

The Physiological Medical Letter

Vol. XII

April 2017

N° 1

UPDATE OF THE SKIN REGENERATION PROTOCOL

Maurizio Ceccarelli & Coll.

Premessa

I fattori di crescita sono dei piccoli frammenti proteici appartenenti al gruppo delle citochine, prodotti da vari tipi di cellule e tessuti, capaci di attivare od inibire le funzioni cellulari.

I fattori di crescita sono stati scoperti dalla professoressa Rita Levi Montalcini in collaborazione con il professor Cohen, nel lontano 1954. I due scienziati hanno successivamente codificato i meccanismi biologici indotti dai fattori di crescita.

I fattori di crescita, per svolgere la loro azione si legano a particolari recettori, detti recettori della tirosin-kinasi e questo legame determina una serie di attivazioni intracellulari che portano alla risposta biologica. I recettori della tirosin-kinasi sono così chiamati perché hanno, nella loro porzione intracellulare, dei residui di tirosina che si fosforilano, una volta attivato il recettore.

La fosforilazione dei residui di tirosina innesca le reazioni di risposta cellulare. Queste risposte iniziano con l'attivazione del Growth Factor Receptor-Bound Protein 2, alla quale segue, con l'attivazione del RAS, la formazione della Mitogen Activated Protein Kinase. Questo induce la moltiplicazione cellulare.

La MAPK attiva anche l'AP-1 Transcription Factor, necessario alla lettura del DNA. L'AP-1 Transcription Factor, con i geni Jun e Fos, permette l'attacco della RNA-Polimerasi sul DNA per consentire, dopo la trascrizione, la sintesi proteica.

A tutto ciò consegue l'aumento del numero di cellule e l'aumento dei prodotti della sintesi di queste. La risposta finale di questi meccanismi intracellulari determinano sia la moltiplicazione cellulare, sia l'aumento della funzione metabolica.

L'importanza della scoperta del Nerve Growth Factor e delle sue funzioni biologiche ha portato, nel 1986, la prof.ssa Rita Levi Montalcini a ricevere il Premio Nobel per la Medicina. L'importanza della scoperta dell'Epidermal Growth Factor e delle sue funzioni biologiche ha portato, nel 1986, il prof. Stanley Cohen a ricevere il Premio Nobel per la Medicina.

Nel 1971 si inizia a parlare di fattori biologicamente attivi presenti nel sangue. E, nel 1974, si afferma che, fattori biologicamente attivi, liberati dalle piastrine, agiscono sulla proliferazione cellulare.

Nel 1999 il dott. Eduardo Anitua, in Spagna, inizia ad utilizzare il PDGF per migliorare i processi di riparazione. In questi lavori, i fattori di crescita piastrinici, venivano applicati sopra la lesione e inducevano una più rapida riparazione della lesione. Per una corretta risposta clinica, nell'applicazione topica, si richiede l'aumento delle concentrazioni piastriniche di 5 -10 volte rispetto al normale (PRP).

Nel 2001, il Prof. Victor Garcia inizia la biostimolazione della cute con fattori di crescita piastrinici, introducendoli direttamente all'interno del derma ed inducendo una rigenerazione del tessuto cutaneo.

Ricordiamo che con il termine di rigenerazione intendiamo un processo fisiologico che porta alla continua ricostruzione dei tessuti labili. Cioè, nella rigenerazione, abbiamo una normalizzazione della quantità di un tessuto funzionale.

È molto importante differenziare il concetto di rigenerazione da quello della riparazione. Nella rigenerazione normalizziamo la quantità del tessuto diminuito per invecchiamento, stimolando la nuova formazione di nuovo tessuto uguale a quello perso, ricco di collagene reticolare. Otteniamo una normalizzazione quantitativa di tessuto funzionale.

Con il termine di riparazione, invece, intendiamo un processo fisiopatologico che porta al compenso di un danno tessutale con la neoformazione di un nuovo tessuto (tessuto fibrotico), ricco di collagene di I° tipo (cicatrizziale) e non funzionale.

Attivare la formazione di collagene reticolare è fondamentale per il ringiovanimento cutaneo. Infatti, l'aumento del collagene di I tipo caratterizza una cute invecchiata, mentre, l'aumento del collagene di III tipo caratterizza una cute giovane.

Lo studio iniziale

Per la formulazione di un corretto protocollo di rigenerazione della cute, il prof. Victor Garcia con il prof. Maurizio Ceccarelli hanno effettuato uno studio bibliografico utile ad approfondire gli effetti biologici dei fattori di crescita piastrinici.

I fattori di crescita sono contenuti nelle piastrine all'interno di specifici granuli (i granuli alfa). Le piastrine contengono vari tipi di granuli. I granuli alfa liberano PDGF, PF4, Fatt. V, Fatt. XIII, fibrinogeno, mentre i granuli delta (o corpi densi) liberano serotonina, ADP e calcio.

