UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

TESINA PARA ASPIRAR

AL TÍTULO DE

ESPECIALISTA EN MEDICINA

DEPORTIVA DEL EQUINO

TITULO:

PROTEÍNA ANTAGONISTA DEL RECEPTOR DE LA INTERLEUQUINA-1 EN EL TRATAMIENTO DE ARTROPATIAS DE LA ARTICULACIÓN INTERFALANGIANA DISTAL EN EQUINOS RESISTENTES A OTROS TRATAMIENTOS

Autor: MV Fernando Pinto

Tutor: MV – Esp. García Liñeiro J.A.

18 de octubre de 2011

ÍNDICE

Agradecimientos…… 3

Resumen en castellano…….. 4

Resumen en ingles……. 4-5

Introducción……..……. 5

Hipótesis……..…….. 6

Material y métodos……..…….. 6-8

Resultados…..……. 8

Discusión……..…….. 8-14

Conclusión……..…… 14

Bibliografía……..…… 15-18

Agradecimientos

A mis padres y hermanos.

Al Dr. José Alberto García Liñeiro por su interminable interés y colaboración durante toda la carrera de especialización.

Palabras clave: Equino, Osteoartritis, Proteína Antagonista de la Interleuquina-1, IRAP.

RESUMEN

La osteoartritis (OA) o enfermedad degenerativa articular en los caballos deportivos genera pérdidas millonarias en la industria equina anualmente.[3,9,11,16,18.] Su tratamiento convencional se basa en la utilización de medicamentos como ácido hialurónico (AH), acetónido de triamcinolona, AINES (Fenilbutazona), glicosaminoglicanos polisulfatados y reposo controlado.[2, 3,11,16,17.] Sin embargo el uso prolongado de esteroides y AINES genera efectos secundarios adversos en el paciente, por lo que su utilización tiene sus limitaciones.[2,3,4,5,11.] La interleuquina-1 es una citoquina producida mayoritariamente por macrófagos y posee un efecto pro-inflamatorio potente.[9,10,16,18.] La terapia con la proteína antagonista de la interleuquina-1 (IRAP) bloquea los receptores biológicos intraarticulares de la IL-1 y no le permite desarrollar su efecto biológico.[6,7,8,12,13,14,15,19,20.] El presente trabajo demuestra los efectos beneficiosos de IRAP en las articulaciones interfalangianas distales de seis caballos de salto, que fueron sometidos a tratamientos convencionales con esteroides y AH y que fueron refractarios a estos tratamientos.

SUMMARY

Osteoarthritis or degenerative joint disease is responsible for generating millionaire losses in the equine sports industry.[3,9,11,16,18.] It's most common and used treatments involve the use of intraarticular hyaluronic acid (HA), intraarticular triamcinolone, NSAIDS, GAGS, and controlled rest.[2, 3,11,16,17.] Nonetheless these treatments have their limitations, for they can't be used in prolonged time lapses because of their adverse secondary effects.[2,3,4,5,11.]

Interleuquin-1 (IL-1) is a cytokine produced mainly by macrophages and has a very potent pro-inflammatory effect in all articular surfaces.[9,10,16,18.] Therapy with the interlequin-1 receptor antagonist protein or IRAP blocks the IL-1 receptors on the articular surfaces which diminishes the IL-1 pro-inflammatory effects.[6,7,8,12,13,14,15,19,20.] The present article demonstrates the beneficial effects of IRAP used in coffin joints of six horses which were previously treated with HA and Triamcinolone and became refractory.

