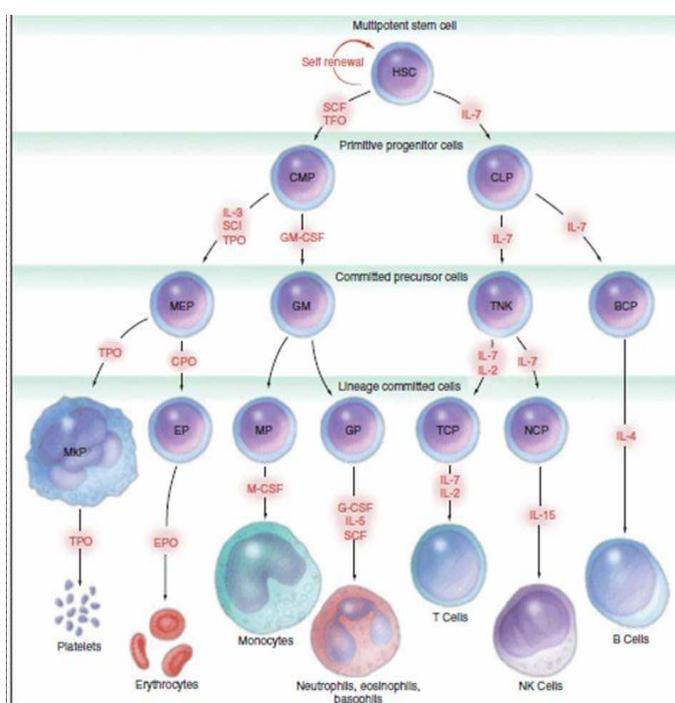
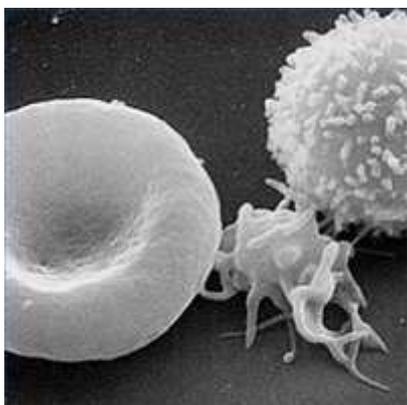


Fig. 1: Piastrinopoiesi (Schalm's Veterinari Hematology 2010 modificato)

polmone, milza, rene, cuore ed altri tessuti (Bessis 1973, Everts 2007).

I megacariociti rappresentano lo 0.1-0.5% delle cellule midollari nucleate e sono localizzate vicino ai seni capillari midollari. La proliferazione, la differenziazione e la maturazione dei megacariociti è stimolata da diverse citochine, dalle interleuchine IL-3, IL-6 e IL-11, e dalla trombopoietina (Sellon 2004). La trombopoietina è un fattore presente nel siero in grado di incrementare la produzione di piastrine e la proliferazione dei megacariociti (Carmona 2006). I megacariociti maturi sono caratterizzati da prolungamenti citoplasmatici, detti pro-piastrine, che sono a contatto con il sangue e che vengono frammentati liberando piastrine: il citoplasma notevolmente compartimentalizzato di una megacariocita rilascia fino a 8000 piastrine nel flusso sanguigno (Sellon 2004, Everts 2007). Le piastrine sono dunque frammenti cellulari secretori senza



nucleo; quelle umane sono di forma discoidale, di dimensioni comprese tra 1 e 4 μ di diametro e di 1 μ di spessore. Nel soggetto normale il numero di piastrine varia da 1.5 a 3 x 10⁵ per mL di sangue circolante (Everts 2007). Le piastrine equine sono frammenti citoplasmatici anucleati generalmente lunghi 5-7 μ m e larghi 1-3 μ m ma sono state ritrovate occasionalmente piastrine

lunghe anche oltre 20 μ m (Carmona 2006, Weiss 2010).

Il numero delle piastrine (Tab. 1) presenta delle variazioni individuali in funzione di diversi parametri quali l'età, il lavoro muscolare ed i momenti fisiologici (Aguggini 1992).

SPECIE	ESTREMI centinaia di migliaia/mm ³	MEDIA centinaia di migliaia/mm ³
BOVINO	1-8	5
PECORA	2.5-7.5	4
CAPRA	3-6	4.5
CAVALLO	1-3.5	2.5
CANE	2-5	3.5
GATTO	3-8	4.5
MAIALE	3-7	5.2

Tab 1: Numero delle piastrine nelle diverse specie animali (Aguggini 1992, modificato)

Le piastrine hanno una vita relativamente breve, di 7-12 giorni (Deldar 2001, Everts 2007, Rožman 2007); le piastrine invecchiate vengono rimosse dalla

circolazione da parte di macrofagi tissutali della milza, del fegato e del midollo osseo (Sellon 2004).

ANATOMIA E FISIOLOGIA

Nonostante il suo ridotto volume, la piastrina è un elemento cellulare complesso, costituito da una membrana esterna che racchiude un citoplasma ricco di organuli e strutture membranose. La piastrina può essere suddivisa in vari comparti (Everts 2007), ognuno dei quali (Fig 2) riveste un ruolo diverso nella funzione piastrinica; le diverse zone verranno di seguito illustrate nel dettaglio.

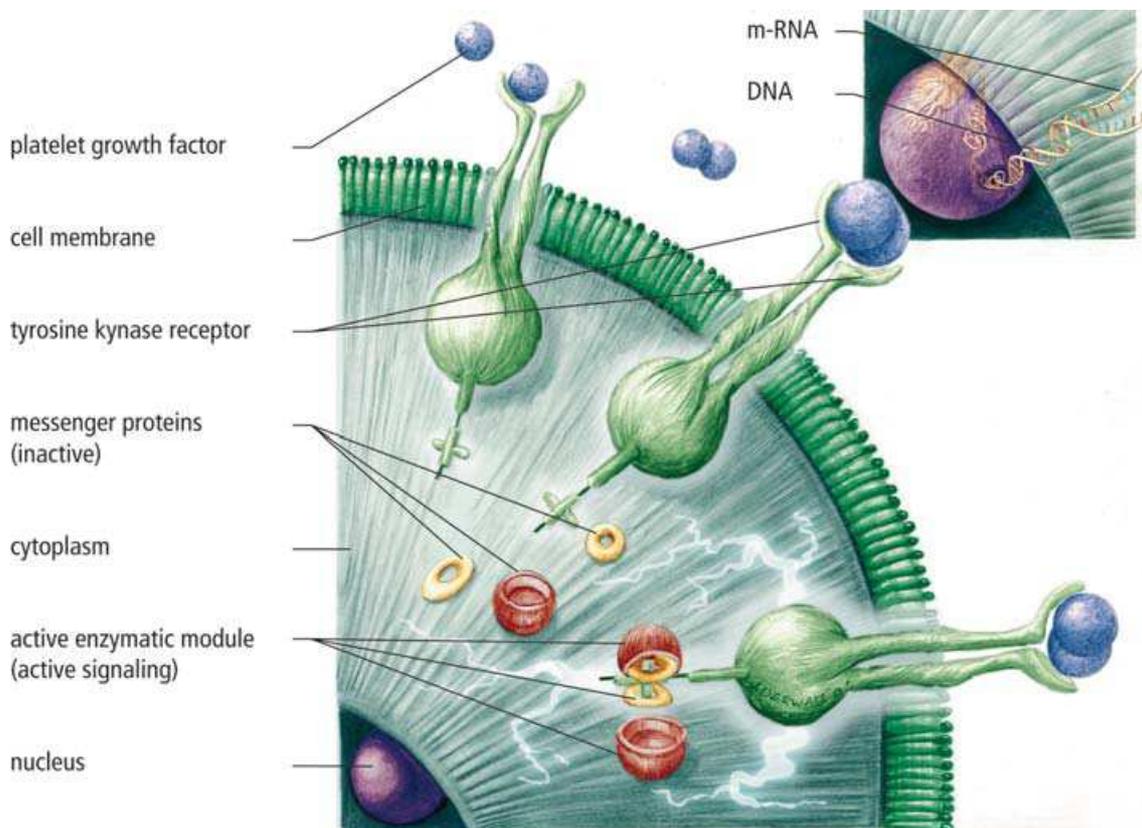


Fig. 2: Struttura piastrinica (Everts 2007 modificato)

Membrana piastrinica

La membrana piastrinica è composta da tre strati: il glicocalice, lo strato fosfolipidico e lo strato sottomembranoso (Carmona 2006, Weiss 2010).

Il *glicocalice* forma un sottile rivestimento esterno di materiale amorfo, responsabile delle proprietà adesive della piastrina stessa. In questo rivestimento vengono adsorbite un certo numero di proteine plasmatiche come fibrinogeno, immunoglobuline e fattori della coagulazione (Deldar 2001). Il glicocalice contiene glicoproteine, lipoproteine e polisaccaridi. Le principali glicoproteine sulla superficie esterna delle piastrine sono i recettori di collagene, fibronectina, vitronectina, fibrinogeno, laminina e fattore di von Willebrand (Carmona 2006).

Il *doppio strato fosfolipidico* è costituito internamente da aminofosfolipidi carichi negativamente (fosfatidilserine e fosfatidiletanolamina) ed esternamente da fosfolipidi neutri (fosfatidilcolina e sfingosina). Altri lipidi presenti sulla membrana sono il fosfatidilinositolo e la lisolecitina (Weiss 2010). Lo strato fosfolipidico ha proprietà anticoagulanti e contiene domini transmembrana e periferici che agiscono da recettori (Carmona 2006). Lo *strato sottomembranoso* è parte del citoscheletro e si lega ad alcune glicoproteine dello strato esterno.

La membrana piastrinica contiene diversi recettori, tra i quali i recettori glicoproteici implicati nell'attivazione piastrinica. Questi costituiscono gli antigeni di membrana piastrinici e si dividono in tre famiglie: integrine, selectine e glicoproteine ricche in leucina (Carmona 2006, Weiss 2010).

Le integrine sono responsabili dell'adesione e dell'aggregazione piastrinica e sono costituite da due subunità, α e β .

La glicoproteina GPIIb-IIIa, conosciuta anche come P-selectina, è presente sulla superficie degli α granuli ed interagisce con il fibrinogeno, il fattore di von Willebrand, la fibronectina e la vitronectina. Questa glicoproteina viene esposta sulla superficie esterna in seguito ad attivazione piastrinica (Anitua 2004, Mitchell 2005, Carmona 2006).

Le glicoproteine ricche in leucina, in particolare la glicoproteina GpIb-IX-V, contribuiscono alla formazione della carica negativa presente sulla superficie piastrinica. Quando si legano con il fattore di von Willebrand vi è un incremento del calcio citoplasmatico e dell'attivazione della fosfatidilinositolo-3-chinasi.

Altri recettori di membrana piastrinici includono i recettori per trombina, immunoglobuline, trombospondina e ADP (Carmona 2006).

Citoplasma delle piastrine

Il citoplasma piastrinico contiene microfilamenti, microtubuli, mitocondri, lisosomi, sistemi membrana, glicogeno e numerosi granuli (Deldar 2001, Everts 2007, Weiss 2010).

Il *sistema canalicolare aperto* o di membrana è composto dalla membrana lipidica che, invaginandosi nel citoplasma, forma un sistema di canalicoli, determinando un aumento della superficie disponibile per gli scambi con l'esterno. Infatti, questo sistema viene impiegato per l'esocitosi e l'endocitosi (Deldar 2001, Sellon 2004). Tale sistema è presente nell'uomo, nel cane e nel gatto ma assente nei ruminanti e nel cavallo: in queste specie dunque il rilascio degli α -granuli non avviene attraverso il sistema canalicolare aperto ma si verifica mediante fusione diretta tra l' α -granulo e la membrana plasmatica (Weiss 2010).

Un altro sistema di canalicoli, denominato *sistema tubulare denso*, agisce come sito di sequestro del calcio e di accumulo di enzimi necessari per il metabolismo dell'acido arachidonico (Deldar 2001, Sellon 2004).

Le piastrine contengono due tipi di actina, filamentosa (polimerica) e globulare (monomerica), complessata con la profillina. L'attivazione piastrinica è preceduta dalla dissociazione del complesso profillina/actina e dalla successiva polimerizzazione dell'actina globulare, resasi in tal modo disponibile (Rosati e Colombo 1997). La risposta piastrinica di contrazione è mediata dalla polimerizzazione actina-miosina (Carmona 2006). I filamenti di actina forniscono un supporto strutturale ai granuli ed ai mitocondri.

I microfilamenti ed i microtubuli formano il citoscheletro per il mantenimento della normale forma discoide della piastrina. Sono responsabili anche dei cambiamenti di forma piastrinici, dell'emissione di pseudopodi durante l'attivazione, della centralizzazione e conseguente secrezione di granuli citoplasmatici e della retrazione del coagulo (Deldar 2001).

Granuli piastrinici e fattori di crescita

Le piastrine dei mammiferi presentano una popolazione eterogenea di granuli (Fig 3), che contengono almeno 60 diversi tipi di sostanze biologicamente attive (Rožman 2007). I granuli lisosomiali contengono enzimi idrolitici e proteolitici: idrolasi acide (fosfatasi e β -

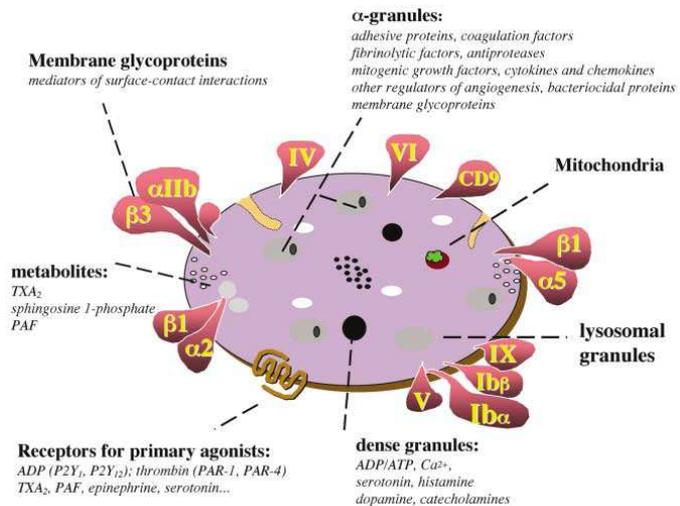


Fig.3: Granuli piastrinici (Anitua 2004 modificato)

glucoronidasi), guanina, fosfolipasi e chinasi (Deldar 2001, Carmona 2006). I granuli elettrondensi (granuli δ) contengono ADP (adenosindifosfato), ATP (adenosintrifosfato), calcio ionizzato, serotonina, istamina, catecolamine, fosforo (Deldar 2001, Anitua 2004, Mitchell 2005, Carmona 2006, Everts 2007). L'ADP stimola la migrazione delle piastrine e, in combinazione con la serotonina, produce contrazione delle arterie; l'ATP ha azione antagonizzante quella dell'ADP (Carmona 2006).

I granuli α sono i più numerosi e contengono citochine, chemochine e fattori della crescita. Alcune molecole sono specifiche per le piastrine, ossia il PF4 (Fattore Piastrinico 4) e le β TG (β -tromboglobuline), mentre altre non lo sono: fattori della coagulazione (V e VIII), proteine adesive (fibrinogeno, fibronectina, vitronectina, trombospondina), albumine e proteoglicani (Deldar 2001, Anitua 2004, Mitchell 2005, Everts 2007). Queste proteine sono essenziali per tutte le funzioni piastriniche quali la formazione e la crescita di trombi, la modulazione del processo flogistico, la sintesi di matrice extracellulare durante la riparazione delle lesioni. Le chemochine sono proteine che attraggono le cellule; esistono chemochine costitutive e chemochine infiammatorie, anche se alcune hanno un duplice ruolo. Le chemochine costitutive vengono prodotte nei tessuti in assenza di stimolo flogistico e sono responsabili di molti processi fisiologici

quali lo sviluppo, l'angiogenesi e l'apoptosi. Le chemochine inducibili svolgono un ruolo critico durante la flogosi. Vengono prodotte nella sede del danno e agiscono sui leucociti, inducendone la migrazione e la risposta (Anitua 2004, Carmona 2006). Le piastrine contengono due chemochine specifiche, PF-4 e β -TG, ed altre non specifiche. Le chemochine non intervengono solo durante l'attivazione piastrinica, bensì influenzano anche la natura dell'infiltrato infiammatorio (Carmona 2006).

Le β -tromboglobuline sono tre peptidi, immagazzinati prevalentemente all'interno delle piastrine. Inducono chemiotassi neutrofilica e degranolazione dei loro granuli primari e secondari. Tuttavia, nelle ultime fasi della flogosi, le β -TG agiscono come peptidi antinfiammatori e diminuiscono la degranolazione neutrofilica (Carmona 2006).

Il Fattore Piastrinico 4 (PF-4) è prodotto dalla piastrine e da linfociti T e mastociti. Il suo recettore principale è il condroitin solfato. Induce chemiotassi leucocitaria ed adesione dei neutrofili alle cellule endoteliali, contatto che induce l'esocitosi dei loro granuli secondari. Il PF-4 è un potente peptide anti-angiogenico: limita l'angiogenesi in primo luogo inibendo la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali, in secondo luogo interagendo con FGF e VEGF allo scopo di inibire il loro legame con i recettori di superficie. L'FP-4 infine inibisce l'apoptosi dei monociti, ne induce la differenziazione in macrofagi e stimola il rilascio di istamina da parte dei basofili. Sia PF-4 che le β -TG determinano inibizione della megacariocitopoiesi (Anitua 2004, Carmona 2006). Il PAF (Platelet Activating Factor) è un lipide chemotattico, media l'arresto e l'attivazione leucocitaria sulle cellule endoteliali o sulle piastrine (Carmona 2006).

All'interno degli α -granuli sono contenuti numerosi **fattori di crescita**, che agiscono, sfruttando peculiari caratteristiche, nel processo di riparazione tissutale (Creaney 2007). Nella tabella sottostante (Tab. 2) vengono riportati i principali fattori di crescita liberati durante la fase di attivazione piastrinica.

<i>Fattore della crescita</i>	<i>Ruolo nel processo di guarigione tissutale</i>
EGF (epidermal growth factor)	<ul style="list-style-type: none"> - Stimola la proliferazione di cellule epiteliali ed epidermiche, fibroblasti e cellule embrionali; - Chemoattrae fibroblasti e cellule epiteliali; - Stimola la ripitelizzazione - Aumenta l'angiogenesi; - Influenza la sintesi ed il turn-over della matrice extracellulare
PDGF (platelet-derived growth factor)	<ul style="list-style-type: none"> - Le isoforme A e B sono potenti mitogeni per fibroblasti, cellule della muscolatura vasale liscia, condrociti, cellule epiteliali ed endoteliali; - Potente chemoattraente per cellule emopoietiche e mesenchimali, fibroblasti e miociti; - Stimola la chemiotassi in associazione a PDGF; - 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
TGF-α (transforming growth factor alpha)	<ul style="list-style-type: none"> - Mima l'EGF, occupa gli stessi recettori; - Stimola la crescita di cellule mesenchimali, epiteliali ed endoteliali, la chemotassi endoteliale e controlla lo sviluppo dell'epidermide; - Stimola la proliferazione di cellule endoteliali, più potente dell'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
TGF-β1 (transforming growth factor beta)	<ul style="list-style-type: none"> - Stimola la proliferazione e la chemotassi dei fibroblasti, stimola la sintesi di collagene; - Inibisce la crescita di cellule epiteliali, ed endoteliali, di fibroblasti, cellule neuronali, emopoietiche e cheratinociti; - Antagonizza l'attività biologica di EGF, PDGF, aFGF e bFGF
KGF o FGF-7 (keratinocyte growth factor)	<ul style="list-style-type: none"> - Il più potente GF per i cheratinociti della pelle, importante nei processi di riparazione a seguito di ferite della cute; - Promuove la guarigione delle ferite tramite proliferazione, differenziazione, angiogenesi e migrazione; - Mitogeno per molte cellule epiteliali, esclusi fibroblasti e cellule endoteliali
aFGF o FGF-1 (fibroblast growth factor; acidic)	<ul style="list-style-type: none"> - Partecipa ai processi cellulari di proliferazione, differenziazione, angiogenesi, e migrazione; - Mitogeno per cheratinociti della pelle, fibroblasti dermici e cellule endoteliali vascolari
bFGF o FGF2 (fibroblast growth factor; basic)	<ul style="list-style-type: none"> - Stimola la crescita di fibroblasti, mioblasti, osteoblasti, cellule neurali, endoteliali, cheratinociti e condrociti; - Stimola, l'angiogenesi, la sintesi di collagene, la proliferazione endoteliale, la contrazione delle ferite, la sintesi di matrice, l'epitelizzazione e la produzione di KGF
VEGF/VEP (vascular endothelial growth factor)	<ul style="list-style-type: none"> - Stimola la proliferazione di cellule endoteliali macrovascolari; - Induce neovascolarizzazione (è una forte proteina angiogenica); - Induce la sintesi di metalloproteinasi, che degrada il collagene interstiziale di tipo 1, 2, e 3
CTGF (connective tissue growth factor)	<ul style="list-style-type: none"> - Il più potente GF per i cheratinociti della pelle, importante nei processi di riparazione a seguito di ferite della cute; - Promuove la guarigione delle ferite tramite proliferazione, differenziazione, angiogenesi e migrazione; - Mitogeno per molte cellule epiteliali, esclusi fibroblasti e cellule endoteliali
GM-CSF o CSFα (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor)	<ul style="list-style-type: none"> - Induce la proliferazione, migrazione, l'angiogenesi e la formazione di endotelio vascolare; - Potente stimolatore alla proliferazione e differenziazione degli osteoblasti, stimola la mineralizzazione della matrice
IGF (insulin-like growth factor)	<ul style="list-style-type: none"> - GF per i fibroblasti, in vitro è mitogeno per molti tipi di cellule mesenchimali; - Promuove la sintesi di collagenasi e prostaglandina E2 nei fibroblasti; - Stimola la sintesi di collagene e matrice da parte degli osteoblasti, regola il metabolismo della cartilagine articolare
TNFα (tumor necrosis factor alpha)	<ul style="list-style-type: none"> - GF per i fibroblasti; - Promuove l'angiogenesi
IL-1β (interleukin 1 β)	<ul style="list-style-type: none"> - Inibisce la crescita di epatociti e cellule endoteliali; - Attiva gli osteoclasti, sopprimendo la formazione di nuovo osso, se in bassa concentrazione favorisce la crescita di nuovo tessuto osseo; - Migliora le reazioni infiammatorie e l'attività della collagenasi
IL-8 (interleukin 8)	<ul style="list-style-type: none"> - Supporta l'angiogenesi; - Mitogeno per le cellule epidermiche

Tab. 2: fattori di crescita piastrinici (Rožman 2007 modificato)

I fattori di crescita sono piccoli polipeptidi ad azione autocrina e paracrina che funzionano da trasmettitori cellulari in grado di influenzare la crescita e la differenziazione di molte linee cellulari (Aldegheri 2002); agiscono come molecola-segnale per differenti tipi cellulari e promuovono e regolano i processi di generazione, rigenerazione e di rimodellamento di diversi tessuti ed organi (Braun 2002, Zachos 2005).

In particolare sette fattori di crescita contenuti negli α granuli sono direttamente implicati nella guarigione tissutale: IGF-1, TGF β -(1 e 2), PDGF, VEGF, bFGF, EGF, HGF (Prades 2006). Tutti agiscono nei diversi stadi del processo riparativo: in particolare IGF-1, TGF β -1 e PDGF sono particolarmente attivi durante l'infiammazione e la precoce proliferazione, mentre VEGF, bFGF, EGF, HGF svolgono le loro azioni principali durante le fasi successive, mediando la proliferazione e la sintesi cellulare, la neoangiogenesi ed il rimodellamento tissutale (Anitua 2004, Molloy 2005).

- IGF-1: Insulin-like Growth Factor 1

I fattori di crescita insulin-like sono due molecole (IGF-1 e -2) della famiglia delle insuline e vengono sintetizzate da molti tessuti, incluso il fegato (Anitua 2004). I tessuti di animali giovani presentano un'abbondante espressione di IGF-1 che diminuisce negli anziani (Fasce 2008). IGF-1 interviene nella crescita corporea fisiologica e nella guarigione (Molloy 2005, Chen 2007); è un importante mediatore di tutte le fasi della guarigione, ma particolarmente durante l'infiammazione e la proliferazione (Chen 2007). In particolare IGF-1 gioca un ruolo importante nell'omeostasi del tessuto tendineo, poiché stimola la produzione di matrice extracellulare (ECM), collagene e proteoglicani (Dahlgren 2002). La sua principale funzione sembra essere la stimolazione di fibroblasti ed altre cellule, intervenendo sulla migrazione, sulla proliferazione e sulla produzione di collagene e di matrice extracellulare durante il rimodellamento. IGF-1 stimola la risposta riparativa intrinseca che prevede la sintesi di collagene. Il prodotto da fibroblasti endogeni portando dunque ad una guarigione migliore e ad una minore comparsa di aderenze (Murphy e Nixon 1997).

- TGF- β : Transforming Growth Factor β

Esistono tre isoforme di TGF- β (β 1, β 2 e β 3), con un peso molecolare approssimativamente di 25 kD che vengono prodotte dalla maggior parte delle cellule attive nella guarigione. TGF- β 1 e TGF- β 2 sono i fattori di crescita maggiormente contenuti nelle piastrine (Anitua 2004). TGF- β è una molecola pleiotropica che può stimolare o inibire la proliferazione, la differenziazione, la motilità o la morte cellulare: TGF- β inibisce la proliferazione di cellule epiteliali, endoteliali, emopoietiche, nervosa e fibroblastiche embrionali, tuttavia stimola quella di alcune cellule mesenchimali, come i fibroblasti cutanei (Carmona 2006, Everts 2007). Inoltre TGF- β promuove l'angiogenesi e agisce sull'ECM, regolando l'espressione di collagene fibrillare e fibronectina (Carmona 2006). L'azione di TGF- β è dose-dipendente ed in sinergia con quella di altri fattori di crescita (Molloy 2005): sembra che basse concentrazioni di TGF- β abbiano un effetto stimolatorio sulla proliferazione delle cellule ossee, mentre alte concentrazioni potrebbero avere un paradossale effetto inibitorio (Everts 2007).

- PDGF: Platelet Derived Growth Factor

Il PDGF è una glicoproteina con un peso molecolare approssimativamente di 30 kD, formata da 2 ponti disolfuro polipeptidici, chiamati catene A e B; esistono tre isoforme di PDGF (Everts 2007). I PDGF vengono prodotti da piastrine, macrofagi, cellule endoteliali, monociti, fibroblasti e dalla matrice ossea. Nelle piastrine i PDGF sono stoccati negli α granuli e vengono rilasciati durante la coagulazione, in seguito all'esposizione delle piastrine ad agenti attivatori come la trombina, il collagene e l'adenosinadifosfato (Molloy 2005, Fasce 2008). I PDGF sembrano svolgere un ruolo significativo nelle fasi precoci della guarigione (Andrae 2008), inducendo la sintesi di altri fattori di crescita, ad esempio IGF-1 e VEGF (Andrae 2008). Inoltre hanno importanti capacità di chemiotassi e di stimolazione della proliferazione cellulare (Carmona 2006) in particolare durante le fasi di guarigione del tessuto osseo (Everts 2007). Studi in vitro hanno dimostrato che questo fattore di crescita riveste anche un ruolo

importante durante le fasi successive, stimolando l'angiogenesi (Carmona 2006, Everts 2007) e la produzione di collagene (Molloy 2005).

- VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VEGF appartiene alla famiglia del gene VEGF, che include fattori di crescita placentari e due proteine. VEGF interviene durante la migrazione cellulare ma è soprattutto attivo dopo la remissione della flogosi, apportando un potente stimolo all'angiogenesi (Molloy 2005). VEGF ha effetti proliferativi sulle cellule endoteliali e ne protegge la sopravvivenza (Braun 2002).

- bFGF: basic Fibroblast Growth Factor

Sono state identificate sette isoforme di FGF ma bFGF (o FGF1) è il più studiato per il suo ruolo nella guarigione (Braun 2002). bFGF è prodotto da cellule del tessuto connettivo e dalle piastrine: è un potente stimolatore dell'angiogenesi e della migrazione e proliferazione di fibroblasti, cheratinociti, cellule endoteliali e muscolari lisce (Carmona 2006).

- EGF: Epidermal Growth Factor

EGF è composto da una singola catena polipeptidica ed è prodotto da cellule epiteliali, fibroblasti e piastrine (Carmona 2006). Durante la guarigione EGF induce proliferazione, differenziazione e motilità cellulare, in particolare è efficace nella chemiotassi dei fibroblasti (Fasce 2008); inoltre regola il turnover di collagene 1 e stimola lo sviluppo di cellule endoteliali e la neoangiogenesi (Zachos e Bertone 2005).

- HGF: Hepatocyte Growth Factor

HGF ha potenti effetti angiogenici, in quanto aumenta l'espressione di VEGF (Carmona 2006). HGF è anche coinvolto nella neovascolarizzazione patologica

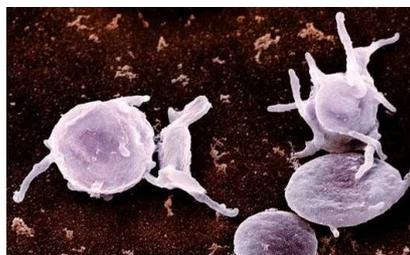
delle lesioni cutanee e nella formazione di tessuto granulare esuberante (Anitua 2004).

1.1.3: Risposta piastrinica

In seguito a lesione vascolare, le piastrine vengono a contatto con elementi della ECM di norma coperti da endotelio: collagene, proteoglicani, fibronectine e altre glicoproteine adesive. Le piastrine vanno incontro ad adesione ed attivazione, cambiamento di forma, secrezione di granuli ed aggregazione (Mitchell 2005, Everts 2007, Nixon 2008, Maia 2009).

Adesione ed attivazione piastrinica

L'adesione delle piastrine all'ECM esposta, ed in particolare al collagene, determina l'attivazione piastrinica e l'avvio di vie di trasduzione del segnale. Il processo di attivazione avviene grazie alla presenza di molecole di adesione. La maggior parte di esse sono integrine, composte da due catene polipeptidiche, α e β . Esistono diverse isoforme delle due catene, le quali si combinano per formare svariate integrine. Alcune di queste molecole vengono esposte sulla superficie in seguito ad attivazione piastrinica, 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 componenti della ECM (Mitchell 2005, Fasce 2008).



I legami sopracitati non hanno forza sufficiente per resistere al flusso sanguigno (Mitchell 2005), ma un'adesione più stabile viene assicurata dalla glicoproteina Ib (GpIb), una glicoproteina ricca di leucina. Questa lega il fattore di von Willebrand, una glicoproteina presente nell'endotelio vascolare delle piastrine, ma anche libera nel plasma, complessata con il fattore della coagulazione VIII. Interagendo con il collagene, forma un ponte tra la molecola GpIb delle

piastrine e la matrice extracellulare esposta (Sellon 2004). L'interazione dei recettori di membrana con il collagene attiva l'enzima fosfolipasi C piastrinico, il quale genera due mediatori: il primo, il diacilglicerolo, regola la secrezione dei granuli piastrinici e sembra essere associato alla fusione delle integrine GpIIb e GpIIIa con conseguente formazione di un complesso glicoproteico fondamentale per l'aggregazione. Nelle piastrine a riposo le glicoproteine GpIIb e GpIIIa sono separate e quindi non attive, l'eterodimero GpIIb/GpIIIa invece è un complesso in grado di legare il fibrinogeno (Chaer 2006, Everts 2007, Fasce 2008). Il secondo mediatore generato dalla fosfolipasi C è l'inositotrilfosfato, che induce il rilascio di ioni calcio nel citosol. Il calcio è essenziale per il cambiamento di forma delle piastrine e la secrezione del contenuto dei granuli all'esterno (Fasce 2008).

Cambiamento di forma delle piastrine

Le piastrine adese passano dalla loro classica forma discoidale ad una forma più sferica, resa irregolare dall'estroflessione di pseudopodi (Fig 4) che permettono il contatto con le piastrine vicine (Everts 2007, Maia 2009). Questo cambiamento di forma è determinato dalle molecole del citoscheletro.

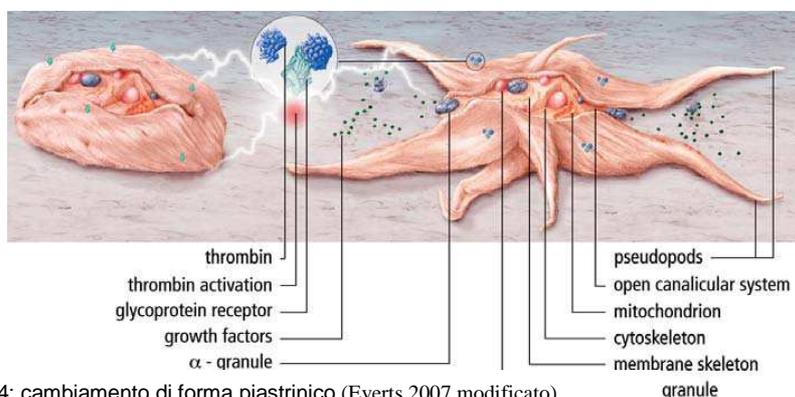


Fig. 4: cambiamento di forma piastrinico (Everts 2007 modificato)

Per rendere possibili le contrazioni dei filamenti di actina associati alla membrana, le piastrine sfruttano le loro riserve di ATP. L'alterazione completa della morfologia piastrinica avviene soltanto se lo stimolo persiste ed è di sufficiente intensità. Nel caso contrario la piastrina riacquisterà la sua forma iniziale e, dopo un periodo di refrattarietà in cui non risponderà a stimoli, sarà nuovamente pronta ad attivarsi (Mitchell 2005, Fasce 2008). Se lo stimolo è sufficiente, l'attivazione piastrinica induce l'espressione di complessi fosfolipidici

sulla superficie della piastrina. Di fondamentale importanza è l'esposizione all'esterno del FP3 (Fattore Piastrinico 3). Questo fosfolipide è situato sul versante interno della membrana delle piastrine a riposo, ma viene esposto all'esterno a seguito del cambiamento di forma. Tali complessi fosfolipidici fungono da siti di legame per il calcio e per i fattori della coagulazione, fornendo così una superficie ottimale per l'avvio ed il mantenimento della cascata della coagulazione (Mitchell 2005).

Secrezione dei granuli (release reaction)

La secrezione dei granuli avviene immediatamente dopo l'adesione piastrinica. È avviata dal legame degli agonisti, tra cui il collagene, l'ADP ed il PAF, a recettori della membrana, seguito da una cascata di fosforilazione intracellulare (Mitchell 2005, Carmona 2006, Everts 2007). È dipendente dal citoscheletro e dalla presenza di ATP. I granuli vengono spostati al centro della piastrina attiva, la membrana del granulo viene fusa con quella del sistema canalicolare aperto ed infine si ha la secrezione del contenuto del granulo. L'espressione temporale è differente: innanzitutto uno stimolo di bassa intensità provoca il rilascio del contenuto dei granuli α , dopodichè avviene quello dei granuli elettrodensi ed infine quello dei granuli lisosomiali (Carmona 2006, Nixon 2008).

Trasduzione del segnale (risposta biochimica)

Durante l'attivazione piastrinica vengono attivati sequenzialmente gli enzimi fosfolipasi C e fosfolipasi A2, che sono situati sul versante interno della membrana piastrinica.

L'attività della fosfolipasi C, enzima chiave delle vie di trasduzione, porta alla "fusione" delle integrine GPIIb e GPIIIa, le quali formano sulla superficie piastrinica una sola molecola chiamata *complesso glicoproteico IIb-IIIa (GPIIb-IIIa)*, fondamentale per l'aggregazione piastrinica (Rožman 2007).

Aggregazione piastrinica

L'aggregazione piastrinica è un fenomeno divisibile in 2 fasi. L'aggregazione primaria viene indotta dall'interazione con i recettori di membrana di piccole quantità di agonisti: ADP, collagene, trombina, PAF (Rožman 2007). L'aggregazione primaria è reversibile e non è associata a rilascio di granuli piastrinici (Sellon 2004). L'aggregazione secondaria è dovuta al rilascio di elevate quantità di ADP e quindi di TXA2 (Trombosano A2) da parte delle piastrine attivate (Mitchell 2005, Fasce 2008). Le piastrine si aggregano tra loro grazie al legame dei complessi GbIIb-IIIa con il fibrinogeno, con formazione di veri e propri ponti tra le piastrine (Rožman 2007). La trombina, generata dall'attivazione della cascata della coagulazione, converte il fibrinogeno in fibrina e stimola direttamente l'adesione di neutrofili e monociti (Mitchell 2005).

1.2: IL CONCENTRATO PIASTRINICO (PRP)

1.2.1: Definizione

Il plasma arricchito di piastrine (PRP, Platelet Rich Plasma) è un emocomponente che si presenta come un concentrato autologo di piastrine sospese in un piccolo volume di plasma (Marx 2004, Sutter 2004, Everts 2007, Nixon 2008, Maia 2009) .

La legge 219 del 21/10/2005 “nuova disciplina delle attività trasfusionali e della produzione nazionale degli emoderivati” definisce come *emocomponenti* i prodotti ricavati dal frazionamento del sangue con mezzi fisici semplici o con aferesi e come *emoderivati* le specialità medicinali estratte dall'emocomponente plasma mediante processi di lavorazione industriale: poiché l'unico componente suscettibile di lavorazione industriale è al momento il plasma, la norma di fatto considera equivalenti le definizioni di emoderivato e di plasma derivato.

Storicamente, nell'ambito della medicina trasfusionale, i concentrati piastrinici venivano utilizzati per il trattamento di gravi trombocitopenie conseguenti ad

aplasie midollari, leucemie acute o significative perdite ematiche conseguentemente ad interventi chirurgici (Dohan 2009). Il PRP, per essere definito tale, deve essere di origine autologa: concentrati di piastrine omologhi ottenuti dal sangue di donatori contengono membrane cellulari dalle proprietà antigeniche, che scatenano una reazione immunitaria (Marx 2004, Everts 2007). Il concentrato piastrinico è un'importante fonte dei diversi fattori di crescita (Anitua 2007, Everts 2007, Nixon 2008, Maia 2009) contenuti nei granuli α piastrinici e contiene anche proteine del sangue. Di queste, la fibrina, la fibronectina e la vitronectina sono importanti nella guarigione tissutale: sono molecole di adesione ed intervengono nella formazione di una matrice temporanea che funge da supporto per il tessuto osseo, il tessuto connettivo e la migrazione epiteliale. I fattori di crescita sono in grado di promuovere la proliferazione e la differenziazione cellulare e la chemotassi, inducendo la migrazione delle diverse cellule (Everts 2007, Nixon 2008). Concentrazioni soprafisiologiche di fattori di crescita potrebbero apportare benefici accelerando la guarigione tissutale, diminuendo la risposta infiammatoria e promuovendo la rigenerazione del tessuto (Prades 2006). Questa ipotesi ha determinato negli ultimi anni un impiego sempre più diffuso del PRP (Marx 2004, Wang 2007, Zimmermann 2008): esso agisce come agente emostatico locale e stimola il processo di guarigione delle ferite incrementando la produzione di collagene; il concentrato è inoltre in grado di favorire la guarigione del tessuto osseo in numerose procedure di innesto osseo (Everts 2007).

1.2.2: Caratteristiche e meccanismo d'azione

L'attivazione piastrinica interviene in tre step necessari del processo di guarigione: infiammazione, proliferazione e rimodellamento (Anitua 2007). Durante la fase infiammatoria la funzione di attivazione piastrinica include i seguenti meccanismi: antimicrobico, di adesione, di aggregazione, di retrazione del coagulo, di pro-coagulazione, di segnalazione da parte delle citochine, di rilascio delle chemochine ed infine di rilascio dei fattori di crescita (Crane 2008). La secrezione attiva di fattori di crescita piastrinici è provocata dalla cascata

della coagulazione ed inizia 10 minuti dopo l'inizio della coagulazione (Marx 2004). Oltre il 95% dei fattori di crescita già sintetizzati viene rilasciato entro un'ora. Il PRP deve perciò essere ottenuto da sangue trattato con anticoagulante; se prodotto in tale maniera, le piastrine del PRP rimangono vitali per circa 8 ore, ma è comunque consigliabile effettuare il trattamento il prima possibile (Marx 2004). Un metodo valido di preparazione del PRP deve efficacemente separare le piastrine dagli eritrociti e concentrarle senza danneggiare o lisare le piastrine stesse. I fattori di crescita contenuti all'interno dei granuli α non sono attivi: durante la secrezione, i granuli si fondono con la membrana piastrinica, sede in cui i fattori di crescita vengono addizionati con catene laterali di istoni e carboidrati; questo processo li attiva. Di conseguenza, se le piastrine vengono danneggiate durante la produzione del PRP, non secerneranno fattori di crescita bioattivi (Marx 2004, Everts 2007). I fattori di crescita si legano a recettori transmembrana sulla superficie delle cellule target (cellule staminali mesenchimali, endoteliali, epidermiche e fibroblasti). I recettori inducono l'attivazione di vie di segnalamento intracellulari con l'espressione di sequenze geniche deputate alla proliferazione cellulare, alla formazione di matrice ed alla sintesi di collagene. Durante la fase proliferativa, i fibroblasti si differenziano in miofibroblasti e le fibre di actina si contraggono in modo da ridurre le dimensioni della ferita. Durante la fase di rimodellamento infine, il collagene matura e si rafforza: la guarigione tissutale inizia quando le fasi di produzione e distruzione del collagene sono in equilibrio: tale fase può durare anche un anno. In questo periodo il collagene di tipo III è sostituito dal collagene di tipo I e si verificano la riorganizzazione del tessuto e la scomparsa dei vasi neoformati (Crane 2008). Poiché i fattori di crescita non entrano nella cellula ed agiscono mediante stimolazione dei meccanismi di guarigione fisiologici, il PRP non ha capacità mutageniche (Marx 2004, Sampson 2008). Dopo il primo rilascio massivo di fattori di crescita, le piastrine ne sintetizzano e secernono di nuovi per il resto della loro vita, circa 7-10 giorni (Marx 2004, Setter 2008). Il concentrato piastrinico dunque mima lo stadio finale nella cascata coagulativa: il PRP, in presenza di trombina, converte il fibrinogeno in fibrina e stimola ulteriore aggregazione piastrinica (Nixon 2008).

I macrofagi, giunti nella sede grazie alla chemiotassi piastrinica, rimuovono le piastrine invecchiate ed assumono poi il ruolo di regolatori della riparazione tissutale, sintetizzando e secernendo i propri fattori di crescita (Marx 2004).

È molto importante non somministrare farmaci antinfiammatori nei pazienti trattati con concentrato piastrinico poiché è riconosciuto che l'azione di tale farmaci inibisce l'azione e di conseguenza l'efficacia del PRP; ne è un classico esempio l'acido acetilsalicilico (aspirina) che interferisce con la funzionalità piastrinica andando a inibire l'enzima ciclossigenasi (COX) (Chaer 2006).

Essendo una preparazione autologa, il PRP non presenta rischi di trasmissione di malattie veicolate dal sangue (Marx 2004, Nixon 2008). Il PRP ha un pH di 6.5-6.7 rispetto ad un pH di 7-7.2 di un coagulo maturo, potrebbe perciò inibire la crescita batterica (Marx 2004). Ciononostante il rispetto della sterilità durante la fase di preparazione e somministrazione è fondamentale.

La quantità di piastrine presenti determina la velocità e l'efficienza di guarigione di una lesione; il PRP ne aumenta la concentrazione fisiologica (Marx 2004).

Haynesworth e collaboratori hanno dimostrato che la proliferazione e la differenziazione di cellule staminali umane iniziano a concentrazioni piastriniche 4-5 volte maggiori rispetto a quella fisiologica (Marx 2004, Everts 2007, Mazzucco 2008, Monteiro 2008, Maia 2009). Lu e collaboratori hanno riscontrato che la proliferazione fibroblastica e la sintesi di collagene di tipo 1 sono incrementate da quantità crescenti di piastrine (Lu 2001, Marx 2004, Everts 2007).

In accordo con altri Autori Anitua ha indicato che la concentrazione minima necessaria perché un PRP correttamente preparato possa esercitare un efficace effetto terapeutico a livello tissutale sia pari a 300×10^3 piastrine μl^{-1} (Anitua 2004, Maia 2009). Tuttavia non è corretto sostenere che più fattori di crescita sono presenti nel PRP, più efficace sarà il trattamento: i fattori di crescita esercitano la loro azione legandosi a recettori di membrana delle cellule bersaglio, perciò una volta saturati i recettori, un incremento ulteriore di fattori di crescita non darà alcun beneficio. In alcuni studi è stato riscontrato che il PRP, in certi tessuti, può avere effetti antinfiammatori o proinfiammatori in base alla sua concentrazione. Dati emergenti sembrano indicare che,

nell'uomo, concentrazioni di piastrine pari a 4-6 volte quella fisiologica abbiano effetti antinfiammatori, mentre concentrazioni di 8-13 volte abbiano effetti proinfiammatori. (Weibrich, 2002) Al contrario altri studi hanno dimostrato effetti benefici di concentrazioni maggiori di piastrine (Crane ed Everts 2008).

I vantaggi del PRP dunque sono rappresentati da: la sua natura autologa (importante riduzione del rischio di *Graft Versus Host Disease*), l'elevata concentrazione di fattori di crescita, la sicurezza del preparato (assenza di capacità mutageniche e trasmissione di malattie veicolate dal sangue, rischio remoto di reazioni o effetti collaterali), il basso costo, l'attrezzatura pratica e poco ingombrante, la facilità di preparazione ed applicazione. Lo svantaggio principale è rappresentato dalla variabilità del prodotto ottenuto per quanto riguarda la quantità di piastrine e di leucociti presenti (Marx 2004, Nixon 2008, Sampson 2008, Fortier 2008). Nell'uomo, nel quale è elevato il rischio di patologie trombotiche, è consigliabile non utilizzare il PRP in prossimità di grossi vasi poiché il concentrato di piastrine contiene fattori protrombotici quali le chemochine, il fattore tissutale e IL-1 (Anitua 2004).

1.2.3: Il ruolo del PRP nel meccanismo di guarigione delle ferite

Il processo di guarigione delle ferite comprende una serie di complessi eventi, che prevedono interazioni cellula-cellula e cellula-matrice, regolati dai fattori di crescita (Everts 2007). Esso è un complesso meccanismo che include coagulazione, infiammazione, sintesi di matrice, angiogenesi, fibroplasia, epitelizzazione, contrazione della ferita e rimodellamento; per maggior chiarezza tali processi vengono raggruppati in quattro fasi tra loro distinte ma temporalmente in parte sovrapposte: emostasi, infiammazione, proliferazione e rimodellamento (Rožman 2007)

Nelle ferite, anche chirurgiche, il meccanismo di riparazione inizia le seguenti fasi: formazione del tappo piastrinico, attivazione della cascata della coagulazione e degranolazione piastrinica seguita dal rilascio dei fattori di

crescita (Everts 2007), il cui ruolo centrale nei processi di guarigione e formazione tissutale è ormai riconosciuto.

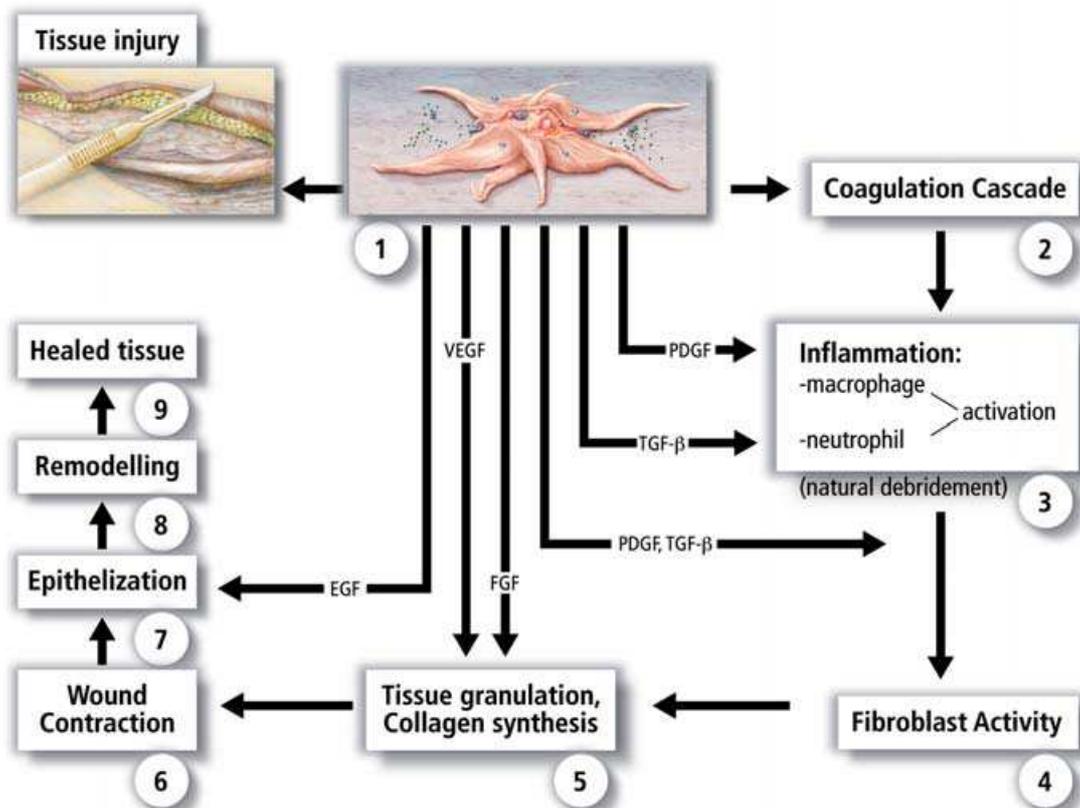


Fig. 5: Ruolo del PRP nel meccanismo di guarigione (Everts 2007 modificato)

Nei primi due giorni del processo di guarigione ha inizio la fase infiammatoria (Fig. 5) per migrazione di neutrofili e successivamente macrofagi nel sito della ferita. A loro volta, i macrofagi attivati rilasciano i fattori di crescita, in particolare TGF β , PDGF, IL-1 e FGF. Le fasi di angiogenesi e fibroplasia, che iniziano dopo circa tre giorni, sono seguite da una fase fondamentale, quale la sintesi del collagene. Tale processo termina con le fasi successive di epitelizzazione e rimodellamento (Everts 2007).

Il ruolo nella guarigione tendinea

Il processo di guarigione tendinea è determinato dall'azione interattiva di numerose popolazioni cellulari, che intervengono nelle diverse fasi del meccanismo riparativo. La fisiopatologia delle lesioni tenodesmiche può essere suddivisa in quattro fasi: fase infiammatoria acuta, fase subacuta di

proliferazione (o di riparazione) e fase cronica di rimodellamento (Smith 2003, Molloy 2005, Sharma 2006). In ognuna di tali fasi i fattori di crescita e gli altri mediatori intervengono regolandone un corretto andamento.

Per quanto riguarda la spiegazione del ruolo dei fattori di crescita nelle diverse fasi del processo riparativo si rimanda al capitolo successivo, nel quale verrà illustrato più dettagliatamente.

Il ruolo nella guarigione ossea

Il processo di guarigione del tessuto osseo, sia nella riparazione di fratture sia in condizioni legate ad altri meccanismi di fusione, è un delicato equilibrio tra deposizione, riassorbimento e rimodellamento regolato da precisi e numerosi meccanismi biochimici, biomeccanici, cellulari e patologici (Perazzi 2008). Durante la guarigione ossea vi è un equilibrio tra l'azione degli osteoblasti e degli osteoclasti; in questa fase le piastrine agiscono come una fonte esogena di fattori di crescita andando a stimolare l'attività delle cellule del tessuto osseo: in particolare vengono rilasciati PDGF, TGF- β ed EGF (Everts 2007).

L'attitudine del tessuto osseo alla guarigione si basa su tre meccanismi fondamentali: osteogenesi, osteoinduzione ed osteoconduzione: nella regolazione e nella stimolazione di questi processi biomeccanici e cellulari il concentrato piastrinico riveste un ruolo fondamentale in particolar modo per quanto concerne la mitogenesi, la chemotassi e la differenziazione delle cellule staminali (Everts 2007).

Il ruolo nella guarigione dei tessuti molli e delle ferite

È stato osservato e positivamente sostenuto l'efficace ruolo del concentrato piastrinico nel trattamento di ferite cutanee sia superficiali che profonde (ad esempio le ulcere podali nei pazienti diabetici): in tali casi infatti il PRP, che viene applicato dopo attivazione con sostanze che ne consentono la gelificazione, nella zona interessata permette di ottenere migliori risultati sia in termini di cicatrizzazione della ferita sia in termini di riduzione dell'edema, delle

infezioni e del dolore post-operatorio con una conseguente riduzione dei tempi di ricovero ed una più rapida ripresa del paziente (Everts 2007). In particolare, nel meccanismo di guarigione interviene in modo attivo il VEGF che stimola i tessuti promuovendo una buona angiogenesi.

1.2.4: Metodiche di preparazione

La centrifugazione del sangue intero costituisce il cardine per la produzione di emocomponenti: dalla lavorazione del sangue si possono ottenere diversi emocomponenti, come illustrato dalla seguente tabella (Tab 3).

