

TRATTAMENTO DELLE LESIONI TENDINEE E LEGAMENTOSE NEL CAVALLO MEDIANTE TRAPIANTO AUTOLOGO DI CELLULE MONONUCLEATE DI MIDOLLO OSSEO (BMMNCs)

BONE MARROW MONONUCLEATED CELLS (BMMNCs) FOR TREATMENT OF TENDON AND LIGAMENT INJURIES IN THE HORSE

LUCA LACITIGNOLA¹, DVM, PhD, Professore Aggregato - EDDA FRANCIOSO²
ANTONIO CROVACE², DVM, Professore Ordinario

¹ Dipartimento delle Scienze Cliniche Veterinarie, Sezione di Chirurgia Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria,
Università degli Studi di Teramo, Viale Crispi 212, 64100 Teramo, Italy

² Dipartimento dell'Emergenza e dei Trapianti di Organi (D.E.T.O.), Sezione di Chirurgia Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria,
Università degli Studi di Bari, s.p. per Casamassima Km 3, 70010 Valenzano, Bari, Italy

Riassunto

Il Trapianto autologo di cellule mononucleate di midollo osseo (BMMNCs) è stato utilizzato in casi di tenite spontanea dei tendini flessori e desmiste del legamento sospensore del nodello di cavallo. Sono stati prelevati aspirati midollari dal tuber coxae. Il midollo è stato stratificato in Biocoll separating solution (Ficoll) per separare il campione di BMMNCs. Il pellet è stato addizionato al fibrinogeno ed inoculato direttamente all'interno della lesione sotto guida ecografica. Sono stati effettuati controlli clinici ed ecografici mediamente per 90 settimane post trapianto. In tutti è stato verificato un notevole miglioramento clinico ed ecografico delle lesioni trattate con rientro in piena attività agonistica nel 65% dei casi trattati e senza osservare alcuna complicazione a breve o lungo termine. Il tasso di recidive è stato attestato al 38%. Clinicamente la rigenerazione del tessuto tendineo è stata soddisfacente, confermata anche da risultati istologici e immunostochimici di studi precedenti.

Summary

Autologous Bone Marrow Mononucleated cells graft has been employed in treatment of spontaneous of equine flexor tendons and suspensory ligament.

Bone Marrow has been harvested from tuber coxae and centrifuged in Biocoll separating solution (Ficoll) in order to separate buffy coat from BM samples. Then, cells have been suspended in adequate volume of fibrinogen and injected into the lesion under ultrasonographic control, small amount of thrombin was injected to clot the suspension.

Ultrasound follow-up has been performed meanly for 90 weeks after treatment. Clinical results showed that 65% of treated horses return to races. Re-injury rate was 38%. Results showed that the use of BMMNCs for repairing the tendon and ligament injuries offers a good technique to regenerate their tissue. Clinical outcome was judged good considering the quality of the regenerated tissue, also confirmed by histological and immunohistochemical confirmed in previous studies.

INTRODUZIONE

Le tendiniti sono considerate lesioni che hanno un considerevole impatto sulle performance atletiche, particolarmente nel cavallo sportivo, in cui il disturbo funzionale può perdurare per mesi e compromette spesso la

carriera agonistica anche a dispetto di adeguate terapie (Sharma & Maffulli, 2005, Smith & Webbon, 2005). Da alcuni anni, messe da parte alcune delle terapie tradizionali, sono state poste in atto delle ricerche volte a migliorare sia i tipi sia le caratteristiche della guarigione, facendo ricorso alle cellule Staminali Mesenchimali

(MSCs) che ad oggi mostrano risultati simili a quelli ottenuti da numerosi autori nella terapia delle strutture muscolo scheletriche, soprattutto dell'osso e del cuore (Awad et al., 1999, Awad et al., 2000, Awad et al., 2003, Banfi et al., 2000, Fortier, 2005, Ouyang et al., 2004, Young et al., 1998).

L'impiego di midollo osseo (MO) in toto è stato descritto per la prima volta da Hertel, che ottenne l'84% di successi, in termini di ritorno all'attività agonistica, rispetto al 15% osservato con il trattamento conservativo (Hertel, 2001, Hertel, 2003). Altri autori hanno, impiegato il trapianto autologo di MO per il trattamento delle tendiniti del tendine flessore superficiale delle falangi (TFSS) associato alla desmotomia della briglia radiale, ottenendo dei buoni risultati clinici (Muttini et al., 2004). I detrattori di questa tecnica però fanno osservare che, a fronte dell'iniezione di grandi volumi di MO, solo una piccola quantità di MSCs viene realmente iniettata. Inoltre l'iniezione di grandi volumi può distruggere il restante tessuto tendineo sano (Smith & Webbon, 2005).