INTRODUCCIÓN

La osteoartritis es una enfermedad crónica caracterizada por sinovitis, cojera e impotencia funcional que se debe a la degeneración del cartílago y formación de osteofitos.[3,9,11,16,18.] El tratamiento médico más empleado se basa en el uso de ácido hialurónico, que mejora el anabolismo del condrocito y favorece la síntesis de su matriz extracelular, antiinflamatorios esteroideos articulares, AINES, suplementos orales de glucosaminoglicanos polisulfatados y reposo controlado.[2,3,4,5,11,16,18.] Sin embargo estos tratamientos presentan ciertas limitaciones ya que su uso prolongado no es recomendado por sus efectos secundarios adversos como laminitis o formación de úlceras gástricas.[2,3,4,5,11,16.] De ahí que sea necesario estudiar nuevos tratamientos y/o técnicas más eficaces que las ya empleadas. La interleuquina-1 (IL-1) es una citoquina producida por múltiples líneas celulares, fundamentalmente macrófagos activados, que se produce como consecuencia de infecciones, lesiones o estrés. Esta citoquina es un mediador clave de la inflamación que ocasiona fiebre, neutrofilia, proteínas de fase aguda y degeneración de las estructuras músculo-esqueléticas.[9,10,16,18.] Por ello, la inyección intraarticular de su antagonista supone una disminución drástica del dolor e inflamación de la articulación afectada.

HIPÓTESIS

La utilización de IRAP en el tratamiento de OA crónicas y refractarias a tratamientos convencionales con ácido hialurónico, AINES, y acetato de triamcinolona intraarticular en caballos deportivos, mejorará el cuadro clínico y le permitirá al equino retornar a sus actividades deportivas normales.

OBJETIVO

Comprobar la efectividad de la técnica IRAP (proteína antagonista del receptor de la interleuquina-1) en el tratamiento de artropatías de la articulación interfalangiana distal refractarias a infiltraciones de ácido hialurónico, acetónido de triamcinolona y AINES.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron para esta experiencia 6 caballos de salto, afectados por artropatía interfalangiana distal, refractaria a tratamientos infiltrativos con ácido hialurónico y acetato de triamcinolona, los cuales tuvieron respuestas positivas a dichos tratamientos previamente. En los 6 casos, el protocolo de selección se estandarizó según el siguiente esquema:

1) Claudicación 3-5 unilateral y de miembro anterior.

2) Flexión forzada interfalangiana distal positiva.

3) Anestesia interfalangiana distal positiva.

4) Diagnóstico radiológico con imágenes sin alteraciones significativas en la articulación interfalangiana distal.

5) Diagnóstico ultrasonográfico indicativo de lesión ligamentosa en colaterales y sinovitis articular.

6) Herrajes terapéuticos según el caso.

7) Curso promedio 18 meses.

8) Tratamientos previos de infiltraciones intraarticulares con ácido hialurónico y acetato de triamcinolona, con respuestas positivas (en promedio 3 en los últimos 18 meses),

9) Ultimo tratamiento, sin resultado.

Obtención del IRAP: En primer lugar se extrae una muestra de sangre del caballo enfermo mediante una jeringa que contiene en su interior microesferas de vidrio impregnadas en sulfato de cromo. Esta sustancia estimula la liberación proteínas antiinflamatorias, incluyendo IRAP, que se une al receptor de IL-1. El proceso incluye además de la recolección de la sangre, su incubación (37 ºC durante 24 horas +/- 5 horas) y centrifugado para separar el plasma con IRAP del resto de la sangre. Después de la centrifugación y separación del plasma, se procede a recogerlo en partes alícuotas divididas en 6 jeringas y congelarlo hasta su empleo. Se pasa el plasma por un filtro de 0,2 μm antes de su congelación para obtener un producto más homogéneo y sin coágulos[14].

Aplicación de IRAP

1. Se realizaron 4 aplicaciones sucesivas de IRAP con intervalos de 7 días.
2. Evaluación semanal considerando aspectos clínicos como presencia de claudicación, y respuesta a la flexión forzada.

3. Evaluación tras un mes de la última infiltración, considerando las mismas maniobras más trabajo en pista consistente en trote, galope y salto.

