

Plasma per via sottocutanea e patologie neurodegenerative: una possibile alternativa al trattamento con le cellule staminali.

Abstract

E'ormai stata confermata da numerosissimi studi l'efficacia delle Cellule Staminali Mesenchimali (MSC) sia per la riparazione di vari tessuti che per gli effetti positivi sulla rigenerazione neuronale in patologie quali Sclerosi Multipla, Alzheimer, Parkinson.

Altre numerose pubblicazioni hanno dimostrato la capacità del Plasma Ricco di Piastrine (PRP) nel promuovere l'attivazione e la proliferazione delle MSC. Nonostante l'importanza di un ulteriore fattore, il Fattore Neurotrofico Cerebrale (BDNF), fondamentale sia nei processi di rigenerazione del sistema nervoso che nel funzionamento fisiologico di vari organi, la sua variazione in seguito al trattamento con PRP non è mai stata misurata. Considerando che questo fattore è contenuto per il 90% nelle piastrine sarebbe opportuno metterlo in gioco per un'ulteriore conferma delle caratteristiche uniche della terapia con il PRP.

L'obiettivo di questo studio è quello di avviare una serie di ricerche per verificare se la somministrazione del PRP per via sottocutanea è capace di dare un effetto sistemico, ossia di incrementare i livelli ematici dei fattori di crescita, nonché del BDNF.

Cellule Staminali Mesenchimali (MSC)

Le cellule staminali mesenchimali presenti nel midollo osseo, nel sangue periferico ed in altri tessuti, sono in grado di differenziarsi in linee cellulari non mesenchimali, come miociti scheletrici, neuroni e cellule del mesoderma viscerale, sia in vitro che in vivo (1-2-3-4).

La gamma di potenziali meccanismi terapeutici dimostrati da queste cellule include: attività antiapoptotica (5-12); antinfiammatoria (6-12); antifibrotica (7); angiogenica (8); neuroprotettiva (2-9-11-21); neurotrofica (12-13-14); ed anche effetti di rigenerazione (5).

Queste azioni neuroprotettive potrebbero spiegare l'effetto straordinario ottenuto con la somministrazione di MSC in modelli sperimentali di ictus (15, 29), nel trattamento della Sclerosi Multipla (SM), sia in modelli animali che in studi clinici (2-10-16-17-18-31) in lesioni del midollo spinale, in studi su animali (19), nella patologia del Parkinson, studi clinici e su modelli animali (20-21-14), nell'Atrofia Sistemica Multipla, sia in modelli animali che in studi clinici (22-20-23-24) e nel morbo di Alzheimer, in modelli animali (25-26-27-28).

Le MSC agiscono con meccanismi diversi, principalmente paracrini, su cellule a distanza del sito con danno tissutale, senza il requisito di attecchimento a lungo termine (30). Questi dati spiegano i risultati ottenuti da Morando et al, i quali hanno ottenuto un ripristino della mielina nel midollo spinale identica, sia in ratti trattati con iniezioni intratecali di MSC, sia con la consegna delle stesse, per via endovenosa (2). Inoltre altri studiosi hanno dichiarato che i risultati più favorevoli osservati nella Encefalomielite Sperimentale Autoimmune (EAE, ossia il modello di SM in grado di

riprodurre i principali aspetti neuroimmunologici e istopatologici della malattia) sono stati raggiunti in seguito alla somministrazione endovenosa, che era sufficiente non solo per indurre tolleranza periferica agli antigeni della mielina (16), ma anche per promuovere rimielinizzazione e preservare gli assoni (31-32-33.19).

Uccelli et al, in seguito ai risultati ottenuti con le MSC, hanno affermato che negli ultimi dieci anni, il trattamento della SM e altre malattie neurologiche, con le cellule staminali, è stato considerato come l'unico modo per ottenere un recupero miracoloso dalla disabilità irreversibile (34).

Le MSC sono presenti anche nel sangue periferico

Le cellule staminali mesenchimali utilizzate in gran parte degli studi, sono state isolate utilizzando procedure invasive, come l'aspirazione del midollo osseo e la liposuzione. Le cellule con potenziale simile, ma recuperate dal sangue periferico, forniscono una fonte alternativa vantaggiosa per la loro facilità di recupero.

Zvaifler et al hanno individuato per primi, già 17 anni fa (2000), che le cellule con morfologia e fenotipo dei precursori mesenchimali sono normalmente presenti in circolo (35). In seguito a questo, altri numerosi studi hanno confermato che anche il sangue periferico è una importantissima fonte alternativa di MSC (36-37-38-39).

Attivazione e proliferazione delle MSC attraverso i fattori di crescita rilasciati dal PRP

Il plasma ricco di piastrine (PRP) può essere definito come il volume della frazione plasmatica del sangue autologo avente una concentrazione di piastrine sopra la linea di base (28).

Le cellule staminali, osteoblasti, fibroblasti, cellule endoteliali e cellule epidermiche esprimono i recettori della membrana cellulare che sono specifici per i fattori di crescita inclusi nel PRP (40-41), è quindi suggerito che i fattori di crescita (GF) compresi nei concentrati piastrinici attivino diversi tipi di cellule coinvolte nella guarigione dei tessuti (42). Dopo il rilascio iniziale di GF da parte delle piastrine, esse sintetizzano e secernono fattori aggiuntivi per i restanti 7 giorni della loro vita (43).

L'interazione tra questi fattori di crescita ed i recettori di superficie sulle cellule bersaglio attiva le vie di segnalazione intracellulare che inducono la produzione di proteine necessarie per i processi rigenerativi, come la proliferazione cellulare, la formazione della matrice, la produzione osteoide e la sintesi del collagene (44-42).

Inoltre, il PRP determina l'attivazione dell'asse hGH-IGF-1 (45) e l'aumento dei recettori cannabinoidi CB1 e CB2 (46); quest'ultimo dato potrebbe spiegare, in parte, l'azione positiva del PRP sul dolore.

Numerosi studi hanno dimostrato che il PRP non solo aumenta la proliferazione, la migrazione e la differenziazione delle MSC (47-48-49) ma ha anche la capacità di produrre fattori di crescita, sia in vitro (50-28) che in vivo (45-51).

ATTIVITA' DEI FATTORI DI CRESCITA RILASCIATI DALLE PIASTRINE: IGF-1; VEGF; TGF- β ; PDGF.

Fattore di Crescita Insulino-Simile (IGF-1) e Sclerosi Multipla

IGF-1 è uno dei più potenti attivatori naturali della via di segnalazione della proteina chinasi B (AKT), uno stimolatore della crescita e proliferazione cellulare ed un potente inibitore della morte cellulare programmata (52).

Il processo di rimielinizzazione nel sistema nervoso centrale dipende da numerosi fattori interattivi inclusa la presenza del fattore di crescita insulino-simile-1 (IGF-1) (53-54). IGF-1 non è solo un potente fattore trofico neuroprotettivo ma anche un fattore di sopravvivenza per le cellule della linea degli oligodendrociti, in quanto mostra una potente capacità mielinogenica (55-56).

Fattore di Crescita Endoteliale Vascolare (VEGF) e Sclerosi Laterale Amiotrofica

Studi sperimentali in vivo e in vitro hanno dimostrato l'azione neuroprotettiva, neurotrofica e angiogenica di VEGF (57-58) attraverso la sua azione su vari tipi di cellule neuronali (59-60-61-62). Inoltre, il fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF), secreto dalle cellule endoteliali, agisce attraverso l'aumento di VEGF e successivamente stimolando la proliferazione delle cellule neurali (63).

Nel 2001, Oosthuyse e collaboratori hanno associato il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) con la patogenesi della Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) (57). VEGF è un fattore proangiogenico che conferisce neuroprotezione, promuovendo la sopravvivenza dei neuroni in vivo e in vitro (58-64), confermata dall'aumento della speranza di vita del modello di SLA nei topi (65-66). Inoltre, esercita effetti protettivi su altre cellule, come epitelio del polmone, midollo osseo, e cellule ossee. Oosthuyse e colleghi hanno studiato VEGF nei topi con una delezione dell'elemento ipossia-risposta ($Vegf \partial / \partial$); questi topi hanno sviluppato, ad insorgenza nell'età adulta, progressiva degenerazione dei motoneuroni che ricorda la SLA (57). Inoltre Lu e colleghi (67) hanno identificato che il mutante SOD1 porta a ipo-regolazione e destabilizzazione dell'mRNA di VEGF.

