

Giorgia Caruana, Eugenio Grignaffini, Luisa Quarta, Nicolò Bertozzi,  
Maria Chiara Finzi, Edoardo Raposio

Clinica di Chirurgia Plastica, Dipartimento di Scienze Chirurgiche

Università degli Studi di Parma

S.S.D. Chirurgia della Cute ed Annessi, Mininvasiva, Rigenerativa e Plastica

Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma

## UTILIZZO DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI ISOLATE DA LIPOASPIRATO PER LA TERAPIA DELLE ULCERE CUTANEE CRONICHE

---

Le ulcere degli arti inferiori colpiscono ca. l'1% degli adulti ed il 3,6% delle persone di età superiore ai 65 anni. Si tratta prevalentemente di ulcere vascolari (venose e arteriose) e diabetiche, ma anche ulcere da decubito, da cause infettive o ulcere vasculitiche. Nei pazienti affetti da ischemia cronica degli arti inferiori, il 60% ca. di questi presenta almeno un'ulcera distale. Le nuove frontiere nel trattamento delle ferite difficili e della medicina rigenerativa contemplano, sempre più frequentemente, il possibile utilizzo terapeutico sperimentale di fattori di crescita, citochine e cellule staminali autologhe (1-6). In questo contesto, il plasma ricco di piastrine (PRP) è definito come una frazione plasmatica, ottenuta mediante un processo di centrifugazione e separazione, con una concentrazione di piastrine superiore ai livelli di base. Il PRP, ricco di fattori di crescita, possiede attività sia chemotattiche che mitogeniche (7-11). Gli alfa-granuli piastrinici contengono infatti platelet-derived growth factor (isomeri PDGF-AA, BB, e AB), transforming growth factor-beta (TGF-Beta), platelet factor 4 (PF4), interleuchina-1 (IL-1), platelet-derived angiogenesis factor (PDAF), vascular endothelial growth factor (VEGF), epidermal growth factor (EGF), platelet-derived endothelial growth factor (PD-EGF), epithelial cell growth factor (ECGF), insulinlike growth factor (IGF), osteocalcina (Oc), osteonectina (On), fibrinogeno (Ff), vitronectina (Vn), fibronectina (Fn), e trombospondina-1 (TSP-1). Questi fattori possono intervenire favorevolmente nei processi di guarigione attirando cellule indifferenziate dalla matrice e favorendo

la replicazione cellulare. Il PRP può sopprimere inoltre il rilascio di citochine correlate alla flogosi cronica, interagendo con i macrofagi per migliorare il tessuto di guarigione e di rigenerazione, promuovendo altresì il processo di neo-angiogenesi capillare e la riepitelizzazione in ulcere croniche. Le piastrine contenute nel PRP possono anche svolgere un ruolo nei meccanismi locali di difesa attraverso la produzione di proteine di segnalazione chemotattiche verso i macrofagi; il PRP infine può contenere anche una frazione leucocitaria, che sintetizza interleuchine nel contesto di un sistema immunitario non specifico. Studi precedenti sull'utilizzo del PRP hanno dimostrato attività antimicrobica contro *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* meticillina-resistente, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*.

Il PRP clinicamente attivo contiene, nel suo contesto, una concentrazione piastrinica almeno pari ad un milione per microlitro. Oltre al suo utilizzo nel trattamento delle ferite difficili ed ulcere croniche, diverse pubblicazioni descrivono l'impiego di PRP in chirurgia parodontale ed orale, chirurgia maxillofacciale, ortopedia e traumatologia, chirurgia plastica ed estetica, chirurgia vertebrale e chirurgia cardiaca (12-18), ma, a causa della sua recente introduzione nell'ambito clinico-scientifico, soltanto un numero estremamente limitato di studi sono stati condotti, al presente, per valutare quantitativamente la sua efficacia clinica; nello specifico campo vulnologico, un solo trial clinico randomizzato (19) è stato effettuato, e riguardava l'uso del PRP autologo nel trattamento delle ulcere diabetiche degli arti inferiori. Lo scopo di questo studio sarà quello di valutare l'efficacia del PRP, arricchito di cellule staminali mesenchimali, per la terapia locale di ulcere croniche degli arti inferiori. Se comparate con le cellule staminali mesenchimali provenienti da midollo osseo, le medesime cellule derivate da tessuto adiposo sono ugualmente in grado di differenziarsi in cellule e tessuti di origine mesodermica. Poiché il tessuto adiposo umano è pressochè onnipresente e facilmente ottenibile, in quantità di rilievo, mediante procedure chirurgiche effettuate in anestesia locale e con disagio limitato per il Paziente, esso si configura quale fonte alternativa ottimale di cellule staminali adulte autologhe per la rigenerazione di tessuti mesenchimali e vari procedimenti di ingegneria tissutale. Cellule ottenute da lipoaspirato possono