RESULTADOS

Los 6 equinos tuvieron mejoría del cuadro clínico al cabo de la segunda infiltración. La claudicación desapareció a la cuarta aplicación, negativizándose las flexiones forzadas. Al mes, los caballos desarrollaron un trabajo de pista normal. Los aspectos clínicos se mantuvieron estables hasta 2 meses de terminado el tratamiento.

DISCUSIÓN

La Osteoartritis (OA) o Enfermedad Degenerativa Articular (EDA) es responsable de generar pérdidas millonarias en la industria equina y figura como la enfermedad número uno en caballos deportivos.[3,9,11,16,18.] La OA es un proceso degenerativo crónico que puede presentar diversos factores como disfunción articular, osteofitosis marginal, deterioro progresivo del cartílago articular, remodelación del cartílago subcondral, y disminución del espacio articular.[3,9,11.] Normalmente caballos con OA presentan sinovitis, efusión sinovial, distintos grados de claudicación, y pérdida progresiva de la función articular.[16,18.] Clínicamente la enfermedad produce dolor y disfunción en la articulación afectada. Las causas de la OA son diversas e incluyen, traumas repetitivos (producen sobrecarga en el hueso subcondral), inestabilidad articular, sinovitis, capsulitis, hipoxia, genético, y sobrepeso. Específicamente en articulaciones de poco movimiento como la interfanlangeana distal, la OA produce proliferación periostea, con tendencia a anquilosis ósea en casos avanzados.[3,9,11,16,18.] La OA se genera cuando ocurre un desbalance entre los péptidos que promueven la síntesis de la matriz extracelular y los que induce una

remodelación de estos componentes. La patogénesis de la OA es consecuencia de una cadena de complejos mecanismos moleculares, resultando en daño tisular y compromiso articular. Se cree que durante la OA no hay suficiente IL1-Ra (antagonista del receptor de IL-1) disponible para bloquear los efectos destructivos de la IL-1.[9,10,16.] La IL-1 es una citoquina producida por múltiples líneas celulares, fundamentalmente macrófagos activados, que se produce como consecuencia de infecciones, lesiones o estrés. Esta citoquina es un mediador clave de la inflamación que ocasiona fiebre, neutrofilia, proteínas de fase aguda y degeneración de las estructuras músculo-esqueléticas[18]. La citoquina IL-1 promueve la quimiotaxis y desgranulación de leucocitos, y aumenta la expresión de otros mediadores proinflamatorios como PgE_2, bradiquininas, metaloproteinasas, y óxido nítrico. La IL-1 tiene varias fuentes naturales como los condrocitos, sinoviocitos, macrófagos, linfocitos y fibroblastos. Los efectos biológicos de la OA inician cuando la IL-1 se une a su receptor específico en el cartílago subcondral de articulaciones. No sólo promueve la liberación de citoquinas proinflamatorias, sino que también inhibe los mecanismos metabólicos en que los condrocitos reparan la matriz extracelular e inhibe la síntesis de colágeno. Queda demostrado que la IL-1 genera daños a una articulación lesionada. Es importante recordar que mientras el animal sienta dolor, se seguirá liberando continuamente IL-1, por lo que sus efectos dañinos continuaran apareciendo.[9,10,16.]

El tratamiento convencional y más utilizado en casos de OA está constituido por el uso de corticoesteroides intraarticulares (acetato de triamcinolona siendo el más utilizado), AINES (Fenilbutazona), protectores de cartílago (glucosaminoglucanos polisulfatados), ácido hialurónico y reposo controlado.[2,3,4,5,11,17,22.] Sin embargo los tratamientos con AINES y corticoesteroides tienen ciertas limitaciones ya que no pueden ser usados de manera

