



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”**



Tesi di Dottorato

**“Standardizzazione del protocollo di produzione,
valutazione macroscopica, istologica e
quantificazione dei fattori di crescita delle
membrane di fibrina ricche di leucociti e piastrine
canine: studio prospettico per l’applicazione clinica”**

Coordinatore

Prof. Giuseppe
Cringoli

Candidato

Dott.ssa Chiara
Caterino

Tutor

Prof. Gerardo
Fatone

Lista delle abbreviazioni	6
Lista delle figure	7
Lista delle tabelle	8
Abstract	10
Introduzione	
I Le piastrine	12
II La citostruttura piastrinica	13
III I granuli piastrinici	16
IV Il processo emostatico	21
V La guarigione delle ferite	23
VI Bibliografia	26
Capitolo 1	
1.1 Cenni storici sui concentrati piastrinici	31
1.2 Classificazione dei concentrati piastrinici	33
1.3 Il PRP	35
1.4 Il PRF	37
1.5 Caratteristiche strutturali e biologiche	40
1.6 Implicazioni cliniche dei diversi preparati	43
1.7 Bibliografia	45
Capitolo 2	
2.1 Scopo della tesi	50
2.2 Materiali e Metodi	52
2.2.1 Modalità di prelievo	53
2.2.2 Protocollo di centrifugazione	53
2.2.3 Preparazione della membrana L-PRF	54
2.2.4 Valutazione macroscopica	55
2.2.5 Valutazione morfologica	56
2.2.6 Quantificazione dei fattori di crescita	56
2.2.7 Analisi statistica	57
2.3 Risultati	58
2.4 Discussione	65
2.5 Bibliografia	69
Capitolo 3	
3.1 Conclusioni	72

L-PRF	Leukocyte-Platelet Rich Fibrin
TGF- β 1	Transforming Growth Factor- β 1
PDGF	Platelet-derived growth factor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
NSAID	Nonsteroidal anti-inflammatory drug
MEP	Megakaryocyte-Erythroid Progenitor
DMS	Demarcation Membrane System
EGF	Epidermal Growth Factor
FGF	Fibroblast Growth Factor
IGF	Insulin-like Growth Factor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
EPC	Epidermal Progenitor Cell
P-PRP	Pure Platelet-Rich Plasma
L-PRP	Leucocyte and Platelet-Rich Plasma
P-PRF	Pure Platelet-Rich Fibrin
IFAT	Indirect Immunofluorescent Antibody Test
BCS	Body Condition Score
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FANS	Farmaci Anti-Infiammatori Non Steroidei

- 1 Figura 1: **A.** Ricostruzione digitale delle giunzioni tetramolecolari esistenti fra le fibrille di fibrina. Si noti la rigidità di questa architettura. **B.** Ricostruzione digitale delle giunzioni trimolecolari tra le fibrille di fibrina. Si noti la flessibilità della rete fibrinica. Modificato da Dohan Ehrenfest et al. 2006.
- 2 Figura 2: **A.** Coagulo L-PRF ottenuto dopo la centrifugazione, il coagulo rosso è rimosso delicatamente utilizzando un paio di forbici. **B.** Coagulo L-PRF all'interno della "wound box". **C.** Membrana L-PRF ottenuta dopo una pressione di 15 minuti.
- 3 Figura 3: Istologia di un coagulo L-PRF. **A.** Porzione cellulare di un coagulo PRF (magnificazione X10). **B.** Coagulo PRF (magnificazione X40). P = piastrine; E = eritrociti; F = fibrina; L = leucociti; PRF = fibrina ricca di piastrine (platelet-rich fibrin).
- 4 Figura 4: Risultati dell'ANOVA test di Friedman per il VEGF; * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$
- 5 Figura 5: Risultati dell'ANOVA test di Friedman per il PDGF-AA; *** = $p < 0,001$
- 6 Figura 6: Risultati dell'ANOVA test di Friedman per il IGF-1; *** = $p < 0,001$
- 7 Figura 7: Risultati dell'ANOVA test di Friedman per il TGF- β 1; *** = $p < 0,001$

- 1 Tabella 1: Fattori di crescita piastrinici.
- 2 Tabella 2: Protocollo di centrifugazione
- 3 Tabella 3: Distribuzione delle razze e del sesso nel gruppo campione.
- 4 Tabella 4: Esame emocromocitometrico; RBC= eritrociti; WBC= leucociti; PLT= piastrine.
- 5 Tabella 5: Risultati del test ELISA a T0, T1, T2 e T3. DS= deviazione standard; VEGF=, vascular endothelial growth factor; PDGF= platelet-derived growth factor; IGF-1=insulin-like growth factor-1; TGF- β 1=transforming growth factor beta 1.

