

Ricerca anno finanziario 2007

Verifica dell'efficacia del trattamento delle tendino/desmopatie del cavallo mediante l'impianto di cellule staminali omologhe derivate dal grasso

Responsabile Scientifico: Dr. Gian Luca Autorino

Durata del progetto: 24 mesi

Elenco delle Unità Operative (U.O.) impegnate nel progetto:

- 1) Dr. Gian Luca Autorino – IZSLT DO Diagnostica delle malattie virali Centro di referenza per le Malattie degli Equini (CERME)
- 2) Dr. Demetrio Amadeo – IZSLT Ufficio di Staff Biotecnologie
- 3) Dr. Fernando Canonici Clinica Veterinaria Equine Practice Srl.

Razionale del progetto

Le tendino-desmopatie rappresentano una delle condizioni patologiche più frequenti dell'apparato muscolo-scheletrico del cavallo ed in particolare dei cavalli atleti impiegati nelle varie discipline sportive senza esclusione delle varie specialità. Queste patologie spesso rappresentano la fine della carriera atletica del soggetto nonché un grado di sofferenza cronica per l'impossibilità di una guarigione completa dovuta alla incapacità implicita del soggetto adulto nel riformare fibre tendinee normali che possano garantire un buon grado di riparazione anatomico-funzionale. Negli anni sono stati proposte varie metodiche sia mediche che chirurgiche che comunque hanno dato scarsi risultati per ciò che riguarda la guarigione della struttura interessata. Ciò è fondamentalmente dovuto alla incapacità da parte dei tenociti, la cui attività declina nel soggetto adulto, nel riprodurre le normali fibre tendinee costituite da collagene di tipo I che rappresenta il tipo costituente principale e garantisce le capacità morfo-funzionali delle strutture tendinee e legamentose. L'insuccesso o, più precisamente, il parziale successo delle metodiche terapeutiche proposte negli ultimi decenni non hanno portato comunque ad un buon grado di risoluzione e quindi di recupero dei soggetti colpiti da patologie dei tendini e legamenti comportando una permanenza di sofferenza cronica dei soggetti e non ultimo un gravissimo danno economico per le perdite dei cavalli colpiti da queste patologie. Il vero progresso in questo campo è stato apportato dall'ausilio della diagnostica collaterale e precisamente l'ecografia che ha permesso una più precisa e oggettiva valutazione diagnostica e al tempo stesso ha confermato lo scarso successo dei trattamenti per la costante alterazione anatomica riscontrata anche in quei soggetti il cui aspetto clinico farebbe pensare il contrario. Questo ha oggettivamente confermato la consapevolezza di una scarsa guarigione in condizioni normali nonostante l'ausilio di metodiche terapeutiche proposte negli ultimi decenni.

Per questi motivi si stanno cercando delle vie alternative che possano garantire una restituzione del tessuto interessato. Negli ultimi anni, la ricerca scientifica nel settore è orientata a verificare se, attraverso l'impiego di cellule staminali, si possa individuare una via alternativa alla terapia classica di tali patologie. Viene da diversi autori ipotizzata la possibilità di ottenere, sotto l'influenza degli stimoli locali, la trasformazione delle cellule impiantate presso la sede della lesione in tenociti ai quali spetterebbe la produzione di collagene di tipo I e II e quindi la rigenerazione di tessuto tendineo o legamentoso normale con le sue caratteristiche morfo-funzionali.

Allo stato attuale, per l'ottenimento delle cellule staminali omologhe, si stanno principalmente due matrici biologiche: il midollo osseo ed il grasso. Inoltre le due metodiche di ottenimento delle cellule staminali comportano dei tempi differenti con relativa diversità di tempo d'impianto e delle

differenze nelle cellule utilizzate e ciò potrebbe comportare delle diversità nell'efficacia dei trattamenti come sostenuto a proprio favore da ciascuna delle scuole di pensiero, le quali adducono delle buone motivazioni tecniche a proprio favore e a scapito dell'altra metodica. Questo comunque potrebbe far intravedere delle vie alternative intermedie che possano garantire una maggiore qualità e quantità del materiale da impiantare in relazione al tempo d'impianto, vie peraltro non ancora esplorate. Le prime esperienze sembrerebbero incoraggianti. Tuttavia non esistono ancora degli studi clinici retrospettivi su grandi numeri che possano testimoniare la reale efficacia di questo trattamento anche se le valutazioni ecografiche di controllo post-impianto testimoniano una riparazione qualitativamente superiore per la precoce rigenerazione di fibre tendinee altrimenti difficilmente apprezzabili in condizioni di riparazione tradizionale. Le considerazioni fatte circa la considerevole incidenza delle patologie tendineo-legamentose dei cavalli, la possibilità diagnostica superiore che permette una più obbiettiva valutazione di queste situazioni patologiche e i relativi processi riparativi, nonché le prime esperienze confortanti con l'uso delle cellule staminali nel trattamento delle tendino/desmopatie, richiedono oggi uno studio più approfondito, avvalendosi anche di approcci metodologici tali da superare le esperienze derivanti dal trattamento dei singoli casi clinici e da poter certificare risultati attraverso l'impiego di criteri di valutazione oggettivi.