differenziarsi infatti in linee adipogeniche, osteogeniche, condrogeniche e miogeniche (20-30), come pure, come nostri studi precedenti hanno evidenziato (31-35), in linee neurogeniche, pancreatiche ed epatiche. Mentre nozioni precise circa l'identità e le caratteristiche biologiche dei progenitori degli adipociti risultano essere ancora lacunose, si ritiene attualmente che queste cellule risiedano verosimilmente nella frazione stroma-vascolare (SVF) del tessuto adiposo (36). La porzione SVF isolata da lipoaspirato recentemente ha destato molta attenzione a causa della sua capacità di differenziarsi in cellule endoteliali mature e partecipare ai processi di neoangiogenesi (37); come tali, queste cellule potrebbero quindi essere proficuamente utilizzate in un approccio strategico volto al trattamento/terapia locale preventiva di lesioni e tessuti ischemici, promuovendo la proliferazione di neovasi. I preadipociti SVF e le cellule endoteliali presentano infatti stretti rapporti in vivo: le cellule SVF esprimono marcatori coerenti con un fenotipo endoteliale, tra cui CD31, CD144 (VE-caderina) e il fattore di von Willebrand. In quest'ottica, Williams et al. hanno descritto l'isolamento di cellule endoteliali differenziate da tessuto adiposo umano: tali linee cellulari, utilizzate nel contesto di innesti vascolari in vivo, hanno contribuito a migliorare significativamente la pervietà degli stessi dopo l'intervento chirurgico. Contemporaneamente, i medesimi Autori hanno descritto l'innesto di SVF nel contesto di corpi cavernosi nei ratti, suggerendo un loro possibile utilizzo nel trattamento della disfunzione erettile. Studi successivi hanno documentato la capacità delle cellule SVF a sviluppare differenziazione endoteliale in vitro: Planat-Benard et al. hanno osservato come le cellule CD13-CD34-SVF coltivate in Matrigel esprimano CD31 e fattore di von Willebrand. Tali cellule, nelle opportune condizioni di coltura, davano luogo a reti di diramazioni tridimensionali, coerenti con la formazione di strutture vascolari. Miranville et al. hanno riferito conclusioni simili, analizzando una popolazione di cellule CD31-CD34-SVF; l'aggiunta di VEGF migliorava la loro differenziazione, valutata in base all'espressione di CD31 e lo sviluppo di strutture vascolari in Matrigel. In lavori correlati, Cao et al. hanno dimostrato come una popolazione cellulare CD31-CD34-CD106-flk-1 isolata da tessuto adiposo possa esprimere marcatori endoteliali in presenza di VEGF. Similmente, Martinez-Estrada et al.