ERITROCITI	LEUCOCITI	PIASTRINE	PLASMA
<ul style="list-style-type: none"> • Emazie concentrate • Emazia concentrate private del buffy coat • Emazia concentrate con aggiunta di soluzioni additive • Emazia concentrate private del buffy coat e risospese in soluzioni additive • Emazia lavate • Emazia leucodeplete • Emazia irradiate • Emazia congelate • Concentrato di emazia da aferesi 	<ul style="list-style-type: none"> • Concentrato granulocitario da aferesi • Cellule staminali emopoietiche periferiche 	<ul style="list-style-type: none"> • Concentrato piastrinico (CP) da aferesi • CP da plasma-piastrinoafèresi • CP da singola unità di sangue intero • CP da pool di buffy coat • CP lavato • CP irradiato • Piastrine crioconservate • Gel piastrinico 	<ul style="list-style-type: none"> • Plasma fresco congelato • Crioprecipitato • Plasma privo di crioprecipitato • Colla di fibrina <p><i>PLASMADERIVATI</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Albumina e soluzioni di proteine plasmatiche • Immunoglobuline • Fattori della coagulazione

Tab. 3: emocomponenti derivanti dalla lavorazione del sangue

Esistono diverse metodiche per concentrare le piastrine autologhe (Zachos 2005); prevedono il prelievo di sangue dal singolo paziente in anticoagulante acido-citrato-destrosio (ACD) o citrato fosfato destrosio (CPD) seguito dalla centrifugazione che separerà le piastrine dagli altri componenti ematici (Sutter 2004, Woodell-May 2005, Everts 2007, Anitua 2007, Mazzucco 2008, Dohan 2009). L'uso dell'EDTA non è raccomandato perché provoca frammentazione delle piastrine (Sanchez 2003, Setter 2008). Dalla lavorazione delle piastrine è possibile ottenere: PRP puro, PRP ricco di leucociti, PRP povero di leucociti e ricco di fibrina e PRP ricco di leucociti e di fibrina (Dohan 2009).

Per quanto riguarda la produzione di PRP, tradizionalmente i metodi venivano divisi in tre categorie: metodo del buffy coat, metodo dell'aferesi e "tube method" (Setter 2004, Carmona 2006).

Tuttavia con lo sviluppo di un sempre maggior numero di metodiche per concentrare le piastrine è difficile includere tutti i sistemi in queste tre categorie. Pertanto si ritiene più funzionale dividere le metodiche di preparazione in *sistemi manuali* e *sistemi semi-automatizzati* (Setter 2004). Tutte le tecniche possiedono vantaggi e svantaggi e non è stato ancora riconosciuto il metodo ideale per concentrare le piastrine (Carmona 2006). La maggior parte delle tecniche è stata sviluppata in medicina umana ma diversi studi hanno dimostrato che non è necessario modificare in modo sostanziale tali protocolli per concentrare in modo efficace le piastrine degli animali domestici (Sutter 2004, Carmona 2006, Arguelles 2006, Fasce 2008, Kaneps 2008).

Nei ***sistemi manuali*** l'operatore ha il controllo sull'interfaccia eritrociti/plasma e può così effettuare aggiustamenti in base al PCV (Sutter 2004).

Il metodo dell'aferesi richiede operatori esperti e l'impiego di tecnologia avanzata, pertanto non è applicabile in una situazione ambulatoriale.

L'aferesi è una procedura che permette di ottenere dal donatore una specifica componente del sangue con l'aiuto di un'apposita macchina. Questo strumento immette il sangue in un circuito sterile e, mediante un processo di centrifugazione e filtrazione, lo separa consentendo la raccolta degli emocomponenti desiderati: plasma e piastrine. Richiede un volume di sangue maggiore (in media 450 ml) rispetto alle altre tecniche, ma la sua efficacia nel

concentrare piastrine e fattori di crescita è riconosciuta. Il suo vantaggio principale consiste nel bassissimo rischio di contaminazione batterica (Sutter 2004, Carmona 2006). La concentrazione delle piastrine avviene mediante un processo di centrifugazione discontinuo, utilizzando un'unità di aferesi a cui sono collegate tre sacche: una per il plasma, una per il buffy coat ed una per l'aria. Il metodo di centrifugazione discontinuo permette il ricircolo del sangue all'interno della camera, in modo da massimizzare la raccolta delle piastrine. Per ottenere una concentrazione di piastrine ancora maggiore, è possibile filtrare il concentrato di piastrine dopo l'aferesi (Setter 2004).

Il metodo del buffy coat consente un'ottima concentrazione delle piastrine, ma allo stesso tempo concentra anche i leucociti. È un metodo semplice e veloce che rende possibile l'impiego ambulatoriale. Il rischio di contaminazione batterica è maggiore rispetto a quello dell'aferesi ma in ogni caso limitato (Sutter 2004). Sono in commercio kit monouso per l'ottenimento del PRP mediante questa tecnica, tuttavia il loro costo ancora elevato (Sutter 2004, Carmona 2006, Dohan 2009): tutti si basano sul meccanismo di separazione del sangue, mediante centrifugazione, in tre strati, plasma povero, buffy coat ed eritrociti. In uno studio eseguito nel 2004 Sutter, utilizzando campioni di sangue intero equino, mette in comparazione il metodo del buffy coat con il metodo dell'aferesi per valutarne l'efficacia nella concentrazione di piastrine e di GFs, nello specifico TGF- β e IGF: l'autore descrive come ugualmente validi entrambi i metodi nella capacità di concentrare le piastrine ed i fattori di crescita suddetti in base a quanto necessario, con una miglior attitudine dell'aferesi nel concentrare TGF- β e IGF (Sutter 2004).

Nella scelta di una metodica di preparazione sarebbe importante conoscere la reale capacità della tecnica nel concentrare non solo le piastrine ma anche i singoli fattori di crescita: è possibile effettuare il dosaggio dei singoli GFs utilizzando appositi kit commerciali ELISA (Quantikine, R&D System, Minneapolis USA), appositamente validati per i diversi fattori di crescita (Everts 2006, Schmidmaier 2006).

Il "tube method" manuale, proposto inizialmente da Anitua, è una tecnica semplice ed economica che prevede la centrifugazione del sangue, raccolto in

apposite provette contenenti anticoagulante, secondo differenti protocolli. Il sangue viene dunque lavorato con diverse centrifugazioni a differente velocità per ottenere la separazione degli emocomponenti ma richiede stretta asepsi per evitare le contaminazioni batteriche. Questa tecnica concentra un minor numero di piastrine, e quindi di fattori di crescita, rispetto al buffy coat ed all'aferesi ma anche un minor numero di leucociti (Anitua 2004, Carmona 2006, Dohan 2009). È una tecnica economica e richiede attrezzature poco complesse (Prades 2006).

I **sistemi semi-automatizzati** sono di norma più rapidi e pratici ma richiedono una più rapida curva di apprendimento da parte dell'operatore. Esistono numerosi dispositivi semi-automatizzati messi in commercio per concentrare le piastrine umane: normalmente sono composti da un sistema di centrifugazione e da kit monouso.



Fig. 6: Alcuni dei dispositivi disponibili (Mazzucco, modificato)

Tra le diverse tipologie di kit disponibili in commercio è possibile ricordare:

NOME COMMERCIALE KIT	DITTA PRODUTTRICE
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
Friident Schütze PRP Kit®	Friident 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

I diversi dispositivi di centrifugazione utilizzano la forza centrifuga ed una tecnica di elutriazione controcorrente oppure un sistema di separazione basato sul peso specifico. I primi sono dispositivi monouso e di conseguenza molto costosi, fattore che ne limita l'impiego in campo veterinario. Diffuso è invece l'utilizzo del sistema di separazione basato sul peso specifico, il quale trattiene

la massa eritrocitaria durante la decantazione del plasma ricco di piastrine e del buffy coat. Il plasma arricchito di piastrine si concentra per centrifugazione tra il plasma povero di piastrine sovrastante ed il buffy coat leucocitario (Nixon 2008). Vi è tuttora speculazione sugli effetti dei leucociti (Zimmermann 2008) nel PRP utilizzato per stimolare la guarigione. Quantità di leucociti maggiori rispetto a quelle del sangue sono in genere accettabili nei concentrati di piastrine autologhe (Sutter 2004, Anitua 2007). In medicina umana, dove la trasfusione di concentrati piastrinici omologhi è utilizzata in primis nella terapia trasfusionale di pazienti affetti da gravi piastrinopenie e/o piastrinopatie, è noto che tale trasfusione può determinare effetti collaterali causati dai leucociti che residuano in tali preparazioni: allo immunizzazione HLA, refrattarietà alla trasfusione piastrinica, reazioni febbrili non emolitiche o altre complicazioni trasfusionali (Sutter 2004, Dijkstra-Tiekstra 2005). Per la prevenzione di tali complicanze è stato proposto da diversi anni, di trasfondere concentrati piastrinici aventi un numero di leucociti $<5 \times 10^5$ per unità (Misso 2001). Non vi sono dati che accertino se l'azione dei leucociti sia benefica o meno per la riparazione tissutale (Nixon 2008, Dohan 2009, Dohan-Ehrenfest 2009). Fortier e colleghi hanno riscontrato che nel PRP applicato fresco (senza precedente congelamento) vi è una correlazione tra la concentrazione leucocitaria e l'aumento dell'espressione di mediatori della flogosi; Fortier consiglia la scelta di un PRP con un'elevata concentrazione di piastrine ed una bassa concentrazione di leucociti, in modo da sfruttare al massimo gli effetti antinfiammatori del TGF- β e limitare il catabolismo (Fortier 2008). Inoltre alcuni autori sostengono che vi è un rapporto tra la concentrazione dei leucociti nel PRP e l'accumulo di citochine infiammatorie quali IL-1, IL-6, IL-8 e TNF tra il 2° ed il 7° giorno in concentrati piastrinici conservati a temperatura ambiente. I leucociti sono maggiormente attivi a 22°C e l'incremento dei mediatori dell'infiammazione deriva dalla sintesi e dal rilascio leucocitari (Fortier 2008). Altri autori al contrario, come riportato da Dohan, sostengono che la presenza di leucociti in un concentrato piastrinico possa influenzare positivamente il processo di guarigione tissutale promuovendo la migrazione dei macrofagi e stimolando, attraverso la sintesi di VEGF, l'angiogenesi del tessuto neoformato

(Rožman 2007, Dohan 2009, Dohan-Ehrenfest 2009). L'influenza dei leucociti sulla biologia di ogni prodotto e dei suoi potenziali benefici, in termini di guarigione tissutale, dovrebbero essere analizzati in modo più preciso in modo da poter spiegare i molti dati controversi della letteratura (Dohan 2009). I diversi dispositivi presenti in commercio consentono di ottenere concentrazioni di piastrine generalmente variabili dalle 2 alle 6 volte rispetto al valore basale: tuttavia come indicato da Mazzucco nel 2008, sarebbe importante andare a 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 sia presente un numero sufficiente di GFs per ottenere l'effetto terapeutico auspicato (Borzini 2004, Mazzucco 2008). Le piastrine infatti sono particolarmente labili e sensibili ad ogni tipo di evento stressante durante la fase di lavorazione ed applicazione; per tale ragione anche la concentrazione di fattori di crescita può venir influenzata dalla manipolazione delle piastrine durante la processazione del sangue.

Produzione di gel piastrinico

Addizionando trombina al concentrato piastrinico è possibile gelificare il composto (Sutter 2004) : il prodotto che ne deriva ha una significativa capacità adesiva, dovuta in gran parte ai livelli elevati di fibrinogeno (Nixon 2008). Per evitare reazioni anticorpali legate all'utilizzo della trombina bovina (Landesberg 2005), oggigiorno si utilizzano di norma metodi alternativi per ottenere il gel piastrinico, come la trombina bovina sottoposta ad ulteriore purificazione, la trombina umana ricombinante, la trombina autologa o altre sostanze come il cloruro di calcio (Sanchez 2003, Anitua 2004, Everts 2007) o la batroxobina. Quest'ultimo è un enzima sierico, isolato dal veleno di *Bothrops atrox* attraverso opportuni processi di purificazione, che ha un effetto trombina-simile a livello di attivazione piastrinica (Rožman 2007).



Una volta ottenuto il gel può essere posizionato direttamente sulla lesione e fungere inoltre come supporto per l'applicazione di ulteriori medicinali (Everts 2007, Rožman 2007). Il prodotto può essere aliquotato e congelato a -40°C per utilizzarlo in diverse applicazioni nel tempo.

Il gel piastrinico viene utilizzato anche in campo veterinario sotto forma di spray superficiale nelle ferite o nella riparazione della cartilagine, in modo da sfruttare le sue caratteristiche di autoaderenza e malleabilità (Nixon 2008).



Per il trattamento di lesioni tenodesmiche invece si preferisce utilizzare il concentrato piastrinico in forma liquida: il PRP viene infatti attivato dal contatto con il collagene e da altri fattori di attivazione apportati dalle piastrine presenti nel coagulo fisiologico (Fortier 2008, Nixon 2008, Setter 2008).

1.3: UTILIZZO TERAPEUTICO DEL PRP

1.3.1: Introduzione

L'utilizzo del concentrato piastrinico a scopo terapeutico rappresenta una tecnologia relativamente nuova nel campo della medicina rigenerativa: il concetto che sta alla base dell'uso clinico del concentrato piastrinico è basato sulla capacità delle piastrine di rilasciare i fattori di crescita (peptici che promuovono la proliferazione e la differenziazione cellulare, la chemotassi e la migrazione di varie cellule coinvolte nei meccanismi di guarigione tissutale). Introdotto inizialmente in medicina trasfusionale per la cura di patologie ematologiche, il trattamento con i fattori di crescita rilasciati dal concentrato piastrinico ha visto negli anni uno sviluppo in diversi campi della medicina, in ragione soprattutto della sua versatilità, biocompatibilità e ridotto costo (Gobbi 2007).

1.3.2: Campi di applicazione in medicina umana

Il concentrato piastrinico è stato utilizzato per la prima volta nel 1987 nel corso di una chirurgia cardiaca, come descritto da Ferrari, dopo un intervento “a cuore aperto” per fornire componenti trasfusionali autologhe senza ricorrere ad una trasfusione omologa (Everts 2007). Numerosi studi sperimentali e clinici realizzati in questi anni sia in medicina umana che in medicina veterinaria hanno permesso di studiare in modo più approfondito l'efficacia del concentrato piastrinico e la possibilità di utilizzarlo routinariamente come supporto terapeutico per diverse patologie (Everts 2007, Rožman 2007). In un lavoro pubblicato nel 2007 Everts analizza i lavori pubblicati fino ad allora, in medicina umana, riguardanti progetti clinici o sperimentali finalizzati allo studio del concentrato piastrinico e del suo utilizzo.

Nella tabella sottostante vengono riportati i lavori presenti in letteratura nei quali il PRP sia stato studiato in modelli animali (Everts 2007).

AUTORE	ANNO	SPE CIE ANIMALE	CAMPO APPLICAZIONE	NUMERO ANIMALI	OUTCOME
Kim	2001	Coniglio	Chirurgia maxillo-facciale	20	+
Kim	2002	Cane	Chirurgia maxillo-facciale	12	+
Aghaloo	2002	Coniglio	Chirurgia maxillo-facciale	15	-
Tennis	2002	Capra	Chirurgia maxillo-facciale	28	+
Kim	2002	Cane	Chirurgia maxillo-facciale	12	?
Furst	2003	Minipig	Chirurgia maxillo-facciale	12	±
Jakse	2003	Pecora	Chirurgia maxillo-facciale	12	±
Schlegel	2003	Maiale	Chirurgia impiantare ossea	15	±
Zechner	2003	Minipig	Chirurgia impiantare dentale	12	+
Aghaloo	2004	Coniglio	Chirurgia maxillo-facciale	15	±
Choi	2004	Cane	Chirurgia maxillo-facciale	8	-
Tennis	2004	Capra	Chirurgia maxillo-facciale	28	+
Li	2004	Maiale	Chirurgia spinale	10	-
Yazawa	2004	Coniglio	Chirurgia maxillo-facciale	10	+
Weibrich	2004	Coniglio	Chirurgia maxillo-facciale	24	+
Aghaloo	2005	Coniglio	Chirurgia maxillo-facciale	15	-
Butterfield	2005	Coniglio	Chirurgia maxillo-facciale	12	-
Tennis	2005	Capra	Chirurgia maxillo-facciale	6	+
Grageda	2005	Pecora	Chirurgia maxillo-facciale	10	-
Kovacs	2005	Cane	Chirurgia maxillo-facciale	10	+
Pryor	2005	Ratto	Chirurgia maxillo-facciale	30	-
Ranly	2005	Topo	Chirurgia ortopedica	30	-
Scalani	2005	Coniglio	Trattamento ferite	?	+

Analizzando inoltre la letteratura riguardante gli studi clinici di medicina umana Everts riporta i principali lavori pubblicati, che vengono raggruppati nella sottostante tabella (Tab 4).

AUTORE	ANNO	TIPOLOGIA STUDIO	CAMPO APPLICAZIONE	NUMERO PAZIENTI	OUTCOME
Knighton	1990	1	Trattamento ferite	32	+
Marx	1998	1	Chirurgia maxillo-facciale	88	+
Anitua	1999	8	Chirurgia maxillo-facciale	20	+
Lowery	1999	2	Chirurgia spinale	19	±
Anitua	2001	8	Chirurgia maxillo-facciale	3	-
Blumenkranz	2001	8	Chirurgia oftalmica	121	+
Man	2001	8	Chirurgia plastica	20	+
Margolis	2001	2	Trattamento ferite	26.599	+
Petrungaro	2001	8	Chirurgia maxillo-facciale	3	+
Powell	2001	3	Chirurgia plastica	8	+
Shanaman	2001	8	Chirurgia maxillo-facciale	3	-
Adler	2002	8	Chirurgia plastica	20	+
Froum	2002	8	Chirurgia maxillo-facciale	3	-
Robiony	2002	8	Chirurgia maxillo-facciale	5	+
Valbonesi	2002	8	Chirurgia plastica	14	+
Weiner	2002	8	Chirurgia spinale	57	-
Castro	2004	5	Chirurgia spinale	84	-
Proveti	2004	8	Trattamento ferite	24	+
Giannini	2004	4	Chirurgia maxillo-facciale	5	+
Mazzucco	2004	8	Trattamento ferite	22	+
Camargo	2005	1	Chirurgia maxillo-facciale	18	+
Carreon	2005	6	Chirurgia spinale	152	-
Englert	2005	6	Chirurgia cardio-toracica	30	+
Merkx	2005	8	Chirurgia maxillo-facciale	8	+
Kassolis	2005	7	Chirurgia maxillo-facciale	10	+
Savarino	2005	1	Chirurgia ortopedica	10	+
Steigman	2005	4	Chirurgia maxillo-facciale	20	+
Everts	2006	1	Chirurgia ortopedica	164	+

Tab. 4: 1: studio prospettico randomizzato, 2: studio clinico retrospettivo, 3: studio prospettico doppio cieco, 4: studio clinico con autocontrollo, 5: studio prospettico con controllo, 6: studio retrospettivo con controllo, 7: studio prospettico singolo cieco, 8: studio clinico (Everts 2007 modificato)

L'autore, analizzando i singoli studi sperimentali e clinici, sottolinea il fatto che vengano riportati dati e risultati tra loro contrastanti, poiché in alcuni casi il concentrato piastrinico non sembra portare gli effetti benefici sperati con il trattamento; tuttavia in alcuni di questi, il campione oggetto di studio si compone numericamente di pochi soggetti ed in altri casi non è chiaro se i concentrati piastrinici utilizzati fossero perfettamente conservati e debitamente attivati; per

tale ragione l'autore suggerisce di valutare con molta cautela i risultati e le conclusioni alle quali giungono gli autori che non hanno notato un effetto benefico del PRP (Everts 2007). Attualmente, nell'uomo, il PRP viene impiegato (Everts 2007) con successo in odontoiatria (Rožman 2007), chirurgia dei tessuti duri e molli (inclusa chirurgia maxillofacciale, cardiovascolare e plastica), in ortopedia e per il trattamento delle ferite, soprattutto piaghe da decubito (Marx 2004). Il PRP viene impiegato sempre con maggior frequenza ed efficacia per il trattamento di molte patologie muscolo-scheletriche, sia acute che croniche: tendinopatie, tendinosi, strappi e fibrosi muscolare, stiramenti legamentosi, lassità di capsula articolare, artrite, artrofibrosi, difetti della cartilagine articolare, lesioni ai menischi, sinoviti croniche e flogosi articolare. Numerosi sono i risultati di studi clinici che depongono a favore dell'utilizzo del PRP nell'uomo per patologie ossee, tenodesmiche ed articolari (Aldegheri 2002, Sanchez 2003, Anitua 2004, Marx 2004, Crane 2008, Sampson 2008). Oltre al beneficio apportato ai meccanismi di guarigione, il PRP sembra anche avere la capacità di alleviare il dolore muscolo-scheletrico, permettendo una precoce ripresa dell'attività fisica. Si suppone che questo effetto sia apportato dalla serotonina presente nei granuli densi piastrinici (Crane 2008, Everts 2008). È stato notato inoltre che l'uso del concentrato di piastrine elimina la necessità di drenaggi e di bendaggi compressivi ed elastici al termine dell'operazione. Il PRP ha proprietà antinfiammatorie, battericide, rigenerative ed emostatiche. Il PRP infine è anche usato nella riparazione retinica in pazienti con fori maculari idiopatici, dato che aumenta la proliferazione cellulare durante la guarigione di lesioni retiniche (Korobelnik 1966).

Utilizzo in odontoiatria e chirurgia maxillo-facciale

Il concentrato piastrinico autologo fu per la prima volta usato da Whitman nella chirurgia orale e maxillo-facciale come procedura aggiuntiva correlata al posizionamento di impianti al titanio integrati nell'osso (Anitua 2004). L'utilizzo del gel piastrinico, nella sua forma gelificata, si è dimostrato efficace nel trattamento chirurgico delle brecce alveolari e nel trattamento delle fistole

oronasali in combinazione con osso da impianto (Marx 2004). L'attitudine osteogenica del gel piastrinico viene peraltro sfruttata nella chirurgia impiantare dove il rilascio dei fattori di crescita contenuti nei granuli piastrinici stimola la formazione di osso nel sito determinando un più efficace posizionamento dell'impianto. I benefici vengono individuati nell'arresto immediato del sanguinamento ed in una riduzione del rischio di dispersione del materiale utilizzato; il successivo rilascio dei GFs piastrinici determina una più rapida maturazione degli innesti accrescendo il rimodellamento e la mineralizzazione, aumenta il potere osteoconduttivo dei materiali osteosostitutivi e favorisce la cicatrizzazione riducendo il rischio di deiscenza dell'innesto e quello della contaminazione batterica (Dean 1997, Marx 2004)

Le piastrine vengono attivate nel sito di estrazione dentaria come naturale conseguenza del danno vasale, e la rigenerazione ossea si ottiene posizionando una fonte addizionale di piastrine autologhe in un coagulo di fibrina nel sito di estrazione ed intorno all'impianto. Successivamente Marx ha valutato l'effetto del PRP autologo durante l'innesto osseo nella ricostruzione di continuità mandibolari: è stato concluso che l'aggiunta del PRP aumenta la velocità ed il grado di formazione ossea, dal momento che PDGF e TGF- β presenti nelle piastrine vengono adsorbiti nell'impianto (Anitua 2004). Con l'uso del PRP, è stato possibile osservare radiograficamente un significativo aumento del tessuto osseo circa 2 mesi dopo il trattamento chirurgico. Si suppone anche che il PRP acceleri la guarigione di tessuti molli promuovendo una più rapida neovascolarizzazione e riepitelizzazione dei flap ottenuti in seguito all'incisione chirurgica (Anitua 2004).

Da altri autori è stato proposto l'utilizzo di concentrato piastrinico addizionato a fibrina autologa (platelet rich fibrin – PRF): tale matrice di fibrina autologa ricca di piastrine e fattori di crescita ottenuta a partire da prelievo ematico può essere realizzata contestualmente all'intervento chirurgico ed applicato in diversi settori della chirurgia impiantare e maxillo-facciale. Miscelato, ad esempio, ai materiali di riempimento sinusale, il PRF funziona sia da legante tra i frammenti ossei sia da matrice favorente la neoangiogenesi e la migrazione delle cellule osteo-progenitrici fino all'interno dell'innesto. Le citochine piastriniche contenute nella

matrice ed in particolare PDGF, TFG- β e IGF verranno progressivamente rilasciate durante il fisiologico riassorbimento della matrice fibrinica e questo permette di ottenere un processo cicatriziale protetto da aggressioni esterne. Recentemente è stato provato come le cellule osteoblastiche manifestino verso il PRF una sensibilità spiccata che si evidenzia con un aumento della proliferazione e della differenziazione (Del Corso 2006)

Utilizzo in chirurgia plastica

Le piastrine autologhe sono utili soprattutto per la rigenerazione di tessuti molli e duri nella chirurgia plastica facciale e ricostruttiva (Anitua 2004). Il loro uso è stato largamente limitato, in passato, dall'uso della colla di fibrina, utilizzata soprattutto per ottenere emostasi e aderenza dei flap cutanei. Uno studio condotto da Man nel 2001 dimostra che l'uso di colla di fibrina autologa e di gel piastrinico in interventi chirurgici estetici elimina la necessità di drenaggi, riduce il dolore post-operatorio ed il gonfiore e migliora la guarigione delle ferite. In ulteriori studi è stato verificato che il trattamento con PRP previene, o comunque riduce, l'ecchimosi e l'edema delle prime fasi del recupero post-operatorio (Anitua 2004, Eppley 2006).

Utilizzo nel trattamento delle ulcere

La dimostrazione dell'efficacia del gel piastrinico nel favorire la rigenerazione ossea ha indotto ad esplorare (Fig 7), con ottimi



Fig.7 Trattamento di lesioni ulcerative (Everts 2007 modificato)

risultati, la possibilità di sottoporre allo stesso trattamento lesioni cutanee (ulcere, piaghe, lesioni croniche), indipendentemente dalla loro natura (traumatica, vascolare, neuropatica, diabetica...) per ridurre il tempo di guarigione e diminuire, anche in modo significativo, i costi relativi alla degenza dei pazienti (Anitua 2004).

Utilizzo in chirurgia ortopedica

La terapia con PRP viene presa in considerazione in caso di tendinopatie persistenti e resistenti alle cure tradizionali, in caso di lesioni muscolari di varia entità, in caso di lesioni legamentose (Fig. 8), nelle fasi iniziali dell'artrosi ed in generale nelle patologie della cartilagine.

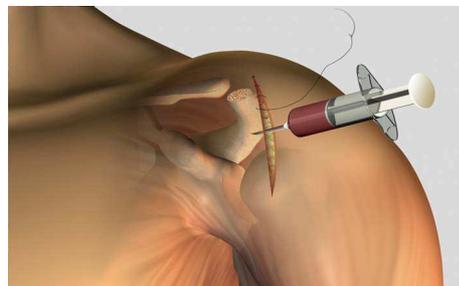
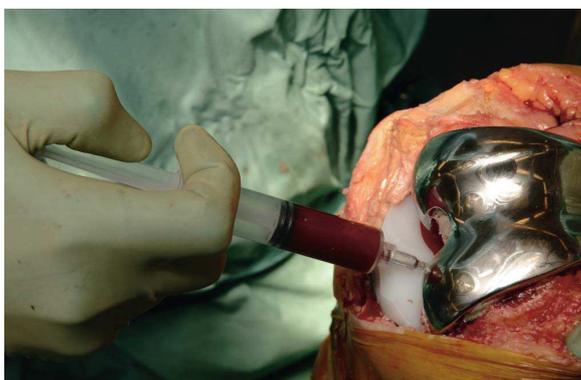


Fig.8: Trattamento di lesioni tenodesmiche (Everts 2007 modificato)

Il concentrato piastrinico può essere utilizzato per il trattamento di lesioni intra-articolari:

ne sono un esempio i trattamenti di processi artritici ed artrofibrotici, di difetti cartilaginei e di lesioni meniscali, di sinoviti croniche o di infiammazioni articolari (Everts 2007, Crane 2008). Le tecniche chirurgiche tradizionali infatti quali il lavaggio articolare, lo “shaving” o la condroplastica hanno un effetto solo temporaneo e non determinano formazione di nuovo tessuto di matrice ialina. Il trapianto cartilagineo invece ha dimostrato la capacità di rigenerare tessuto cartilagineo di tipo ialino: in particolar modo, grazie agli “scaffold” di tessuto bioingegnerizzato su cui vengono seminati i condrociti autologhi, si evita di dover prelevare un lembo periostale ma resta la necessità di effettuare 2 interventi chirurgici. Al momento attuale risulta molto interessante il possibile impiego delle cellule mesenchimali autologhe concentrate (MSCs), isolate da midollo osseo ed impiantate in un unico intervento chirurgico (“one step”), combinate all’impiego di un biomateriale, come il concentrato piastrinico, da utilizzare come *scaffold* per la copertura dell’innesto (Gobbi 2007). Everts in uno studio pubblicato nel 2007 descrive gli effetti benefici ottenuti grazie



all’utilizzo di concentrato piastrinico in soggetti sottoposti ad artroplastica totale di ginocchio (Fig. 9) in termini di miglioramento del *range of motion*, di durata del ricovero e di incidenza di artrofibrosi (Everts 2007).

Fig.9: Trattamento periprotetico (Everts 2007 modificato)

Si stanno considerando ulteriori utilizzi del concentrato di piastrine nella riparazione di fratture ossee complicate e nel riposizionamento articolare in seguito a lussazioni: è stato ipotizzato infatti che le piastrine, attraverso il rilascio di fattori di crescita, abbiano effetti chemotattici e mitogeni sulle cellule staminali mesenchimali ed osteoblastiche e che accelerino il rimodellamento osseo (Anitua 2004, Everts 2007). Gli interventi di osteosintesi ed il riempimento di cavità insieme a matrice ossea costituiscono un ambito di applicazione primario per gli effetti sulla rigenerazione ossea dei fattori di crescita. È documentato inoltre il ruolo fondamentale dei fattori di crescita endogeni, tra cui IGF-1, TGF- β , VEGF, PDGF ed FGF, nella riparazione di tendini e legamenti: essi infatti partecipano alle fasi di flogosi, proliferazione cellulare e rimodellamento tissutale (Sutter 2004, Rožman 2007). Inoltre Anitua ha sperimentato con risultati incoraggianti l'uso del concentrato piastrinico autologo attivato con calcio nella riparazione di lesioni muscolari e del tendine calcaneale (Anitua 2004). Scarpone ha riportato risultati positivi ottenuti in un gruppo di 14 pazienti con forte dolore alla spalla secondario alla rottura della *Cuffia dei rotatori* trattati con infiltrazioni di PRP: nello studio non sono stati rilevati effetti collaterali ma è stata riportata invece un'importante risposta in termini di effetto analgesico apportato dalla terapia (Scarpone 2008). Risultati analoghi, in termini di riduzione del dolore post-operatorio e di accorciamento dei tempi necessari per il completo recupero funzionale del paziente, sono stati riportati anche da Barbieri, che descrive l'efficacia del PRP utilizzato in corso di artroscopia per il trattamento di lesioni a carico della *Cuffia dei rotatori* (Barbieri 2008). Uno studio sperimentale compiuto su modello animale (ratto) ha messo in evidenza l'effetto positivo del concentrato piastrinico nello stimolare la proliferazione dei tenociti e la sintesi di collagene di tipo I nei primi giorni dopo la sua applicazione: scopo del suddetto lavoro, presentato nel 2009, è stato quello di verificare l'efficacia e la sicurezza del PRP nella riparazione di lesioni subtotali sperimentalmente indotte nel tendine calcaneale di ratto; gli autori riportano una maggiore proliferazione e sintesi collagenica della linea fibroblast-like (tenociti) nei soggetti trattati con PRP rispetto ai controlli (Busilacchi 2009).

Utilizzo in chirurgia oftalmica

Un nuovo potenziale utilizzo delle piastrine è applicabile nella riparazione dei fori maculari retinici: sono difetti retinici a tutto spessore nell'area foveare, che è avascolare e particolarmente sottile, e per questo maggiormente predisposta alla formazione di lesioni con scarsa tendenza alla guarigione (Anitua 2004).

Gimeno e collaboratori nel 2006 hanno pubblicato dei risultati interessanti in merito all'utilizzo del PRP a livello corneale: in uno studio sperimentale effettuato in vivo, che ha visto l'utilizzo del coniglio come modello animale, gli autori si sono posti l'obiettivo di verificare se l'uso del concentrato piastrinico associato all'applicazione di *grafts* corneali potesse migliorare l'adesione dell'impianto stesso allo stroma corneale; al termine del lavoro, effettuato su un campione di 20 animali, gli autori hanno rilevato un'efficacia del PRP pari al 152% nel migliorare la capacità adesiva dei *grafts* al tessuto corneale stremale, suggerendo quindi un'ulteriore possibilità applicativa di questo biomateriale nel campo della cheratoplastica lamellare (Gimeno 2006).

Altri campi di applicazione

Recentemente è stato proposto, accompagnato da buoni risultati, l'utilizzo del concentrato piastrinico nella chirurgia endoscopica dei pazienti sottoposti ad interventi di riduzione di ernie per via laparoscopica e nei pazienti obesi sottoposti a bypass gastrico: in questi casi il PRP, applicato intraoperatoriamente nel sito chirurgico, ha contribuito a migliorare la risposta emostatica del soggetto e ad accelerare il processo di guarigione, stimolando la produzione di collagene e prevenendo la formazione di aderenze cicatriziali intorno alle anastomosi (Everts 2007). Un'ulteriore applicazione riguarda l'utilizzo del concentrato piastrinico nella sua forma liquida negli interventi di chirurgia addominale che prevedono l'inserimento di meshes sintetiche: nei punti di inserzione del materiale artificiale infatti l'applicazione del biomateriale si è rivelata essere un valido ausilio per migliorare la forza di tenuta

dell'impianto favorendo la formazione di tessuto cicatriziale "sano" e resistente e riducendo il rischio di danneggiamento delle meshes stesse (Everts 2007).

L'utilizzo del concentrato piastrinico è stato proposto anche in corso di interventi di neurochirurgia finalizzati ad ottenere un' artrodesi vertebrale postero-laterale: in questo studio è stata valutata l'efficacia del PRP addizionato ad un concentrato di cellule midollari per ottenere una migliore fusione spinale (Denaro 2009).

1.3.3: Utilizzo del PRP in medicina equina

L'utilizzo di PRP sembra rappresentare dunque una promettente opzione nel trattamento di patologie teno-desmiche sia in campo ortopedico umano che veterinario. I riscontri positivi ottenuti nell'uomo nel trattamento di diverse patologie ne hanno indotto l'impiego per la cura di diverse patologie del cavallo. Lo scopo dell'applicazione di tali terapie in campo veterinario è di ottenere una completa rigenerazione del tessuto con ripristino completo della sua funzionalità. Nel cavallo il PRP trova applicazione soprattutto nel trattamento di ferite cutanee e patologie muscolo-scheletriche (Carmona 2006). È particolarmente utile per la tenite flessoria, la desmite sospensoria, la bursite e la sinovite, nonché per l'erosione cartilaginea (Nixon 2008).

Utilizzo nel trattamento di ferite cutanee

Nel cavallo, danni a carico del tessuto cutaneo sono relativamente frequenti ed il processo di guarigione richiede generalmente tempi di recupero molto lunghi, portando spesso ad un risultato estetico scadente con la formazione di un tessuto cicatriziale esuberante (Monteiro 2008, De Rossi 2009). Tali riscontri si rilevano soprattutto a carico delle lesioni che coinvolgono le porzioni distali degli arti o del collo (Monteiro 2008). Le ferite che affliggono la porzione distale degli arti del cavallo notoriamente presentano notevoli difficoltà di guarigione. Le cause sono molteplici e probabilmente non ancora del tutto comprese, ma sicuramente alcune di esse sono rappresentate dalla distanza tra i margini della

ferita, la forte tensione superficiale presente e la scarsa rete vascolare che caratterizza la cute della zona. L'apporto ematico limitato determina la carenza di ossigeno, la diminuzione della temperatura, la scarsità dei fattori di crescita. I trattamenti terapeutici tradizionalmente proposti ed utilizzati non consentono di ottenere, nella maggior parte dei casi un buon risultato estetico e funzionale. Inoltre gli interventi di chirurgia plastica che spesso si rendono necessari, come i trapianti o gli innesti tissutali, richiedono un'anestesia generale del soggetto (Monteiro 2008, De Rossi 2009). Per tale ragione negli ultimi anni è stato testato, con ottimi risultati, un approccio terapeutico basato sulla medicina rigenerativa mediante l'utilizzo di concentrato piastrinico (Monteiro 2008, De Rossi 2009). Il primo studio in vivo pubblicato sull'impiego di concentrati di piastrine equine è quello di Carter nel 2003: sono stati valutati gli effetti del trattamento con un gel ottenuto aggiungendo trombina ed acido ascorbico ad un concentrato piastrinico in lesioni create nella porzione distale degli arti di un cavallo. Biopsie sequenziali hanno evidenziato velocizzazione della differenziazione epiteliale e presenza di tessuto di granulazione maturo nelle lesioni trattate con gel piastrinico rispetto ai controlli. Il tessuto di granulazione era composto da collagene organizzato in fasci di fibre densi e paralleli all'epidermide, garantendo maggiore resistenza alla parte (Carter 2003).

Utilizzo nel trattamento di patologie osteo-articolari

Le patologie articolari sono molto comuni nel cavallo, che viene sottoposto a notevoli sforzi atletici. Le cause delle artropatie in questa specie sono molteplici, tra cui traumi ripetuti, instabilità articolare, infezioni, osteocondrosi. Tutti questi fattori possono provocare gravi danni alla cartilagine articolare, con potenziale degenerazione cartilaginea irreversibile. Uno studio in vitro ha dimostrato l'impatto positivo del PRP sulla funzione metabolica dei condrociti equini, rispetto al plasma povero di piastrine ed alla fibrina. Il PRP ha infatti incrementato la formazione di cluster di condrociti, la sintesi di collagene di tipo II e l'accumulo di proteoglicani (Nixon 2008). Diversi veterinari utilizzano iniezioni di PRP nelle patologie articolari, ma ancora oggi non ci sono dati certi

sulla loro efficacia, in quanto gli studi clinici pubblicati presentano molte variabili. Carmona e Prades riportano miglioramento della zoppia e diminuzione dell'effusione articolare in cavalli affetti da osteoartrite, osteocondrosi o frattura della terza falange e trattati con tre iniezioni di PRP intra-articolari a distanza di due settimane (Carmone 2006, Prades 2006, Prades 2008).

Fortier e collaboratori hanno dimostrato, in uno studio condotto su cavalli, che è possibile utilizzare una tecnica di concentrazione delle cellule midollari in sala operatoria, e durante la stessa seduta impiantare il concentrato midollare con vantaggi significativi in termini di costi e di tempo, utilizzando la cosiddetta "one step surgery" per il trapianto cartilagineo (Fortier 2009, prendi da Gobbi)

Frisbie e collaboratori hanno riportato miglioramenti clinici ed istologici in articolazioni artrosiche equine dopo trattamento con PRP autologo intra-articolare (Frisbie 2007, da Gobbi).

Utilizzo nel trattamento di patologie teno-desmiche

Il PRP oggi trova l'impiego più diffuso nel trattamento delle lesioni tenodesmiche (Sutter 2008). L'efficacia dell'utilizzo del concentrato piastrinico nelle lesioni tendinee trova riscontro anche in uno studio condotto sul topo in cui è stato dimostrato attraverso degli esami istologici che il trattamento con il concentrato piastrinico riduce il numero di aderenze peritendinee, migliora l'organizzazione della matrice extracellulare e favorisce un corretto allineamento delle fibre collagene; il grado di guarigione dei soggetti trattati inoltre risulta più avanzato rispetto al gruppo di controllo (Maia, 2009).

L'iniezione di PRP è raccomandata per il trattamento di lesioni tendinee e legamentose recenti e di quelle lesioni che non sono guarite in modo soddisfacente con i trattamenti tradizionali. In particolare si raccomanda di trattare lesioni recenti, che si sono verificate entro i trenta giorni precedenti: il trattamento può essere effettuato con il cavallo in stazione utilizzando solamente una leggera sedazione ed il blocco locale del nervo; al termine del trattamento, che viene effettuato generalmente per via eco-guidata, si procede applicando un bendaggio leggero all'arto che viene lasciato in situ nei primi tre

giorni. Il trattamento sarà dunque seguito da controlli clinici ed ecografici periodici del soggetto e da un importantissimo periodo di riabilitazione graduale e controllato (Kaneps 2008).

I risultati dell'applicazione di PRP su espianati tendinei equini in vitro indicano che tale emocomponente sostiene attivamente la riparazione del tendine flessore: viene descritto l'utilizzo del PRP nel trattamento di tendiniti flessorie entro le prime 8 settimane dal danno (Nixon 2008). In particolare Schnabel ha valutato i pattern di espressione genica, il DNA ed il contenuto di collagene in sezioni di TFS coltivate in un medium che conteneva PRP, plasma, plasma povero di piastrine o aspirato midollare a concentrazioni diverse, precisamente del 10%, del 50% o del 100%. Le concentrazioni di PDGF e TGF- β erano maggiori nel PRP rispetto agli altri prodotti. I tendini coltivati in PRP al 100% dimostravano un incremento dell'espressione genica delle molecole di collagene I a discapito del collagene III (Schnabel 2007). Lo stesso autore riporta inoltre un effetto anabolico del PRP sulla sintesi della matrice tendinea utilizzando una concentrazione di piastrine pari a $395 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$ (Schnabel 2007, Maia 2009). Il PRP viene reputato, da diversi ippatri, l'unico trattamento iniettabile valido per la tenite flessoria entro le prime 8 settimane dal danno (Nixon 2008). Presso l'Università di Barcellona si è intrapreso uno studio clinico su larga scala per valutare le potenzialità del PRP ottenuto con il metodo della doppia centrifugazione ed applicato in tre iniezioni, a distanza di due settimane l'una dall'altra, in lesioni tenodesmiche acute e croniche. Di 62 cavalli trattati, 58 sono tornati in allenamento e di questi solo 5 hanno manifestato recidive. Gli autori inoltre hanno rilevato una marcata velocizzazione della guarigione indotta dal PRP: soggetti affetti da gravi lesioni del TFS ritornavano a correre in media dopo 5.5-6.5 mesi dall'inizio dell'esercizio controllato (Prades 2008). In un articolo di Arguelles si riportano i risultati del trattamento con PRP secondo il medesimo protocollo in cinque cavalli, di cui due affetti la lesione acuta del TFS e tre da lesione cronica del LS. Tutti i cavalli, entro 6 mesi dal trattamento, erano ritornati a svolgere un lavoro di intensità pari a quello svolto prima dell'infortunio. Fino a 20 mesi dopo il trattamento non sono state riportate recidive (Arguelles 2008). In ambito clinico si sta notevolmente diffondendo

l'impiego del PRP: i risultati di queste esperienze cliniche sono incoraggianti poiché diversi ippatri riportano un netto miglioramento della guarigione, caratterizzato dalla remissione dei sintomi clinici e, generalmente, da un marcato miglioramento dei parametri ecografici (Kaneps 2008, Setter 2008).

Infine il PRP viene anche utilizzato come veicolo per le cellule staminali di derivazione midollare o adiposa nel trattamento di lesioni particolarmente gravi a carico di tendini, legamenti o articolazioni (Nixon 2008, Kaneps 2008, Setter 2008).

1.3.4: utilizzo del PRP in associazione a cellule staminali mesenchimali (MSCs)

Introduzione

Le cellule staminali adulte (MSCs) continuano ad incuriosire il mondo scientifico per le prospettive del loro utilizzo in situazioni cliniche in cui i naturali meccanismi di rigenerazione non consentono un pieno recupero funzionale. L'utilizzo delle cellule staminali come strumento per la riparazione tissutale costituisce infatti un'importante prospettiva di ricerca in clinica veterinaria (Crovace 2010). Sempre con maggior interesse ci si avvicina alle prospettive terapeutiche basate sulla capacità rigenerativa e riparativa di organi e tessuti che le cellule staminali offrono, grazie alle loro caratteristiche intrinseche, come la capacità di auto-replicazione e di proliferazione illimitata (Ferrari 2007, Crovace 2010). Interessanti studi di bioingegneria hanno evidenziato che la guarigione di molti tessuti migliora in seguito ad impianto nel focolaio di cellule mesenchimali staminali associate a matrici tridimensionali biologiche (Del Bue 2006).

THE MESENGENIC PROCESS

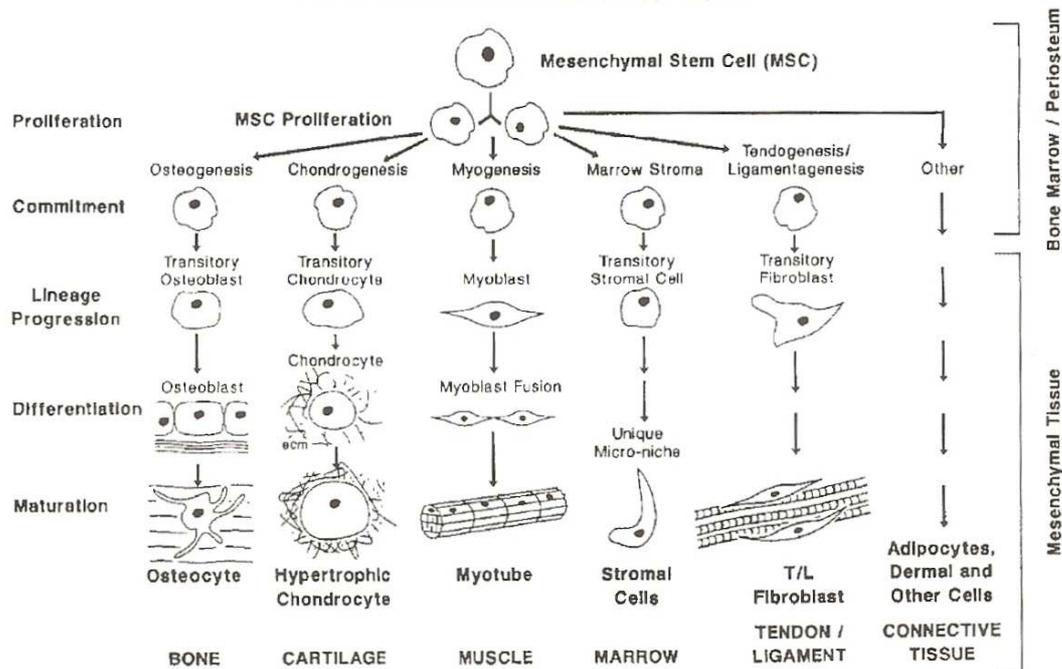


Fig. 10: Capacità differenziativi delle cellule staminali

Le cellule staminali mesenchimali adulte (MSCs) sono cellule multipotenti (Fig. 10) che possono replicarsi come cellule indifferenziate per poi differenziarsi, se opportunamente indirizzate, nell'organo bersaglio in specifiche e varie popolazioni cellulari (cellule ossee, cartilaginee, tendinee, muscolari etc) (Gobbi 2007). L'utilizzo delle MSCs autologhe oltre ad evitare i problemi di natura etica sollevati dall'utilizzo di cellule staminali embrionali, permette di ridurre al minimo il rischio di reazioni immunitarie. Per tale ragione il loro ritrovamento in diversi tessuti rappresenta la possibilità di un loro utilizzo come fonte di cellule staminali applicabili nella clinica per la riparazione dei danni tissutali (Pittenger 1999). Il midollo osseo è stato considerato per anni la principale fonte di cellule staminali mesenchimali (Smith 2005, Richardson 2007, Crovace 2007, Nixon 2008, Crovace 2008), ma l'invasività delle procedure di prelievo ed il fatto che il numero di cellule isolate ed il loro potenziale differenziativi si riducono con l'età, ha portato i ricercatori a cercare nuove fonti di MSCs. In questi ultimi anni alcuni studi hanno dimostrato che il sangue venoso periferico può essere considerato una promettente fonte alternativa di cellule staminali mesenchimali (Koerner 2006, Martinello 2009). La capacità differenziativa di tali cellule ha reso

soprattutto nell'ultimo decennio le MSCs una componente potenzialmente promettente nel campo dell'ingegneria tissutale (Everts 2007). L'ingegneria tissutale è una tecnologia, finalizzata alla morfogenesi di nuovi tessuti biologici, che prevede l'utilizzo di cellule isolate grazie a matrici biocompatibili ed ad una stimolazione indotta dai fattori di crescita. Recentemente diversi studi hanno proposto l'utilizzo di concentrato piastrinico, sia nella sua forma liquida che in quella gelatinosa, come matrice per l'applicazione di cellule staminali, con l'obiettivo che le piastrine debitamente attivate potessero liberare i diversi fattori di crescita necessari per la differenziazione delle cellule multipotenti (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'associazione delle cellule mesenchimali con i fattori di crescita piastrinici permette di accelerare l'impianto e la crescita in vivo delle cellule impiantate (Lucarelli 2003, Kilian 2004, Doucet 2005, Del Bue 2006, Gobbi 2007). Drengk e collaboratori hanno riportato in un recente studio che la combinazione di PRP e cellule staminali mesenchimali può incrementare fino a 14 volte la proliferazione cellulare, costituendo un possibile substrato bioattivo per il trattamento dei difetti cartilaginei in vivo (Goggi 2007). Un importante vantaggio rappresentato dall'utilizzo combinato di MSCs e di PRP è rappresentato dal fatto che entrambi i biomateriali sono due componenti autologhi, non tossici e biodegradabili. L'impiego delle cellule staminali e del PRP per la riparazione dei difetti cartilaginei è estremamente attuale e teoricamente offre significativi vantaggi rispetto alle metodiche convenzionali di trapianto cartilagineo: la procedura è più semplice, effettuabile in un unico intervento e molto meno costosa.

I risultati preliminari sono incoraggianti, ma saranno necessari ulteriori studi per chiarire se l'uso simultaneo di fattori di crescita e cellule staminali mesenchimali possa rappresentare una reale soluzione terapeutica per i difetti cartilaginei nel campo della medicina rigenerativa (Gobbi 2007).

Campi di applicazione nel cavallo

Le cellule staminali adulte sono considerate una risorsa interessante per il loro potenziale impiego in ingegneria tissutale. Le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono già state isolate da diversi tessuti e testate per il differenziamento in diverse linee cellulari. Il loro utilizzo clinico in medicina umana sta prendendo sempre più piede ed anche in veterinaria esistono già esempi di applicazione pratica. Nella medicina del cavallo sportivo l'utilizzo delle MSCs può essere considerato una promettente alternativa alle metodologie terapeutiche tradizionali. In particolare le MSCs associate al PRP possono trovare applicazione soprattutto nei seguenti ambiti:

- ***Utilizzo nel trattamento di lesioni tendinee***

Attualmente esistono diverse opzioni terapeutiche per il trattamento di patologie a carico delle strutture desmo-tendinee, ma nessuna sembra essere più efficace di un prolungato periodo di riposo accompagnato da restrizione dell'esercizio (Smith 2006, Richardson 2007). La peculiare anatomia dell'arto del cavallo rende le strutture tendinee fondamentali a rendere la locomozione e la stazione quadrupede il più efficiente possibile; proprio queste strutture sono le più vulnerabili e soggette a stress nei cavalli sportivi, di conseguenza è comune il verificarsi di lesioni di gravità variabile a carico dei suddetti tessuti. Il tendine parzialmente lesionato ripara naturalmente, ma la formazione di tessuto fibroso non garantisce una corretta *restitutio ad integrum*. Infatti la morfologia del tessuto cicatriziale fibroso differisce da quello dei normali tenociti; il collagene nel tessuto cicatriziale risulta meno strettamente crociato rispetto a quello normale e presenta una quantità maggiore di collagene tipo 3 (normalmente è inferiore all'1% nel tendine normale) rispetto al collagene di tipo 1, ciò conferisce al tendine maggior elasticità ma minor resistenza (Richardson 2007). L'esigenza di ottenere la restituzione alla funzionalità originaria ha incoraggiato lo studio di strategie rigenerative finalizzate ad ottenere un ripristino completo della naturale elasticità del

tessuto. Smith è stato il primo a descrivere l'uso di cellule staminali mesenchimali autologhe in una lesione spontanea di un tendine flessore superficiale del dito; dall'autore vengono messe in evidenza l'efficacia della terapia e l'assenza di reazioni avverse nelle settimane successive all'iniezione (Smith, 2003). L'uso delle cellule staminali nella terapia delle lesioni tendinee del cavallo è stato descritto da numerosi autori (Goodship, 2004; Smith, 2004; Richardson *et al* 2007; Barreira, 2008). Le cellule staminali si differenziano in tenociti in conseguenza a stimoli meccanici (tensione), metabolici (fattori di crescita e citochine), fisici e chimici (aumento della pressione idrostatica e il contatto con cellule simili) (Richardson *et al*, 2007). In vitro le cellule staminali hanno dimostrato di essere in grado di produrre una matrice extracellulare con caratteristiche simili a quella del tendine (Richardson *et al*, 2007). Nixon e collaboratori nel 2008 hanno trattato 8 cavalli, a cui era stata indotta una tendinite con collagenasi, con cellule staminali mesenchimali derivate dal grasso (Nixon 2008). Dopo aver sottoposto i soggetti ad eutanasia, sono stati eseguiti gli esami istologici che hanno evidenziato una migliore architettura tendinea, ad indicare una buona rigenerazione del tessuto ed una miglior distribuzione delle fibre secondo l'asse longitudinale del tendine (Nixon 2008). I tendini trattati con cellule staminali hanno presentato una diminuzione di quantità di infiltrato infiammatorio che suggerisce inoltre una discreta attività antinfiammatoria da parte delle cellule staminali (Nixon 2008). In vivo è stato dimostrato che l'utilizzo di cellule staminali mesenchimali in una lesione tendinea conferisce al tendine caratteristiche ecografiche istologiche e biomeccaniche migliori rispetto alla guarigione spontanea o all'utilizzo di altri impianti biodegradabili (Richardson 2007, Barreira 2008).

