

STUDIO CLINICO E DI RICERCA FONDAMENTALE DEL TRATTAMENTO APOPTOSICO DEGLI ECCESSI VOLUMETRICI DI TESSUTO CON ACIDO ASCORBICO IN SOLUZIONE FERRICA

Maurizio Ceccarelli e Coll.

Premessa

L'Apoptosi degli Adipociti nasce alla fine del 2006, dalla collaborazione scientifica del Prof. Roberto Tullii con il Prof. Maurizio Ceccarelli ed è stata presentata per la prima volta a livello internazionale nel gennaio 2012, a Los Angeles, in un Corso di Formazione tenuto dal Prof. Maurizio Ceccarelli per l'American Association of Aesthetic Medicine & Surgery. La tecnica si basa sull'induzione della morte spontanea cellulare utilizzando una particolare concentrazione di acido ascorbico in presenza di ferro ferrico.

Il termine apoptosi si utilizza per definire un particolare processo che porta a morte programmata una cellula. La particolarità dell'apoptosi, che la differenzia dalla necrosi cellulare, è l'assenza d'inflammatione. La cellula viene fagocitata dai macrofagi senza liberazione di mediatori infiammatori.

L'Apoptosi è caratterizzata da una serie di eventi biochimici che portano ad alterazioni cellulari caratteristiche e alla morte. Questi cambiamenti includono il *blebbing* e il *flipping* e la produzione di frammenti cellulari chiamati *corpi apoptotici*, che i fagociti sono in grado d'inglobare e rimuovere rapidamente prima che il contenuto della cellula possa riversarsi verso le cellule circostanti e causare danni.

Gli antiossidanti svolgono il ruolo di protezione della cellula, a piccole dosi, mentre, ad alti dosaggi diventano pro ossidanti. Anche l'acido ascorbico, la vitamina C, presenta questa caratteristica: è pro-ossidante ad alti dosaggi.

In presenza di metalli di transizione (ferro trivalente) l'acido ascorbico attiva la Reazione di Fenton con liberazione di radicali liberi di tipo ossidrilico (*FASEB J. 1999 Jun;13(9):1007-24. Does vitamin C act as a prooxidant under physiological conditions? Carr A, Frei B.*). L'aumento di radicali liberi determina, a livello cellulare, l'attivazione dei canali del calcio con aumento intracellulare di questo ione (*Mol Pharmacol. 1988 Sep;34(3):388-94. The effect of oxygen free radicals on calcium*

permeability and calcium loading at steady state in cardiac sarcoplasmic reticulum. Okabe E, Odajima C, Taga R, Kukreja RC, Hess ML, Ito H.). L'aumento di ioni calcio porta ad aumento di permeabilità dei mitocondri con liberazione del citocromo c ed attivazione della cascata delle caspasi, con finale apoptosi.

In "*The Effect of Local Injection with Vitamin C to Adipocytes Apoptosis*" pubblicato nel *Journal of Chinese Medicine Research*", Gao Yan, Wei Qiang, Chen ShiHai affermano che dosaggi di vitamina C tra lo 0,12% e lo 0,24% inducono il processo di apoptosi se infiltrati negli adipociti. In "*Relationship Between Ascorbyl Radical Intensity And Apoptosis-Inducing Activity* pubblicato su *Anticancer Res. 1996 SepOct;16(5A):2635-44.*", Sakagami H, Satoh K, Ohata H, Takahashi H, Yoshida H, Iida M, Kuribayashi N, Sakagami T, Momose K, Takeda M. ci riferiscono che l'apoptosi cellulare è indotta da concentrazioni di acido ascorbico comprese tra 1 e 10 mMol. Un grammo di vitamina C corrisponde a 5,68 mMol, quantità sufficiente ad indurre apoptosi. Da quanto esposto, l'introduzione di una quantità sufficiente di acido ascorbico, in presenza di ioni ferrici, nel tessuto adiposo induce l'attivazione della Reazione di Fenton con liberazione di radicali liberi, induzione del processo apoptotico e riduzione del numero di adipociti.

