

*Didier Serteyn*

*Clinica equina, Università di Liegi, Belgio*

Lo scopo di questa presentazione è di spiegare l'uso attuale della terapia cellulare nella medicina equina: cellule staminali e piastrine arricchite con plasma (PRP).

Dei 60 milioni di cavalli presenti a livello mondiale, più di un milione sono utilizzati nelle corse e più di 2.5 milioni in competizioni quali: endurance, eventing, dressage e salto ostacoli.

Nella medicina equina le lesioni del sistema locomotorio sono la principale causa di intolleranza nell'esercizio fisico. Le principali patologie riscontrate sono le tendinopatie (specialmente in cavalli da corsa), osteocondriti delle articolazioni e malattie degenerative delle articolazioni, comuni nel salto ad ostacoli e nel dressage.

Nei cavalli il volume della muscolatura è localizzato ove si riduce il peso distale degli arti, in modo da rendere più efficaci la protrazione articolare e la locomozione: si hanno così un lungo tendine come il tendine flessore superficiale digitale, il tendine flessore profondo e il legamento sospensorio.

Inoltre il cavallo è dotato di un' articolazione falangea iper-estesa del metacarpo, che permette ai lunghi tendini, situati sull'aspetto palmare dell'arto, di sopportare notevoli carichi di peso. Tutti i tendini sostenenti il peso sono in grado di assorbire, e rilasciare energia elastica durante le svariate fasi del passo. Così facendo, contribuiscono a un'alta efficienza nella locomozione, e fungono da ammortizzatori per gli arti.

Gli stiramenti massimi nei tendini flessori superficiali digitali dei cavalli sono stati registrati al 16% durante il galoppo dei purosangue. Gli stiramenti misurati ex vivo indicano, che il limite nello stesso tendine è tra il 10 e il 20%: il tendine è quindi prossimo ai suoi limiti funzionali.

L'incidenza annuale delle tendinopatie è del 25% nei cavalli da corsa e del 15% in cavalli da competizione, riportando un dato di più di 600 000 casi nel mondo su base annua.

Secondo le stime di allenatori e veterinari il 70/80% dei cavalli con tendinopatie ritorna al lavoro dopo 12/15 mesi di normali terapie. Il ripetersi della patologia colpisce il 35/45% degli animali trattati, e pochi esemplari ritornano alle prestazioni in atto prima della malattia: tale prognosi è dovuta essenzialmente al processo di guarigione dopo la ferita.

La diagnosi di tendinopatia è relativamente semplice nella maggior parte dei casi: dopo aver localizzato la lesione, la gravità della stessa viene stimata dall'ecografia.

Una ferita acuta comporta una pronunciata reazione infiammatoria della durata di pochi giorni. Attraverso fattori di crescita e il rilascio delle citochine, attivati da macrofagi e trombociti, si ottiene un responso chemiotattico e proliferativo nei fibroblasti, e viene incoraggiata la sintesi di collagene, di tipi I, III e V favorendo la formazione del tessuto sulla ferita.

La natura meccanica del tendine curato è tuttavia ancora scarsa a causa di una carente strutturazione e della composizione della matrice. Un' importante quantità di tessuto fibroso si posa all'interno e attorno al tendine, allargandolo, ma conferendo pure una maggiore rigidità strutturale.

Di conseguenza l'aumentata rigidità riduce l'efficienza del tendine a livello elastico, e compromette le prestazioni del cavallo. Il completamento della cicatrizzazione del tessuto fibroso impiega un lungo lasso di tempo (da 1 a 3 anni), ma il tendine non è in grado di recuperare le sue precedenti proprietà meccaniche: ciò spiega la vasta incidenza di ricadute.

Negli anni sono state sperimentate numerose modalità di trattamento, ma la maggior parte di esse hanno causato effetti equivoci e deleteri sulla guarigione del tendine. Vi sono svariati trattamenti disponibili, ma essi non consentono un completo recupero. Tuttavia i suddetti trattamenti godono almeno di un fondamento logico per la cura della tendinopatia del tendine flessore digitale.

La necessità primaria, al fine di recuperare interamente la funzionalità del tendine, è nello sviluppo di strategie rigenerative, facendo progressi in tale direzione. In merito alla terapia matrix si sono sviluppati solo risultati preliminari, disponibili riguardo l'iniezione intra-lesionale di un modificato sulfato sintetico eparino.

Le piastrine arricchite con plasma (PRP) sono una fonte autologa di fattori di crescita, e il PRP sta diventando con costante frequenza un metodo utile al trattamento delle ferite di tendini e legamenti. Le cellule staminali hanno la potenzialità di differenziarsi in un numero di tessuti.