- *Utilizzo nel trattamento di lesioni cartilaginee*

Le cellule staminali mesenchimali sono state studiate anche per la terapia delle lesioni cartilaginee, in particolare nel trattamento di lesioni

osteocondrosiche. La maggior parte degli studi descrive l'attività delle cellule staminali in vitro, e non ci sono studi precisi riguardo alla loro efficacia nelle lesioni cartilaginee spontanee nel cavallo (Kisiday 2008, Koch 2009). In uno studio Wilke *et al.* hanno indotto delle lesioni nell'articolazione femoropatellare di sei cavalli che sono state trattate con fibrina da sola o in associazione a cellule staminali mesenchimali (Wilke, 2007). I risultati hanno dimostrato un netto miglioramento della guarigione nei casi trattati con l'associazione di cellule staminali e fibrina rispetto a quelli trattati con sola fibrina (Wilke, 2007).

- *Utilizzo nel trattamento di patologie ossee*

Le cellule staminali si sono dimostrate efficaci anche nella rigenerazione del tessuto osseo (Vidal 2006). Le cellule staminali mesenchimali possono essere indotte a differenziarsi e ad espandersi secondo una linea osteoblastica usando desametazone, ascorbato o β -glicerolfosfato (Lucarelli 2003). In tali condizioni le cellule vanno incontro ad una sequenza di eventi prestabilita: proliferazione, differenziazione, maturazione e mineralizzazione. La proliferazione e la maturazione avvengono quando viene indotta la sintesi di matrice extracellulare, in particolare di collagene di tipo I, e viene stimolata la produzione della fosfatasi alcalina. La fosfatasi alcalina è un enzima di membrana che favorisce la formazione di cristalli di idrossiapatite e di conseguenza la mineralizzazione (Lucarelli 2003). Lennon e collaboratori nel 2000 hanno dimostrato la miglior efficacia della terapia con cellule staminali innestate in fratture da non unione rispetto all'utilizzo di scaffold senza cellule staminali (Lennon 2000). Le fisiologiche risposte di cicatrizzazione e riparazione apportano infatti cambiamenti nella normale composizione molecolare e nell'organizzazione strutturale della matrice extracellulare con produzione di un tessuto cicatriziale che limita la sintesi ed il mantenimento di una matrice normale. Le cellule staminali potrebbero rappresentare un'importante risorsa futura nella restituzione alla normalità delle diverse lesioni ossee: la finalità è quella di aumentare

l'organizzazione, la sintesi e la qualità della matrice extracellulare, di facilitare l'integrazione di protesi, di stimolare la riparazione ossea in fratture da non unione o di sostituire importanti resezioni ossee.

1.4: IMPORTANZA TERAPEUTICA DEL PRP, CONTROINDICAZIONI E RISCHI LEGATI AL SUO UTILIZZO

Ogni volta che compare un nuovo ritrovato terapeutico si assiste al proliferare di letteratura a favore di quel ritrovato e, usualmente, si riscontrano poche voci dissonanti. Ciò si deve al convergere di più fattori: l'entusiasmo dei ricercatori per la novità e la possibilità di apertura di nuovi mercati commerciali (Borzini 2004). Il maggior numero delle pubblicazioni riguardanti l'utilizzo del PRP testimonia, nei soggetti trattati con PRP, un miglioramento della sintomatologia ed una più alta percentuale di guarigioni rispetto ai casi controllo (Everts 2007): i risultati positivi sono stati ottenuti in innesti ossei, in difetti intra-ossei periodontali, in chirurgia cosmetica ed anche nella guarigione di innesti cutanei. Molti studi documentano, in medicina umana, un miglioramento sia nella rigenerazione ossea sia nella guarigione dei tessuti molli. Alcuni ricercatori sostengono che l'efficacia del PRP sia maggiore nella guarigione dei tessuti molli perché le piastrine non contengono BMP (proteine morfogenetiche dell'osso) e non sono osteoinduttive; tuttavia gli effetti osteoinduttivi/osteoconduttivi derivano dalle cellule staminali mesenchimali con destino osteogenico ed è stato dimostrato che gli osteoblasti rispondono al PRP velocizzando la formazione del tessuto osseo (Everts 2007). La validità del PRP è dovuta alla sua efficacia, alla sua sicurezza, al costo limitato ed alla sua disponibilità rapida grazie alla semplicità dei protocolli di preparazione (Marx 2004, Anitua 2007). L'uso del concentrato piastrinico è controindicato qualora siano presenti determinate condizioni: sindrome della disfunzione piastrinica, trombocitopenia, ipofibrinogenemia, instabilità emodinamica, setticemia, recenti episodi febbrili, tumori, utilizzo di antinfiammatori non steroidei o cortisonici

(Anitua 2004, Crane 2008). Everts riporta le affermazioni di Scott e Pawson che escludono la possibilità di un effetto negativo del PRP utilizzato in presenza di una forma tumorale poiché il concentrato piastrinico ed i fattori di crescita in esso contenuti agiscono sulla membrana cellulare e non sul nucleo; tuttavia l'autore suggerisce di studiare in maniera molto approfondita tale aspetto prima di proporre e sostenere l'applicazione del concentrato piastrinico anche nella chirurgia oncologica (Everts 2007).

Alcuni autori sostengono che la concentrazione di globuli bianchi presente nel PRP conferisca al prodotto un'azione antimicrobica locale (Everts 2006, Bielecky 2007, Everts 2007) legata al rilascio di sostanze quali catecolamine, proaccelerina e peptici antimicrobici; i neutrofilo ed i monoliti contenuti nel PRP infatti sono ricchi di numerosi granuli contenenti mieloperossidasi ed altri enzimi che favoriscono la sintesi di sostanze ossidanti dotate di una potente azione battericida. Gli stessi autori riportano comunque un'inefficace azione del PRP, in questi termini, nei confronti di *Enterococcus faecalis* (Cieslik-Bielecka 2007). Altri ricercatori al contrario hanno avanzato l'ipotesi che il PRP potesse promuovere infezioni: in particolare in uno studio descritto da Bielecki nel 2008, gli autori riportano che l'utilizzo di concentrato piastrinico in pazienti che presentano infezioni in atto da *Pseudomonas*, *Enterococcus* o *Klebsiella*, può potenzialmente stimolare l'azione dei patogeni (Bielecki 2008, prendi da Kaneps). In realtà, in linea generale, il PRP non costituisce un buon terreno per i batteri dato che presenta un pH leggermente più acido (6.5-6.7) rispetto a quello sanguigno. Ciò non toglie che una sepsi rigorosa debba essere garantita in tutte le fasi produttive del concentrato piastrinico (Marx 2004).

È segnalata la possibilità che il paziente manifesti dolore nel sito di inoculo nei primissimi giorni dopo il trattamento: tale disagio si risolve spontaneamente in breve tempo (Crane 2008)

Capitolo 2

Il processo di guarigione tissutale nelle patologie tenodesmiche del cavallo

2.1: INTRODUZIONE: LE FASI DEL PROCESSO DI GUARIGIONE

Classicamente il processo di guarigione tissutale viene suddiviso in diverse fasi: infiammatoria, proliferativa, angiogenica, di epitelizzazione, di contrazione, di deposito della matrice e di rimodellamento (Anitua 2007). È importante puntualizzare che tutte queste fasi possono avvenire simultaneamente e che il meccanismo generale può essere adattato a tutti i tessuti adulti, tra cui pelle, muscoli, tendini, legamenti ed ossa.

Fase infiammatoria

La risposta tissutale ad una lesione, sia essa causata traumaticamente o chirurgicamente, comporta un'infiammazione (Boothe 2001). La distruzione del tessuto determina infatti un danno cellulare a carico dei tessuti molli: consiste in un'alterazione del metabolismo cellulare, con conseguente liberazione di mediatori chimici in grado di innescare la risposta infiammatoria. Tutti i processi infiammatori sono caratterizzati da infiltrazione di leucociti polimorfonucleati neutrofili o da macrofagi e da essudazione di fluidi e proteine come albumina, fibrinogeno, fibrina, numerose proteine della fase acuta e, in alcuni casi, immunoglobuline (Boothe 2001): durante la fase infiammatoria i leucociti, le altre cellule fagocitarie e l'essudato vengono liberati nel tessuto danneggiato. Questa reazione cellulare ha una funzione protettiva finalizzata a localizzare o

eliminare i prodotti della lesione (sangue e cellule danneggiate) con la fagocitosi, e consentire l'avvio della fase di riparazione. Flogosi e riparazione sono due manifestazioni dello stesso processo: iniziano simultaneamente e coesistono durante tutto il processo infiammatorio (Anitua 2007).

Al momento del danno si ha una vasocostrizione delle arterie che fornisce un provvisorio tappo che previene un'ulteriore perdita di sangue; dopo pochi secondi si verificano vasodilatazione ed aumento della permeabilità vascolare delle piccole venule che permette il passaggio di cellule, proteine e fluidi all'interno dell'area danneggiata (Boothe 2001). Piastrine e fibrina costituiscono la matrice temporanea che potrà essere sostituita da tessuto di granulazione nella fase successiva; tale matrice è fonte di fattori di crescita e chemochine che sono lentamente rilasciate e che agiranno durante tutto il processo di guarigione (Anitua 2007).

Durante un trauma i vasi linfatici subiscono generalmente danni maggiori perché sono più fragili dei vasi sanguigni. La fibrina ed altri elementi della coagulazione rilasciati durante la vasodilatazione danneggiano ulteriormente il drenaggio linfatico: ciò contribuisce alla formazione di edema, ma, al tempo stesso, tende a limitare il grado di estensione della reazione infiammatoria ad una risposta locale (Boothe 2001).

I leucociti sono una fonte abbondante di una grande varietà di mediatori chimici dell'infiammazione: enzimi lisosomiali, mediatori granulari (istamina e serotonina), mediatori derivati dalla membrana cellulare, che comprendono gli eicosanoidi ed il fattore di attivazione piastrinica, ed i radicali ossigenati (Boothe 2001). Le prime cellule che arrivano nel sito di flogosi sono i neutrofili, probabilmente perché sono presenti in alto numero nel sangue; scompaiono tre giorni dopo quando i macrofagi diventano le cellule più numerose, dando inizio alla fase di riparazione: l'assenza dei macrofagi può infatti ritardare in maniera sostanziale la guarigione della ferita a causa di un'alterata attività del fibrinogeno e dei fibroblasti. I fibroblasti migrano verso il tessuto danneggiato con la stessa rapidità con cui i macrofagi rimuovono il tessuto necrotico, i coaguli ed altri detriti: se i prodotti dell'infiammazione rimangono, un minor

numero di fibroblasti migra verso i tessuti danneggiati e la sintesi del collagene viene danneggiata (Boothe 2001).

Se i tessuti subiscono solo lesioni lievi, la reazione infiammatoria è transitoria ed è improbabile che causi un ulteriore danno tissutale. Al contrario traumi estesi, infezioni o la presenza di materiale estraneo possono causare una notevole distruzione tissutale (Boothe 2001).

Fibroplasia

La formazione del tessuto di granulazione inizia alla fine della fase infiammatoria. La fase della formazione della cicatrice, denominata fibroplasia, inizia nelle prime ore successive alla lesione e può avere una durata variabile dalle quattro alle sei settimane (Carmona 2006, Anitua 2007). Il tessuto di granulazione è necessario perché produce una superficie attraverso la quale cellule epiteliali possono migrare e perché previene le infezioni. Macrofagi, fibroblasti e cellule endoteliali formano una matrice di collagene tipo I e III insieme a fibrina, fibronectina e proteoglicani ricchi in acido ialuronico che permette migrazione cellulare, agisce come meccanismo di supporto per la deposizione e l'orientamento delle fibre collagene e lega le cellule del tessuto connettivo alla ECM. La proliferazione dei fibroblasti inizia con gli stimoli apportati dai fattori di crescita secreti da piastrine, macrofagi e cheratinociti (Anitua 2007).

Angiogenesi

L'angiogenesi rappresenta un insieme di processi funzionali atti alla formazione di nuovi vasi sanguigni a partire da quelli pre-esistenti. La formazione di un vaso passa attraverso diversi stadi ben definiti, caratterizzati da modificazioni dell'endotelio e della matrice extracellulare. Si individuano 4 tappe nel processo angiogenico (Carmona 2006):

- destabilizzazione dei vasi pre-esistenti

- migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali in una zona del tessuto dove è necessaria la formazione di nuovi vasi
- differenziazione delle cellule endoteliali (formazione di capillari primitivi)
- richiamo di cellule subendoteliali di supporto

Epitelizzazione

E' la fase più lenta del processo di riparazione delle ferite. Inizia uno o due giorni dopo l'evento traumatico ed in questa fase avviene la ricostruzione delle cellule dell'epidermide e di altre cellule epiteliali. C'è una migrazione di cheratinociti dal margine della ferita lungo il difetto: le molecole coinvolte sono soprattutto EGF e TGF- β , che accrescono la sintesi dei recettori epiteliali sulla superficie cellulare per i componenti della ECM, e IL-1 e TGF- α che sono inoltre considerati essenziali per la migrazione epiteliale e per la proliferazione. Diversi fattori di crescita stimolano la proliferazione, tra i quali TGF- β che stimola il potenziale proliferativo delle cellule epiteliali (Carmona 2006, Anitua 2007).

Contrazione

Dal settimo giorno dopo l'evento traumatico, la mancanza di tessuto è colmata grazie al riempimento centripeto che inizia dai tessuti circostanti non danneggiati. Le cellule coinvolte sono i miofibroblasti. La contrazione della ferita determina la rapidità della guarigione per seconda intenzione; all'inizio il nuovo tessuto risulta molto sottile, poi le cellule iniziano a proliferare e aggiungono spessore al tessuto (Boothe 2001). La contrazione della ferita si interrompe in tre casi: quando cellule simili prendono contatto tra loro (inibizione da contatto), quando la tensione cutanea eguaglia le forze repulsive di contrazione, o quando l'esuberante tessuto di granulazione ostacola la capacità di contrazione della ferita. Quando i miofibroblasti persistono oltre il tempo necessario per la chiusura della ferita possono favorire l'accumulo di ECM e la contrazione patologica, condizione che porta ad un significativo stato patologico (Carmona 2006).

Rimodellamento della matrice

La fase di maturazione come rimodellamento è un processo a lungo termine. Questa fase conduce al riallineamento ed al rimodellamento delle fibre collagene, in modo tale da rendere il tessuto cicatriziale in grado di sopportare le forze tensive alle quali è sottoposto (Anitua 2007).

Con il progredire del rimaneggiamento delle fibre collagene, si ha infatti un aumento costante della resistenza al carico del tessuto cicatriziale. Con l'aumentare del carico e dello stiramento le fibre collagene si dispongono assecondando le linee di forza, ed il tessuto assume di nuovo in modo graduale un aspetto ed una funzionalità normale anche se una cicatrice ha solo in casi rari la resistenza di un tessuto sano. La fase di *maturazione* è caratterizzata dalla diminuzione del numero di fibroblasti e dal raggiungimento di un equilibrio tra produzione e lisi di collagene. Solitamente dopo circa tre settimane si forma una cicatrice forte e resistente, mentre la maturazione completa può richiedere anche parecchi anni (Carmona 2006, Anitua 2007).

2.2: CENNI DI ANATOMIA FUNZIONALE DELLE STRUTTURE TENO-DESMICHE

2.2.1: Introduzione

L'evoluzione e la selezione dei cavalli atleti ha portato negli ultimi anni ad ottenere soggetti dotati di tendini e legamenti molto resistenti che contribuiscono all'efficienza della locomozione nelle diverse discipline sportive. Ciò nonostante i livelli di allenamento e la frequenza delle competizioni a cui i cavalli sono spesso sottoposti risultano molto elevati in rapporto all'intensità di lavoro che possono fisiologicamente sostenere. Da questo deriva un rilevante aumento dell'incidenza di problemi che coinvolgono gli arti, con relativa compromissione delle performances sportive. Nella medicina equina le lesioni

tenodesmiche rivestono un ruolo di primaria importanza; l'elevata incidenza di queste patologie si riscontra in cavalli di tutte le età e di tutte le attitudini. Ne risentono sia soggetti impegnati in competizioni di alto livello che soggetti impiegati saltuariamente per lavori leggeri. Le lesioni muscoloscheletriche rappresentano un problema nel mondo delle corse sia dal punto di vista del benessere dell'animale che dal punto di vista dei costi intesi in termini di soldi per le terapie e in termini di tempo per la riabilitazione a cui i soggetti sono sottoposti per poter tornare all'attività sportiva (Wilson 2004).

Le lesioni possono essere acute e croniche, causate da fattori intrinseci o estrinseci che agiscono singolarmente o in associazione. Individuare il meccanismo patogenetico è fondamentale per poter effettuare una terapia mirata a risolvere al meglio il problema (Sharma 2006). Lo *stiramento* è definito come una lesione ad un tendine o ad un muscolo causata da un uso eccessivo o da una eccessiva sollecitazione (McIlwraith 2002). Le lesioni da eccessiva sollecitazione del legamento sospensore sono classificate come stiramenti in quanto questa struttura più che un vero legamento è da considerare come il vestigio del muscolo interosseo terzo (McIlwraith 2002). Per tenite si intende il processo infiammatorio di un tendine o delle giunzioni muscolo-tendinee (McIlwraith 2002). Nel cavallo ci si riferisce in particolar modo all'infiammazione dei flessori indotta dallo stiramento eccessivo che colpisce il tendine che è circondato dallo strato paratendineo e non dalla guaina tendinea. Con il termine *tenosinovite* si indica il processo infiammatorio a carico di una zona di tendine avvolta dalla guaina tendinea (McIlwraith 2002). Questi processi patologici si manifestano visivamente con un ispessimento del tendine che nella regione metacarpale prende il nome di "tenonco" (Fig.11). Il processo flogistico a carico di un legamento viene definito *desmite* (McIlwraith 2002).



Fig. 11 ispessimento tendineo (*tenonco*)

Una lesione tenodesmica può insorgere come conseguenza di un trauma extratendineo come una compressione o una lacerazione oppure in seguito ad uno danno intratendineo che ha come conseguenza la separazione di alcune fibre (Barret 2008). Quest'ultimo può essere acuto, mono o bilaterale, causato

da uno sforzo eccessivo a cui viene sottoposto il tendine, oppure può essere cronico ed essere la conseguenza di un indebolimento della struttura tendinea dato dalla somma di microtraumi ripetuti che portano a lesione senza che si possa definire con precisione una causa scatenante (Goodship 1996).

2.2.2: Anatomia dei tendini flessori del dito e del legamento sospensore del nodello

ANATOMIA MACROSCOPICA

Il cavallo nel corso dell'evoluzione ha risposto alle sue esigenze di adattamento diminuendo il numero delle dita della mano e del piede. Al conseguente minor numero di muscoli fa eco uno sviluppo di tendini e legamenti molto resistenti che sopportano carichi e tensioni elevati durante la stazione e, soprattutto, durante il movimento (Denoix 1996). I tendini rappresentano la parte terminale connettivale fibrosa dei muscoli destinata all'inserzione dei muscoli stessi sullo scheletro. Macroscopicamente i tendini sani, lisci e di colore biancastro, hanno la forma di cordoni o nastri ed in sezione trasversale appaiono rotondi o ovali (Adamo 2002). La forma dei tendini è strettamente collegata alla funzione che essi devono svolgere in rapporto all'azione specifica dei muscoli dai quali dipendono: muscoli deputati a compiere movimenti delicati e di precisione possiedono tendini lunghi e sottili, mentre quelli che svolgono azioni di potenza e resistenza hanno tendini più brevi e robusti (Denoix 1996). 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 composto dal terzo muscolo interosseo (TMI), dallo scudo prossimale e dai legamenti sesamoidei distali.

Le principali funzioni di questo apparato tendineo sono:

- sostenere il nodello (Fig.12)
- prevenire l'iperestensione del carpo
- assorbire l'energia dell'impatto durante la fase di contatto e la fase sostenitiva per restituirla nella fase propulsiva e nella fase di stacco (Denoix 1996).

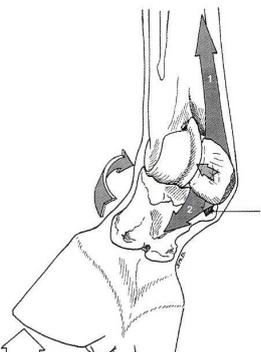


Fig.12: Ruolo del LS nel limitare i movimenti abassiali del nodello (Denoix 1996 modificata)

Di seguito verrà brevemente richiamata l'anatomia di tali strutture per quanto riguarda l'arto anteriore, ricordando che, a livello di treno posteriore, l'organizzazione delle strutture menzionate può essere considerata pressoché sovrapponibile.

Tendine flessore superficiale del dito (TFS)

Il corpo del muscolo flessore superficiale del dito origina prossimalmente dall'epicondilo mediale dell'omero e si trova profondamente al capo ulnare del flessore profondo del dito e al flessore ulnare del carpo. Il ventre muscolare si colloca contro l'origine del muscolo flessore profondo del dito

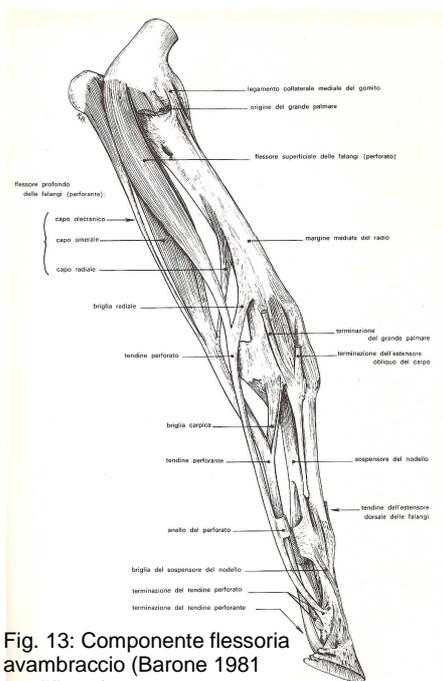
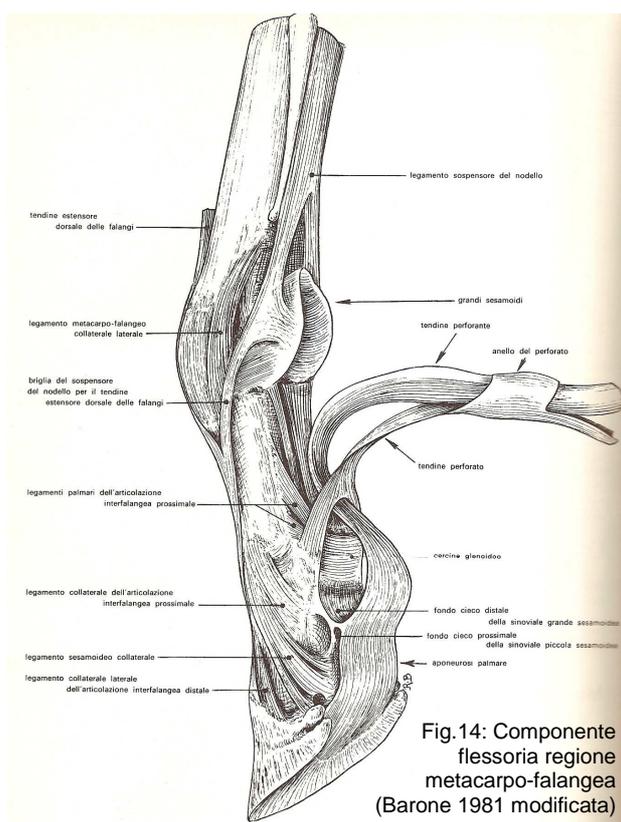


Fig. 13: Componente flessoria avambraccio (Barone 1981 modificata)

(Kainer 1990). Il muscolo ha una robusta inserzione tendinea e continua distalmente come tendine flessore superficiale del dito (Fig. 13). Questo tendine origina anche da un capo radiale o legamento accessorio che si inserisce nella porzione caudomediale del radio, 7-10 cm prossimalmente all'articolazione antebrachio carpica, e si fonde col tendine in posizione leggermente prossimale rispetto a questa (Denoix 1996). Il TFS in questo punto ha una sezione arrotondata e si porta distalmente

attraversando il retinacolo dei flessori, uno spesso legamento con direzione trasversale teso tra le ossa mediali e l'osso accessorio del carpo 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 avvolto dalla guaina sinoviale del carpo; questa guaina si estende da 7-10 cm prossimalmente all'articolazione antebrachio carpica fino al terzo prossimale del metacarpo (Denoix 1996; Schaller 1999). Nella regione metacarpale il tendine si appiattisce ed ha una sezione a mezzaluna, i margini laterali sono assottigliati e presentano un maggior contenuto di cellule rispetto alla porzione centrale più arrotondata, lungo il metacarpo si trova profondamente alla cute e alla fascia sottocutanea ed è in rapporto dorsalmente col tendine flessore profondo (Denoix 1996; Kainer 1990). Il tendine raggiunge l'articolazione metacarpofalangea allargandosi (Fig. 14) e, prossimalmente

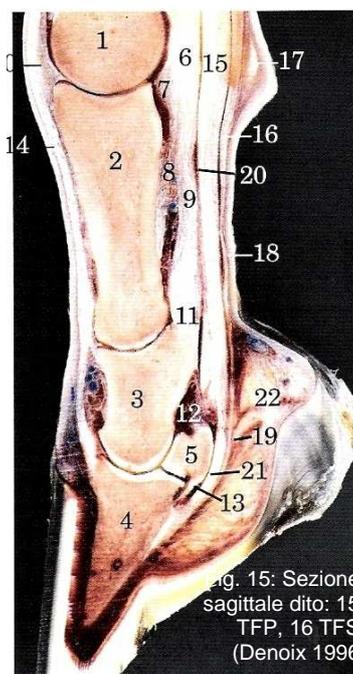


all'osso sesamoideo prossimale stacca dai suoi margini una lamina fibrosa, *manica flessoria*, che circonda il tendine flessore profondo e distalmente all'osso sesamoideo prossimale diviene sottile nella porzione centrale e si allarga in quelle abassiali (Denoix 1996). Nella porzione distale della falange prossimale il tendine si divide in due branche che si assottigliano distalmente. (Denoix 1996). Le branche si inseriscono

sull'estremità distale della falange prossimale e sull'estremità prossimale della seconda falange (Fig. 14) palmarmente ai legamenti collaterali dell'articolazione interfalangea prossimale (Kainer 1990).

Tendine flessore profondo del dito (TFP)

Il muscolo flessore profondo è costituito da tre capi. Il capo principale è il capo omerale che origina sull'epicondilo mediale dell'omero che continua in un robusto tendine. Questo tendine ha inserzione 8-10 cm prossimalmente all'articolazione antebrachio carpica (Fig. 14) e si unisce agli altri due capi, l'ulnare e il radiale, a livello dell'articolazione antebrachio carpica (Kainer 1990; Denoix 1996). Il capo ulnare origina lungo l'ulna mentre il capo 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 (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 si 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 (Fig. 15) il tendine si allarga e assume una consistenza fibrocartilaginea. Nella metà prossimale della falange prossimale il tendine si divide in due porzioni simmetriche in cui le fibre si dispongono a spirale ed attraversa, portandosi distalmente le branche del TFS la sinoviale della guaina digitale 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. Il tendine si allarga e assume una forma a ventaglio e occupa l'intero spazio tra il processo palmare mediale e il processo palmare laterale della falange distale (Denoix 1996). In prossimità della sua inserzione sulla falange distale il tendine è tenuto in sito dal legamento anulare distale. Il TFP termina sulla faccia flessoria della falange distale (Kainer 1990).

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). È costituito principalmente da una robusta fascia tendinea rettangolare, lunga circa 20-25 cm contenente variabili quantità di tessuto muscolare soprattutto nella porzione prossimale. Il legamento sospensore origina dal legamento palmare del carpo, prossimalmente alla fila distale delle ossa del carpo (Fig 16) e dalla

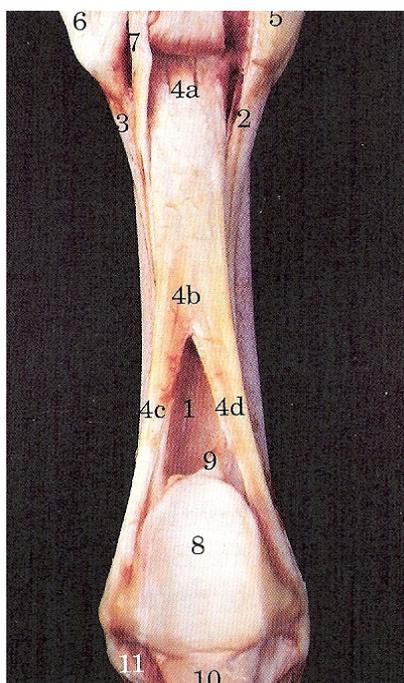


Fig. 16: Veduta palmare metacarpo: 4a inserzione del LS, 4b corpo del LS, 4c branca laterale del LS, 4d branca mediale del LS (Denoix 1996 modificata)

superficie palmare delle ossa metacarpali, in particolar modo dal terzo osso metacarpale. Il corpo del legamento scorre tra il secondo e il quarto osso metacarpale, e gradualmente si separa dalla faccia palmare del terzo osso metacarpale (Denoix 1996). All'altezza del quarto distale del metacarpo il legamento si divide in due branche che si inseriscono sulla faccia abassiale del corrispondente osso sesamoide prossimale. Da ogni branca si stacca un sottile ramo che corre lungo la falange prossimale dorsodistalmente con direzione obliqua e si unisce al tendine estensore dorsale del dito

appena prossimalmente alla articolazione interfalangea prossimale (Denoix 1996). I legamenti sesamoidei distali rappresentano la continuazione funzionale del terzo muscolo interosseo nel dito. Sono formati da il legamento sesamoideo retto, i legamenti sesamoidei obliqui e da i legamenti sesamoidei crociati. Tutti questi legamenti originano dall'osso sesamoideo prossimale e dal legamento palmare. Il legamento sesamoideo retto è il più palmare, presenta prossimalmente una sezione trapezoidale con la base più larga posta in posizione palmare mentre distalmente diventa ovale. Distalmente si inserisce sullo scudo medio. I legamenti sesamoidei obliqui si 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 si incrociano rispettivamente e terminano sulla porzione prossimopalmare della tuberosità della falange prossimale (Denoix 1996).

ANATOMIA MICROSCOPICA

Tendini e legamenti sono costituiti da tessuto connettivo denso regolare ed hanno una resistenza alla tensione molto elevata (Eurell 2000). Queste

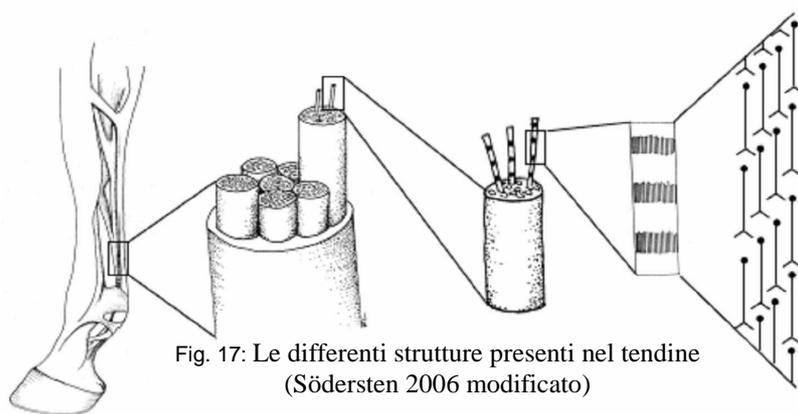


Fig. 17: Le differenti strutture presenti nel tendine (Södersten 2006 modificato)

strutture anatomiche non sono tessuti inerti, bensì sono biologicamente attivi e devono la loro capacità biomeccanica alla loro organizzazione

(Fig. 17) molecolare, morfologica e cellulare. Come negli altri tessuti connettivi, anche nei tendini e nei legamenti le cellule sono separate fra loro da un'abbondante sostanza o *matrice intercellulare (extracellulare o ECM)*. A sua volta la sostanza intercellulare è costituita da una *componente fibrosa* e da una

sostanza amorfa o *sostanza fondamentale* (Adamo 2002). La composizione della matrice è molto complessa: le macromolecole caratteristiche della sostanza amorfa sono i *glicosaminoglicani (GAG)* e i *proteoglicani* (macromolecole risultanti dal legame covalente di GAG e proteine) la cui elevata idratazione permette la diffusione di nutrienti, metabolici, ormoni attraverso la sostanza intercellulare (Sharma 2006). L'ECM rappresenta la componente principale all'interno del tendine ed è costituita per il 70% da acqua (Sharma 2006). Il rimanente 30% di sostanza secca è costituito per il 75-90% dalle diverse molecole di collagene, lo 0,2-5% è rappresentato da glicosaminoglicani e proteoglicani e l' 1-2% da elastina (Sharma 2006, Güngörmüş 2008). I proteoglicani e i glicosaminoglicani formano un gel poroso dando un supporto meccanico al tendine, grazie alla loro alta densità di cariche negative sono osmoticamente attivi richiamando nella matrice grandi quantità di acqua che permette di sopportare anche forze di compressione, a differenza delle fibrille di collagene che resistono a forze di stiramento.

Tra le glicoproteine presenti nella ECM assume notevole importanza la Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP). (Smith 1997), la cui presenza è stata riscontrata anche nel tendine. È stato ipotizzato che abbia una funzione sia metabolica 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). È stato dimostrato infatti che è in grado di legare collagene di tipo I, II e IX, così come fibronectina e altre proteine (Gagarina 2008). Nel tendine la COMP è tra le proteine presenti in quantità maggiore dopo il collagene, la sua distribuzione varia in funzione di diversi fattori. Alla nascita i livelli di questa proteina nel tendine sono bassi, aumentano rapidamente durante la crescita e il picco massimo si ha intorno ai 2 anni. Nel cavallo adulto tali livelli diminuiscono nuovamente. Il ruolo di questa proteina nello sviluppo delle tendiniti non è ben chiaro, ma la sua diminuzione nel corso degli anni potrebbe favorirne l'insorgenza (Smith 1997).

Nella matrice sono immerse le fibre: insieme alle classiche fibre del tessuto connettivo (collagene, reticolari ed elastiche) sono presenti proteine *fibrose di connessione* o *adesive* (come la *fibronectina*) che collegano le cellule ai

componenti della matrice (Wang 2006; Smith 1996). I rapporti tra cellule e matrice connettivale sono complessi: da una parte le macromolecole della matrice (amorfa e fibrosa) sono sintetizzate e secrete dalle cellule, che regolano anche la loro disposizione tridimensionale nello spazio extracellulare; dall'altra la matrice influenza e regola le funzioni delle cellule che vi sono immerse (Adamo 2002).

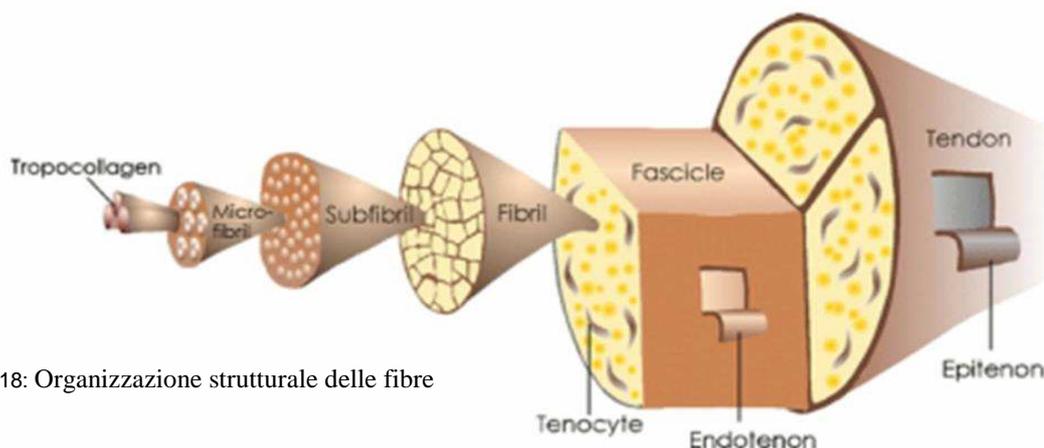
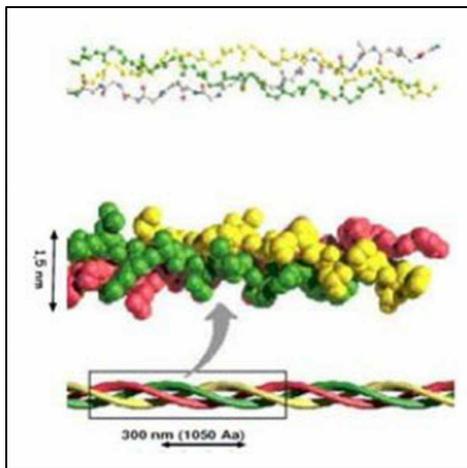


Fig. 18: Organizzazione strutturale delle fibre

La tipologia di tessuto connettivo di cui sono composti tendini e legamenti prevede una disposizione ordinata delle fibre, che vengono raccolte in fasci paralleli (Fig. 18). Le fibre collagene rappresentano la categoria di fibre più rappresentata nei tessuti connettivi; sono flessibili ma assai poco estensibili ed offrono una grande resistenza alla trazione (Adamo 2002). La compattezza data dal collagene risulta fondamentale per la forza meccanica del tendine, mentre le fibre elastiche permettono alle fibre collagene di riprendere la loro posizione naturale dopo uno stress tendineo. Le fibrille collagene con diametro maggiore hanno più resistenza alla trazione grazie al maggior numero di legami intramolecolari mentre le fibrille con diametro minore sono più adatte allo scorrimento e sono molto più flessibili, quindi in base alle dimensioni le fibrille svolgono ruoli meccanici differenti. Nei tendini e nei legamenti i fasci di fibre collagene sono fittamente stipati tra loro ed orientati tutti nella direzione della trazione; la sostanza amorfa è quantitativamente scarsa e le uniche cellule presenti sono fibroblasti disposti in file parallele negli interstizi tra i fasci di fibre collagene (Adamo 2002).

Il collagene è costituito da triplici eliche di tropocollagene (Fig. 19). Le molecole

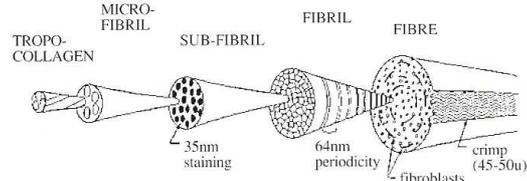
Fig. 19 Costituzione del collagene



di tropocollagene si legano attraverso interazioni specifiche tra le teste e le code delle varie molecole e vengono così a formarsi le microfibrille di spessore variabile, generalmente compreso tra 20 e 150 nm. Le microfibrille a loro volta si uniscono a formare le fibrille che hanno un diametro compreso tra 0,2 e 0,5 μm e che formano le fibre di collagene dal diametro compreso tra 1 e 12 μm (Rosati 1997, Sharma 2006). Le fibrille

hanno un aspetto ondulato definito con il termine inglese “crimp” (Fig. 20), responsabile dell’elasticità del tendine durante la prima fase del carico (Dowling 2000).

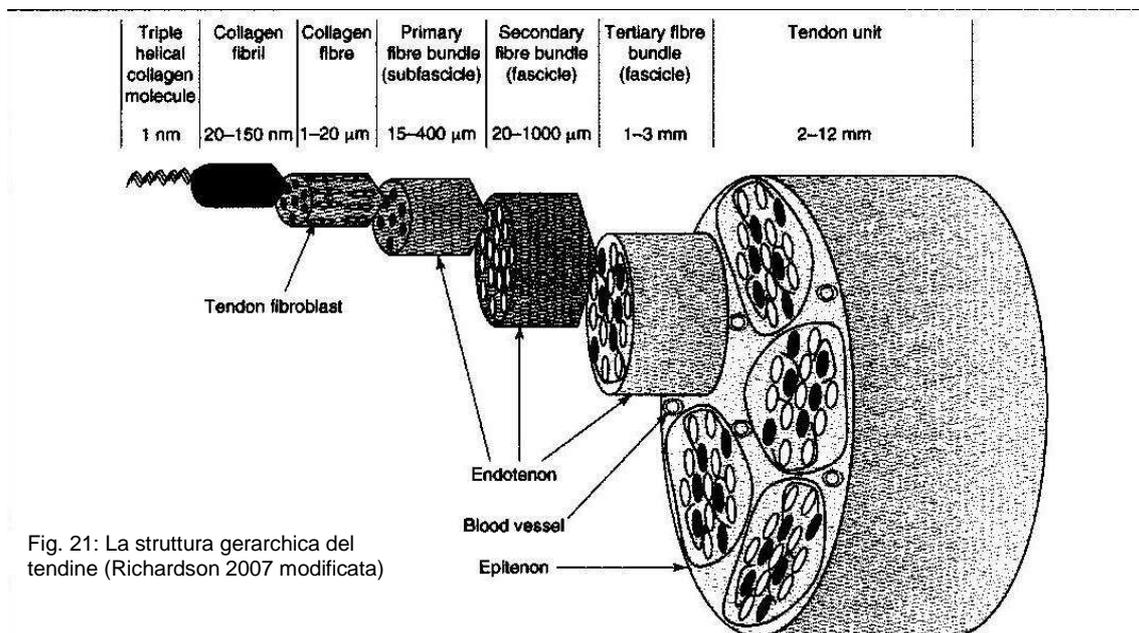
Fig. 20: Rappresentazione schematica della struttura del collagene (Smith 1996 modificata)



Sono stati identificati circa 20 tipi di molecole di collagene ed i tipi principali presenti nei tessuti connettivi sono i tipi I, II, III, V e XI. Il tipo I è di

gran lunga quello più frequente ed è distribuito nelle ossa, pelle, organi interni, legamenti e tendini; nei tendini normali circa il 95% del totale di collagene è costituito dal tipo I, mentre i tipi III, IV e V costituiscono il restante 5% (Von der Mark 1981, Boothe 2001). Il collagene di tipo I è responsabile della fitta architettura delle fibre, rende il tessuto molto resistente, il collagene di tipo IV è il costituente principale della membrana basale, i collageni III e V formano fibrille più fini e rendono il tendine elastico. Il 70% del tendine del cavallo adulto è composto da acqua, il restante 30% da sostanza secca (Dowling 2000). Il 60-85% del peso secco è fornito dal collagene. Il collagene I è quello predominante (circa 60%), ma elevati livelli di collagene III sono rilevabili nel tendine immaturo o lesionato e con l’età (Lin 2004). Nelle prime fasi di riparazione di una lesione, fibrille di collagene III vengono velocemente sintetizzate per garantire una certa forza ed elasticità, ma esse non presentano la stessa resistenza allo stiramento del collagene I, e di conseguenza non riescono a sopportare un carico

massimale. Il processo di guarigione continua con la sostituzione delle fibrille di tipo III con fibrille di tipo I (Carmona 2006).



La fibra collagene è la più piccola unità del tendine visibile al microscopio ottico e la più piccola struttura collagenica testabile meccanicamente (Fig.21). Dall'aggregazione di più fibre collagene si forma il fascio primario (detto anche sub-fascicolo) e più fasci primari, a loro volta circondati da tessuto connettivo dei setti endotenonici, si aggregano in fasci più cospicui a formare il fascio secondario (fascicolo). Un gruppo di fasci secondari forma a sua volta un fascio terziario e l'insieme di più fasci terziari forma il tendine rivestito dall'epitenonion (Kastelic 1978). L'epitenonio favorisce lo scorrimento del tendine sulle superfici ossee assieme alla guaina tendinea o strato paratendineo che si compone di due foglietti, uno interno e l'altro esterno separati da una cavità virtuale piena di liquido. Lo strato paratendineo ha un ruolo determinante nell'apporto di sostanze nutritive al tendine. I vasi sanguigni del tendine passano attraverso una struttura detta mesotenonion posta fra le estremità della guaina tendinea (Eurell 2000; McIlwraith 2002). I legamenti anulari o retinacoli sono delle fasce fibrose che mantengono il tendine in posizione corretta in prossimità di superfici o prominenze ossee dove potrebbero subire cambiamenti di posizione (McIlwraith 2002).

I fasci fibrosi sono disposti longitudinalmente e quasi parallelamente tra loro; la disposizione compatta e parallela delle fibre di collagene dona al tendine

una delle più elevate resistenze tensili tra tutti i tessuti dell'organismo (Boothe 2001). Il diametro medio delle fibre in una determinata area è direttamente proporzionale al carico che quell'area sopporta (Sese 2007). In linea di massima, lungo tutto il tendine flessore superficiale, il diametro medio delle fibrille è maggiore nelle aree periferiche piuttosto che nelle aree centrali a dimostrazione del fatto che aree diverse del tendine sopportano carichi differenti (Sese 2007). La struttura dei tessuti appena descritta cambia notevolmente nei punti di inserzione del tendine e del legamento nell'osso. In questi punti il connettivo denso regolare si trasforma in fibrocartilagine che mineralizza prima di entrare nell'osso e le fibre collagene si inseriscono nella matrice ossea come fibre di Sharpey (Eurell 2000, Boothe 2001).

Nel tendine sono presenti cellule endoteliali, cellule sinoviali e condrociti, ma la componente principale è data dai tenociti, che rappresentano circa il 90-95% della componente cellulare totale (Wang 2006; Goodman 2005). I tenociti sono le cellule caratteristiche del tendine responsabili della secrezione della matrice extracellulare, dell'assemblaggio e del ricambio del collagene (Sharma 2006). Queste cellule sono dei fibroblasti specializzati e sono disposti in lunghe file parallele negli interstizi tra i fasci di fibre collagene dove sono interposte anche reti elastiche. In una struttura tenodesmica si riconoscono tre tipi di tenociti (Smith 1996, Patterson-Kane 2009, Hosaka 2009).

Tipo I: cellule con un nucleo affusolato e citoplasma sottile. Hanno un reticolo endoplasmatico rugoso e un apparato del Golgi molto sviluppati, questo indica che sono molto attivi nella sintesi di proteine e componenti della ECM come le metalloproteasi e le citochine. Sono detti comunemente tenociti (Smith 1996; Patterson-Kane 2009, Hosaka 2009)

Tipo II: cellule con un nucleo arrotondato a forma di sigaro, e organelli citoplasmatici ben sviluppati che sono indice dell'intensa attività metabolica di queste cellule. Sono detti tenoblasti (Patterson-Kane 2009)

Tipo III: cellule simili a condrociti con nucleo arrotondato e nucleoli visibili, predominano nelle porzioni di tendine sottoposte a forze compressive (Patterson-Kane 2009)

I tenociti di tipo II e di tipo III sono metabolicamente più attivi rispetto a quelli di tipo I, i loro nuclei infatti sono più grandi e presentano numerosi nucleoli (Stanley, 2008; Smith 1996). I tenociti del TFS sono più attivi rispetto al TFP ed entrambi sono più attivi di quelli del tendine estensore comune del dito. Da questo ne deriva che i tendini flessori hanno una maggiore capacità nel produrre grandi quantità di collagene e metalloproteasi (Hosaka 2009). Numerosi fattori regolano il numero e il tipo di tenociti presenti in una struttura. Il numero dei tenociti è inversamente proporzionale all'età, nei soggetti giovani prevalgono i tenociti di tipo II che si inseriscono tra i fasci di collagene, con il passare degli anni aumentano i tenociti di tipo I. Il citoplasma dei tenociti è difficilmente distinguibile nei preparati colorati con ematossilina-eosina non solo perché è sparso, ma anche perché assume lo stesso colore delle fibre collagene. Durante la crescita inizialmente sono associate alle fibrille e ai fasci di fibrille (Birk 1994), con l'aumentare dell'età, le cellule si appiattiscono e diventano molto meno numerose e i loro lunghi e fini dendriti citoplasmatici diminuiscono di dimensioni e di numero (Strocchi 1991).

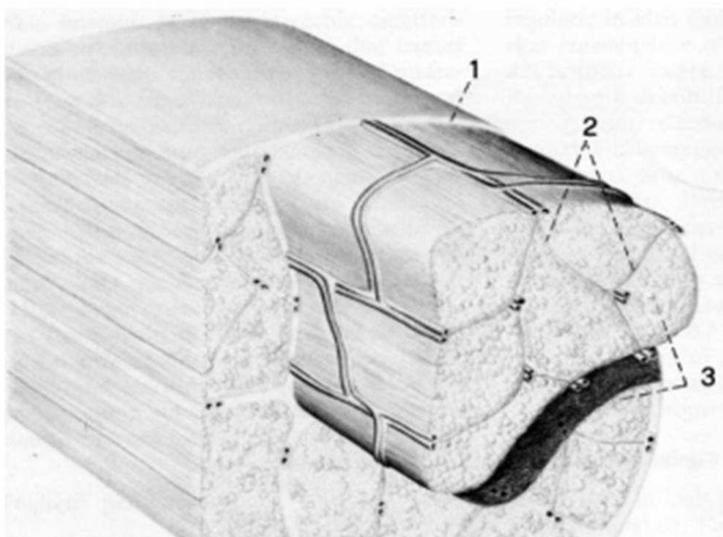


Fig. 22: Apporto vascolare tendineo

I tendini hanno un apporto vascolare (Fig. 22) minore rispetto agli altri tessuti muscolari metabolicamente attivi con i quali sono associati; questo spiega perché i tendini freschi sono di colore opalescente mentre i

muscoli sono rossastri. La quantità di sangue che arriva al tendine varia a seconda della struttura coinvolta, in generale, comunque, l'apporto di sangue è inversamente proporzionale all'età e al carico sopportato. Nelle strutture tenodesmiche il consumo di ossigeno è di 7,5 volte minore rispetto ai muscoli, questo fa sì che riescano a sopportare carichi e tensioni per lunghi

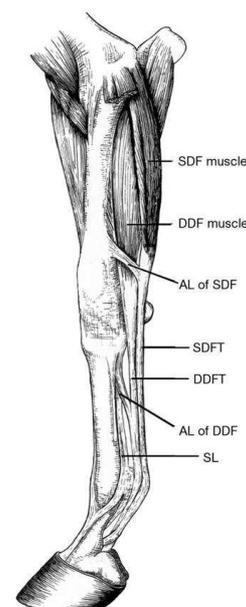
periodi superando entro certi limiti il rischio di ipossia e necrosi (Sharma 2006; Smith 1996). Nel tendine stesso i vasi corrono longitudinali, paralleli ai fasci e all'interno dell'endotenonio, nei tendini digitali ad esempio la maggior parte dei vasi sono arteriole e venule con quest'ultime molto più numerose (Brockis 1953).

Molto spesso i vasi nervosi viaggiano associati a quelli sanguigni, ed è stato dimostrato che queste fibre nervose regolano il flusso sanguigno tendineo attraverso la secrezione di neuropeptide Y e noradrenalina (vasocostrittori) e di *Vasoactive intestinal polipeptide* (Vip), che ha azione vasodilatatrice (Ackermann 2001); i nervi crescono nelle rotture tendinee e nel tendine danneggiato in associazione con i vasi sanguigni (Messner 1999, Messner 1999).

2.3: EZIOPATOGENESI DELLE LESIONI TENODESMICHE

Tra le proprietà biomeccaniche dei tendini si riconoscono soprattutto una elevata resistenza alla tensione, una buona flessibilità e una ottima elasticità, ma al contrario di altri tessuti in cui c'è una relazione lineare tra la forza applicata e la conseguente deformazione, nei tendini questo rapporto non è costante (Goodship 1994, Sharma 2006). Tendini e legamenti hanno proprietà viscoelastiche, quindi variano le loro proprietà biomeccaniche in base al loro stato di tensione in conseguenza al carico. (Smith 1996; Davis 2005).

I tendini trasferiscono le forze biomeccaniche dai muscoli alle ossa mentre i legamenti forniscono una resistenza passiva alla deformazione delle ossa in seguito al carico (Smith 1996). 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 composto dal terzo muscolo interosseo (TMI), dallo scudo prossimale e dai legamenti sesamoidei distali. Essi sono coinvolti nella regolazione dei movimenti della porzione distale dell'arto, nell'abbassamento e nel sollevamento del nodello. Sono strutture elastiche e quindi hanno come ruolo principale quello di assorbire e restituire l'energia dell'impatto riducendo così il dispendio energetico necessario per la locomozione soprattutto a velocità elevata.

TENITE DEI TENDINI FLESSORI DEL DITO

Il meccanismo patogenetico che sta alla base della manifestazione clinica di una tenite può essere visto come un deficit da parte della matrice extracellulare nell'adattarsi alle modificazioni conseguenti allo squilibrio tra degenerazione e sintesi della matrice (Sharma 2006). I fattori di rischio che possono predisporre a una lesione tenodesmica sono numerosi e si possono dividere in fattori legati al tipo di attività sportiva praticata dal soggetto e fattori legati al soggetto stesso. Tra i primi si devono prendere in considerazione diversi aspetti legati al tipo di corsa e alla superficie della pista (Lam 2007; Williams 2001).



Nei Purosangue Inglese partecipanti a corse in piano o ad ostacoli si riscontrano principalmente lesioni al TFS che viene sottoposto a forti sollecitazioni durante la fase di iperestensione del nodello; lo stesso avviene nei Quarter



Horses a cui vengono richiesti bruschi cambi di direzione. Nei trottatori e negli ambiatori invece si ha una maggiore incidenza di desmiti del legamento sospensore, questa differenza è ricollegabile al fatto che nei trottatori si ha una aumentata fase craniale del passo durante la quale il legamento sospensore adempie alla sua funzione di sostegno del nodello. Questo è spiegabile, oltre che con la differente distribuzione del carico durante le fasi del passo in base alla attività locomotoria



richiesta, anche con la diversa conformazione della porzione distale degli arti ed in particolar modo con il tipo di ferratura richiesta (Goodship 1996). In generale i cavalli che partecipano a corse a ostacoli, come per esempio lo steeplechase vanno incontro più facilmente a lesione rispetto ai soggetti che partecipano a corse in piano, così come i soggetti che percorrono distanze più lunghe si lesionano più facilmente rispetto a quei soggetti che percorrono distanze minori (Goodship 1996; Lam 2007). Tra i fattori legati al tipo di pista si devono prendere in considerazione sia il tipo di materiale che ne costituisce la superficie, quindi sabbia, erba o piste all-weather sia le condizioni della pista che può essere più o meno pesante (Williams 2001). Le piste in erba hanno un'incidenza minore di lesioni rispetto alle piste all-weather, ma maggiore rispetto a quelle in sabbia, anche se è difficile stabilire se questa differenza sia imputabile al tipo di terreno o piuttosto al tipo di competizione e alla lunghezza del tracciato. Un terreno morbido e non scivoloso porta ad una diminuzione del numero di lesioni soprattutto per quanto riguarda le corse con ostacoli (Williams 2001; Mundy 1997).