hanno descritto come cellule flk-1 isolate da cellule SVF in coltura esprimano un fenotipo endoteliale in presenza di VEGF. Successivi studi in vivo hanno evidenziato ulteriormente il potenziale endotelial-differenziativo delle cellule SVF: in un modello di ischemia tissutale nel ratto, l'innesto di una popolazione cellulare CD31 ha migliorato significativamente l'angiogenesi e il successivo recupero dell'omeostasi perfusoria dei tessuti interessati. Questa constatazione è stata confermata da almeno 5 gruppi indipendenti, e risultati simili sono stati ottenuti, sempre in modelli animali, sia somministrando tali linee cellulari per via endovenosa, sia tramite iniezione intra-muscolare in prossimità della lesione ischemica. Sebbene le cellule SVF possano integrarsi compiutamente nel tessuto ricevente e differenziarsi verso cellule endoteliali, le stesse potrebbero inoltre influire positivamente nei processi di guarigione tissutale attraverso meccanismi paracrini: le cellule SVF derivate da tessuto adiposo secernono infatti citochine angiogeniche, quali il VEGF e l'hepatocyte growth factor (HGF). I livelli di VEGF e/o HGF secreti dalle cellule SVF possono essere inoltre stimolati da esposizione delle cellule ad ipossia e fattori di crescita e differenziazione (tumor necrosis factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, ascorbato, etc.). Studi in vivo, utilizzando un modello murino di preadipociti 3T3-F442A, suggeriscono come una relazione reciproca possa esistere tra angiogenesi e adipogenesi; questo fenomeno coinvolge direttamente il VEGF, in quanto la somministrazione di anticorpi anti-recettore VEGF interferisce con la neo-adipogenesi in vivo, coerentemente con un percorso paracrino affine tra cellule endoteliali e preadipocitarie. Un ulteriore supporto alla valorizzazione di un comune percorso paracrino tra queste linee cellulari proviene dall'osservazione di un accresciuto tasso proliferativo osservato in coculture bi- e tri-dimensionali di preadipociti e cellule endoteliali. Diversi altri meccanismi non-specifici sono stati inoltre ipotizzati per un coinvolgimento proficuo di cellule adipocitarie SVF (aSVFc) nei processi di guarigione tissutale: in primis, aSVFc innestate in un tessuto ischemico o necrotico possono secernere citochine e fattori di crescita che stimolano la rigenerazione tissutale in modo paracrino. Le aSVFc infatti stimolerebbero il reservoir di cellule staminali "di nicchia" presenti nel tessuto ricevente, stimolando il recruitment di cellule staminali

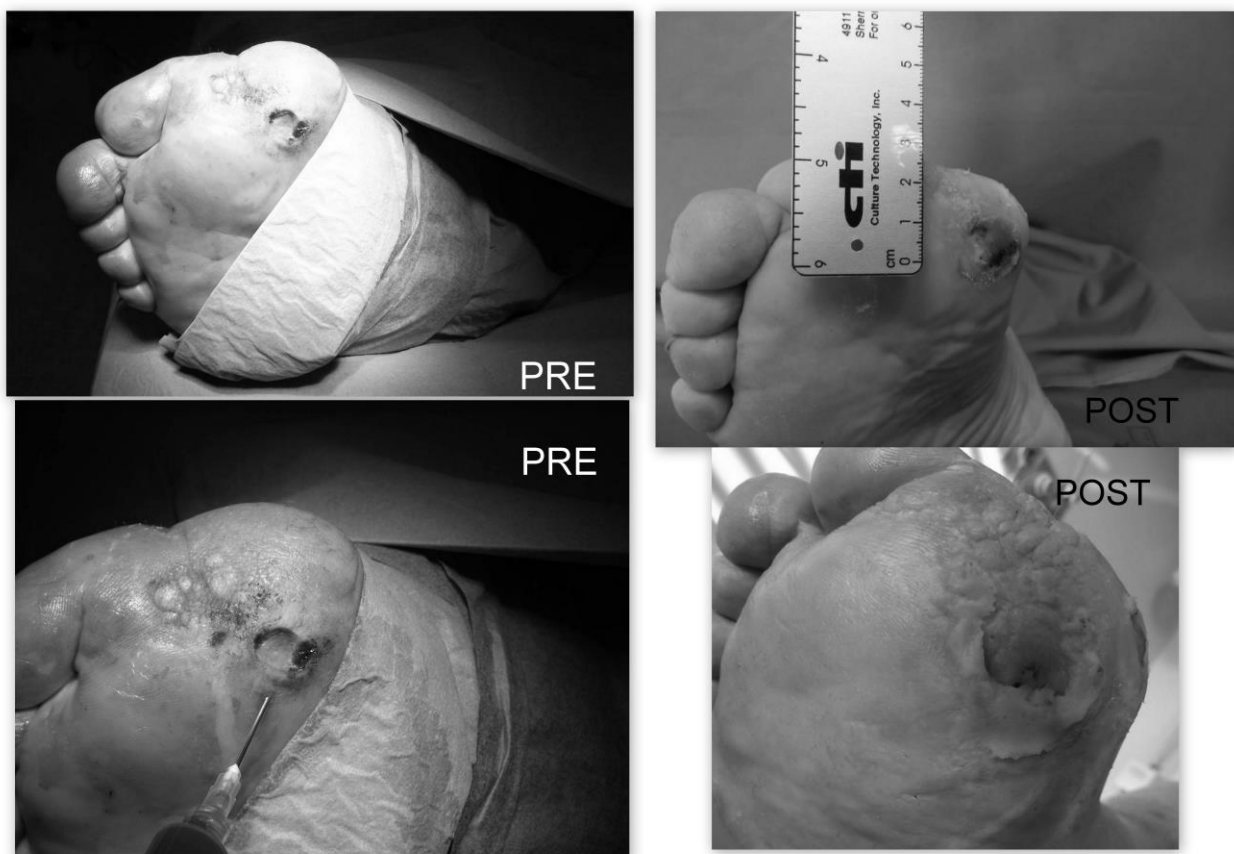
endogene promuovendone la differenziazione lungo i lignaggi richiesti. In maniera analoga e correlata, le aSVFc potrebbero secernere molecole antiossidanti, scavenger di radicali liberi e proteine chaperone/heat shock in un sito ischemico; conseguentemente, si assisterebbe ad un incremento nell'eliminazione delle molecole tossiche rilasciate nell'ambiente locale, favorendo così i meccanismi di recupero delle cellule superstiti. Infine, recenti studi hanno evidenziato la possibilità che cellule mesenchimali derivate da midollo osseo possano fornire nuovi mitocondri a cellule danneggiate, salvaguardando in tal modo il metabolismo aerobico; si può ragionevolmente presumere come potenzialità analoghe possano essere espresse anche dalle cellule staminali adipocitarie SVF.

