

Titolo: Applicazioni della medicina rigenerativa nel trattamento degli esiti cicatriziali atrofici sul volto: utilizzo di innesti adiposi autologhi “nano-fat” in combinazione con gel piastrinico e laser frazionato a CO2.

Autore principale: Dott. Mauro Barone

Autori secondari: Dott.ssa Stefania Tenna, Dott.ssa Maria Cristina Tirindelli, Dott. Vincenzo Panasiti, Dott.ssa Carolina Nobile, Prof. Paolo Persichetti

Dipartimento ed Istituzione: Chirurgia Plastica, Ricostruttiva ed Estetica del Campus Bio-Medico di Roma (Prof. Paolo Persichetti)

Indirizzo: Via Alvaro del Portillo, 200 Roma

Manoscritto

Sommario

L'acne è una patologia infiammatoria cronica dell'unità pilosebacea caratterizzata dalla presenza di lesioni cutanee polimorfe quali comedoni, papule, pustole, noduli e lesioni cistiche. Nonostante le numerose armi terapeutiche, sia topiche che sistemiche a disposizione del dermatologo, alcune forme di acne, specie quelle caratterizzate da un'inflammatione che si estende al derma profondo (forme nodulo-cistiche) esitano in cicatrici che hanno un forte impatto non soltanto estetico ma soprattutto psicologico. Gli esiti cicatriziali sono il più delle volte il risultato di un processo infiammatorio grave che si estende al derma così come accade nell'acne nodulo cistica; tuttavia possono derivare anche dalla manipolazione da parte degli stessi pazienti di lesioni acneiche meno gravi. Il management delle cicatrici da acne prevede l'utilizzo di diverse metodiche sia fisiche (laser, luce pulsata, crioterapia), chirurgiche (dermoabrasione, punch excision etc), fillers e peeling chimici. Nessuno di queste metodiche ad oggi, rappresenta il gold standard per il trattamento degli esiti cicatriziali da acne. Il presente studio pilota, no profit, di tipo prospettico, interventistico e randomizzato, ha come scopo quello di valutare l'efficacia degli innesti adiposi autologhi "nano-fat" addizionati con gel piastrinico (PRP) nella sua forma liquida ed utilizzati in combinazione con laser frazionato CO₂ nel trattamento degli esiti cicatriziali da acne. Si prefigge di selezionare pazienti con esiti cicatriziali inveterati e refrattari agli altri trattamenti descritti in letteratura. I pazienti saranno suddivisi con criterio casuale in 2 gruppi: gruppo 1 trattato con la metodica combinata, l'altro, gruppo 2, utilizzato come controllo, solo con l'infiltrazione di nano-fat e PRP. E' stato eseguito un unico trattamento sui pazienti ed è stata eseguita una valutazione a 6 mesi a mezzo di ecografia cutanea. In questo studio pilota la valutazione ecografica è il metodo obiettivo per giudicare i risultati ottenuti: a 6 mesi dal trattamento il gruppo 1 ha aumentato lo spessore cutaneo di 0,068 mm a destra e 0,059 mm a sinistra e lo spessore sottocutaneo di 0,35 mm a destra e 0,281 mm a sinistra; il gruppo 2 ha aumentato lo spessore cutaneo di 0,073 mm a destra e 0,083 mm a sinistra e lo spessore sottocutaneo di 0,29 mm a destra e 0,359 a sinistra.

Introduzione

L'acne è una patologia infiammatoria cronica dell'unità pilosebacea caratterizzata dalla presenza di lesioni cutanee polimorfe quali comedoni, papule, pustole, noduli e lesioni cistiche.

Da un punto di vista patogenetico, affinché si sviluppi la patologia, devono essere presenti alcune condizioni quali una ipersecrezione sebacea accompagnata da una ipercheratinizzazione dell'ostio follicolare che contribuisce alla creazione di un ambiente anaerobio nel quale viene favorita la crescita batterica, in particolare del *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), e lo sviluppo di una reazione infiammatoria.

Nonostante le numerose armi terapeutiche, sia topiche che sistemiche a disposizione del dermatologo, alcune forme di acne, specie quelle caratterizzate da un'inflammatione che si estende al derma profondo (forme nodulo-cistiche) esitano in cicatrici che hanno un forte impatto non soltanto estetico ma soprattutto psicologico. Gli esiti cicatriziali sono il più delle volte il risultato di un processo infiammatorio grave che si estende al derma così come accade nell'acne nodulo cistica; tuttavia possono derivare anche dalla manipolazione da parte degli stessi pazienti di lesioni acneiche meno gravi. Si riconoscono due forme di cicatrici: quelle ipertrofiche e quelle atrofiche distinte a loro volta in icepick, rolling e boxcar, di gran lunga di più comune riscontro. Il management delle cicatrici da acne prevede l'utilizzo di diverse metodiche sia fisiche (laser, luce pulsata, crioterapia), chirurgiche (dermoabrasione, punch excision etc), fillers e peeling chimici (1). Nessuno di queste metodiche ad oggi, rappresenta il gold standard per il trattamento degli esiti cicatriziali da acne.