Bibliografia di riferimento:

1. Alhadlaq A., Mao J.J. (2004) Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev* 13: 436-448. *Am J Vet Res.* 52(5):764-73.
2. Banfi A., Bianchi G., Notaro R., Luzzatto L., Cancedda R., Quarto R., (2002) Replicative aging and gene expression in long term cultures of human bone marrow stromal cells. *Tissue*
3. 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: implication for their use in cell therapy. *Exp. Hemat.* 28; 707-715.
4. Bennet J.H., Joyner C.J., Triffitt J.T., Owen M.E. (1991) Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J Cell Sci*; 99: 131-139.
5. Beresford J.N. (1989) Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop Rel Res* 240: 270-280.
6. Bianco P. (1990) Bone and its marrow: alkaline phosphatase positive stromal cells under normal and diseased conditions. *Int J Mineral Electr Met*; 4: 127-135.
7. Bianco P., Costantini M., Dearden L.C., Bonucci E. Alkaline phosphatase positive precursors of adipocytes in the human bone marrow. *Br J Haematol* 1988; 68: 401-403.
8. Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P.G. (2001) Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19:180-192.
9. Brockbank K.C.M., DeJong J.P., Piersma A.H., Voerman J.S.A (1986) Hemopoiesis in purified bone marrow-derived reticular fibroblasts in vitro. *Exp Hematol*; 14: 386-394.
10. Caplan A. (1991) Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9: 641-650.
11. [Chong A.K., Ang A.D., Goh J.C., Hui J.H., Lim A.Y., Lee E.H., Lim B.H.](#) (2007) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon-healing in a rabbit achilles tendon model.
12. Conget P.A., Minguell J.J. (1999) Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 181: 67-73.
13. Cowan C.M., Shi Y.Y., Aalami O.O., et al. (2004) Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol* 560-567.
14. [Dahlgren L.A., van der Meulen M.C., Bertram J.E., Starrak G.S., Nixon A.J.](#) (2002) Insulin-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase-induced model of flexor tendinitis. *J Orthop Res.* 20(5):910-9.

15. Douglas G. Altman "Practical statistics for medical research"; prima ed., Chapman and Hall, London, 1991 – pag. 403-409. Fleiss, J.L., "Statistical methods for rates and proportions", seconda ed., Wiley & Son, New York, 1981 – pag. 219-225
16. Epichina S.Y., Latzinik N.V. (1976) Proliferative activity of bone marrow stromal clonogenic cells. *Bull Exp Biol Med*; 81: 55.
17. [Farrell E., Byrne E.M., Fischer J., O'Brien F.J., O'Connell B.C., Prendergast P.J., Campbell V.A.](#) (2007) A comparison of the osteogenic potential of adult rat mesenchymal stem cells cultured in 2-D and on 3-D collagen glycosaminoglycan scaffolds. *Technol Health Care*. 15(1):19-31.
18. Ferguson C.M., Miclau T., Hu D., et al. (1998) Common molecular pathways in skeletal morphogenesis and repair. *Ann NY Acad Sci* 23: 33-42.
19. Fried W., Chamberlin W., Knospe W.H., Trobaugh F.E. Jr (1973). Studies on the defective haemopoietic microenvironment of SI/SId mice. *Br J Haematol*; 24: 643-650.
20. Friedenstein A.J. (1980) Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. In Thienfelder S., Rodt H., Kolb H. (eds.) *Immunobiology of bone marrow transplantation*. Springer-Verlag, Berlin; 19-29.
21. [Gaughan E.M., Nixon A.J., Krook L.P., Yeager A.E., Mann K.A., Mohammed H., Bartel D.L.](#) (1991) Effects of sodium hyaluronate on tendon healing and adhesion formation in horses.
22. Gimble J.M., Katz A.J., Bunnell B.A. (2007) Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 100: 1249-1260.
23. Gronthos S., Zannettino A.C., Hay S.J., et al. (2003) Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 116 (Pt 9): 1827-1835.
24. Hicok K.C., Du Laney T.V., Zhou Y.S., et al. (2004) Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo. *Tissue Eng* 10: 371-380. *J Bone Joint Surg Am*. 89(1):74-81.
25. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., et al. (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418: 41-49.
26. Jiang Y., Jahagirdar BN., Reinhardt RL., Schwartz RE., Keene CD., Ortiz-Gonzalez KR., Reyes M., Lenvik T., Blakstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low WC., Largaespada DA., Verfaillie CM.(2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 20 June.
27. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. (1998) In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*;238(1):265-72.
28. Langer R., Vacanti J.P. (1993) Tissue engineering. *Science* 260: 920-926.
29. Lee J.A., Parrett B.M., Conejero J.A., et al. (2003) Biological alchemy: engineering bone and fat from fat-derived stem cells. *Ann Plast Surg* 50: 610-617.
30. Lendeckel S., Jodicke A., Christophis P., et al. (2004) Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg* 32: 370-373.
31. Lennon, D. P., Haynesworth, S. E., Young, R. G., Dennis, J. E. and Caplan, A. I. (1995). A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 219, 211-222.
32. [Lin T.M., Chang H.W., Wang K.H., Kao A.P., Chang C.C., Wen C.H., Lai C.S., Lin S.D.](#) (2007) Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human lipoma tissue. *Biochem Biophys Res Commun*.361(4):883-9.
33. Locklin, R. M., Oreffo, R. O. and Triffitt, J. T. (1999). Effects of TGFbeta and BFGF on the