Tra i fattori di rischio di lesione tenodesmica legati al soggetto si devono prender in considerazione sia fattori quali l'età e il sesso sia fattori legati alla morfologia del soggetto. L'età rappresenta un fattore di rischio indipendentemente dal tipo di attività svolta sebbene molto probabilmente si tratti di un fattore da ricondurre alla somma di microtraumi in conseguenza all'attività svolta più che non all'età anagrafica in quanto tale. La prevalenza di lesioni tenodesmiche risulta essere significativamente maggiore nei maschi interi rispetto alle femmine o ai castroni (Mundy 1997; Oikawa 2002). Dal punto di vista morfologico particolare attenzione deve essere rivolta alla conformazione dello zoccolo, infatti uno dei fattori che maggiormente predispone un soggetto a tendinite è la presenza di una punta troppo lunga a di talloni troppo alti. Un altro aspetto che sembra favorire l'insorgenza di tendinite è il peso del soggetto (Oikawa 2002; Lam 2007). Tra i fattori di rischio esposti, età ed esercizio, in particolar modo, sembrano avere un ruolo determinante nella degenerazione tendinea. Il tendine equino raggiunge la maturità a due anni, infatti a questa età ha una *cross sectional area* (CSA) tale da sostenere il

carico fisiologico e dal punto di vista istologico, le fibre di collagene, i legami tra le fibre e il “crimp” pattern risultano stabilizzati (Fig. 23).

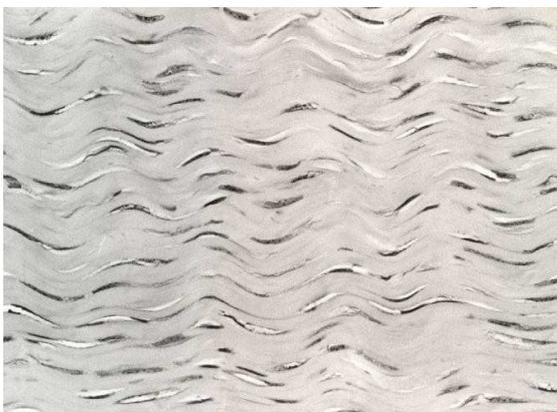
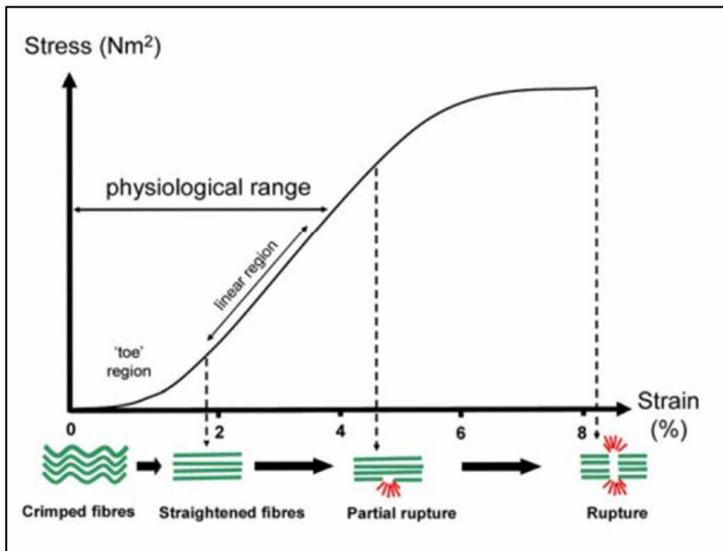


Fig. 23: Sezione longitudinale del tendine al microscopio

Nel cavallo giovane si ha una maggiore risposta adattativa all'esercizio da parte del tendine che nell'adulto, questo fatto probabilmente è da attribuire alle variazioni della matrice extracellulare e del contenuto in collagene del tendine (Dowling 2000). Con il passare degli anni la struttura del tendine subisce numerose modificazioni a causa soprattutto dello stimolo continuo a cui è sottoposto il tendine durante il lavoro. Per quanto riguarda la componente cellulare si riscontra una diminuzione di cellule soprattutto nella porzione centrale del metacarpo. Questa modificazione porta ad una diminuzione del metabolismo con conseguente impoverimento della matrice extracellulare (Dowling 2000), infatti diminuisce la quantità di COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) che è direttamente proporzionale alle proprietà meccaniche del tendine quali la forza tensile e la robustezza del tendine (Smith 2002) e diminuisce anche la sintesi di collagene. Quest'ultima variazione è legata al fatto che diminuisce il metabolismo dei tenociti perchè tra queste cellule diminuiscono le proteine di giunzione come la *connexin 43* e la *connexin 32*; le gap junction sono legate alla sintesi principalmente di collagene di tipo I (Young 2009; Patterson-Kane 2009). Per quanto riguarda il collagene in quanto tale si hanno modificazioni legate sia alla struttura che al tipo di collagene. In primo luogo, col passare degli anni e in conseguenze dell'attività fisica, aumentano la formazione di legami crociati tra le fibre collagene (Patterson-Kane 2009), il diametro delle fibrille ed i legami covalenti all'interno delle fibrille di collagene (Dowling 2000). L'angolazione del crimp pattern diminuisce, questa alterazione si riscontra più facilmente nella porzione centrale del tendine rispetto alla periferia; tendini con un angolazione e una lunghezza del crimp pattern minori raggiungono prima il termine della *toe region* descritta dalla curva di isteresi (Patterson-Kane 2009).



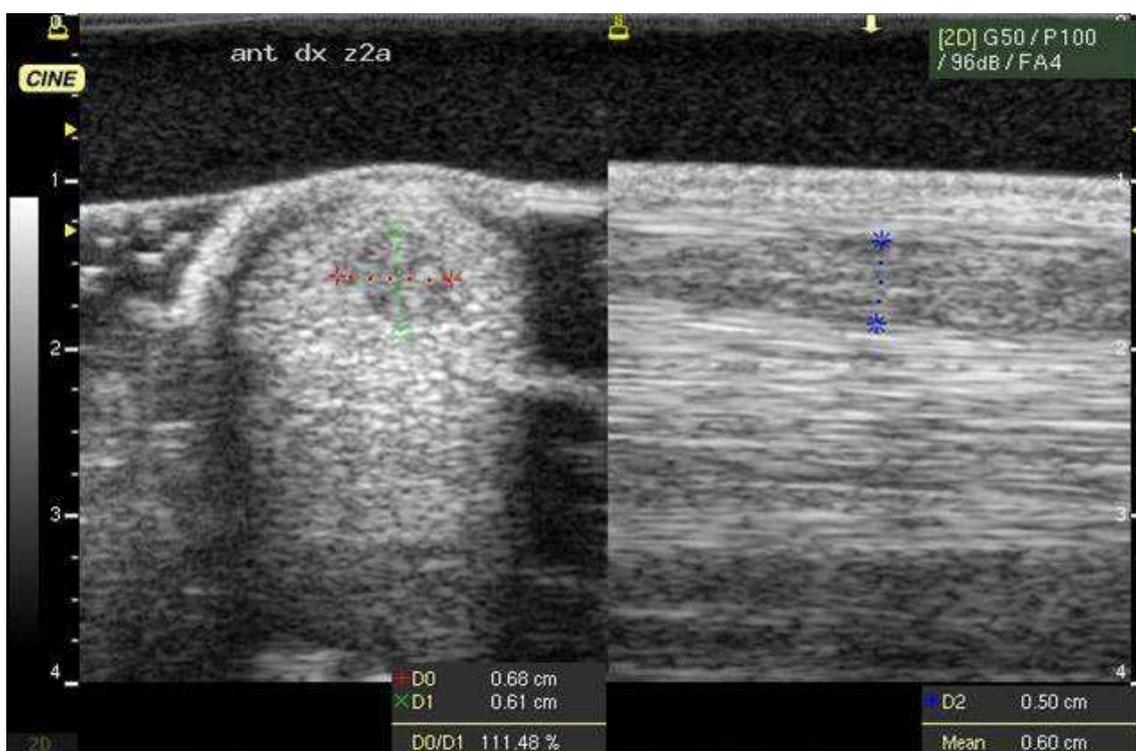
Tale curva descrive molto bene il comportamento biomeccanico del tendine. Durante la contrazione muscolare il tendine è sottoposto prevalentemente a sollecitazioni tensorie, unidirezionali, minime sono le sollecitazioni flessorie,

pressorie o di torsione. Quando è assoggettato ad una forza traente, esso subisce un allungamento pari al 4% circa della sua lunghezza originaria. Successivamente il tessuto tendineo dimostra una notevole rigidità per aumenti anche notevoli della forza traente. Per carichi ancora più elevati si ha un maggiore incremento dell'entità della deformazione che porta infine alla rottura del tendine.

Oltre a queste modificazioni strutturali ci sono modificazioni legate al tipo di collagene, infatti col tempo aumenta la sintesi di collagene di tipo III. Nel tendine il collagene di tipo III dovrebbe essere presente in scarsa quantità in quanto è legato alle fibrille di piccolo diametro, quindi più deboli, inoltre il collagene di tipo III forma dei legami interfibrillari che conferiscono rigidità al tendine. Di conseguenza, se la sintesi di collagene di tipo III aumenta, il tendine si indebolisce ed è predisposto a lesione (Young 2009; Dowling 2000). Un'altra alterazione legata all'età che probabilmente predispone o contribuisce allo sviluppo di quelle appena citate è la diminuzione dei livelli di fattori di crescita circolanti. Molti fattori della crescita tra cui il GH (growth hormone), IGF1 (insulin like growth factor 1) e il TGF β -1 (trasforming growth factor β -1) sono coinvolti nei meccanismi di riparazione e rimodellamento della matrice extracellulare, il TGF β -1 per esempio sembra stimolare la produzione di COMP e la replicazione dei tenociti (Dowling 2000). Infine nell'uomo stata riscontrata una insufficiente regolazione dell'attività delle metalloproteasi nel tendine d'Achille

che porta ad uno squilibrio tra sintesi e degradazione della matrice (Ireland 2001).

I fattori di rischio precedentemente esposti, la fatica a cui sono sottoposti muscoli e tendini, una scarsa preparazione atletica, l'incoordinazione e la fatica muscolare al termine di una corsa portano il tendine a subire un eccessivo sforzo meccanico e quindi sono causa di un danno fisico al tendine (Dowling 2000; McIlwraith 2002). La maggior parte delle lesioni tendinee si manifesta come *core lesion* ed ha sede nella porzione mediale della regione centrale



del metacarpo che è il punto in cui il tendine ha una minore sezione trasversale o CSA; questo fa pensare che il principale meccanismo patogenetico che sta alla base di una lesione tendinea sia una forza eccessiva per unità di superficie imposta al tendine (McIlwraith 2002). Tuttavia nonostante il tendine in questa regione sia più sottile, la quantità totale di collagene non risulta inferiore rispetto a quella delle altre porzioni di tendine il che fa presupporre che il tendine in questo punto non sia necessariamente più debole (Patterson-Kane 2009). Le conseguenze di età ed esercizio descritte precedentemente agiscono indebolendo la struttura tendinea, ma il principale meccanismo patogenetico che provoca un danno fisico è la temperatura. Al galoppo il cavallo può raggiungere una temperatura a livello di core tendineo pari a 43-45°C con una

differenza di 5,4°C rispetto alla superficie. Una temperatura così elevata è determinata dal fatto che il tendine non rilascia sotto forma di energia cinetica tutta l'energia che assorbe e inoltre il calore non viene dissipato a causa della scarsa vascolarizzazione del tendine. Questo aumento di temperatura non sembra causare morte ai tenociti ma danneggia gravemente la matrice extracellulare (Patterson-Kane 2009). Non è ben chiaro se i fattori vascolari tra cui l'ischemia e l'ipossia incidano sull'insorgenza delle patologie tendinee. Il TFS è irrorato da una fitta rete di vasi ed il flusso sanguigno all'interno del tendine aumenta con l'esercizio; ciò porta a pensare che in vivo non ci sia evidenza di ipossia. I tenociti sembrano dipendere da un metabolismo ossidativo ma non si è in grado di stabilire se sono in grado di sopportare una ridotta tensione di ossigeno durante lo sforzo o se piuttosto questi bassi livelli di ossigeno non portino ad una produzione eccessiva di specie dell'ossigeno reattive tra cui perossido di idrogeno e anione superossido non appena l'esercizio termina (Dowling 2000, Patterson-Kane 2009). Tutti questi fattori possono portare la struttura tendinea a degenerazione. Se questa struttura danneggiata viene sottoposta ad un carico eccessivo si ha come conseguenza lo spostamento delle fibre che vanno incontro a rottura (McIlwraith 2002, Sharma 2006). I legami all'interno delle fibrille collagene e tra le fibrille stesse si rompono, si ha un allungamento delle fibre che scivolano una sull'altra, l'allungamento e lo scivolamento intrafibrillare avviene alcuni millisecondi prima dell'allungamento macroscopico (Patterson-Kane 2009). Questo scivolamento fa separare le fibre e questo provoca emorragia dei capillari all'interno del tendine. Inizialmente si ha emorragia, deposito di fibrina, coaguli, edema, infiltrazione di cellule infiammatorie. Edema ed emorragia portano a separazione e indebolimento anche le fibre circostanti, inoltre vengono rilasciati enzimi litici come collagenasi e proteasi endogeni che agiscono anche nelle aree adiacenti alla lesione iniziale (Patterson-Kane 2009, McIlwraith 2002). Si ha lesione tendinea quando la degenerazione supera le capacità riparative del tendine (Sharma 2006). Per esempio, quando in un tendine numerosi tenociti a causa di uno stress eccessivo o in seguito ad infiammazione vanno incontro ad apoptosi si ha una diminuzione del numero di cellule che porta ad una

diminuzione nella capacità di sintetizzare matrice extracellulare. Tutto ciò porta il tendine a degenerazione, ma anche ad una alterazione del proprio metabolismo. I segnali apoptotici, come per esempio le caspasi, assumono un ruolo fondamentale nella degenerazione tendinea sia perché diminuendo il numero di tenociti diminuisce drasticamente la produzione di collagene, sia perché stimola la sintesi di collagenasi (Hosaka, 2005).

DESMITE DEL LEGAMENTO SOSPENSORE DEL NODELLO

Questa patologia viene trattata insieme alle teniti perché in realtà il legamento sospensore può essere considerato il vestigio del tendine del terzo muscolo interosseo. Anatomicamente è costituito da un robusto fascio tendineo contenente numerose fibre muscolari. Colpisce cavalli di tutte le razze, ma soprattutto trottatori e ambiatori; può essere diagnosticata negli arti anteriori e nei posteriori, nei trottatori colpisce prevalentemente gli arti posteriori (Reef 1998)

1. Desmite della branca mediale o della branca laterale del legamento sospensore: i fattori eziologici di questo tipo di lesione sono gli stessi che portano a tenite. Questa lesione colpisce cavalli di tutte le razze, può colpire gli anteriori o i posteriori, generalmente colpisce solo una delle due branche, ma negli arti posteriori non è infrequente che siano coinvolte entrambe. Spesso la causa scatenante di questa lesione è da ricondurre a una scorretta conformazione del piede o a una ferratura non idonea.
2. Desmite del corpo del legamento sospensore: la causa scatenante molto spesso è la frattura delle ossa metacarpali II e IV oppure può essere una sequela di una desmite delle branche. Questo tipo di lesione colpisce prevalentemente trottatori e galoppatori, nei primi sono coinvolti sia gli anteriori che i posteriori, nei secondi prevalgono le lesioni agli anteriori. I segni tipici di una lesione tenodesmica si associano ad un calo delle performance anche se la zoppia può non essere evidente.

3. Desmite dell'inserzione prossimale del legamento sospensore sull'osso metacarpale III anche in questo caso la eccessiva sollecitazione porta a lesione. Questo termine si riferisce a desmiti del terzo prossimale del metacarpo o del metatarso e rappresenta una condizione relativamente frequente che può colpire sia gli arti anteriori che i posteriori, può colpire cavalli di tutte le età e appartenenti a tutte le discipline sportive. Questa patologia generalmente è associata a un calo delle performance oltre che ai classici segni clinici come edema, zoppia, evidente soprattutto dopo flessione del nodello (Dyson 1996).

2.4: FISIOPATOLOGIA DEL PROCESSO DI GUARIGIONE NEL TESSUTO TENO-DESMICO

I tendini ed i legamenti sono organi passivi, costituiti da tessuti dotati di flessibilità e robustezza che permettono loro di trasmettere le forze della contrazione muscolare all'osso su cui prendono inserzione, realizzando così i movimenti articolari necessari alla locomozione. Per sostenere gli stress meccanici devono possedere un'elevata resistenza alla tensione ed avere la possibilità di scivolare sui tessuti peritendinei. Superando i livelli massimi di tensione che possono essere sopportati si arriva alla perdita permanente della normale conformazione fino alla rottura della struttura di collagene, con conseguenti alterazioni dell'andatura e calo delle performance del soggetto. Negli animali di interesse veterinario la maggior parte dei disturbi invalidanti di origine tendino-legamentosa sono di origine traumatica: un trauma acuto può determinare la rottura di un tendine, come nel caso di un oggetto affilato che colpisce la superficie caudale dell'arto posteriore determinando la resezione del tendine comune calcaneale. I tendini possono anche essere lacerati dall'applicazione di una forza che supera la capacità di resistenza dell'unità muscolo-tendinea (Boothe 2001). Pur attribuendo la rottura delle fibre tendinee ad un evento generalmente singolo, acuto e secondario ad 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. Quando le lesioni si localizzano nella parte centrale del tendine (*core lesion*) si verifica una minor formazione di fasci tendinei e fibrosi e la struttura diviene nettamente meno resistente; nel momento in cui il carico di tensione supera la resistenza del tendine si verificano danni strutturali macroscopici (Dehghan 2007). Dopo una lesione il tendine normalmente guarisce attraverso la formazione di una cicatrice tissutale, la quale impiega circa 1-2 anni per formarsi (Goodship 1994, Maia 2009): i fattori che influenzano il risultato finale sono numerosi, tra i più significativi vi è il tipo di lesione, il tendine leso, la tipologia dei tessuti circostanti ed il trattamento scelto. Una buona guarigione mira alla minor compromissione possibile della funzionalità del tendine o del legamento. 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 ridurre al minimo la comparsa di aderenze fibrose con le strutture circostanti.

Il processo di guarigione può avvenire in due modi: estrinseco ed intrinseco, in quello estrinseco, che rappresenta la tipologia predominante, si verificano una risposta da parte dei fibroblasti della guaina tendinea e degli altri tessuti attorno, un afflusso di sangue extratendineo, ma la cosa fondamentale è la formazione di aderenze (Weiner 1971, Matthews 1979, Sharma 2006, Andia 2010). Durante questo processo, la cellularità del tendine è aumentata e i fibroblasti che infiltrano la ferita appaiono morfologicamente diversi dai tenociti nativi (McIlwraith 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 (Manse 1988, Kim 2010). La fisiopatologia delle lesioni tenodesmiche può essere suddivisa in quattro fasi: fase infiammatoria acuta, fase subacuta di proliferazione (o di riparazione) e fase cronica di rimodellamento (Smith 2003, Molloy 2005, Sharma 2006).

Fase infiammatoria acuta

La fase acuta si instaura immediatamente dopo il trauma e si protrae per una o due settimane. L'estensione e la durata di questa fase sono determinate dalla gravità della lesione e dalla terapia antinfiammatoria somministrata. È caratterizzata da flogosi, emorragia intratendinea, aumento del flusso sanguigno, edema ed infiltrazione leucocitaria (neutrofili inizialmente, in seguito macrofagi e monociti) (Smith 2003, Sharma 2006, Maia 2009). Con la rottura delle fibrille e delle fibre si crea una lacuna, riempita subito dall'emorragia. L'esposizione del collagene ed il rilascio di molecole di segnalamento da parte delle cellule intrinseche scatenano la cascata della coagulazione, con conseguente formazione di un coagulo e deposizione di fibrina. Le piastrine e la fibrina formano una matrice temporanea, che verrà in seguito sostituita da tessuto di granulazione (Anitua 2004), ma è fondamentale nelle fasi precoci della guarigione per l'allineamento, dei fibroblasti innanzitutto, e successivamente delle nuove fibrille (Spinabella 2007).

La cascata della coagulazione, mediante la trombina, favorisce, inoltre, la proliferazione fibroblastica e protegge i fattori mitogenici e chemotattici dai loro inibitori naturali (Carmona 2006). Le piastrine attivate all'interno della matrice stimolano la migrazione leucocitaria mediante il rilascio di citochine proinfiammatorie, IL-1 β (Interleuchina 1 β) e TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), e fattori della crescita: IGF (Insulin-like Growth Factor), TGF- α (Transforming Growth Factor α), TGF- β (Transforming Growth Factor β), PDGF (Platelet Derived Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor) e HGF (Hepatocyte Growth Factor) (Robbins 1997, Molloy 2005). TNF- α e IL-1 favoriscono l'infiammazione stimolando la migrazione delle cellule fagocitarie, la permeabilità e l'esposizione di molecole adesive dell'endotelio ed intensificando la produzione leucocitaria di citochine e fattori della crescita (Anitua 2004). Entrambi sono soggetti a 'down regulation' da parte di IL-6 (Interleuchina-6) prodotta da leucociti, fibroblasti e cellule endoteliali. I leucociti polimorfonucleati ed i linfociti producono citochine e glicoproteine a basso peso molecolare che,

insieme ai prodotti della degradazione di componenti della matrice extracellulare, fungono da mediatori locali del processo flogistico e richiamano altre cellule estrinseche. Si innescano vie di segnalamento autocrine e paracrine, provocando l'espansione del processo infiammatorio ed il reclutamento di ulteriori cellule, comprese cellule mesenchimali pluripotenti (Molloy 2005). Le prime cellule a giungere sono i neutrofili (Enwemeka 1989, Maia 2009): questi arrivano nel sito della lesione in 24-48 ore e permangono per diversi giorni, svolgendo la funzione di fagocitosi dei tessuti necrotici e secernendo diversi growth factors, che inducono neovascolarizzazione e la formazione di tessuto di granulazione e stimolano la migrazione dei fibroblasti. Il loro ruolo risulta di primaria importanza perché sono i fibroblasti stessi che depositano la trama di collagene lungo i filamenti di fibrina. Dal terzo giorno dalla lesione, nella ferita si trovano piastrine, macrofagi, leucociti, linfociti e cellule mesenchimali multipotenti (Maia 2009). In seguito al rallentamento del flusso ematico nei vasi attorno al sito di lesione, vi è la marginazione dei leucociti, ossia il loro accumulo lungo le pareti dei vasi. Ciò permette l'instaurarsi del processo denominato *rolling* dei leucociti attraverso interazioni transitorie a bassa affinità tra le selectine. Le selectine (L, E e P) sono presenti a livello leucocitario, piastrinico ed endoteliale. Successivamente i leucociti si fermano, legandosi a glicoproteine denominate adesine che hanno la funzione di favorire le interazioni ad alta affinità dei leucociti con la membrana basale o con ligandi espressi da altre cellule. In seguito i leucociti si insinuano tra le cellule endoteliali, attraversano la membrana basale e vengono liberati nello spazio extravasale, potendo così raggiungere il sito di lesione. Neutrofili e macrofagi iniziano a rimuovere il tessuto necrotico mediante fagocitosi (Kumar 2005). Riassumendo, l'allungamento, lo scivolamento e la rottura delle fibrille sono seguiti da emorragia ed edema che separano e indeboliscono le fibre adiacenti (Spinabella 2007) e interrompono l'apporto ematico alla zona lesa, con conseguente necrosi (McIlwraith 2002). Il rilascio di enzimi da parte dei fibroblasti danneggiati e delle cellule infiammatorie instaura inoltre la fibrinolisi (Bowling 2000). Se la flogosi è massiva, gli enzimi collagenasi e proteasi, oltre a rimuovere il collagene necrotico, digeriscono anche porzioni del tendine

relativamente intatte. Se non si riesce a controllare l'infiammazione, nei giorni seguenti la comparsa dei sintomi, si può assistere ad un'espansione della lesione inizialmente rilevata (Smith 2003). Inoltre, se la flogosi è imponente, vi è la formazione di un'eccessiva quantità di tessuto di granulazione che darà origine, in seguito, ad un'estesa fibrosi (Spinabella 2007).

Fase subacuta di proliferazione o riparazione

La fase subacuta di riparazione inizia un paio di giorni dopo l'infortunio, accavallandosi con la reazione infiammatoria, e perdura per tre settimane (Sharma 2006). Le cellule estrinseche (piastrine, macrofagi, leucociti polimorfonucleati, linfociti e cellule mesenchimali pluripotenti) agiscono assieme alle cellule intrinseche (dell'endotenonio e dell'epitenonio) per rilasciare una seconda ondata di citochine, la quale instaura la fase di proliferazione (Molloy 2005). La stimolazione dei monociti da parte della fibrina insolubile, della bassa tensione di ossigeno, di agenti chemotattici, di lipopolisaccaridi batterici e di interferone determina la loro trasformazione in macrofagi, i quali dal terzo giorno divengono la cellula infiammatoria prevalente. I macrofagi hanno molteplici funzioni, che espletano mediante il rilascio di fattori di crescita e citochine (PDGF, TGF- β , TGF- α , FGF e Il-1 e il CSF-1 – Colony Stimulating Factor). Essi lisano il tessuto necrotico e stimolano il richiamo e la proliferazione di fibroblasti, la formazione di tessuto di granulazione e la neovascolarizzazione dell'area, attraverso la gemmazione dei capillari endoteliali (Molloy 2005; Carmona 2006). Fondamentale è il contributo di fibrina, fibronectina e proteoglicani ricchi in acido ialuronico, i quali permettono la migrazione cellulare, agiscono da supporto per la deposizione e l'orientamento delle fibrille collagene e legano le cellule del tessuto connettivo alla matrice. La proliferazione fibroblastica è una risposta all'assenza di cellule adiacenti e all'azione di fattori di crescita e chemochine secreti da piastrine, macrofagi e cheratinociti (Carmona 2006). I fibroblasti sintetizzano il collagene e le proteine che compongono la cicatrice, la quale è caratterizzata da collagene poco organizzato, prevalentemente di tipo III, e GAG. In questa fase il contenuto di

GAG ed acqua è elevato (Molloy 2005; Sharma 2006). Il collagene III è immaturo e si organizza casualmente, ma forma legami covalenti interfibrillari che garantiscono precoce stabilità e forza meccanica (Bowling 2000, Fortier 2007). Si evidenziano anche aumenti di collagene IV e V (Bowling 2000). I fibroblasti derivano da diverse fonti: tenociti residenti, cellule dell'endotenonio, cellule del paratenonio e monociti vascolari (Smith 2003). Anche se vi sono delle differenze nell'influenza di cellule provenienti da differenti regioni della struttura sulla riparazione tissutale, contribuiranno alla guarigione, per la maggior parte dei tendini e dei legamenti, sia le cellule intrinseche, mediante proliferazione dei tenociti dell'endotenonio e dell'epitenonio, che quelle estrinseche, derivanti dalla guaina e dal liquido sinoviale (Molloy 2005). La riparazione intrinseca è rilevante, ma in caso di lesioni estese, la componente estrinseca diviene fondamentale per la guarigione. Incoraggiando la prevalenza del processo intrinseco si può potenzialmente diminuire la formazione di aderenze peritendinee (Spinabella 2007).

L'angiogenesi si sviluppa assieme alla fibroplasia. L'incremento di fattori di crescita angiogenetici è correlato con un pattern di crescita vascolare verso il sito di lesione, derivante dall'apporto sanguigno intratendineo e dell'epitenonio. Questa neovascolarizzazione procede lungo la superficie dell'epitenonio e apporta cellule estrinseche, nutrienti e fattori di crescita alla sede del danno (Molloy 2005). Si instaura mediante la distruzione della membrana basale da parte di collagenasi e attivatore del plasminogeno, secreti dalle cellule endoteliali. Questo processo rende possibile la migrazione delle cellule endoteliali verso il sito di stimolo angiogenico. Le cellule endoteliali producono fibronectina e collagene, i quali formano una matrice su cui le cellule possono migrare. La proliferazione e la differenziazione endoteliale è regolata da periciti, cellule che circondano i capillari e possono ridurre la risposta angiogenica inibendo la crescita delle cellule endoteliali adiacenti. I nuovi capillari sono molto fragili e permeabili, di conseguenza il tessuto di granulazione è edematoso (Anitua 2004; Carmona 2006). Nelle varie fasi della guarigione, la matrice extracellulare, in particolare il collagene I, è fondamentale: agisce da substrato fisico su cui le cellule possono aderire e migrare, ma ha anche la

capacità di indurre delle risposte intracellulari nelle cellule infiammatorie e nei fibroblasti, attraverso il segnalamento mediato dall'integrina. Ad esempio, i monociti vengono indotti al rilascio di TNF- α , IL-6 ed ossigeno dal semplice contatto con il collagene I. Queste risposte della matrice extracellulare sono fondamentali per la progressione della guarigione (Molloy 2005) L'ossido nitrico è un radicale libero dall'emivita breve ed ha molteplici funzioni biologiche: è battericida ed induce l'apoptosi delle cellule infiammatorie, l'angiogenesi e la vasodilatazione. L'ossido nitrico potrebbe espletare una funzione in diversi aspetti della guarigione tendinea e legamentosa. In seguito a tenotomia del tendine di Achille nel ratto, i livelli della ossido nitrico sintetasi hanno presentato un picco dopo 7 giorni e sono ritornati ai livelli basali 14 giorni dopo la chirurgia. L'inibizione dell'enzima ossido nitrico sintetasi ha prodotto una diminuzione della guarigione rappresentata da minor area di sezione e minore punto di rottura del tendine (Sharma 2006). A partire dalla seconda settimana dall'insorgenza della lesione, si nota una migliore organizzazione del tessuto di riparazione ed una maggiore proliferazione cellulare della matrice. Il diametro dei vasi cicatriziali ed il contenuto di collagene, tuttavia, sono maggiori rispetto a quelli presenti nel tendine normale (Molloy 2005).

Fase cronica di rimodellamento

Durante la fase cronica, che inizia alcuni mesi dopo l'infortunio, il tessuto cicatriziale viene lentamente rimodellato (Sharma 2006). Si assiste alla riduzione del contenuto cellulare e vascolare del tessuto (Molloy 2005), alla diminuzione della sintesi di GAG (Sharma 2006) ed alla conversione del collagene III in collagene I. Tuttavia, fibre lasse di collagene I e III predominano fino a 6 mesi dopo l'infortunio. Con il rimodellamento, la matrice diviene meno densa e le fibrille di collagene I iniziano ad organizzarsi secondo un pattern lineare, indici di una normalizzazione progressiva del tessuto (Bowling 2000, Sharma 2006). Fino a 14 mesi dopo l'insorgenza della lesione, tuttavia, sono ancora evidenziabili quantità anormali di collagene III, fibrille di collagene dalle dimensioni minori rispetto alla norma, carenza di fascicoli di fibre e di

organizzazione lineare (Bowling 2000; Fortier 2007). Anche oltre ad un anno dopo la comparsa della lesione, i diametri delle fibrille collagene e la quantità di legami covalenti spesso rimangono inferiori alla norma (Molloy 2005). Le metalloproteinasi della matrice (MMP) sono importanti regolatori del rimodellamento della ECM, in quanto denaturano e degradano il collagene. I loro livelli sono alterati durante la guarigione tendinea. In un modello di lacerazione del tendine flessore nel ratto, l'espressione di MMP-9 e MMP-13 ha presentato un picco tra il settimo ed il quattordicesimo giorno dopo la chirurgia. I livelli di MMP-2, MMP-3 e MMP-14 sono aumentati in maniera significativa dopo la chirurgia e sono rimasti elevati fino al ventottesimo giorno. Questi ritrovamenti indicano che MMP-9 e MMP-13 partecipano soltanto nella degradazione del collagene, mentre MMP-2, MMP-3 e MMP-14 partecipano sia nella degradazione che nel rimodellamento del collagene (Sharma 2006). L'equilibrio tra la sintesi e la degradazione di collagene durante la fase di rimodellamento dipende dalla presenza simultanea di MMP e dei loro inibitori, i TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases). Un'alterazione di questo equilibrio può portare ad un riassorbimento anormale ed un ritardo nella guarigione (Carmona 2006). L'esercizio controllato, operando una leggera tensione del tendine o del legamento lesionato, sembra influenzare positivamente il processo di riparazione intrinseca, promuovendo la conversione del collagene e, fattore di notevole importanza, il corretto allineamento delle fibrille lungo la direzione di applicazione delle forze, migliorando quindi le proprietà meccaniche del tessuto cicatriziale. Inoltre, potenzialmente, l'esercizio potrebbe diminuire la formazione di aderenze, favorendo la separazione fra il tendine o legamento ed il paratenonio o la guaina sinoviale circostante. Di conseguenza il completo riposo potrebbe essere controindicato dopo le prime fasi della patologia, infatti, il recupero funzionale completo sembra essere favorito dall'introduzione di un protocollo di esercizio controllato progressivo. Il carico di esercizio non deve mai essere esagerato, in quanto sollecitazioni eccessive di un tessuto che non ha ancora recuperato le sue caratteristiche meccaniche favoriranno l'insorgenza di recidive (Reef 1998, Spinabella 2007). La corretta gestione di una patologia

tenodesmica nel cavallo sportivo consiste nel programmare un periodo di esercizio controllato quotidiano molto leggero, preferibilmente in qualità di passo a mano, in modo da favorire i meccanismi di riparazione. Segue un periodo di riabilitazione in cui si provvede ad aumentare gradualmente il carico di lavoro, in modo da dare alla struttura il tempo di adattarsi a sollecitazioni sempre maggiori e di consentire un adeguato recupero del tono muscolare (Reef 1998, Smith 2003). La guarigione è completa dopo circa 15-18 mesi (Smith 2003), ma la sua qualità è variabile. A volte la quantità di collagene ed il rimodellamento sono sufficienti: il tendine riacquista dimensioni quasi normali e vi è buon allineamento delle fibre. In altri casi si sviluppa una grossa cicatrice con ispessimento della struttura, fibre dal pattern disorganizzato e fibrosi peritendinea (Reef 1998). Come abbiamo già detto, si suppone che le patologie tenodesmiche siano dovute ad una degenerazione della ECM provocata dalla mancata risoluzione di una flogosi e dallo scadente processo riparativo. Un incremento degli enzimi catabolici IL-1 e TNF- α si riscontra nei tendini equini in presenza di infiammazione: Hosaka et al., hanno riportato un livello di TNF- α mRNA 2,7 volte maggiore in presenza di tenite rispetto al tessuto normale (Hosaka 2005). IL-1 e TNF- α aumentano la degradazione della matrice attraverso l' 'up-regulation' delle MMP e delle prostaglandine e la 'down-regulation' delle TIMP, fornendo un quadro catabolico deleterio per le cellule residenti (Carmona 2006). Il TNF- α , inoltre, è una citochina pleiotropica che induce la proliferazione o la morte cellulare attraverso il legame con i recettori TNF-R1 e TNF-R2. Entrambi i recettori mediano la proliferazione, mentre soltanto il TNF- R2 media l'apoptosi (Hosaka 2005). In un TFS infiammato si nota la presenza di eccessiva apoptosi cellulare (Carmona 2006). L'incidenza delle recidive nelle lesioni tenodesmiche è purtroppo elevata, anche dopo la guarigione completa della lesione, poiché il tessuto non ritorna ad essere uguale a quello normale. Non vi è ancora una spiegazione certa del perché il tessuto tenodesmico non è in grado di rigenerare completamente da un infortunio (Molloy 2005). La composizione e la disposizione anormali della matrice nel tessuto cicatriziale, la quale presenta proprietà biomeccaniche scadenti rispetto al tessuto tendineo, e la lentezza della guarigione sono i motivi

per cui il completo recupero da una lesione tenodesmica è così difficoltoso (Dowling 2000). Il tipo e le caratteristiche delle fibre collagene nel tessuto cicatriziale di riparazione sono differenti da quelle presenti nel tendine normale perché si ha una riduzione delle interdigitazioni fra le fibre collagene e la presenza di una abbondante quantità del tipo III anche il 20-30% quando normalmente è 1% (Williams 1980). Sebbene le fibre collagene di tipo III presentino una maggior elasticità rispetto a quelle di tipo I, esse hanno delle caratteristiche meccaniche differenti dovute principalmente alla dimensione inferiore di diametro. Le proprietà meccaniche del tendine riparato attraverso la formazione di una cicatrice sono inferiori rispetto al tendine normale, si ha una perdita di organizzazione strutturale con un forte aumento di tessuto fibroso cicatriziale (Wang 2006, Obaid 2010). Si può avere anche un limitato scorrimento del tendine dovuto a questa eccessiva formazione di tessuto cicatriziale, che può esitare nella perdita di funzione. Una carente cicatrizzazione invece può portare ad una rottura prematura nel sito di lesione. La recidiva può coinvolgere lo stesso tendine o legamento, il controlaterale o altre strutture di supporto dell'articolazione metacarpofalangea. Dopo il rimodellamento, il tendine o legamento è caratterizzato da maggiore forza rispetto al tendine normale, ma minore elasticità. Ne consegue una maggiore tensione sulle zone limitrofe a quella della lesione, precedentemente non danneggiate. Di conseguenza, se la recidiva colpisce lo stesso tendine o legamento, in genere è adiacente alla lesione originale. Una lesione del tendine o legamento controlaterale può essere considerata effettivamente una recidiva, in quanto la natura della patologia è bilaterale (Smith 2003). Un successivo infortunio a carico del LS può essere dovuto ad una parziale perdita del supporto all'articolazione metacarpofalangea a causa dell'allungamento del TFS, conseguenza di una sua grave tenite (Smith 2003). Frequentemente, si nota la comparsa di recidive quando il processo di guarigione ha determinato la formazione di un abbondante tessuto cicatriziale all'interno o tra i fascicoli, compromettendone la funzionalità. Questo è il motivo per cui lo scopo delle terapie adottate per il trattamento delle lesioni tenodesmiche del cavallo è quello di ridurre la formazione di tessuto cicatriziale.

Differenze nella guarigione fra porzioni intrasinoviali ed extrasinoviali

L'assenza del paratenonio, e quindi di un apporto vascolare esterno alla porzione di tendine sita nelle guaine, potrebbe motivare la scadente guarigione che caratterizza le lesioni in queste zone. La guarigione intrinseca determina migliore biomeccanica ed insorgenza di un minor numero di complicazioni. La guarigione estrinseca, invece, comporta la formazione di aderenze all'interno della guaina per permettere l'angiogenesi e l'infiltrazione cellulare all'interno del tendine danneggiato. Le aderenze, però, limiteranno i movimenti futuri della struttura con effetti deleteri sulla sua funzionalità (Smith 2003).

Differenze nella guarigione tra tendini e legamenti

I tendini ed i legamenti manifestano alcune differenze nelle loro capacità di guarigione. Spindler et al., hanno esaminato la risposta di cellule endogene del legamento crociato anteriore e del tendine patellare umano a diverse concentrazioni di fattori di crescita. Culture di cellule del legamento crociato anteriore hanno risposto, con un aumento della proliferazione, ad una stimolazione con TGF- β alle concentrazioni di 10-100nG/L, mentre quelle del tendine patellare hanno risposto solo quando esposte alle concentrazioni più basse. L'effetto contrario è stato evidenziato nei due tessuti all'esposizione al PDGF (Platelet Derived Growth Factor): le cellule tendinee hanno mostrato un significativo aumento nella proliferazione, mentre quelle legamentose no (Spindler 1996, Molloy 2005). La fibrillogenesi presenta delle differenze nel tendine crociato anteriore e nel legamento patellare umano. Il diametro delle fibrille nel tendine patellare ha dimensioni maggiori rispetto a quello nel legamento crociato durante la crescita, ma anche alla maturazione. Questo aumento delle dimensioni sembra essere correlato con un aumento dell'espressione delle proteine della ECM nel tendine rispetto al legamento, fra cui la decorina ed il collagene I (Molloy 2005). Il motivo per cui esistono differenze nelle capacità di risposta ai fattori di crescita in cellule molto simili

non è chiaro. La variabilità potrebbe essere dovuta a differenze nell'ambiente ed alla facilità o meno con cui i fattori di crescita riescono a giungere alla zona lesionata (Molloy 2005). Mediante l'ecografia si rilevano spesso differenze nella guarigione fra tendini e legamenti. Le lesioni del LS, e a volte anche quelle del TFP, mostrano un miglioramento ecografico molto più lento rispetto alle lesioni del TFS. In particolare, per quanto riguarda il LS, il miglioramento dell'ecogenicità e dell'allineamento delle fibre è lento ed il legamento lesionato può rimanere ipoecogeno per mesi. In alcuni cavalli, soprattutto se la lesione è cronica, la parte non riacquista mai un aspetto uniforme ed un'ecogenicità normale, anche se la guarigione clinica è da considerarsi completa (Reef 1998, Dyson 2003).

2.5: STRATEGIE TERAPEUTICHE PER LE PATOLOGIE TENO-DESMICHE

Le lesioni tenodesmiche provocano alterazioni permanenti della composizione molecolare e delle proprietà biomeccaniche della struttura: si determina un indebolimento del tendine ed un'alterazione delle proprietà meccaniche. Il tendine lesionato potrebbe non recuperare completamente la propria funzionalità e andare incontro a recidiva (Dowling 2000). Il rischio di recidiva nella lesioni tendinee è molto alto, 56% secondo Smith, 67% secondo Dyson, ma Genovese descrive persino percentuali pari al 93% (Genovese 1996, Dyson 2004, Smith 2008). Anche se esistono molte terapie, sia mediche che chirurgiche, si hanno poche prove oggettive dei loro effettivi benefici a lungo termine. Un corretto approccio terapeutico alle lesioni tenodesmiche del cavallo consiste nella scelta del trattamento più indicato in base alla fase di guarigione della lesione (Dowling 2000).

Trattamenti convenzionali

Le terapie utilizzate fino ad oggi possono essere classificate secondo la fase di guarigione in cui vanno ad agire e quindi: fase acuta o infiammatoria, fase subacuta o di proliferazione, fase cronica o di rimodellamento, oppure possono essere suddivise in terapie fisiche, farmacologiche o chirurgiche (Dowling 2000). Durante la fase acuta vengono di norma utilizzati quei trattamenti che riducono la flogosi e, di conseguenza, limitano l'azione degli enzimi proteolitici sulla matrice intatta: il riposo, il bendaggio, le docciature fredde e l'applicazione di ghiaccio o pomate antiflogistiche (Bowling 2000, Smith 2003).



L'uso di *antinfiammatori* nel trattamento delle lesioni tenodemiche offre un ampio spettro di opportunità e soluzioni descritte da diversi autori. Il precoce utilizzo (nelle prime 24 ore) di corticosteroidi per via sistemica quali il desametasone (0.04 mg/kg), potrebbe ridurre l'infiammazione acuta e limitare, quindi, i danni a carico delle fibre intatte. Al contrario, l'uso più tardivo di corticosteroidi è controindicato, in quanto inibisce la risposta fibroblastica. Inoltre, l'utilizzo intralesionale di corticosteroidi a deposito potrebbe addirittura avere degli effetti collaterali, provocando necrosi del collagene e calcificazione distrofica nel punto di inoculazione (Dowling 2000; McIlwraith 2002). L'uso sistemico degli antinfiammatori non steroidei, (FANS) quali il fenilbutazone (4.4 mg/kg), per 7-10 giorni è controverso: la loro effettiva azione antinfiammatoria in una lesione tenodesmica non è mai stata dimostrata, di conseguenza la loro funzione sembrerebbe essere soprattutto analgesica (Reef 1998, Bowling 2000, Smith 2003). Anche il *dimetilsulfossido* (DMSO) è sconsigliato, in quanto diminuisce il carico di rottura medio del tendine. Terminata la fase acuta, si valuta innanzitutto la ferratura del cavallo. Il corretto *pareggio* del piede, in particolare il suo equilibrio latero- mediale, è basilare. L'*esercizio controllato*, sia attivo che passivo, promuove la guarigione e la riabilitazione delle patologie muscolo-scheletriche. Terminata la fase acuta, la

ripresa di un leggero esercizio promuove la circolazione, facilita il drenaggio linfatico, incrementa il riassorbimento di eventuali raccolte ematiche ed essudative, facilita l'allineamento delle cellule e delle fibre e, favorendo la separazione fra la struttura lesionata e quelle circostanti (paratenonio, guaina, altri tendini o legamenti), diminuisce l'incidenza di aderenze. L'esercizio controllato dovrebbe essere raccomandato in qualsiasi caso, indipendentemente dalla scelta di effettuare altri trattamenti. Esistono diversi protocolli di esercizio controllato, i quali si basano sull'incremento graduale della durata e dell'intensità dell'esercizio, iniziando da brevi sessioni di passo a mano e giungendo alla ripresa del lavoro al galoppo 12 mesi dopo la lesione (Dyson 1997, Gillis 1997). Per favorire una buona guarigione, è consigliabile effettuare



delle regolari visite cliniche ed ecografiche di controllo durante la riabilitazione ed, in base ai riscontri, eventualmente modificare il protocollo in base al singolo caso. In passato, la terapia più comune per le lesioni tenodesmiche consisteva nel creare una "contro irritazione" mediante l'impiego di *pomate o tinture revulsive* (a base di biioduro di Mercurio, tanaceto, olio di crotontiglio...), blister interni

(iodio al 2% su base oleosa), focatura e crioterapia. Tradizionalmente, si pensava che i tendini riparassero grazie all'arrivo di tessuto di granulazione e fibroblasti provenienti da fonti estrinseche, come la guaina sinoviale ed il paratenonio. Le aderenze che si formavano tra queste ultime e la struttura lesionata erano considerate, quindi, l'unica fonte di nutrienti e cellule per la guarigione



tenolegamentosa e, di conseguenza, erano considerate essenziali per il processo riparativo. In realtà questi trattamenti traumatizzano il tendine, provocano la formazione di un abbondante tessuto cicatriziale scarsamente vascolarizzato, sia nel tendine che nei tessuti circostanti, ed aumentano la formazione di aderenze tra il tendine lesionato ed il tessuto peritendineo

(Murphy 1997, Dowling 2000). Nonostante ciò, a causa della forte tradizione e della loro economicità rispetto alle nuove terapie, questi trattamenti sono ancor'oggi diffusi (Dowling 2000, Smith 2003). Il *beta-aminopropionitrile fumarato* è una sostanza tossica che si trova nei semi della pianta *Lathyrus odoratus*. L'iniezione intralesionale di Bapten® (betaaminopropionitrile fumarato) viene effettuata 30-90 giorni dopo la lesione. Il Bapten® si lega all'enzima lisil-ossidasi: la sua azione è quella di inibire la deaminazione della lisina, bloccando temporaneamente la formazione di legami crociati e favorendo così il corretto allineamento delle nuove fibre collagene. Esso favorisce la formazione di un maggior numero di fibrille di collagene I ed un loro corretto allineamento, ma non incrementa la velocità della guarigione (Smith 2003). Gli esiti clinici a lungo termine di questo trattamento, però, non sono molto convincenti (Bowling 2000, Smith 2003). Lo *ialuronato di sodio* appartiene ai glicosaminoglicani. Influisce direttamente sulla formazione e sull'aggregazione delle fibrille collagene, promuove la fibrillogenesi del collagene I e stimola l'angiogenesi (Smith 2003, Spinabella 2004). L'impiego intralesionale di ialuronato di sodio potrebbe ridurre la formazione di aderenze durante la guarigione tendinea (Dowling 2000, Smith 2003, Spinabella 2004). I *PSGAG (glicosaminoglicani polifosfati)* sono complessi polisaccaridici solfati. Inibiscono l'attivazione dei macrofagi e l'attività delle collagenasi e delle metalloproteinasi, prevenendo così la degradazione delle fibre sane e dei proteoglicani. L'utilizzo di PSGAG intralesionale o sistemico, di conseguenza, potrebbe essere utile nelle fasi precoci della lesione (Dowling 2000, Smith 2003). Tuttavia, anche gli effetti dello ialuronato di sodio e dei PSGAG sono controversi. Dyson ha effettuato uno studio comparativo degli esiti clinici a lungo termine di tre trattamenti per la tenite del TFS: il metodo conservativo a base soltanto di esercizio controllato, l'iniezione di ialuronato di sodio associato ad esercizio controllato e l'impiego di PSGAG (in alcuni cavalli sia intralesionale che sistemico, in altri esclusivamente per via sistemica) associato sempre ad esercizio controllato. Non ha rilevato la presenza di differenze statisticamente significative nell'incidenza delle recidive nei tre differenti gruppi, la quale in media era del 43% (Dyson 1997).

Si è diffuso negli ultimi anni il trattamento delle patologie tenodesmiche mediante le *onde d'urto*. In letteratura esistono molti lavori che attestano l'efficacia di tale metodica nell'uomo per il trattamento di diverse patologie ortopediche, tra cui le tendinopatie inserzionali e le teniti croniche caratterizzate da calcificazioni distrofiche nella spalla. L'efficacia delle onde d'urto nel cavallo è controversa. I meccanismi mediante cui favorirebbero la guarigione non sono ancora del tutto chiari, ma recenti lavori indicano che potrebbero promuovere la neovascolarizzazione, incrementare l'espressione di diversi fattori di crescita nel tendine e nell'osso e facilitare il reclutamento di cellule staminali mesenchimali nell'osso (Dahlgren 2005). Normalmente vengono effettuati tre trattamenti con onde d'urto, a 10- 14 giorni di distanza. Le onde d'urto vengono impiegate come unico trattamento o in associazione ad altre terapie (Hopper 2007). Dati preliminari provenienti da studi clinici dimostrano che potrebbero rivelarsi un trattamento efficace per alcune patologie tenodesmiche nel cavallo, in particolare per le desumiti croniche del LS (Scheuch 2000). Diversi trattamenti chirurgici sono conosciuti per il trattamento delle patologie tenodesmiche del cavallo. Nel caso di tenite del TFS, viene praticata la desmotomia del legamento accessorio del flessore superficiale (LA-TFS), la quale produce un allungamento funzionale dell'unità muscolotendinea, riducendo così le sollecitazioni al tendine. Una volta tagliato, il LA guarisce rapidamente, ma, soprattutto se l'animale viene tenuto in esercizio, rimane allungato (Bowling 2000). In realtà, la tensione viene ridistribuita su altre strutture, in particolare sul LS, aumentando quindi il rischio di una desmite sospensoria (Bowling 2000, Smith 2003, Dahlgren 2005). Il *tendon splitting* o fissurazione tendinea consiste in piccole incisioni eseguite longitudinalmente al tendine (McIlwraith 2002); attualmente viene impiegato da alcuni chirurghi nel trattamento di 'core lesion' tendinee acute per drenare l'emorragia e l'essudato raccolti tra le fibre, per incrementare la vascolarizzazione, per ridurre le dimensioni delle lesioni e per promuovere il corretto orientamento delle fibre collagene. L'utilizzo di questa tecnica chirurgica è, tuttavia, ancora controverso per quanto riguarda la sua efficacia a lungo termine: la qualità della guarigione, infatti, risulta variabile e spesso non è superiore a quella prodotta da altri

trattamenti. Sono inoltre da tenere in considerazione gli effetti collaterali di questa tecnica: danni ai tessuti peritendinei ed alle fibre tendinee integre (Dowling 2000, Smith 2003). Ci sono due opzioni chirurgiche per le desmiti del LS, in particolare per le desmiti croniche della porzione prossimale del LS nell'arto posteriore. Alcuni autori hanno riscontrato successo con l'utilizzo della *desmoplastica sospensoria*, una tecnica ecoguidata che comprende la fasciotomia e lo splitting chirurgico. Altri autori, invece, raccomandano la *fasciotomia* associata alla *nevrectomia del ramo profondo del nervo plantare laterale* (Dyson 2003, Hopper 2007).

Prospettive terapeutiche attuali

Negli ultimi anni grande interesse è stato rivolto verso lo sviluppo di terapie rigenerative quali ad esempio cellule staminali, concentrato piastrinico, cellule mononucleate di midollo osseo ed aspirato midollare che influenzando la velocità e la qualità della riparazione tendinea mirando a migliorarla andando a contrastare la formazione di tessuto cicatriziale ed a diminuire il numero di recidive (Barriera 2008, Fortier 2007).

Da alcuni anni, messe da parte alcune delle terapie tradizionali, sono state poste in atto ricerche volte a migliorare sia la tipologia sia le caratteristiche della guarigione, facendo ricorso alle cellule staminali mesenchimali (MSCs) (Lacitignola 2008). L'impiego di midollo osseo usato tal quale è stato descritto per la prima volta da Hertel nel 2003, che ottenne l'84% di successi in termini di ritorno all'attività agonistica rispetto al 15% osservato per il trattamento conservativo (Hertel 2003). I detrattori di questa tecnica però fanno osservare che, a fronte dell'iniezione di grandi volumi di midollo osseo, solo una piccola quantità di MSCs viene realmente iniettata (Smith 2005). Recentemente da Smith e collaboratori è stata proposta, con risultati promettenti, come terapia delle teniti il trapianto autologo di MSCs coltivate (Smith 2005, Richardson 2007). Parallelamente il gruppo di ricerca coordinato da Crovace ha sviluppato un ulteriore filone di ricerca che prevede l'utilizzo di cellule mononucleate di

midollo osseo (BMMNCs), concentrate in piccoli volumi, come fonte alternativa di MSCs (Lacitignola 2008, Crovace 2010).