Il nostro studio è stato realizzato in accordo con le regolamentazioni locali, con le norme internazionali di "Good Clinical Practice" nella Comunità Europea e con i principi della Dichiarazione di Helsinki.

Materiali e Metodi

Il presente studio pilota, no profit, di tipo prospettico, interventistico e randomizzato, ha come scopo quello di valutare l'efficacia degli innesti adiposi autologhi "nano-fat" addizionati con gel

piastrinico (PRP) nella sua forma liquida ed utilizzati in combinazione con laser frazionato CO₂ nel trattamento degli esiti cicatriziali da acne. Si prefigge di selezionare pazienti con esiti cicatriziali inveterati e refrattari agli altri trattamenti descritti in letteratura. I pazienti saranno suddivisi con criterio casuale in 2 gruppi (5 pazienti per ogni gruppo): uno trattato con la metodica combinata, l'altro, utilizzato come controllo, solo con l'infiltrazione di nano-fat e PRP.

Il numero totale dei pazienti è stato 10, con età compresa tra 18 e 38 anni, in buone condizioni cliniche generali, senza patologie sistemiche di base (tabella 1).

Il razionale dell'utilizzo del nano-fat + PRP si basa sulle evidenze cliniche presenti in letteratura riguardanti le terapie dimostrate fino ad ora efficaci nel modulare il processo di miglioramento degli esiti cicatriziali e della patologia da danno cutaneo da mezzi fisici.

Sono stati selezionati pazienti con esiti cicatriziali da acne inveterati in sede geniena bilaterale che sono stati informati sulle caratteristiche del nano-fat e del PRP, sull'esecuzione dei prelievi del sangue e del grasso, della loro combinazione per essere iniettati nelle aree cicatriziali del volto.

I pazienti sono stati selezionati in base ai seguenti criteri:

Criteri di Inclusione

- a) Pazienti tra i 18 e i 40 anni in buone condizioni di salute
- b) Pazienti con esiti cicatriziali da acne in regione geniena bilaterale.
- d) Pazienti che abbiano firmato e datato il consenso informato

Criteri di Esclusione

- a) Pazienti diabetici, neoplastici, affetti da collagenopatie, stati carenziali
- b) Patologie dermatologiche croniche e acute
- d) Pazienti con difetti della coagulazione e conta delle piastrine < 150.000/mm³
- e) Donne in gravidanza
- f) Acne in fase acuta

e) Terapia con antiaggreganti piastrinici o FANS

Qualora il paziente avesse deciso di sottoporsi allo studio avrebbe dovuto firmare e datare un Consenso Informato approvato dal Comitato Etico prima di iniziare qualsiasi procedura di screening specifica dello studio.

I pazienti sono stati inoltre classificati sulla base dei seguenti dati:

- Indagine anagrafica (data e luogo di nascita, sesso, razza)
- Anamnesi (prossima e remota con valutazione della eventuale terapia del paziente)
- Esame fisico con valutazione dei parametri vitali (PA, Fc, Temperatura ascellare)
- Valutazione dell'assenza di malattie dermatologiche croniche o acute
- Valutazione di assenza di infezione, edema, eritema, lesioni vascolari o traumatiche delle zone da trattare.
- Emocromo, PT, PTT e Fibrinogeno
- Valutazione dello spessore cutaneo di lesioni target pre e post trattamento mediante una sonda ecografica da 22MHz
- Valutazione fotografica del quadro clinico.

Al paziente, considerato arruolabile in base ai criteri di inclusione, è stato assegnato un numero.

I pazienti sono stati suddivisi, con criterio casuale, in 2 gruppi omogenei per eseguire il trattamento.

Il primo gruppo (numeri dispari) è stato sottoposto a resurfacing con laser frazionato seguito da infiltrazione di innesti adiposi autologhi nano-fat e PRP in concentrazione 2/10 (due unità di PRP ed 8 di tessuto adiposo) (figura 3 e 4). L'altro gruppo (numeri pari) solo a infiltrazione di innesti adiposi autologhi nano-fat e PRP in concentrazione 2/10 (figura 1 e 2).