continua por sus efectos secundarios adversos[5]. La novedosa terapia de la proteína antagonista del receptor de la interleuquina-1 (IRAP) ha sido utilizada en casos crónicos de OA en donde los tratamientos convencionales con AINES y corticoesteroides no mejoran el cuadro clínico del paciente.[6,7,8,20.] La terapia con IRAP está basada en la liberación y estimulación de la proteína antagonista de la interleuquina-1 (IL1-Ra). Esta proteína se adhiere a los receptores específicos que utiliza la IL-1 para ejercer su función biológica y bloquea su acción pro-inflamatoria.[12,13,14,15,19.] La inyección intraarticular de su antagonista supone una disminución drástica del dolor e inflamación de la articulación afectada. Esto genera una disminución en los efectos pro-inflamatorios y degenerativos de la IL-1. En una encuesta realizada en los Estados Unidos en el año 2009, el 54.1% de veterinarios dedicados a la medicina equina que participaron en la encuesta, habían utilizado IRAP alguna vez. De ese 54.1%, el 32.3% lo utilizaba raramente y el 21.9% frecuentemente. El 36.2% lo utilizó en casos refractarios a tratamientos convencionales con corticoesteroides y AH, y el 24.1% lo utiliza como tratamiento primario en los casos que el dinero no es un problema para el cliente[25].

Irap®-Therapie utiliza el antagonista de la proteína del receptor interleukin-1 (IL-1Ra) a partir del suero del animal para conseguir los beneficios terapéuticos (Suero Autólogo Condicionado, ACS)[14]. Esto implica el aislamiento de proteínas antiinflamatorias y regenerativas de la sangre del caballo que serán inyectadas en la articulación afectada del propio animal. La IL-1 tiene un papel importante en el desarrollo de artrosis y degeneración del cartílago por su potente acción inflamatoria; por lo tanto, su antagonista (IL-1Ra), inhibe los efectos perjudiciales de la IL-1 y supone una terapia eficaz para la patología articular. La respuesta al tratamiento es variable y en gran parte depende de la severidad de

la lesión en el momento de la terapia. Las articulaciones que presentan principalmente sinovitis o degeneración articular leve responden mejor que las que muestran una lesión extensa del hueso subcondral y/o del cartílago, donde la respuesta es menos favorable[12]. La eficacia del IL-1Ra en el tratamiento de la artrosis en caballos ha sido demostrada en varios estudios, como el de Frisbie et al. 2002 (Colorado State University). En este estudio, se les realizó OA mediante artroscopia quirúrgica en la articulación intercalar. Al día 14 se dividieron los caballos en dos grupos: un grupo tratado con IRAP y el otro con un Placebo control. Los resultados demostraron que los caballos tratados con IRAP, mejoraron considerablemente su grado de renquera, y se produjo una importante reducción en la hiperplasia de la membrana sinovial. Vale destacar que no se reportaron reacciones adversas después de la infiltración IA con IRAP[12].

Las artropatías interfalangianas distales en el caballo, especialmente en el salto, tienen una relativa frecuencia y suele tener un curso crónico e insidioso. Las respuestas clínicas obtenidas en procesos crónicos como los descriptos y su efecto, alientan a su utilización en episodios agudos, ya que justamente ese es el momento ideal para su utilización considerando que es en la fase aguda, es cuando se liberan los intermediarios inflamatorios que a la larga conducen a la artrosis. Todavía no existen estudios a largo plazo que verifiquen al 100% estas afirmaciones aunque, los resultados obtenidos a corto plazo son muy satisfactorios y ha quedado confirmado su potente acción antiinflamatoria en el cartílago articular.

IRAP utiliza sangre homologa del caballo afectado con OA para estimular la proliferación de la proteína IL1-Ra. En la actualidad existen dos métodos de procesamiento de muestra y ambos son muy similares y sencillos, pero requieren el uso de material específico.