Fattore di Crescita Trasformante beta-1 (TGF- β 1) e Alzheimer

Le varie isoforme di TGF-beta hanno dimostrato, sia in vitro che in vivo, di avere potenti effetti sulla proliferazione, la funzione, e la sopravvivenza sia dei neuroni che di tutti e tre i tipi di cellule gliali: astrociti, oligodendrociti e microglia (68).

Il rilascio di TGF- β 1 aumenta significativamente in risposta a lesioni del sistema nervoso centrale, e diversi studi hanno dimostrato che l'induzione di TGF- β 1 durante infortunio esercita un ruolo centrale nella prevenzione della neurodegenerazione (69-70-71-72-73-74).

Molti rapporti descrivono una compromissione significativa di TGF- β 1 nel cervello dei malati di Alzheimer (75-76-77-78-79-80-81), è stato infatti dimostrato che il TGF- β 1 ha effetti neuroprotettivi contro la neurodegenerazione indotta da placche di β -amiloide (82-83-84-85).

Fattore di Crescita Derivato dalle Piastrine (PDGF) e Parkinson

La famiglia del Fattore di Crescita Derivato dalle Piastrine (PDGF) comprende fattori di crescita che agiscono attraverso i recettori tirosin-chinasi. I PDGFs stimolano diverse funzioni cellulari quali la proliferazione, la crescita e la differenziazione (86).

Il morbo di Parkinson (PD) è una malattia neurodegenerativa dove la degenerazione del sistema nigrostriatale porta a deficit motori specifici.

Un recente studio di Zachrisson et al (86) ha dimostrato che il PDGF-BB è efficace nel contrastare i cambiamenti istologici, comportamentali e biochimici in modelli sperimentali di Parkinson, nei roditori. I risultati di questo studio suggeriscono un nuovo approccio per la riparazione di un sistema dopaminergico disfunzionale e l'uso di PDGF-BB come nuovo farmaco promettente che, stimolando le cellule progenitrici, potrebbe avere un impatto significativo sul trattamento della malattia di Parkinson. Inoltre Padel et al (87) hanno dimostrato che un trattamento di 2 settimane con PDGF-BB porta a recupero comportamentale (verificato con diversi test), e ripristina parzialmente la via nigrostriatale.

Fattore Neurotrofico Derivato dal Cervello (BDNF)

Oltre ai vari fattori di crescita le piastrine sono anche la principale fonte di BDNF periferico (88-89): infatti il novanta per cento o più di BDNF nel sangue è contenuto nelle piastrine (90), che durante il trauma dei tessuti o lesioni nervose rilasciano il loro contenuto in circolo nel sito della lesione (91). Il BDNF negli alfa-granuli viene rilasciato al momento dell'attivazione piastrinica, mentre il BDNF citoplasmatico non viene rilasciato (92).

Il BDNF svolge un ruolo importante nello sviluppo del sistema nervoso centrale, neurogenesi, sopravvivenza neuronale, migrazione, differenziazione cellulare, crescita di assoni e dendriti e formazione di sinapsi (93-94).

Riferendosi alla barriera emato encefalica, alcuni studi sui roditori hanno dimostrato che la somministrazione periferica di BDNF promuove la rigenerazione delle lesioni del midollo spinale (95), ha un effetto sul comportamento depressivo simile (96) e potrebbe aumentare i livelli di BDNF nel cervello (97). Inoltre, il BDNF ripara efficacemente i danni dei podociti in vitro, e contrasta la proteinuria e lesioni glomerulari nei modelli in vivo di FSGS (Glomerulo Sclerosi Idiopatica Segmentale Focale), aprendo una potenziale nuova prospettiva per il trattamento dei disturbi dei podociti (98).

ALCUNI DATI RILEVANTI SULL'EFFICACIA DEL PRP

Nel 2001 Margolis et al (99) hanno pubblicato uno studio retrospettivo analizzando i risultati di 26.599 pazienti con ulcere del piede diabetico neuropatico, che erano stati trattati con il gel piastrinico autologo. La revisione ha suggerito che il gel piastrinico abbinato alla cura standardizzata è stato più efficace della cura standard da sola.

In un altro studio su 171 pazienti con 355 ferite, un tasso del 78% di salvataggio d'arto è stato raggiunto in coloro per i quali l'amputazione era stata inizialmente raccomandata (100).

Un altro studio indipendente ha osservato, con una singola iniezione di PRP, miglioramento nel dolore e nella funzione in 29 pazienti che non avevano avuto nessun risultato con sei mesi di trattamento con corticosteroidi (101).

Xie-Gang Ding et al hanno osservato che l'applicazione del PRP al sito di lesione del nervo cavernoso (CN) ha effetti neuromodulatori sulla rigenerazione del SNC e il recupero della funzione erettile (102), risultati simili sono stati ottenuti in ratti in cui è stato leso il nervo sciatico (103).

In seguito ai dati del loro studio, Giannessi et al afferma che l'applicazione di una membrana di PRP intorno alla neurorrafia migliora il processo di rigenerazione del nervo in un modello di nervo sciatico di ratto; l'uso di PRP come membrana suturabile potrebbe eseguire un'azione non solo come fonte di proteine bioattive ma anche come guida per nervi per contenere la reazione cicatriziale e migliorare così la rigenerazione assonale (104).

Dopo aver provocato una lesione nel nervo mediano di 15 conigli, Park e Kwon hanno valutato l'effetto della iniezione di PRP; i risultati esprimono che la sezione trasversale del nervo mediano e lo spessore del tessuto connettivo subsinoviale nel gruppo PRP, rispetto ai due gruppi di controllo, erano significativamente superiori; inoltre la latenza motoria nel gruppo trattato con PRP era significativamente più lunga (105).

Elgazzar e colleghi, dopo il loro studio sui ratti, concludono che il PRP può migliorare la rigenerazione del nervo periferico in seguito a rianastomosi con cianoacrilato (106).

Dati discordanti sulla preparazione del PRP

Ci sono risultati promettenti sull'uso di plasma ricco di piastrine (PRP) per la riparazione dei vari tessuti, tuttavia, la variabilità nella metodologia per il suo ottenimento può causare risultati differenti e opposti in letteratura. Questa variabilità riguarda l'uso dell'anticoagulante più adatto; l'attivazione esogena delle piastrine; l'uso di uno step o due di centrifugazione; numero di giri e tempo di centrifugazione: per quest'ultimo dato, a complicare di più le cose c'è il fatto di usare la RCF (Relative Centrifugal Force) e non tradurre in rpm (rotazioni per minuto), o viceversa, della maggior parte degli autori. Ancora: la quantità, in millilitri, del PRP da iniettare e la presenza o meno, in esso, dei globuli bianchi.

Uso dell'anticoagulante più adatto

Uno studio molto accurato è stato effettuato da Do Amaral et al (107) i quali consigliano l'uso di SC (citrato di sodio) in quanto, rispetto all'EDTA (acidoetilendiamminotetraacetico) e all'ACD (citrato destrosio) il PRP ottenuto in SC ha presentato il recupero delle piastrine superiore dopo la prima fase di centrifugazione del sangue e un minimo cambiamento nell'espressione genica delle MSC. Inoltre, l'uso di SC e ACD ha comportato maggiore induzione della

proliferazione di MSC (107). Infine, un dato molto importante è che il citrato di sodio e L'ACD-A differiscono notevolmente per il Ph: il citrato di sodio al 3,8% ha Ph 7,8 mentre l'ACD-A ha Ph 4,9 (50-108-109). Considerando che il sangue in condizioni normali ha un pH tra 7,35 e 7,45 e conoscendo l'importanza del Ph basico nella fisiologia umana, nonché l'accuratezza dei lavori sopra, non dovrebbero esserci più dubbi sul fatto che il citrato di sodio al 3,8% sia l'anticoagulante più adatto per la preparazione del PRP.