Attorno alle piastrine sono presenti numerosi altri fattori di crescita che contribuiscono alle funzioni biologiche di rigenerazione tessutale. Tra questi, quello a più alta concentrazione è l'Insulin Like Growth Factor.

I fattori di crescita liberati dalle piastrine (principalmente PDGF e IGF) hanno una funzione specifica nella rigenerazione della cute e, in particolare, sulla sintesi della matrice dermica e sull'attivazione fibroblastica.

Un lavoro pubblicato su *J. Biol Chem* nel luglio del 2008 ci dice che:

- già con solo con 5 ng/ml di fattori di crescita piastrinici si ha una forte induzione alla proliferazione fibroblastica.

Un lavoro pubblicato su *Blood* nell'agosto del 1984 ci dice che:

- la concentrazione di PDGF, in un siero umano sano, dopo la degranolazione piastrinica, è di circa 20 ng/ml.

Ogni piastrina libera, quando attivata e degranolata, un quantità di 7.5×10^{-8} nanogrammi di PDGF.

Da quanto esposto, essendo presente nel plasma intero una quantità di fattori di crescita piastrinici quattro volte quella necessaria a stimolare le funzioni biologiche cellulari, utilizziamo, nel nostro trattamento di rigenerazione, tutto il plasma raccolto dopo la centrifugazione del sangue intero.

I PDGF vengono liberati dalle piastrine legati ad un eparinoide. Distaccati da questo, in forma dimerica, si legano ai recettori della tirosinKinasi con attivazione cellulare.

Un lavoro pubblicato su *Blood* nell'agosto del 1984 ci dice che l'emivita del PDGF, liberato dall'eparansolfato, è molto breve, circa 2 minuti. Dopo questo tempo abbiamo un effetto biologico nullo.

Per questo non attiviamo la degranolazione piastrinica con l'aggiunta di calcio, ma introduciamo direttamente il plasma nel derma per consentire il legame delle piastrine al collagene connettivale, inducendo la loro attivazione e degranolazione, con la liberazione dei fattori di crescita, direttamente nel campo d'azione.

Inoltre, un lavoro del 2008 pubblicato su *Communicative & Integrative Biology* scrive che:

- dopo 6-8 ore da una stimolazione fibroblastica con PDGF si ha un reclutamento di recettori sulla superficie cellulare con aumento del loro numero.

Da ciò, dopo 6-8 ore da una prima stimolazione del fibroblasto con PDGF, nelle zone particolarmente danneggiate, effettuiamo una seconda fase utilizzando fattori di crescita piastrinici concentrati (PRP).

Il prof. Victor Garcia, in collaborazione con il dottor González Nicolás Albandea J. Antonio, ha valutato istologicamente, in un lavoro pubblicato sul *International Journal of Cosmetic Medicine and Surgery*, la risposta dermica alla introduzione di PDGF.

Dopo 7 giorni dalla biostimolazione con PDGF abbiamo il massimo dell'angiogenesi, cioè una nuova produzione di vasi ed un miglioramento della microcircolazione nel tessuto stimolato.

Dopo 30 giorni dalla biostimolazione dermica con fattori di crescita abbiamo un'alta concentrazione di fibroblasti attivati (proliferazione). Dopo due mesi abbiamo la neoformazione di una matrice giovanile ricca in collagene di III tipo (reale ringiovanimento).

Sulle basi scientifiche esposte è stato creato il corretto protocollo di rigenerazione della cute con la introduzione intradermica di PDGF.

Gli studi di Garcia e Ceccarelli sono, poi, andati avanti fino ad ottenere il protocollo finale di rigenerazione di tutti i tessuti del volto, definito *Full Face Medical Regeneration*. Il protocollo finale è stato pubblicato nel 2010 su *The Physiological Medical Letter*.

Con il *Full Face Medical Regeneration* possiamo rigenerare:

- L'epidermide
- Il derma
- L'ipoderma
- L'osso

Per questo utilizziamo anche il termine di *Medical Face Lifting*.

Per ottenere quanto esposto utilizziamo tutti prodotti autologhi, ottenuti dal paziente, ed in particolare:

- Autologus Platelets Derived Growth Factors
- Autologus Platelets Rich Plasma
- Autologus Plasmatic Fibrin
- Autologus Adult Fat Stem Cells
- Autologus Biological Tissue Support + Tricalcium Phosphate

L'attualità

Sulle basi delle risposte cliniche ottenute in quindi anni di trattamento rigenerativo della cute, il prof. Ceccarelli ha, recentemente, approfondito le cause dei diversi risultati ottenuti su pazienti giovani e su pazienti anziane: studiando la soluzione per la scarsa risposta ottenibile sulle cuti anziane.

Il fibroblasto vecchio presenta due caratteristiche negative: la riduzione del numero di recettori, con ridotta risposta alla stimolazione, e la scarsa capacità produttiva per collagene reticolare e proteoglicani rispetto alla produzione di collagene fibrotico.

Inoltre, il fibroblasto vecchio ha raggiunto già un elevato numero di mitosi e la stimolazione proliferativa dei PDGF facilita il raggiungimento del Limite di Hayflick con morte della cellula.