La medicina rigenerativa e l'ingegneria tissutale hanno ottenuto raggiunto un interesse crescente negli ultimi decenni sia in medicina umana che in quella veterinaria. I concentrati piastrinici sono derivati ematici ottenuti da sangue autologo e sono ampiamente utilizzati in chirurgia maxillofacciale, medicina sportiva e ortopedia.

La fibrina ricca di piastrine e leucociti (L-PRF) è considerata la seconda generazione di concentrato piastrinico; è utilizzata come un sigillante autologo a base di piastrine e un agente emostatico nella guarigione delle ferite chirurgiche. Il coagulo L-PRF e la membrana L-PRF sono caratterizzate da una struttura viscoelastica, costituita da uno scaffold di fibrina che costituisce una rete tridimensionale all'interno della quale sono distribuite i leucociti, le piastrine e le cellule staminali. Tale scaffold biologico è in grado di rilasciare fattori di crescita (come ad esempio TGF- β 1, PDGF-AB, VEGF) e protiene della matrice (fibronectina, vitronectina e trombospodina-1) dopo l'applicazione durante il processo di guarigione.

Fino ad oggi non è ancora stato descritto e standardizzato né in medicina umana né in quella veterinaria un protocollo per la produzione di L-PRF. Pertanto, questo studio prospettico ha l'obiettivo di applicare il protocollo di Choukroun modificato da Crisci nella specie canina, valutare macroscopicamente (dimensioni e peso) ed istologicamente le membrane ottenute mediante l'utilizzo della "wound box" per standardizzare un protocollo di produzione nel cane e di valutare, poi l'applicabilità delle membrane tramite la valutazione quali-quantitativa del rilascio di fattori di crescita dalle membrane tramite test ELISA in un intervallo temporale di 7 giorni

Sono stati arruolati 128 cani, in buone condizioni generali di salute, che non avessero assunto antinfiammatori nei 15 giorni precedenti all'arruolamento e/o nessun altro farmaco o patologia che potesse interferire con il normale processo coagulativo.

Abbiamo ottenuto 172 membrane L-PRF: una metà di queste è stata destinata all'analisi macroscopica e poi istologica, l'altra metà è stata utilizzata per i test ELISA.

Abbiamo ottenuto membrane con lunghezza media ($\pm$ DS) di 1,97cm ($\pm$ 0,89), larghezza media di 0,95 cm ($\pm$ 0,36) ed infine peso medio di 0,46 g ($\pm$ 0,20). L'esame istologico ha confermato una istoarchitettura caratterizzata da 5 strati ben distinti fra loro, distinguibili per la densità e la distribuzione al loro interno delle cellule ematiche.

L'analisi tramite test ELISA ha mostrato un primo picco di rilascio di fattori di crescita nelle prime 6h dopo la produzione della membrana, una riduzione

del rilascio nell'intervallo compreso tra le successive 24 e 72h, seguito però da un secondo picco di rilascio a 168h dalla produzione.

I risultati ottenuti confermano, pertanto, l'efficacia e l'applicabilità di questo protocollo nella specie canina.

Regenerative medicine and tissue engineering have gained increasing interest in human and veterinary medicine in the last decades. Platelet concentrates are autologous blood products that have a widespread use since their introduction in dental and maxillofacial surgery, sports medicine and orthopaedics. Leukocytes-Platelets Rich Fibrin (L-PRF) is a new generation of platelet concentrates; it was widely used, as an autologous platelet-based wound sealant and hemostatic agent in surgical wound healing. L-PRF clot or membrane is a solid fibrin-based biomaterial, with a specific 3D distribution of the leukocytes and platelet aggregates and stem cells. This biological scaffold releases growth factors (i.e., TGFbeta1, PDGF-AB, VEGF) and matrix proteins (fibronectin, vitronectin and thrombospondin-1) during the healing process after the application.

To the Authors' knowledge both in human and veterinary medicine a unique standardized protocol was not reported. This prospective study aimed to apply Crisci's L-PRF protocol in canine species, evaluate macroscopically and histologically the L-PRF membranes obtained by using Wound Box to standardize the L-PRF protocol in dogs and to evaluate the clinical feasibility of using L-PRF membranes by quantitative in vitro analysis of growth factors over 7 days.

One hundred twenty-eight dogs in good general condition with no history of recent NSAIDs intake (15 days of washout) and/or any medication or disease related to coagulation process were enrolled.

We obtained 172 membrane L-PRF membranes: half of them underwent macroscopic and histological analysis, the other 86 underwent ELISA analysis.

The Wound Box gave a membrane of mean ($\pm$ SD) length (cm), width (cm) and weight (g) of 1.97 ($\pm$ 0.89), 0.95 ($\pm$ 0.36), 0.46 ($\pm$ 0.20) respectively. Histology analysis confirmed a well-defined histoarchitecture with 5 layers reproducing density and distribution of blood cells in this biomaterial.

Finally, the ELISA test showed a peak of growth factors after 6h from membrane production followed by a reduction in the release after 24h and 72 h and the second peak of release at 168 h from the production.