Uso di uno step o due di centrifugazione

Tamimi et al hanno utilizzato e confrontato 2 metodi per ottenere il PRP: doppia centrifugazione e singola centrifugazione. I risultati di questo studio riportano che la doppia centrifugazione è in grado di ottenere concentrazioni di piastrine superiori (336%) rispetto alla singola centrifugazione (227%), tuttavia, la doppia centrifugazione ha determinato un'alterazione della morfologia delle piastrine (130). Questo risultato è stato confermato da Nagata et al nel 2010 (131).

Una sola centrifugazione è quindi più opportuna per la preparazione del PRP, sia perché non altera la morfologia (e quindi la funzionalità/efficienza) delle piastrine, sia perché evita alle stesse, ma anche ai fattori di crescita già rilasciati nel plasma, lo stress indotto dalla manipolazione per la seconda centrifugazione.

Attivazione esogena del PRP

Un'altra variabile molto discussa è l'attivazione esogena del PRP (con calcio cloruro o trombina bovina). L'uso sistemico di trombina bovina in chirurgia cardiovascolare è stato segnalato provocare coagulopatie, risultante dalla reattività degli anticorpi al fattore V bovino con il fattore umano (110-111). Inoltre, è stato ampiamente dimostrato che l'uso di PRP non attivato, ha la stessa efficacia di quello attivato (112-113), il mancato feed-back delle piastrine con la parete vasale è infatti sufficiente per l'attivazione delle stesse.

Uso vietato di farmaci antinfiammatori

E' importante sottolineare il fatto che, prima e dopo il trattamento con PRP è indispensabile non usare farmaci antinfiammatori, poiché è riconosciuto che l'azione di tali farmaci inibisce l'attivazione delle piastrine e, di conseguenza, l'efficacia del PRP: ne è un classico esempio l'acido acetilsalicilico che interferisce con la funzionalità piastrinica andando ad inibire l'enzima ciclossigenasi (cox); questa inibizione è irreversibile e richiede la produzione di nuove piastrine per riguadagnare la funzione (114).

I pazienti con problemi cardiovascolari, che dovessero necessitare del trattamento con PRP non possono, comunque, fare a meno dell'acido acetilsalicilico e sarebbe opportuno studiare se essa, possa essere momentaneamente sostituita con gli estratti di ginkgo biloba (EGb 761), anch'essi potenti fluidificanti del sangue che non agiscono inibendo la cox-1 e di conseguenza la sintesi di TXA2 (115-116-117).

E'probabile che anche i corticosteroidi (FAS) inibiscano l'attività delle piastrine in quanto bloccano l'attività della fosfolipasi A2, l'enzima che trasforma i fosfolipidi

delle membrane cellulari in acido arachidonico, precursore di altri mediatori chimici dell'inflammatione come prostaglandine e trombossani.

Profilo di sicurezza

E'ben noto che il PRP è derivato da sangue autologo e questo comporta rischi minimi per la trasmissione di malattie, reazioni immunologiche e cancro (118). I fattori di crescita intervengono sulle membrane cellulari piuttosto che sul nucleo cellulare e attivano l'espressione genica normale (118); il PRP non è mutagenico e agisce attraverso la regolazione genica e normali meccanismi di controllo a feed-back per la guarigione delle ferite (119). Inoltre, nei dati riportati in letteratura, le iniezioni di PRP sono sicure e non danno alcun particolare effetto negativo (120-121).

Concentrazione ottimale delle piastrine nel PRP

Ad oggi, esistono più di 40 sistemi commerciali che pretendono di concentrare dal sangue intero, un plasma ricco di piastrine, ma un sistema standardizzato di preparazione deve essere ancora implementato nella pratica (119).

Anche se una concentrazione ottimale di PRP è ancora da determinare, alcuni studi dimostrano che i risultati positivi possono essere raggiunti quando le concentrazioni di piastrine rientrano in un certo range (122).

Effetti biologici particolarmente vantaggiosi sembrano apparire quando si usa una concentrazione piastrinica pari a 1.000.000/ul. Sotto questo intervallo l'effetto è ottimale; oltre questa gamma ci può essere un effetto paradossalmente inibitorio (123). Considerando che, nell'uomo, i valori di riferimento della conta piastrinica vanno da 150.000 a 450.000 per ul, l'aumento di concentrazione ottimale va da 2 a 4 volte. Diversi studi hanno infatti dimostrato che una concentrazione di piastrine troppo elevata può avere effetti paradosso (123- 124-125) inibenti la relazione dose-risposta: in questo modo la concentrazione dei fattori di crescita ed i processi biologici che essi stimolano non è lineare (126-127).

Protocolli di preparazione del PRP

I seguenti tre protocolli usano una sola centrifugazione e ottengono un aumento della concentrazione piastrinica che va dall'80 al 100%. Tutti i protocolli possono essere preparati in modo affidabile ed economico senza l'utilizzo di un kit commerciale.

Protocollo I:

- Prelievo di 9 ml di sangue venoso, in due provette da 4,5ml, con citrato di sodio al 3,8%;
- Centrifugazione per 7 minuti a 2000 rpm;
- Prelievo di 1,5ml (80% circa) del plasma al di sopra del trombo rosso (da ciascuna provetta), usando la massima cautela ed una minima distanza per evitare di inquinare il plasma con i globuli rossi.

- somministrazione del PRP così ottenuto, per via sottocutanea, preferibilmente in corrispondenza della superficie addominale, perché in tale sede il suo assorbimento è più rapido e costante.

Protocollo II:

- Prelievo di 9 ml di sangue venoso, in due provette da 4,5ml, con citrato di sodio al 3,8%;
 - Centrifugazione per 5 minuti a 1500 rpm (350g);
 - Prelievo di 1,5ml (80% circa) del plasma al di sopra del trombo rosso(da ciascuna provetta), usando la massima cautela ed una minima distanza per evitare di inquinare il plasma con i globuli rossi.
 - somministrazione del PRP per via sottocutanea.
- Questo PRP contiene una quantità minima di leucociti (122-128).

Protocollo III:

- Prelievo di 9 ml di sangue venoso in due provette da 4,5ml, con citrato di sodio al 3,8%;
 - Centrifugazione per 9 minuti a 3500 rpm
 - Prelievo di tutto il plasma e, come sopra, distanziare l'ago dal trombo rosso per evitare l'inquinamento del PRP.
 - somministrazione del PRP per via sottocutanea.
- Questo tipo di preparazione ci consente di ottenere il L-PRP (plasma ricco di piastrine e leucociti) (129).

Si potrebbe iniziare con due provette da 4,5 ml, dalle quali si ricavano circa 3 ml di PRP; seguito dalla misurazione post trattamento (previa misurazione basale pre-trattamento) dell'aumento, a livello ematico dei fattori di crescita (e del BDNF). Un risultato positivo potrebbe essere raggiunto con l'ottenimento dei valori riscontrati da Wasterlain et al in seguito a iniezione intratendinea di L- PRP (45). Se il presunto aumento non dovesse verificarsi si dovrà procedere, quindi, ad incrementare la dose, ossia 3 provette da 4,5 ml che ci danno circa 5 ml di PRP.

Le piastrine sintetizzano e rilasciano i fattori di crescita dal momento in cui si attivano; inoltre sintetizzano e secernono fattori di crescita aggiuntivi per i restanti 7-10 giorni della loro vita (43), per cui sarebbe opportuno fare almeno quattro trattamenti al mese, come dose di attacco, per tre mesi, riducendo successivamente il numero di somministrazioni, fino a raggiungere la dose di mantenimento, che varia a seconda della patologia.

SOMMINISTRAZIONE PER VIA SOTTOCUTANEA

Quella che viene chiamata comunemente pelle, in realtà è composta da tre strati: epidermide, derma e sottocute.