La soluzione a questo problema richiede la neoformazione di fibroblasti giovani.

I fibroblasti, come tutte le cellule di derivazione mesodermica, richiedono la differenziazione di cellule staminali mesenchimali inserite nell'ambiente idoneo alla neoformazione fibroblastica. Da questo, si richiederebbe prima l'introduzione intradermica di cellule staminali mesenchimali e, successivamente, l'applicazione dei fattori di crescita piastrinici.

Questo determina una problematica nell'attuazione del trattamento rigenerativo della cute.

Infatti, per ottenere questo protocollo, dobbiamo prelevare la frazione vascolo-stromale del tessuto adiposo, perché studi d'immunoistochimica e di immunofluorescenza hanno dimostrato che le cellule staminali si trovano proprio nella zona del connettivo perivasale mescolate con i periciti. Una volta estratto il tessuto adiposo, si deve prima frammentare il lipoaspirato, meccanicamente, per ottenere piccole particelle di tessuto più facilmente attaccabili dalla collagenasi. Poi, dobbiamo trattare il grasso frammentato con la collagenasi per liberare le cellule staminali. Una volta solubilizzato il connettivo, dobbiamo effettuare numerosi lavaggi per eliminare le tracce di collagenasi ed ottenere le cellule staminali da iniettare.

Quanto esposto, limita notevolmente la nostra possibilità d'uso della rigenerazione cutanea. Infatti, l'aspirazione del grasso richiede un ambulatorio chirurgico e il processo di separazione e purificazione delle cellule staminali richiede un ambiente sterile e protetto.

Tutto ciò limitava la possibilità di eseguire la rigenerazione cutanea in un normale ambulatorio medico. Abbiamo, perciò, approfondito i nostri studi per risolvere questo problema.

La letteratura scientifica ci dice che in tutti i tessuti sono presenti cellule staminali.

Queste cellule hanno la funzione di rigenerare un tessuto sottoposto ad un danno lieve. Un grande danno determina, invece, un processo riparativo (cicatriziale) dei volumi cellulari persi, per apoptosi o necrosi.

Esiste, inoltre, un pool di cellule staminali circolanti, continuamente, nel sangue. Quando un tessuto subisce un lieve danno, richiama queste cellule che si muovono per diapedesi fino a raggiungere il tessuto per rigenerarlo. Il richiamo e lo stimolo a differenziarsi alle cellule mesenchimali è dato dall'infiammazione che segue al danno del tessuto. In particolare, dalla liberazione del transforming growth factor beta.

Le cellule staminali in fase latente sono presenti anche nella cute.

Da tutto ciò, non riteniamo necessario introdurre nuove cellule staminali nella cute per formare giovani fibroblasti, ma, semplicemente, stimolare la differenziazione di quelle già presenti, in fase quiescente.

La letteratura scientifica ci dice che lo stimolo alla differenziazione delle cellule staminali quiescenti è fatto dalla liberazione di piccole quantità di ROS (radicali liberi dell'ossigeno).

Tutto ciò ci conferma che i ROS rappresentano dei mediatori intracellulari che regolano le funzioni della cellula. In piccole quantità inducono la differenziazione delle cellule staminali quiescenti, mentre in alta quantità inducono l'apoptosi cellulare.

Concludendo, nei nostri tessuti, e nella cute, sono presenti cellule staminali quiescenti. Queste, sottoposte ad un piccolo danno (ROS) si attivano e si differenziano rigenerando il tessuto.

Da queste affermazioni scientifiche, nel novembre 2015, presso il Centro di Dermatologia Sperimentale dell'Hospital Universitario Ramón y Cajal di Madrid, si è impostato un lavoro di rigenerazione cutanea mediante l'applicazione di un trattamento di terapia fotodinamica a basso dosaggio.

Nel lavoro si propone di applicare una bassa concentrazione di ALA (acido aminolevulinico) e di stimolare, con luce rossa a 630 nm a bassa energia, la liberazione di una piccola quantità di ROS, capaci di non produrre apoptosi o necrosi, ma la differenziazione delle cellule staminali quiescenti.

La letteratura scientifica ci dice che basse concentrazioni di ROS (0,1-0,5 mMoli) stimolano la differenziazione delle cellule staminali quiescenti, mentre concentrazioni più alte (superiori a 1,0 mMoli) stimolano l'apoptosi cellulare.

Da ciò, liberare ROS in concentrazione superiore a 1,0 mMoli induce la morte cellulare per apoptosi, mentre concentrazioni inferiori, comprese tra 0,1 e 0,5 mMoli stimolano la differenziazione delle cellule staminali quiescenti.

Ci è sembrato difficile calcolare la corretta quantità di ROS utile alla differenziazione delle cellule staminali senza rischiare l'apoptosi, tramite l'applicazione di ALA e di luce a 630 nm. Per questo abbiamo ricercato una possibilità che ci consentisse un corretto calcolo stechiometrico dei ROS da produrre.