- differentiation of human bone marrow stromal fibroblasts. *Cell Biol Int* 23, 185-194.
34. Locklin, R. M., Williamson, M. C., Beresford, J. N., Triffitt, J. T. and Owen, M. E. (1995). In vitro effects of growth factors and dexamethasone on rat marrow stromal cells. *Clin Orthop*, 27-35.
 35. Muraglia A, Cancedda R., Quarto R. (2000) Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J. Cell Science* 113; 1161-1166.
 36. Muraglia, A., Martin, I., Cancedda, R. and Quarto, R. (1998) A nude mouse model for human bone formation in unloaded conditions. *Bone* 22, 131S-134S.
 37. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., et al. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.
 38. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti WD, Crig S, Marshak DR. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* vol 284.
 39. Quarto R., Mastrogiacomo M., Cancedda R., et al. (2001) Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 344:385-386.
 40. [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(9):409-16.
 41. Shi S., Gronthos S., Chen S. et al. (2002) Bone formation by human postnatal bone marrow stromal cells is enhanced by telomerase expression. *Nature Biotechnol* 20: 587-591.
 42. [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(1):99-102.
 43. [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(9):582-4
 44. Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., et al. (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 4279-4295.

Descrizione complessiva del progetto

Breve sintesi delle conoscenze già disponibili sull'argomento

Da diversi anni sono in atto ricerche e sperimentazioni sull'uso di cellule staminali nella terapia della riparazione /rigenerazione di diversi tessuti.

In particolare, le cellule staminali di origine mesenchimale, in presenza di adeguati fattori di crescita sono in grado di differenziarsi e riprodursi formando differenti popolazioni di cellule (miociti, osteociti, condrociti, neuroni, adipociti e fibroblasti).

Negli ultimi anni, la ricerca è stata principalmente orientata all'uso di cellule staminali omologhe, cioè di derivazione dello stesso individuo, al fine di limitare fenomeni di rigetto.

Quali fonti di cellule sono stati impiegati differenti tessuti. Tuttavia, recentemente, sono state coltivate principalmente dapprima da midollo osseo e, più recentemente, anche da grasso.

Anche in Italia, alcuni ricercatori hanno dimostrato che, inoculando cellule staminali di origine mesenchimale o elementi mononucleati, di derivazione da midollo osseo, in sede di lesioni sperimentalmente indotte su tendini di cavalli trattati con collagenasi, era possibile osservare la formazione di nuove fibre tendinee. Ultimamente è stato osservato che il grasso può costituire un substrato alternativo al midollo osseo, considerato che, in rapporto al peso di materiale prelevato, questo contiene mediamente un numero di cellule 50 volte superiore.

Gli esperimenti condotti riguardano singoli casi, con tipologie di lesioni talvolta differenti fra loro per sede e per dimensione, spesso non sono sufficientemente documentati i protocolli di estrazione ed i metodi di coltivazione non sono ancora standardizzati.