Our data confirm the effectiveness of this protocol and of Wound Box to produce L-PRF membranes in dogs.

I. Le piastrine

Le piastrine, o trombociti, sono frammenti di cellule facenti parte degli elementi figurati del sangue; presentano una forma rotondeggiante od ovale con diametro variabile da 1 a 3 μm , raggiungendo e talvolta superando i 10 μm in alcune razze canine come il Cavalier King Charles Spaniel (1). Nei mammiferi, si presentano come corpuscoli privi di nucleo prodotti a livello del midollo osseo dalla frammentazione di cellule giganti polinucleate i megacariociti che derivano a loro volta da un progenitore bipotente megacariocita-eritroide (megakaryocyte-erythroid progenitor- MEP) (2).

Negli esseri umani e negli animali domestici i megacariociti sono principalmente localizzati a livello del midollo osseo. Nei topi, invece, la milza è considerata un organo ematopoietico in grado di produrre tutte le linee cellulari, compresi, pertanto, megacariociti.

I megacariociti subiscono il processo di frammentazione durante il circolo polmonare nella maggior parte dei mammiferi.

Durante le prime fasi di sviluppo dei megacariociti, la cellula progenitrice subisce le tipiche divisioni cellulari e nel contempo acquisisce recettori e marker specifici che si riscontrano anche nella piastrina. Le fasi finali di sviluppo, invece, sono caratterizzate da varie fasi di endomitosi nelle quali mancano l'anafase, la telofase e la citochinesi che esitano, quindi, nella suddivisione del DNA, senza divisione citoplasmatica (3). La motivazione di questa divisione "atipica" è da ricercare nella mancata formazione di un fuso mitotico funzionante (4).

La differenziazione finale dei megacariociti avviene quando l'endomitosi è completata e si formano delle invaginazioni della membrana citoplasmatica che forma il sistema a membrana di demarcazione (demarcation membrane system- DMS) (5). Il DMS, da studi recenti, risulterebbe responsabile della formazione di riserve di membrana citoplasmatica fondamentale per la formazione e l'estensione delle propiastine (5).

Insieme alla formazione del DMS, si assiste anche alla sintesi dei granuli piastrinici che vengono spostati dai microtubuli presenti nelle estensioni delle propiastine (6).

Al termine della formazione delle propiastine, il nucleo va incontro ad apoptosi.

II. La citostruttura piastrinica

Le piastrine sono dotate di una membrana citoplasmatica caratterizzata da un doppio strato fosfolipidico all'interno del quale si collocano microdomini lipidici meno fluidi, detti "zattere lipidiche", costituiti da sfingolipidi, molecole di colesterolo e alcune proteine. Queste ultime, grazie al loro notevole grado di mobilità, sono fondamentali durante la fase di attivazione piastrinica e durante la riorganizzazione del citoscheletro per la retrazione del coagulo (7).

Tra i recettori dello strato più esterno della membrana plasmatica si annoverano le selectine (come GMP 140 o P-selectina), le integrine (come GP I, GP II, GP III, GP IV, GP V), le immunoglobuline e altri recettori, come quelli per l'adenosina difosfato (ADP), il collagene, l'epinefrina, la trombina etc., che partecipano all'adesione e all'aggregazione delle piastrine e alla coagulazione (8,9).

Le integrine sono composte da 2 polipeptidi, subunità α e β , che modificando la loro conformazione strutturale riconoscono alcune specifiche sequenze presenti nelle proteine circolanti o dell'endotelio, rendendo possibile le reazioni di adesione e aggregazione piastrinica(7) .

Tra i principali recettori:

- GP Ib-IX-V (conosciuto come recettore vWF), complesso glicoproteico transmembrana, composto da subunità ricche di leucina (circa 60.000 per piastrina). Origina dai megacariociti, ma esplica la sua azione sulla superficie delle piastrine, come mediatore nella prima fase di adesione piastrinica, facilitando il legame al Fattore di Von Willebrand (vWF) sul sub-endotelio danneggiato in condizioni di elevata sollecitazione (10) ;
- GP VI (principale recettore del collagene), glicoproteina transmembrana, composto da due anelli di immunoglobulina C2 che legano il collagene. Svolge un ruolo importante nell'attivazione e nell'aggregazione piastrinica indotta dal collagene(11);
- GP IIb-IIIa (recettore fibrinogeno), anche conosciute come integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, sono il complesso glicoproteico maggiormente rappresentato sulla superficie delle piastrine (circa 50.000-80.000 per piastrina).