Nel 2009 avevamo iniziato ad utilizzare la liberazione di ROS in concentrazione di 5 mMoli per ottenere l'apoptosi degli adipociti. Una diluizione di questa soluzione poteva permetterci di attivare le cellule staminali quiescenti.

L'acido ascorbico, in presenza di ioni ferrici, attiva la reazione di Fenton con liberazione di ROS. Sulla base della reazione chimica descritta, è possibile calcolare, in maniera stechiometrica, la quantità di ROS liberati da una determinata quantità di acido ascorbico.

Per l'apoptosi utilizziamo una concentrazione di 5 mMoli di acido ascorbico in soluzione ferrica, la diluizione di questa può farci ottenere la concentrazione giusta per attivare le cellule staminali quiescenti.

Diluendo a 6 mg per litro l'acido ascorbico otteniamo una concentrazione di ROS di 0,34 mMoli, utile e sufficiente ad attivare la differenziazione delle cellule staminali quiescenti.

L'iniezione intradermica della soluzione preparata consente l'attivazione e la differenziazione delle cellule staminali quiescenti sia a livello del derma che a livello dell'epidermide.

Il processo di differenziazione cellulare si completa nell'arco di 21 giorni. Questo consente di ottenere dei nuovi fibroblasti giovani capaci di costruire una matrice giovanile.

Dopo 21 giorni attiviamo la proliferazione e l'attività metabolica dei fibroblasti neoformati con l'introduzione nel derma di fattori di crescita di derivazione piastrinica. Tutto ciò ci consente di ottenere un reale ringiovanimento cutaneo.

I ROS inducono la differenziazione delle cellule staminali quiescenti in nuovi fibroblasti. Il PDGF attiva la proliferazione e l'attività metabolica di questi. Si ottiene la rigenerazione del derma per neoformazione di collagene reticolare.

Il protocollo finale di rigenerazione cutanea prevede, quindi, prima l'attivazione differenziativa delle cellule staminali quiescenti e successivamente lo stimolo proliferativo e metabolico di queste.

La separazione dei fattori di crescita piastrinici

Vediamo ora la corretta tecnica di separazione e d'uso dei fattori di crescita.

Per prima cosa dobbiamo verificare i tubi di separazione. Dobbiamo scegliere delle provette contenenti un gel capace di separare i globuli rossi ed i polimorfonucleati dal plasma con le piastrine (ed i linfociti). La provetta deve contenere un anticoagulante e, in particolare, del Citrato di sodio al 3,8%. Questo sale, in presenza di calcio, forma un sale più stabile, il citrato di calcio. La sequestrazione del calcio porta all'impossibilità di far passare la protrombina in trombina e quindi impedisce la coagulazione del sangue.

Troviamo in commercio provette contenenti eparina come anticoagulante. L'eparina si lega a un fattore del sangue, l'antitrombina III, attivandola. L'AT-III, attivata, inattiva la trombina impedendo la coagulazione del sangue.

Queste provette non vanno utilizzate perché l'eparina danneggia le piastrine. La letteratura scientifica dimostra che l'eparina induce aggregazione delle piastrine, con conseguente degranolazione e perdita del PDGF. Inoltre, sempre riferimenti letterari, dimostrano che l'eparina determina la diminuzione del numero delle piastrine attive contenenti PDGF e della loro funzione biologica.

Quando acquistiamo un tubo da separazione di piastrine, dobbiamo, la prima volta che l'usiamo, verificare quante piastrine abbiamo dopo la centrifugazione. Questo valore può variare sulla base del tipo di gel separatore usato, del tipo di centrifuga, del numero di rotazioni per minuto e del tempo di centrifugazione.

Effettuiamo, perciò, una centrifugazione che, con la nostra centrifuga, ci consenta di separare la parte corpuscolata rossa e bianca, dal plasma con le piastrine. Preleviamo il plasma con le piastrine e confrontiamo, mediante un contaglobuli, la quantità di piastrine ottenuta, con quella presente nel sangue intero. Rapportando i due valori abbiamo il Fattore d'Incremento Piastrinico che utilizziamo per valutare quanto sangue dobbiamo prelevare.

Valutiamo, poi, la quantità di plasma necessaria al nostro trattamento.

Normalmente, la rigenerazione cutanea viene fatta a livello del volto, del collo, del décolleté e delle mani. Sviluppando il volume di tessuto che dobbiamo trattare otteniamo un valore medio di 60 centimetri cubi che rappresentano 60 millilitri. La letteratura ci dice che per attivare le cellule contenute in un millilitro di tessuto abbiamo bisogno di 5 nanogrammi di PDGF. 5 nanogrammi moltiplicati per 60 millilitri ci danno 300 nanogrammi. Questa è la quantità di fattori di crescita necessaria al trattamento di rigenerazione di tutte le zone descritte.