Tutti i pazienti sono stati selezionati e seguiti dalla stessa equipe medica. Il trattamento è stato eseguito in regime di Day Hospital.

Il paziente ha eseguito presso il Centro Trasfusionale del Campus Bio Medico un prelievo di circa 30 cc di sangue che sono stati immediatamente centrifugati per essere re-iniettati entro le successive 8 ore.

Su ogni campione di PRP prodotto sono stati eseguiti controlli di qualità per definire lo standard di prodotto (conta delle piastrine sul PRP autologo, controllo di sterilità) presso il Centro Trasfusionale.

Il paziente è stato quindi sottoposto presso l'Ambulatorio Chirurgico, previa esecuzione del time out e controllo della sterilità e dello strumentario, a prelievo di circa 10 cc di tessuto adiposo dalla regione addominale o trocanterica con cannula pluriforata del diametro di 2 mm previa infiltrazione di anestetico locale (infiltrazione di 20 cc di soluzione formata da 10 cc di soluzione fisiologica e 10 cc di carbocaina al 2%).

Il tessuto adiposo è stato quindi processato mediante travaso manuale ripetuto 30 volte tra 2 siringhe da 10 cc opportunamente collegate con rubinetto. Al termine l'emulsione siero-emato-adiposa è stata addizionata con PRP precedentemente preparato ed iniettata in sede sottocutanea con aghi 27 G.

Dopo l'infiltrazione un gruppo di pazienti (5 pazienti) è stato sottoposto a resurfacing con Laser CO2 con i seguenti parametri: modalità High Peak, spaziatura 550 micron, Potenza 15 W

E' stata poi eseguita una medicazione con impacco di crema antibiotica e cortisonica e garza vaselinata. Il paziente è stato dimesso dopo un periodo di osservazione di 3 ore.

I dati relativi a ciascun paziente, i risultati delle valutazioni e gli eventuali eventi avversi riscontrati nel corso dello studio sono stati riportati in un'apposita Scheda Raccolta Dati, a cura dello Sperimentatore.

Le schede sono state conservate dagli Sperimentatori e consegnate alla Sperimentatore principale insieme alla documentazione fotografica al termine dello studio. Le valutazioni cliniche, fotografiche e strumentali sono state eseguite 4 volte rispettivamente prima di iniziare il trattamento (T0), dopo 1

mese dall'applicazione (T1), dopo 3 mesi dall'applicazione (T2), dopo 6 mesi dall'applicazione (T3). Durata della partecipazione del paziente: 6 mesi (figura 1,2,3 e 4).

Risultati

A gennaio 2014 il nostro protocollo di ricerca è stato approvato dal Comitato Etico del Campus Bio-Medico di Roma e dal 12 febbraio 2014 al 15 marzo 2014 sono stati arruolati 12 pazienti per il protocollo. 2 pazienti sono stati esclusi dal protocollo a causa delle piastrine $< 150.000/\text{mm}^3$. I 10 pazienti arruolati sono stati classificati secondo una numerazione progressiva, i numeri dispari avrebbero ricevuto un trattamento combinato di laser CO₂ ed infiltrazione di nanofat e PRP, i numeri pari avrebbero ricevuto un trattamento con la sola infiltrazione di nanofat e PRP. Sono state eseguite valutazioni di controllo successive a 1 mese, a 3 mesi e a 6 mesi ed ecografia cutanea delle regioni trattate a 6 mesi dal trattamento per mettere a confronto i dati ottenuti con quelli di partenza. Lo spessore cutaneo medio dei pazienti del gruppo 1 (numeri dispari) era di 0,034 mm a destra e 0,051 a sinistra e lo spessore medio del sottocute era di 0,235 mm a destra e 0,259 a sinistra. A 6 mesi dal trattamento lo spessore cutaneo medio dei pazienti è stato di 0,102 mm a destra e 0,11 a sinistra e lo spessore medio del sottocute è risultato 0,585 mm a destra e 0,54 a sinistra (tabella 2 e 3).

Lo spessore cutaneo medio dei pazienti del gruppo 2 (numeri pari) era di 0,031 mm a destra e 0,049 mm a sinistra e lo spessore medio del sottocute era di 0,245 mm a destra e 0,271 mm a sinistra. A 6 mesi dal trattamento lo spessore cutaneo medio dei pazienti è stato di 0,104 mm a destra e 0,132 a sinistra e lo spessore medio del sottocute è risultato 0,535 mm a destra e 0,63 a sinistra (tabella 2 e 3).