Mediano l'aggregazione piastrinica legando proteine come il fibrinogeno, il fattore di Von Willerbrand, fibronectina e vitronectina e determinando la prima fase dell'adesione piastrinica all'endotelio (12);

- GP Ia-IIa, conosciuto come VLA2 (*very late antigen*) sui linfociti (circa 2000-3000 per piastrina), è il principale recettore di adesione del collagene, favorisce l'attivazione piastrinica tramite il legame del collagene con questo recettore (13);
- GP Ic-IIa (recettore vitronectina), conosciuta come integrina $\alpha_v\beta_3$ (circa 200-300 per piastrina) e integrina $\alpha_6\beta_1$ (recettore fibronectina). Hanno la capacità di modificare la loro conformazione strutturale riconoscendo alcune specifiche sequenze (arginina, glicina, acido aspartico = RGD) e spesso presenti in proteine come vitronectina, fibrinogeno e laminina (14,15).

Al di sotto della membrana piastrinica è presente una banda circonferenziale di microtubuli, strutture cilindriche cave composte da protofilamenti formati da dimeri di alfa e beta tubulina, agganciati in un modello elicoidale testa-coda(16). I microtubuli sono responsabili del mantenimento della forma discoidale delle piastrine circolanti. In condizioni fisiologiche la tubulina β_1 è espressa solo come una componente dei microtubuli nei megacariociti e ha un ruolo fondamentale nella frammentazione delle piastrine dal citoplasma dei megacariociti. Oltre che dai microtubuli, la struttura cellulare è sostenuta dal citoscheletro presente sul versante citoplasmatico della membrana, composto da actina, spectrina, adducina, filamina e glicoproteine Ib-IX-V (recettore vWF). L'actina forma una rete tridimensionale all'interno del citoplasma alla quale si legano i recettori di membrana legati a loro volta alle “*actin-binding protein*” (ABP).

La membrana piastrinica presenta sul versante esterno dei punti di discontinuità rappresentati da invaginazioni che si estendono in profondità nel citoplasma, che danno origine ad una serie di canali interconnessi tra loro, noti come “sistema canalicolare aperto” (OCS) (17). Si ipotizza che questa struttura favorisca una reazione piastrinica più rapida ed efficace, in quanto aumenta la superficie di scambio con l'esterno e fornisce una veloce via di secrezione dei granuli a seguito dell'attivazione piastrinica. In altri

termini, l'OCS mette in comunicazione la membrana plasmatica con l'esterno consentendo l'assorbimento di elementi esterni, quali batteri e virus, e il rilascio dei granuli piastrinici. Durante l'attivazione piastrinica, infatti, l'OCS viene estroflesso in modo tale da aumentare il numero di recettori di superficie disponibili per il legame del ligando; questo meccanismo è dimostrato dalla presenza di questi recettori sia sulla superficie piastrinica che sull'OCS. È stato altresì documentato che l'OCS in alcune specie, quali ruminanti ed equini, sia presente esclusivamente nei megacariociti; in queste specie le piastrine non aumentano la loro superficie durante l'attivazione, non presentando un meccanismo per l'assorbimento di particelle e rilasciano il contenuto dei granuli mediante la fusione di questi direttamente con la membrana citoplasmatica.

Alla periferia del citoplasma, adiacente dai microtubuli, è presente il sistema tubulare denso (*dense tubular system* – DTS), un complesso sistema di canalicoli membranosi, residuo del reticolo endoplasmatico liscio dei Megacariociti. A differenza dell'OCS, non comunica con il citoplasma o con le membrane granulari. Il DTS è un *pool* di calcio intrapiastrinico e di acido arachidonico, costituente fondamentale della membrana piastrinica, che esplica una duplice funzione: stabilizza la membrana e genera vari mediatori piastrinici come trombossani e prostaglandine (18).

Inoltre, nel citoplasma delle piastrine non attivate sono presenti organelli uniformemente distribuiti. I mitocondri, ad esempio, sono un'importante fonte di energia e sono necessari a fornire il fabbisogno metabolico durante l'aggregazione e la secrezione; per questo motivo il collasso del potenziale della membrana mitocondriale è associato all'invecchiamento delle piastrine in circolazione (15)

III. I granuli piastrinici

La maggior parte degli organelli sono rappresentati da granuli di accumulo, classificabili in 3 categorie: alfa, densi (δ) e lisosomiali, che si differenziano per contenuto e morfologia. La tabella 1 (Tab.1) sintetizza in breve il contenuto di tali granuli.

I **granuli α** sono i più grandi e numerosi tra i granuli piastrinici, al microscopio ottico appaiono come granuli azzurrofilici. Sono costituiti da due regioni principali: una regione nucleoidica centrale scura, che contiene proteoglicani, fibrinogeno, fattore piastrinico 4 e una regione della matrice grigia in periferia elettrolucente, che contiene il Fattore Von Willebrand, visibile al microscopio elettronico(19).I granuli α sono importanti organelli di conservazione delle proteine secrete, originano dai megacariociti come piccole vescicole contenenti proteine sintetizzate dall'apparato del Golgi (trans-Golgi network, TGN), attraverso corpi multivescicolari (MVBs) e fusione con proteine di rivestimento (es. Clatrina, COPII), proteine adattine (es. AP-1,AP-2,AP-3), proteine di fusione (es. recettori delle proteine solubili di attacco NSF) e proteine monomeriche GTPasiche (es. Rab) (20).I granuli α vengono trasportati dal corpo dei megacariociti nelle pro-piastrine e poi catturati nelle piastrine prima del loro rilascio in circolo. Tutti questi processi sono accompagnati sia da endocitosi, mediata dalla clatrina delle proteine plasmatiche legate ai recettori di superficie, sia da pinocitosi.