#### PAZIENTI E METODI

Sono esclusi i pazienti sottoposti a chemioterapia, pazienti con emoglobina  $<10.5$  g/dL, piastrine  $<100 \times 10^9/L$ , albumina sierica  $<2.5$  g/dL, ulcere neoplastiche e ulcere infette. Ogni paziente sarà sottoposto, in regime di Day Surgery, alla seguente procedura terapeutica. Cinquanta cc di sangue verranno prelevati e frazionati mediante centrifugazione (3200 rpm per 15 minuti), con anticoagulante citrato destrosio-A (ACD-A, 6 ml nella siringa da 60 ml), presso il Centro Trasfusionale dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma. Mediante tale operazione si otterrà un plasma ricco di piastrine (PRP), con una concentrazione piastrinica media di ca. 7 volte i livelli di riferimento. In ottemperanza alla legislazione italiana vigente, tale manovra sarà effettuata da un Dirigente Medico del ns. Servizio Trasfusionale. Il risultante PRP e verrà immediatamente inviato alla Day Surgery dell'Azienda e conservato sterilmente e a temperatura ambiente fino a quando necessario (circa 60 minuti). Il Pz. sarà quindi sottoposto ad una liposuzione convenzionale dell'area addominale inferiore: previa infiltrazione dell'area da trattare con anestetico locale e soluzione fisiologica, si provvederà alla suzione di ca. 80 cc di tessuto adiposo tramite cannule smusse (diametro: 2 mm) inserite nel tessuto sottocutaneo mediante un'incisione ombelicale e connesse a siringhe luer-lock da 20cc (tempo di prelievo: ca. 20'). Il lipoaspirato così ottenuto sarà quindi immediatamente trattato, nella stessa sala operatoria ed all'interno di una cappa a flusso

laminare, in modo da isolare le ADSC in conformità al protocollo seguente: separazione meccanica delle ADSC mediante shaker cellulare (6000 vrb/min x 6 min) e loro isolamento tramite centrifuga (600 rpm x 6 min). Il pellet di cellule staminali mesenchimali autologhe così ottenuto è quindi miscelato, sempre sterilmente, con il PRP precedentemente prodotto, al fine di ottenere un enhanced-MSC-PRP (e-PRP), ora pronto per l'innesto. Tale e-PRP autologo è iniettato nel contesto del margine cutaneo così come nel fondo della lesione stessa. Infine si effettua una medicazione costituita da una porzione di questo concentrato di piastrine, attivato con l'aggiunta di trombina e/o di calcio, risultante in un composto piastrinico gelatinoso che verrà posizionato a coprire interamente la lesione.

## RISULTATI



Le cellule staminali ottenute da lipoaspirato incrementano significativamente i processi di guarigione e rigenerazione tissutale, i pazienti lamentano nettamente meno dolore ed eventuali innesti successivamente apposti sulla stessa area trattata mostrano un migliore attecchimento.