La parte superiore (quella che si vede all'esterno) è composta dall'*epidermide*; sotto vi è il *derma* che contiene i bulbi piliferi, le terminazioni nervose, le ghiandole sudoripare e i vasi sanguigni. Lo spessore dei primi due strati di pelle è pressoché uguale per tutti gli individui di qualsiasi corporatura ed è in media di due millimetri. Tra il derma e il tessuto muscolare vi è uno strato occupato principalmente da grasso, chiamato *tessuto sottocutaneo* o *ipoderma*.

La distribuzione e lo spessore dell'ipoderma sono molto variabili. Lo spessore oscilla tra i 0,5 e i 2 cm, risultando minore laddove la pelle è a contatto diretto con osso o cartilagine (135).

La somministrazione parenterale per via sottocutanea (SC) è utilizzata da molte migliaia di pazienti che si autogestiscono quotidianamente, ad esempio quelli che usano l'insulina per gestire il diabete, i riceventi di alcuni tipi di terapia ormonale e così via (136).

Idealmente, tutti i tessuti sottocutanei con massa sufficiente, in assenza di alterazioni cutanee o edemi, possono essere utilizzati per la somministrazione sottocutanea (137). I farmaci somministrati per via SC sono di solito completamente assorbiti dalla circolazione sistemica entro 30 minuti (138); l'assorbimento è compreso tra il 78% e il 100%, anche in pazienti con tessuto sottocutaneo molto sottile o bassa pressione sanguigna periferica (139,140).

Il volume massimo di soluzione somministrabile come iniezione sottocutanea singola è di 2,5 ml, mentre per infusione continua, possono essere somministrati volumi maggiori, abitualmente alla velocità di 1ml/min. (137,141). E' possibile utilizzare due siti d'iniezione differenti per facilitare la diffusione locale (137,141) se, come nel caso del PRP, la soluzione da infondere è maggiore di 2,5 ml.

Il fluido per via sottocutanea può essere somministrato in modo talmente lento che le forze di diffusione e perfusione sono in grado di trasferire quel fluido alla circolazione ad una velocità uguale alla velocità della sua erogazione (142).

CONCLUSIONI

Vista la necessità di una valida terapia, non ancora esistente, per le patologie neurodegenerative, sarebbe opportuno valutare l'efficacia della somministrazione per via sottocutanea che potrebbe essere un'ottima soluzione per un effetto sistemico del PRP. La somministrazione sottocutanea è più efficace nonché sicura sia rispetto alla via di somministrazione intramuscolare che a quella endovenosa: nel tessuto adiposo presente nell'ipoderma si trova, infatti, una concentrazione di MSC di molto superiore a quella presente negli altri tessuti; vi è quindi un'immediata attivazione, mobilitazione e input alla proliferazione di una quantità massiva di Cellule Staminali Mesenchimali. Inoltre, la semplicità di esecuzione della metodica proposta ne permette l'impiego a domicilio o nelle strutture di ricovero e consente di evitare l'ospedalizzazione, con conseguente abbattimento dei costi sia di preparazione che di somministrazione.

Sono ormai trascorsi più di 20 anni dai primi eccellenti risultati, in patologie neurologiche, ottenuti sia con le Cellule Staminali Mesenchimali che con il Plasma

Ricco di Piastrine. Nonostante questo, i trattamenti con il PRP sono a tutt'oggi utilizzati quasi esclusivamente per trattamenti estetici e in ambito ortopedico. I milioni di pazienti affetti da patologie gravi stanno ancora aspettando...

Autore: Graziella Cordeddu
Graziellacordeddu3@gmail.com

BIBLIOGRAFIA

1. Freedman MS, Bar-Or A, Atkins HL, Karussis D, Frassoni F, Lazarus H, Scolding N, Slavin S, Le Blanc K, Uccelli A; MSCT Study Group. **The therapeutic potential of mesenchymal stem cell transplantation as a treatment for multiple sclerosis: consensus report of the International MSCT Study Group.** Mult Scler. 2010 Apr;16(4):503-10. doi: 10.1177/1352458509359727. Epub 2010 Jan 19.
2. Morando S, Vigo T, Esposito M, Casazza S, Novi G, Principato MC, Furlan R, Uccelli A. **The therapeutic effect of mesenchymal stem cell transplantation in experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated by peripheral and central mechanisms.** Stem Cell Res Ther. 2012 Jan 26;3(1):3. doi: 10.1186/scrt94.
3. Bossolasco P, Cova L, Calzarossa C, Rimoldi SG, Borsotti C, Deliliers GL, Silani V, Soligo D, Polli E. **Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro.** Exp Neurol. 2005 Jun;193(2):312-25.
4. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. **Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro.** Exp Neurol. 2000 Aug;164(2):247-56.
5. Shabbir A1, Zisa D, Suzuki G, Lee T. **Heart failure therapy mediated by the trophic activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a noninvasive therapeutic regimen.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009 Jun;296(6):H1888-97. doi: 10.1152/ajpheart.00186.2009. Epub 2009 Apr 24.
6. Bartosh TJ1, Ylöstalo JH, Mohammadipoor A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, Lee RH, Choi H, Prockop DJ. **Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Aug 3;107(31):13724-9. doi: 10.1073/pnas.1008117107. Epub 2010 Jul 19.
7. Mirosou M1, Jayawardena TM, Schmeckpeper J, Gnechi M, Dzau VJ. **Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart.** J Mol Cell Cardiol. 2011 Feb;50(2):280-9. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.08.005. Epub 2010 Aug 19.
8. Shyu KG, Wang BW, Hung HF, Chang CC, Shih DT. **Mesenchymal stem cells are superior to angiogenic growth factor genes for improving myocardial performance in the mouse model of acute myocardial infarction.** J Biomed Sci. 2006 Jan;13(1):47-58. Epub 2005 Nov 9.
9. Constantin G1, Marconi S, Rossi B, Angiari S, Calderan L, Anghileri E, Gini B, Bach SD, Martinello M, Bifari F, Galiè M, Turano E, Budui S, Sbarbati A, Krampera M, Bonetti B. **Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis.** Stem Cells. 2009 Oct;27(10):2624-35. doi: 10.1002/stem.194.
10. Bai L1, Lennon DP, Eaton V, Maier K, Caplan AI, Miller SD, Miller RH. **Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis.** Glia. 2009 Aug 15;57(11):1192-203. doi: 10.1002/glia.20841.
11. Ohtaki H1, Ylostalo JH, Foraker JE, Robinson AP, Reger RL, Shioda S, Prockop DJ. **Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Sep 23;105(38):14638-43. doi: 10.1073/pnas.0803670105. Epub 2008 Sep 23.
12. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. **Mesenchymal stem cells in health and disease.** Nat Rev Immunol. 2008 Sep;8(9):726-36. doi: 10.1038/nri2395.
13. Figueroa FE, Carrión F, Villanueva S, Khoury M. **Mesenchymal stem cell treatment for autoimmune diseases: a critical review.** Biol Res. 2012;45(3):269-77. doi: 10.4067/S0716-97602012000300008.