Recentemente da Smith e coll. è stata proposta come terapia delle teniti il trapianto autologo di MSCs coltivate (Smith et al., 2003, Smith, 2004, Smith, 2006, Smith & Webbon, 2005, Richardson et al., 2007). Nonostante i promettenti risultati, anche questa tecnica possiede alcuni svantaggi che ne limitano la diffusione su vasta scala, che sono rappresentati principalmente dagli alti costi e dalla necessità di disporre di laboratori attrezzati necessari alla coltivazione delle MSCs. Nell'impiego di questa tecnica vanno anche considerati altri fattori quali l'intervallo di tempo tra il prelievo e l'impianto delle cellule coltivate e, fatto non sottovalutabile, che le MSCs coltivate in vitro, dopo la confluenza in piastre di coltivazione, perdono in gran parte le loro capacità replicative (Bianchi et al., 2001, Bianchi et al., 2003, Cancedda et al., 2003). A suffragio di questa tesi vanno le esperienze di altri autori che nello studio della rigenerazione dell'osso hanno dimostrato che in seguito alla coltivazione in-vitro, l'efficienza di formazione dell'osso in vivo è più bassa rispetto al MO (Bianchi et al., 2001, Bianchi et al., 2003, Cancedda et al., 2003). Questa perdita in vivo del potenziale di differenziazione (plasticità) dopo l'espansione in vitro, limita drasticamente l'impiego delle MSCs coltivate per scopi terapeutici (Bianchi et al., 2003).

Le cellule mononucleate di midollo osseo (Bone Marrow Mononucleated Cells, BMMNCs), possono rappresentare una fonte alternativa per ottenere MSCs. Il loro uso è stato descritto nell'infarto del miocardio, nella ricostruzione di perdite di sostanza ossea e nel danno ischemico muscolare (Tateishi-Yuyama et al., 2002; Tse et al., 2003; Crovace et al., 2004a; Crovace et al., 2004b Blatt et al., 2005, Cho et al., 2005, Hisatome et al., 2005, Ryu et al., 2005).

L'idea del trapianto autologo delle BMMNCs è basata sul concetto che le MSCs presenti tra le cellule mononucleate del midollo possono essere separate ex-vivo in laboratorio (allontanando eritrociti, piastrine ed altre componenti midollari indesiderate), concentrate in un piccolo volume e trapiantate immediatamente nel tessuto danneggiato del paziente. Qui il microambiente (matrice extracellulare, tenociti, fattori di crescita locali e forze biomeccaniche) stimolerà la loro replicazione e differenziazione in cellule specializzate. Questo metodo non richiede, quindi,

coltivazione cellulare, ed è privo di rischi da immunoreazione in quanto autotrapianto.

Partendo da risultati istologici e immunoistochimici ottenuti in un modello sperimentale di tendinite collagenasi indotta nel cavallo (Crovace et al., 2006) abbiamo voluto effettuare prove cliniche con lo scopo di verificare l'efficacia clinica del trapianto autologo di BMMNCs in casi di lesioni spontanee dell'apparato tendineo e legamentoso in cavalli sportivi.

MATERIALI E METODI

Caratteristiche del campione

Dei soggetti condotti a visita presso la sezione di Chirurgia veterinaria dell'ospedale veterinario Universitario dal gennaio '05 al gennaio '08, riferiti per zoppia causata da tendinopatie/desmopatie dei tendini flessori superficiale (TFSS), profondo delle falangi (TFPF) e del legamento sospensore del nodello (LSN) sono stati inclusi nello studio 19 cavalli, 9 da salto e 10 trottatori, 6 femmine, 9 castroni e 4 stalloni di età compresa da 2 a 8 anni, regolarmente allenati per l'attività agonistica. Sono stati esclusi dallo studio i soggetti che presentavano o una lesione cronica, o sottoposta a trattamenti revulsivi/focatura, o con un interessamento maggiore del 70% della lunghezza del tendine.

L'esame clinico evidenziava segni tipici delle teniti acute: tumefazione della regione dei flessori e dolorabilità alla palpazione dei tendini interessati dalla lesione; in anamnesi i soggetti mostravano zoppia mediamente di grado 2/5.

Tra i soggetti selezionati 3 mostravano tenite bilaterale e 16 monolaterale; sono stati trattati quindi un totale di 22 tendini, di cui 16 TFSS, 1 TFPF, 3 Branche del LSN e 2 inserzioni prossimali del LSN.

Il follow-up medio è stato di 90 settimane, quello più lungo di 161 settimane.

La percentuale di recidive (R) è stata calcolata considerando tendinopatie/desmopatie ripresentate a carico dello stesso tendine trattato.

Caratteristiche ecografiche delle lesioni

L'esame ecografico è stato eseguito con sonda lineare da 7,5 MHz collegata ad un apparecchio ecografico GE alfa-100 sostituito in seguito da un ecografo GE LS400 con sonda lineare 11 MHz. Nella valutazione delle lesioni sono state considerate: il rapporto percentuale tra la "Cross Sectional Area della lesione in rapporto alla CSA totale del tendine"; il "Fiber Pattern Score" (FPS), punteggio attribuito secondo il grado di disgregazione delle fibre in una scansione longitudinale del tendine: > 75%, 0; 50÷75%, 1; 25÷50%, 2; < 25%, 3; L'"Echo Score" (ES) punteggio che viene attribuito alla lesione in base alla ecogenicità della lesione in una scansione trasversale del tendine: 0 (isoecogeno), 1 (ipoecogeno), 2 (più ipoecogeno), 3 (anaecogeno). I valori medi delle caratteristiche delle lesioni trattate riscontrati sono stati descritti nella Tabella 1.