Discussioni

L'associazione di tessuto adiposo con i concentrati piastrinici è stata già documentata in precedenza nell'ambito della rigenerazione cellulare. In particolare, l'aspetto più significativo è l'associazione dell'effetto prevalentemente riempitivo delle cellule adipose a quello rigenerativo delle piastrine.

Tale procedura non prevede alcun tipo di conservazione o trattamento/manipolazione cellulare.

L'obiettivo è la valutazione dell'efficacia dell'utilizzo di innesti adiposi autologhi "nano-fat" e PRP in combinazione con laser frazionati o da soli nel trattamento degli esiti cicatriziali da acne.

Il nano-fat (2) è il prodotto finale di un processo di frammentazione meccanico di tessuto adiposo autologo prelevato dal paziente, non manipolato estensivamente, ed immediatamente reiniettato nello stesso paziente. Il tessuto adiposo può essere indistintamente prelevato da regioni corporee come quella addominale o trocanterica.

Il protocollo, in accordo con le norme vigenti (Decreto legislativo 6 novembre 2007, n. 191), non prevede la conservazione né la manipolazione estensiva del tessuto adiposo e delle cellule staminali in esso presenti.

Il nanofat è costituito prevalentemente da fattori di crescita e adipose derived stem cells (ADSC).

Con il termine PRP (dall'inglese Platelet Rich-Plasma) si intendono gli emocomponenti ad elevato contenuto piastrinico (3,4). I concentrati piastrinici possiedono effetti di rigenerazione tissutale mediante la liberazione di fattori di crescita a seguito di attivazione e degranulazione. I fattori di crescita coinvolti nei processi di riparazione tissutale sono il PDGF, il VEGF, l'EGF, l'IGF-1, l'FGF (3,4,5,6).

Nelle ferite acute i valori di TGF- β 1, PDGF, VEGF, bFGF, EGF vengono rilevati a livelli piuttosto elevati e inducono la guarigione della ferita. Tutti questi fattori vengono rilasciati dalle piastrine e leucociti nel PRP, quindi la sua applicazione ha come scopo quello di aumentare i loro livelli di accelerare la guarigione. Al contrario, nelle ferite croniche, i livelli di questi fattori di crescita stessi sono molto bassi. Pertanto, l'uso del PRP serve per integrare questi livelli ed accelerare il processo di guarigione. Molti studi riportano che il PRP sia efficace per il trattamento di ferite croniche.

Il prelievo per la produzione del PRP è ottenuto da sangue autologo. Il processo di produzione dell'emocomponente consiste in una manipolazione minima del sangue autologo caratterizzata da centrifugazione e separazione. Il processo di preparazione, che avviene in condizioni di sterilità, dura 2 ore ed il prodotto deve essere applicato entro 8 ore dal prelievo. Il volume di prelievo è di 8 ml per ottenere 2 ml di PRP, con una concentrazione finale di piastrine pari a 800.000-1.200.000, concentrazione ritenuta ottimale per il rilascio di quantità efficaci di fattori di crescita piastrinici (3,4,5,6,7,8).

Non sono stati registrati durante i 10 trattamenti eventi avversi o reazioni inaspettate e nell'arco della settimana successiva al trattamento i pazienti hanno riferito la risoluzione completa di eritema ed infiammazione causati dal trattamento laser o gonfiore e nodularità da accumulo causati dall'infiltrazione di nanofat e PRP.

In questo studio pilota la valutazione ecografica è il metodo obiettivo per giudicare i risultati ottenuti: a 6 mesi dal trattamento il gruppo 1 (figura 3 e 4) ha aumentato lo spessore cutaneo di 0,068 mm a destra e 0,059 mm a sinistra e lo spessore sottocutaneo di 0,35 mm a destra e 0,281 mm a sinistra; il gruppo 2 (figura 1 e 2) ha aumentato lo spessore cutaneo di 0,073 mm a destra e 0,083 mm a sinistra e lo spessore sottocutaneo di 0,29 mm a destra e 0,359 a sinistra (tabella 2 e 3).

Lo spessore cutaneo e sottocutaneo risulta quindi essere maggiore dopo il trattamento con la sola infiltrazione di nanofat e PRP che come un filler riempie le depressioni cutanee e regolarizza il livello cutaneo rendendolo da subito più omogeneo permettendo al paziente una percezione migliore del proprio volto.

Il trattamento combinato laser CO2 e infiltrazione di nanofat e PRP ha richiesto ai pazienti 4 giorni in media di prognosi, mentre il trattamento con la sola infiltrazione ha richiesto ai pazienti in media 2 giorni.