14. Masatoshi Inden, Daijiro Yanagisawa, Masanori Hijioka and Yoshihisa Kitamura. Review Article: **Therapeutic Effects of Mesenchymal Stem Cells for Parkinson's Disease** *Annals of Neurodegenerative Disorders*. Submitted: 10 April 2016 Accepted: 27 April 2016 Published: 28 April 2016
15. Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, Katakowski M, Zhang LJ, Lu M, Janakiraman N, Chopp M. **Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery**. *Neurology*. 2002 Aug 27;59(4):514-23.
16. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, Giunti D, Ceravolo A, Cazzanti F, Frassoni F, Mancardi G, Uccelli A. **Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy**. *Blood*. 2005 Sep 1;106(5):1755-61. Epub 2005 May 19.
17. Llufríu S, Sepúlveda M, Blanco Y, Marín P, Moreno B, Berenguer J, Gabilondo I, Martínez-Heras E, Sola-Valls N, Arnaiz JA, Andreu EJ, Fernández B, Bullich S, Sánchez-Dalmau B, Graus F, Villoslada P, Saiz A. **Randomized placebo-controlled phase I trial of autologous mesenchymal stem cells in multiple sclerosis**. *PLoS One*. 2014 Dec 1;9(12):e113936. doi: 10.1371/journal.pone.0113936. eCollection 2014.
18. Connick P, Kolappan M, Crawley C, Webber DJ, Patani R, Michell AW, Du MQ, Luan SL, Altmann DR, Thompson AJ, Compston A, Scott MA, Miller DH, Chandran S. **Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study**. *Lancet Neurol*. 2012 Feb;11(2):150-6. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70305-2. Epub 2012 Jan 10.
19. Akiyama Y, Radtke C, Honmou O, Kocsis JD. **Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells**. *Glia*. 2002 Sep;39(3):229-36.
20. Park HJ, Bang G, Lee BR, Kim HO, Lee PH. **Neuroprotective effect of human mesenchymal stem cells in an animal model of double toxin-induced multiple system atrophy parkinsonism**. *Cell Transplant*. 2011;20(6):827-35. doi: 10.3727/096368910X540630. Epub 2010 Nov 5.
21. Gugliandolo A, Bramanti P, Mazzon E. **Mesenchymal stem cell therapy in Parkinson's disease animal models**. *Curr Res Transl Med*. 2017 Apr - Jun;65(2):51-60 Epub 2016 Dec 2.
22. Lee PH, Lee JE, Kim HS, Song SK, Lee HS, Nam HS, Cheong JW, Jeong Y, Park HJ, Kim DJ, Nam CM, Lee JD, Kim HO, Sohn YH. **A randomized trial of mesenchymal stem cells in multiple system atrophy**. *Ann Neurol*. 2012 Jul;72(1):32-40. doi: 10.1002/ana.23612.
23. Lee PH, Kim JW, Bang OY, Ahn YH, Joo IS, Huh K. **Autologous mesenchymal stem cell therapy delays the progression of neurological deficits in patients with multiple system atrophy**. *Clin Pharmacol Ther*. 2008 May;83(5):723-30. Epub 2007 Sep 26.
24. Salem, A.M.; Ahmed, H.H.; Atta, H.M.; Ghazy, M.A.; Aglan, H.A. **Potential of bone marrow mesenchymal stem cells in management of Alzheimer's disease in female rats**. *Cell Biol. Int*. 2014, doi:10.1002/cbin.10331
25. Harach T, Jammes F, Muller C, Duthilleul N, Cheatham V, Zufferey V, Cheatham D, Lukasheva YA, Lasser T, Bolmont T. **Administrations of human adult ischemia-tolerant mesenchymal stem cells and factors reduce amyloid beta pathology in a mouse model of Alzheimer's disease**. *Neurobiol Aging*. 2017 Mar;51:83-96. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.11.009. Epub 2016 Nov 24.
26. Naaldijk Y, Jäger C, Fabian C, Leovsky C, Blüher A, Rudolph L, Hinze A, Stolzing A. **Effect of systemic transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on neuropathology markers in APP/PS1 Alzheimer mice**. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2016 Feb 26. doi: 10.1111/nan.12319. [Epub ahead of print]
27. Matchynski-Franks JJ1, Pappas C, Rossignol J, Reinke T, Fink K, Crane A, Twite A, Lowrance SA, Song C, Dunbar GL. **Mesenchymal Stem Cells as Treatment for Behavioral Deficits and Neuropathology in the 5xFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease**. *Cell Transplant*. 2016;25(4):687-703. doi: 10.3727/096368916X690818. Epub 2016 Feb 2.

28. Ming Li, Kequan Guo and Susumu Ikehara, Review: **Stem Cell Treatment for Alzheimer's Disease**. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 19226-19238; doi:10.3390/ijms151019226
29. Andrews EM, Tsai SY, Johnson SC, Farrer JR, Wagner JP, Kopen GC, Kartje GL. **Human adult bone marrow-derived somatic cell therapy results in functional recovery and axonal plasticity following stroke in the rat**. *Exp Neurol.* 2008 Jun;211(2):588-92. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.02.027. Epub 2008 Mar 13.
30. Uccelli A, Prockop DJ. **Why should mesenchymal stem cells (MSCs) cure autoimmune diseases?** *Curr Opin Immunol.* 2010 Dec;22(6):768-74. doi: 10.1016/j.coi.2010.10.012. Epub 2010 Nov 17.
31. Gerdoni E, Gallo B, Casazza S, Musio S, Bonanni I, Pedemonte E, Mantegazza R, Frassoni F, Mancardi G, Pedotti R, Uccelli A. **Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis**. *Ann Neurol.* 2007 Mar;61(3):219-27.
32. Kassis I, Grigoriadis N, Gowda-Kurkalli B, Mizrahi-Kol R, Ben-Hur T, Slavin S, Abramsky O, Karussis D. **Neuroprotection and immunomodulation with mesenchymal stem cells in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis**. *Arch Neurol.* 2008 Jun;65(6):753-61. doi: 10.1001/archneur.65.6.753.
33. Zhang J, Li Y, Lu M, Cui Y, Chen J, Noffsinger L, Elias SB, Chopp M. **Bone marrow stromal cells reduce axonal loss in experimental autoimmune encephalomyelitis mice**. *J Neurosci Res.* 2006 Aug 15;84(3):587-95.
34. Uccelli A, Laroni A, Freedman MS. **Mesenchymal stem cells as treatment for MS - progress to date**. *Mult Scler.* 2013 Apr;19(5):515-9. doi: 10.1177/1352458512464686. Epub 2012 Nov 1.
35. Nathan J Zvaifler, Lilla Marinova-Mutafchieva, Gill Adams, Christopher J Edwards, Jill Moss, Jan A Burger and Ravinder N Maini. **Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals**. *Arthritis Res* 2000, 2:477-488
36. Qiang Fu, Ning-Ning Tang, Qian Zhang, Yi Liu, Jia-Chen Peng, Ning Fang, Li-Mei Yu, Jin-Wei Liu, and Tao Zhang. **Preclinical Study of Cell Therapy for Osteonecrosis of the Femoral Head with Allogenic Peripheral Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells**. *Yonsei Med J* 2016 Jul;57(4):1006-1015
37. Wan C, He Q, Li G. **Allogenic peripheral blood derived mesenchymal stem cells (MSCs) enhance bone regeneration in rabbit ulna critical-sized bone defect model**. *J Orthop Res.* 2006 Apr;24(4):610-8.
- 1 38. Da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. **In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells**. *Stem Cells.* 2008 Sep;26(9):2287-99. doi: 10.1634/stemcells.2007-1122. Epub 2008 Jun 19.
39. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. **Circulating skeletal stem cells**. *Cell Biol.* 2001 May 28;153(5):1133-40.
40. Whitman DH, Berry RL, Green DM. **Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery**. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997 Nov;55(11):1294-9.
41. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. **Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration**. *Thromb Haemost.* 2004 Jan;91(1):4-15.
42. Alsousou J, Thompson M, Hulley P, Noble A, Willett K. **The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature**. *J Bone Joint Surg Br.* 2009 Aug;91(8):987-96. doi: 10.1302/0301-620X.91B8.22546.
43. Marx RE. **Platelet-rich plasma: evidence to support its use**. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Apr;62(4):489-96.
44. Schilephake H. **Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction**. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002 Oct;31(5):469-84.