Numerose ricerche stanno convergendo verso lo studio di terapie che abbiano lo scopo di stimolare la riparazione endogena attraverso l'introduzione di fattori di crescita autologhi. In questi ultimi anni sembra assumere sempre maggiore importanza il ruolo delle piastrine nei meccanismi di riparazione tissutale. Esse permettono infatti, se attivate, la liberazione di numerosi fattori di crescita (tra cui PDGF, TGF- β , FGF, IGF, VEGF ed EGF) capaci di stimolare la replicazione di molte linee cellulari esercitando tra l'altro un'azione chemiotattica, mitogenica e angiogenica. L'utilizzo di concentrato piastrinico (PRP), come fonte di fattori di crescita, in alcuni casi associato a MSCs, sembra rappresentare l'ultima frontiera nel trattamento di patologie muscolo-scheletriche in campo ortopedico umano. Negli ultimi anni, risultati incoraggianti ottenuti da diversi Autori, in vitro ed in studi sperimentali, sembrano suggerire la validità di questa metodica nella riparazione delle lesioni muscolo-scheletriche anche in campo veterinario (Maia 2009). Considerata l'innumerabile quantità di dati presenti in letteratura sia umana che veterinaria riguardante l'utilizzo dei diversi biomateriali, si è deciso di approfondire nello specifico, come già descritto nel precedente capitolo, le conoscenze riguardanti il ruolo del concentrato piastrinico nella medicina rigenerativa.

Seconda parte

Applicazioni cliniche
di concentrato piastrinico
per la guarigione del
tessuto tenodesmico

Capitolo 3

Applicazioni cliniche di concentrato piastrinico con o senza associazione di cellule staminali per il trattamento di lesioni teno-desmiche nel cavallo

3.1: UTILIZZO DI CONCENTRATO PIASTRINICO PER IL TRATTAMENTO DI LESIONI TENO-DESMICHE NEL CAVALLO: ESPERIENZA CLINICA

3.1.1: obiettivo dello studio clinico

Le lesioni muscoloscheletriche rappresentano un problema nel mondo delle corse sia dal punto di vista del benessere dell'animale che dal punto di vista dei costi intesi in termini di soldi per le terapie e in termini di tempo per la riabilitazione a cui i soggetti sono sottoposti per poter tornare all'attività sportiva (Wilson 2004). Le lesioni desmo-tendinee dovute sia a traumi che a sollecitazioni ripetute comportano lunghi periodi di inattività e la guarigione di tali lesioni spesso non porta ad un recupero completo delle caratteristiche funzionali e morfologiche delle strutture coinvolte. Il tessuto di riparazione che si ottiene risulta funzionalmente meno elastico e maggiormente predisposto all'insorgenza di recidive rispetto al tessuto sano (Dowling 2000, Smith 2003, Wilson 2004). I protocolli terapeutici attualmente utilizzati nel trattamento delle patologie teno-desmiche del cavallo sono lontani dalla potenzialità di una reale "restitutio ad integrum". I trattamenti in uso infatti prevedono l'utilizzo di protocolli (antinfiammatori, infiltrazioni, crioterapie, "splitting" etc...) che non

determinano una guarigione completa delle lesioni e che portano alla formazione di tessuto distrofico (Reef 1998, Dahlgren 2005). Le attuali ricerche stanno dunque convergendo verso lo studio di terapie che abbiano lo scopo di stimolare la riparazione endogena attraverso l'introduzione di fattori di crescita autologhi (Murphy 1997, Anitua 2004, Carmona 2006).

In questo studio si intende valutare l'efficacia dell'applicazione clinica intra-lesionale di concentrato piastrinico autologo nel trattamento di patologie tenodesmiche nel cavallo atleta.

3.1.2: materiali e metodi

Criteri di selezione dei soggetti

Nello studio sono stati inclusi 9 cavalli di età, sesso, razza ed attitudine sportiva differenti che presentavano una lesione tendinea o desmica acuta. Per essere presi in considerazione i soggetti dovevano presentare, in base ai rilievi ecografici, lesioni di tipo 3 o 4 (secondo la scala di valutazione espressa da Reef 1998) che coinvolgevano almeno il 15% del tendine o del legamento in scansione trasversale. La classificazione riportata da Reef prevede l'assegnazione di un grado di gravità sulla base di una valutazione ecografica che tiene conto dell'ecogenicità del tessuto e dell'allineamento delle fibre. Tale classificazione viene illustrata, per una maggiore chiarezza, nella sottostante tabella (Tab. 5):

GRADO LESIONE	ASPETTO ECOGRAFICO
TIPO 1	lesione lievemente ipoecogena, caratterizzata da una leggera alterazione della disposizione delle fibre. si riscontra la presenza di una ridotta quantità di infiltrato infiammatorio
TIPO 2	lesione in parte ecogena ed in parte anecogena, caratterizzata da alterazione del pattern delle fibre e dalla presenza di infiltrato infiammatorio
TIPO 3	lesione per la maggior parte anecogena, si evidenzia la rottura delle fibre all'interno della lesione
TIPO 4	lesione anecogena; al suo interno si evidenziano la totale rottura delle fibre e la formazione di ematoma

Tab.5: Classificazione del grado di lesione tendinea (da Reef 1998 modificata)

Per ogni soggetto sono stati raccolti i seguenti dati:

- segnalamento
- note riguardanti appiombi e ferratura
- tipo ed intensità dell'attività agonistica
- anamnesi clinica generale
- anamnesi della lesione specifica comprensiva di notizie relative a trattamenti già effettuati

Sono stati inclusi nello studio quindi soggetti che non presentavano alcuna patologia concomitante e che non mostravano alcuna alterazione specifica dei parametri emato-biochimici. Al contrario, sono stati esclusi dallo studio cavalli con alterazioni del profilo emato-biochimico e che erano stati sottoposti a focatura, crioterapia, onde d'urto, tendon splitting, terapie antinfiammatorie ed iniezioni intra-lesionali e peri-lesionali.

I soggetti selezionati per questo studio clinico sono elencati nella Tab 6.

CAVALLO	ETÀ (anni)	RAZZA	SESSO	IMPIEGO
1	3	TROTTATORE	M	TROTTO
2	12	SELLA INGLESE	C	SALTO OSTACOLI
3	3	TROTTATORE	F	TROTTO
4	6	SELLA ITALIANO	C	SALTO OSTACOLI
5	13	SELLA OLANDESE	F	SALTO OSTACOLI
6	15	SELLA TEDESCO	C	SALTO OSTACOLI
7	3	TROTTOATORE	M	TROTTO
8	6	SELLA ITALIANO	F	SALTO OSTACOLI
9	4	TROTTATORE	M	TROTTO

Tab.6: Segnalamento dei soggetti inclusi nello studio: M= maschio, F= femmina, C= castrone

Nelle settimane precedenti l'applicazione di PRP, sono stati eseguiti trattamenti atti a limitare la fase infiammatoria acuta, quali il riposo, le docce fredde, l'applicazione di ghiaccio e la fasciatura dell'arto.

Visita clinica e valutazione della lesione

Ciascun soggetto è stato valutato clinicamente effettuando un esame ortopedico completo ed osservandolo prima in stazione e poi in movimento: sono stati valutati gli appiombi e la ferratura, ed eventuali alterazioni visibili a carico delle strutture teno-desmiche ed articolari. Con la palpazione sono stati messi



Fig. 24: ispezione del soggetto in movimento



in evidenza eventuali segni di edema, calore, ispessimento e dolorabilità. Sono stati infine eseguiti test di flessione ed, in alcuni casi, anestesie diagnostiche per individuare esattamente la struttura responsabile della zoppia; in un caso è stato eseguito anche un esame scintigrafico. In base ai



Fig. 25: palpazione dell'arto

rilevi ottenuti dunque è stato assegnato un grado di zoppia secondo la scala dell'American Association of Equine Practitioners (Tab. 7):

GRADO DI ZOPPIA	CARATTERISTICHE CLINICHE
0	assenza di zoppia in tutte le circostanze
1	zoppia difficilmente visibile ed incostante in tutte le circostanze
2	zoppia difficile da valutare in retta al passo ed al trotto ma costante in circolo, su superfici dure e con dislivelli
3	zoppia costante al trotto
4	zoppia ben visibile anche al passo
5	caricamento minimo del peso sull'arto affetto sia a riposo che in movimento/impossibilità nel movimento

Tab.7: Classificazione del grado di zoppia secondo l'AAEP

Per ciascun soggetto è stato effettuato un esame ecografico completo: tale indagine è infatti la più accurata per valutare la struttura tendinea in seguito ad un trauma e durante la fase di guarigione; essa permette infatti di valutare la dimensione, la forma, la localizzazione e la gravità di una lesione dei tessuti molli sulla base dell'ecogenicità del tessuto e dell'allineamento delle fibre (Dehghan 2007). Con il soggetto in



Fig. 26: esame ecografico dell'arto

stazione è stato eseguito un esame ecografico utilizzando un apparecchio portatile digitale Esaote Mylab 30 con sonda elettronica T-shape lineare di 7.5/10 Mhz ed un distanziatore standard (Fig. 26). L'esame è stato condotto partendo dal bordo distale dell'osso accessorio nell'arto anteriore o da una posizione appena distale alla tuberosità del calcaneo nell'arto posteriore, e proseguendo distalmente fino al nodello. È stata effettuata una scansione completa delle strutture tenodesmiche palmari all'osso metacarpeo/metatarsale principale, sia in scansione trasversale che in scansione longitudinale. Nei cavalli affetti da desmite della branca laterale del legamento sospensore le scansioni sono state eseguite in posizione obliqua, con direzione latero-

mediale. Sono state rilevate la posizione e l'estensione della lesione annotando la sua distanza in centimetri da un punto di riferimento: quest'ultimo era costituito dal bordo distale dell'osso carpale (DACB: Distal to Accessory Carpal Bone) nell'arto anteriore e dalla tuberosità del calcaneo (DTC: Distal to Tuberosity Calcis) nell'arto posteriore. I parametri ecografici considerati in scansione trasversale sono stati lo spessore e la dimensione totale dell'area di sezione (CSA), la percentuale della struttura interessata dalla lesione, l'ecogenicità del tendine o del legamento e l'ecogenicità della sua porzione lesionata. In sezione longitudinale invece sono stati considerati i seguenti parametri: lo spessore del tendine o del legamento, la lunghezza della lesione, la disposizione delle fibre circostanti ed all'interno della lesione ed infine la rottura delle fibre. I dati ottenuti sono stati raccolti utilizzando le schede descritte da Nyland (1995) riportanti l'anatomia ecografica della porzione distale dell'arto del cavallo (Fig. 27 e 28).

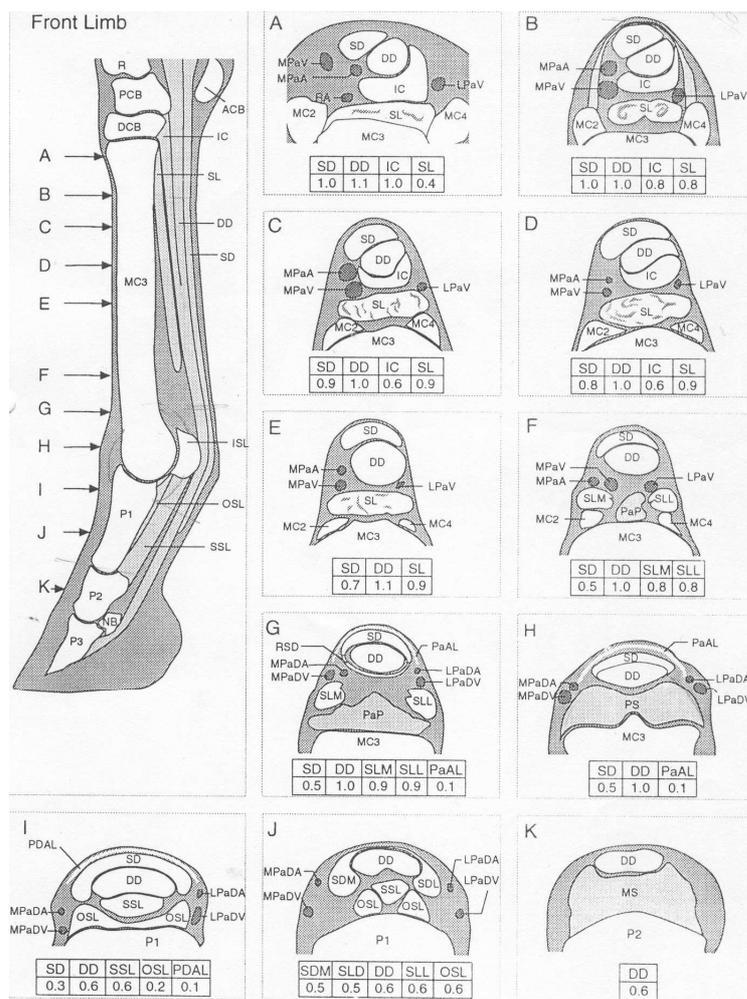


Fig. 27: Anatomia ecografia dell'arto anteriore (Nyland 1995 modificato)

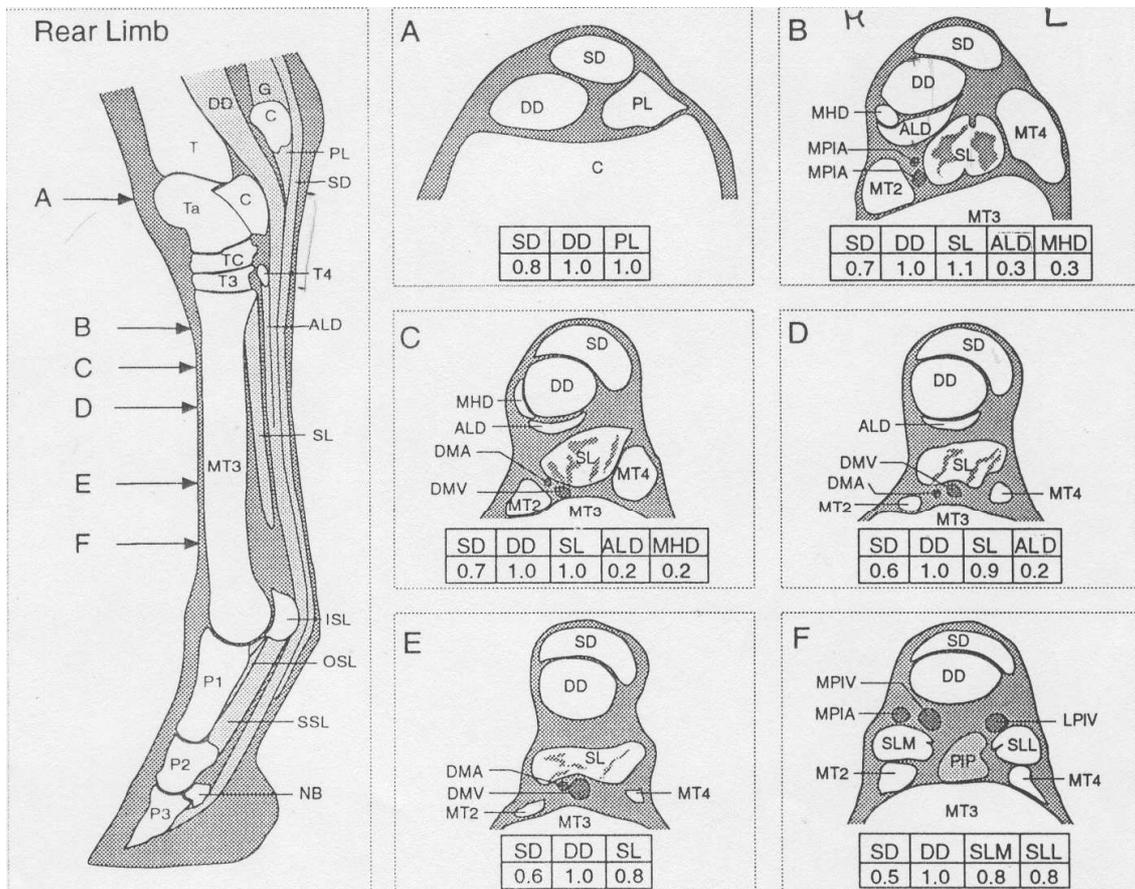


Figure 15-2. Cross-sectional anatomy of the equine front (*facing page*) and rear (*above*) distal limbs. All measurements are approximations and will vary slightly between individuals. All measurements are in centimeters and oriented in a roughly dorsopalmar direction, across the thickest portion of a given structure.

Key

- | | | | | | |
|-------|--|-------|--|-----|---|
| ACB | accessory carpal bone | MPaDA | medial palmar digital artery | PS | proximal scutum |
| ALD | accessory ligament (tarsal head of deep digital flexor tendon) | MPaDV | medial palmar digital vein | R | radius |
| C | calcaneus | MPaV | medial palmar vein | RSD | ring formed by superficial digital flexor tendon |
| DCB | distal row of carpal bones | MPIA | medial plantar artery | RA | radial artery |
| DD | deep digital flexor tendon | MPIV | medial plantar vein | SD | superficial digital flexor tendon |
| DMA | dorsal metatarsal artery | MS | middle scutum | SDL | superficial digital flexor tendon, lateral branch |
| DMV | dorsal metatarsal vein | MT2 | second metatarsus | SDM | superficial digital flexor tendon, medial branch |
| F | fibrous sheath | MT3 | third metatarsus | SL | suspensory ligament, body |
| G | gastrocnemius tendon | MT4 | fourth metatarsus | SLL | suspensory ligament, lateral branch |
| IC | inferior check ligament | NB | navicular bone | SLM | suspensory ligament, medial branch |
| ISL | intersesamoid ligament | OSL | oblique sesamoid ligament | SSL | straight sesamoid ligament |
| LPaDA | lateral palmar digital artery | P1 | first phalanx | T | tibia |
| LPaDV | lateral palmar digital vein | P2 | second phalanx | T3 | third tarsal bone |
| LPaV | lateral palmar vein | P3 | third phalanx | T4 | fourth tarsal bone |
| LPiA | lateral plantar artery | PaAL | palmar annular ligament | Ta | talus |
| MC2 | second metacarpus | PaP | palmar pouch, metacarpophalangeal joint | TC | central tarsal bone |
| MC3 | third metacarpus | PCB | proximal row of carpal bones | | |
| MC4 | fourth metacarpus | PDAL | proximal digital annular ligament | | |
| MHD | medial head of deep digital flexor tendon | PL | plantar ligament | | |
| MPaA | medial palmar artery | PIP | plantar pouch, metatarsophalangeal joint | | |

Fig. 28: Anatomia ecografia dell'arto posteriore (Nyland 1995 modificato)

Metodica di preparazione del concentrato piastrinico

Il plasma autologo arricchito di piastrine è stato prodotto utilizzando una centrifuga SmartPReP2® (Fig. 29) dotata di appositi kit sterili monouso APC 60



Fig. 29: centrifuga SmartPReP2® dotata di appositi kit sterili monouso APC 60 (Harvest Technologies, Plymouth, MA)

(Harvest Technologies, Plymouth, MA). In particolare, a partire da 60 ml di sangue periferico, con il kit monouso sterile APC 60 è possibile produrre da 7 a 10 ml di PRP come volume finale utilizzabile. A seconda dell'estensione della lesione da trattare, è stato deciso il volume

finale da ottenere variando il quantitativo di PPP (Platelet Poor Plasma) utilizzato per risospendere le piastrine concentrate. Questo sistema ha la capacità di concentrare, in condizioni di massima sterilità, le piastrine, mantenendole biologicamente attive, ottenendo dei valori 4-5 volte superiori alla concentrazione basale del soggetto. Per verificare l'effettiva concentrazione di piastrine, rispetto al valore basale evidenziata dall'esame emocromocitometrico eseguito al momento del prelievo di sangue, un'aliquota di circa 0.5 ml di PRP è stata analizzata per ciascun soggetto prima del trattamento.



Fig. 30: provetta separatrice: RBC e WBC, PPP e strato di PLT

Applicazione del concentrato piastrinico

Dopo sedazione del soggetto con Xilazina (1mg/Kg) e blocco regionale con Mepivacaina (100-160 mg/capo), il sito è stato accuratamente tricotomizzato e disinfettato per consentire l'esecuzione del trattamento in condizioni di sterilità. Per evitare la contaminazione del campo durante la procedura non sono stati utilizzati né il distanziatore per la sonda né il gel da ecografie.

In tutti i soggetti l'iniezione di PRP è stata eseguita, in uno o più punti di somministrazione sempre dallo stesso operatore, per via ecoguidata utilizzando



Fig. 31: guida bioptica sterile utilizzata per l'iniezione

una guida bioptica sterile ed aghi monouso sterili da 22G e 5 cm di lunghezza. L'iniezione ecoguidata offre il vantaggio di poter accertare il riempimento della lesione (ipoecogena) con il PRP (iperecogeno) mentre quest'ultimo viene iniettato. Dopo l'inoculazione il sito è

stato disinfettato e coperto con una garza sterile; l'arto è stato infine fasciato per qualche giorno. Durante la fase di riabilitazione non è stato somministrato, né per via sistemica né ad uso topico, ai soggetti alcun tipo di terapia antinfiammatoria né antibiotica dopo il trattamento eseguito.

Follow-up clinico ed ecografico

In seguito al trattamento i soggetti sono stati valutati ad intervalli periodici: la prima visita 4 settimane dopo l'inoculazione, e poi rispettivamente 8 e 12 settimane dopo; le successive visite sono state stabilite in base all'andamento del recupero funzionale del soggetto. Tutti i controlli clinici ed ecografici sono stati effettuati dallo stesso operatore che ha valutato i soggetti prima del trattamento, in modo da garantire una valutazione più oggettiva possibile dell'andamento clinico ed ecografico della guarigione.

Nella fase riabilitativa i cavalli hanno seguito un protocollo, che prevedeva esercizio controllato di durata ed intensità gradualmente crescenti, con movimento al passo già nei primi giorni post-trattamento per evitare la formazione di aderenze. L'obiettivo finale del protocollo stabilito è stato quello di portare il soggetto ad una ripresa degli allenamenti nell'arco di 5-6 mesi e dell'attività sportiva in 9-12 mesi (Tab. 8).

MESE POST TRATTAMENTO	TIPOLOGIA DI ESERCIZIO
1	passo a mano: 10-15 minuti bid dal giorno successivo al trattamento
2	passo a mano: 15-20 minuti bid
3	passo + trotto: da qualche minuto a 10 minuti
4	passo e trotto: incrementare il trotto del 10% a settimana (alternando alternativamente intensità e durata)
5	incrementare gradualmente il lavoro
6	allenamento normale per 3-6 mesi per il ritorno all'attività sportiva

Tab. 8: Protocollo riabilitativo dei soggetti

3.1.3: risultati

In questo lavoro sono stati valutati gli effetti di un singolo trattamento di PRP, seguito da un preciso periodo di riabilitazione, in 9 cavalli affetti da una lesione teno-desmica acuta di entità moderata-grave, considerati clinicamente sani sulla base di uno screening clinico ed ematobiochimico completo.

Il campione è costituito da 5 cavalli da sella e 4 trottatori. 3 cavalli erano di sesso femminile e 6 di sesso maschile o castroni con un'età media di 7.2 anni (range 3-15). La lesione si è verificata a carico degli arti anteriori in 6 soggetti (66%) e a carico di un arto posteriore in 3 cavalli (33%). In particolare 4 cavalli (44%) sono risultati affetti da tenite del tendine flessore superficiale del dito e 5 cavalli (55%) da desmite del legamento sospensore del nodello: di questi ultimi, 1 soggetto presentava una lesione a carico della porzione prossimale, 3 cavalli a carico della branca laterale ed 1 a carico della branca mediale. I rilievi clinici ed ecografici ottenuti durante la visita clinica sono stati raccolti nella tabella sottostante (Tab.9).

CAVALLO	SEDE DELLA LESIONE	ARTO AFFETTO	ACUTA/CRONICA	TIPO	PERCENTUALE STRUTTURA COINVOLTA DA LESIONE	LUNGHEZZA DELLA LESIONE
1	TFS	AS	acuta	3	20%	3.5 cm
2	branca laterale LS	AD	acuta	4	31%	4 cm
3	TFS	AS	acuta	3	17%	5 cm
4	TFS	AD	acuta	4	20%	5.5 cm
5	porzione prossimale LS	PD	acuta	3	25%	5 cm
6	branca laterale FS	AS	acuta	3	25%	5 cm
7	branca mediale LS	PD	acuta	3	30%	5 cm
8	TFS	AD	acuta	3	30%	6 cm
9	branca laterale LS	PD	acuta	3	20%	4 cm

tab. 9: Caratteristiche cliniche ed ecografiche delle lesioni: TFS= tendine flessore superficiale del dito, LS= legamento sospensore del nodello, AS= arto anteriore sinistro, AD= arto anteriore destro, PD= arto posteriore destro, ACUTA= lesione insorta da meno di 3 mesi, CRONICA= lesione insorta da oltre 3 mesi

In tutti i soggetti sono stati rilevati edema, ispessimento e dolorabilità a carico della porzione desmica o tendinea lesionata.

Nessun soggetto è stato trattato con alcun tipo di terapia medica locale o sistemica nei giorni né prima, né durante né dopo il trattamento con PRP; nei giorni precedenti al trattamento sono state concesse solo docciature fredde per diminuire il processo flogistico in atto.

Nei 9 soggetti è stata eseguita, tra i 15 ed i 30 giorni successivi al trauma, un'inoculazione eco-guidata di PRP; la quantità di PRP inoculata è stata in media di 5ml, talvolta suddivisa in 2-3 aliquote iniettate in punti diversi, a seconda dell'estensione e del grado di riempimento della lesione. Un'aliquota di circa 0.5ml di PRP è stata analizzata per ciascun soggetto per verificare l'effettiva concentrazione di piastrine rispetto al valore basale evidenziata dall'esame emocromocitometrico eseguito al momento del prelievo di sangue. Mediamente il sangue intero dei soggetti conteneva $136,2 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$ ($\pm 8,47 \times 10^3$) piastrine ed il PRP ottenuto ne conteneva $566,25 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$ ($\pm 119,86 \times 10^3$); rispetto ai valori fisiologici dunque le piastrine sono state concentrate in media 4,16 volte. Nel 100% dei cavalli trattati non si sono verificati effetti collaterali né locali né sistemici a seguito dell'iniezione di PRP. Non sono stati registrati segni di reazione infiammatoria al trattamento quali calore, dolore, tumefazione persistente, zoppia.

Tutti i cavalli trattati hanno seguito un preciso periodo di riabilitazione che prevede lo svolgimento di un esercizio controllato di durata ed intensità gradualmente crescenti, con l'obiettivo di riportare i soggetti ad un allenamento normale entro 5-6 mesi. In 8 casi le successive visite cliniche hanno permesso di evidenziare un graduale miglioramento dei sintomi clinici fino alla loro risoluzione; solamente in un caso (cavallo 5) il soggetto non ha presentato segni evidenti di miglioramento clinico dopo il trattamento ed, in conseguenza di ciò, è stato messo a riposo al prato.

I 6 soggetti sottoposti a visita clinica ed indagine ecografica 4 settimane dopo il trattamento presentavano risoluzione dell'edema ed assenza di calore e dolorabilità alla palpazione. In 5 di questi cavalli l'ispessimento della struttura tendino-legamentosa era notevolmente diminuito.

In tutti i cavalli l'esame ecografico eseguito a 8 settimane dal trattamento ha permesso di evidenziare, sia in scansione longitudinale che trasversale, una riduzione delle dimensioni della lesione, un marcato miglioramento della sua ecogenicità e la presenza di fibre neoformate al suo interno caratterizzate da un buon grado di allineamento. I controlli ecografici eseguiti a 4 e 8 settimane hanno dunque confermato l'andamento favorevole della guarigione tissutale,

caratterizzato da una graduale normalizzazione dell'ecogenicità e del pattern delle fibre; in nessun caso è stata rilevata la formazione di tessuto cicatriziale o di aderenze tra la struttura teno-desmica danneggiata ed i tessuti circostanti.

A scopo esemplificativo si riportano alcune immagini ecografiche dei casi trattati (Fig.32 e 33)

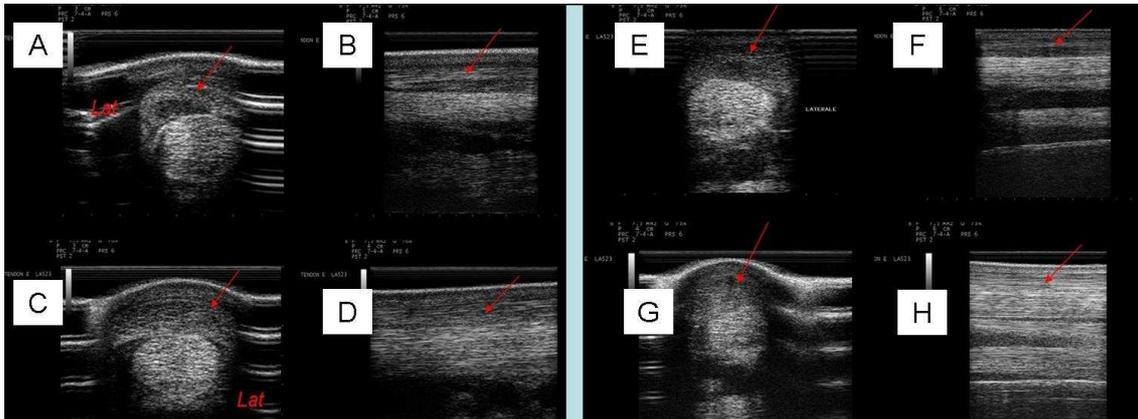


Fig. 32: **A-D**: controllo ecografico a 4 settimane di distanza; A: lesione iniziale in scansione trasversale, B: lesione iniziale in scansione longitudinale; C: lesione a 4 settimane p.o. in trasversale; D: lesione a 4 settimane p.o. in longitudinale. **E-H**: controllo ecografico a 8 settimane di distanza; E: lesione iniziale in scansione trasversale, F: lesione iniziale in scansione longitudinale; G: lesione a 8 settimane p.o. in trasversale; H: lesione a 8 settimane p.o. in longitudinale; le lesioni sono indicate dalla freccia rossa

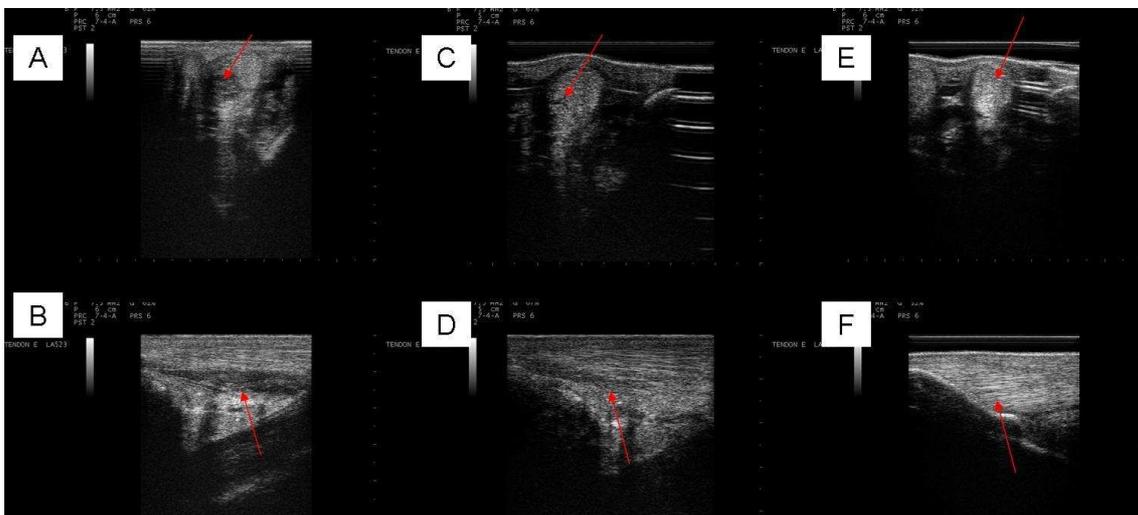


Fig. 33: **A-F**: controllo ecografico a 22 settimane di distanza; A: lesione iniziale in scansione trasversale, B: lesione iniziale in scansione longitudinale; C: lesione a 4 settimane p.o. in trasversale; D: lesione a 4 settimane p.o. in longitudinale; E: lesione a 22 settimane p.o. in scansione trasversale, F: lesione a 22 settimane p.o. in scansione longitudinale; le lesioni sono indicate dalla freccia rossa

In due casi (cavallo 1 e 2) si è verificata una lieve riacutizzazione dei sintomi clinici durante il periodo di riabilitazione, rispettivamente a 14 e 15 settimane dopo il trattamento: tale riacutizzazione era caratterizzata dalla presenza di un lieve edema perilesionale e da segni di una lieve flogosi visibile

ecograficamente intorno alle fibre desmo-tendinee. In entrambi i casi la riacutizzazione era associata ad un aumento improvviso dell'intensità del carico di lavoro. Una settimana di riposo associata a docce fredde e ghiaccio locali hanno determinato la remissione dei sintomi. La successiva ripresa del protocollo riabilitativo non ha evidenziato ulteriori sovraccarichi teno-desmici. Al termine del periodo riabilitativo (cioè a distanza di circa 9 mesi per i trottatori e 12 mesi per i cavalli da sella), dei 9 soggetti trattati, 1 cavallo è stato messo a riposo al prato non avendo mostrato segni di miglioramento clinico mentre 8 hanno manifestato un'ottima risposta al trattamento. Di questi, in 1 soggetto si è manifestata una recidiva 4 mesi dopo il trattamento (12.5%) mentre 7 cavalli, a distanza di circa 9 mesi dal trauma, hanno ripreso l'attività agonistica con performance atletiche ad oggi (circa 15 mesi dal trauma) ancora sovrapponibili a quelle raggiunte prima dell'evento traumatico.

3.1.4: discussione

Le patologie teno-desmiche rappresentano un grave problema per il cavallo sportivo, per l'elevata incidenza con cui si verificano, per la difficoltà di ottenere una guarigione completa ed un pieno recupero funzionale delle strutture coinvolte e perché comportano lunghi periodi di riabilitazione ed alti rischi di recidiva (Williams 2001; O'Sullivan 2007; Barriera 2008). Alcuni fattori come l'età, intesa soprattutto in correlazione all'esercizio, il sesso, la ferratura, il tipo di corsa praticata (in piano o ad ostacoli) e le diverse superfici dei terreni delle piste sono stati considerati come predisponenti (Williams 2001; Vigliani 2005). La distribuzione delle lesioni nel nostro campione rispecchia l'incidenza reale delle lesioni nelle differenti strutture: le tenite del TFS e le desmiti del LS rappresentano le patologie maggiormente rappresentate in questo studio clinico. La tenite del TFS nell'arto anteriore è la patologia tenodesmica più comune nei purosangue inglesi, nei trottatori, nei purosangue arabi e nei cavalli da completo e da polo. È comune anche nei cavalli da caccia e da salto ostacoli (Reef 1998). La desmite del LS è la seconda patologia in termini di

incidenza nel cavallo sportivo e si ritrova in cavalli partecipanti a tutte le discipline equestri. Normalmente tale patologia coinvolge gli arti anteriori ma viene comunemente riscontrata anche a carico dei posteriori (Reef 1998). La guarigione di queste lesioni richiede tempi molto lunghi e raramente esita in un tessuto funzionalmente attivo e morfologicamente sovrapponibile al tessuto sano: vi è la formazione di una cicatrice avascolare, non elastica, poco resistente alla trazione e contenente tessuto fibroso caratterizzato da una morfologia strutturale disorganizzata e da un'abbondante quantità di collagene di tipo III (Williams 1980, Reef 1998, Dowling 2000, Molloy 2005). Per tale ragione il recupero funzionale dei soggetti è spesso incompleto e l'incidenza delle recidive è elevata determinando importanti perdite economiche per il proprietario (Wang 2006, Obaid 2010). I metodi di trattamento tradizionali non migliorano la risposta cellulare al danno (Reef 1998, Dahlgren 2005). Stimolare la risposta a livello molecolare e cellulare potrebbe migliorare la qualità della guarigione e la possibilità di recupero delle performance sportive (Fortier 2007). Ne consegue la ricerca continua, in medicina equina, di terapie che favoriscano la restitutio ad integrum del tessuto leso e che al contempo riducano i tempi di riabilitazione (Fortier 2007, Barriera 2008). Stimolare la risposta a livello molecolare e cellulare potrebbe migliorare la qualità della guarigione e la possibilità di recupero delle performance atletiche dei soggetti. In questo senso, grande interesse è stato manifestato nel verificare la possibilità di utilizzare il concentrato piastrinico (PRP) come trattamento delle lesioni muscolo-scheletriche del cavallo: il PRP infatti contiene un'alta concentrazione di piastrine in grado di secernere, una volta attivate, grandi quantità di fattori di crescita che, come dimostrato già da diversi anni, sono in grado di favorire la guarigione tissutale. Risultati incoraggianti sono stati riportati da diversi autori che hanno testato clinicamente l'utilizzo del concentrato piastrinico in soggetti affetti da lesioni teno-desmiche (Carmona 2006, Fasce 2008, Kaneps 2008, Prades 2008, Sutter 2008, Waselau 2008, Nixon 2008, Arguelles 2008). Un obiettivo del presente studio è stata la valutazione clinica ed ecografica del processo di guarigione tissutale in cavalli affetti da patologie desmo-tendinee.

Le osservazioni ed i risultati ottenuti nel corso dello studio si rivelano in accordo con quanto riportato finora in letteratura (Carmona 2006, Fasce 2008, Kaneps 2008, Prades 2008, Sutter 2008, Waselau 2008, Nixon 2008, Arguelles 2008) : tutti i soggetti trattati infatti, ad eccezione di uno, hanno manifestato un notevole miglioramento della sintomatologia clinica con miglioramento del grado di zoppia, riduzione/scomparsa dell'edema, dell'ispessimento e della dolorabilità della struttura danneggiata. I rilievi ecografici inoltre hanno evidenziato segni indicativi di un processo riparativo migliore, che ha portato alla formazione di un tessuto morfologicamente sovrapponibile, in termini di dimensioni e di allineamento delle fibre, al tessuto sano. A 30 giorni dal trattamento sono stati riscontrati aumento dell'ecogenicità e presenza di nuove fibre collagene. A 60 giorni l'ecogenicità era quasi normale e le fibre collagene erano aumentate di dimensioni e correttamente allineate: questo reperto, al contrario, non viene normalmente rinvenuto per molti mesi nei cavalli trattati in maniera tradizionale. Spesso inoltre permangono per anni aree caratterizzate da ipoecogenicità e da disposizione casuale delle fibre (Reef 1998). Il miglioramento ecografico rilevato ha avuto riscontro anche nell'attività sportiva dei soggetti: 8 dei 9 cavalli trattati hanno manifestato un'ottima risposta all'applicazione intra-lesionale di PRP. Di questi, in 1 soggetto si è manifestata una recidiva 4 mesi dopo il trattamento (12.5%) mentre 7 cavalli, a distanza di circa 9 mesi dal trauma, hanno ripreso l'attività agonistica con performance atletiche ad oggi (circa 15 mesi dal trauma) ancora sovrapponibili a quelle raggiunte prima dell'evento traumatico. Tale dato trova riscontro in alcuni lavori che riportano percentuali di recidiva simili (18%) in un gruppo di cavalli trattati con terapie rigenerative analoghe (Fortier 2008; Smith 2008).

I risultati ottenuti vanno dunque ad avvalorare un utilizzo clinico-terapeutico del concentrato piastrinico: esso infatti non presenta effetti collaterali o sistemici, può essere prodotto ed utilizzato nella stessa giornata della visita, e non richiede un'anestesia generale del paziente, risultando dunque una metodica di produzione rapida e poco invasiva. Inoltre il PRP si è rivelato una terapia promettente per il trattamento di lesioni teno-desmiche nel cavallo poiché

sembra promuovere la rigenerazione e non la guarigione del tessuto, favorendo la formazione di tessuto sano e funzionale a discapito di una cicatrice fibrosa. Tuttavia saranno necessari ulteriori studi, che prendono in considerazione una casistica più ampia per poter confermare i risultati ottenuti in questo studio clinico.

3.2: UTILIZZO COMBINATO DI CONCENTRATO PIASTRINICO E CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI PER IL TRATTAMENTO DI LESIONI TENO-DESMICHE NEL CAVALLO: ESPERIENZA CLINICA

3.2.1: obiettivo dello studio clinico

Scopo di questo secondo studio clinico è di valutare l'efficacia dell'applicazione clinica intra-lesionale eco guidata di concentrato piastrinico (PRP) associato a cellule staminali mesenchimali (MSCs) autologhi in un gruppo omogeneo di cavalli purosangue inglese da corsa colpiti da lesioni teno-desmiche acute.

3.2.2: materiali e metodi

Criteri di selezione dei soggetti



Sono stati inclusi nello studio 17 cavalli purosangue inglese, castroni, partecipanti a corse con siepi o steeplechase, di età compresa tra 3 e 8 anni. Tutti i soggetti erano stabulati presso le scuderie dell'ippodromo di Merano, assistiti dal medesimo staff e seguiti da un unico allenatore. Hanno quindi



ricevuto la stessa razione alimentare, le stesse cure giornaliere ed il medesimo metodo di allenamento. Tutti i cavalli trattati avevano riportato una lesione del tendine flessore superficiale delle falangi (TFS) o del legamento sospensore del nodello (LSN) in uno o entrambi gli arti anteriori. Sono stati presi in considerazione soggetti che ecograficamente presentavano in sezione trasversale lesioni di tipo 2 e 3 e in sezione longitudinale un allineamento delle fibre di secondo grado secondo la classificazione di Reef (Reef 1998).

Per ogni soggetto sono stati raccolti i seguenti dati:

- segnalamento
- note riguardanti appiombi e ferratura
- tipo ed intensità dell'attività agonistica
- anamnesi clinica generale
- anamnesi della lesione specifica comprensiva di notizie relative a trattamenti già effettuati

Sono stati inclusi nello studio quindi soggetti che non presentavano alcuna patologia concomitante e che non mostravano alcuna alterazione specifica dei parametri emato-biochimici. Sono stati esclusi dallo studio soggetti che avessero effettuato terapie mediche locali o sistemiche di qualsiasi tipo prima della visita o in cui la lesione si fosse verificata prima dei sette giorni precedenti alla visita. I soggetti selezionati per questo studio clinico sono elencati nella Tab 10.

CAVALLO	ETÀ (anni)	RAZZA	SESSO	IMPIEGO	LESIONE
1	7	PSI	C	Steeplechase	AS TFS
2	5	PSI	C	Siepi	AS TFS
3	6	PSI	C	Steeplechase	AS LS AD LS
4	5	PSI	C	Steeplechase	AD TFS
5	8	PSI	C	Siepi	AD TFS
6	4	PSI	C	Siepi	AD TFS
7	5	PSI	C	Steeplechase	AD TFS
8	8	PSI	C	Steeplechase	AS TFS
9	5	PSI	C	Steeplechase	AD TFS
10	6	PSI	C	Siepi	AS TFS
11	5	PSI	C	Siepi	AS LS AD LS
12	5	PSI	C	Siepi	AD TFS
13	3	PSI	C	Siepi	AD LS
14	5	PSI	C	Siepi	AS LS
15	5	PSI	C	Siepi	AS TFS
16	3	PSI	C	Siepi	AD TFS
17	4	PSI	C	Steeplechase	AD TFS

Tabella 10. Schema riassuntivo dei casi clinici trattati, età, sesso, razza, attitudine, tipo di lesione e arto coinvolto. C= castrone PSI= purosangue inglese, AS= arto anteriore sinistro, AD= arto anteriore destro, TFS= tendine flessore superficiale del dito, LS= legamento sospensore del nodello.

Sono state permesse, in attesa del trattamento proposto (dell'impianto di MSCs e PRP), solo docciature locali fredde.

Visita clinica e valutazione della lesione

Prima di procedere con ulteriori accertamenti i cavalli sono stati sottoposti a una visita clinica completa ed esami ematobiochimici di base per poter escludere la presenza di eventuali patologie sistemiche concomitanti in corso.

Tutti i soggetti sono stati quindi sottoposti ad accurata visita ortopedica completa valutando gli appiombi e la ferratura, ed eventuali alterazioni visibili a carico delle strutture teno-desmiche ed articolari. Con la palpazione sono stati messi in evidenza eventuali segni di edema, calore, ispessimento e dolorabilità. Sono stati infine eseguiti test di flessione ed, in alcuni casi, anestesie diagnostiche per individuare esattamente la struttura responsabile della zoppia. In base ai rilievi ottenuti dunque è stato assegnato un grado di zoppia secondo la scala dell'American Association of Equine Practitioners.

Per ciascun soggetto è stato effettuato un esame ecografico completo: con il soggetto in stazione è stato eseguito un esame ecografico utilizzando un apparecchio portatile digitale Esaote Mylab 50 con sonda elettronica T-shape lineare di 7.5 Mhz ed un distanziatore standard (standoff). L'esame è stato condotto sia in scansione longitudinale che trasversale partendo dal bordo distale dell'osso accessorio nell'arto anteriore o da una posizione appena distale alla tuberosità del calcaneo nell'arto posteriore, e proseguendo distalmente fino al nodello. Per l'indagine ecografia sono state seguite le medesime linee-guida già illustrate nel precedente studio clinico. I dati ottenuti sono stati raccolti utilizzando le schede descritte da Nyland (1995) riportanti l'anatomia ecografica della porzione distale dell'arto del cavallo.

Per una maggiore standardizzazione, gli esami clinici, gli esami ecografici pre e post trattamento, le procedure chirurgiche di prelievo e di impianto delle cellule e del PRP sono state eseguite da un unico medico veterinario presso la Clinica Veterinaria dell'ippodromo di Merano.

Metodica di estrazione, caratterizzazione e coltura delle cellule staminali

Le fasi di coltura delle cellule staminali e la produzione del PRP sono state eseguite presso il Centro Substrati Cellulari dell'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna di Brescia. I prelievi di midollo osseo (60 ml), ottenuti dalle sternebre, sono stati eseguiti in condizioni di sterilità con soggetti in stazione sedati con medetomidina e xilazina (10 µg/kg e 0,3 µg/kg).



Fig. 34: prelievo di midollo osseo per l'isolamento di MSCs

Dopo tricotomia dello sterno è stata individuata ecograficamente e marcata con un pennarello sterile la quarta sternebra. Successivamente è stata eseguita una anestesia locale con 5 ml di lidocaina 2% accertandosi di mettere bene in evidenza con un bottone di anestetico il punto precedentemente marcato. Infine, dopo disinfezione chirurgica della cute "*lege artis*" è stata eseguita una piccola incisione cutanea nel punto prestabilito con una lama da bisturi del 15 per facilitare l'introduzione dell'ago. Per il prelievo dell'aspirato midollare è stato utilizzato un ago Jamshidi da 11 G lungo 10 cm. Circa 60 ml di aspirato midollare sono stati aspirati in una siringa pre-caricata con 5 ml di eparina (Fig. 34). L'aspirato midollare è stato così trasferito, in un contenitore termico, al laboratorio nelle prime tre ore successive al prelievo. Qui, è stato opportunamente trattato in modo da ottenere elementi cellulari mononucleati

successivamente seminati alla concentrazione di 1×10^6 cellule/cm² in fiasche ed incubati a 37°C in 5% di CO₂ sostituendo il medium di coltura ogni 48 ore. Infine, al raggiungimento della sub confluenza, le cellule (Fig. 35) sono state espanse fino ad un massimo di cinque passaggi seriali sostituendo il terreno di coltura (40% DMEM low glucose, 40% Ham's F12, 20% Siero Fetale Bovino, Streptomicina 1500 µg/ml, penicillina 3000 UI/ml). Tutte le linee cellulari coltivate sono state sottoposte a specifici controlli batteriologici e virologici presso la stessa struttura.

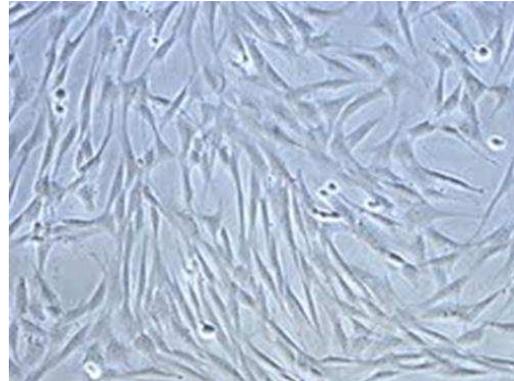


Fig. 35: MSCs isolate e coltivate in laboratorio

Metodica di preparazione del concentrato piastrinico

Dopo circa 21 giorni, quando le cellule hanno raggiunto il numero desiderato (più di 1 milione), prima del loro ritiro presso il laboratorio sono stati prelevati sterilmente circa 300 ml di sangue venoso dallo stesso paziente per la



Fig. 36: sangue venoso prelevato in una sacca

successiva preparazione del PRP e trasportati al laboratorio in un contenitore a temperatura refrigerata nel più breve tempo possibile. Qui, mediante tecnica del buffy coat, è stato ottenuto il PRP dopo una doppia centrifugazione a 1600 G a 20°C per 10 minuti. Infine le piastrine sono state risospese in un volume opportuno di plasma ottenendo una concentrazione finale di circa 9×10^9 piastrine/ml. Contemporaneamente, dopo lavaggio della sospensione cellulare in PBS antibiotato (streptomicina 1500 µg/ml, penicillina 3000 U/ml e anfotericina B 6 µg/ml), il pellet è stato risospeso in 5 ml di PRP e trasportato, in una apposita siringa, in clinica per l'impianto.

Applicazione del concentrato piastrinico in associazione alle cellule staminali

Dopo sedazione del soggetto con Xilazina (1mg/Kg) e blocco regionale con Mepivacaina (100-160 mg/capo), il sito è stato accuratamente tricotomizzato e disinfettato per consentire l'esecuzione del trattamento in condizioni di sterilità. Per evitare la contaminazione del campo durante la procedura non sono stati utilizzati né il distanziatore per la sonda né il gel da ecografie.

L'impianto biologico è stato dunque inserito, per via eco guidata, in un unico punto di inoculo sterilmente nella lesione tendinea/dermica utilizzando un ago 22G di 5 cm di lunghezza. L'arto è stato successivamente fasciato per un paio di giorni e i soggetti mantenuti in box per i primi 7 giorni post trattamento. Dopo il trattamento intra-lesionale non è stata effettuata alcuna terapia medica né sistemica né locale di alcun tipo.

I cavalli sono poi stati inviati in un'altra scuderia dove avevano la possibilità di trascorrere le ore diurne in piccoli paddock e dove sono rimasti per il periodo di riabilitazione fino al ritorno in allenamento.

Follow-up clinico ed ecografico

In seguito al trattamento i soggetti sono stati valutati ad intervalli periodici: inizialmente 4 settimane dopo l'inoculazione, e poi rispettivamente 8 e 24 settimane dopo; le successive visite sono state stabilite in base all'andamento del recupero funzionale del soggetto. Tutti i controlli clinici ed ecografici sono stati effettuati dallo stesso operatore che ha valutato i soggetti prima del trattamento, in modo da garantire una valutazione più oggettiva possibile dell'andamento clinico ed ecografico della guarigione.

Il programma di riabilitazione, uguale per tutti i cavalli, ha previsto un esercizio controllato al passo e al trotto a mano in modo da riportare il soggetto ad un normale allenamento in maniera graduale e progressiva nell'arco di 30 settimane come descritto in tabella 11.

PERIODO	TIPOLOGIA DI ESERCIZIO	NOTE
2-4 settimane	10 minuti di passo a mano una volta al giorno	1° controllo ecografico 4 settimane dopo il trattamento
5-8 settimane	- progressivamente da 10 a 20 minuti di passo a mano una volta al giorno - ricovero diurno in paddock 4m x 4m fino al successivo controllo ecografico	2° controllo ecografico 8 settimane dopo il trattamento
9-12 settimane	progressivamente da 20 a 30 minuti di passo a mano due volte al giorno	-
13-16 settimane	- progressivamente da 30 minuti di passo a mano a 40 minuti di passo due volte al giorno. - ricovero diurno in paddock 8m x 8m	-
17-24 settimane	progressivamente da 40 minuti di passo e 5 minuti di trotto fino a 30 minuti di passo e 15 minuti di trotto	3° controllo ecografico
25-30 settimane	progressivamente da 30 minuti di passo e 15 minuti di trotto fino a 20 minuti al passo e 25 minuti di trotto	rientro previsto in ippodromo per la ripresa di un normale allenamento

Tabella 11 protocollo riabilitativo effettuato

Nell'arco di 6-7 mesi, la maggior parte dei cavalli è rientrata in ippodromo per riprendere con un normale allenamento. Dopo il primo mese di giostra al passo e al trotto tutti i soggetti sono stati sottoposti ad ulteriore visita clinica ed ecografica. Il secondo mese, dopo il rientro in ippodromo, i cavalli hanno lavorato soprattutto al passo sotto sella, eventualmente intervallando il passo con del jogging. Dal terzo mese in poi i cavalli hanno ripreso a lavorare a pieno regime (20 minuti di passo, 800 m di jogging ed altri 20 minuti di passo tutti i giorni). I cavalli in allenamento venivano fatti galoppare per una distanza di 2200 m per 3-4 volte alla settimana e fatti saltare una volta alla settimana. Infine una volta alla settimana, viene eseguito un canter (16-27 Km/h) di 2000 metri. Dopo circa 12 mesi dal trauma, è quindi previsto il rientro in gara dei cavalli trattati.