Dopo aver concluso questo studio pilota il nostro obiettivo futuro è un follow up ad un anno e un confronto con più trattamenti successivi nel tempo con un numero maggiore di pazienti.

Referenze

- (1) Current therapeutic approach to acne scars. Basta-Juzbašić A. *Acta Dermatovenerol Croat.* 2010;18(3):171-5. Review
- (2) *Plast Reconstr Surg.* 2013 Oct;132(4):1017-26. Nanofat grafting: basic research and clinical applications. Tonnard P, Verpaele A, Peeters G, Hamdi M, Cornelissen M, Declercq H.
- (3) Anitua E, Sanchez M, Orive G, Andia I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials.* 2007;28:4551-4560.
- (4) Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008;16:585-601
- (5) Villela DL, Santos VLGG. Evidence on the use of platelet-rich plasma for diabetic ulcer: a systematic review. *Growth Factors.* 2010;28:111-116.
- (6) Lacci KM, Dardik A. Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. *Yale J Biol Med.* 2010;83:1-9.
- (7) O'Connell SM, Impeduglia T, Hessler K, Wang XJ, Carroll RJ, Dardik H. Autologous platelet-rich fibrin matrix as cell therapy in healing of chronic lower-extremity ulcers. *Wound Repair Regen.* 2008;16:749-756.
- (8) Saad Setta H, Elshahat A, Elsherbiny K, Massoud K, Safe I. Platelet-rich plasma versus platelet-poor plasma in the management of chronic diabetic foot ulcers: a comparative study. *Int Wound J.* 2011;8:307-312.

Tabella 1. Anagrafica pazienti

	PAZIENTE	SESSO	ANNI
1	T.M.	M	38
2	C.S.	F	34
3	L.S.	F	32
4	P.M.	M	25
5	F.M.	M	26
6	B.F.	F	30
7	G.F.	F	18
8	I.L.	F	24
9	R.S.	M	26
10	D.A.	M	31

Tabella 2. Spessore cutaneo e sottocutaneo pre- e post- trattamento sede 1 (numeri dispari trattamento gruppo 1, numeri pari gruppo 2)

PAZIENTE	SEDE 1	CUTE tempo zero	CUTE dopo trattamento	SOTTOCUTE tempo zero	SOTTOCUTE dopo trattamento
1	GUANCIA DX	0,06	0,125	0,335	0,75
2	GUANCIA DX	0,02	0,04	0,175	0,475
3	GUANCIA DX	0,02	0,08	0,11	0,575
4	GUANCIA DX	0,055	0,175	0,425	0,725
5	GUANCIA DX	0,02	0,09	0,355	0,575
6	GUANCIA DX	0,03	0,05	0,175	0,275
7	GUANCIA DX	0,02	0,08	0,25	0,625
8	GUANCIA DX	0,02	0,08	0,175	0,575
9	GUANCIA DX	0,05	0,135	0,125	0,4
10	GUANCIA DX	0,03	0,175	0,275	0,625

Tabella 3. Spessore cutaneo e sottocutaneo pre- e post- trattamento sede 2 (numeri dispari trattamento gruppo 1, numeri pari gruppo 2)

PAZIENTE	SEDE 2	CUTE tempo zero	CUTE dopo trattamento	SOTTOCUTE tempo zero	SOTTOCUTE dopo trattamento
1	GUANCIA SN	0,05	0,12	0,25	0,525
2	GUANCIA SN	0,045	0,175	0,18	0,375
3	GUANCIA SN	0,02	0,04	0,2	0,5
4	GUANCIA SN	0,03	0,06	0,385	0,75
5	GUANCIA SN	0,02	0,05	0,27	0,475
6	GUANCIA SN	0,05	0,175	0,215	0,55
7	GUANCIA SN	0,04	0,09	0,3	0,45
8	GUANCIA SN	0,05	0,125	0,25	0,625
9	GUANCIA SN	0,125	0,25	0,275	0,75
10	GUANCIA SN	0,07	0,125	0,325	0,85

Figura 1. Caso clinico pre-trattamento (a) e post-trattamento a 6 mesi con infiltrazione di nano-fat e PRP



Figura 2. Caso clinico pre-trattamento (a) e post-trattamento a 6 mesi con infiltrazione di nano-fat e PRP



Figura 3. Caso clinico pre-trattamento (a) e post-trattamento a 6 mesi con laser CO2 e infiltrazione di nano-fat e PRP



Figura 4. Caso clinico pre-trattamento (a) e post-trattamento a 6 mesi con laser CO2 e infiltrazione di nano-fat e PRP