45. Wasterlain AS1, Braun HJ, Harris AH, Kim HJ, Dragoo JL. **The systemic effects of platelet-rich plasma injection.** Am J Sports Med. 2013 Jan;41(1):186-93. doi: 10.1177/0363546512466383. Epub 2012 Dec 4.
46. Lee HR1, Park KM, Joung YK, Park KD, Do SH. **Platelet-rich plasma loaded hydrogel scaffold enhances chondrogenic differentiation and maturation with up-regulation of CB1 and CB2.** J Control Release. 2012 May 10;159(3):332-7. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.02.008. Epub 2012 Feb 4.
47. Parsons P1, Butcher A, Hesselden K, Ellis K, Maughan J, Milner R, Scott M, Alley C, Watson JT, Horner A. **Platelet-rich concentrate supports human mesenchymal stem cell proliferation, bone morphogenetic protein-2 messenger RNA expression, alkaline phosphatase activity, and bone formation in vitro: a mode of action to enhance bone repair.** J Orthop Trauma. 2008 Oct;22(9):595-604. doi: 10.1097/BOT.0b013e318188dbb7.
48. Krüger JP, Hondke S, Endres M, Pruss A, Siclari A, Kaps C. **Human platelet-rich plasma stimulates migration and chondrogenic differentiation of human subchondral progenitor cells.** J Orthop Res. 2012 Jun;30(6):845-52. doi: 10.1002/jor.22005. Epub 2011 Nov 4.
49. Mishra A, Tummala P, King A, Lee B, Kraus M, Tse V, Jacobs CR. **Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation.** Tissue Eng Part C Methods. 2009 Sep;15(3):431-5. doi: 10.1089/ten.tec.2008.0534.
50. Dhurat R, Sukesh M. **Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective.**

1

 J Cutan Aesthet Surg. 2014 Oct-Dec;7(4):189-97. doi: 10.4103/0974-2077.150734.
51. Lyras DN, Kazakos K, Agrogiannis G, Verettas D, Kokka A, Kiziridis G, Chronopoulos E, Tryfonidis M. **Experimental study of tendon healing early phase: is IGF-1 expression influenced by platelet rich plasma gel?** Orthop Traumatol Surg Res. 2010 Jun;96(4):381-7. doi: 10.1016/j.otsr.2010.03.010. Epub 2010 May 7.
52. Nakao Y, Otani H, Yamamura T, Hattori R, Osako M, Imamura H. **Insulin-like growth factor 1 prevents neuronal cell death and paraplegia in the rabbit model of spinal cord ischemia.** J Thorac Cardiovasc Surg. 2001 Jul;122(1):136-43.
53. McMorris FA, McKinnon RD. **Regulation of oligodendrocyte development and CNS myelination by growth factors: prospects for therapy of demyelinating disease.** Brain Pathol. 1996 Jul;6(3):313-29.
54. Carson MJ, Behringer RR, Brinster RL, McMorris FA. **Insulin-like growth factor I increases brain growth and central nervous system myelination in transgenic mice.** Neuron. 1993 Apr;10(4):729-40.
55. Chesik D, Wilczak N, De Keyser J. **The insulin-like growth factor system in multiple sclerosis.** Int Rev Neurobiol. 2007;79:203-26.
56. Procaccini C, Santopaolo M, Faicchia D, Colamatteo A, Formisano L, de Candia P, Galgani M, De Rosa V, Matarese G. **Role of metabolism in neurodegenerative disorders.** Metabolism. 2016 Sep;65(9):1376-90. doi: 10.1016/j.metabol.2016.05.018. Epub 2016 Jun 7.
57. Oosthuyse B1, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, Van Dorpe J, Hellings P, Gorselink M, Heymans S, Theilmeier G, Dewerchin M, Laudénbach V, Vermeylen P, Raat H, Acker T, Vleminckx V, Van Den Bosch L, Cashman N, Fujisawa H, Drost MR, Sciort R, Bruyninckx F, Hicklin DJ, Ince C, Gressens P, Lupu F, Plate KH, Robberecht W, Herbert JM, Collen D, Carmeliet P. **Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration.** Nat Genet. 2001 Jun;28(2):131-8.
58. Jin KL1, Mao XO, Greenberg DA. **Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Aug 29;97(18):10242-7.

59. Storkebaum E, Carmeliet P. **VEGF: a critical player in neurodegeneration.** J Clin Invest. 2004 Jan;113(1):14-8.
60. Storkebaum E, Lambrechts D, Carmeliet P. **VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection.** Bioessays. 2004 Sep;26(9):943-54
61. Ruiz de Almodovar C, Lambrechts D, Mazzone M, Carmeliet P. **Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system.** Physiol Rev. 2009 Apr;89(2):607-48.
62. Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A, Greenberg DA. **VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia.** J Clin Invest. 2003 Jun;111(12):1843-51.
63. Louissaint A Jr, Rao S, Leventhal C, Goldman SA. **Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain.** Neuron. 2002 Jun 13;34(6):945-60.
64. Silverman WF, Krum JM, Mani N, Rosenstein JM. **Vascular, glial and neuronal effects of vascular endothelial growth factor in mesencephalic explant cultures.** Neuroscience. 1999;90(4):1529-41.
65. Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I, Al-Chalabi A, Bornes S, Musson R, Hansen V, Beckman L, Adolfsson R, Pall HS, Prats H, Vermeire S, Rutgeerts P, Katayama S, Awata T, Leigh N, Lang-Lazdunski L, Dewerchin M, Shaw C, Moons L, Vlietinck R, Morrison KE, Robberecht W, Van Broeckhoven C, Collen D, Andersen PM, Carmeliet P. **VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death.** Nat Genet. 2003 Aug;34(4):383-94.
66. Storkebaum E, Lambrechts D, Carmeliet P. **VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection.** Bioessays. 2004 Sep;26(9):943-54.
67. Lu L, Zheng L, Viera L, Suswam E, Li Y, Li X, Estévez AG, King PH. **Mutant Cu/Zn-superoxide dismutase associated with amyotrophic lateral sclerosis destabilizes vascular endothelial growth factor mRNA and downregulates its expression.** J Neurosci. 2007 Jul 25;27(30):7929-38.
68. Pratt BM, McPherson JM. **TGF-beta in the central nervous system: potential roles in ischemic injury and neurodegenerative diseases.** Cytokine Growth Factor Rev. 1997 Dec;8(4):267-92.
69. Brionne TC, Tesseur I, Masliah E, Wyss-Coray T. **Loss of TGF-beta 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain.** Neuron. 2003 Dec 18;40(6):1133-45.
70. Vivien D, Ali C. **Transforming growth factor-beta signalling in brain disorders.** Cytokine Growth Factor Rev. 2006 Feb-Apr;17(1-2):121-8. Epub 2005 Nov 3.
71. Caleb E. Finch, Nicholas J. Laping, Todd E. **TGF-1 is an organizer of responses to neurodegeneration.** Journal of Cellular Biochemistry 53:314-322 (1993)
72. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. **Transforming growth factor-beta regulation of immune responses.** Annu Rev Immunol. 2006;24:99-146.
73. Bialas AR, Stevens B. **TGF-1 signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement.** Nat Neurosci. 2013 Dec;16(12):1773-82. doi: 10.1038/nn.3560. Epub 2013 Oct 27.
74. Butovsky O1, Jedrychowski MP2, Moore CS3, Cialic R1, Lanser AJ1, Gabriely G1, Koeglspenger T1, Dake B1, Wu PM1, Doykan CE1, Fanek Z1, Liu L4, Chen Z5, Rothstein JD5, Ransohoff RM4, Gygi SP2, Antel JP3, Weiner HL1. **Identification of a unique TGF-beta dependent molecular and functional signature in microglia.** Nat Neurosci. 2014 Jan;17(1):131-43. doi: 10.1038/nn.3599. Epub 2013 Dec 8.
75. Wyss-Coray T. **Tgf-Beta pathway as a potential target in neurodegeneration and Alzheimer's.** Curr Alzheimer Res. 2006 Jul;3(3):191-5.
76. Lee HG, Ueda M, Zhu X, Perry G, Smith MA. **Ectopic expression of phospho-Smad2 in Alzheimer's disease: uncoupling of the transforming growth factor-beta pathway?** J Neurosci Res. 2006 Dec;84(8):1856-61.