Sempre la letteratura ci dice che nel plasma normale (non concentrato in piastrine) abbiamo, dopo la degranolazione, 20 nanogrammi per millilitro di PDGF. Sappiamo che ogni piastrina è capace di liberare 7.5×10^{-8} nanogrammi di PDGF.

Con questo valore possiamo calcolare quante piastrine sono necessarie per ottenere 300 nanogrammi di PDGF.

Dividiamo 20 nanogrammi per 7.5×10^{-8} e otteniamo che le piastrine necessarie a liberare 20 nanogrammi di PDGF, corrispondono a 300 milioni per millilitro. 300 milioni per millilitro equivalgono a 300.000 per millimetro cubo.

Calcoliamo ora la quantità di sangue da prelevare.

Dividendo i 300 nanogrammi per millilitro necessari al trattamento per la quantità di PDGF presente in un millilitro, otteniamo il volume di plasma necessario al trattamento (15 ml).

Consideriamo, per esempio, che il nostro tubo ci consenta un Fattore d'Incremento Piastrinico di 0,86.

Moltiplichiamo il volume per il Fattore d'Incremento Piastrinico e otteniamo il volume di plasma necessario.

Dobbiamo ora, rapportare il volume di plasma alla reale quantità di piastrine della nostra paziente. Abbiamo visto che per avere 20 ng/ml di PDGF dobbiamo avere 300.000 piastrine per millimetro cubo. Il valore delle piastrine del paziente può essere superiore o inferiore, questo richiede una variazione nel volume da usare. Calcoliamo, perciò, un fattore di correzione dividendo il valore teorico per quello del paziente. Calcoliamo ora la quantità di sangue da prelevare. Considerando, poi, il valore dell'ematocrito del paziente possiamo risalire al volume di sangue che dobbiamo prelevare.

Un ematocrito di 0,4 ci dice che dopo centrifugazione del sangue otterremo il 60% di plasma e il 40% di parte corpuscolata. Facendo la dovuta proporzione vediamo che per ottenere 13 ml di plasma da un sangue con un ematocrito di 0,4 e un valore di piastrine di 300.000 (Fattore 1), dobbiamo prelevare 21,7 ml di sangue intero.

Calcolato il sangue da prelevare, vediamo come separare il plasma dopo centrifugazione per ottenere, sia il plasma intero, sia il plasma ricco in piastrine (PRP).

Dopo aver centrifugato il sangue, otteniamo una separazione tra globuli rossi e polimorfonucleati, posti sotto il gel, e mononucleati e piastrine, posti sopra il gel.

Ruotiamo per inversione il tubo per sospendere le piastrine all'interno del plasma e, a provetta invertita, perforiamo il tappo di gomma e preleviamo tutto il plasma (Plasma Intero).

Per il PRP, dopo aver centrifugato il sangue, otteniamo una separazione tra globuli rossi e polimorfonucleati, posti sotto il gel, e mononucleati e piastrine, posti sopra il gel.

Inseriamo un ago all'interno della provetta e aspiriamo i due terzi superiori del plasma.

Ruotiamo per inversione il tubo per sospendere le piastrine all'interno del volume di plasma ridotto e, a provetta invertita, perforiamo il tappo di gomma e preleviamo il PRP.

Abbiamo detto che, con la separazione del sangue fatta con gel, otteniamo le piastrine mescolate con i leucociti mononucleati. Rispondiamo alla domanda: "La presenza di globuli bianchi nel plasma può essere negativa?"

Coloro che giudicano negativa la presenza di leucociti nel plasma da iniettare, affermano che, mentre le piastrine rigenerano il tessuto, i linfociti ed i polimorfonucleati portano a danno della matrice per liberazione di metalloproteinasi ed interleuchine infiammatorie.

Ma la letteratura è contrastante in proposito e troviamo, addirittura, lavori che affermano un miglior risultato clinico con l'uso di piastrine e leucociti.

Per comprendere meglio effettuiamo una valutazione biologica su cosa accade quando piastrine e leucociti si trovano nel derma.

Le piastrine, nel derma, si attivano unendosi al collagene connettivale tramite il fattore di von Willebrand. A questo processo segue la degranolazione con liberazione dei fattori di crescita.

I polimorfonucleati per attivarsi e liberare sostanze attive devono trovarsi in un ambiente infiammatorio. Mentre i linfociti liberano citochine infiammatorie solo in presenza di antigeni eterologhi.

Ne consegue che l'eventuale presenza di leucociti nel nostro trattamento non ha risultati positivi o negativi.

La separazione della Fibrina Autologa

Vediamo ora come separare il plasma del paziente per ottenere la fibrina autologa (APF). Dobbiamo fare un prelievo di sangue venoso in una provetta che non contenga né anticoagulante né attivatore della coagulazione. Questo ci consente, dal momento del prelievo, un tempo di lavoro di circa 12 minuti (tempo fisiologico della coagulazione plasmatica).