Comercialmente se conocen como IRAP e IRAP II[14]. El proceso de IRAP inicia con la extracción de 50ml de sangre en la jeringa IRAP (ver figuras I, II y III). Esta jeringa contiene micro esferas de vidrio impregmentadas con sulfato de cromo que estimula la liberación y proliferación de IL1-ra por parte de diferentes líneas celulares, pero principalmente macrófagos. Después de extraída la sangre, se deja incubar por un periodo de 24 horas (+-5 horas) a una temperatura de 37°C, para luego ser centrifugada y separar el plasma con IRAP del resto de la sangre. Finalmente el plasma centrifugado a 4000rpm durante 10 minutos y se separa en partes iguales en jeringas de 6 ml para su congelación. Se recomienda filtrar el plasma en un filtro de 0,2µm antes de su congelación. El mecanismo de procesamiento sanguíneo del IRAP difiere muy poco del IRAP. Su principal diferencia ocurre durante la extracción sanguínea.

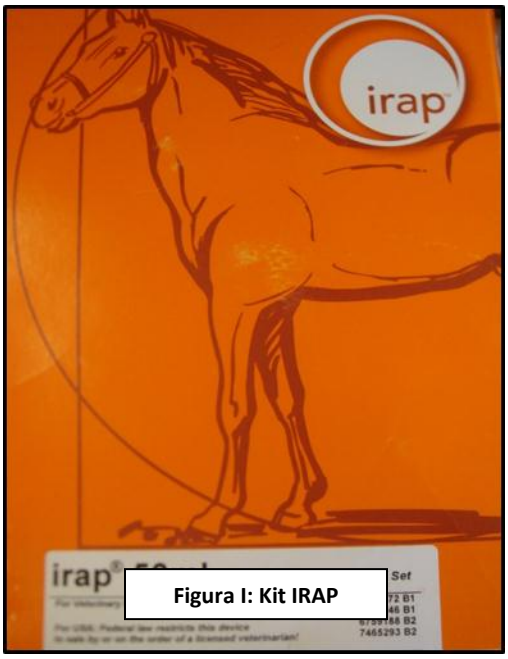

Figura I: Kit IRAP

Figura II: Jeringa IRAP

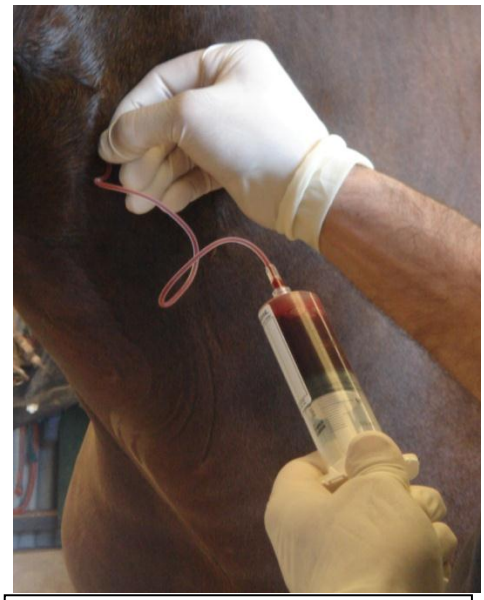

Figura III: Extracción de sangre con jeringa IRAP

En el caso de IRAP II, se extraen 50ml de sangre entera en una jeringa común, para después depositar la sangre en un tubo de 60ml que contiene las microesferas de vidrio. El proceso de incubación de la sangre se hace a 37°C durante 16-24 horas (no exceder las 24 horas). El proceso de centrifugado y congelamiento de ambas técnicas son iguales [12,14]. Aunque ambas técnicas son muy similares, en un estudio realizado en el año 2011 por Frisbie et al., se logró determinar que las concentraciones de IL1-ra y otros factores de crecimiento beneficiosos en casos de OA como el Factor de Crecimiento de la Insulina (IGF-1), y Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF-β), fueron mayores en IRAP II.[1,8,12,13,14,21.] Esto sugiere que la utilización del IRAP II sería más beneficiosa en los casos de OA, ya que al tener más IL1-Ra disponible, ésta podría unirse a los receptores de la IL-1 y bloquear su acción inflamatoria. Los factores de crecimiento como IGF-1 y TGF-β que se presentan en las muestras de IRAP suponen ser beneficiosos para articulaciones con OA.[1,8.] Los factores de crecimiento proveen analgesia, estimulan síntesis de matriz extracelular,