Tabella 1
Caratteristiche delle lesioni

	L (mm)	% CSA-I	ES	FPS	Follow-up
Media	55.88	36.40	2.29	2.24	90.24
Dev st	51.20	21.97	0.56	0.54	55.93

Valori medi \pm dev. Standard. (L) Lunghezza della lesione espressa in mm; % CSA-I Percentuale di area sezionale del tendine occupata dalla lesione; (ES) "Echo Score" punteggio che viene attribuito alla lesione in base alla ecogenicità in una scansione trasversale del tendine: 0 (isocogeno), 1 (ipoecogeno), 2 (più ipoecogeno), 3 (anaecogeno); (FPS) Fiber Pattern Score", punteggio attribuito secondo il grado di disgregazione delle fibre in una scansione longitudinale del tendine: > 75%, 0; 50-75%, 1; 25-50%, 2; <25%, 3. **Follow-up**: settimane trascorse mediamente dal trattamento.

Tabella 2
Tabella riassuntiva della qualità dei prelievi midollari

	Volume midollo	Conta pre Centrif.	Conta post Centrif.*	BMMNCs	Volume Sospensione	BMMNC/ml
Media	72.11	264.62	669.23	1.15x10 ⁸	6.01	2.99x10 ⁷
Dev St	30.05	336.85	754.89	4.44x10 ⁷	4.89	2.59x10 ⁷

Volume medio espresso in ml; **Conta CFU-f pre centrif.**: Conta delle Unità Formanti Colonie di fibroblasti prima della centrifugazione del midollo. **Conta CFU-f post centrif.**: Conta delle Unità Formanti Colonie di fibroblasti dopo centrifugazione del midollo. *(p < 0.05 - vs. CFU-f pre centrif). **BMMNCs**: Numero di Cellule mononucleate di midollo ottenute dopo centrifugazione dell'aspirato midollare. **Volume della Sospensione**: volume di fibrinogeno (in ml) mediamente utilizzato per la sospensione cellulare. **BMMNCs/ml**: Concentrazione media delle BMMNCs nelle sospensioni cellulari.

Prelievo MO

Il MO è stato prelevato dal tuber coxae con l'animale in stazione quadrupedale e posto in un travaglio. La contenzione farmacologica è stata ottenuta con detomidina (0,02 mg/kg) e butorfanolo (0,02 mg/kg). L'anestesia della sede del prelievo si otteneva con l'infiltrazione di 20 ml di lidocaina al 2% intorno al tuber coxae. La cute nel sito di prelievo veniva quindi preparata chirurgicamente mediante tricotomia e preparazione chirurgica del campo. Per eseguire il prelievo venivano utilizzati aghi da biopsia midollare tipo JAMSHIDI di 8 Gauge che venivano inseriti a livello del tuber coxae per una profondità di circa 6 cm. Sono stati prelevati mediamente 72,1 ml ($\pm 30,0$ SD) di midollo osseo. Il campione ottenuto veniva trattato opportunamente secondo la metodica precedentemente descritta dal nostro gruppo (Crovace et al., 2004a, Crovace et al., 2004b, Lacitignola et al., 2005) e quindi le BMMNCs venivano trapiantate nella lesione dopo circa due ore dal prelievo sotto guida ecografica all'interno della lesione.

Mediamente sono state inoculate $1,15 \times 10^8$ ($\pm 4,44 \times 10^7$) BMMNCs diluite in un volume di fibrinogeno pari a 5,6 ml ($\pm 4,9$ ml).

Su ogni soggetto è stato eseguito il calcolo delle frequenze della formazione in vitro delle colonie fibroblastiche (Colony Forming Units-fibroblast, CFU-f) sul midollo

intero e dopo separazione delle BMMNCs. Ottenendo una conta cellulare media prima della centrifugazione con Ficoll di 264,6 CFU-f ($\pm 336,8$ DS), mentre la media delle conte delle CFU-f post-Ficoll è stata di 669,2 ($\pm 754,9$ DS).

Preparazione della sospensione cellulare

Il midollo osseo prelevato, è stato trasferito in provette Falcon contenenti 0,6-0,7 ml/20 ml di eparina.

Successivamente, i campioni sono stati diluiti in PBS (phosphate buffered saline, pH 7,2) con una diluizione 1:2. Le cellule mononucleate (MNC) sono state colorate con un colorante nucleare (0,1% di metilviolettio in 0,1 M di acido citrico), 200 μ l di midollo diluito in PBS 1:10 sono stati miscelati a 200 μ l di colorante, dopo circa 10-15 minuti è stata eseguita la conta cellulare con camera di Burkert. Il midollo diluito è stato stratificato, nel rapporto 1:1, in Biocoll separating solution (Ficoll) con densità 1077 e centrifugato a 2000 rpm per 30 minuti.