L'Equazione di Van't Hoff mette in relazione il valore della pressione osmotica con la concentrazione molare della soluzione. La soluzione fisiologica (cloruro di sodio allo 0,9%) è così chiamata perché non interferisce sull'equilibrio osmotico dei tessuti. Infatti il calcolo della sua pressione osmotica ci dà il valore di 310 mOsm/l. Lo stesso calcolo, applicato per la nostra soluzione apoptotica ci dava un valore ben 7 volte maggiore. Per questo, abbiamo diluito la nostra soluzione fino ad un valore quasi fisiologico di 450 mOsm/l.

Su queste basi si sono preparate due soluzioni: la prima con acqua sterile per preparazioni iniettabili con 1,25 mg di Ferro ferrico per 100 ml; la seconda con 3 gr di acido ascorbico per 100 ml. Al momento dell'uso si prelevano 9 ml di soluzione ferrica e si aggiunge 1 ml di soluzione con acido ascorbico.

L'effetto apoptotico, in assenza di necrosi, di questa preparazione è stato verificato in vitro mediante la microscopia a fluorescenza utilizzando due tipi di colorazione: l'Annessina V e lo Ioduro di Propidio.

L'Annessina V colora la fosfatidilserina, dimostrando il fenomeno del *flipping* (spostamento della fosfatidilserina dall'interno della cellula alla superficie esterna della stessa) caratteristico del processo di apoptosi in atto. Lo Ioduro di Propidio colora il DNA, dimostrando la rottura cellulare e, quindi, il processo di necrosi.

Si è verificato che, l'introduzione di 1 ml della soluzione in oggetto per centimetro cubo di tessuto, determina apoptosi cellulare in assenza di necrosi.

Materiale e metodi

Sono state selezionate trenta pazienti di sesso femminile con eccesso volumetrico delle pliche nasogeniene e con cedimento tissutale a livello dell'angolo inferiore della bocca e sono state trattate con una infiltrazione settimanale di acido ascorbico (30 mg/ml) in soluzione ferrica nella

quantità di 1 ml per centimetro cubo di tessuto, mediante infiltrazione del liquido con un ago da 6 mm 30 G inserito verticalmente al piano cutaneo. Le infiltrazioni eseguite sono state 10 per zona, per un totale di 20 millilitri per seduta.

Sono state eseguite un massimo di tre sedute per paziente con una cadenza settimanale.

A questo primo gruppo di lavoro è stata abbinata un'ulteriore paziente con eccesso adiposo addominale. La paziente è stata trattata con 40 mg di acido ascorbico in soluzione ferrica per centimetro cubo di tessuto. È stata trattata solo una parte dell'addome per verificare il risultato anche su grandi volumi di tessuto adiposo. Sono state eseguite 3 sedute prima di verificare il risultato parziale.

Risultati

Il gruppo di pazienti trattate per la diminuzione del volume di tessuto a livello delle nasogeniene e della porzione inferiore del volto hanno dato i seguenti risultati.

- In 7 pazienti si è rilevato un miglioramento in una sola seduta settimanale
- In 8 pazienti si è rilevato miglioramento con due sedute settimanali
- In 11 pazienti si è rilevato miglioramento con tre sedute settimanali
- In 4 pazienti si è non ha avuto risultati apprezzabili

Le 4 pazienti senza risultato hanno denunciato di aver fatto nel tempo numerosi impianti di filler, evidenziando che l'eccesso volumetrico era determinato da tessuto fibrotico sviluppatosi in conseguenza della permanenza del filler.