estimula síntesis colágena, que benefician la reparación del cartílago subcondral.[1,8,13,14,21.] También se determinó que las concentraciones de las citoquinas proinflamatorias Factor de Necrosis Tumoral Alpha (FNT-α) e IL-1β fueron menores en IRAP II, lo que también sería beneficioso para la articulación con OA ya que la inflamación sería menos dañina.[1,8,13,14,18,21.] En un estudio realizado en tendones de Aquiles de ratones, en los cuales se les hizo una herida de 3cm perpendicular a las fibras colágenas, se comprobó que al ser tratados con IRAP, aparecieron más rápido las fibras colágenas, más gruesas, más agrupadas, lo que representa una mejor organización colágena comparado al grupo control.[1.]

Normalmente se recomienda que los tratamientos con IRAP e IRAP II sean de 4 aplicaciones vía IA con intervalos de una semana.[12,14,15,19,20,21,23,24.] Es importante destacar que el FNT-α posee propiedades proinflamatorias muy potentes, por lo que se recomendaría utilizar IRAP II[14].

CONCLUSIÓN

IRAP supone un tratamiento alternativo frente al uso de los Corticoides intraarticulares, e incluso el ácido hialurónico demostrando en este estudio buenos resultados en procesos inflamatorios y en las primeras fases de la artrosis. La utilización de IRAP en los 6 caballos de salto con artrosis crónicas de la articulación interfalangiana distal mejoró el cuadra clínico y los caballos pudieron regresar a su trabajo de pista normal.

BIBLIOGRAFÍA

1. ASPENBERG P, VIRCHENKO O: Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. Acta Orthop Scand 75:93-99, 2004.
2. BOLT, D.M., ISHIHARA, A., WEISBRODE, S.E. AND BERTONE, A.L. (2008) Effects of Triamcinolone acetonide, sodium hyaluronate, amikacin sulfate, and mepivacaine hydrochloride, alone and in combination, on the morphology and matrix composition of lipopolysaccharide-challenged and unchallenged equine articular cartilage explants. Am. J. vet. Res. 69, 861-867.
3. CARON, J.P. AND GENOVESE, R.L. (2003) Principles and practices of joint disease treatment. In: Diagnosis and Management of Lameness in the Horse, Eds: M.W. Ross and S.J. Dyson, Saunders, Elsevier, St. Louis. pp 746-763.
4. DECHANT, J.A., BAXTER, G.M., FRISBIE, D.D., TROTTER, G.W. AND MCILWRAITH, C.W. (2003)Effects of dosage titration of Methylprednisolone acetate and Triamcinolone Acetonide on interleukin-1-conditioned equine articular cartilage explants in vitro. Equine vet. J. 35, 444-450.
5. EDS: J. FRISBIE, D.D., KAWCAK, C.E., TROTTER, G.W., POWERS, B.E., WALTON, R.M. AND MCILWRAITH, C.W. (1997) Effects of Triamcinolone acetonide on an osteochondralfragment exercise model. *Equine vet. J.* 29, 349-359.A. Auer and J.A. Stick, Saunders, Elsevier, St. Louis. pp 1055-1072.
6. FRISBIE DD, GHIVIZZANI SC, ROBBINS PD, EVANS CH AND MCILWRAIT CW. Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. Gene Therapy (2002), 9: 12-20.