Ogni tessuto ha una nicchia di cellule staminali, e in caso di lesioni sotto l'influenza di svariati fattori, le cellule cominciano a differenziarsi e proliferare, al fine di cicatrizzare il tessuto o l'organo.

In campo oncologico un disordine nella differenziazione di cellule staminali è ora considerato come un punto importante nella fase iniziale dello sviluppo del cancro.

Esistono due modalità terapeutiche: con midollo osseo e con tessuti adiposi.

Le cellule staminali embrioniche sono pluripotenti, ma con lo svantaggio di essere associate alla formazione del teratoma. Le cellule staminali derivate postnatali sono multipotenti, e sono sottodivise in cellule ematopoietiche (HSC) e in cellule mesenchimali (MSC). Tali cellule staminali

vengono facilmente recuperate in prevalenza dal midollo osseo, nonostante addetti al settore considerino l'uso di cellule staminali estratte dal grasso.

Cellule staminali ematopoietiche (HSC) e relative progenie nel midollo osseo popolano la nicchia vascolare, che è circondata da cellule stromali, derivate da MSC. Cellule mesenchimali (MSC) con vere cellule staminali fanno parte dello stroma, mentre MSC con cellule osteoprogenitrici risiedono nella nicchia osteoblastica.

Le cellule staminali mesenchimali (MSC), presenti nel midollo osseo adulto sono multipotenti, ed hanno un' ampia capacità di proliferazione. Si possono differenziare in lignaggi multipli quali tenociti, osteociti, condrociti, fibroblasti, adipociti, astrociti e miociti.

Il potenziale interesse in sviluppi terapeutici è perciò evidente.

Tuttavia non è ancora ben chiaro, se sia più opportuno compiere un autotrapianto con cellule staminali differenziate, oppure iniziare la differenziazione in laboratorio prima della reiniezione. In medicina umana si preferisce utilizzare cellule differenziate, al fine di evitare rischi di tumore.

Numerosi centri di ricerca e aziende hanno sviluppato molte procedure per iniziare la differenziazione, e le prime applicazioni cliniche sono per esempio ora disponibili in cardiologia (cardio 3). Al momento si è sviluppato un grande interesse generale sull' uso delle cellule staminali per la formazione di nuovi tessuti: biopolimeri ricoperti con cellule staminali, parzialmente differenziate, sono utilizzati per la ricostruzione di ossa e cartilagine.

La gestione diretta intralesionale del midollo osseo è stata presentata dal Dr. Hertel per mostrare promettenti risultati nel trattamento di 100 cavalli, affetti da lesioni al legamento sospensorio. Tuttavia nell' aspirazione del midollo osseo vi sono alcune MSC mescolate ad altri tipi di cellule. Ciò potrebbe essere potenzialmente pericoloso per la guarigione del tendine o del legamento, in modo particolare a causa della calcificazione ectopica indotta.

La seconda tecnica consiste nel raccogliere il grasso dal capo della coda, smaltendo il tessuto, e rimuovendo le cellule grasse. Questo processo porta a una miscela di cellule, tra le quali anche le cellule staminali adipose-derivate (+/-2%), le quali vengono riconsegnate al veterinario senza ulteriore purificazione per essere iniettate intra-tendine.

La terza tecnica sviluppata dal Dr. Smith e i suoi collaboratori prevede il raccoglimento del midollo osseo, seguito dall' isolamento e dall' espansione in laboratorio del gruppo cellulare nucleato aderente. Dopo tre settimane più di dieci milioni di cellule sono pronte per essere impiantate. Le cellule sono sospese sulla superficie del midollo osseo, contenenti una miscelanza di elementi di crescita; successivamente vengono impiantate al centro del tendine.

## Uso della terapia cellulare nelle patologie equine

---

La prima pubblicazione riguardo l'uso di cellule staminali mesenchimali per il trattamento di tendinopatie in clinica equina è del Dr. Smith, e risale al 2003.

La terapia con cellule staminali viene ora proposta da numerose aziende per il mercato dei cavalli da corsa: le più importanti sono senz'altro Vet Stem e Vet Cell.

Le biopsie sul grasso e le cellule del midollo osseo vengono quindi campionate; le cellule staminali mesenchimali vengono estratte, spedite alle aziende di riferimento per essere arricchite, e pochi giorni dopo iniettate nel tendine danneggiato. Il risultato pare essere buono, ma resta controverso, poiché nessun esperimento clinico in doppio cieco è stato finora documentato. Tuttavia il Dr. Smith ha annunciato una significativa riduzione di ricadute (< del 20%) in cavalli sottoposti ad allenamento pieno in un periodo di più di un anno, su un numero maggiore di 500 cavalli.