Lo scopo dell'infiltrazione intradermica dell'APF è creare uno scaffold dove i fibroblasti migrano e ottenere, in quella zona, una rigenerazione preferenziale del tessuto. Per far durare più a lungo lo scaffold di fibrina, dobbiamo rallentare la retrazione del coagulo alla quale segue la trasformazione del plasminogeno in plasmina che distrugge il coagulo.

Effettuiamo, quindi, una centrifugazione rapida ad alto numero di giri per allontanare le piastrine ed evitare la liberazione della trombostenina (reactozyme) responsabile della retrazione del coagulo. Dopo la centrifugazione, preleviamo tutto il plasma già in fase di coagulazione. Prima d'infiltrarlo, possiamo aggiungere acido tranexamico (acido amino capronico) per impedire il passaggio del plasminogeno in plasmina (una goccia è sufficiente per 10 ml).

Update sulla Rigenerazione Cutanea

Vediamo ora, in pratica, la procedura della rigenerazione cutanea.

Al tempo 0 (inizio del trattamento) stimoliamo la neoformazione di giovani fibroblasti liberando, nel derma, 0,34 mMoli di ROS, mediante l'uso di una soluzione di acido ascorbico in presenza di ferro ferrico.

Iniettiamo, con ponfi intradermici in tutta la superficie da stimolare, 10 millilitri di soluzione fisiologica con, all'interno, 6 mg di acido ascorbico in acqua sterile e ferro ferrico, corrispondente a 0,34 mMoli di ROS.

Quando parliamo di millimoli si parla dei milligrammi di una sostanza divisi per il peso molecolare di questa (176,12 nel caso dell'acido ascorbico), sciolti in un litro di soluzione.

Effettuando il calcolo nel nostro caso, vediamo che per ottenere una concentrazione di 0,34 mMoli dobbiamo solubilizzare circa 60 mg di acido ascorbico in un litro di soluzione.

60 milligrammi per litro sono 0,6 mg in 10 millilitri.

Nella soluzione utilizzata per l'apoptosi, usiamo 30 milligrammi per millilitro. Quindi, 0,2 millilitri di questa contengono 6 milligrammi.

Nella nostra preparazione solubilizziamo i 6 milligrammi (0,2 millilitri) in 10 millilitri di soluzione fisiologica e abbiamo la soluzione di 0,34 mMoli.

Questo trattamento iniziale ci consente di stimolare la differenziazione delle cellule staminali presenti nella cute nell'arco di 21 giorni. Otteniamo così dei nuovi fibroblasti giovani capaci di costruire una matrice giovanile.

Dimettiamo il nostro paziente prescrivendo la conta delle piastrine e il valore ematocrito per determinare, alla seconda fase del trattamento, il sangue da prelevare.

Dopo 21 giorni, il paziente ritorna per la seconda fase del trattamento e preleviamo la quantità di sangue necessaria per trattare tutte le zone interessate con plasma intero. Questo consente la stimolazione proliferativa e metabolica dei giovani fibroblasti neoformati.

Utilizziamo plasma intero perché la quantità di PDGF presente per millilitro è quattro volte quella necessaria a stimolare le cellule contenute nello stesso volume.

Utilizziamo provette contenenti un gel capace di separare i globuli rossi ed i polimorfonucleati dal plasma con le piastrine (ed i linfociti) e citrato di sodio come anticoagulante.

Effettuiamo, sulla base dei valori ematochimici del paziente, le correzioni necessarie a calcolare il volume corretto di sangue da prelevare.

Centrifughiamo il sangue (mediamente a 2500 rpm per 5 min) otteniamo una separazione tra globuli rossi e polimorfonucleati, posti sotto il gel e mononucleati e piastrine, posti sopra il gel.

Ruotiamo per inversione il tubo per sospendere le piastrine all'interno del plasma e, a provetta invertita, perforiamo il tappo di gomma e preleviamo tutto il plasma.

Effettuiamo la biostimolazione dermica su viso, collo, décolleté e mani, infiltrando il plasma con un ago da 4 mm 30 G.

Ci assicuriamo l'introduzione intradermica visionando la formazione del ponfo. Questo porta le piastrine a contatto con il collagene dermico, alla loro attivazione e alla successiva degranulazione.

Il PDGF viene liberato dalle piastrine legato ad un eparinoide. Distaccato da questo, in forma dimerica, si lega ai recettori della tirosinKinasi con attivazione cellulare. La liberazione il loco ci assicura il completo effetto biologico del PDGF, nonostante la sua breve vita.

Sia il PDGF che l'eparinoide carrier hanno una funzione importante nella rigenerazione della cute. Il PDGF attiva i recettori della tirosin kinasi e l'eparinoide svolge un'azione antitrombotica.

La microcircolazione del plesso dermico è particolarmente rallentata, sia per la ridotta dimensione dei capillari, sia per la loro forma ad ansa. Questo rallentamento di flusso facilita la formazione di piccoli trombi. L'eparinoide, con la sua funzione antitrombotica, solubilizza i microtrombi facilitando il microcircolo dermico ed il metabolismo cutaneo.