7. FRISBIE DD, KAWCAK CE, MCILWRAIT CW. Evaluation of gene therapy as a treatment for equine traumatic arthritis and ostoearthritis. Clin. Orthoped. Relat. Res. (2000), 379 (Suppl): S273-S287.
8. FRISBIE DD, NIXON AJ. Insulin-like growth factor and corticosteroid modulation of chondrocyte metabolic and mitogenic activities in interleukin-1-conditioned equine cartilage. Am J Vet Res 1997;58:526–530.
9. FRISBIE DD, OXFORD JT, SOUTHWOOD L, ET AL. Early events in cartilage repair after subchondral bone microfracture. Clin Orthop Rel Res 2003;407:215–227.
10. FRISBIE, D.D. (2006a) Synovial joint biology and pathobiology. In: Equine Surgery, Eds: J.A. Auer and J.A. Stick, Saunders, Elsevier, St. Louis. pp 1036- 1054.
11. FRISBIE, D.D. (2006b) Principles of treatment of joint diseases. In: Equine Surgery.
12. FRISBIE, D.D., KAWCAK, C.E., WERPY, N.M., PARK, R.D. AND MCILWRAITH, C.W. (2007) Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimental induced osteoarthritis. Am. J. vet. Res. 68, 290-296.
13. HOUPT JL, FRISBIE DD, MCILWRAITH CW, ET AL. Dual transduction of insulin-like growth factor-1 in interleukin-1 receptor antagonist protein controls cartilage degradation in an osteoarthritic culture model. J Orthop Res 2005;23: 118–126.
14. HRAHA T, COWLEY K, MCILWRAITH W, FRISBIE D. Autologous conditioned serum: A comparison of two commercial methods of IRAP® and IRAP II®. Equine Vet J submitted 2010.
15. HRAHA TH, DOREMUS KAC, MCILWRAITH CW, FRISBIE DD. Anabolic effect of clinical relevant autologous conditioned blood products (ACBP) on equine digital flexor tenocytes. Manuscript submitted 2010.

16. MCILWRAITH, C.W. (1996) General pathobiology of the joint and response to injury. In: Joint Disease in the Horse, Eds: C.W. McIlwraith and G.W. Trotter, W.B Saunders, Philadelphia. pp 40-70.
17. MCLLWRAITH CW, FRISBIE DD, KAWCAK CE. Current treatments for traumatic synovitis capsulitis and osteoarthritis, in Proceedings Am Assoc Equine Pract. 2001;47: 180-210.
18. MEIJER H, REINECKE J, BECKER C, THOLEN G, WEHLING P: The production of anti-inflammatory cytokines in whole blood by physico-chemical induction. Inflamm Res 52:404-407, 2003.
19. MORISSET S, FRISBIE DD, ROBBINS PD, ET AL. Healing of full-thickness chondral defects treated with arthroscopic subchondral bone plate microfracture and IL-1ra/IGF-1 delivered through gene transfer. Vet Surg 2004;33:E16.
20. MOSER, C., BALZTER, A.W.A. AND JANSEN, S.A. (2007) Autologous conditioned serum (ACS) compared to HA and saline injections for the treatment of knee OA [abstract podium no. 330]. In: American Academy of Orthopaedic Surgeons 74th Annual Meeting, San Diego (CA).
21. NIXON AJ, HOUPT JL, FRISBIE DD, ET AL. Gene mediated restoration of cartilage matrix by combination insulin-like growth factor-1/interleukin receptor-1 antagonist. Gene Ther 2005;12:177–186.
22. ROSE RJ. The treatment of navicular disease: a review and current concepts, in Proceedings. Am Assoc Equine Pract. 1984;29:271-278.
23. WEHLING P, MOSER C, FRISBIE D, MCILWRAITH CW, KAWCAK CE, KRAUSPE R, REINECKE JA: Autologous conditioned serum in the treatment of orthopedic diseases: the orthokine therapy. BioDrugs 21:323-332, 2007.

24. WRIGHT-CARPENTER T, KLEIN, P, SCHÄFERHOFF, P, APPELL, HJ, MIR, LM, WEHLING, P. Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: A pilot study on sportsmen with muscle strains.Int. J Sports Med. (2004), 25:.588-593. ISSN: 1988-2688RCCV VOL. 3 (2). 2009.
25. WRIGHT T, FRISBIE D.D, MCILWRAITH C.W, Current joint therapy usage in equine practice: A survey of veterinarians 2009. Equine Vet J., 2011.