77. Chalmers KA1, Love S. **Neurofibrillary tangles may interfere with Smad 2/3 signaling in neurons.** J Neuropathol Exp Neurol. 2007 Feb;66(2):158-67.
78. Luteran JD1, Haroutunian V, Yemul S, Ho L, Purohit D, Aisen PS, Mohs R, Pasinetti GM. **Cytokine gene expression as a function of the clinical progression of Alzheimer disease dementia.** Arch Neurol. 2000 Aug;57(8):1153-60.
79. Wyss-Coray T, Lin C, Yan F, Yu GQ, Rohde M, McConlogue L, Masliah E, Mucke L. **TGF-beta1 promotes microglial amyloid-beta clearance and reduces plaque burden in transgenic mice.** Nat Med. 2001 May;7(5):612-8
80. Peress NS, Perillo E. **Differential expression of TGF-beta 1, 2 and 3 isotypes in Alzheimer's disease: a comparative immunohistochemical study with cerebral infarction, aged human and mouse control brains.** J Neuropathol Exp Neurol. 1995 Nov;54(6):802-11.
81. Van der Wal EA, Gómez-Pinilla F, Cotman CW. **Transforming growth factor-beta 1 is in plaques in Alzheimer and Down pathologies.** Neuroreport. 1993 Jan;4(1):69-72.
82. Caraci F, Battaglia G, Bruno V, Bosco P, Carbonaro V, Giuffrida ML, Drago F, Sortino MA, Nicoletti F, Copani A. **TGF-b1 pathway as a new target for neuroprotection in Alzheimer's disease.** CNS Neurosci Ther. 2011 Aug;17(4):237-49. doi: 10.1111/j.1755-5949.2009.00115.x. Epub 2009 Nov 19.
83. Sortino MA, Chisari M, Merlo S, Vancheri C, Caruso M, Nicoletti F, Canonico PL, Copani A. **Glia mediates the neuroprotective action of estradiol on beta-amyloid-induced neuronal death.** Endocrinology. 2004 Nov;145(11):5080-6. Epub 2004 Aug 12.
84. Prehn JH, Bindokas **Protective effect of transforming growth factor-beta 1 on beta-amyloid neurotoxicity in rat hippocampal neurons.** Mol Pharmacol. 1996 Feb;49(2):319-28.
85. Kim ES, Kim RS, Ren RF, Hawver DB, Flanders KC. **Transforming growth factor-beta inhibits apoptosis induced by beta-amyloid peptide fragment 25-35 in cultured neuronal cells.** Brain Res Mol Brain Res. 1998 Nov 20;62(2):122-30.
86. Zachrisson O, Zhao M, Andersson A, Dannaeus K, Häggblad J, Isacson R, Nielsen E, Patrone C, Rönholm H, Wikström L, Delfani K, McCormack AL, Palmer T, Di Monte DA, Hill MP, Janson Lang AM, Haegerstrand A. **Restorative effects of platelet derived growth factor-BB in rodent models of Parkinson's disease.** J Parkinsons Dis. 2011;1(1):49-63. doi: 10.3233/JPD-2011-0003.
87. Padel T, Özen I, Boix J, Barbariga M, Gaceb A, Roth M, Paul G. **Platelet-derived growth factor-BB has neurorestorative effects and modulates the pericyte response in a partial 6 hydroxydopamine lesion mouse model of Parkinson's disease.** Neurobiol Dis. 2016 Oct;94:95-105. doi: 10.1016/j.nbd.2016.06.002. Epub 2016 Jun 7.
88. Bus BA, Molendijk ML, Penninx BJ, Buitelaar JK, Kenis G, Prickaerts J, Elzinga BM, Voshaar RC. **Determinants of serum brain-derived neurotrophic factor.** Psychoneuroendocrinology. 2011 Feb;36(2):228-39. doi: 10.1016/j.psyneuen.2010.07.013. Epub 2010 Aug 10.
89. Karege F, Bondolfi G, Gervasoni N, Schwald M, Aubry JM, Bertschy G. **Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity.** Biol Psychiatry. 2005 May 1;57(9):1068-72.
90. Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, Kambayashi J, Sun B, Tandon NN. **Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation.** Thromb Haemost. 2002 Apr;87(4):728-34.
91. Radka SF, Holst PA, Fritsche M, Altar CA. **Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay.** Brain Res. 1996 Feb 12;709(1):122-301.

92. Tamura S, Suzuki H, Hirowatari Y, Hatase M, Nagasawa A, Matsuno K, Kobayashi S, Moriyama T. **Release reaction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) through PAR1 activation and its two distinct pools in human platelets.** *Thromb Res.* 2011 Nov;128(5):e55-61. doi:10.1016/j.thromres.2011.06.002. Epub 2011 Sep 14.
93. Huang EJ, Reichardt LF. **Neurotrophins: roles in neuronal development and function.** *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:677-736.
94. Tapia-Arancibia L, Rage F, Givalois L, Arancibia S. **Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function.** *Front Neuroendocrinol.* 2004 Jul;25(2):77-107.
95. Krishna V, Konakondla S, Nicholas J, Varma A, Kindy M, Wen X. **Biomaterial-based interventions for neuronal regeneration and functional recovery in rodent model of spinal cord injury: a systematic review.** *J Spinal Cord Med.* 2013 May;36(3):174-90.
96. Schmidt HD, Duman RS. **Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models.** *Neuropsychopharmacology.* 2010 Nov;35(12):2378-91.
97. Alcalá-Barraza SR1, Lee MS, Hanson LR, McDonald AA, Frey WH 2nd, McLoon LK. **Intranasal delivery of neurotrophic factors BDNF, CNTF, EPO, and NT-4 to the CNS.** *J Drug Target.* 2010 Apr;18(3):179-90. doi: 10.3109/10611860903318134.
98. Armelloni S, Zennaro C, Wei C, Corbelli A, Ikehata M, Berra S, Giardino L, Mattinzoli D, Watanabe S, Agostoni C, Edefonti A, Reiser J, Messa P, Rastaldi MP. **BDNF repairs podocyte damage by microRNA-mediated increase of actin polymerization.** *J Pathol.* 2015 Apr;235(5):731-44. doi: 10.1002/path.4484. Epub 2015 Jan 7.
99. Margolis DJ, Kantor J, Santanna J, Strom BL, Berlin JA. **Effectiveness of platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers.** *Diabetes Care.* 2001 Mar;24(3):483-8.
100. Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Austin LL, Butler EL. **Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF).** *Ann Surg.* 1986 Sep;204(3):322-30.
101. Hechtman KS, Uribe JW, Botto-vanDemden A, Kiebzak GM. **Platelet-rich plasma injection reduces pain in patients with recalcitrant epicondylitis.** *Orthopedics.* 2011 Jan 1;34(2):92. doi: 10.3928/01477447-20101221-05.
102. Ding XG, Li SW, Zheng XM, Hu LQ, Hu WL, Luo Y. **The effect of platelet-rich plasma on cavernous nerve regeneration in a rat model.** *Asian J Androl.* 2009 Mar;11(2):215-21. doi: 10.1038/aja.2008.37. Epub 2009 Jan 19.
103. Emel E, Ergün SS, Kotan D, Gürsoy EB, Parman Y, Zengin A, Nurten A. **Effects of insulin-like growth factor-I and platelet-rich plasma on sciatic nerve crush injury in a rat model.** *J Neurosurg.* 2011 Feb;114(2):522-8. doi: 10.3171/2010.9.JNS091928. Epub 2010 Oct 29.
104. Elisabetta Giannessi, Alessandra Coli, Maria Rita Stornelli, Vincenzo Miragliotta, Andrea Pirone, Carla Lenzi, Silvia Burchielli, Giovanni Vozzi, Carmelo De Maria, Margherita Giorgetti **An autologously generated platelet-rich plasma suturable membrane may enhance peripheral nerve regeneration after neurorrhaphy in an acute injury model of sciatic nerve neurotmesis.** *J Reconstr Microsurg* 2014 Nov 16;30(9):617-26. Epub 2014 May 16.
105. Park GY1, Kwon DR. **Platelet-rich plasma limits the nerve injury caused by 10% dextrose in the rabbit median nerve.** *Muscle Nerve.* 2014 Jan;49(1):56-60. doi: 10.1002/mus.23863. Epub 2013 Sep 20.
106. Elgazzar RF, Mutabagani MA, Abdelaal SE, Sadakah AA. **Platelet rich plasma may enhance peripheral nerve regeneration after cyanoacrylate reanastomosis: a controlled blind study on rats.** *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008 Aug;37(8):748-55. doi: 10.1016/j.ijom.2008.05.010. Epub 2008 Jun 25.
107. do Amaral RJ, da Silva NP, Haddad NF, Lopes LS, Ferreira FD, Filho RB, Cappelletti PA, de Mello W, Cordeiro-Spinetti E, Balduino A. **Platelet-Rich Plasma Obtained with Different Anticoagulants and Their Effect on Platelet Numbers and Mesenchymal Stromal Cells Behavior In Vitro.** *Stem Cells Int.* 2016;2016:7414036. doi: 10.1155/2016/7414036. Epub 2016 Jun 2.