La centrifugazione ha permesso di separare la porzione contenente le cellule, visibili per mezzo della formazione di un anello opalescente tra le due fasi, che veniva recuperata e nuovamente centrifugata a 2000 rpm per 10 minuti. Il pellet ottenuto veniva lavato con PBS e soluzione fisiologica per 2-3 volte, centrifugato a 2000 rpm per 10 minuti e, portato tutto a 10 ml. Scongelati 2 ml di colla di fibrina (Tissucol), si effettuava una diluizione con PBS nel rapporto di 1:2, tale diluizione veniva addizionata al pellet di cellule.

Impianto della sospensione cellulare

Per il trapianto i cavalli sono stati sedati e, dopo anestesia locale sottocutanea, un ago di 23 G è stato inserito all'interno del tendine sotto guida ecografica. Successivamente la sospensione di BMMNCs, veniva iniettata riempiendo la lesione tendinea. Una piccola quantità di trombina veniva iniettata attraverso lo stesso ago nella lesione in modo da precipitare il preparato. Mediamente le sospensioni cellulari contenevano $1,15 \times 10^8$ BMMNCs ($\pm 4,44 \times 10^7$); sospese in 6,0 ml ($\pm 4,9$ ml) di fibrinogeno; ottenendo una concentrazione media di BMMNCs/ml di $2,99 \times 10^7$ cellule/ml ($\pm 2,59 \times 10^7$).

Programma di allenamento e controlli ecografici

Il programma di allenamento post trattamento impiegato ha previsto in tutti i soggetti: da 0 a 1 settimane dal trattamento: riposo in box; da 1 a 2 settimane: passo a mano per 15 min; da 2 a 4: passo a mano per 30 min; da 4 a 6: passo montato per 30 min; da 6 a 8: passo montato per 20 min + 5 min trotto; da 8 a 10: passo montato per 20 min + 10 min trotto; da 10 a 12: passo montato per 30 min + 15 min trotto; da 12 a 16: passo montato per 30 min + 20 min trotto; da 16 a 20: passo montato per 30 min + 30 min trotto. Successivamente i soggetti hanno progressivamente aumentato il livello di allenamento fino all'attività agonistica.

Gli incrementi di livello di allenamento sono stati effettuati dopo ogni controllo ecografico e qualora i risultati dell'indagine ecografica mostrassero una architettura tendinea non

adeguata a quel livello di esercizio si consigliava di rispettare lo stesso livello fino al controllo ecografico successivo.

Analisi statistica

I dati sono espressi come medie \pm deviazione standard. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il test ANOVA a una via; il livello di significatività fissato a ($p \leq 0,05$).

RISULTATI

Risultati clinici

Tra tutti i cavalli sottoposti a trapianto di BMMNCs, solo due soggetti hanno presentato una lieve tumefazione post trapianto, facilmente controllata con bendaggio Robert-Jones modificato. Nei restanti soggetti non è stata apprezzata alcuna tumefazione a livello del punto di inoculo legata a processi infiammatori dovuti alla procedura o infezioni.

A 3 settimane i cavalli non evidenziavano dolorabilità alla palpazione digitale del tendine trattato, mentre a 6 settimane non mostravano più alcuna zoppia. Attualmente dei 19 soggetti inclusi nello studio 13 (68%) hanno concluso il programma di allenamento di 20 settimane, e 10 hanno ripreso la piena attività agonistica, ottenendo almeno 2 piazzamenti nelle competizioni delle rispettive specialità.

Recidive

Tra tutti i tendini trattati il tasso di recidive è stato del 38%. I soggetti che hanno sviluppato recidive (gruppo R) hanno sempre sviluppato una nuova lesione in zone di tendine/legamento diverse da quelle trattate. Due casi che erano stati trattati bilateralmente, hanno sviluppato recidiva solo in un tendine. Confrontando la concentrazione delle BMMNCs/ml ricevuta abbiamo verificato che gli animali con recidive hanno ricevuto una dose ($1,52 \times 10^7 \pm 1,48 \times 10^7$ BMMNCs/ml) significativamente inferiore ai soggetti che non hanno sviluppato recidive (NR) ($3,98 \times 10^7 \pm 2,71 \times 10^7$ BMMNCs/ml) (Grafico 1).

Riguardo il tempo di insorgenza sebbene sia stata osservata una notevole differenza tra i soggetti del gruppo R ($130,3 \pm 26,6$ settimane) e NR ($76,6 \pm 62,1$ settimane) non esiste significatività tra i due gruppi. Le caratteristiche delle lesioni L, % CSA-I, ES, e FPS non hanno mostrato differenze statisticamente significative.