Le proteine possono essere raggruppate in base alla loro funzione in: proteine di adesione, fattori di crescita, chemochine e citochine, recettori di membrana, fattori della coagulazione. Le proteine di adesione più rappresentative sono: fibrinogeno, fibronectina, vitronectina e trombospondina-1 (TSP-1). Queste proteine, si legano ai recettori piastrinici di membrana durante la secrezione e favoriscono la formazione del trombo. Inoltre, il fibrinogeno può agire come fattore mitogeno, mentre la fibronectina potenzia l'azione del fattore di crescita derivato dalle piastrine (*platelet-derived growth factor-PDGF*) (21,22). Tra i fattori mitogeni presenti nei granuli α , sono annoverati un'ampia varietà di fattori di crescita come il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (*vascular endothelial growth factor-VEGF*), fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), fattore di crescita dei fibroblasti (*fibroblast growth factor-FGF*), fattore di

crescita epidermico (epidermal growth factor-EGF), fattore di crescita trasformante beta (*transforming growth factor β -TGF- β*) e fattore di crescita insulino-simile (*insulin like growth factor-IGF*), che sono fondamentali per la guarigione delle ferite(20). Il PDGF è un potente fattore chemiotattico e di proliferazione cellulare. Il TGF- β 1 è un polipeptide a 2 catene molto rappresentato nelle piastrine, che recluta le cellule infiammatorie nella sede della ferita, a scapito dei processi di riepitelizzazione e può promuovere la produzione di tessuto connettivo da parte dei fibroblasti(22,23). Il VEGF agisce tramite recettori chinasi affini, espressi nelle cellule endoteliali per stimolare la formazione di vasi sanguigni (24) . Gli alfa granuli piastrinici contengono un'ampia gamma di chemochine e citochine, tra le quali il fattore piastrinico 4 (*platelet factor 4- PF4*), che ha un ruolo non solo nell'emostasi/trombosi, ma anche nella chemiotassi dei neutrofili, attivazione dei monociti e differenziazione dei monociti in macrofagi e cellule schiumose (20,21) Le proteine della membrana dei granuli α sono molto simili alle proteine dei granuli densi poiché si esprimono sulla superficie piastrinica dopo la secrezione come risultato della fusione dei granuli con OCS. La più importante proteina di membrana dei granuli α , espressa sulla superficie delle piastrine attivate, è la P-selectina (conosciuta come CD62, GMP-140 o PADGEM), una glicoproteina di 140kd presente nei granuli α delle piastrine a riposo e nei corpi di Weibel-Palade delle cellule endoteliali.

L'attivazione delle piastrine con agonisti, come la trombina, induce la traslocazione di GMP-140 dai granuli α alla membrana plasmatica, dove media l'aderenza delle piastrine a neutrofili e monociti. Diversi studi condotti in medicina umana hanno dimostrato che questa glicoproteina è presente solo nelle piastrine, nei megacariociti e nelle cellule endoteliali. Altre proteine presenti all'interno delle membrane dei granuli α includono GPIb-IX-V, GPIIb-IIIa e GPIV. Alcune di queste proteine sono state riscontrate anche nelle membrane dei granuli δ .

I **granuli δ** o corpi densi, così chiamati perché appaiono più elettrodensi al microscopio elettronico, presentano alte concentrazioni di nucleotidi di adenina (ADP e ATP), calcio, polifosfati inorganici e serotonina. Circa il 50% dell'ADP piastrinico è immagazzinato nei corpi densi (*pool* di stoccaggio) e viene rilasciato solo dopo l'attivazione piastrinica(19,25).L'adenosindifosfato (ADP) è un cofattore essenziale dell'aggregazione piastrinica, che agisce attraverso i recettori P2Y1 e P2Y12

associati alle proteine G ed è essenziale per l'emostasi primaria (26). L'ATP, legato al recettore P2X₁ è responsabile dell'ingresso rapido del calcio e svolge un ruolo nell'attivazione piastrinica indotta dal collagene. Il calcio, presente nei granuli, rappresenta circa il 70% del totale contenuto nelle piastrine, è un regolatore centrale nella guarigione delle ferite ed è essenziale per la formazione di fibrina; mentre i polifosfati sono un elemento regolatore, recentemente riconosciuto, dei sistemi di coagulazione e fibrinolitici che reagiscono, tra gli altri, con il fattore XII (fattore di Hagemann)(21,27). La serotonina (5-idrossitriptamina, 5-HT) viene trasportata dal plasma e si accumula nei granuli δ con concentrazioni 1000 volte maggiori rispetto a quelle del plasma, è un importante vasocostrittore, si lega al recettore 5HT2A accoppiato alle proteine G e insieme all'ADP

amplifica la risposta piastrinica; inoltre, ha un'importante azione pro-coagulante e nel trattenere proteine pro-coagulanti come fibrinogeno e trombospodina sulla superficie piastrinica (28).