Possiamo verificare il processo di degranulazione piastrinica e l'azione del PDGF con la contemporanea degranulazione dei corpi densi o granuli delta. La degranulazione di questi, che accompagna la degranulazione dei granuli alfa (con liberazione di PDGF), libera serotonina. Quindi, la sicurezza della degranulazione piastrinica l'abbiamo attraverso l'osservazione degli effetti che conseguono la liberazione della serotonina dai granuli densi. La serotonina a livello cutaneo induce rossore, calore e prurito al paziente indicandoci la liberazione anche dei fattori di crescita.

Nei soggetti dove i segni dell'invecchiamento cutaneo sono più evidenti, possiamo effettuare, per potenziare la risposta biologica, una seconda biostimolazione dopo 6-8-ore.

La seconda biostimolazione si fa dopo questo tempo perché, dopo 6-8 ore abbiamo un reclutamento recettoriale sui fibroblasti con aumento del numero di recettori sulla superficie del fibroblasto e, quindi, una seconda biostimolazione con una quantità maggiore di PDGF, induce una risposta biologica superiore.

Da ciò, nella seconda fase utilizziamo i fattori di crescita piastrinici concentrati, cioè il Plasma Ricco in Piastrine (PRP).

In questo caso, effettuiamo la separazione del plasma con centrifugazione, ma, prima di risospendere le piastrine, asportiamo i due terzi superiori del plasma. Dopo omogeneizziamo la concentrazione piastrinica per inversione della provetta e otteniamo una concentrazione piastrinica triplicata rispetto l'iniziale.

Effettuiamo la biostimolazione solo nelle zone più danneggiate del volto, dove richiediamo una risposta metabolica maggiore, sempre introducendo le piastrine nel derma, per consentire il contatto col collagene e la degranulazione..

La rigenerazione cutanea induce proliferazione fibroblastica (aumento di numero) e successiva neoformazione di matrice giovanile ricca in collagene di III tipo (ringiovanimento).

La proliferazione avviene entro 30 giorni dal primo trattamento con PDGF, con un picco numerico massimo di fibroblasti attivati.

E' utile indirizzare il lavoro di queste cellule nei punti di maggior necessità ed ottimizzare il loro lavoro somministrando precursori biologici. Anche la normalizzazione del pH ambientale è importante per formare matrice giovanile.

Da ciò, dopo 30 giorni, effettuiamo una nuova biostimolazione con aminoacidi precursori dei componenti del derma e tampone bicarbonato. Prima, infiltriamo della fibrina per indirizzare il lavoro dei fibroblasti in particolari punti.

La fibrina plasmatica autologa (APF) forma uno scaffold, dove richiediamo una rigenerazione preferenziale, quale base di movimento e di funzione dei fibroblasti. In particolare infiltriamo le rughe superficiali, le depressioni e le mani. In questi punti otteniamo una rigenerazione più evidente con conseguente riduzione della problematica estetica.

L'introduzione di aminoacidi precursori consente di formare, secondo i principi dell'endomodulazione, la giusta concentrazione dei componenti della matrice. La regolazione del pH al valore fisiologico di 7,4 consente la formazione di collagene reticolare. Infatti, in ambiente acido, ricco di cariche positive, abbiamo una più facile secrezione di frammenti carbossiterminali (con carica negativa) e miglior formazione di collagene di I° tipo.

Effettuiamo questa ultima biostimolazione dermica, a tappeto, su viso, collo, décolleté e mani.

Il ciclo completo di rigenerazione cutanea viene ripetuto due volte l'anno.