## CONCLUSIONI

L'utilizzo di cellule staminali mesenchimali autologhe si è dimostrato una valida risorsa per il trattamento delle ulcere cutanee croniche, sia singolarmente che associato ad altri trattamenti terapeutici come l'utilizzo di innesti cutanei.

---

## **Bibliografia**

(1)Drago H, Marín GH, Sturla F, Roque G, Mártire K, Díaz Aquino V et al. *The next generation of burns treatment: intelligent films and matrix, controlled enzymatic debridement, and adult stem cells*, Transplant Proc. 2010 Jan-Feb;42(1):345-9.

- (2) Zou Z, Zhang Y, Hao L, Wang F, Liu D, Su Y et al. *More insight into mesenchymal stem cells and their effects inside the body*, Expert Opin Biol Ther. 2010 Feb;10(2):215-30.
- (3) Bey E, Prat M, Duhamel P, Benderitter M, Brachet M, Trompier F, et al. *Emerging therapy for improving wound repair of severe radiation burns using local bone marrow-derived stem cell Administrations*, Wound Repair Regen. 2010 Jan-Feb;18(1):50-8.
- (4) Guenou H, Nissan X, Larcher F, Feteira J, Lemaitre G, Saidani M, et al. *Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study*, Lancet. 2009 Nov 21;374(9703):1745-53.
- (5) Zhang CP, Fu XB, *Therapeutic potential of stem cells in skin repair and regeneration*, Chin J Traumatol. 2008 Aug;11(4):209-21.
- (6) Haertsch PA. *Re: "The use of a non-cultured autologous cell suspension and Integra) dermal regeneration template to repair full thickness skin wounds in a porcine skin model: a one-step process"* Burns 2007;33(6):693-700.
- (7) Mehta S, Watson JT. *Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications*. J Orthop Trauma. 2008;22(6):432-8.
- (8) Marx RE. *Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP?* Implant Dent. 2001;10(4):225-8.
- (9) Pietrzak WS, Eppley BL. *Platelet rich plasma: biology and new technology*. J Craniofac Surg. 2005;16(6):1043-54.
- (10) Everts PA, Brown Mahoney C, Hoffmann JJ, Schönberger JP, Box HA, van Zundert A et al. *Platelet-rich plasma preparation using three devices: implications for platelet activation and platelet growth factor release*. Growth Factors. 2006;24(3):165-71.
- (11) El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J, Hasturk H, Liu H, Alshahat M et al. *Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties*. J Periodontol. 2007;78(4):661-9.
- (12) Driver VR, Hanft J, Fylling CP, Beriou JM. *Autologel Diabetic Foot Ulcer Study Group. A prospective, randomized, controlled trial of autologous platelet-rich plasma gel for the treatment of diabetic foot ulcers*. Ostomy Wound Manage. 2006;52(6):68-70.
- (13) Petrova N, Edmonds M. *Emerging drugs for diabetic foot ulcers*. Expert Opin Emerg Drugs. 2006;11(4):709-24.
- (14) Millington JT, Norris TW. *Effective treatment strategies for diabetic foot wounds*. J Fam Pract. 2000;49(11 Suppl):S40-8.
- (15) Lacci KM, Dardik A. *Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing*. Yale J Biol Med. 2010 Mar;83(1):1-9.
- (16) Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. *Platelet rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery*. Plast Reconstr Surg. 2006;118(6):147e-59e.
- (17) Salemi S, Rinaldi C, Manna F, Guarneri GF, Parodi PC. *Reconstruction of lower leg skin ulcer with autologous adipose tissue and platelet-rich plasma*. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2008;61(12):1565-7.
- (18) Lindeboom JA, Mathura KR, Aartman IH, Kroon FH, Milstein DM, Ince C. *Influence of the application of platelet-enriched plasma in oral mucosal wound healing*. Clin Oral Implants Res. 2007;18(1):133-9.
- (19) Steed DL, Goslen JB, Holloway GA, Malone JM, Bunt TJ, Webster MW. *Randomized prospective double-blind trial in healing chronic diabetic foot ulcers. CT-102 activated platelet supernatant, topical versus placebo*. Diabetes Care. 1992;15(11):1598-1604.
- (20) Altman AM, Abdul Khalek FJ, Alt EU, Butler CE. *Adipose Tissue- derived Stem Cells Enhance Bioprosthetic Mesh Repair of Ventral Hernias*. Plast Reconstr Surg. 2010 May 10.
- (21) Qian SW, Li X, Zhang YY, Huang HY, Liu Y, Sun X, et al. *Characterization of adipocyte differentiation from human mesenchymal stem cells in bone marrow*. BMC Dev Biol. 2010 May 7;10(1):47.