3.2.3: risultati

In questo lavoro sono stati valutati gli effetti di un singolo trattamento di PRP associato a MSCs, seguito da un preciso periodo di riabilitazione, in 17 cavalli affetti da una lesione teno-desmica acuta di entità moderata, considerati clinicamente sani sulla base di uno screening clinico ed ematobiochimico completo. I 17 cavalli colpiti erano galoppatori purosangue inglese, castroni, di età media di 5,2 anni (età compresa tra 3 e 8 anni). Le lesioni si sono verificate in tutti i soggetti a carico degli arti anteriori, in 9 casi (53%) a destra ed in 6 casi

(35%) a sinistra; in 2 soggetti (12%) la patologia ha colpito entrambi gli arti anteriori. Di questi due ultimi casi uno è stato colpito contemporaneamente in entrambi gli arti anteriori, mentre l'altro ha riportato due lesioni a distanza di 5 mesi l'una dall'altra. 2 soggetti (12%) hanno riportato una lesione all'inserzione del legamento sospensore, altrettanti (12%) sono stati colpiti da desmite bilaterale della branca mediale del LSN mentre i cavalli affetti da tenite del FSF sono stati 13 (76%). Tra questi, 8 hanno subito una lesione a carico dell'arto destro (62%) e 5 a carico dell'arto sinistro (38%).

Nessun soggetto è stato trattato con alcun tipo di terapia medica locale o sistemica prima, durante o dopo il trattamento con MSCs e PRP; sono state effettuate, in tutti i casi, solo delle docciature fredde in attesa del trattamento.

La tecnica di prelievo utilizzata non ha provocato effetti collaterali o complicazioni in nessun caso. La quantità di aspirato midollare in tutti i casi è risultata essere di 60 ml come previsto. L'impianto è stata effettuato tra i 17 e i 34 giorni (media 25) dopo il prelievo di aspirato midollare. Sono state iniettate, diluite in 5 ml di soluzione e attraverso un singolo punto di inoculo, mediamente circa $1-2 \times 10^7$ cellule staminali e 9×10^9 piastrine in ogni soggetto.

Non sono stati riscontrati effetti collaterali alla terapia effettuata né locali né sistemici. Tutti i cavalli trattati hanno seguito un preciso periodo di riabilitazione che prevede lo svolgimento di un esercizio controllato di durata ed intensità gradualmente crescenti, con l'obiettivo di riportare i soggetti ad un allenamento normale entro 6-7 mesi.

Tutti i cavalli sono stati controllati clinicamente ed ecograficamente a 4, 8 e 17 settimane dal trattamento per valutare eventuali complicazioni o recidive. Già dopo 4 settimane in tutti i soggetti non sono stati rilevati edema, calore o dolorabilità della parte trattata. I controlli ecografici eseguiti nel periodo riabilitativo hanno evidenziato un'uniforme ecogenicità delle fibre, in sezione trasversale, già 4 settimane dopo il trattamento mentre, in sezione longitudinale il tendine presentava un buon allineamento dopo 8 settimane. Nessuno dei soggetti trattati ha sviluppato aderenze.

A scopo esemplificativo si riportano alcune immagini ecografiche dei casi trattati (Fig. 37)

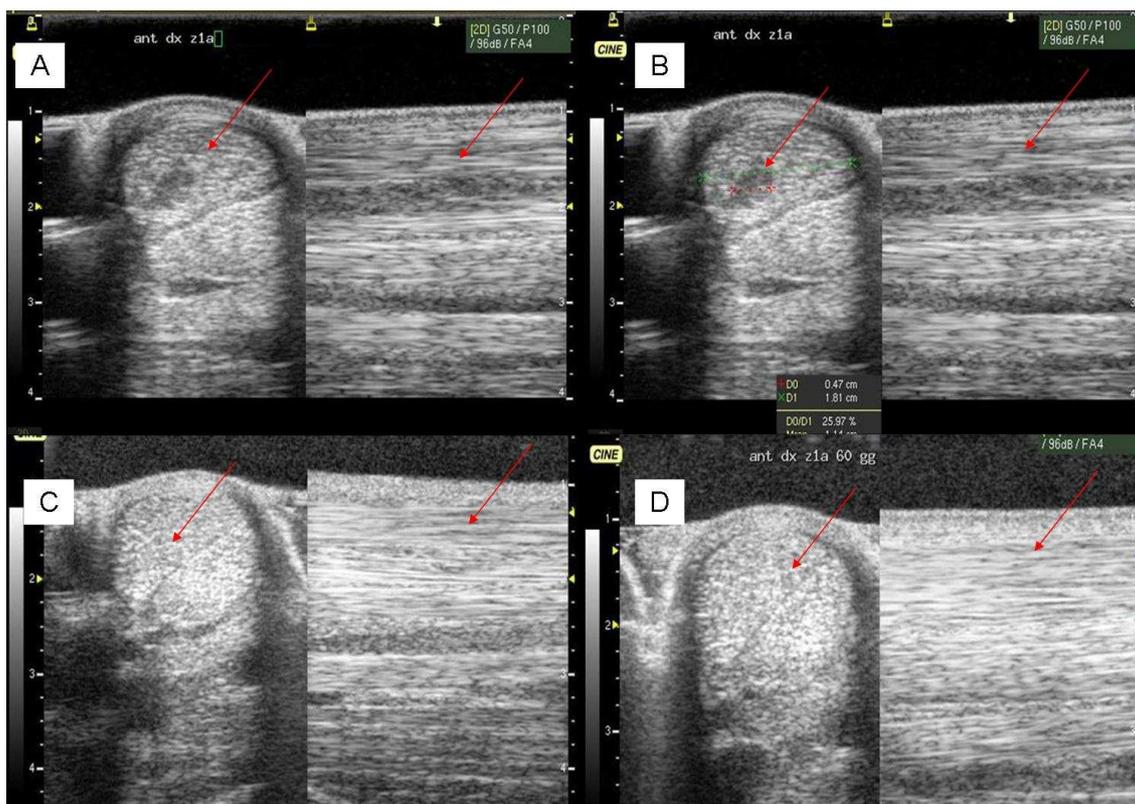
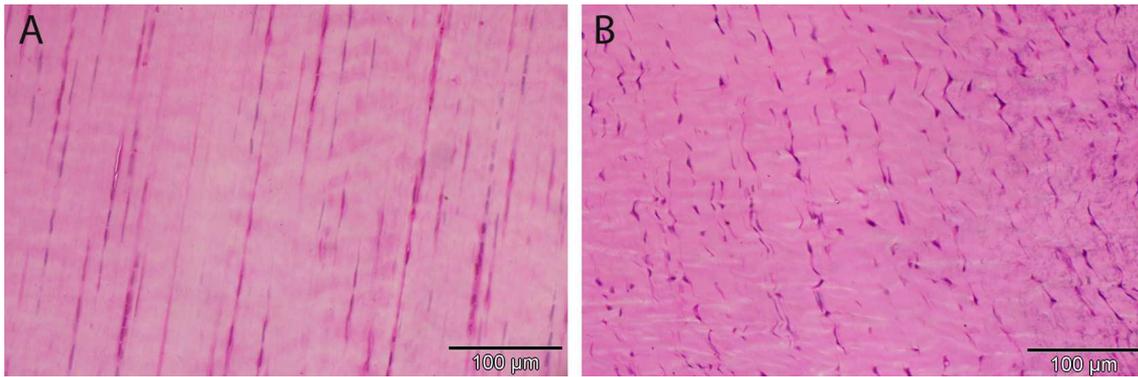


Fig. 37: **A-D**: controllo ecografico a 1, 4 e 8 settimane di distanza; A: lesione iniziale, B: lesione a 1 settimane p.o.; C: lesione a 4 settimane p.o.; D: lesione a 8 settimane p.o.; le lesioni sono indicate dalla freccia rossa

In 4 casi è stata evidenziata la presenza di una recidiva nelle porzioni di tendine limitrofe al punto di lesione iniziale 6 e 9 mesi dopo il trattamento. I soggetti sono stati quindi ritirati definitivamente dall'attività agonistica. Al termine del ciclo completo di riabilitazione, cioè a distanza di circa 12 mesi dal trattamento, 13 soggetti (77%) hanno ripreso l'attività agonistica nei tempi prestabiliti mentre i 4 soggetti (23%) che avevano mostrato recidiva sono stati ritirati dalle corse. Riportando i risultati ottenuti nel nostro campione a distanza di circa due anni dal trattamento eseguito, 12 soggetti (71%) hanno partecipato a più di 5 corse senza ripresentare recidiva, 1 soggetto (6%) è stato sottoposto ad eutanasia per frattura dell'omero ma senza aver mai presentato alcun segno di risentimento tendineo. In seguito all'eutanasia del cavallo soppresso sono stati prelevati i tendini flessori superficiali degli arti anteriori ed è stato eseguito un esame istologico.



La colorazione con ematossilina-eosina mostra i nuclei dei tenociti in viola e la matrice extracellulare in rosa. L'immagine A raffigura una sezione del tendine flessore superficiale dell'arto destro sano. I tenociti hanno una forma allungata, sono ben allineati e disposti lungo le fibre collagene. L'immagine B raffigura una sezione del tendine flessore superficiale dell'arto sinistro. La sezione è stata eseguita nella zona 2a, in cui è stato effettuato il trattamento con cellule staminali e concentrato piastrinico. Nell'immagine si riconoscono i tenociti, disposti lungo le fibre di collagene, le quali si organizzano in fasci di fibre parallele.

3.2.4: discussione

Nel cavallo le patologie desmo-tendinee sono di primaria importanza sia per quanto riguarda l'elevata incidenza sia per la difficoltà di ottenere una guarigione completa ed un pieno recupero funzionale (Maia 2009). Il processo patologico che sta alla base di queste lesioni può essere considerato di natura degenerativa (Dahlgren 2005, Carmona 2006). L'eziologia è multifattoriale e le cause predisponenti sono numerose: età, esercizio, cicli di carico ad alta velocità ripetuti su lunghe distanze, scarso allenamento, difetti di conformazione dell'arto e del piede, difetti di ferratura, superfici di lavoro non idonee e movimenti anomali (Dowling 2000, Spinabella 2004). Ne risentono sia soggetti impiegati in competizioni di alto livello, che soggetti impiegati saltuariamente per lavori leggeri (Spinabella 2004). Nei galoppatori, gli arti anteriori risultano maggiormente soggetti a lesione (Stashak 1990) ed in particolare a destra

(Vigliani 2005). L'incidenza delle lesioni tendinee può raggiungere anche il 43% dei purosangue in allenamento con maggiore incidenza nella porzione centrale del tendine (O'Sullivan 2007; Genovese 1996, Dowling 2000; Patterson-Kane 2009). Il tendine flessore superficiale del dito risulta essere la struttura maggiormente affetta da lesione lavorando spesso al limite delle proprie capacità (O'Sullivan 2007). La guarigione di queste lesioni richiede tempi molto lunghi (6-18 mesi) ed è di qualità spesso scadente. I tendini ed i legamenti normalmente tendono a riparare anziché a rigenerare: si forma una cicatrice avascolare, non elastica, poco resistente alla trazione e contenente tessuto fibroso caratterizzato da una morfologia strutturale disorganizzata e da un'abbondante quantità di collagene di tipo III (Goodship 2004, Molloy 2005). I protocolli terapeutici attualmente utilizzati nel trattamento delle patologie tendinee del cavallo, siano esse mediche o chirurgiche, come ad esempio, corticosteroidi, FANS, revulsivi, Jaluronato di sodio, Glicosamminoglicani, Beta-Aminopropionitrile Fumarato, splitting tendineo, desmotomia della briglia carpica etc.. si sono dimostrate lontane dalla potenzialità di ottenere una reale "restitutio ad integrum" dei tessuti coinvolti visto che spesso le cicatrici che ne derivano non possiedono le caratteristiche morfo-funzionali ed elastiche del tessuto originale (Barriera 2008); ne deriva un rischio di recidiva particolarmente elevato (Dyson 1997; Patterson-Kane 2009), che porta spesso al termine della carriera agonistica del cavallo ed a notevoli perdite economiche per il proprietario. L'utilizzo delle cellule staminali come strumento per la riparazione tissutale costituisce un'importante prospettiva di ricerca in clinica veterinaria (Crovace 2010). Sempre con maggior interesse ci si avvicina alle prospettive terapeutiche basate sulla capacità rigenerativa e riparativa di organi e tessuti che le cellule staminali offrono, grazie alle loro caratteristiche intrinseche, come la capacità di auto-replicazione e di proliferazione illimitata (Ferrari 2007, Crovace 2010). La capacità differenziativa di tali cellule ha reso soprattutto nell'ultimo decennio le MSCs una componente potenzialmente promettente nel campo dell'ingegneria tissutale (Everts 2007). L'ingegneria tissutale è una tecnologia, finalizzata alla morfogenesi di nuovi tessuti biologici, che prevede l'utilizzo di cellule isolate grazie a matrici biocompatibili ed ad una

stimolazione indotta dai fattori di crescita. Recentemente diversi studi hanno proposto l'utilizzo di concentrato piastrinico, sia nella sua forma liquida che in quella gelatinosa, come matrice per l'applicazione di cellule staminali, con l'obiettivo che le piastrine debitamente attivate potessero liberare i diversi fattori di crescita necessari per la differenziazione delle cellule multipotenti (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'associazione delle cellule mesenchimali con i fattori di crescita piastrinici permette di accelerare l'impianto e la crescita in vivo delle cellule impiantate (Lucarelli 2003, Kilian 2004, Doucet 2005, Gobbi 2007). Anche in medicina veterinaria negli ultimi anni alcuni autori utilizzano il PRP come veicolo per le cellule staminali di derivazione midollare coltivate, nel trattamento di lesioni particolarmente gravi a carico di tendini e legamenti (Nixon 2008, Kaneps 2008, Sutter 2008). Nel nostro studio dunque abbiamo voluto valutare l'efficacia in termini di risposta clinica ed ecografia dell'utilizzo di PRP associato a MSCs per il trattamento di lesioni tenodesmiche nel cavallo sportivo. Questo studio ha preso in esame un campione di 17 cavalli purosangue in attività sportiva agonistica, molto omogeneo per quanto riguarda il tipo di stabulazione, il tipo di alimentazione e soprattutto il tipo di allenamento. Prendendo in considerazione gli arti colpiti e la sede di lesione, si nota che il 100% delle lesioni si è verificata a carico degli arti anteriori ed il 76% dei casi (13 soggetti) si è verificata a carico del FSF; ciò concorda con quanto affermato da numerosi autori (Smith 2003; O'Sullivan 2007; Williams 2001; Dowling 2000; Kasashima 2004) secondo i quali l'incidenza delle lesioni del TFS nei cavalli purosangue inglese è molto elevata. Il TFS infatti, agendo come una molla che assorbe e ridistribuisce l'energia durante le varie fasi dell'andatura, lavora spesso al limite delle proprie capacità. L'alta velocità, i salti, i terreni duri, l'allenamento e la conformazione del piede aumentano il carico applicato sulla struttura. Inoltre, secondo quanto riportato in letteratura, le lesioni tendinee colpiscono prevalentemente l'arto interno durante la corsa (O'Sullivan 2007). Questo lavoro conferma questa osservazione infatti il 63% delle lesioni ha colpito l'arto destro ed i cavalli partecipano a corse

disputate in senso orario. Considerando l'età dei cavalli colpiti, in letteratura vengono riportati dati discordi: alcuni autori riportano una maggiore incidenza di lesioni in purosangue di 2 anni di età (Vigliani 2005) altri Autori riportano invece che i cavalli con più di cinque anni sono più facilmente soggetti a sviluppare lesione tenodesmiche, così come i maschi interi e i partecipanti a corse a ostacoli (Williams 2001; Kasashima 2004). Il nostro lavoro conferma la correlazione positiva tra l'età e la probabilità di sviluppare lesione, visto che il 77% dei cavalli presenta 5 o più anni, ma non è possibile confermare il legame tra sesso e incidenza della lesione in quanto fanno parte di questa scuderia solo maschi castroni. Le tecniche di prelievo ed impianto del biomateriale utilizzati, confermando quanto viene riportato in letteratura (Fortier 2008), si sono dimostrate sicure ed efficaci: in tutti i casi la quantità di midollo prelevata si è dimostrata sufficiente per permettere l'estrazione in laboratorio delle cellule staminali; infine l'inoculazione del bioimpianto sotto guida ecografica ha permesso una precisa deposizione del preparato all'interno della lesione. In nessun caso si sono verificate reazioni post trattamento di alcun tipo. La quantità di cellule iniettate è conforme con quanto riportato in studi analoghi (Fortier 2008) così come per quanto riguarda i tempi di impianto (Smith 2004). Nel presente studio infatti tutti i cavalli sono stati trattati tra i 17 ed i 35 giorni dopo il trauma così come descritto in bibliografia (Smith 2004). Lo stesso autore consiglia infatti di effettuare la terapia tra 1 e 2 mesi dopo che è avvenuta la fase infiammatoria ma prima che si crei la fibrosi (circa tre mesi dopo la lesione) (Smith, 2004). Dopo il trattamento, tutti i cavalli sono stati inviati per un periodo di 30 settimane nella medesima scuderia per il periodo di riabilitazione controllata ad intensità e durata crescente e graduale in attesa del rientro in ippodromo con conseguente ripresa degli allenamenti. Durante questo periodo il meccanismo di guarigione è stato monitorato mediante ecografie di controllo a distanza programmata. I rilievi ecografici hanno evidenziato segni indicativi di un processo riparativo che ha portato alla formazione di un tessuto morfologicamente sovrapponibile, in termini di dimensioni e di allineamento delle fibre, al tessuto sano in tempi relativamente brevi: questo reperto, mentre viene riportato anche da altri studi clinici in vivo in soggetti trattati con diversi

biomateriali (Lacitignola 2008), non viene normalmente rinvenuto nei cavalli trattati in maniera tradizionale (Reef 1998; Smith 2003). I controlli ecografici ripetuti durante il periodo riabilitativo rappresentano uno dei mezzi di cui dispone il medico veterinario per valutare la corretta guarigione e la risposta del tendine alla ripresa dell'allenamento (Meghoufel 2010). Prima dell'avvento dell'ecografia infatti solo il 25% dei soggetti ritornava in competizione con successo, successivamente si è visto che in seguito a monitoraggio ecografico della guarigione il 55-60% dei soggetti trattati con terapia conservativa tornava all'attività agonistica (Reef 1998). Il periodo medio di rientro in pista nella nostra casistica è stato di circa 12 post trauma. È opinione comune a tutti gli Autori che le lesioni tenodesmiche, soprattutto se a carico del FSF, richiedano un periodo riabilitativo molto lungo prima che il soggetto ritorni alle corse, (Dahlgren 2007; Reef 1998; Smith 2003; Smith 2008) visto che il FSF sembrerebbe presentare particolari difficoltà di guarigione (Reef 1998, Hosaka 2005; Carmona 2006; Patterson-Kane 2009). In questo frangente il protocollo riabilitativo è considerato essere un supporto essenziale per il corretto rimodellamento del tendine. Il mancato rispetto del tempo da dedicare all'esercizio controllato porta molto più facilmente a recidiva. Programmi di recupero che prevedono tempi di riabilitazione inferiori a 6 mesi aumenterebbero inevitabilmente l'incidenza delle recidive (Dyson 1997, Genovese 1996, Reef 1998, Smith 2008).

Un metodo di valutazione per valutare l'efficacia di una terapia è sicuramente la percentuale di ritorno alle corse e la percentuale di recidive. Ma per poter paragonare l'efficacia di una terapia è necessario paragonare due campioni che siano più omogenei possibile. In letteratura esistono molti lavori sull'uso delle cellule staminali associate a scaffold ricchi di fattori di crescita. La maggior parte di questi studi però considera lesioni sperimentalmente indotte ed i risultati si riferiscono per lo più ad analisi istologiche (Brehm 2002; Barriera 2008; Nixon 2008; Koch 2009, Crovace 2010). Molti Autori riportano anche risultati clinici ma il campione dei soggetti trattati non è confrontabile con il nostro per la razza, l'attitudine dei soggetti o il tipo di biomateriale utilizzato (Del Bue 2008, Lacitignola 2008, Douglas 2001). E' noto che, indipendentemente dal tipo di trattamento tradizionale utilizzato, nei cavalli da corsa il rischio di recidiva

risulta particolarmente elevato (Dyson 1997), Fortier e Smith (2008) riportano percentuali di recidiva del 66% in cavalli da corsa dopo lesione del FSF. I risultati ottenuti in questo studio sono confortanti (recidiva 23%) se paragonati alle percentuali di recidiva riportate (42-45%) utilizzando diversi protocolli terapeutici utilizzati maggiormente in passato (terapia conservativa, ialuronato di sodio intralesionale, PSGAG, BAPN) e con intervallo di rientro in pista simile (Dyson 1997; Dyson 2004). Percentuali di recidiva simili (18%) vengono riportate invece da altri Autori (Fortier 2008; Smith 2008) in un gruppo di cavalli omogenei al nostro per attitudine, età, tipo di lesione e protocollo riabilitativo trattati con terapie rigenerative analoghe (PRP associato o meno a MSCs). In conclusione, sulla base delle valutazioni cliniche, ecografiche e dei risultati ottenuti a breve e a lungo termine, la terapia con cellule staminali e concentrato piastrinico autologhi nel trattamento delle lesioni tenodesmiche del purosangue inglese che partecipa a corse in piano o ad ostacoli risulta essere molto promettente anche se un frequente monitoraggio ecografico ed una corretta riabilitazione rimangono pilastri altrettanto fondamentali per il ripristino della funzionalità biomeccanica delle strutture coinvolte.

Terza parte

Applicazioni sperimentali di
concentrato piastrinico per
la guarigione del
tessuto tenodesmico

Capitolo 4

Valutazioni cliniche, ecografiche ed istologiche dell'efficacia terapeutica di concentrato piastrinico (PRP) e cellule staminali mesenchimali adulte (MSCs) nel trattamento di lesioni tendinee sperimentalmente indotte nella pecora

4.1: INTRODUZIONE ED OBIETTIVI DELLA RICERCA

4.1.1: la gestione della pecora come animale sperimentale in linea con il principio delle “3R”

L'etica è una forma di ricerca umana in cui è possibile esprimere principi di condotta ragionevoli e razionali^{URL}. L'uso di animali pone sicuramente un grande quesito etico ed esistono correnti di pensiero che si oppongono in assoluto all'uso di animali a scopo medico^{URL}. In generale però è opinione diffusa che l'utilizzo di animali a beneficio umano sia accettabile, purché vengano garantiti adeguati standard di benessere^{URL}. È necessario stabilire le responsabilità dei ricercatori e delle istituzioni per quanto concerne l'utilizzo di animali a scopo scientifico ponendo l'accento sui seguenti principi^{RUSSEL 1959,URL}.

- la ricerca deve essere giustificata: vanno soppesati i benefici potenzialmente derivanti dallo studio rispetto agli effetti potenzialmente dannosi che questo può avere sul benessere degli animali;
- i ricercatori devono trattare gli animali con rispetto e considerare il loro benessere come un fattore essenziale negli esperimenti;
- gli animali devono essere utilizzati solo quando necessario e limitando al minimo il numero di soggetti;
- le procedure devono essere studiate al fine di minimizzare l'impatto sugli animali.

La maggior parte degli Stati, in materia di sperimentazione animale, fa riferimento ai principi noti come le “tre R”,^{URL}: il principio delle “3R” venne introdotto per la prima volta nel 1959 da Russell e Burch nel libro “*The Principles of Humane Experimental Technique*” ed in seguito è diventato uno dei punti di riferimento per la gestione degli animali da laboratorio anche dal punto di vista legale (Vitale 2009). “*Replacement - Reduction - Refinement*” (“*The 3Rs*”) sono i tre punti chiave sui quali si basa la comunità biomedica al fine di garantire il benessere degli animali coinvolti nella ricerca scientifica. Con “*Replacement - Reduction - Refinement*” s'intende: sostituzione degli animali con altri metodi sperimentali quando possibile (*Replacement*), riduzione del numero di soggetti impiegati (*Reduction*) ed infine miglioramento delle tecniche e delle procedure al fine di eliminare o minimizzare lo stress e la sofferenza e garantire il benessere animale (*Refinement*) (Russel 1959). La nuova Direttiva europea 2010/63/UE all'articolo n.4 riprende questi tre principi e all'articolo n.13 evidenzia la necessità di scegliere attentamente la specie adatta e la migliore procedura in grado di richiedere il minor numero possibile di soggetti e di ridurre la sofferenza, il dolore e lo stress pur fornendo risultati soddisfacenti.

In particolare tale direttiva illustra come interpretare i tre principi:

- **replacement:** agire su tale punto significa scegliere, qualora esista e sia possibile, un'alternativa che sostituisca in toto o parzialmente l'uso di animali (tecniche in vitro o modelli informatici); al giorno d'oggi tuttavia in letteratura non è facile trovare esempi che riportino la possibilità di sostituire completamente gli animali con altri modelli. L'utilizzo dei

modelli animali è ancora necessario per lo studio delle alterazioni comportamentali, dei disturbi motori, per la valutazione clinica della malattia e per testare la veridicità dei risultati ottenuti ad esempio con studi *in vitro* o con sistemi computerizzati.

- **reduction:** l'obiettivo del "*Reduction*" è individuare quelle strategie che consentano da un lato di utilizzare il minor numero di animali nel corso delle sperimentazioni e dall'altro di ottenere comunque dei risultati scientificamente validi e soddisfacenti (*Fenwick 2009*). A questo scopo, prima di intraprendere un lavoro di ricerca che prevede il coinvolgimento di modelli animali, possono essere impiegati dei metodi statistici che permettono di determinare il minor numero di soggetti necessario al fine di garantire il raggiungimento di risultati statisticamente significativi. Un altro modo per ridurre il numero di animali consiste nel promuovere la standardizzazione delle procedure, del genotipo dei soggetti e dell'ambiente stesso in cui vivono gli animali in termini di cibo e clima (*Baumans 2005*) al fine di minimizzare tutti quei fattori che potrebbero influenzare i risultati della sperimentazione.
- **refinement:** agire sul "*Refinement*" significa intervenire affinché gli animali utilizzati nella ricerca possano esprimere al meglio i loro fabbisogni fisiologici e comportamentali anche se non si trovano nel proprio ambiente naturale. L'obiettivo diventa quello di assicurare un ambiente e un'alimentazione adeguati, di provvedere all'anestesia ed all'analgesia qualora lo si ritenga necessario e di garantire la presenza di personale competente al fine di minimizzare lo stress potenziale (*Baumans 2005*).

In questa studio è stata scelta la pecora come modello animale sperimentale: la pecora è un animale mite, di dimensioni adeguate e facilmente gestibile per quanto riguarda la stabulazione ed il management quotidiano.

Da un punto di vista legislativo l'utilizzo di questa specie a scopo sperimentale è regolamentata dagli stessi principi precedentemente esposti ma risultano minori le restrizioni previste, poiché, a differenza del cane, del gatto e dei primati non umani, la pecora viene considerata animale da reddito.

Tuttavia, punto fermo nella scelta di questa specie per la sperimentazione animale deve rimanere il rispetto del principio delle “3R”.

Una particolare attenzione è stata inoltre riservata attenendoci a quanto illustrato nel “Policy on the care and use of sheep for scientific purposes based on good practice” (Monash University 2005).

Lo studio sperimentale oggetto del nostro lavoro è stato approvato dal Comitato Etico di Ateneo per la Sperimentazione Animale (CEASA - Ateneo Patavino) ed approvato ai sensi dell'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.

4.1.2: obiettivo dello studio

In medicina umana e veterinaria le patologie teno-desmiche rivestono grande interesse per l'elevata incidenza con cui si verificano, per la difficoltà di ottenere una guarigione completa ed un pieno recupero funzionale delle strutture coinvolte e perché comportano lunghi periodi di inattività. I protocolli terapeutici attualmente utilizzati nel trattamento di queste patologie sono lontani dalla potenzialità di una reale “*restitutio ad integrum*”. Alcuni filoni di ricerca stanno studiando i vantaggi ottenuti da sostanze che accelerano i fisiologici processi di guarigione; tra questi il concentrato piastrinico (PRP, *platelet-rich plasma*), ha riscosso notevole interesse in quanto fonte di fattori di crescita stimolanti una corretta e più rapida rigenerazione tissutale. Un altro importante ambito di ricerca riguarda lo studio delle cellule staminali ed è stimolato dalla prospettiva di poterle utilizzare a scopo terapeutico. L'isolamento di cellule staminali ottenute da tessuti adulti di origine mesenchimale (MSCs), rappresenta una grande speranza per la terapia cellulare di molte patologie sia in medicina veterinaria che umana. Sempre con maggior interesse infatti ci si avvicina alle prospettive terapeutiche basate sulla capacità rigenerativa e riparativa di organi e tessuti che le cellule staminali offrono, grazie alle loro caratteristiche intrinseche, come la capacità di auto-replicazione e di proliferazione illimitata (Ferrari 2007, Crovace 2010). Molti progetti di ricerca stanno studiando precise

metodiche per poter isolare, differenziare e coltivare in vitro cellule staminali adulte, ottenute da diversi tessuti (midollo osseo, grasso, sangue...) per poi poterle utilizzare in vivo a scopo terapeutico.

Recentemente diversi studi hanno proposto l'utilizzo di concentrato piastrinico, sia nella sua forma liquida che in quella gelatinosa, come matrice per l'applicazione di cellule staminali, con l'obiettivo che le piastrine debitamente attivate potessero liberare i diversi fattori di crescita necessari per la differenziazione delle cellule multipotenti (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'associazione delle cellule mesenchimali con i fattori di crescita piastrinici permette di accelerare l'impianto e la crescita in vivo delle cellule impiantate (Gobbi 2007). L'utilizzo quindi di PRP associato al trattamento con MSCs autologhe sembra rappresentare una promettente opzione nel trattamento di patologie teno-desmiche in campo ortopedico umano e veterinario. Risultati incoraggianti ottenuti in vitro ed in vivo, sembrano confermare la validità di questa metodica nella riparazione delle lesioni muscolo-scheletriche anche in campo veterinario, ma ulteriori approfondimenti istologici, biochimici ed molecolari sono necessari per comprendere maggiormente la reale efficacia di questi trattamenti. Il presente progetto si prefigge di studiare l'efficacia dell'applicazione intra-lesionale di PRP autologo nel trattamento di tendinopatie sperimentalmente indotte attraverso un meccanismo patogenetico il più possibile sovrapponibile a quello reale. Sarà dunque valutato, da un punto di vista clinico, ecografico ed istologico, l'effetto del trattamento con PRP autologo associato o meno a MSCs adulte autologhe, isolate da sangue venoso periferico. L'applicazione intra-lesionale di PRP e MSCs indifferenziate avrà lo scopo di favorire una rigenerazione tissutale più rapida e completa. Questo studio sarà articolato in due fasi: 1) creazione di una lesione tendinea bilaterale in 2 gruppi di pecore 2) applicazione terapeutica monolaterale di PRP (gruppo 1) e di PRP associato a MSCs (gruppo 2) e monitoraggio del follow up postoperatorio. Gli arti contro-laterali saranno considerati come *arto controllo* in quanto dopo la creazione della lesione

tendinea non verrà applicata alcuna terapia. Il presente progetto darà l'opportunità di stabilire un protocollo sperimentale adattabile ad animali di elevato interesse economico (es. cavallo sportivo). L'esito di tale ricerca, confermato dai rilievi clinici, morfologici ed istologici, potrà fornire, negli animali di interesse veterinario, maggiori informazioni ed ulteriori prospettive nell'applicazione di nuove terapie, volte a migliorare sia il tipo che le caratteristiche della guarigione, che sembrano riscuotere, secondo quanto riportato in letteratura, risultati sempre più promettenti.

4.2: MATERIALI E METODI

4.2.1: criteri di selezione dei soggetti

I mammiferi di gran lunga più utilizzati per gli studi rigenerativi che utilizzano cellule staminali sono il topo ed il ratto i quali però presentano una capacità rigenerativa elevata e differente dagli animali di interesse veterinario. Per questo studio è stata scelta la pecora in quanto sono molto scarsi i dati sperimentali su animali di interesse veterinario. La scelta di utilizzare la pecora come modello animale nel quale eseguire lesioni sperimentali attraverso un meccanismo il più possibile sovrapponibile a quello che si verifica *in vivo* permetterà quindi di studiare un protocollo adattabile ad animali di elevato interesse economico come ad esempio il cavallo.

Sono state trattate in totale 6 pecore adulte, simili per peso, sesso ed età, giudicate sane sulla base di controlli clinici, emato-biochimici e parassitologici completi eseguiti prima del trial sperimentale. Prima di iniziare il trial sperimentale tutti i soggetti sono stati stabulati presso le scuderie del Dipartimento di Scienze Cliniche per un periodo di 30 giorni per consentire un buon adattamento degli animali e favorire il loro benessere.



Le 6 pecore sono state dunque casualmente suddivise in due gruppi ciascuno

dei quali ha ricevuto un diverso trattamento: applicazione terapeutica di PRP (gruppo 1) e di PRP associato a MSCs (gruppo 2). Per incrementare l'attendibilità dei dati rilevati, il disegno sperimentale prevede l'utilizzo di un controllo interno per ogni animale: uno solo dei due arti posteriori è stato sottoposto al trattamento mentre l'arto contro laterale è stato utilizzato come controllo. Lo studio è stato articolato in diversi step riconducibili a due fasi sostanziali: 1) creazione di una lesione tendinea bilaterale nei 2 gruppi di pecore a carico del tendine flessore profondo delle falangi dell'arto posteriore 2) applicazione terapeutica monolaterale di PRP o PRP e MSCs e monitoraggio del follow up postoperatorio da un punto di vista clinico, ultrasonografico ed istologico. Per maggiore chiarezza saranno descritti i diversi step del programma di ricerca esponendoli in punti sequenziali.

4.2.2: metodica di estrazione, caratterizzazione e coltura delle cellule staminali

La fase iniziale del progetto è stata finalizzata all'isolamento ed alla caratterizzazione delle cellule staminali mesenchimali isolate da sangue periferico prima di effettuare le lesioni.

Tale fase del progetto è stata realizzata in collaborazione con il dr. Patruno e la dr.ssa Martinello del laboratorio di Anatomia del Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie di Padova; è stato dunque utilizzato un protocollo per l'estrazione di MSCs, a partire da sangue periferico, già standardizzato nel cavallo (Martinello 2009) e perfettamente adattabile alla pecora. Per consentire l'estrazione e la caratterizzazione delle MSCs che sono state poi utilizzate a scopo terapeutico, il prelievo di sangue è stato eseguito quattro settimane prima del trattamento dalla vena giugulare con animale sveglio. Le MSCs sono state isolate da circa 100 ml di sangue seguendo il metodo per l'isolamento dei linfociti. Il sangue trattato con un anticoagulante (Litio-eparina) e diluito con della soluzione fisiologica è stato depositato lentamente sopra uno strato di Ficoll (Amersham) e centrifugato per separare le diverse cellule che migrano secondo gradiente. Gli eritrociti e granulociti sedimentano mentre le cellule

mononucleate (linfociti e MSCs) per la loro bassa densità formano un'interfaccia tra il Ficoll e il plasma. Tutte le cellule mononucleate sono state dunque raccolte e piastrate ma solo le cellule staminali hanno la capacità di aderire alla plastica pertanto i linfociti, che sono le cellule preponderanti nella coltura, sono stati eliminati con successivi lavaggi. Le cellule staminali che circolano nel sangue si trovano in uno stato di quiescenza e per attivare la loro proliferazione in coltura si utilizza l'LPS (lipopolisaccaride), un agente mitogeno. Le MSCs, che sono cellule mononucleate con morfologia fibroblastoide e capaci di crescere in coltura in un medium con siero fetale al 10%, sono state poi piastrate per essere amplificate..

4.2.3: induzione della lesione sperimentale

In tutti i gruppi di pecore, con i soggetti in anestesia generale e decubito laterale, le lesioni sono state indotte per via ecoguidata (Ecografo GE Medical System LOGIO P5 con sonda elettronica lineare intracavitaria 6-10 MHz modello I739) l'indagine è stata preceduta da un'accurato esame ecografico degli arti sia in scansione longitudinale che trasversale. Per indurre la lesione tendinea è stato deciso di procedere danneggiando enzimaticamente il tessuto con l'utilizzo di collagenasi batterio-derivante. Tale enzima infatti, già utilizzato in diversi trial sperimentali nel ratto, nella pecora e nel cavallo, induce una lesione tendinea con un meccanismo simile a quello che si verifica naturalmente (Muttini 2009, Dehghan 2007, Crovace 2010). Sono state dunque



Fig. 38: iniezione della collagenasi

ottenute lesioni tendinee focali con l'ausilio di collagenasi di tipo IA (collagenasi type IA : C-9891, Sigma, Milan Italy); 500 U.I. diluite in soluzione fisiologica con un volume finale di 0.13 ml (Fig. 38) sono state inoculate, per via ecoguidata, nel tendine flessore profondo delle falangi di entrambi gli arti (Fig. 39).

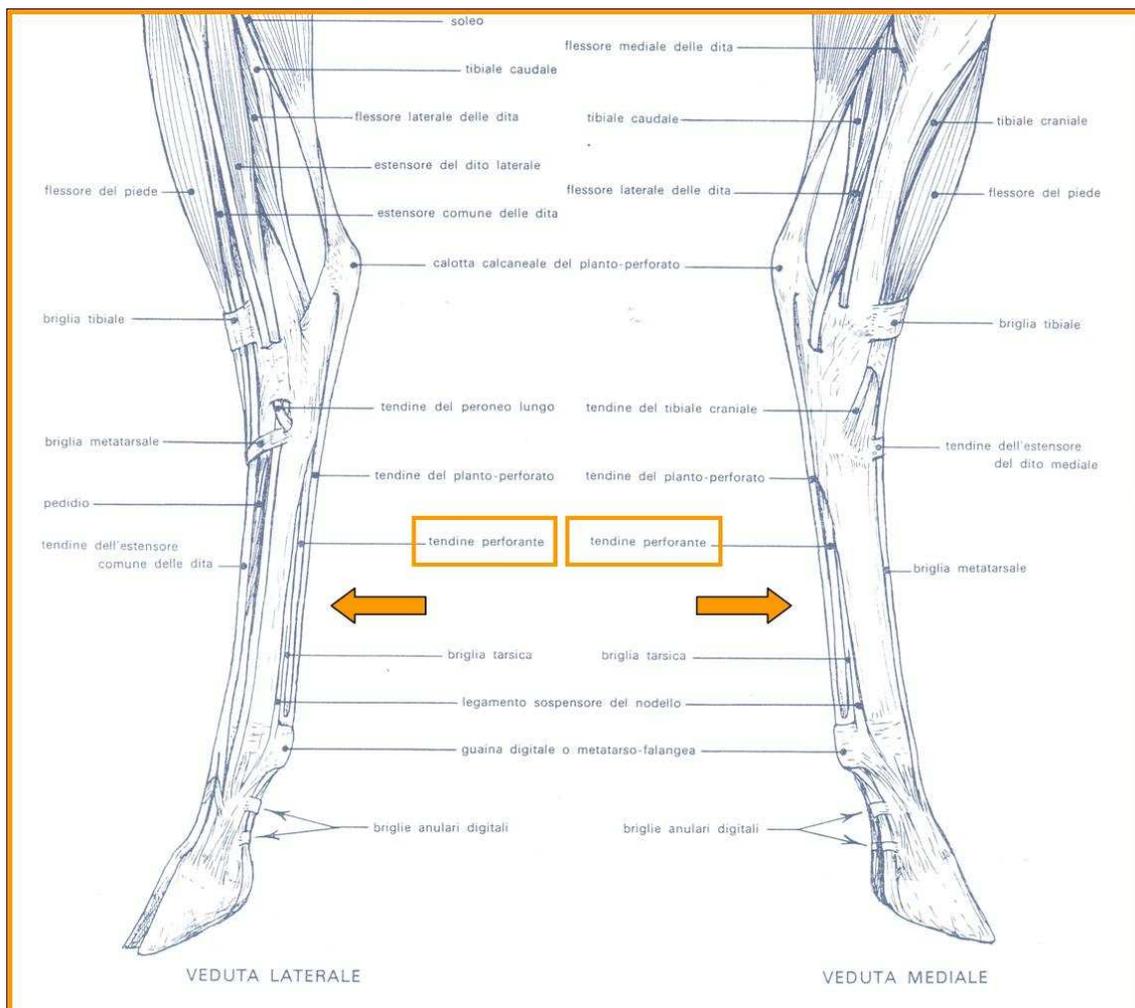


Fig. 39: Anatomia dell'arto posteriore della pecora: la freccia arancione evidenzia, sia in proiezione mediale che laterale, il punto utilizzato per l'inoculo della collagenasi. L'iniezione è stata infatti praticata ad una distanza di 15 cm in senso prossimo-distale dalla sommità calcaneale, allo scopo di lesione il tendine prima della sua biforcazione (Barone 1981 modificata)

Entrambi gli arti di ciascun soggetto sono stati accuratamente tricotomizzati e preparati in modo asettico per procedere con l'induzione delle tendinopatia. Per l'iniezione della collagenasi è stato utilizzato un ago 23 G sterile, inserito per via percutanea ad una distanza di 15 centimetri, in senso prossimo-distale, dalla sommità calcaneale; durante la procedura l'arto è stato posizionato da un assistente in modo che l'articolazione del tarso presentasse un angolo di flessione di circa 90° e che il nodello risultasse iperesteso. L'ago è stato fatto penetrare mantenendo un'inclinazione obliqua della punta caudo-prossimale e cranio-distale (Fig. 40).



Fig. 40: Inserimento dell'ago

Al termine della procedura è stato applicato, in ciascun arto, un punto di sutura cutaneo sulla superficie mediale dell'arto alla stessa altezza del punto di inoculo in modo da individuare il punto esatto della lesione nel corso dei controlli ecografici postoperatori; è stata infine applicata una fasciatura leggera nella regione metatarsale lasciata *in situ* per 48 ore in modo da limitare l'eventuale edema postoperatorio dei tessuti trattati. Una terapia antibiotica ed antidolorifica è stata somministrata nei primi giorni post-operatori.



Fig. 41:
applicazione
del punto di
sutura

4.2.4: procedura di applicazione di PRP e MSCs

Sette giorni dopo l'induzione della tendinopatia gli animali sono stati trattati con il biomateriale scelto; la scelta di intervenire terapeutamente a distanza di una settimana dall'induzione della lesione è basata sull'esecuzione di alcuni trial sperimentali riportati in letteratura; in particolare in uno studio condotto da Dehghan e collaboratori, finalizzato alla valutazione ecografica di lesioni tendinee sperimentalmente indotte con collagenasi, è stato osservato che le dimensioni e la gravità delle lesioni sono massime in un periodo compreso tra il 5° ed il 7° giorno dopo l'inoculazione (Dehghan 2007). Prima di procedere con l'inoculazione si è proceduto con la preparazione del concentrato piastrinico. A ciascun soggetto appartenente ai due gruppi sono stati prelevati, a livello della vena giugulare, 18 ml di sangue periferico che sono stati poi addizionati a 2 ml di anticoagulante (ACD, acido citrico+citrato di sodio+destrosio). Il sangue così miscelato è stato introdotto sterilmente in un'apposita provetta. La metodica utilizzata prevede l'ausilio di kit sterili, comprendenti provette dotate di una doppia camera di decantazione, e di un'apposita centrifuga (SmartPRP2 APC+, Harvest®). Durante la centrifugazione la membrana semipermeabile, di cui è dotata la provetta, consente la separazione dei globuli rossi e dei globuli bianchi dal plasma povero e dalle piastrine. È possibile dunque ottenere una concentrazione di piastrine corrispondente a 4-5 volte il valore di partenza in un volume di 3-5 ml (con il kit da 20ml) di plasma. Tale prelievo è stato eseguito

nello stesso giorno previsto per l'impianto in quanto la sua preparazione richiede circa 1 ora di tempo. Uno solo dei due arti di ciascun soggetto è stato accuratamente preparato in modo asettico per procedere con il trattamento: la lesione è stata colmata attraverso l'introduzione sterile per via ecoguidata transcutanea di 1 ml di PRP (gruppo 1) contenente 972×10^3 piastrine μl^{-1} , e di 1 ml di PRP addizionato ad 1 ml di soluzione fisiologica sterile veicolante 15×10^6 MSCs (gruppo 2). Il PRP è stato inoculato direttamente in forma liquida sfruttando l'azione dei fattori della coagulazione locali per indurre la gelificazione del composto in situ.

Nell'arto controlaterale di tutti gli animali non è stato applicato alcun riempimento terapeutico ma è stata inoculato, come *placebo*, 1 ml di soluzione fisiologica. In questo modo ogni animale è risultato essere il controllo di se stesso per quanto riguarda la comparazione del meccanismo e della velocità di guarigione. Una terapia antibiotica ed analgesica è stata instaurata nel post operatorio ma non è stata somministrata alcuna terapia antinfiammatoria locale o sistemica, per evitare che l'azione dei farmaci potesse inibire l'effetto della terapia cellulare.

4.2.5: follow up clinico ed ecografico

Il monitoraggio dell'efficienza della terapia cellulare è stato ottenuto mediante visite cliniche ed esami ecografici effettuati ad intervalli regolari fino al momento del sacrificio degli animali. I soggetti sono stati visitati giornalmente nella prima settimana post trattamento. Sono stati valutati eventuali tumefazioni, dolore, calore, zoppia, etc. La riparazione del tessuto tendineo è stata inoltre monitorata da un punto di vista ultrasonografico ogni settimana per valutare le modificazioni ecografiche durante le prime fasi del processo. Sono stati valutati il grado di allineamento delle fibre collagene e le modificazioni di ecogenicità e di dimensioni delle alterazioni tissutali.



4.2.6: prelievo *post-mortem* del tessuto tendineo

A 30 giorni dal trapianto i soggetti sono stati sacrificati per poter effettuare esami istologici ed immunoistochimici per una più completa valutazione dell'evoluzione del meccanismo di guarigione e dell'apporto del PRP e delle MSCs ai meccanismi rigenerativi del tendine. Sono stati prelevati i tendini flessori profondi delle falangi dell'arto trattato e del controlaterale comprendendo le porzioni prossimali e distali alla zona lesionata per valutare microscopicamente i meccanismi di guarigione presenti. Inoltre per ogni pecora è stato prelevato, a livello dell'arto anteriore, il tendine flessore profondo delle falangi come controllo istologico positivo di un tendine sano.

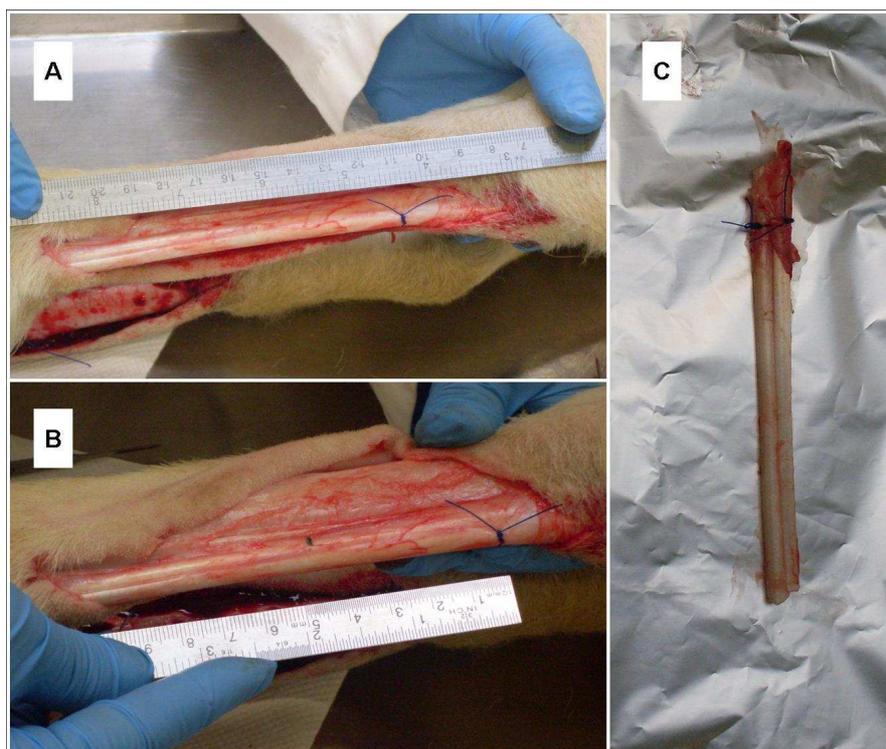


Fig. 42: prelievo *post mortem* del tendini per l'esame istologico; è stato applicato, per ciascun tendine, un punto di sutura nella porzione più prossimale del tessuto ed è stata quindi calcolata la distanza, in cm, del punto di lesione dal punto di sutura; in questo modo, anche dopo asportazione del tendine è stato possibile individuare l'esatta posizione della lesione per i tagli istologici.

Mediante analisi istologica ed immunoistochimica sono stati valutati l'andamento delle fibre collagene presenti, il grado di neovascolarizzazione, la cellularità del tessuto e l'espressione dei diversi tipi di collagene (tipo I e III).

4.2.7: esame istologico ed immunoistochimico del tessuto tendineo

I tendini prelevati sono stati divisi in porzioni seriate di 1 cm appositamente numerate procedendo in senso prossimo-distale. Tutte le sezioni sono state fissate in paraformaldeide 4% a temperatura di 4°C per una notte e successivamente disidratate attraverso passaggi graduali in etanolo (70°, 90°, 95° e 100°C). Alla completa disidratazione sono seguiti dei bagni di chiarificazione tramite xilolo, e l'inclusione in paraffina liquida a 60°C (impregnazione) che è penetrata completamente all'interno del tessuto sostituendo in modo permanente tutti gli spazi che prima erano occupati dallo xilolo. La processazione è stata eseguita in modo automatico mediante l'apparecchio Shandon Cittadel 1000 presso il laboratorio di Scienze Sperimentali del Dipartimento di Medicina Veterinaria di Padova. Mediante taglio al microtomo dei campioni inclusi in paraffina, sono state ottenute sezioni seriate longitudinali dello spessore di 5 µm, raccolte su vetrini e utilizzate successivamente per le diverse colorazioni.

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

La colorazione *ematossilina-eosina* è effettuata in modo manuale e consta nella sparaffinatura, nell'idratazione, nella colorazione e nella disidratazione delle sezioni in previsione di una montatura definitiva con colla non acquosa. Il primo step consiste nell'eliminazione della paraffina mediante il trattamento con il solvente xilolo per 15 minuti. In un secondo tempo si elimina il solvente con l'etanolo, facendo percorrere ai vetrini la serie discendente degli alcoli (100°, 95°, 75°, 50°C). Dopo un risciacquo veloce in acqua distillata, i vetrini si colorano mediante l'ematossilina di Harris, si lavano in acqua di fonte e poi in acqua distillata per eliminare l'eccesso di colorante ed infine alcuni secondi in HCL 1% per farne virare la tonalità verso il viola. Dopo alcuni lavaggi in acqua distillata si procede con la colorazione mediante eosina ed infine si eseguono la scala ascendente degli alcoli (50°, 75°, 95° e 100° C) e la chiarificazione in xilolo

prima del montaggio in balsamo sintetico (EUKITT, Kartell). Nelle sezioni colorate con HE sono stati analizzati l'organizzazione tissutale, la densità e le caratteristiche dei fibroblasti, la presenza e la tipologia dell'infiltrato infiammatorio e la neovascolarizzazione.

La colorazione *tricromica di Masson* (Sigma) è stata invece utilizzata per visualizzare in modo più evidente le fibre collagene e la neovascolarizzazione. In tale colorazione si procede alla sparaffinatura e all'idratazione con la scala discendente degli alcoli come nella colorazione ematossilina-eosina. I vetrini vengono trattati con il mordente in soluzione di Bouin preriscaldata a 56°C per 15 minuti. Si raffreddano in acqua corrente per rimuovere l'eccesso del colorante dalle sezioni e si colora ematossilina di Harris. Dopo un lavaggio in acqua corrente per 5 minuti ed un risciacquo in acqua distillata, si colorano i vetrini nella soluzione Ecarlate di Biebrich-Fucsina acida per 5 minuti e si risciacquano in acqua distillata. Si collocano i vetrini nella soluzione acido fosfotungstico/acido fosfomolibdico per 5 minuti, si colorano con la soluzione blu di anilina per altri 5 minuti ed infine si trattano con acido acetico all'1% per 2 minuti. La disidratazione avviene con la scala ascendente degli alcoli (50°, 75°, 95°, 100°C) ed infine si chiarifica in xilolo per 15 minuti e si montano in balsamo sintetico (EUKITT, Kartell).

L'**immunoistochimica** rappresenta invece la metodica di elezione per la localizzazione e l'evidenziazione di molecole e/o strutture intra ed extracellulari su campioni tissutali. In particolare è stata studiata l'espressione di collagene I e III, biglicano e COMP. La tecnica immunoistochimica adottata si basa sull'utilizzo di anticorpi specifici verso gli antigeni che si desiderano individuare e di opportuni marker coniugati con gli anticorpi stessi in modo diretto o indiretto. Questi marcatori, con diverse modalità, permettono all'avvenuta reazione tra antigene e anticorpo di rendersi visibile e di essere individuati attraverso la microscopia ottica. I preparati tendinei inclusi, fissati e tagliati come precedentemente descritto sono stati utilizzati per l'analisi immunoistochimica. Sezioni di 5 µm di tessuto sono state sparaffinate in xilolo e idratate attraverso dei passaggi gradualmente in alcool a concentrazione decrescente (scala discendente degli alcoli). Dopo un lavaggio in PBS 1X sono stati bloccati

i siti di legame non specifici incubando le sezioni con del siero fetale di bovino al 5%. Successivamente le sezioni sono state incubate per una notte a temperatura di 4°C in ambiente umido con i seguenti anticorpi primari:

- anti-collagene I, monoclonale(1:500, Sigma, C2456)
- anti-collagene III, monoclonale (1:500, Sigma, C7805)
- anti-COMP, policlonale (1:100, abcam, ab74524)
- anti-biglicano, policlonale (1:100, abcam, ab58562)

Dopo alcuni lavaggi in PBS gli anticorpi primari vengono rilevati mediante il Vector kit (Vector laboratories, PK7800). Lo sviluppo è avvenuto in una soluzione di 3,3'-diaminobenzidine (DAB) e H₂O₂ per 3 minuti e 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.