Risultati ecografici

Le caratteristiche ecografiche del tendine hanno evidenziato un miglioramento apprezzabile già a 3 settimane dal trattamento. I parametri ecografici presi in esame (CSA-I, FPS, TLS) miglioravano in tutti i soggetti, con un evidente riempimento della lesione, indicato da un punteggio TLS notevolmente migliorato e da CSA-I in via di riduzione. Tale trend si è conservato nei follow up successivi. Con l'aumento di livello dell'allenamento, l'architettura del tendine è migliorata notevolmente, in particolare l'allineamento e la

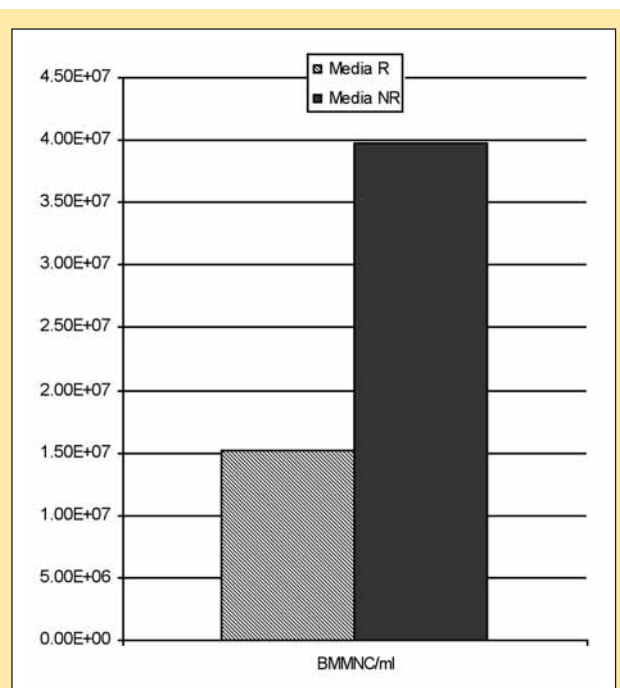


GRAFICO 1 - Il grafico mostra le differenze di concentrazione delle sospensioni cellulari somministrate nei soggetti che hanno mostrato recidive (R) ($1,52 \times 10^7 \pm 1,48 \times 10^7$ BMMNCs/ml) e nei soggetti che non hanno mostrato recidive (NR) ($3,98 \times 10^7 \pm 2,71 \times 10^7$ BMMNCs/ml). La differenza è statisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

lunghezza delle fibre, era indicata da un FPS più basso. Nelle Figure 1, 2, 3, sono state riprodotte le immagini ecografiche relative ad alcuni soggetti prima del trattamento e nei successivi follow-up.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo scopo di questo studio è stato valutare l'efficacia del trapianto autologo di BMMNCs nelle tendinopatie/desmopatie in cavalli sportivi.

È stato verificato che la procedura è una tecnica sicura, in quanto evita qualsiasi risposta immunitaria, in quanto si impiegano cellule autologhe. Si è verificata una irrilevante reazione infiammatoria nei giorni successivi il trapianto in due soggetti sottoposti a trapianto. Questi animali avevano ricevuto un volume maggiore di sospensione cellulare; rispetto a quanto riportato in letteratura, con il trapianto di BM intero in cui si è osservata una risposta infiammatoria (Hertel, 2001, Hertel, 2003, Muttini et al., 2004). Nei controlli clinici ed ecografici a distanza, è stato possibile evidenziare l'andamento progressivo della guarigione. Un iniziale miglioramento si è avuto già a 3 settimane dal trattamento, nelle successive 5 settimane, le lesioni sono progressivamente diminuite di dimensioni e aumentate in ecogenicità. Il ripristino di una architettura tendine propria di un tendine normale è stata osservata nei controlli ecografici effettuati soprattutto dopo la ripresa dell'allenamento. In ogni soggetto è stato infatti osservato come l'architettura tendinea, in termini di allineamento e lunghezza delle fibre collagene, sia notevolmente migliorata. Questa caratteristica è infatti considerata propria di una rigenerazione tendinea, al contrario di una riparazione cicatriziale con fibre orientate casualmente e quindi biomeccanicamente non

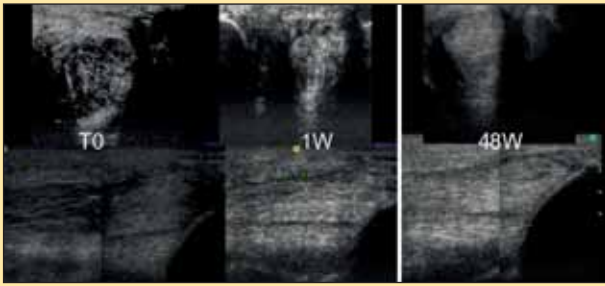


FIGURA 1 - Scansioni Ultrasonografiche Trasversali e Longitudinali di un caso di desmitite della Branchia del LSN. 0w: Scansione prima del trattamento: lesione ampia che occupa tutta la superficie della branca, punteggio ES 2, architettura delle fibre alterata. 1w: Scansione 1 settimana dal trattamento: miglioramento dell'ecogenicità del volume del legamento e dell'organizzazione delle fibre. 48w: controllo a 48 settimane dal trattamento; evidente miglioramento della struttura con allungamento e allineamento delle fibre.