I granuli lisosomiali contengono idrolasi acido-dipendenti quali glicosidasi, proteasi (es. Catepsine, elastasi), fosfatasi e lipasi, a funzione degradative (29).

Fattore di crescita	Ruolo nel processo di guarigione tissutale
	- Stimola la proliferazione di cellule epiteliali ed epidermiche, fibroblasti e cellule embrionali.
EGF (epidermal growth factor)	- Chemoattrae fibroblasti e cellule epiteliali. - Stimola la ripitelizzazione. - Aumenta l'angiogenesi. - Influenza la sintesi ed il turnover della matrice extracellulare.
PDGF (platelet-derived growth factor)	- Le isoforme A e B sono potenti mitogeni per fibroblasti, cellule della muscolatura vasale liscia, condrociti, cellule epiteliali ed endoteliali. - Potente chemoattraente per cellule emopoietiche e mesenchimali, fibroblasti e miotici. - Stimola la chemiotassi in associazione a PDGF. - Attiva il TGF-β, stimola neutrofili e macrofagi, la mitogenesi di fibroblasti e cellule della muscolatura liscia, la sintesi di collagene, l'angiogenesi e l'attività della collagenasi.
TGF-α (transforming growth factor α)	- Mima l'EGF, occupa gli stessi recettori; - Stimola la crescita di cellule mesenchimali, epiteliali ed endoteliali, la chemiotassi endoteliale, controlla lo sviluppo dell'epidermide; - Stimola la proliferazione di cellule endoteliali, più potente dell'EGF; - Promuove la generazione di osteoblasti influenzando il rilascio di matrice ossea durante l'osteogenesi; - Influenza la formazione dell'osso e il suo rimodernamento inibendo la sintesi di collagene e il rilascio di calcio
TGF-β1 (transforming growth factor β 1)	- Stimola la proliferazione e la chemiotassi dei fibroblasti, stimola la sintesi di collagene; - Inibisce la crescita di cellule epiteliali, endoteliali, fibroblasti, neuroni, emopoietiche e cheratinociti; - Antagonista l'attività biologica di EGF, PDGF, aFGF e bFGF
KGF o FGF-7 (keratinocyte growth factor)	- Il più potente GF per i cheratinociti della pelle, importante nei processi di riparazione a seguito delle ferite della cute; - Promuove la guarigione delle ferite tramite la proliferazione, differenziazione, angiogenesi e migrazione; - Mitogeno per molte cellule epiteliali, esclusi i fibroblasti e cellule endoteliali.
aFGF o FGF-1 (fibroblast growth factor; acidic)	- Partecipa ai processi cellulari di proliferazione, differenziazione, angiogenesi e migrazione; - Mitogeno per cheratinociti della pelle, fibroblasti dermici e cellule endoteliali vascolari
bFGF o FGF2 (fibroblast growth factor; basic)	- Stimola la crescita di fibroblasti, mioblasti, osteoblasti, cellule neurali, endoteliali, cheratinociti e condrociti; - Stimola l'angiogenesi, la sintesi di collagene, la proliferazione endoteliale, la contrazione delle ferite, la sintesi di matrice, l'epitelizzazione e la produzione di KGF
VEGF/VEP (vascular endothelial growth factor)	- Stimola la proliferazione di cellule endoteliali macrovascolari; - Induce neo-vascularizzazione; - Induce la sintesi di metalloproteinasi che degrada il collagene interstiziale di tipo I, II, III
CTGF (connective tissue growth factor)	- Il più potente GF per i cheratinociti della pelle, importante nei processi di riparazione a seguito di ferite della cute; - Promuove la guarigione delle ferite tramite proliferazione, differenziazione, angiogenesi e migrazione; - Mitogeno per molte cellule epiteliali, esclusi fibroblasti e cellule endoteliali
GM-CSF o CSFα (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor)	- Induce la proliferazione, migrazione, l'angiogenesi e la formazione di endotelio vascolare; - Potente stimolatore della proliferazione e differenziazione degli osteoblasti, stimola la mineralizzazione della matrice
IGF (insulin-like growth factor)	- GF per i fibroblasti, in vitro è mitogeno per molti tipi di cellule mesenchimali; - Promuove la sintesi di collagenasi e prostaglandina E₂ nei fibroblasti; - Stimola la sintesi di collagene e matrice da parte degli osteoblasti; - Regola il metabolismo della cartilagine articolare
TNFα (tumor)	- GF per i fibroblasti; - Promuove l'angiogenesi

necrosis factor alpha)	
IL-1β (interleukin 1 β)	- Inibisce la crescita di epatiti e cellule endoteliali; - Attiva gli osteoclasti, sopprimendo la formazione di nuovo osso; - Se in bassa concentrazione favorisce la crescita di nuovo tessuto osseo; - Migliora le reazioni infiammatorie e l'attività delle collagenasi
IL-8 (interleukin 8)	- Supporta l'angiogenesi; - Mitogena per le cellule epidermiche