In collaborazione con RegenLab e BiopTis abbiamo sviluppato recentemente due kit specifici per PRP equina e raccolta di cellule mononucleari da midollo osseo, comprendenti naturalmente cellule staminali mesenchimali.

L'aspirazione del midollo osseo viene compiuta grazie ad un'operazione di puntura della seconda o terza sternebra. Questa procedura viene realizzata dopo sedazione su cavalli eretti, oppure su cavalli anestetizzati in fase di intervento. Si utilizzano specifiche provette anticoagulanti, 3 o 4, contenenti ciascuna 6 ml di midollo osseo.

Le provette vengono centrifugate, e le cellule mononucleari del midollo osseo, contenenti le cellule staminali vengono quindi raccolte. A seconda delle diverse procedure cliniche, le cellule sono reiniettate direttamente nella parte colpita dopo l'attivazione attraverso il calcio. In alcuni casi il midollo osseo restante viene consegnato al laboratorio, in modo da essere isolato, e coltivare cellule staminali mesenchimali per una successiva iniezione.

L'uso di attivate cellule nucleari del midollo osseo con calcio, in caso di profonde lesioni subacute o croniche, è da effettuarsi nel nucleo del tendine: l'esatta posizione dell'ago viene verificata con l'ausilio dell'ecografia.

I protocolli di centrifugazione e le specifiche provette sviluppate da Regenlab consentono di eliminare i globuli rossi e i granulociti, e di conservare le cellule mononucleari, comprendenti le MSC chiaramente identificabili, quando gli anticorpi equini specifici sono disponibili.

Vorrei a tal proposito citare un particolare esempio con l'uso della coltura di midollo osseo (BMC) su un cavallo delle Ardenne, affetto da una severa tendinopatia cronica del tendine flessore digitale. Si è riscontrata una tipica lesione del nucleo: immediatamente dopo l'iniezione delle cellule all'interno della lesione è stato possibile rilevare una modificata ecogenicità.

Due cavalli, uno dal dressage e il secondo dal salto ad ostacoli, sono stati presentati alla nostra clinica a causa di severe lesioni del tendine flessore digitale superficiale (SDFT), estremamente dolorose, coinvolgendo tutto il tendine. Le BMC sono state iniettate sull'intera lunghezza del tendine; l'immobilizzazione è stata ottenuta con bendaggi "Robert Jones" nel corso di 6 settimane. L'esercizio dei cavalli è stato monitorato in un lasso di tempo pari a un anno, e i cavalli si sono esercitati leggermente fino ad oggi senza nessun accenno ad andatura zoppicante. Dall'esame ecografico, effettuato un anno dopo l'iniezione delle cellule staminali, si osserva chiaramente un SDFT con diametro più largo, ma sorprendentemente una buona struttura del tessuto. Tuttavia sul cavallo da salto si nota una leggera ritrazione del tendine.

Le piastrine arricchite sono considerate una ricca fonte autologa di molti elementi di crescita. Quando le piastrine vengono attivate da calcio o trombina, rilasciano numerosi elementi di crescita come TGF B, ...

A proposito dell'uso di PRP in tendinopatie e desmopatie, il Dr. Schnabel e i suoi collaboratori hanno evidenziato, che le piastrine arricchite migliorano la composizione genetica anabolica del flessore superficiale del tendine.

I primi piccoli esperimenti sono stati riportati dal Dr. Wasselau nel 2008, ed hanno mostrato effetti positivi. Le piastrine arricchite sono state usate per trattare una desmopatia del legamento sospensorio su 9 cavalli, e una patologia delle articolazioni su 7 cavalli.

Recentemente due esami hanno portato alla luce risultati molto promettenti: il primo esame, attraverso l'individuazione ultrasonografica, ha mostrato evidenti differenze tra animali trattati con PRP e altri trattati con placebo (Bosch et al. 2009). Si è quindi raggiunta la conclusione, che il trattamento con PRP mostra un aumento dell'attività metabolica e uno sviluppo nella riparazione dei tessuti, a differenza di lesioni indotte del tendine non trattate, a testimonianza del fatto che PRP risulta benefico in questo tipo di lesioni (Bosch et al. 2010).

Alcuni campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena giugulare e immessi in provette BCT: dopo la centrifugazione (8 min. a 1500 g) sono state raccolte PRP, e successivamente preparate per un'immediata iniezione, o alternativamente attivate con calcio. Con questa procedura è possibile ottenere una concentrazione di piastrine da 2 a 6 volte più elevata, e maggiori elementi di crescita rispetto al sangue intero (200-600 000 piastrine/mm<sup>3</sup>).