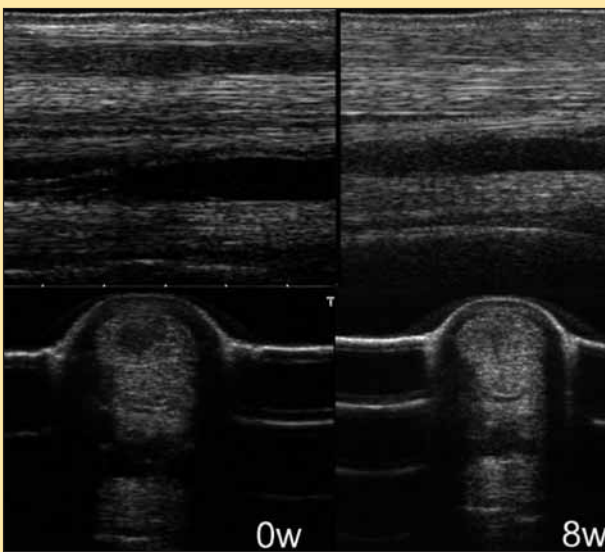


FIGURA 2 - Scansione ultrasonografica di un TFSS con evidente lesione a "core". 8w: già 8 settimane dopo il trattamento è possibile verificare un'ottima struttura tendinea con allineamento e allungamento delle fibre.

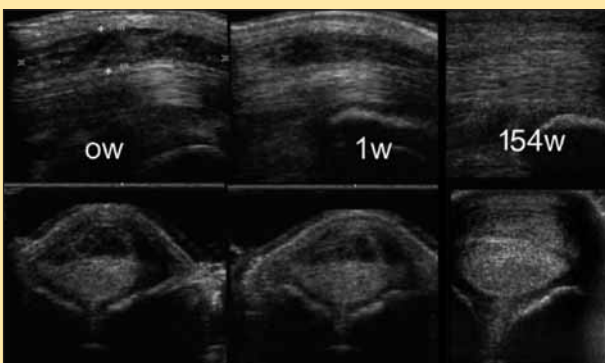


FIGURA 3 - Scansione ultrasonografica di un TFSS con evidente lesione a "core" nella zona 3A. 1w: prima settimana successiva al trapianto di BMMNCs; è osservabile un discreto riempimento della lesione ed una migliore organizzazione delle fibre. 48w: evidente miglioramento della lesione, a fronte di un aumento di volume della CSA del tendine.

competente (Kjaer, 2004). La regolare organizzazione delle fibre, osservata ecograficamente, indicherebbe una deposizione di matrice extracellulare (presumibilmente collagene di tipo I), promossa dalle MSC trapiantate in attività. Re-

centi studi su lesioni tendinee sperimentali nel cavallo e nella pecora trattati con BMMNCs, hanno dimostrato che la natura di queste fibre è da attribuire ad una deposizione di collagene di tipo I che si organizza longitudinalmente. Questi eventi sono stati dimostrati sia mediante ecografia sia con procedure immunostologiche (Crovace et al., 2006, Crovace et al., 2008, Crovace et al., 2007). Interessante è stato anche notare che tendini con un quadro clinico ed ecografico peggiore, hanno mostrato un netto miglioramento già a poche settimane dal trattamento, rispetto a tendini con lesioni di gravità inferiore.

L'utilizzo del tuber coxae come sede di prelievo si è rivelata molto vantaggiosa sia in funzione della comodità e sicurezza dell'operatore che per la quantità di materiale prelevato. La sedazione con detomidina e butorfanolo associata ad una anestesia locale si è dimostrata sufficiente per l'esecuzione della procedura senza fare ricorso all'anestesia generale. Disporre infatti di quantità notevoli di midollo permette anche di disporre di maggiori quantità di cellule mononucleate e quindi di MSC. È stato, infatti, dimostrato che il numero di MSC in un campione di cellule mononucleate di midollo varia da 1 cellula ogni 10^6 a 0,01% (Fortier, 2005, Hertel, 2003). Inoltre alcuni autori ritengono che un alto numero di MSC garantisca migliori risultati (Smith et al., 2003, Smith, 2004, Smith & Webbon, 2005).

L'inoculazione delle cellule nella lesione sotto guida ecografica permette una precisa e sicura deposizione del preparato all'interno della lesione, fornendo un adeguato numero di cellule solo nel sito interessato senza rischiare che cellule vadano perse. In più, l'associazione della colla di fibrina al pellet di cellule garantisce l'aggregazione delle cellule che rimangono esclusivamente nel punto di inoculo assicurando in questo modo anche un substrato ideale di sviluppo e replicazione come recentemente segnalato (Lusardi & Cain, Jr., 1994, Thomopoulos et al., 2002).

L'impiego delle cellule mononucleate comporta vantaggi in termini di numero di cellule impiantate rispetto a quanto si può ottenere impiegando il midollo osseo in toto. Questo è dimostrato dalle conte delle CFU-f pre e post centrifugazione in Ficoll, che sono risultate statisticamente superiori dopo la centrifugazione del midollo. Somministrare, infatti, grandi quantità di cellule solo nella lesione tendinea permette l'attivazione dei processi riparativi esclusivamente nella sede di lesione senza danni alla porzione sana del tendine (Smith et al., 2003; Smith, 2004; Smith & Webbon, 2005). Inoltre la scelta di utilizzare le cellule fresche senza espansione evita gravosi costi in termini di coltivazione ed espansione; sebbene in questi casi dopo l'espansione il numero di MSC impiantate può essere notevolmente superiore.