Tabella 1: Fattori di crescita piastrinici. Modificata da Roman et al. (30).

IV. Il processo emostatico

Le piastrine hanno un ruolo cardine nei processi emostatici e trombotici, ma anche nella risposta immunitaria innata, nella risposta infiammatoria, nella guarigione delle ferite e nelle metastasi ematogene(12) . Inoltre, hanno la capacità di sintetizzare le proteine, denominata traduzione dipendente del segnale (31).

Nel fisiologico processo dell'emostasia, le piastrine formano un "tappo" in corrispondenza della lesione vasale, che è sufficiente a fermare il sanguinamento solo nel caso di un vaso di piccolo calibro. In secondo luogo, a seguito dell'attivazione piastrinica, si ha il trasferimento di fosfolipidi sulla superficie esterna e il legame con specifici fattori della coagulazione circolanti, che accelerano la cascata coagulativa e concorrono, inoltre, al mantenimento dell'integrità vascolare (32)).

Il primo evento che si verifica in seguito a una lesione vascolare è l'adesione piastrinica alla matrice extracellulare dell'area danneggiata. Tale processo avviene grazie al legame tra il complesso glicoproteico GPIb-IX-V della superficie piastrinica e le molecole del fattore Von Willebrand (vWF) presenti sulla superficie del sub-endotelio. Il complesso GPIb-IX-V si lega al vWF generalmente legato al collagene, immobilizzate nella matrice extracellulare. Ciò avviene, a seguito delle modificazioni strutturali che subiscono le molecole del vWF legate alla matrice, soprattutto quando vengono applicate elevate forze di taglio, come accade quando il flusso di sangue aumenta e impatta sulla superficie sub-endoteliale, favorendo il legame al recettore GIIb delle piastrine. Oltre il vWF, anche altri fattori, come la trombospodina-1 (TSP-1), rappresentano un substrato alternativo in condizioni di *shear stress* (sforzo di taglio). In condizioni statiche di basso taglio, invece, le piastrine aderiscono direttamente al collagene sul sub-endotelio mediante GPVI e integrine $\alpha_2\beta_1$ (GPIa-IIa) (28,33). Dopo l'adesione delle piastrine alla matrice extracellulare e il legame con il collagene o altri agonisti, come elevate concentrazioni di Trombossano A₂ (TxA₂) e trombina, si determina l'attivazione della fosfolipasi C presente sulla membrana piastrinica. La fosfolipasi C (PLC) idrolizza il fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP₂) in inositolo trifosfato (IP₃) e diacilglicerolo (DAG). L'inositolo trifosfato si andrà a legare al sistema

tubulare denso e favorirà il rilascio di calcio intracellulare e il diacilglicerolo favorirà l'attivazione della proteina chinasi C. Queste reazioni culminano con la secrezione dei granuli e l'aggregazione piastrinica. Sostanze agoniste come la serotonina e concentrazioni ridotte di trombina, attivano la fosfolipasi A₂, che determina l'idrolisi dei fosfolipidi (soprattutto fosfatidilcolina) dal sistema tubulare denso, favorendo il rilascio di acido arachidonico, che poi sarà successivamente metabolizzato in TxA₂ dalla cicloossigenasi. La fosfolipasi A₂ riveste un ruolo essenziale nella produzione del fattore di attivazione piastrinico (PAF, 1-achil-2-acetilglicerolo-3-fosfocolina), che è un altro agonista necessario all'aggregazione piastrinica e anche un importante mediatore proinfiammatorio. Questo viene prodotto sia dalle piastrine stimolate che dalle cellule endoteliali attivate e dai leucociti (31)). Le piastrine, inizialmente di forma discoidale, tendono ad assumere una forma sferica irregolare con la presenza di pseudopodi, che serviranno a favorire il contatto con le piastrine adiacenti. Questa modificazione è data dalle molecole del citoscheletro che determinano la destrutturazione dei microtubuli e la polimerizzazione e contrazione dei filamenti di actina associati alla membrana. Successivamente, si ha la secrezione piastrinica (degranulazione o rilascio di granuli), tramite meccanismi contrattili con dispendio energetico. I granuli δ e α vengono rilasciati dal sistema canalicolare aperto, che è in diretta comunicazione con la superficie piastrinica(28). A seguito dell'adesione piastrinica si verifica l'aggregazione piastrinica, ossia l'attivazione di piastrine circolanti e l'accumulo di piastrine a formare un tappo emostatico primario. Successivamente, dove vi è stata adesione e aggregazione primaria si ha la formazione di un aggregato irreversibile, o tappo emostatico secondario(28). La stabilizzazione del coagulo, descritta come emostasi secondaria, è caratterizzata dal consolidamento della massa piastrinica attraverso retrazione piastrinica mediata da actina/miosina. In questa fase, la trombina, oltre ad attivare le piastrine, converte il fibrinogeno in fibrina, determinando una fitta rete di fibrina (34).