In ogni caso, a fronte di una copiosa produzione scientifica relativa alla parte sperimentale, non sono ancora stati documentati studi ed applicazioni cliniche su popolazioni campionarie tali da rendere oggettivo il risultato.

Quali nuove conoscenze/informazioni il progetto si prefigge di produrre

Attraverso il presente progetto si vuole definire, dopo aver verificato le migliori condizioni di crescita e moltiplicazione, un protocollo standard per l'estrazione, la coltivazione, la conservazione ed il trasporto di cellule staminali derivate da grasso.

Si vuole procedere alla loro caratterizzazione in vitro ed alla definizione di un protocollo standard per il loro impiego terapeutico per il trattamento delle tendino/desmopatie del cavallo.

Inoltre, si vuole verificare attraverso uno studio di campo, la risposta individuale alla somministrazione di un numero predefinito di cellule staminali in soggetti con tendino/desmopatie localizzate nelle sedi di più frequente lesione (tendine flessore superficiale delle falangi). L'efficacia dei trattamenti sarà periodicamente valutata sugli stessi soggetti per sottoposti ad impianto al fine di poter effettuare nel tempo valutazioni qualitative e quantitative rispetto al processo di crescita delle fibre tendinee.

Lo studio ha come ulteriore obiettivo quello di sperimentare un metodo di lavoro finalizzato all'ottenimento di letture oggettive delle immagini ecografiche dei soggetti sottoposti a trattamento, registrate nel corso delle attività di cui al punto precedente, da parte di esperti chiamati a valutare i risultati in maniera casuale.

Metodologia

Per lo svolgimento del progetto è prevista una fase preliminare su equini macellati di verifica relativamente alle regioni anatomiche con maggiori quantità di grasso mobile sottocutaneo, ai fini della determinazione del relativo contenuto in cellule staminali, delle caratteristiche biochimiche per i processi di digestione ed infine, fattore non meno importante, per la scelta della più agevole sede di prelievo nell'animale in vita in termini di minore invasività e semplicità di prelievo.

Comparazione fra potenzialità fra cellule staminali mesenchimali di derivazione da midollo osseo e da grasso, verificandone la concentrazione nelle matrici di origine, la capacità replicativa e di differenziamento.

Messa a punto di protocolli per la digestione della matrice di origine, l'isolamento, la crescita, il controllo della sterilità delle colture, la conservazione ed il trasporto delle cellule ai fini dell'impianto.

Definizione delle condizioni d'impianto di inoculo di cellule in termini di concentrazione e mezzo per la loro sospensione ai fini del trasporto.

Studio delle caratteristiche biologiche delle cellule staminali isolate mediante verifica della capacità di differenziamento in vitro in colture bidimensionali e determinazione del life-span e mantenimento della multipotenzialità differenziativa.

Individuazione di soggetti da arruolare per lo studio al fine di poter effettuare studi comparativi sui casi catalogati per: arto interessato, struttura interessata, dimensione della lesione (diametro, area e rapporto della superficie della lesione rispetto alla superficie totale della struttura interessata) estensione della lesione, durata.

Analisi dei risultati mediante lettura dei referti diagnostici d'immagine da parte di esperti. Il panel

di immagini che ogni clinico dovrà esaminare, effettuando una diagnosi relativa allo status delle lesioni ed al grado di restituito anatomica della parte, basate su uno scoring, sarà costituito da una serie di immagini ecografiche rilevate a diversi periodi dall'impianto, ad ognuna delle quali verrà assegnata una codifica univoca casuale, in modo tale che l'osservatore non sia in grado di dedurre i soggetti ai quali appartengono. Verranno valutate la ripetibilità dei giudizi espressi da ogni singolo clinico nonché la riproducibilità dei giudizi espressi dai vari clinici per il panel di immagini ecografiche, attraverso l'utilizzo di test statistici per la valutazione della concordanza depurata dell'effetto del caso.

Descrizione dei criteri di trasferibilità e di diffusione dei prodotti e dei risultati da conseguire

I risultati dello studio clinico saranno trasferiti alla comunità scientifica attraverso la realizzazione di pubblicazioni e/o presentazioni nel corso di convegni e/o eventi formativi.

La pubblicazione di metodi standardizzati di isolamento e coltivazione delle cellule staminali mesenchimali derivate da grasso, nonché dei protocolli terapeutici, potranno essere utilmente adottati da altri operatori di laboratorio e clinici e contribuiranno a ridurre l'estemporaneità e l'empirismo che attualmente spesso caratterizzano numerosi tentativi di approccio nella pratica veterinaria di campo.