Nel nostro studio, la maggior parte dei soggetti ha raggiunto un livello di guarigione della lesione tale da permettere un ritorno all'attività agonistica con prestazioni simili a quelle raggiunte prima dell'insorgenza della patologia, grazie ad una guarigione clinica ed ecografica delle lesioni. Il ritorno ad una regolare attività agonistica si è avuta in 6 cavalli; altri 2 soggetti hanno terminato la fase di allenamento controllato e iniziano ora l'allenamento per l'attività agonistica.

La percentuale di recidive nel campione di tendini trattati è stata del 38%. L'incidenza maggiore di recidive è stata osservata a carico del TFSS; questo dato può non essere considerato attendibile perché falsato dal maggior numero di

TFSF trattati in questo studio. Le recidive si sono verificate nei soggetti che hanno ricevuto una concentrazione di BMMNCs/ml più bassa rispetto agli altri. Questo dato può essere considerato importante, in funzione della maggiore diluizione della sospensione cellulare correlata ad un maggiore volume della lesione. Pertanto, il verificarsi delle recidive può essere influenzato sia dal numero di BMMNCs (e quindi di MSC) sia dalla grandezza della lesione. Inoltre, nel gruppo R è stato osservato che le nuove lesioni si presentano in zone diverse da quelle trattate. Presumibilmente le zone di tendine non trattate sono in preda ad una degenerazione subclinica che porta alla patologia conclamata quando i cavalli riprendono l'attività agonistica, o quando i tendini vengono sottoposti a sovradistensione.

Questo studio ha permesso di validare l'efficienza del trattamento con BMMNCs, peraltro noto in letteratura per altri tessuti, a questo risultato ha anche contribuito un attento piano di allenamento, che garantisce insieme alla terapia cellulare il ritorno ad una piena e regolare attività agonistica.

Parole chiave

Cellule mononucleate di midollo osseo, tendinite, trapianto autologo, cavallo.

Key words

Bone marrow mononucleated cells, tendinitis, autologous graft, horse.