108. Callan MB, Shofer FS, Catalfamo JL. **Effects of anticoagulant on pH, ionized calcium concentration, and agonist-induced platelet aggregation in canine platelet-rich plasma.** Am J Vet Res. 2009 Apr;70(4):472-7. doi: 10.2460/ajvr.70.4.472.
109. Guder WG, Narayanan S, Wisser H, Zawta B. **Special Aspects of Haematological Analysis: Diagnostic Samples: From the Patient to the Laboratory: The Impact of Preanalytical Variables on the Quality of Laboratory Results.** 4th ed. Wiley - Blackwell Publications; 2009. pp. 36–7);
110. Landesberg R, Moses M, Karparkin M. **Risks of using platelet rich plasma gel.** J Oral Maxillofac Surg. 1998 Sep;56(9):1116-7.
111. Cmolik BL, Spero JA, Magovern GJ, Clark RE. **Redo cardiac surgery: late bleeding complications from topical thrombin-induced factor V deficiency.** J Thorac Cardiovasc Surg. 1993 Feb;105(2):222-7; discussion 227-8.
112. Mishra A, Pavelko T. **Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma.** Am J Sports Med. 2006 Nov;34(11):1774-8. Epub 2006 May 30.
113. Shani S1, Ahmad RE2, Naveen SV3, Murali MR3, Puvanan K3, Abbas AA3, Kamarul T4. **Platelet rich concentrate promotes early cellular proliferation and multiple lineage differentiation of human mesenchymal stromal cells in vitro.** Scientific World Journal. 2014;2014:845293.
114. Chaer RA1, Graham JA, Mureebe L. **Platelet function and pharmacologic inhibition.** Vasc Endovascular Surg. 2006 Aug-Sep;40(4):261-7.
115. Flammer J1, Mozaffarieh M. **What is the present pathogenetic concept of glaucomatous optic neuropathy?** Surv Ophthalmol. 2007 Nov;52 Suppl 2:S162-73.
116. Varga E, Bodi A, Ferdinandy P, Droy-Lefaix MT, Blasig IE, Tosaki A.299. **The protective effect of EGb 761 in isolated ischemic/reperfused rat hearts: a link between cardiac function and nitric oxide production.** J Cardiovasc Pharmacol. 1999 Nov;34(5):711-7.
117. Wu Y, Li S, Cui W, Zu X, Du J, Wang F. **Ginkgo biloba extract improves coronary blood flow in healthy elderly adults: role of endothelium-dependent vasodilation.** Phytomedicine 2008; 15:164-
118. Everts PA, Hoffmann J, Weibrich G, Mahoney CB, Schönberger JP, van Zundert A, Knape JT. **Differences in platelet growth factor release and leucocyte kinetics during autologous platelet gel formation.** Transfus Med. 2006 Oct;16(5):363-8.
119. Salamanna F, Veronesi F, Maglio M, Della Bella E, Sartori M, Fini M. 1
 New and emerging strategies in platelet-rich plasma application in musculoskeletal regenerative procedures: general overview on still open questions and outlook. Biomed Res Int. 2015;2015:846045.
120. Filardo G, Kon E, Pereira Ruiz MT, Vaccaro F, Guitaldi R, Di Martino A, Cenacchi A, Fornasari PM, Marcacci M. **Platelet-rich plasma intra-articular injections for cartilage degeneration and osteoarthritis: single- versus double-spinning approach.** 1
 Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2012 Oct;20(10):2082-91. Epub 2011 Dec 28.
121. Wang-Saegusa A, Cugat R, Ares O, Seijas R, Cuscó X, Garcia-Balletbó M. **Infiltration of plasma rich in growth factors for osteoarthritis of the knee short-term effects on function and quality of life.** Arch Orthop Trauma Surg. 2011 Mar;131(3):311-7. doi: 10.1007/s00402-010-1167-3. Epub 2010 Aug 17.
122. Metcalf KB, Mandelbaum BR, McIlwraith CW. **Application of Platelet-Rich Plasma to Disorders of the Knee Joint.** 1 **Cartilage.** 2013 Oct;4(4):295-312. doi: 10.1177/1947603513487553.
123. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. **Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on periimplant bone regeneration.** Bone. 2004;34(4):665-71)

124. Graziani F, Ivanovski S, Cei S, Ducci F, Tonetti M, Gabriele M. **The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts.** Clin Oral Implants Res. 2006;17(2):212-219;
125. Yamaguchi R, Terashima H, Yoneyama S, Tadano S, Ohkohchi N. **Effects of platelet-rich plasma on intestinal anastomotic healing in rats: PRP concentration is a key factor.** [published online ahead of print November 2, 2010]. J Surg Res
126. Alberto Gobbi, MD, Georgios Karnatzikos, MD, Vivek Mahajan, MD, and Somanna Malchira, MD. **Platelet-Rich Plasma Treatment in Symptomatic Patients With Knee Osteoarthritis: Preliminary Results in a Group of Active Patients.** Orthopaedic surgery.
127. Cho HS, Song IH, Park SY, Sung MC, Ahn MW, Song KE. **Individual variation in growth factor concentrations in platelet-rich plasma and its influence on human mesenchymal stem cells.** Korean J Lab Med. 2011;31(3):212-8.
128. Sistema Artex ACP:
<https://www.arthrex.com/resources/animation/z5DJQTOXdEy0dwE2LZN7CQ/acp-autologous-conditioned-plasma>
- 1 129. Gobbi A, Karnatzikos G, Mahajan V, Malchira S. **Platelet-rich plasma treatment in symptomatic patients with knee osteoarthritis: preliminary results in a group of active patients.** Sports Health. 2012 Mar;4(2):162-72.
130. Tamimi FM, Montalvo S, Tresguerres I, Blanco Jerez L. **A Comparative Study of 2 Methods for Obtaining Platelet-Rich Plasma.** J Oral Maxillofac Surg. 2007 Jun;65(6):1084-93).
- 1 131. Nagata MJ, Messori MR, Furlaneto FA, Fucini SE, Bosco AF, Garcia VG, Deliberador TM, de Melo LG. **Effectiveness of two methods for preparation of autologous platelet-rich plasma: an experimental study in rabbits.** Eur J Dent. 2010 Oct;4(4):395-40).
135. Da Anastasi, Capitani et all., *Trattato di Anatomia Umana*, Edi-Ermes, 2012; pagina 27
136. Gabriel J. The use of subcutaneous infusion in medication administration. Br J Nurs. 2013 Jul 25-Aug 7;22(14):S6, S8, S10 passim.
137. Morichon E. **Guide pour l'Administration de Médicaments par Voie Sous-Cutanée.** Bulletin d'Information du médicament et de pharmacovigilance 2006; 128
138. G. Laval, B. Sang, MC. Villard. **Les principales thérapeutiques en soins palliatifs chez l'adulte et la personne âgée.** 2ème Edition ; Sauramps medical 2004 : 299 pages
139. A. Hirschauer. **L'hypodermoclyse : perfusion sous-cutanée continue ou discontinue.** FMC du 8 février 2005 AMEM (Association des Médecins de l'Est du Morbihan).
140. Lipschitz S, Campbell AJ, Roberts MS. **Subcutaneous fluid administration in elderly subjects: validation of an under-used technique.** J Am Geriatr Soc 1991;39:6-9).
141. Sasson M, Shvartzman P. **Hypodermoclysis: an alternative infusion technique.** Am Fam Physician 2001;64:1575-8).
142. Berger EY. Nutrition by Hypodermoclysis. J Am Geriatr Soc. 1984 Mar; 32 (3): 199-203. .

Graziella Cordeddu 3913130316

Graziellacordeddu3@gmail.com