La **valutazione dei preparati istologici** è stata eseguita, per garantire una maggiore uniformità dei rilievi raccolti, servendoci di un criterio di osservazione utilizzato da Nixon nel 2008 e Maia nel 2009 e da noi modificato (tab 13). All'interno di ogni gruppo di pecore è stato assegnato un punteggio medio per ogni parametro analizzato sulla base delle osservazioni qualitative.

VARIABILI ANALIZZATE	PUNTEGGI E CRITERI
DENSITA' CELLULARE	0: NORMALE
	1: LIEVE AUMENTO
	2: MODERATO AUMENTO
	3: NOTEVOLE AUMENTO
CARATTERISTICHE DEI FIBROBLASTI NEL PUNTO DI LESIONE	VALUTAZIONE DELLA TIPOLOGIA PREDOMINANTE DEI 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
CARATTERISTICHE DEL TESSUTO	VALUTAZIONE DELLA DISPOSIZIONE DELLE FIBRE COLLAGENE E DEI FIBROBLASTI NELLA MATRICE TENDINEA

Tab. 13: Parametri osservati nella valutazione istologica (Maia 2009, modificato)

Di ogni porzione di tendine incluso sono state esaminate 3 sezioni di 5 µm ed in ognuna sono stati osservati 10 campi casuali per valutare i parametri precedentemente descritti.

I risultati ottenuti nei due diversi gruppi sono stati osservati e confrontati: sono stati verificati i singoli effetti dei diversi trattamenti paragonandoli ai risultati ottenuti nell'arto di controllo controlaterale (lesionato e non trattato) e nell'arto anteriore sano.

4.3: RISULTATI

4.3.1: preparazione del PRP e delle MSCs

La metodica di preparazione utilizzata per ottenere il PRP si è rivelata rapida, sicura ed efficace; ha reso possibile una lavorazione sterile del sangue ed ha consentito una concentrazione di piastrine nel prodotto finale pari a $972 \times 10^3 \mu\text{l}^{-1}$. Per quanto riguarda l'isolamento e la coltura delle cellule staminali, la scelta di utilizzare un protocollo già standardizzato (Martinello 2009) per il sangue di cavallo si è rivelata corretta: la procedura di prelievo è stata poco invasiva per i soggetti ed efficace, consentendo di ottenere, con un unico prelievo, un numero soddisfacente di MSCs.

4.3.2: valutazione clinica ed ecografica

Nei giorni successivi all'induzione della tendinopatia ottenuta con collagenasi tutti i soggetti hanno mostrato in entrambi gli arti una sintomatologia tipica di una risposta infiammatoria acuta: tumefazione della regione (da moderata ad intensa), calore e dolore alla palpazione. Una modesta zoppia bilaterale, risoltasi spontaneamente in breve tempo, è stata notata nei primi giorni dopo l'iniezione di collagenasi. Tutti gli animali hanno tollerato perfettamente il

trattamento sperimentale, non mostrando alcun segno clinico sfavorevole. Inoltre, rispetto ai tendini controllo (arto sinistro per tutti i soggetti), in entrambi i gruppi l'arto trattato ha mostrato in linea generale una riduzione più rapida dell'intensità dei segni clinici tipici di un processo flogistico acuto.

In particolare la sintomatologia nei soggetti del gruppo 1 (trattamento con PRP) viene riportata nella Tab. 14,

PECORA	GRUPPO	DATA	PESO		ZOPPIA		FLOG.LOC.		CIRCONF. PUNTO LESIONE			
1	PRP	LESIONE	50.2 Kg	SX	0	SX	0	SX	9.5 CM			
				DX	0	DX	0	DX	9.5 CM			
		TRATTA.		SX	II-III	SX	CAL++, DOL++,TUM++	SX	11.5 CM			
				DX	II	DX	CALDA ++, DOL +	DX	10 CM			
		CTRL 7		SX	II-III	SX	CALDA+, TUM ++	SX	11.5 CM			
				DX	II	DX	CALDA +	DX	10 CM			
		CTRL 14		SX	I	SX	TUMEFAZ +	SX	11.5 CM			
				DX	I	DX	0	DX	10 CM			
		CTRL 21		SX	I	SX	TUMEFAZ +/-	SX	11.2 CM			
				DX	I	DX	0	DX	10 CM			
		CTRL 28		SX	I	SX	TUMEFAZ +/-	SX	11 CM			
				DX	I	DX	0	DX	9.5 CM			
		2		PRP	LESIONE	52.6 Kg	SX	0	SX	0	SX	9.5 CM
							DX	0	DX	0	DX	9.5 CM
TRATTA.	SX		II		SX		CALDA +	SX	10 CM			
	DX		II		DX		CALDA +	DX	10 CM			
CTRL 7	SX		II		SX		CALDA +/-	SX	9.7 CM			
	DX		II		DX		CALDA +/-	DX	9.5 CM			
CTRL 14	SX		I		SX		0	SX	9.7 CM			
	DX		I		DX		0	DX	9.5 CM			
CTRL 21	SX		I		SX		0	SX	9.5 CM			
	DX		I		DX		0	DX	9.5 CM			
CTRL 28	SX		I		SX		0	SX	9.5 CM			
	DX		I		DX		0	DX	9.5 CM			
3	PRP		LESIONE		47 Kg		SX	0	SX	0	SX	9.5 CM
							DX	0	DX	0	DX	9.5 CM
		TRATTA.	SX	II		SX	CALDA +	SX	10 CM			
			DX	II		DX	CALDA +	DX	10 CM			
		CTRL 7	SX	II		SX	CALDA +/-	SX	10 CM			
			DX	II		DX	CALDA +/-	DX	9.8 CM			
		CTRL 14	SX	I		SX	0	SX	9.7 CM			
			DX	I		DX	0	DX	9.5 CM			
		CTRL 21	SX	I		SX	0	SX	9.5 CM			
			DX	I		DX	0	DX	9.5 CM			
		CTRL 28	SX	I		SX	0	SX	9.5 CM			
			DX	I		DX	0	DX	9.5 CM			

Tab. 14: Sintomatologia clinica rilevata nel gruppo 1

La sintomatologia rilevata nel primo gruppo non si discosta molto dai rilievi clinici dei soggetti trattati con PRP e MSCs, come è possibile osservare dai dati riportati nella Tab. 15. In un solo soggetto (pecora 5) al termine dello studio l'arto trattato ha manifestato una sintomatologia lievemente peggiore rispetto al controllo: tale rilievo è da attribuirsi presumibilmente alla formazione di aderenze peritendinee.

PECORA	GRUPPO	DATA	PESO		ZOPPIA		FLOG.LOC.		CIROCONF. PUNTO LESIONE
4	PRP + MSCs	LESIONE	64	SX	0	SX	0	SX	9.5 CM
				DX	0	DX	0	DX	9.5 CM
		TRATTA.		SX	II	SX	CALDA +	SX	10 CM
				DX	II	DX	CALDA +	DX	10 CM
		CTRL 7		SX	II	SX	CALDA +	SX	10.4 CM
				DX	II	DX	CALDA +	DX	10.3 CM
		CTRL 14		SX	I	SX	CALDA +/-	SX	10 CM
				DX	I	DX	CALDA +/-	DX	10 CM
		CTRL 21		SX	I	SX	0	SX	9.5 CM
				DX	I	DX	0	DX	9.8 CM
CTRL 28	SX	I	SX	0	SX	9.5 CM			
	DX	I	DX	0	DX	9.8 CM			
5	PRP + MSCs	LESIONE	63.8	SX	0	SX	0	SX	9.5 CM
				DX	0	DX	0	DX	9.5 CM
		TRATTA.		SX	II	SX	CALDA +, TUMEF AZ +/-	SX	10.5 CM
				DX	III	DX	CALDA +, TUMEF AZ ++	DX	12 CM
		CTRL 7		SX	II	SX	CALDA +/-	SX	9.8 CM
				DX	II-III	DX	CALDA +, TUMEF AZ ++	DX	12.6 CM
		CTRL 14		SX	I	SX	0	SX	9.5 CM
				DX	II	DX	CALDA +/-, TUMEF AZ +	DX	11.5 CM
		CTRL 21		SX	I	SX	0	SX	9 CM
				DX	I-II	DX	TUMEF AZ +/-	DX	11 CM
CTRL 28	SX	I	SX	0	SX	9 CM			
	DX	I	DX	TUMEF AZ +/-	DX	10.5 CM			
6	PRP + MSCs	LESIONE	62.5	SX	0	SX	0	SX	9.5 CM
				DX	0	DX	0	DX	9.5 CM
		TRATTA.		SX	II	SX	CALDA +, TUMEF AZ ++	SX	11.3 CM
				DX	III	DX	CALDA +, TUMEF AZ ++	DX	10.5 CM
		CTRL 7		SX	II	SX	CALDA +, TUMEF +/-	SX	11.3 CM
				DX	II-III	DX	CALDA +, TUMEF AZ +	DX	10 CM
		CTRL 14		SX	I-II	SX	CALDA +/-	SX	11 CM
				DX	II	DX	CALDA +/-, TUMEF AZ +/-	DX	10 CM
		CTRL 21		SX	I	SX	0	SX	11 CM
				DX	I-II	DX	TUMEF AZ +/-	DX	10 CM
CTRL 28	SX	I	SX	0	SX	10.5 CM			
	DX	I	DX	0	DX	9.5 CM			

Tab. 15: Sintomatologia clinica rilevata nel gruppo 2

L'andamento del processo di guarigione è stato dunque monitorato attraverso un'indagine ultrasonografica; a scopo esemplificativo vengono riportate alcune delle immagini ecografiche rilevate nel corso dei controlli eseguiti.

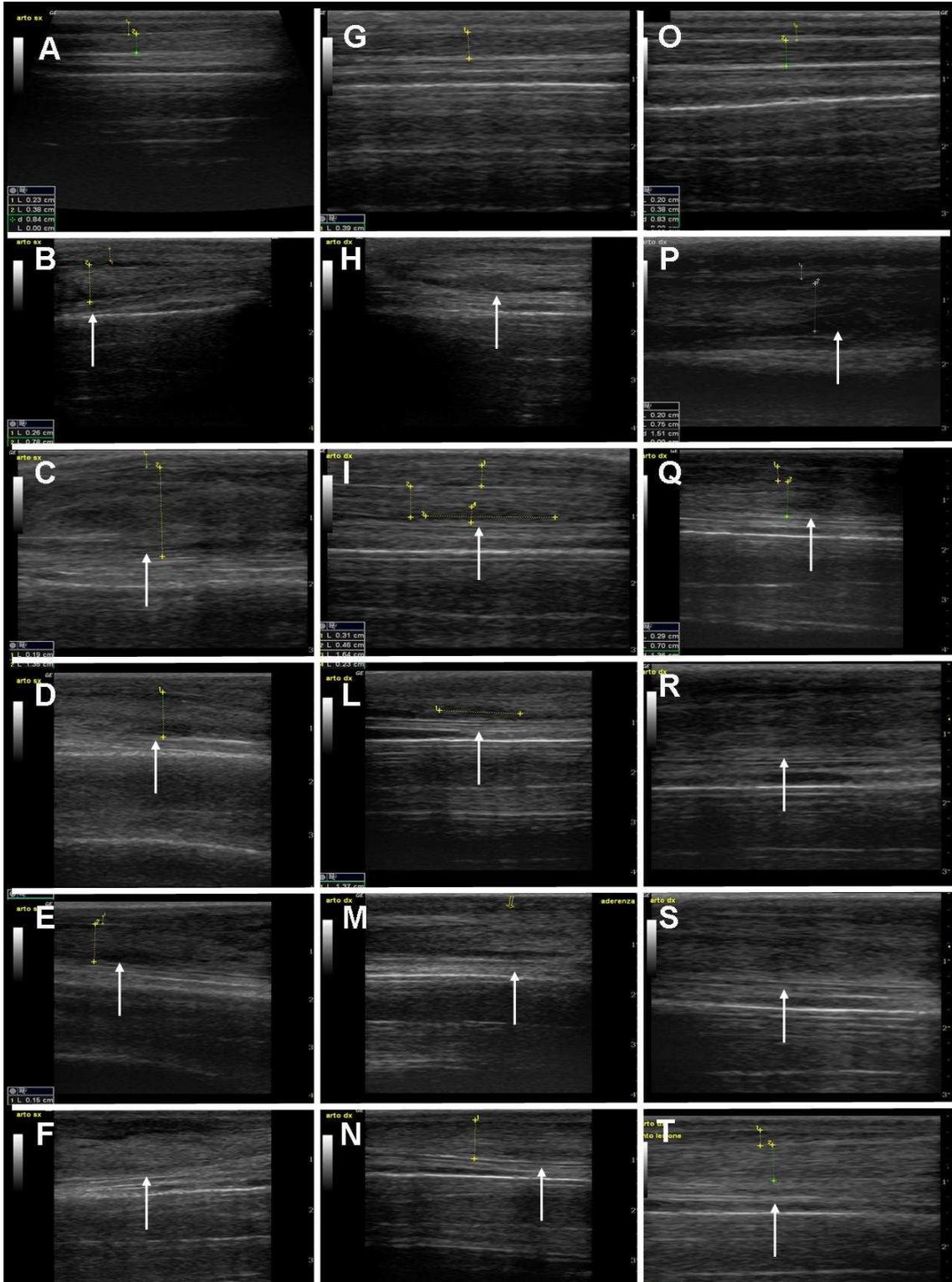


Fig. 43: Andamento ecografico del processo di guarigione tendineo: A-F: primo controllo; G-N: gruppo 1 (PRP); O-T: gruppo 2 (PRP + MSCs); la freccia bianca indica il punto di lesione

Per quanto riguarda i principali rilievi ecografici evidenziati, fin dai primi giorni successivi all'induzione della lesione è stata notata la presenza di edema peritendineo associato ad una perdita di ecogenicità del tessuto tendineo in corrispondenza del punto di inoculo e delle aree adiacenti.

Ecograficamente, a distanza di sette giorni dal trattamento con collagenasi, nella sede dell'iniezione è stato possibile riscontrare lesioni focali ipoecogene caratterizzate, nella maggior parte dei casi da una perdita di allineamento più o meno evidente delle fibre collagene. Nelle settimane successive al trattamento in entrambi i gruppi è stato possibile osservare, a carico dell'arto trattato, un progressivo ma lento riempimento dell'area anecogena tissutale interessata da lesione. Sono state inoltre rilevate nella maggior parte dei soggetti aderenze peritendinee sia con la guaina tendinea sia con il TFP soprattutto nelle zone adiacenti al punto di inoculo.

4.3.3: valutazione istologica ed immunoistochimica

Nelle fase di prelievo del tessuto tendineo in seguito ad eutanasia del soggetto, è stato evidenziata, a livello di entrambi gli arti, la presenza di aderenze tra flessore profondo e guaina peritendinea in 1 soggetto del primo gruppo (PRP) e di aderenze tra flessore superficiale e flessore profondo in 1 soggetto del secondo gruppo (PRP + MSCs). Dopo lavorazione dei campioni prelevati, le sezioni istologiche ottenute sono state osservate al microscopio ottico: particolare attenzione dunque è stata posta nella valutazione della struttura della matrice, dell'organizzazione delle fibre e della presenza di tenociti, cellule fibroblastoidi, infiltrato infiammatorio e neovascolarizzazione.

A scopo esemplificativo alcune fotografie dei campi istologici analizzati dopo colorazione con ematossilina-eosina e con tricromia di Masson sono riportate nelle figure 44-47

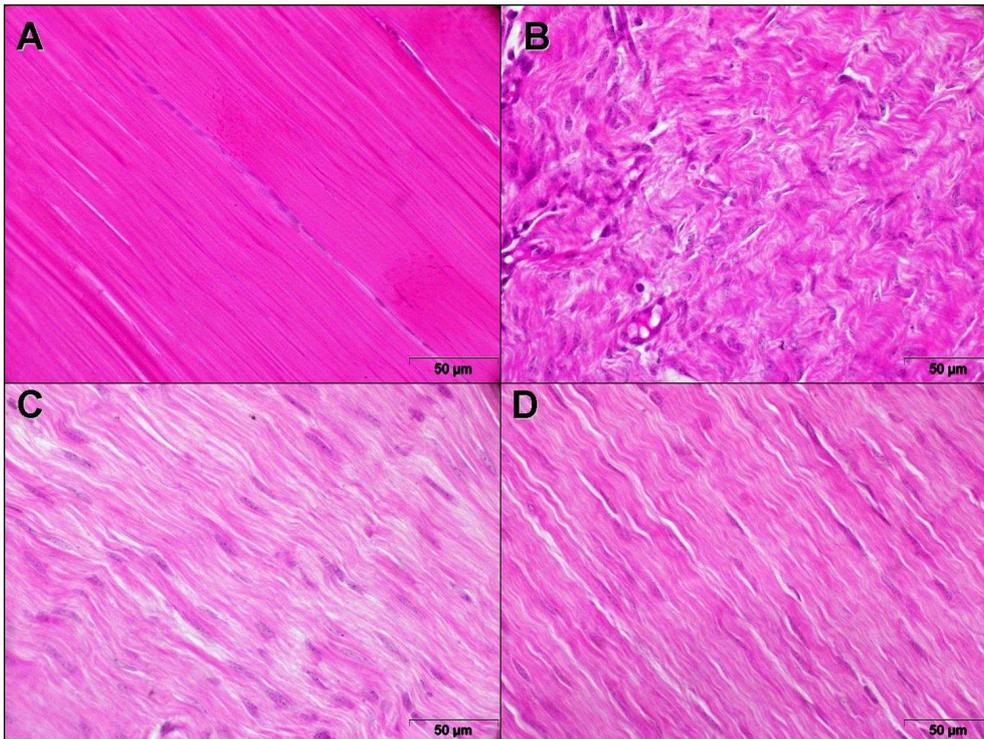


Fig. 44: ematossilina-eosina di sezioni di tendine flessore profondo delle falangi (TFP) di pecora. **A:** TFP arto anteriore **sano**; **B:** TFP arto posteriore **controllo**; **C:** TFP arto posteriore trattato con **PRP**; **D:** TFP arto posteriore trattato con **PRP e MSCs**. Ingrandimento 20x

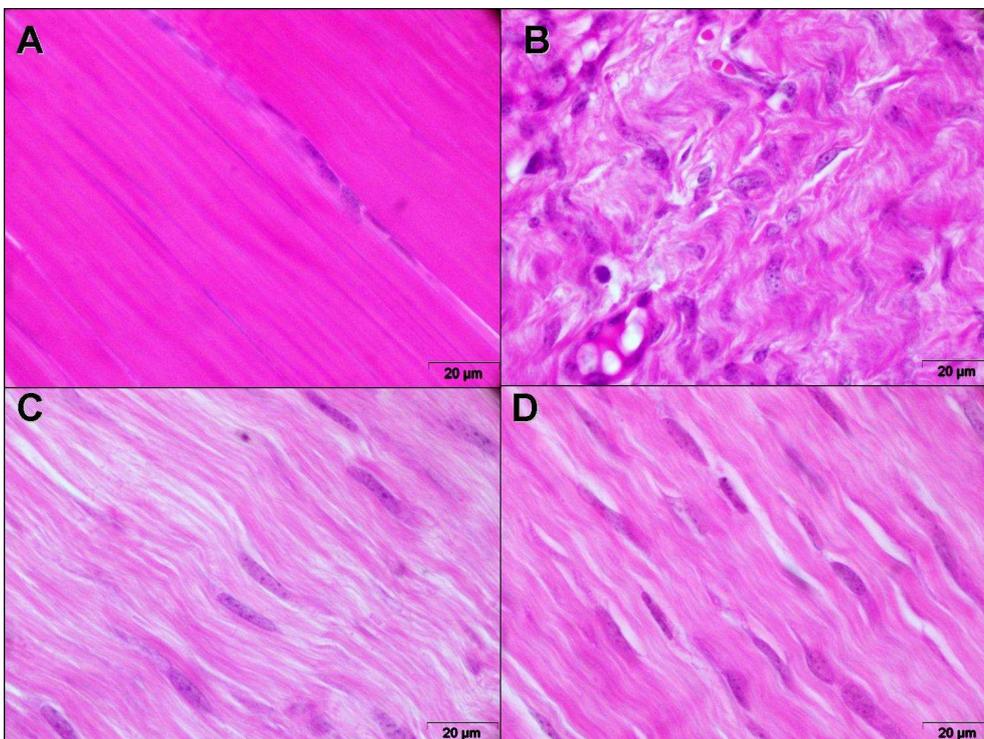


Fig. 45: ematossilina-eosina di sezioni di tendine flessore profondo delle falangi (TFP) di pecora. **A:** TFP arto anteriore **sano**; **B:** TFP arto posteriore **controllo**; **C:** TFP arto posteriore trattato con **PRP**; **D:** TFP arto posteriore trattato con **PRP e MSCs**. Ingrandimento 40x

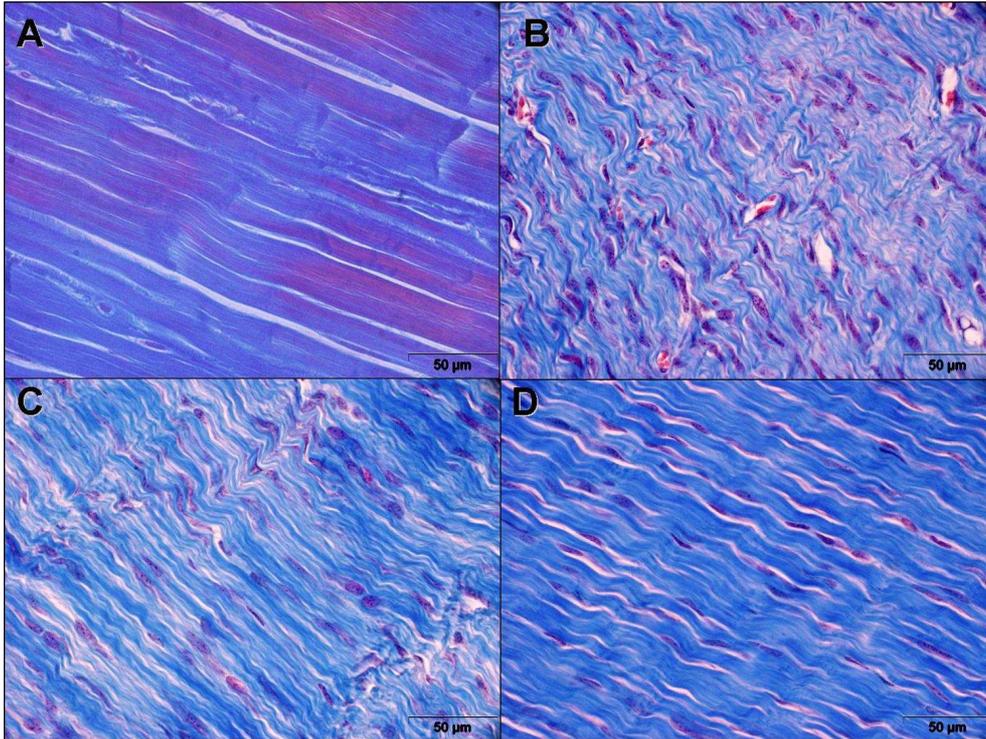


Fig. 46: tricromica di Masson di sezioni di tendine flessore profondo delle falangi (TFP) di pecora. **A:** TFP arto anteriore **sano**; **B:** TFP arto posteriore **controllo**; **C:** TFP arto posteriore trattato con **PRP**; **D:** TFP arto posteriore trattato con **PRP e MSCs**. Ingrandimento 20x

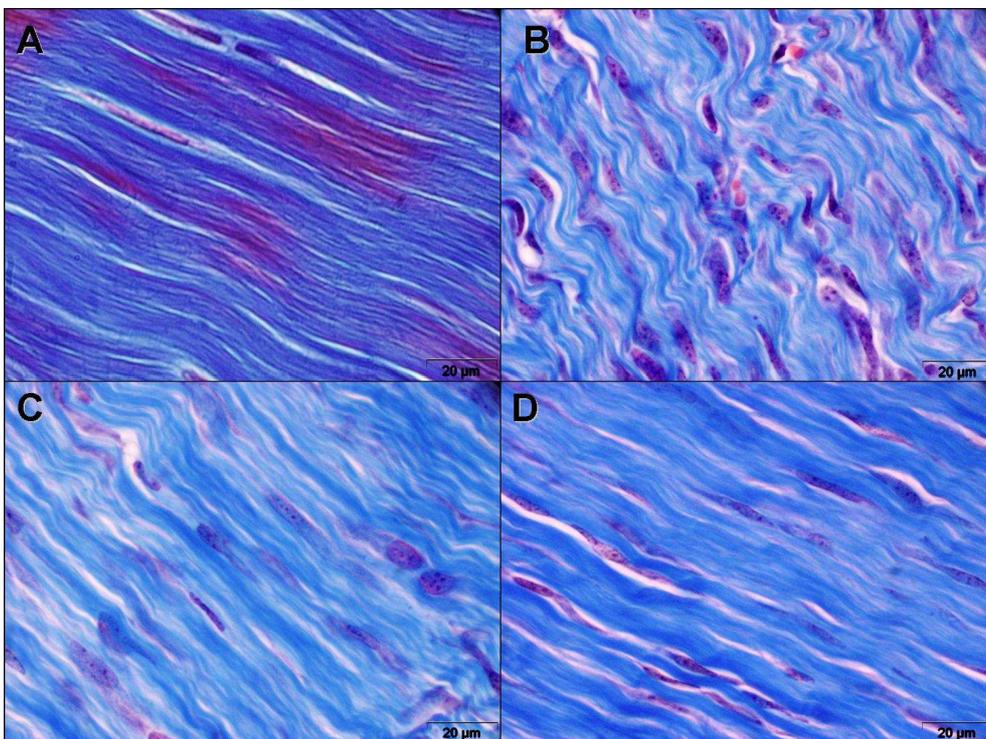


Fig. 47: tricromica di Masson di sezioni di tendine flessore profondo delle falangi (TFP) di pecora. **A:** TFP arto anteriore **sano**; **B:** TFP arto posteriore **controllo**; **C:** TFP arto posteriore trattato con **PRP**; **D:** TFP arto posteriore trattato con **PRP e MSCs**. Ingrandimento 40x

Nella figura 44-45 e 46-47 il tendine di controllo (Fig. 44-45B, 46-47B), dopo un mese dal trattamento con collagenasi, presenta un quadro istologico alterato rispetto ad un tendine sano (Fig.44-45A, 46-47A). Le fibre collagene non sono più disposte in modo regolare poiché vi è una completa perdita dell'organizzazione tissutale.(media: 1) Il tendine lesionato presenta un'elevata cellularità (media: 3) caratterizzata da fibroblasti di forma circolari, inoltre è stata osservata una elevata neovascolarizzazione (media:3) associata ad un moderato infiltrato infiammatorio.

I soggetti trattati con PRP presentano all'esame istologico (Fig.44-45C e 46-47C) un aumento da moderato ad elevato della densità dei fibroblasti (media: 2,5) ed un moderato aumento della neovascolarizzazione (media: 2,5) e dell'infiltrato infiammatorio perivascolare rispetto al tendine sano. Comparando inoltre le immagini 44-45C e 46-47C (tendine trattato con PRP) ed 44-45B, 46-47B (tendine controllo), è possibile evidenziare una moderata organizzazione tissutale (media: 2) con fibre collagene disposte più regolarmente ed infiltrate da una predominanza di fibroblasti allungati; in alcuni punti permane ancora disorganizzazione con disposizione casuale delle fibre.

Il gruppo trattato con PRP e cellule staminali (Fig.44-45D e 46-47D) infine mostra, rispetto al tendine trattato con PRP (Fig.44-45C e 46-47C), una miglior organizzazione tissutale (media: 2,5) ed un parallelismo più omogeneo tra le fibre collagene secondo l'asse longitudinale del tendine nella maggior parte dei campi istologici esaminati. Anche in questi preparati istologici è evidente una cellularità moderata-elevata (media: 2,5) e la presenza moderata di neovascolarizzazione (media: 2).

Alcune sezioni istologiche marcate con ematossilina-eosina vengono di seguito riportate per evidenziare la neovascolarizzazione dei diversi tessuti tendinei trattati (Fig. 48).

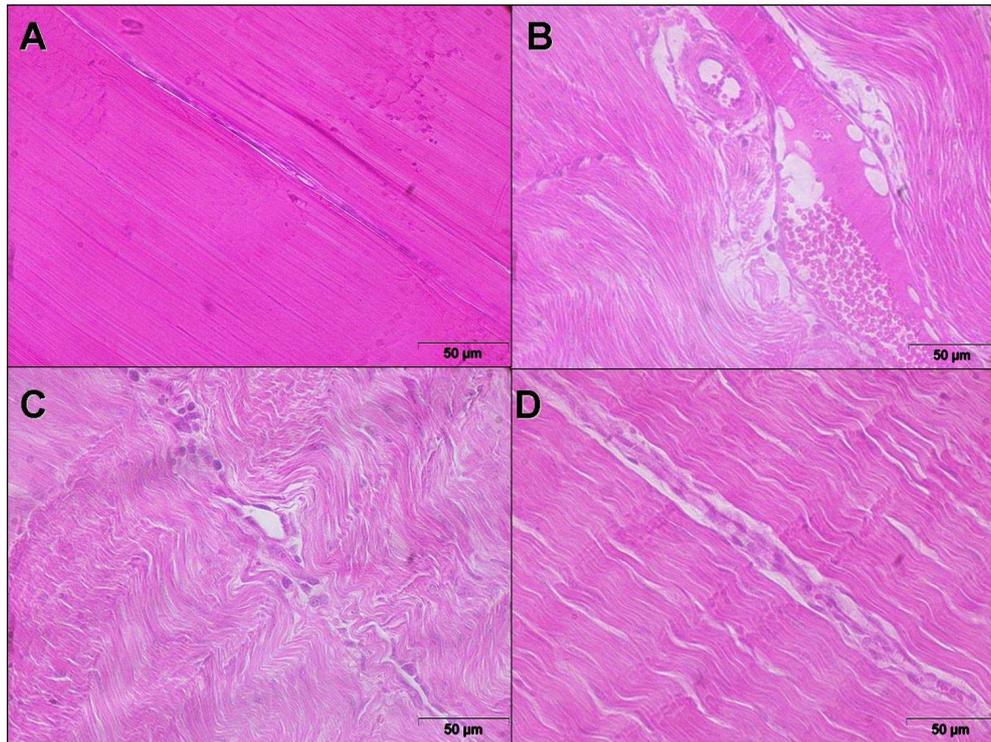


Fig. 48: ematossilina-eosina di sezioni di tendine flessore profondo delle falangi (TFP) di pecora. **A:** TFP arto anteriore sano; **B:** TFP arto posteriore controllo; **C:** TFP arto posteriore trattato con PRP; **D:** TFP arto posteriore trattato con PRP e MSCs. Ingrandimento 20x

Abbiamo valutato inoltre, mediante indagine immunohistochimica, la presenza del collagene di tipo I e di tipo III nei tendini dopo i diversi trattamenti(Fig.49-50)

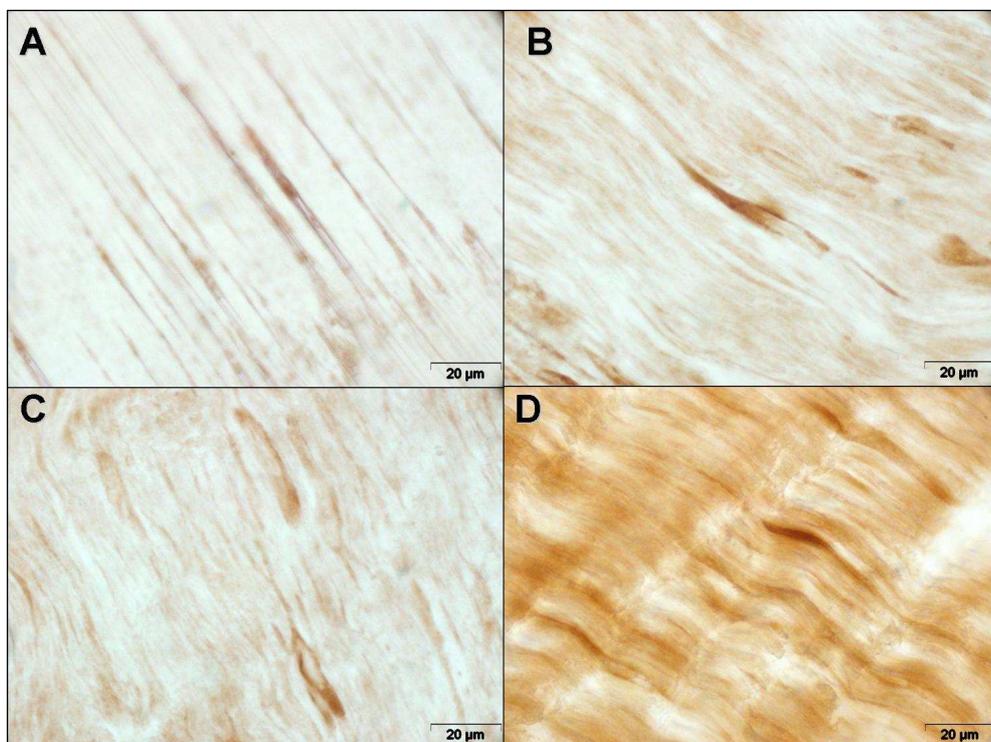


Fig. 49: colorazione immunohistochimica per l'espressione di collagene di tipo I di sezioni di tendine flessore profondo delle falangi (TFP) di pecora. **A:** TFP arto anteriore sano; **B:** TFP arto posteriore controllo; **C:** TFP arto posteriore trattato con PRP; **D:** TFP arto posteriore trattato con PRP e MSCs. Ingrandimento 40x

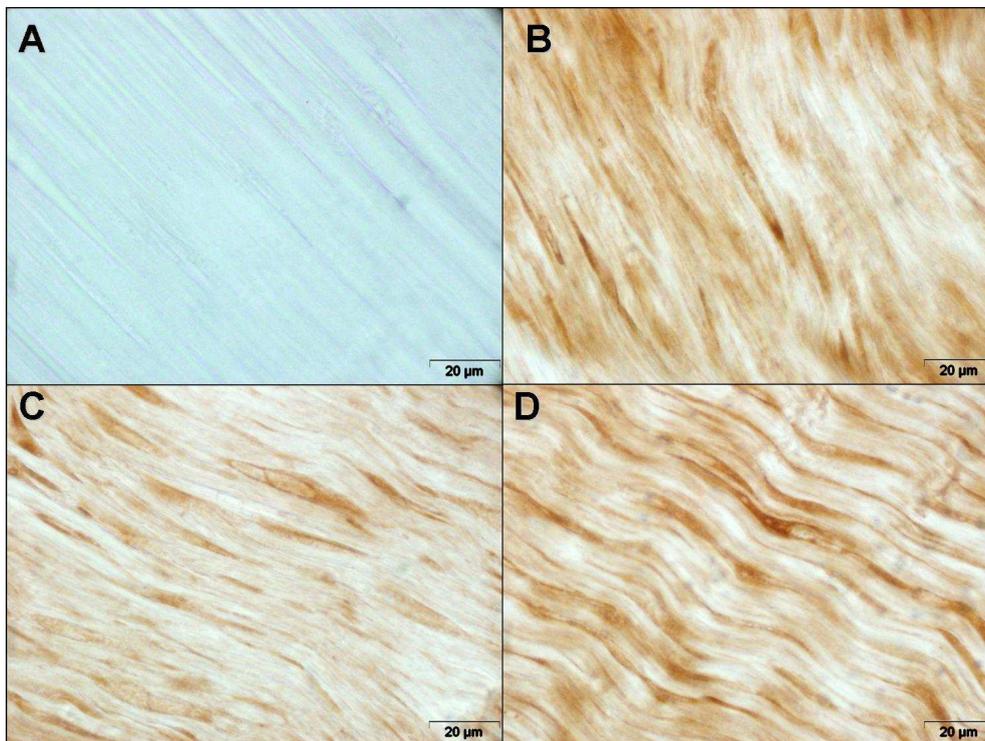


Fig. 50: colorazione immunostochimica per l'espressione di collagene di tipo III di sezioni di tendine flessore profondo delle falangi (TFP) di pecora. **A:** TFP arto anteriore **sano**; **B:** TFP arto posteriore **controllo**; **C:** TFP arto posteriore trattato con **PRP**; **D:** TFP arto posteriore trattato con **PRP e MSCs**. Ingrandimento 40x

Come si può evidenziare della fig 49 il collagene di tipo I è espresso in tutti i tendini esaminati ed è maggiormente rilevabile nei soggetti trattati con PRP e MSCs (Fig.49D).

Il collagene III invece non risulta espresso nel tendine sano (Fig.50A) mentre viene prodotto sia dal tendine controllo che dai tendini trattati.

Per valutare l'espressione, da parte delle cellule presenti nei preparati istologici, di proteine dell'ECM coinvolte nella tenogenesi abbiamo analizzato la presenza della proteina COMP e biglicano (Fig. 51-52).

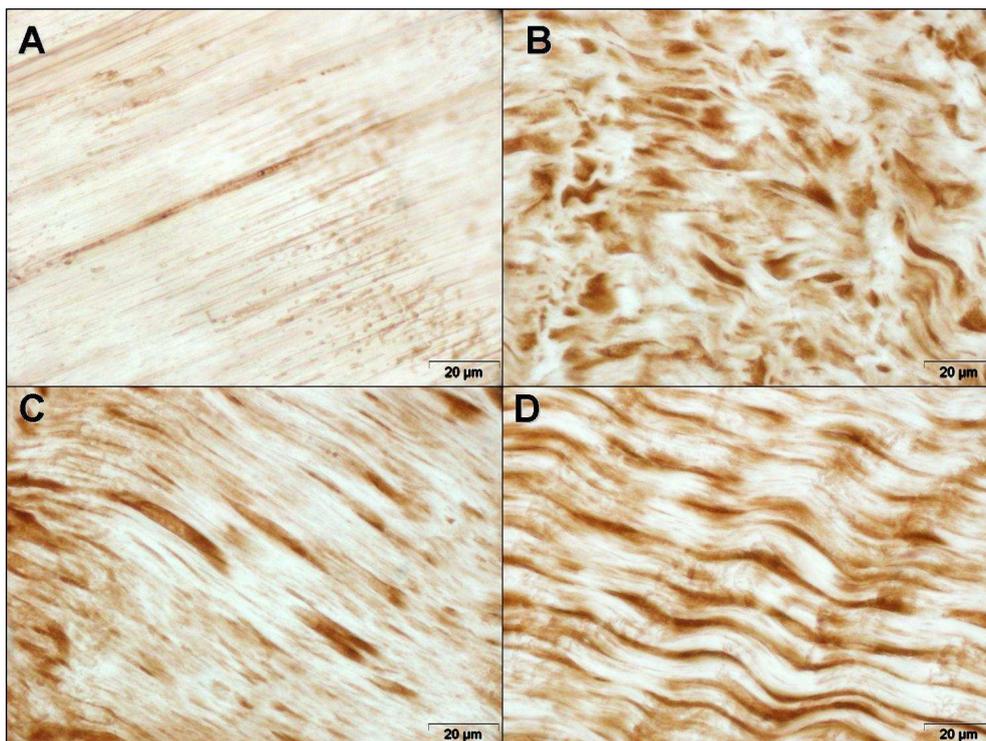


Fig. 51: colorazione immunostochimica per l'espressione di COMP di sezioni di tendine flessore profondo delle falangi (TFP) di pecora. **A:** TFP arto anteriore **sano**; **B:** TFP arto posteriore **controllo**; **C:** TFP arto posteriore trattato con **PRP**; **D:** TFP arto posteriore trattato con **PRP e MSCs**. Ingrandimento 40x

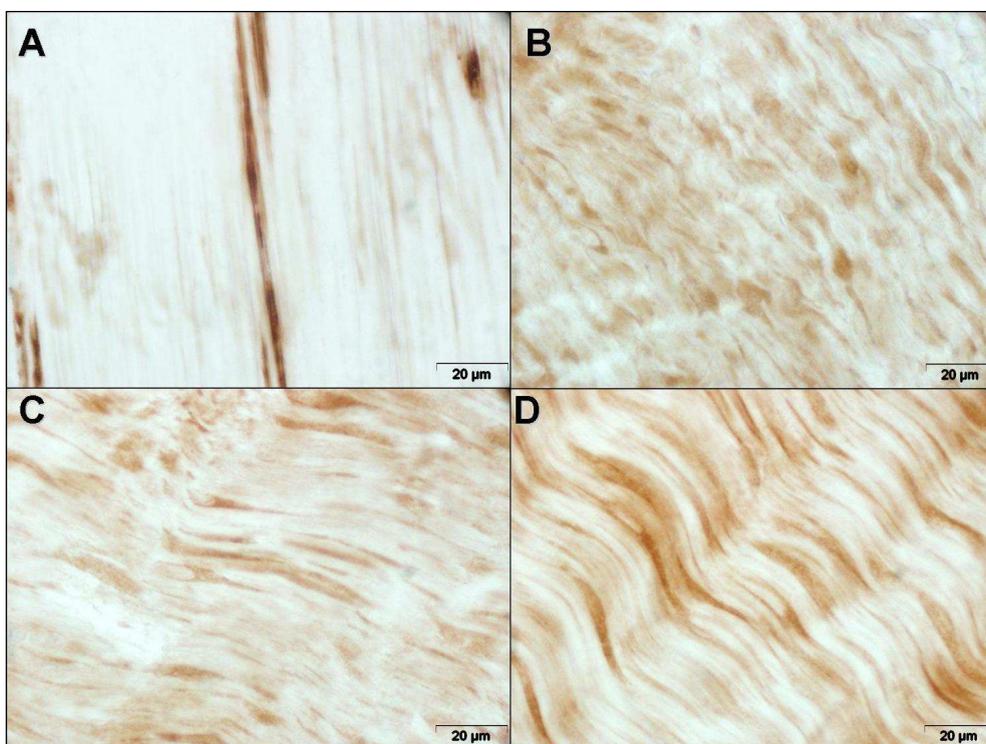


Fig. 52: colorazione immunostochimica per l'espressione di biglicano di sezioni di tendine flessore profondo delle falangi (TFP) di pecora. **A:** TFP arto anteriore **sano**; **B:** TFP arto posteriore **controllo**; **C:** TFP arto posteriore trattato con **PRP**; **D:** TFP arto posteriore trattato con **PRP e MSCs**. Ingrandimento 40x

Entrambe le proteine sono presenti nel tendine sano ma la loro espressione risulta più evidente nei tendini lesionati e in quelli trattati (Fig. 51-52).

4.4: DISCUSSIONE

L'obiettivo primario di questo studio sperimentale è stata la determinazione, mediante una valutazione clinica, ecografia ed istologica, dell'efficacia del PRP nel trattamento di tendinopatie sperimentalmente indotte nel tendine flessore profondo di pecora. Inoltre è stato valutato se l'associazione del PRP con cellule staminali adulte autologhe potesse determinare una azione sinergica miglioratrice nel processo di guarigione tissutale. Sulla base di quanto riportato in letteratura, per quanto riguarda sia la medicina umana che veterinaria, l'ipotesi iniziale si basava sul fatto che il PRP fosse in grado di apportare un beneficio nella riparazione tendinea grazie alla presenza di fattori di crescita endogeni e che questi stessi, se associati a cellule staminali autologhe, potessero migliorare ulteriormente la qualità del processo riparativo (Everts 2007, Gobbi 2007, Fotia 2008).

La scelta di utilizzare la pecora si è rivelata adatta per il raggiungimento dello scopo finale essendo questa specie di facile management ed un buon modello per le patologie tenodesmiche del cavallo. Inoltre le metodiche di preparazione del PRP e dell'isolamento di MSCs da sangue periferico messe a punto nel cavallo (Martinello 2009) sono risultate adatte anche nella pecora: tali protocolli non sono invasivi, non comportano sofferenze per l'animale e possono essere effettuati senza ricorrere ad alcuna forma di anestesia o sedazione.

Per mimare le patologie tenodesmiche che insorgono fisiologicamente si è deciso di procedere inducendo le lesioni mediante collagenasi come descritto ampiamente in letteratura (Muttini 2009, Dehghan 2007, Crovace 2008, Maia 2009 Crovace 2010). A differenza di quanto sostenuto da altri autori tuttavia, nella nostra esperienza è stata rilevata una notevole difficoltà ad ottenere una *core lesion* simile in termini di dimensioni e morfologia nei diversi soggetti; nella maggior parte dei casi, presumibilmente a causa dello spessore ridotto del

tendine trattato, è stata ottenuta una lesione non perfettamente netta ma con caratteristiche infiltrative tra le fibre collagene. La quantità di collagenasi necessaria per indurre la lesione (Crovace 2007, Muttini 2009, Maia 2009) è stata inoculata per via ecoguidata: come riportato anche da altri autori (Dehghan 2007, Reef 1998) tale metodo si è rivelato accurato per confermare il corretto posizionamento dell'ago e per visualizzare l'iniezione del liquido. Dal giorno successivo al trattamento con collagenasi le pecore hanno manifestato segni di zoppia, calore, dolore e tumefazione nel punto di inoculo. Tali segni clinici sono da attribuirsi presumibilmente alla formazione di ematoma ed edema in risposta ad un processo infiammatorio che inizia già dalle prime ore successive al trattamento. Tale rilievo trova conferma anche negli studi condotti da altri autori (Keg 2001, Dehghan 2007)

L'estensione e l'evoluzione del processo patologico in atto possono essere monitorate efficacemente attraverso un esame ultrasonografico, metodica non invasiva e ampiamente diffusa nella pratica clinica. L'immagine ultrasonografica permette di visualizzare le dimensioni, l'aspetto, la localizzazione e la gravità di una lesione sulla base delle ecogenicità e dell'allineamento delle fibre (Dehghan 2007). Dai dati già riportati da studi sul cavallo è stato visto che la massima estensione del danno indotto dalla collagenasi si manifesta intorno al 7°-8° giorno dopo l'inoculo (Dehghan 2007), per tale ragione i trattamenti, rispettivamente con PRP e con PRP e cellule staminali, sono stati programmati ed effettuati a distanza di una settimana dell'induzione della lesione.

Nessuno dei soggetti ha manifestato effetti collaterali né locali né sistemici in seguito al trattamento. I controlli clinici effettuati periodicamente dal medesimo operatore nelle settimane successive al trattamento, erano finalizzati ad una valutazione dei soggetti in risposta alla terapia eseguita: progressivamente in entrambi i gruppi dello studio è stato evidenziato un miglioramento della sintomatologia clinica in termini di riduzione del fenomeno flogistico locale (tumefazione, calore e dolore). Al termine dello studio sperimentale infatti sono stati osservati risoluzione dell'edema ed assenza di calore e dolorabilità alla palpazione. Da un punto di vista ecografico, il quadro rilevato, caratterizzato da un progressivo miglioramento in entrambi i gruppi a carico dell'arto trattato,

trova conferma con i dati riportati da altri autori nel corso di questi anni: entrambi i trattamenti infatti contribuiscono al processo di guarigione tissutale migliorandone la qualità e promuovendo la formazione di nuove fibre collagene allineate secondo l'asse longitudinale del tendine (Carmona 2006, Fasce 2008, Kaneps 2008, Crovace 2008, Prades 2008, Sutter 2008, Waselau 2008, Nixon 2008, Arguelles 2008, Crovace 2010).

Tale miglioramenti nel nostro studio risultano maggiormente apprezzabili comparando i quadri ecografici di inizio e fine trattamento; risulta infatti difficile rilevare sostanziali differenze nell'ecogenicità dei tessuti a distanza di una settimana tra un controllo ed il successivo. Tale difficoltà presumibilmente può essere ricondotta, per quanto riguarda la specie ovina alle minori dimensioni del tessuto tendineo, rispetto alla specie equina.

A nostro parere risulta infine importante sottolineare e confermare quanto descritto da Maia e collaboratori, che riportano la presenza di aderenze tra il tessuto tendineo trattato e le strutture adiacenti; la formazione di sottili aderenze tissutali nel punto di inoculo viene attribuita all'azione della collagenasi stessa nel punto di inoculo (Maia 2009).

Le valutazioni istologiche ed immunohistochimiche sono state utilizzate per verificare la qualità del processo di guarigione tissutale nei tendini controllo e nei tendini trattati con PRP e PRP-MSCs. Le sezioni istologiche marcate con ematossilina-eosina e con la colorazione tricromica di Masson hanno permesso di valutare qualitativamente l'organizzazione della matrice extracellulare e la distribuzione della componente cellulare. In accordo con quanto riportato da Maia et al nel 2009, i tendini controllo mostrano un'elevata disorganizzazione tissutale caratterizzata da distribuzione casuale delle fibre, neovascolarizzazione (Fig. 48) e da un aumento della componente cellulare, costituita prevalentemente da fibroblasti tondeggianti. Il trattamento con PRP ha indotto una migliore organizzazione delle fibre collagene, che hanno mostrato, rispetto ai controlli, un maggior parallelismo lungo l'asse longitudinale del tendine. E' stata inoltre da noi osservata una minor densità dei fibroblasti tissutali che presentano una morfologia più allungata (Webbon 1978). Come confermato da alcuni studi descritti in letteratura, nel corso del processo

riparativo una riduzione del numero di fibroblasti ed un cambiamento della forma da tondeggianti a fusiforme sono suggestivi di una maggior maturità del meccanismo di guarigione (Webbon 1978, Maia 2009)

Per quanto concerne inoltre i risultati da noi ottenuti nei tendini trattati con l'associazione di PRP e MSCs, essi trovano conferma con quanto riportato da numerosi autori in letteratura è già nota infatti l'efficacia delle cellule staminali nei processi di riparazione tissutale (Smith 2005, Richardson 2007, Lacitygnola 2008, Crovace 2010); inoltre altri autori (Everts 2007, Fotia 2009) hanno sottolineato l'importante ruolo dei fattori di crescita nello stimolare l'azione di tali cellule nei meccanismi di guarigione. Come da noi evidenziato nei risultati l'aggiunta delle cellule staminali al trattamento con PRP sembra migliorare ulteriormente il grado di organizzazione tissutale sia in termini di disposizione delle fibre sia in termini di distribuzione e morfologia delle cellule.

Nelle tendinopatie, sia in medicina umana che in medicina veterinaria, l'alterazione della matrice extracellulare risulta essere il rilievo più evidente; per tale ragione abbiamo ritenuto importante valutare l'espressione di proteine della matrice come il collagene di tipo I e di tipo III e di proteoglicani coinvolti nella tenogenesi come il biglicano e la COMP (*cartilage oligomeric matrix protein*).

Com'è noto il tendine sano esprime il collagene di tipo I mentre è assente il collagene di tipo III (fig.xx); nelle tendinopatie al contrario predomina una maggior espressione di collagene di tipo III. Nei tendini controllo del nostro studio, l'immunoistochimica ha permesso di evidenziare un'elevata espressione di collagene di tipo III, a conferma della voluta azione, a livello tendineo, da parte della collagenasi nell'indurre un insulto tissutale. Questo dato risulta interessante essendo un'ulteriore dimostrazione dell'inizio precoce di un meccanismo di riparazione tissutale. Come confermato dagli studi riportati, nelle prime fasi di riparazione di una lesione fibrillare collagene di tipo III vengono velocemente sintetizzate per garantire una certa forza ed elasticità, ma esse non presentano la stessa resistenza allo stiramento del collagene I, e di conseguenza non riescono a sopportare un carico massimale. Il processo di guarigione continua nel corso delle settimane e dei mesi successivi con la progressiva sostituzione delle fibrille di tipo III con fibrille di tipo I (Carmona

2006, Wang 2006, Obaid 2010). Per valutare se il trattamento indurrà, nel corso delle settimane successive, una maggior e corretta produzione di collagene di tipo I sarà necessario effettuare valutazioni immunohistochimiche ad intervalli temporali maggiori.

La matrice extracellulare di un tendine è responsabile sia delle proprietà strutturali che di quelle fisiologiche del tessuto; oltre al collagene che è la proteina più abbondante nel tendine sono presenti altre importanti molecole incluse la COMP ed il biglicano. La COMP è una glicoproteina pentamerica che lega direttamente il collagene di tipo I, la sua funzione non è tuttora certa ma sembra provvedere all'integrità strutturale della fibra. È stato ipotizzato che abbia una funzione sia metabolica 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). Essa infatti è in grado di legare collagene di tipo I, II e IX, così come fibronectina e altre proteine (Gagarina 2008). La quantità di COMP è direttamente proporzionale alle proprietà meccaniche del tendine quali la forza tensile e la robustezza del tendine (Smith 2002). Ugualmente il biglicano lega il collagene fibrillare e regola la fibrillogenesi; è un piccolo proteoglicano che oltre a legare il collagene di tipo I è in grado di interagire con diversi fattori di crescita.

Le tendinopatie sono comunemente associate alla perdita dei componenti della matrice extracellulare come COMP e biglicano, studi precedenti hanno inoltre dimostrato che in un tendine in via di riparazione la produzione di collagene è correlata alla produzione di proteine ultrastrutturali (Soderdten 2005). Le nostre analisi immunologiche dimostrano che i tendini lesionati e quelli trattati avviano un meccanismo di riparazione che porta ad una maggiore espressione delle proteine non fibrillari della matrice come appunto COMP e biglicano.