Bibliografia

- Awad, H.A., Boivin, G.P., Dressler, M.R., Smith, F.N., Young, R.G., & Butler, D.L. (2003). Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. *J. Orthop. Res* 21, 420-431.
- Awad, H.A., Butler, D.L., Boivin, G.P., Smith, F.N., Malaviya, P., Hui-bregtse, B., & Caplan, A.I. (1999). Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng* 5, 267-277.
- Awad, H.A., Butler, D.L., Harris, M.T., Ibrahim, R.E., Wu, Y., Young, R.G., Kadiyala, S., & Boivin, G.P. (2000). In vitro characterization of mesenchymal stem cell-seeded collagen scaffolds for tendon repair: effects of initial seeding density on contraction kinetics. *J. Biomed. Mater. Res* 51, 233-240.
- Banfi, A., Muraglia, A., Dozin, B., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., & Quarto, R. (2000). Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp. Hematol.* 28, 707-715.
- Bianchi, G., Banfi, A., Mastrogiacomo, M., Notaro, R., Luzzatto, L., Cancedda, R., & Quarto, R. (2003). Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp. Cell Res* 287, 98-105.
- Bianchi, G., Muraglia, A., Daga, A., Corte, G., Cancedda, R., & Quarto, R. (2001). Microenvironment and stem properties of bone marrow-derived mesenchymal cells. *Wound. Repair Regen.* 9, 460-466.
- Blatt, A., Cotter, G., Leitman, M., Krakover, R., Kaluski, E., Milo-Cotter, O., Resnick, I. B., Samuel, S., Gozal, D., Vered, Z., Slavin, S., & Shapira, M. Y. (2005). Intracoronary administration of autologous bone marrow mononuclear cells after induction of short ischemia is safe and may improve hibernation and ischemia in patients with ischemic cardiomyopathy. *Am. Heart J.* 150, 986.
- Cancedda, R., Bianchi, G., Derubeis, A., & Quarto, R. (2003). Cell therapy for bone disease: a review of current status. *Stem Cells* 21, 610-619.
- Cho, S.W., Park, H.J., Ryu, J.H., Kim, S.H., Kim, Y.H., Choi, C.Y., Lee, M.J., Kim, J.S., Jang, I.S., Kim, D.I., & Kim, B.S. (2005). Vascular patches tissue-engineered with autologous bone marrow-derived cells and decellularized tissue matrices. *Biomaterials* 26, 1915-1924.
- Crovace, A., Lacitignola, L., De Siena, R., Rossi, G., & Francioso, E. (6 A.D.). Bone marrow mononucleated cells (BMMNCs) are able to synthesize type I collagen similar to cultured bone marrow stromal cells (cBMSC) in an equine model of collagenase-induced tendonitis: A preliminary study, in Management of lameness causes in sport horses, CESMAS 2006 pp. 169-172.
- Crovace, A., Lacitignola, L., Francioso, E., & Rossi, G. (2008). Histology and immunohistochemistry study of ovine Achilles tendon grafted with Cultured Bone Marrow Mesenchymal Cells and Bone Marrow Mononucleated Cells after collagenase-induced tendonitis. *Vet Comp Orthop Traumatol Pre print Online: VCOT First*.
- Crovace, A., Francioso E., Hendry J., & Quarto R Use of autogenous bone marrow stromal cells (BMSC) and resorbable scaffolds in dogs with bone loss, in 12th ESVOT Congress, Munich, 10th - 12th September 2004, published in VCOT, p. A27 (16).
- Crovace, A., Francioso, E., Hendry, J., & Quarto, R. Use of autologous bone marrow stromal cell (BMSC) and resorbable bone graft substitute in dogs with orthopedic lesions. Proceedings of ACVS Veterinary Symposium, October 7-9, 2004, Denver published in *Vet Surg* p. 435-E25.
- Crovace, A., Lacitignola, L., De, S.R., Rossi, G., & Francioso, E. (2007). Cell therapy for tendon repair in horses: an experimental study. *Vet. Res. Commun.* 31 Suppl 1, 281-283.
- Fortier, L.A. (2005). Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg* 34, 415-423.
- Hertel, D.J. (2001). Enhanced suspensory ligament healing in 100 horses by stem cells and other bone marrow components pp. 319-321.
- 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 M. W. Ross & S. J. Dyson, p. 673. Philadelphia: Ed WB Saunders.
- Hisatome, T., Yasunaga, Y., Yanada, S., Tabata, Y., Ikada, Y., & Ochi, M. (2005). Neovascularization and bone regeneration by implantation of autologous bone marrow mononuclear cells. *Biomaterials* 26, 4550-4556.
- Kjaer, M. (2004). Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev.* 84, 649-698.
- Lacitignola, L., Ferlan, G., De Siena, R., Francioso, E., & Crovace, A. Trapianto autologo di cellule mononucleate di midollo (BMMNCs) nelle lesioni tendinee nel cavallo, in Proceedings of XII Congresso Nazionale SICV, Pisa, pp. 85-87.
- Lusardi, D.A. & Cain, J.E., Jr. (1994). The effect of fibrin sealant on the strength of tendon repair of full thickness tendon lacerations in the rabbit Achilles tendon. *J. Foot Ankle Surg.* 33, 443-447.
- Muttini, A., Bassetti, D., & Cuomo, A. Duplice desmotomia e trapianto di midollo osseo emopoietico per il trattamento delle teniti del flessore superficiale delle falangi, in Proceedings of XI Congr. Nazionale SICV, Torino, pp. 245-247.
- Ouyang, H.W., Goh, J.C., & Lee, E.H. (2004). Use of bone marrow stromal cells for tendon graft-to-bone healing: histological and immunohistochemical studies in a rabbit model. *Am. J. Sports Med.* 32, 321-327.
- Richardson, L.E., Dudhia, J., Clegg, P.D., & Smith, R. (2007). Stem cells in veterinary medicine—attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends Biotechnol.* 25, 409-416.
- Ryu, J.H., Kim, I.K., Cho, S.W., Cho, M.C., Hwang, K.K., Piao, H., Piao, S., Lim, S.H., Hong, Y.S., Choi, C.Y., Yoo, K.J., & Kim, B.S. (2005). Implantation of bone marrow mononuclear cells using injectable fibrin matrix enhances neovascularization in infarcted myocardium. *Biomaterials* 26, 319-326.
- Sharma, P. & Maffulli, N. (2005). Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J. Bone Joint Surg. Am.* 87, 187-202.
- Smith, R. K. Autogenous Stem Cell Implantation, in Proceedings of ACVS Veterinary Symposium, October 7-9, 2004, Denver published in *Vet Surg*, Denver pp. 199-201 E.
- Smith, R.K. (2006). The use of bone marrow-derived stem cells in tendon injury. American College of Veterinary Surgeons Symposium October 5-7 pp. 155-156.
- Smith, R.K., 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.
- Smith, R.K. & Webbon, P.M. (2005). Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: heralding a new dawn? *Br. J. Sports Med.* 39, 582-584.
- Tateishi-Yuyama, E., Matsubara, H., Murohara, T., Ikeda, U., Shintani, S., Masaki, H., Amano, K., Kishimoto, Y., Yoshimoto, K., Akashi, H., Shimada, K., Iwasaka, T., & Imaizumi, T. (2002). Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360, 427-435.
- Thomopoulos, S., Soslowsky, L.J., Flanagan, C.L., Tun, S., Keefer, C.C., Mastaw, J., & Carpenter, J.E. (2002). The effect of fibrin clot on healing rat supraspinatus tendon defects. *J. Shoulder. Elbow. Surg.* 11, 239-247.
- Tse, H.F., Kwong, Y.L., Chan, J.K., Lo, G., Ho, C.L., & Lau, C.P. (2003). Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 361, 47-49.
- Young, R.G., Butler, D.L., Weber, W., Caplan, A.I., Gordon, S.L., & Fink, D.J. (1998). Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J. Orthop. Res* 16, 406-413.