Bibliografia

1. *Abhishek Sohni and Catherine M. Verfaillie Mesenchymal Stem Cells Migration Homing and Tracking Stem Cells International Volume 2013 (2013), Article ID 130763, 8 pages*
2. *Ae-Ri Ji,1,2,* Seung-Yup Ku,1,2,* Myung Soo Cho,3 Yoon Young Kim,2 Yong Jin Kim,1 Sun Kyung Oh,2 Seok Hyun Kim,1,2 Shin Yong Moon,1,2 and Young Min Choicorresponding author1,2 Reactive oxygen species enhance differentiation of human embryonic stem cells into mesendodermal lineage Exp Mol Med. 2010 Mar 31; 42(3): 175-186.*
3. *Anitua E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. Pract Proced Aesthet Dent. 2001 Aug;13(6):487-93; quiz 487-93.*
4. *Barbara Gunnella, Maurizio Ceccarelli Attivazione cellule staminali quiescenti The Physiologica Medical Letter Vol.XI September 2016 N°2*
5. *Borregaard NI, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. Blood. 1997 May 15;89(10):3503-21.*
6. *Bowen-Pope DF, Malpass TW, Foster DM, Ross R. Platelet-derived growth factor in vivo: levels, activity, and rate of clearance. Blood. 1984 Aug;64(2):458-69.*
7. *Carr AI, Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? FASEB J. 1999 Jun;13(9):1007-24.*
8. *Cell Transplant. 2012;21(2-3):601-7*
9. *De Donatis A, Cirri P. Understanding the specificity of receptor tyrosine kinases signaling. Commun Integr Biol. 2008;1(2):156-7.*
10. *De Donatis A, Comito G, Buricchi F, Vinci MC, Parenti A, Caselli A, Camici G, Manao G, Ramponi G, Cirri P. Proliferation versus migration in platelet-derived growth factor signaling: the key role of endocytosis. J Biol Chem. 2008 Jul 18;283(29):19948-56.*
11. *Dhurat RI, Sukesh MI. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. J Cutan Aesthet Surg. 2014 Oct-Dec;7(4):189-97. doi: 10.4103/0974-2077.150734.*
12. *Dieter Paul, Allan Lipton, and Ingrid Klinger Serum Factor Requirements of Normal and Simian Virus 40-Transformed 3T3 Mouse Fibroblasts Proc Natl Acad Sci U S A. 1971 Mar; 68(3): 645-648.*
13. *Eika C. The Platelet Aggregating Effect of Eight Commercial Heparins, Scandinavian Journal of Haematology, Volume 9, Issue 1-6, pages 480-482, March 1972*
14. *Elisa Carrasco, María I. Calvo, Alfonso Blázquez-Castro, Daniela Vecchio, Alicia Zamarrón, Irma Joyce Dias de Almeida, Juan C. Stockert, Michael R. Hamblin, Ángeles Juarranz, and Jesús Espada1, Photoactivation of ROS production in situ transiently activates cell proliferation in mouse skin and in the hair follicle stem cell niche promoting hair growth and wound healing J Invest Dermatol. 2015 Nov; 135(11): 2611-2622.*
15. *García Giménez J. Víctor - González Nicolás Alban J. Antonio Tratamiento del envejecimiento cutáneo mediante bioestimulación con factores de crecimiento autógenos International Journal Of Cosmetic Medicine And Surgery Volume 7 - numero 2 - 2005*
16. *Jai Pal Singh, Margery A. Chaikin and Charles D. Stiles Phylogenetic Analysis of Platelet-Derived Growth Factor by Radio-Receptor Assay The Journal of Cell Biology Vol. 95, No. 2, Part 1 (Nov., 1982), pp. 667-671*
17. *John Tower Stress and stem cells Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2012 Nov-Dec; 1(6): 10.1002/*
18. *Kawazoe T, Kim HH. Tissue augmentation by white blood cell-containing platelet-rich plasma.*
19. *Malmström J, Westergren-Thorsson G. Heparan sulfate upregulates platelet-derived growth factor receptors on human lung fibroblasts. Glycobiology. 1998 Dec;8(12):1149-55.*
20. *Maurizio Ceccarelli J. Víctor García Full Face Regeneration: theoretical and practical protocol*

21. Maurizio Ceccarelli *Trattamento delle adiposità localizzate per apoptosi degli adipociti* *The Physiologica Medical Letter* Vol.V Dicembre 2011 N°4
22. Mishra PJ, Banerjee D. *Activation and differentiation of mesenchymal stem cells.* *Methods Mol Biol.* 2011;717:245-53.
23. Patrick C. Baer and Helmut Geiger *Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity* *Stem Cells Int.* 2012; 2012: 812693.
24. R Levi-Montalcini *The nerve growth factor: thirty-five years later.* *EMBO J.* 1987 May; 6(5): 1145-1154.
25. Roberts DE1, McNicol A, Bose R. *Mechanism of collagen activation in human platelets.* *J Biol Chem.* 2004 May 7;279(19):19421-30.
26. Rong YH1, Zhang GA, Wang C, Ning FG. *Quantification of type I and III collagen content in normal human skin in different age groups.* *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* 2008 Feb;24(1):51-3.
27. Russell Ross, John Glomset,† Beverly Kariya, and Laurence Harker *A Platelet-Dependent Serum Factor That Stimulates the Proliferation of Arterial Smooth Muscle Cells In Vitro* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974 Apr; 71(4): 1207-1210.
28. Stanley Cohen *Origins of Growth Factors: NGF and EGF* *J Biol Chem.* 2008 Dec 5; 283(49): 33793-33797.
29. Stanley Cohen, Rita Levi-Montalcini, and Viktor Hamburger *A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcom as 37 and 180** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1954 Oct; 40(10): 1014-1018.
30. Sudhir Gupta, William E. Paul, Ralph Steinman *Mechanisms of Lymphocyte Activation and Immune Regulation X: Innate Immunity* Springer US, 28 apr 2005 - 163 pagine
31. *The Physiologica Medical Letter* Vol.2 May 2010 N°1
32. Tullia Maraldi, Cristina Angeloni, Elisa Giannoni and Christian Sell *Reactive Oxygen Species in Stem Cells* *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 2015: 159080.
33. Valerie Horsley, Antonios O. Aliprantis, Lisa Polak, Laurie H. Glimcher and Elaine Fuchs *NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells* *Cell.* 2008 Jan 25; 132(2): 299-310.