Vorrei ora presentare alcuni risultati di un esperimento clinico su desmiti dei legamenti sospensori. Con un costante monitoraggio della patologia si sono ottenuti interessanti risultati grazie all'uso della terapia onda d'urto. Il 41% dei cavalli zoppicanti nelle zampe posteriori e il 53% con zoppicatura anteriore sono tornati al lavoro in perfette condizioni fisiche sei mesi dopo la diagnosi

del problema. La prognosi è stata significativamente influenzata dal livello ultrasonografico della diagnosi e dall' evidenza ultrasonografica della risoluzione della lesione sulle zampe posteriori.

Per ciò che concerne il secondo esperimento il Dr. Lischer e i suoi collaboratori hanno evidenziato, che la prognosi, per un ritorno all' attività sei mesi dopo la diagnosi, può essere migliorata grazie all' uso della terapia onde d' urto (ESWT) e di uno specifico programma di esercizio. Dopo avere associato ESWT e PRP abbiamo ora presso la nostra clinica dati su 22 cavalli, monitorati in un lasso di tempo di sei mesi dopo il trattamento. 16 cavalli su 22 sono tornati in un perfetto stato di salute.

Un secondo dominio applicabile alla terapia rigenerativa è costituito dalle patologie delle articolazioni.

Le patologie degenerative delle articolazioni, anche dette osteoartriti, sono molto frequenti sui cavalli, e causate da un'eccessiva attività dell' animale o da traumi ripetuti nel tempo: come nella medicina umana, tale patologia si sviluppa con intensa frequenza su soggetti adulti.

Il limitato potenziale della cartilagine articolare nel processo di rigenerazione è ormai noto da due secoli a questa parte. E' risultato evidente, che i difetti presenti nella consistenza della cartilagine sono curabili con tessuti fibrosi, i quali possono subire o meno un processo di metaplasia al fine di diventare fibrocartilagine con proprietà biochimiche inferiori a quelle della cartilagine ialina articolare.

I risultati di questo studio hanno indicato un netto miglioramento clinico ed istologico in articolazioni affette da osteoartrite su cavalli sottoposti a trattamento ACS, in confronto al trattamento placebo.

Inoltre il Dr. Weiberger ha riportato buoni risultati anche su cavalli affetti da patologie degenerative delle articolazioni.

Risultati di esperimenti con l' uso di cellule staminali, condotti dal Dr. Frisbie e i suoi collaboratori sono più che incoraggianti. E' stato notato un notevole miglioramento nell' uso di cellule staminali mesenchimali derivate da midollo osseo, in confronto alla frazione stromo-vascolare di derivazione adiposa e al trattamento placebo. Tuttavia i risultati di questi studi non sono ancora sufficientemente significativi per raccomandare l' uso delle cellule staminali nel trattamento delle osteoartriti.

Ulteriori patologie equine sono la degenerazione sinoviale; leggera alterazione della superficie cartilaginea con moderata infiammazione; inizio di erosione della cartilagine e completo deterioramento della cartilagine ialina. Non vi è alcun dubbio, che sia necessario sviluppare terapie rigeneranti per la cura delle suddette patologie.

Prima di utilizzare PRP o BMC in clinica, abbiamo sperimentato le terapie in oggetto su 3 cavalli affetti da una severa bilaterale osteoartrite irreversibile delle articolazioni interfalangee. Abbiamo quindi potuto notare, che con PRP è immediatamente diminuita la zoppicatura per un periodo da 3 a 6 settimane, mentre la somministrazione di BMC ha prodotto un aumento della zoppicatura nei primi 3 giorni e un lieve miglioramento della stessa nelle 3 settimane successive. E' per questo motivo, che utilizziamo PRP in cavalli affetti da patologie degenerative delle articolazioni: più di 20 cavalli colpiti da severe osteoartriti fanno parte di questo studio clinico. I primi risultati paiono soddisfacenti in particolare su cavalli affetti da artropatia femorale-tibiale. Considerati i positivi effetti antiinfiammatori e analgesici riscontrati su cavalli malati di artropatia, abbiamo deciso di utilizzare PRP dopo avere individuato un difetto di cartilagine attraverso l' artroscopia.

Fino ad oggi più di 36 cavalli affetti da osteocondrosi sono stati sottoposti a PRP al termine dell' intervento: risultati clinici hanno evidenziato una riduzione del dolore postoperatorio, del gonfiore dell' osso, nessuna complicazione è stata registrata, avendo così un' eccellente evoluzione clinica nel corso della prima settimana. Tuttavia non abbiamo a disposizione un gruppo placebo per confermare queste osservazioni cliniche.

Esistono inoltre ulteriori applicazioni nella medicina equina, che hanno mostrato interessanti risultati nella guarigione di ferite: fra queste possiamo citare il trattamento di infezioni oculari e di ulcere corneali.