- (22) Mantovani C, Mahay D, Kingham M, Terenghi G, Shawcross SG, Wiberg M. *Bone marrow- and adipose-derived stem cells show expression of myelin mRNAs and proteins*. Regen Med. 2010 May;5(3):403-10.
- (23) Huang Y, Yang X, Wu Y, Jing W, Cai X, Tang W, et al. *gamma-secretase inhibitor induces adipogenesis of adipose-derived stem cells by regulation of Notch and PPAR-gamma*. Cell Prolif. 2010 Apr;43(2):147-56.
- (24) Park E, Patel AN. *Changes in the expression pattern of mesenchymal and pluripotent markers in human adipose-derived stem cells*. Cell Biol Int. 2010 May 6.
- (25) Akita S, Akino K, Hirano A, Ohtsuru A, Yamashita S. *Mesenchymal stem cell therapy for cutaneous radiation syndrome*. Health Phys. 2010 Jun;98(6):858-62.
- (26) Condé-Green A, Baptista LS, de Amorim NF, de Oliveira ED, da Silva KR, Pedrosa Cda S, et al. *Effects of centrifugation on cell composition and viability of aspirated adipose tissue processed for transplantation*. Aesthet Surg J. 2010 Mar;30(2):249-55.
- (27) Sterodimas A, de Faria J, Nicaretta B, Papadopoulos O, Papalambros E, Illouz YG. *Cell-assisted lipotransfer*. Aesthet Surg J. 2010 Jan;30(1):78-81.
- (28) Runyan CM, Jones DC, Bove KE, Maercks RA, Simpson DS, Taylor JA. *Porcine allograft mandible revitalization using autologous adipose-derived stem cells, bone morphogenetic protein-2, and periosteum*. Plast Reconstr Surg. 2010 May;125(5):1372-82.
- (29) Jang S, Cho HH, Cho YB, Park JS, Jeong HS. *Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin*. BMC Cell Biol. 2010 Apr 16;11:25.
- (30) Makarov AV, Arutyunyan IV, Bol'shakova GB, Volkov AV, Gol'dshtein DV. *Morphological changes in paraurethral area after introduction of tissue engineering construct on the basis of adipose tissue stromal cells*. Bull Exp Biol Med. 2009 Oct;148(4):719-24.
- (31) Scanarotti C, Bassi AM, Catalano M, Guida C, Coradeghini R, Falugi C, Aluigi M, Santi P, Raposio E. *Neurogenic-committed human pre-adipocytes express CYP1A isoforms*. Chem Biol Interact. 2010 Mar 30;184(3):474-83.
- (32) Coradeghini R, Guida C, Scanarotti C, Sanguineti R, Bassi AM, Parodi A, Santi PL, Raposio E. *A comparative study of proliferation and hepatic differentiation of human adipose-derived stem cells*. Cells Tissues Organs. 2010;191(6):466-77.
- (33) Aluigi MG, Coradeghini R, Guida C, Scanarotti C, Bassi AM, Falugi C, Santi P, Raposio E. *Pre-adipocytes commitment to neurogenesis 1: preliminary localisation of cholinergic molecules*. Cell Biol Int. 2009 May;33(5):594-601.
- (34) Raposio E, Guida C, Coradeghini R, Scanarotti C, Parodi A, Baldelli I, Fiocca R, Santi PL. *In vitro polydeoxyribonucleotide effects on human pre-adipocytes*. Cell Prolif. 2008 Oct;41(5):739-54.
- (35) Raposio E, Guida C, Baldelli I, Benvenuto F, Curto M, Paleari L, Filippi F, Fiocca R, Robello G, Santi PL. *Characterization and induction of human pre-adipocytes*. Toxicol In Vitro. 2007 Mar;21(2):330-4.
- (36) Tang W, Zeve D, Suh JM, Bosnakovski D, Kyba M, Hammer RE, et al. *White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature*. Science. 2008 Oct 24;322(5901):583-6.
- (37) Madonna R, De Caterina R. *In vitro neovasculogenic potential of resident adipose tissue precursors*. Am J Physiol Cell Physiol. 2008 Nov;295(5):C1271-80.