I risultati ottenuti dunque in questo studio sperimentale sono preliminari: essi tuttavia sottolineano i seguenti aspetti:

- 1) l' applicazione di PRP e MSCs non evoca nell'ospite alcuna reazione di tipo immunitario

- 2) la lieve flogosi riscontrata clinicamente fa seguito all'iniezione di collagenasi e si esaurisce entro la prima settimana dal trattamento
- 3) i controlli clinici e le analisi istologiche ed immunoistochimiche, che trovano conferma nei numerosi studi descritti in letteratura, mostrano un progressivo miglioramento dei tendini trattati rispetto ai loro controlli
- 4) dopo un mese dal trattamento le fibre collagene neoformate hanno mostrato un buon livello di organizzazione con un decorso quasi parallelo all'asse longitudinale del tendine.

L'utilizzo quindi di concentrato piastrinico (PRP) come fonte di fattori di crescita associato al trattamento con cellule staminali autologhe risulta essere una promettente opzione nel trattamento di patologie teno-desmiche.

I risultati positivi fino ad ora raggiunti risultano propedeutici nell'indirizzare la successiva fase di sperimentazione che sarà volta a confermare i risultati attuali e fornire ulteriori chiarimenti per quanto riguarda i meccanismi che stanno alla base del processo riparativo.

Considerazioni personali

Sulla base dei dati raccolti ed analizzati nel corso di questo progetto di ricerca, cercheremo di sintetizzare brevemente alcune considerazioni personali:

- ✧ il trattamento con concentrato piastrinico autologo presenta importanti vantaggi: la metodica di preparazione è rapida, non invasiva ed economica; inoltre la terapia con concentrato piastrinico si è rivelata sicura e non ha indotto nel paziente effetti collaterali locali né sistemici
- ✧ il protocollo utilizzato per l'isolamento delle cellule staminali mesenchimali adulte si è rivelato, sia nel cavallo che nella pecora, efficace e non invasivo; non comporta sofferenze per l'animale e può essere messo in atto senza ricorrere ad alcuna forma di anestesia o sedazione del soggetto
- ✧ la scelta di utilizzare la pecora nello studio sperimentale si è rivelata adatta per il raggiungimento dello scopo finale essendo questa specie di facile management ed un buon modello per le patologie tenodesmiche del cavallo
- ✧ l'applicazione di concentrato piastrinico e cellule staminali autologhi non evoca nell'ospite alcuna reazione di tipo immunitario
- ✧ le osservazioni cliniche ed i risultati ottenuti nel corso dello studio si rivelano in accordo con quanto riportato finora in letteratura: nei soggetti trattati infatti sono stati rilevati notevoli miglioramenti della sintomatologia

- ✧ l'indagine ultrasonografica si è rivelata sia clinicamente che sperimentalmente una buona metodica per monitorare l'estensione e l'evoluzione del processo patologico in atto: è una metodica non invasiva e ampiamente diffusa nella pratica clinica e consente di apprezzare il grado di riempimento di una lesione e l'andamento delle fibre collagene. Risulta tuttavia difficile rilevare sostanziali differenze nell'ecogenicità dei tessuti a distanza di una settimana tra un controllo ecografico ed il successivo. Tale difficoltà presumibilmente si rivela maggiore nella pecora rispetto al cavallo per le minori dimensioni delle strutture tendinee.

- ✧ i rilievi ecografici inoltre hanno evidenziato, per entrambe le metodiche terapeutiche utilizzate, segni indicativi di un processo riparativo migliore, che ha portato alla formazione di un tessuto morfologicamente sovrapponibile, in termini di dimensioni delle lesioni e di allineamento delle fibre, al tessuto sano. Ecograficamente non sono rilevabili sostanziali differenze tra i due diversi trattamenti per quanto riguarda la qualità del processo riparativo.

- ✧ da un punto di vista istologico, il trattamento con concentrato piastrinico ha indotto una migliore organizzazione delle fibre collagene, che hanno mostrato, rispetto agli arti controllo un maggior parallelismo lungo l'asse longitudinale del tendine. L'aggiunta delle cellule staminali al trattamento con concentrato piastrinico sembra migliorare ulteriormente il grado di organizzazione tissutale sia in termini di disposizione delle fibre sia in termini distribuzione e morfologia delle cellule.

- ✧ il concentrato piastrinico, soprattutto se associato alle cellule staminali, si è rivelato una terapia promettente per il trattamento delle lesioni tenodesmiche del cavallo, in quanto promuove la rigenerazione del tessuto, a discapito della formazione di una cicatrice fibrosa, riducendo così il rischio di recidiva. È stato rilevato tuttavia che le terapie da noi utilizzate intervengono migliorando il processo riparativo ma non sembrano in grado di velocizzarlo. Per tale ragione un buon protocollo riabilitativo è considerato essere un supporto essenziale per il corretto rimodellamento del tendine. Il mancato rispetto del tempo da dedicare all'esercizio controllato può portare molto più facilmente alla comparsa di recidive.

L'utilizzo quindi di concentrato piastrinico come fonte di fattori di crescita associato al trattamento con cellule staminali autologhe risulta essere una valida strategia terapeutica nel trattamento di patologie teno-desmiche: i risultati ottenuti vanno dunque ad avvalorare un utilizzo clinico-terapeutico del concentrato piastrinico

I risultati positivi fino ad ora raggiunti risultano propedeutici nell'indirizzare la successiva fase di sperimentazione che sarà volta a confermare i risultati attuali e fornire ulteriori chiarimenti per quanto riguarda i meccanismi che stanno alla base del processo riparativo.

Gli autori, sulla base dei risultati ottenuti nel corso di questo progetto di ricerca, non credono di poter dare dei giudizi definitivi; ritengono però di poter esprimere un parere nettamente favorevole riguardo l'applicazione di tale tecnica, che a loro giudizio ha permesso di ottenere i buoni risultati auspicati.

Riteniamo che la nostra esperienza sia molto positiva, anche se certamente da correggere e migliorare. La positività dei risultati raggiunti ci autorizza ad essere fiduciosi nel continuare a percorrere la strada intrapresa.

Glossario

A

Aferesi: una tecnologia medica nella quale il sangue periferico di un donatore o paziente viene fatto passare attraverso una apparecchiatura che separa un particolare costituente

Alpha-granuli: granuli presenti nel granulomero piastrinico; contengono citochine, chemochine e fattori della crescita

Angiogenesi: lo sviluppo di nuovi vasi sanguigni a partire da altri già esistenti. È un processo di fondamentale importanza in molti processi fisiologici, quali la normale crescita del tessuto, lo sviluppo embrionale e la cicatrizzazione delle ferite, e patologici.

Artrite: un fenomeno infiammatorio articolare

Artrosi: una patologia cronica degenerativa delle cartilagini articolari, con interessamento secondario di osso, sinovia, capsula.

Autologo: appartenente allo stesso organismo, allo stesso individuo

B

Batroxobina: enzima sierico isolato dal veleno di *Bothrops atrox* attraverso opportuni processi di purificazione; ha un effetto trombina-simile a livello di attivazione piastrinica

Biomateriale: ogni sostanza o combinazione di sostanze di origine sintetica o naturale, diversa da un farmaco, che si interfaccia con i sistemi biologici per valutare, trattare, aumentare o sostituire un qualunque tessuto, organo o funzione del corpo

Buffy coat: la frazione di un campione di sangue ottenuta dopo la centrifugazione in gradiente di densità; contiene la maggior parte dei globuli bianchi e delle piastrine.

C

Cellule staminali mesenchimali: cellule multipotenti che possono replicarsi come cellule indifferenziate per poi differenziarsi, se opportunamente

indirizzate, nell'organo bersaglio in specifiche e varie popolazioni cellulari (cellule ossee, cartilaginee, tendinee, muscolari etc)

Cellule staminali embrionali: cellule primitive non specializzate dotate della singolare capacità di differenziarsi in diversi altri tipi cellulari

Collagenasi: gli enzimi che tagliano i legami peptidici presenti nel collagene

Collagene: proteina fibrosa costituita da fibroblasti le cui fibre, flessibili e in grado di offrire una grande resistenza alle trazioni, prendono parte alla costituzione di ossa, tendini e cartilagini

Concentrato piastrinico: un emocomponente che si presenta come un concentrato autologo di piastrine sospese in un piccolo volume di plasma

Contrattura: la retrazione di una ferita che causa deformazione e perdita di funzionalità

Contrazione: la fase del processo di guarigione caratterizzata dalla riduzione delle dimensioni di una ferita aperta che deriva dal movimento centripeto dell'intero spessore della cute circostante

Crioprecipitato: un componente che contiene la frazione crioglobulinica del plasma, ottenuto mediante centrifugazione ad alta velocità del plasma fresco

D

Desmite: il processo flogistico a carico di un legamento

E

Ecogenicità: la capacità di una struttura di generare eco.

Ecografia: un sistema di indagine diagnostica medica che non utilizza radiazioni ionizzanti, ma ultrasuoni e si basa sul principio dell'emissione di eco e della trasmissione delle onde ultrasonore.

Emocomponente: un prodotto ricavato dal frazionamento del sangue con mezzi fisici semplici o con aferesi

Emoderivato: una specialità medicinale estratta dall'emocomponente plasma mediante processi di lavorazione industriale

Emopoiesi: la formazione e la maturazione di tutti i tipi di cellule del sangue a partire dai loro precursori.

Emostasi: processo fisiologico che, in caso di rotture della parete vascolare, porta alla formazione di un coagulo, che ha la funzione di arrestare o limitare il verificarsi di una emorragia.

Epitelizzazione: lo stadio finale della fase proliferativa della riparazione tissutale; le cellule epiteliali migrano sulla superficie della lesione, completando la guarigione.

Eritrociti: le cellule del sangue, di forma discoidale biconcava, adibite al trasporto dell'ossigeno dai polmoni verso i tessuti e di una parte dell'anidride carbonica dai tessuti ai polmoni.

Eterologo: proprio di organo, tessuto o sostanza organica che proviene da una specie diversa da quella in oggetto

F

Fattori di crescita: proteine capaci di stimolare la proliferazione e il differenziamento cellulare

Ferita: una soluzione di continuo delle strutture corporee causata da un agente vulnerante.

Fibrina: una proteina fibrillare, derivante dal fibrinogeno, che interviene nel meccanismo di coagulazione del sangue

Fibrosi: la riparazione di un danno tissutale mediante sostituzione delle cellule parenchimali con cellule connettivali

G

Glicoproteina GPIIb-IIIa: molecola di superficie piastrinica fondamentale per l'aggregazione piastrinica

Graft Versus Host Disease: è una rara forma di GVHD (malattia del trapianto contro l'ospite), che si ottiene quando durante una trasfusione di sangue T immunocompetenti esse aggrediscono il sistema immunitario della persona, riconoscendolo come corpo estraneo. Solitamente si manifesta entro 10-12 giorni, con numerose complicanze.

Growth factors: vedere anche "Fattori di crescita"

I

Iperecogeno: la qualità ultrasonografica di tessuti o strutture di riflettere in notevole quantità le onde ultrasoniche ad essi dirette. E' propria di strutture solide e può essere omogenea o disomogenea

Ipoecogeno: la qualità ultrasonografica di tessuti o strutture di riflettere poco le onde ultrasoniche ad essi dirette; produce echi di ampiezza o densità minori rispetto al medium circostante.

L

Leucociti: sono cellule del sangue, la cui funzione principale è quella di preservare l'integrità biologica dell'organismo tramite l'attuazione di meccanismi di difesa diretti contro agenti patogeni di varia natura.

Linfociti: cellule presenti nel sangue (sottopopolazione dei leucociti) che svolgono un ruolo molto importante nel sistema immunitario (risposta immunitaria adattativa)

M

Medicina rigenerativa: un nuovo approccio terapeutico finalizzato alla rigenerazione biologica del tessuto anziché alla sua sostituzione

Megacariocita: una cellula del midollo osseo responsabile della produzione delle piastrine

Mitosi: la riproduzione per divisione equazionale della cellula eucariote

N

Neutrofili: una sottopopolazione dei globuli bianchi, il cui citoplasma contiene granulazioni caratteristiche ed un nucleo lobato (per cui i granulociti vengono anche chiamati *polimorfonucleati*) ed hanno funzioni di difesa dell'organismo contro le infezioni

O

Omologo: proprio di organo, tessuto o sostanza organica che proviene dalla stessa specie di quella in oggetto

Osteofibrosi: malattia dovuta ad una carenza o a uno scarso assorbimento di calcio da parte dell'organismo

Osteogenesi: la capacità di produrre nuovo tessuto osseo; è determinata dalla presenza di cellule osteoprogenitrici e di precursori osteogenici.

Osteoinduzione: la capacità di stimolare le cellule staminali a differenziarsi in cellule mature attraverso lo stimolo indotto dai fattori di crescita locali, in particolar modo PDGF e TGF- β .

Osteoconduzione: è determinata dalla presenza di uno scaffold che permette la migrazione vascolare e cellulare; generalmente si ottiene grazie all'utilizzo di *graft* autologhe od omologhe oppure di matrici artificiali con osso demineralizzato, idrossi-apatite, fosfatotricalcico e collagene.

P

Perimio: l'insieme delle membrane esterne di rivestimento che separano il muscolo dai piani fasciali

Platelet rich plasma: vedi anche "Concentrato piastrinico"

R

Rigenerazione tissutale: la sostituzione di un tessuto danneggiato o mancante con un tessuto strutturalmente e funzionalmente simile

Riparazione tissutale: la formazione di un tessuto cicatriziale non funzionale

S

Stiramento: una lesione ad un tendine o ad un muscolo causata da un uso eccessivo o da una eccessiva sollecitazione

T

Tendinite: una tendinopatia di origine infiammatoria

Tendinosi: una degenerazione del tessuto tendineo dovuta a fattori lesivi che si perpetuano nel tempo; non associata propriamente a fenomeni flogistici

Tenosinovite: il processo infiammatorio a carico di una zona di tendine avvolta dalla guaina tendinea

Tessuto di granulazione: tessuto connettivo composto da vasi capillari e cellule connettivali proliferanti, a superficie mammellonata; si forma su una lesione cutanea o della mucosa, per colmare la perdita del tessuto preesistente

Trombina: un enzima, appartenente alla classe delle idrolasi, che catalizza il taglio selettivo dei legami Arg-Gly del fibrinogeno per formare la fibrina e rilasciare i fibrinopeptidi A e B; interviene nella cascata della coagulazione.

Trombociti: sono elementi corpuscolati del sangue, specializzati nei fenomeni di emostasi; sono frammenti del citoplasma dei megacariociti, cellule del sangue prodotte a livello del midollo osseo. Le piastrine sono presenti nel sangue circolante ed hanno una vita media di circa 10 giorni; sono prive di nucleo, ma possiedono granuli, molti organuli citoplasmatici ed RNA.

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 ditto* In Adamo S., Carinci P., Molinaro M., Siracusa G., Stefanini M., Riparo E. *Istologia di V. Monesi* Piccin editore 2002 V edizione III ristampa 435-488
3. **Aguggini G., Beghelli V., Giulio L.F.** 1992 *Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia* UTET Torino
4. **Akeda K., An H., Okuma M., Attawia M., Miyamoto K., Thonar E.J., Lenz M.E., Sah R.L., Masuda K.** 2006 *Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis.* Osteoarthritis Cartilage 14(12), 1272-1280
5. **Akeda K., An H., Pichika R., Attawia M., Thonar E.J., Lenz M.E., Uchida A., Masuda K.** 2006 *Platelet-rich plasma (PRP) stimulates the extracellular matrix metabolism of porcine nucleus pulposus and annulus fibrosus cell cultured in alginate beads.* Spine 31(9), 959-966
6. **Aldegheri R., Dupplicato 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
7. **Andia I, Sanchez M, Maffulli N.** 2010 *Tendon Healing and platelet-rich plasma therapies* Expert Opin Biol Ther 10, 1415-26
8. **Andrae J., Gallini R., Betsholtz C.** 2008 *Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine.* Genes and Development 22, 1276-1312
9. **Anitua E., Andia I., Ardanza B., Nurden P., Nurden A.T.** 2004 *Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration.* Thromb Haemost 91(1), 4-15
10. **Anitua E., Andia I., Sanchez M., Azofra J., Del Mar Zaldueño M., De la Fuente M., Nurden P., Nurden A.T.** 2005 *Autologous preparation rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture.* J Orthop Res 23(2), 281-286
11. **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

12. **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
13. **Anitua E., Sanchez M., Orive G., Andia I.** 2008 *Delivering growth factors for therapeutics.* Trends in Pharmacological Sciences 29(1), 37-41
14. **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
15. **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
16. **Arnoczky S.P.** 2006 *The future of meniscal repair, regeneration and replacement.* In Atti del 13th ESVOT Congress, 13
17. **Ashdown R.R., Done S.H.** 1987 *Atlante di anatomia veterinaria- volume secondo "Il cavallo"* edizioni USES Firenze
18. **Aspenberg P., Virchenko O.** 2004 *Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats.* Acta Orthop Scand 75, 93-99
19. **Barbieri E.** 2008 *use of platelet gel in arthroscopic treatment for rotator cuff lesion: preliminary report precursors* In Atti del X Congresso nazionale IORS, Messina 12-13 settembre, 78
20. **Barone R.** 1981 *Anatomia comparata dei mammiferi domestici – vol.2 Artrologia e Miologia.* 2^a edizione. Bologna Ed. Agricole
21. **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
22. **Barret J., White A.** 2008 *Introduction to equine tendon injury* In Proceedings of the Annual Convention of the AAEP 464-469
23. **Baumans V.** 2005 *Science-based assesment of animal welfare: laboratory animals.* Rev Sci Tech. 24(2), 503-513
24. **Bessis M.** 1972 *The thrombocytic series* In Living blood cells and their ultrastructure 367-396 Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York 1973
25. **Bielecki T.M., Gazdzik T.S., Arendt M.D., Szczepanski T., Krol W., Wielkoszynski T.** 2007 *Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances.* Journal of Bone and Joint Surgery 89(3), 417-420
26. **Birk D.E., Zycband E.** 1994 *Assembly of the tendon extracellular matrix during developement.* J Anat 184, 457-463
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.** 2005 *Tissue regeneration and in loco administration of platelet derivatives: clinical outcome, heterogeneous products, and heterogeneity of the effector mechanisms.* Transfusion 45, 1759-1767
29. **Borzini P., Mazzucco L., Cattana E.** 2004 *Platelet gel: clinical use and unanswered question* Blood Transfusion 2, 10-14
30. **Brehm M., Zeus T., Eckehard Strauer B.** 2002 *Stem Cells—Clinical Application and Perspectives* Herz 27, 611-620
31. **Brockis J.G.** 1953 *The blood supply of the flexor and extensor tendons of fingers in man.* J Bone Joint surg 35, 131-138
32. **Boudreaux M. K.** 2010 *Platelet structure* In Weiss D.J. Wardrop K.J. Schalm's Veterinary Hematology 561-568 Wiley-Blackwell Iowa USA
33. **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
34. **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
35. **Brehm W., Aklin B., Yamashita T., Rieser F., Trüb T., Mainil-Varlet P.** 2004 *Cartilage repair using tissue engineered cartilage in a caprine superficial osteochondral defect model.* In Atti del 12th ESVOT Congress, 215-216
36. **Brunnberg L.** 2008 *Biomarkers of pain in osteoarthritis.* In Atti del 14th ESVOT Congress Munich 10th-14th September 2008 23
37. **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, Ancona 12-13 giugno, 5
38. **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 Europ Coll Vet Surg 2005, 68-71
39. **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
40. **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
41. **Castellacci E., Lunati P., Orsoni E.** 2009 *L'ingegneria tissutale: utilizzo di fattori di crescita e cellule staminali in traumatologia dello sport* G.I.O.T 35, 163-169
42. **Chang J., Most D., Stelnicki E., Siebert J.W., Longaker M.T., Hiu K., Lineaweaver W.C.** 1997 *Gene expression of transforming growth factor beta-1 in rabbit zone II flexor*

- tendon wound healing: evidence for dual mechanism of repair. Plast Reconstr Surg* 100(4), 937-944
43. **Chaer R. A., Graham J.A., Mureebe L.** 2006 *Platelet function and pharmacologic inhibition. Vasc Endovasc Surg* 40, 261-267
 44. **Chen T.L., Chang L.Y., DiGregorio D.A., Perlman A.J.** 1993 *Growth factor modulation of insulin-like growth factor-binding proteins in rat osteoblast-like cells. Endocrinology* 133(3), 1382-1389
 45. **Cieslik-Bielecka A., Gazdzik T.S., Bielecki T.M., Cieslik T.** 2007 *Why the platelet-rich gel has antimicrobial activity? OOOOE* 103(3), 303-305
 46. **Clegg P.** 2008 *Tissue engineering of tendon. In Atti del 14th ESVOT Congress Munich 10th-14th September 2008* 3-5
 47. **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
 48. **Crane D.** 2008 *Platelet rich plasma (PRP) matrix grafts Practical Pain Management* 8, 12-27
 49. **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*
 50. **Creaney L., Hamilton B.** 2007 *Growth factor delivery methods in the management of sports injuries: the state of play. Br J Sports Med.* 5,
 51. **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)*
 52. **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, In press
 53. **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
 54. **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
 55. **Curi M.M., Saraceni Issa Cossolin G., Koga D.H., Araujo S.R., Feher O., Oliveira dos Santos M., Zardetto C.** 2007 *Treatment of avascular osteonecrosis of the mandible in cancer patients with a history of bisphosphonate therapy by combining bone*

- resection and autologous platelet-rich plasma: report of 3 cases. J Oral Maxillofac Surg* 63, 349-355
56. **Dabareiner R.M., Carter G.K., Chaffin M.K.** 2000 *How to perform ultrasound-guided tendon splitting and intralesional tendon injections in the standing horse* In *Proceeding of the Annual Convention of AAEP* 2000 176-182
 57. **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
 58. **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
 59. **Davenport-Goodall C.L., Boston R.C., Richardson D.W.** 2004 *Effect of insuli-like growth factor-II on the mitogenic and metabolic activities of equine articular cartilage with and without interleukin 1-β.* *Am J Vet Res* 65(2), 238-244
 60. **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
 61. **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
 62. **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
 63. **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
 64. **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
 65. **Del Corso M., Choukroun J., Dohan D.** 2006 *L'impiego del PRF nella chirurgia ossea ricostruttiva* *Dental Tribune* 9, 11-14
 66. **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
 67. **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

68. **Denoix J.M.** 1996 *Functional anatomy of tendons and ligaments in the distal limbs (manus and pes)* In *The equine athlete: tendon, ligament and soft tissue injuries*. Proceedings Dubai International Equine Symposium 23-54
69. **De Rossi R., Ancillero de Oliveira Coelho A.C.** 2009 *Effect of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses*. *Acta cirúrgica Brasileira* 24(4), 276-281
70. **De Vasconcelos Gurgel B.C., Gonc P.F., Pimentel S.P., Bovi G.M., Nociti F.H., Sallum E.A., Casati M.Z.** 2007 *Platelet-rich plasma may not provide any additional effect when associated with guided bone regeneration around dental implants in dogs*. *Clin. Oral. Impl. Res* 18, 649-654
71. **Dias M.J., Lourenco P.J., Rodrigues A.C., Azevedo J.M., Ferreira A.J., Cabrita A.M.** 2004 *The influence of the quantity of autologous spongy bone graft applied or its association to platelet rich plasma on the induction of the bone regeneration process in two experimental models in the sheep*. In *Atti del 12th ESVOT Congress proceedings 10th-12th September Munich – Germany*
72. **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
73. **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
74. **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
75. **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
76. **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
77. **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
78. **Du Toit D.F., kleintjes W.G., Otto M.J., Mazyala E.J., Page B.J.** 2007 *Soft and hard-tissue augmentation with platelet-rich plasma: tissue culture dynamics, regeneration and molecular biology perspective*. *Int J Shoulder Surg* 1(2), 64-73
79. **Dyson S.J.** 1995 *Suspensory ligament desmitis* *Veterinary Clinics of North America*. *Equine practice* 11(2),177-215

80. **Dyson S.J.** 1996 *Diagnosis and Prognosis of Suspensory Desmitis In The equine athlete: tendon, ligament and soft tissue injuries.* Proceedings Dubai International Equine Symposium 207-226
81. **Dyson S.J.** 1997 *Treatment of Superficial Digital Flexor Tendinitis: a Comparison of Conservative Management, sodium Hyaluronate, and Glycosaminoglycan Polysulfate* Proceedings of the Annual Convention of the AAEP; 297-300
82. **Edwards D.A.** 1946 *The blood supply and lymphatic drainage of tendons.* J. Anat 80, 147-152
83. **Endresen G.K.M** 1984 *Demonstration of fibronectin associated with platelets in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis.* Scand J Rheumatology 13, 351-356
84. **Enwemeka C.S.** 1989 *Inflammation, cellularity and fibrillogenesis in regenerating tendon: implications for tendon rehabilitation.* Phys Ther 69, 816-825
85. **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
86. **Evans J.H., Barbanel J.C.** 1975 *Structural and mechanical properties of tendon related to function.* Equine Vet J 7,1-2
87. **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
88. **Everts P.A., Devilee R.J., Oosterbos C.J., Mahoney C.B., Schattenkerk M.E., Knape J.T., Van Zundert A.** 2007 *Autologous platelet gel and fibrin sealant enhance the efficacy of total knee arthroplasty: improved range of motion, decreased length of stay and a reduced incidence of arthrofibrosis.* Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 15(7), 888-894
89. **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
90. **Everts P.A.M., van Zundert A., Schönberger J.P.A.M., Devilee R.J.J., Knape J.T.A.** 2008 *What do we use: Platelet-rich plasma or platelet-leucocyte gel?* Journal of Biomedical Materials Research Part A 85A(4), 1135-1136
91. **Eyre D.R., McDevitt C.A., Billingham M.E.J., Muir H.** 1980 *Biosynthesis of collagen and other matrix proteins by articular cartilage in experimental osteoarthritis* Biochem.J 188, 823-837
92. **Facello C., Gugliemino R.** 1992 *Il sangue* In Aguggini G., Beghelli V., Giulio L.F. *Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia* 309-351 UTET, Torino, Italy
93. **Fackelman G.E.** 1973 *The nature of tendon damage and its repair* Equine Vet J 5, 141-142

94. **Fayolle P.** 2004 *Fisiopatogenesi delle osteocondrosi e delle osteocondriti*. Summa 9, 44-50
95. **Fenwick N., Griffin G., Gauthier C.** 2009 *The welfare of animals used in science: how the "three Rs" ethic guides improvements*. Can Vet J 50(5), 523-530
96. **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
97. **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
98. **Fitzpatrick N., Yeadon R., Van Terheijden C.** 2008 *Early clinical experience of osteochondral autograft transfer for the treatment of osteochondritis dissecans of the femoral condyle in dogs*. In Atti del 14th ESVOT Congress Munich 10th-14th September 2008 324-326
99. **Fortier L.A.** 2005 *Stem cells: classifications, controversies and clinical applications*. Veterinary Surgery 34, 415-423
100. **Fortier L.A., Mohammed H.O., Lust G., Nixon A.J.** 2002 *Insulin-like growth factor-1 enhances cell-based repair of articular cartilage*. The Journal of Bone and Joint Surgery 84(2), 276-288
101. **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
102. **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
103. **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
104. **Franch J.** 2008 *Synthetic cancellous bone grafts material*. In Atti del 14th ESVOT Congress Munich 10th-14th September 2008 65-67
105. **Francioso E., Bartoli C., Dozin B., Crovace A.** 2004 *Produzione di cartilagine da condrociti articolari del cane*. In Atti del XI Congresso Nazionale S.I.C.V. Grugliasco (TO) 10-12 giugno 2004 80-83
106. **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

107. **Gagarina V.** 2008 *Cartilage Oligomeric Matrix Protein Protects Cells against Death by Elevating Members of the IAP Family of Survival Proteins* *The Journal of Biological Chemistry* 283(1),648-659
108. **Gaissmaier C., Fritz J., Krackhardt T., Flesh I., Aicher W.K., Ashammakhi N.** 2005 *Effect of human platelet supernatant on proliferation and matrix synthesis of human articular chondrocytes in monolayer and three-dimensional alginate cultures.* *Biomaterials* 26(14), 1953-1960
109. **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
110. **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
111. **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
112. **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*
113. **Gillis C.L.** 1997 *Rehabilitation of tendon and ligament injuries* *AAEP Proceedings* 43, 306-309
114. **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
115. **Giovannini S., Brehm W., Mainil-Varlet P., Nestic D.** 2007 *Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells.* *Differentiation* 76, 118-129
116. **Giusti I.** 2006 *Il gel piastrinico nella terapia adiuvante per la riparazione tissutale: il laboratorio e la clinica* In *Atti del Assegno regionali di ricerca, Regione Abruzzo*
117. **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*
118. **Goodman H.J. Choueka J.** 2005 *Biomechanics of the Flexor Tendons* *Hand Clinics.* 21,129-149
119. **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.
120. **Güngörmüş C., Kolankaya D.** 2008 *Characterization of type I, III, V collagens in high-density cultured tenocytes by triple immunofluorescence technique* *Cytotechnology* 58, 145-152

121. **Halliday D.A., Zettler C., Rush R.A., Scicchitano R., McNeil J.D.** 1998 *Elevated nerve growth factor levels in the synovial fluid of patients with inflammatory joint disease.* *Neurochemical Research* 23(6), 919-922
122. **Hartman A.R., Galanakis D.K., Honig M.P., Seifert F.C., Anag-Nostopoulos C.E.** 1992 *Autologous whole plasma fibrin gel – intraoperative procurement.* *Arch Surg* 127, 357-359
123. **Hauschild G., Merten H.A., Bader A., Uhr G., Deivick A., Meyer-Lindenberg A., Fehr M.** 2005 *Bioartificial bone grafting: tarsal joint fusion in a dog using a bioartificial composite bone graft consisting of a β -tricalciumphosphate and platelet rich plasma – a case report.* *VCOT* 18(1), 52-54
124. **Herron A.J.** 2001 *Struttura, funzione, metabolismo e crescita delle ossa.* In *Le basi patogenetiche delle malattie chirurgiche nei piccoli animali*, Bojrab A.J. San Lazzaro di Savena (BO) Cristiano Giraldi Editore
125. **Hertel 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
126. **Hopper S.** 2007 *Treatment Options for Hindlimb Proximal Suspensory Desmitis* *Compendium Equine*, September/October 2007: 266- 272
127. **Hosaka Y.** 2005 *Mechanism of Cell Death in Inflamed Superficial Digital Flexor Tendon in the Horse* *Journal of Comparative Pathology* 132; 51-58
128. **Hosaka Y.** 2009 *Comparative study of the characteristics and properties of tendinocytes derived from three tendons in the equine forelimb* *Tissue Cell* doi:10.1016/j.tice.2009.06.002
129. **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
130. **Hsu C., Chang J.** 2004 *Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing.* *J Hand Surg* 29(4), 551-563
131. **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
132. **Ireland D.** 2001 *Multiple changes in gene expression in chronic human Achilles tendinopathy* *Matrix Biology* 20, 159-169
133. **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
134. **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
 135. **Ito K., Yamada Y., Naiki T., Ueda M.** 2006 *Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma.* Clin Oral Impl Res 17, 579-586
 136. **Jackson D.W., Scheer M.J., Simon T.M.** 2001 *Sostituti della cartilagine: rassegna delle scienze di base e delle opzioni di trattamento.* J Am Acad Orthop Surg 9, 37-52
 137. **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
 138. **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
 139. **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
 140. **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
 141. **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
 142. **Kannus P.** 2000 *Structure of the tendon connective tissue.* Scand J Med Sci Sport 10, 312-320
 143. **Kastelic J., Galeski A., Baer E.** 1978 *The multicomposite structure of tendon.* Connect Tissue Res 6, 11-23
 144. **Keg P.R., Van Den Belt A.J.M., Merkens H.W.** 1992 *The effect of regional nerve blocks on the lameness caused by collagenase induced tendinitis in the midmetacarpal region of the horse: a study using gait analysis and ultrasonography to determine tendon healing* J Vet Med Assoc 39, 349-364
 145. **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
 146. **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

147. **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
148. **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
149. **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.
150. **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
151. **Knutsen G., Engebretsen L., Ludvigsen T.C., Drogset J.O., Grontvedt T., Solheim E., Strand T., Roberts S., Isaksen V., Johansen O.** 2004 *Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee.* The Journal of Bone and Joint Surgery (American) 86, 455-464
152. **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
153. **Koerner J., Nesic D., Romero J.D., Brehm W., Mainil-Varlet P., Grogan S.P.** 2006 *Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells.* Stem Cells 24, 1613-1619
154. **Korobelnik J.F.** 1966 *Autologous platelet concentrate as an adjunct in macular hole healing* Ophthalmology; 103, 590-594
155. **Kumar V., Abbas A.K., Fausto N.** 2005 *Acute and Chronic Inflammation* In Kumar, Abbas e Fausto, *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease.* 7th edition. Ed. Elsevier Saunders 47-86
156. **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
157. **Lam K.H., Parkin T.D.H., Riggs C.M., Morgans K.L.** 2007 *Descriptive analysis of thoroughbred racehorses due to tendon injuries at the Hong Kong Jockey Club (1992-2004)* Equine Veterinary Journal 39,143-148
158. **Landesberg R., Burke A., Pinsky D., Katz R., Vo J. Eisig S.B., Lu H.H.** 2005 *Activation of platelet-rich plasma using thrombin receptor agonist peptide.* J Oral Maxillofac Surg 63, 529-535
159. **Lin T.W., Cardenas L., Soslowsky L.J.** 2004 *Biomechanics of tendon injury and repair* Journal of Biomechanics 37,865-877

160. **Lu L., Yaszemski M.J., Mikos A.G.** 2001 *TGF- β 1 release from biodegradable polymer microparticles: its effects on marrow stromal osteoblast function* J Bone Joint Surg (Am) 83, 82-91
161. **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
162. **Lundquist R., Dziegiel M.H., Agren M.S.** 2008 *Bioactivity and stability of endogenous fibrinogenic factors in platelet-rich fibrin.* Wound Repair and Regeneration 16(3), 356-363
163. **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
164. **Majewski M., Ochsner P.E., Liu F., Flückiger R., Evans C.H., Reinecke J.A.** 2008 *Tendon healing by autologous conditioned serum (irap).* In Atti del 14th ESVOT Congress Munich 10th-14th September 2008 311-312
165. **Man D., Plosker H., and Winland-Brown J. E.** 2001 *The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery* Plast. Reconstr. Surg. 107, 229.
166. **Manes E., Manes C., Cantò L., Erasmo R.** 2005 *Le cellule staminali ed i fattori di accrescimento in ortopedia e traumatologia.* G.I.O.T. 31, 197-205
167. **Manske P.R.** 1988 *Flexor tendon healing* J Hand Surg 1988;13, 237
168. **Martinello T., Bronzini I., Decaminada M., Maccatrozzo L., Perazzi A., Iacopetti I., Mascarello F., 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
169. **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
170. **Marx R.E.** 2004 *Platelet-rich plasma: evidence to support its use* J Oral Maxillofac Surg 62, 489-496
171. **Masoudifard M., Dehghan M.M., Kazemi Mehrjardi H., Baghban Eslaminejad M.R., Sharifi D., Vajhi A.R.** 2008 *Ultrasonographic evaluation of treatment of superficial digital flexor tendinitis with autologous mesenchymal stem cells in horse.* In Atti del 14th ESVOT Congress Munich 10th-14th September 2008 304
172. **Mazzucco L., Balbo V., Cattana E., Guaschino R., Borzini P.** 2008 *Not every PRP-gel is born equal. 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
173. **McCullagh K.G., Goodship A.E., Silver I.A.** 1979 *Tendon Injuries and their treatment in the horse*. Vet Rec 105 (3), 54-57
 174. **McIlwraith C.W.** 2002 *Disease and problems of Tendons, Ligaments and related Structures*. 5th ed Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
 175. **McIntyre T.M., Prescott S.M., Zimmerman G.A., Stafforini D.M.** 2004 *Platelet-activating factor, a pleiotrophic mediator of physiological and pathological processes*. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 146-149
 176. **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
 177. **Messner K., Wei Y., Andersson B., Gillquist J., Rasanen T.** 1999 *Rat model of Achilles tendon disorder. A pilot study*. Cells Tissues Organs 165, 30-39
 178. **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
 179. **Molloy T.J.** 2005 *Gene Expression in Healing Tendon*. PhD thesis, University of South Wales, Sydney, Australia.
 180. **Molloy T., Wang Y., Murrell G.** 2003 *The roles of growth factors in tendon and ligament healing*. Sports Med. 33(5), 381-394
 181. **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
 182. **Monteiro S.** 2008 *Wound cicatrisation and platelet rich plasma*. In Atti del 14th ESVOT Congress Munich 10th-14th September 2008 258-260
 183. **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
 184. **Mortellaro C.M.** 2001 *Dall'età dello sviluppo all'articolazione anziana:inquadramento clinico dell'artrosi*. Innovation in Veterinary Medicine 1(3), 7-9
 185. **Mundy G.D.** 1997 *Review in risk factors associated with racing injuries* Proceedings of the annual convention of the AAEP 1997
 186. **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*. AJVR 58(1)103-109
 187. **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*
188. **Murray M.M., Spindler K.P., Ballard P., Welch T.P., Zurakowski D., Nanney L.B.** 2007 *Enhanced histologic repair in a central wound in the anterior cruciate ligament with a collagen-platelet scaffold. J Orthop Res 137-142*
 189. **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*
 190. **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*
 191. **Muttini A., Mattioli M., Petrizzi L., Varavano V., Sciarrini C., Russo V., Mauro A., Coccolone D., Turriani M., Barboni B.** 2009 *Studio sperimentale sull'allografting di cellule epiteliali amniotiche in lesioni del tendine calcaneale nell'ovino Atti del XVI Congresso Soc. It. Di Chir. Vet (SICV) Parma 18-19 giugno 2009*
 192. **Nyland T.G., Mattoon J.S.** 1995 *Veterinary diagnostic ultrasound* W.B. Saunders Company Philadelphia
 193. **Nixon A.J.** 2008 *Come preparare ed applicare il plasma arricchito di piastrine Atti del XIV Congresso SIVE-FEEVA, Venice (Italy) 332-339*
 194. **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*
 195. **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*
 196. **Nixon A.J., Fortier L.A., Williams J., Mohammed H.** 1999 *Enhanced repair of extensive articular defects by insulin-like growth factor I-laden fibrin composites. Journal of orthopaedic research 17, 475-487*
 197. **Obaid H., Connell D.** 2010 *Cell therapy in tendon disorders: what is the current evidence? Am J Sports Med*
 198. **Ohya M., Yamada Y., Ozawa R., Ito K., Takahashi M., Ueda M.** 2005 *Sinus floor elevation applied tissue-engineered bone. Comparative study between mesenchymal stem cells/platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with PRP complexes in rabbits. Clin. Oral Impl 16, 622-629*
 199. **Oikawa M., Kasashima Y.** 2002 *The Japanese experience with tendonitis in racehorses J. Equine Sci. 13, 41-56*
 200. **Orito K., Koshino T., Saito T.** 2003 *Fibroblast growth factor 2 in synovial fluid from an osteoarthritic knee with cartilage regeneration. J Orthop Sci 8, 294-300*

201. **O'Sullivan C.B.** 2007 *Injuries of the Flexor Tendons: Focus on the Superficial Digital Flexor Tendon* Clinical Techniques in Equine Practice 6, 189-197.
202. **Palmlad J.** 2009 *Platelet and angiogenesis: novel aspects* Expert. Rev. Hematol. 2(1), 1-2
203. **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
204. **Pelagalli G.V., Botte V.** 1999: *Anatomia veterinaria sistematica e comparata*. Milano, Edi.Ermes s.r.l.
205. **Perazzi A., Iacopetti I., Van Ryssen B., Busetto R.:** 2008 *La tecnica artroscopica nelle patologie articolari del gomito del cane*. Atti XII Congresso Soc. It. di Chir. Vet., (S.I.C.V.) Porto Cesareo (LE) 11-12 Giugno 2008 pagg 112-116
206. **Piermattei D.L., Flo G.L., DeCamp C.E.** 2006: *Arthrology, Arthroscopy in joint surgery*. In Handbook of small animal orthopedics and fracture repair. 185-189,233-251 Missouri. Saunders Elsevier
207. **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
208. **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
209. **Prades M.** 2007 *Current trends in OA therapy in horses*. In Atti del SECV Proceedings 2007
210. **Prades M.** 2007 *Current trends in regenerative medicine for soft tissue musculoskeletal injury*. In Atti del SECV Proceedings 2007
211. **Prades M.** 2007 *Platelet rich plasma: a realistic alternative in tissue repair*. In Atti del SECV Proceedings 2007
212. **Radin E.L., Paul I.L.** 1972 *A consolidated concept of joint lubrication*. Journal Bone Joint Surgery 54-A, 607
213. **Ramirez J.U.C.** 2006 *Use of autologous platelet concentrates for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse*. Tesi PHD University of Barcelona
214. **Read R.A.** 1993 *Osteocondrosi ed artrosi del gomito nel cane giovane : incidenza, diagnosi e trattamento*. Waltham International Focus 3(2), 2-10
215. **Reef V.** 1998 *Musculoskeletal Ultrasonography* In Equine diagnostic ultrasound Ed WB Saunders Philadelphia 39- 186.
216. **Rees S.G., Dent C.M., Catterson B.** 2009 *Metabolism of proteoglycans in tendon* Scan J Med Sci Sports 19, 470-478

217. **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
218. **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
219. **Robbins J.R., Evanko S.P., Vogel K.G.** 1997 *Mechanical loading and TGF- β regulate proteoglycan synthesis in tendon* Arch Biochem Biopsy 342, 203-211
220. **Rodkey W.G., McKinney L.A.** 2001: *Struttura, funzione e composizione della cartilagine e della sinovia*. In *Le basi patogenetiche delle malattie chirurgiche nei piccoli animali* Bojrab M.J. 871-879 San Lazzaro di Savena (BO) Cristiano Giraldi Editore
221. **Rosati P., Colombo R.** 1997 *I tessuti* Ermes edizioni, Milano
222. **Rožman P., Bolta Z.** 2007 *Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries*. Acta Dermatoven APA 16(4), 156-165
223. **Russell W.M.S., Burch R.L.** 1959 *The Principles of Human Experimental Technique* UFAW, Wheathampstead
224. **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
225. **Sampson S., gerhardt M., Mandelbaum B.** 2008 *Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review*. Curr Rev Musculoskeletal Med 3, 124-129
226. **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
227. **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
228. **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
229. **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
230. **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
231. **Schaller O.** 1999 *Nomenclatura anatomica veterinaria illustrata* Antonio Delfino Editore

232. **Scheuch B., Whitcomb M.B., Galuppo L., Snyder J., Rose J.** 2000. *Clinical Evaluation of High-Energy Extracorporeal Shock Waves on Equine Orthopedic Injuries*. Proceedings, 20th Annual Meeting of the association for Equine Sports Medicine (AESM), 9th-12th September, New Brunswick, NJ.
233. **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
234. **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
235. **Schulz K.S., Krotscheck U.** 2003 *Displasia del gomito nel cane*. In Trattato di Chirurgia dei piccoli animali, Slatter D. 1927-1951 Roma, Antonio Delfino Editore
236. **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.
237. **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
238. **Sese M.** 2007 *Characteristic of Collagene Fibrils in the Entire Equine Superficial Digital Flexor Tendon* Okajimas Folia Anatomica Japonica 84,111-114
239. **Sharifi D., Abedi G.R., Mousavi G., Sohrabi Haghdoost I., Mortazavi P., Rabiee S.M., Hesaraki S.** 2008 *Repair of segmental bone defect using a complex of calcium phosphate and type I collagen in rabbit radius*. In Atti del 14th ESVOT Congress Munich 10th-14th September 2008 315
240. **Sharma P., Maffulli N.** 2006 *Biology of tendon injury: healing, modelling and remodelling* J musculoskeletal Neuronal Interact 6,181-190
241. **Slater M., Patava J., Kingham K., Mason R.S.** 1995 *Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity*. J Orthop Res 13(5), 655-663
242. **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
243. **Smith R.K.W.** 2004 *Stem cell therapy for tendon and ligament injuries-Clinical results* In Proceedings 12 ESVOT Congress, Munich, 187-189
244. **Smith R.K.W.** 2008 *Mesenchymal stem cell for equine tendinopathy* Disability and Rehabilitation 30, 1752-1758
245. **Smith R.K.W.** 2008 *Tendon and Ligament Injury* In Proceedings of the Annual Convention of the AAEP. San Diego, CA, USA, 475-501

246. **Smith R.K.W., Korda M., Blunn G.W., Goodship A.E.** 2003 *Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment* Equine Vet J 35, 99-102
247. **Smith J.J., Ross M.W., Smith R.K.** 2006 *Anabolic effects of acellular bone marrow, platelet rich plasma and serum on equine suspensory ligament fibroblasts in vitro.* Vet Comp Orthop Traumatol 19(1), 43-47
248. **Smith R.K.W., Webbon P.M.** 1996 *The physiology of normal tendon and ligament In The equine athlete: tendon, ligament and soft tissue injuries.* Proceedings Dubai International Equine Symposium , 55-82
249. **Smith R.K.W., Zunino L., Webbon P.M., Heinegard D.** 1997 *The Distribution of Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) in Tendon and Its Variation with Tendon Site, Age and Load* Matrix Biology 16,255-271
250. **Södersten F., Ekman S., Eloranta M.L., Heinegård D., Dudhia J., Hulthenby K.** 2005 *Ultrastructural immunolocalization of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in relation to collagen fibrils in the equine tendon* Matrix Biology 24, 376-385
251. **Spinabella S.** 2007 *Impiego delle cellule staminali nelle lesioni tenolegamentose del cavallo.* Tesi di dottorato di ricerca, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Pisa.
252. **Spinabella S., Carlucci F.** 2004 *La tenite del cavallo: recenti acquisizioni, prospettive future.* Annali della Facoltà di Medicina veterinaria, Università di Pisa: 163-170.
253. **Spindler K.P., Imro A.K., Mayes C.E., Davidson J.M** 1996 *Patellar Tendon and Anterior Cruciate Ligament Have Different Mitogenic Responses to Platelet-Derived Growth Factor and Transforming Growth Factor β* Journal of Orthopaedic Research 14, 542-546
254. **Stashak T.** 1990 *Diagnosi di zoppicatura* In Stashak T. *Adams', La zoppicatura nei cavalli.* Quarta edizione. Edizioni SBM, 100-156
255. **Stokol T.** 2000 *Disordini della funzionalità piastrinica* In Day H.J., Mackin A., Littlewood J.D. *Ematologia e medicina trasfusionale del cane e del gatto* 205-217 UTET, Torino, Italy
256. **Stolinski C.** 1995 *Disposition of collagen fibrils in human tendons.* J Anat. 186, 577-83
257. **Strocchi R., De Pasquale V., Guizzardi S., Govoni P., Facchini A., Raspanti M., Girolami M., Giannini S.** 1991 *Human Achilles tendon: morphological and morphometric variations as a function of age.* Foot Ankle 2, 100-104
258. **Stromberg B., Tufvesson G.** 1969 *Lesion of the superficial flexo tendon in race horses: a microangiographic and histopathologic study* J Am Vet Med Assoc 164, 57-59
259. **Summers K.L., O'Donnell J.L., Heiser A., Highton J., Hart D.N.J.** 1999 *Synovial fluid transforming growth factor β inhibits dendritic cell-t lymphocyte interactions in patients with chronic arthritis.* Arthritis and Rheumatism 42(3), 507-518

260. **Sutter W.** 2008 *Platelet-rich plasma: an aid to soft tissue healing* Newswire of Edmonton Equine Veterinary Service
261. **Sutter W.W., Kaneps A.J., Bertone A.L.** 2004 *Comparison of hematologic values and transforming growth factor- β and insulin-like growth factor concentrations in platelet concentrates obtained by use of buffy coat and apheresis methods from equine blood.* AVJR 65(7), 924-930
262. **Taylor S.D., Honnas C.M., Pascoe J.R., Hoffman A.G.** 1997 *Il trattamento delle lacerazioni dei tendini flessori nel cavallo* Ippologia 3, 61-67
263. **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
264. **Theoret C.L.** 2006 *What's new and innovative in wound management: problems and solutions.* In Atti del 52th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners 2006 San Antonio, TX, USA
265. **Theoret C.L.** 2008 *The place of tissue engineering in wound repair. The 3 "R"s: repair, replace, regenerate.* In Atti del 14th ESVOT Congress Munich 10th-14th September 2008 8-10
266. **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
267. **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
268. **Tözüm T.F., Demiralp B.** 2003 *Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry.* Journal of the Canadian Dental Association 69(10), 664
269. **Trindade-Suedam I.K., Leite F.R.M., de Morais 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
270. **Trippel S.B., Mankin H.J.** 2001 *Riparazione della cartilagine articolare.* In Le basi patogenetiche delle malattie chirurgiche nei piccoli animali Bojrab M.J. 955-973 San Lazzaro di Savena (BO) Cristiano Giraldi Editore
271. **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
272. **Vidal M.A., Kilroy G.E., Lopez M.J., Johnson J.R., Moore R.M., Gimble J.M.** 2007 *Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells.* Veterinary Surgery 36, 613-622
273. **Vidal M.A., Robinson S.O., Lopez M.J., Paulsen D.B., Borkhsenius 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
274. **Vigliani A., Boniperti E., Scudo E., Vairo S.** 2005 *Valutazione statistica ed ecografica delle lesioni a carico del tendine flessore superficiale delle falangi, in 190 cavalli da corsa* Ippologia 16, 9-14
275. **Virchenko O., Fahlgren A., Rundgren M., Aspenberg P.** 2008 *Early Achilles tendon healing in sheep* Arch Orthop Trauma Surg 128, 1001-1006
276. **Virchenko O., Grenegard M., Aspenberg P.** 2006 *Independent and additive stimulation of tendon repair by thrombin and platelets.* Acta Orthopaedica 77(6), 960-966
277. **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
278. **Von der Mark K.** 1981 *Localization of collagen types in tissue* Int Rev Connect Tissue Res 9, 265-324
279. **Wang J.H.C.** 2006 *Mechanobiology of tendon* Journal of Biomechanics 39, 1563-1582
280. **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
281. **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
282. **Webbon P.M.** 1978 *A histological study of macroscopically normal equine digital flexor tendons* Equine Vet J 10, 253-259.
283. **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
284. **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
285. **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
286. **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

287. **Weiler A. et al** 2006 *The influence of locally applied platelet-derived growth factor-BB on free tendon graft remodelling after anterior cruciate ligament reconstruction.* American Journal of Sports Medicine 32, 881-891
288. **Weiner L.J., Peacock E.E. Jr.** 1971 *Biologic principles affecting repair of flexor tendons* Adv Surg. 5, 145-88
289. **Williams R.B., Harkns L.S., Hammond C.J., Wood L.N.** 2001 *Racehorse injuries, clinical problems and fatalities recorded on British racecourses from flat racing and National Hunt racing during 1996, 1997 and 1998* Equine Veterinary Journal 33, 478-486
290. **Williams I.F., Heaton A, McCullagh K.G.** 1980 *Cell morphology and collagen types in equine tendon scar* Res Vet Sci 28, 302-310
291. **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
292. **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
293. **Woodell-May J.E., Pietzrak W.S.** 2006 *Platelet-rich plasma in orthopedics* Orthopedic Biology and Medicine 547-558
294. **Woodell-May J.E., Ridderman D.N., Swift M.J., Higgins J.** 2005 *Producing accurate platelet counts for platelet rich plasma: validation of a hematology analyzer and preparation techniques for counting.* Journal of Craniofacial Surgery accepted 24th January 2005
295. **Wrotniak M., Bielecki T., Gazdik T.S.** 2007 *Current opinion about using the platelet-rich gel in orthopaedics and trauma surgery.* Ortop Traumatol Rehabil 9(3), 227-238
296. **Wu W., Chen F., Liu Y., Ma Q., Mao T.** 2007 *Autologous injectable tissue-engineered cartilage by using platelet-rich plasma: experimental study in a rabbit model.* J Oral Maxillofac Surg 65(10)1951-1957
297. **Yasuda K.** 2004 *The effect of growth factors on biomechanical properties of the bone-patellar tendon-bone graft after anterior cruciate ligament reconstruction.* American Journal of Sports Medicine 32, 870-880
298. **Young N.J.** 2009 *Maturation alterations in gap junctions expression and associated collagen synthesis in response to tendon function* Matrix biology 28, 311-323
299. **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
300. **Zamprogn H., Lopez P.C.M., Oliveira A.L.A., Balduino A., Fernandes M.B., Duarte M.E.L.** 2008 *The use of bone marrow stromal cells to treat bone defects in dogs.* In Atti del 14th ESVOT Congress Munich 10th-14th September 2008 328

301. **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
302. **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

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI TRATTI DA INTERNET

303. **Fortier L.A.** 2008 *Platelet Rich Plasma (PRP): background and significance in musculoskeletal regeneration* <http://www.michvma.org/documents/MVC>
304. **Prades M., Abellanet I., Carmona J.U.** 2008 *Platelet rich plasma: a realistic alternative in tissue repair* <http://minnie.uab.es/~veteri>
305. **URL:** <http://www.xenome.eu>

Un sincero ringraziamento per la collaborazione e la disponibilità dimostratemi alla Prof.ssa Jacopetti ed a tutto il Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie di Padova, al Prof. Patrucco, alla dott.ssa Martinello ed alla dott.ssa Bronzini, al dott. Chiades, al dott. Cornali, alla dott.ssa Assirelli ed alla dott.ssa Carlin, alla Prof.ssa Festoni ed alla dott.ssa Dalla Pria, all'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna. Si ringrazia inoltre il Prof. Busetto in qualità di Direttore del Dipartimento di Scienze Cliniche di Padova