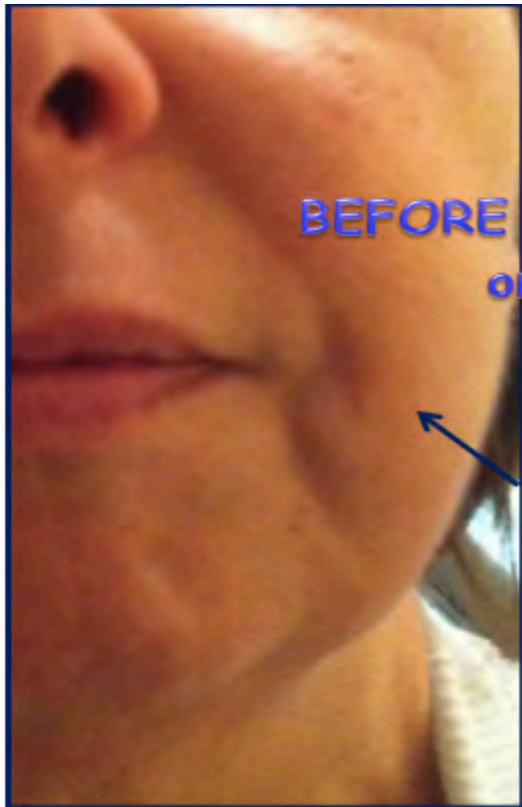
In tutte le pazienti, dopo l'infiltrazione è esitato un edema, dovuto alla quantità di liquido introdotta, che è scomparso in poche ore.

Immediatamente dopo l'infiltrazione è riferito un dolore che permane per qualche minuto.

Nessun altro effetto collaterale è stato evidenziato.

Riportiamo alcune delle foto prima e dopo:





BEFORE

one session



AFTER



BEFORE

one session



AFTER



BEFORE

one session +



AFTER

fenol peeling



La paziente con eccesso adiposo addominale localizzato ha evidenziato un notevole miglioramento che può essere notato nella foto in allegato.



Conclusioni

Il trattamento di apoptosi per gli eccessi volumetrici del viso e del corpo si è rivelato un trattamento semplice e sicuro che porta a rapidi risultati. L'apoptosi può essere indotta solo a livello cellulare e questo spiega l'assenza di risposta sugli eccessi volumetrici dovuti a tessuto connettivale.

Le risposte negative che seguono al trattamento sono di breve durata e prive di rischio. Il dolore scompare in pochi minuti e l'edema entro poche ore.

Possibile, vista l'iniezione profonda, la comparsa di piccoli ematomi.

Bibliografia

1. Alberts, Keith; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts; Walter, Peter (2008). "Chapter 18 Apoptosis: Programmed Cell Death Eliminates Unwanted Cells". *Molecular Biology of the Cell* (textbook) (5th ed.). Garland Science. p. 1115.
2. Apoptosis Interest Group (1999). "About apoptosis". Retrieved 2006-12-15.
3. Carr A, Frei B Does vitamin C act as a prooxidant under physiological conditions? *FASEB J.* 1999 Jun;13(9):1007-24.
4. Ceccarelli M, García J. V., *Il Medical Face Lifting: Rigenerazione dei Tessuti del Volto*, *The Physiological Medical Letter* Vol. I Gennaio 2010 N° 1

5. Cyrelys Collazo, Osmani Chacón, Orlando Borrás (2006). "Programmed cell death in plants resembles apoptosis of animals". *Biotecnología Aplicada* 23: 1–10.
6. Dejean LM, Martinez-Caballero S, Manon S, Kinnally KW (February 2006). "Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins". *Biochim. Biophys. Acta* 1762 (2): 191–201.
7. Gao Yan Wei Qiang Chen ShiHai, The effect of local injection with vitamin C to adipocytes apoptosis, *Journal of Chinese Medicine Research*, 2009 Vol. 9 No. 6 pp. 325-329
8. Okabe E, Odajima C, Taga R, Kukreja RC, Hess ML, Ito H. The effect of oxygen free radicals on calcium permeability and calcium loading at steady state in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Mol Pharmacol.* 1988 Sep;34(3):388-94.
9. Sakagami H, Satoh K, Ohata H, Takahashi H, Yoshida H, Iida M, Kuribayashi N, Sakagami T, Momose K, Takeda M., Relationship between ascorbyl radical intensity and apoptosisinducing activity, *Anticancer Res.* 1996 SepOct;16(5A):2635-44
10. Terri Sundquist, M.S., Rich Moravec, B.S., Andrew Niles, M.S., Martha O'brien, Ph.D., And Terry Riss, Ph.D., Timing Your Apoptosis Assays, *Cell Notes Issue* 16 2006