Gli stessi metodi, inoltre potranno essere utilmente adattati per la cura di tendino/desmopatie di altre specie animali da compagnia e da reddito.

Infine, i risultati ottenuti potranno costituire un modello applicativo anche per gli studi e la terapia con cellule staminali autologhe in medicina umana.

Valore aggiunto dell'aggregazione tra soggetti diversi che partecipano al progetto

Per la realizzazione del progetto le Unità Operative partecipanti garantiscono complessivamente le competenze necessarie per il raggiungimento degli obiettivi indicati. Infatti, il gruppo di ricerca è in grado di coniugare le specifiche esperienze pluriennali maturate nei seguenti settori:

- Centro di referenza Nazionale per le Malattie degli Equini - organizzazione, gestione e svolgimento di progetti di ricerca;
- Ufficio Staff Biotecnologie – esperienza in tecniche di colture cellulari e specifica formazione del responsabile della UO nell'uso delle cellule staminali in applicazioni scientifiche;
- Equine Practice - eccellenza nel campo della clinica e chirurgia degli equini, disponibilità di vasta casistica e possesso di strutture e strumentazioni per condurre la parte applicativa

Descrizione e spiegazione dell'articolazione del programma in fasi fra le varie UU.OO.

1. studio preliminare al mattatoio per la verifica delle sedi e delle migliori condizioni di prelievo ai fini del trasferimento del metodo sugli animali in vita (UO 1)
2. studio e messa a punto in laboratorio delle condizioni colturali di cellule staminali di origine mesenchimale (UO 2)
3. caratterizzazione delle cellule staminali isolate (UO 2)
4. Messa a punto di protocolli per la digestione della matrice di origine, l'isolamento, la crescita, il controllo della sterilità delle colture, la conservazione ed il trasporto delle cellule ai fini dell'impianto (UO 1, 2)
5. Definizione delle condizioni d'impianto di inoculo (UO 1, 2, 3)
6. Verifica delle migliori condizioni per la conservazione ed il trasporto (UO 1, 2)
7. Individuazione di cavalli affetti da tendino/desmopatie di recente manifestazione o riacutizzazione di casi cronici (UO 3)
8. Espianto di grasso sottocutaneo in stazione e anestesia locale (UO 3)

9. Isolamento e coltivazione delle cellule secondo i metodi predefiniti (UO 1)
10. Reimpianto intralesionale ecoguidato di quantità definite di cellule staminali (UO 3)
11. Esame ecografico di controllo a 30, 60 e 120 gg. dalla data d'impianto (UO 3)
12. Realizzazione di un sistema di scoring per la valutazione casuale delle immagini (UO 1)
13. Invio delle immagini per la verifica, attraverso referee internazionali, per la valutazione del grado di riempimento delle lesioni e di allineamento delle fibre tendinee rigenerate in seguito all'impianto (UO 1, 3)
14. Analisi dei risultati attraverso l'utilizzo di test statistici per la valutazione della concordanza depurata dell'effetto del caso (UO 1)

Output del programma (es. documenti; metodologie; corsi di formazione, attivazione di servizi, etc.) con indicazione dei tempi previsti per la presentazione

Entro il secondo anno, dall'inizio della ricerca, saranno disponibili i seguenti output:

- Elaborazione di metodi e protocolli per l'isolamento, la crescita, la conservazione ed il trasporto di cellule staminali.
- Produzione di protocolli clinici relativi alle fasi di espianto di grasso sottocutaneo, impianto ecoguidato e controlli clinici nel periodo di convalescenza.
- Realizzazione di un sistema, per la valutazione dei risultati, in grado di definire la concordanza assoluta e relativa nella lettura delle immagini da parte di valutatori indipendenti.
- Almeno una pubblicazione su rivista con impact factor per la divulgazione dei risultati.

Se ritenuto attuabile sulla base dei risultati ottenuti, potrà essere attivato uno specifico servizio di isolamento e coltivazione a favore degli operatori del settore.

Obiettivi e indicatori per la verifica dei risultati raggiunti

Gli indicatori necessari alla verifica dei risultati sono riferiti al raggiungimento degli obiettivi proposti. Pertanto, ai fini della evidenza dei risultati sono da considerare i seguenti indicatori:

- 1) Almeno 3 protocolli operativi;
- 2) numero di soggetti arruolati ai fini dello studio;
- 3) numero di cavalli sottoposti ad impianto;
- 4) numero di controlli clinici effettuati nei quattro mesi successivi ai trattamenti;
- 5) numero di esiti favorevoli in seguito ad applicazione dei protocolli.