V. La guarigione delle ferite

La guarigione delle ferite è un'interazione complessa e dinamica tra vari tipi di cellule, la matrice extracellulare (ECM), le citochine e i fattori di crescita (35). Studi effettuati negli ultimi decenni, suggeriscono che le piastrine hanno un importante ruolo nella riparazione dei tessuti e nel rimodellamento vascolare, oltre ad essere componenti attivi nelle risposte infiammatorie e immunitarie. Rilasciando proteine biologicamente attive sono in grado di influenzare una serie di processi promuovendo il reclutamento, la crescita e la morfogenesi cellulare. Tutte queste sostanze sono rilasciate o presentate sulla superficie delle piastrine attivate. Questa capacità delle piastrine le rende una fonte naturale autologa di fattori di crescita e citochine che possono essere utilizzate terapeuticamente per accelerare la guarigione naturale (22).

La guarigione delle ferite è un processo costituito da quattro fasi: l'emostasi, l'infiammazione, la proliferazione e il rimodellamento. Gli eventi di ogni fase devono avvenire in modo preciso e regolamentato; alterazioni o interruzioni di questi eventi portano a una guarigione ritardata della ferita (36). La prima fase si instaura subito dopo la lesione con costrizione vascolare e formazione di coaguli di fibrina. In questa fase si ha il rilascio dal tessuto circostante e dal coagulo di citochine pro-infiammatorie e fattori di crescita coinvolti nella deposizione di matrice extracellulare (TGF- β), chemiotassi (PDGF), epitelizzazione (FGF, EGF) e angiogenesi (VEGF) (37). Controllata l'emorragia, le cellule infiammatorie migrano nella ferita tramite chemiotassi e si ha la fase infiammatoria. In questa seconda fase si ha l'infiltrazione sequenziale neutrofili, macrofagi e linfociti. I neutrofili sono i primi ad arrivare nella sede della ferita, determinano l'eliminazione dei microbi patogeni e detriti cellulari, ma producono anche sostanze come proteasi e specie reattive dell'ossigeno (ROS), che causano ulteriori danni (36). Successivamente ai neutrofili, intervengono i macrofagi, cellule capaci di eliminare le cellule apoptotiche, compresi i neutrofili, che potrebbero causare uno stato infiammatorio prolungato, effettuano il *debridement* dei tessuti e rilasciano citochine e fattori di crescita aggiuntivi, che promuovono la proliferazione di fibroblasti, l'angiogenesi e la migrazione di cheratociti. Il fattore di crescita epidermico (EGF), prodotto da piastrine, macrofagi e fibroblasti favorisce la riepitelizzazione e l'angiogenesi. Il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), prodotto da macrofagi, linfociti T, mastociti favorisce

il reclutamento dei fibroblasti. Il fattore di necrosi tumorale (TNF- α), citochina infiammatoria prodotta principalmente dai macrofagi, ma anche da linfociti T, determina la chemioattrazione dei leucociti. Altre citochine infiammatorie come le interleuchine (IL-1 e IL-8) favoriscono la riepitelizzazione, l'angiogenesi e il reclutamento di altre cellule del sistema immunitario (38).

La fase proliferativa generalmente segue e si sovrappone alla fase infiammatoria, è caratterizzata da proliferazione epiteliale e riepitelizzazione, ossia migrazione sulla matrice provvisoria all'interno della ferita (36). I fibroblasti e le cellule endoteliali sono molto importanti in questa fase per la crescita capillare, la formazione di collagene e del tessuto di granulazione nella sede della lesione. I fibroblasti producono collagene, proteoglicani, glicosaminoglicani, che compongono principalmente la matrice cellulare. L'epitelizzazione inizia con il distacco cellulare ed è stimolata da vari fattori di crescita (EGF, FGF, TGF- β) e da molteplici citochine. Allo stesso tempo, altri fattori di crescita, FGF, PDGF e VEGF, inizialmente rilasciati dalle piastrine e poi da altre cellule presenti nel letto della ferita, avviano e promuovono l'angiogenesi. Questa inizia subito dopo lo sviluppo della lesione, con l'instaurarsi di un'ipossia locale, in quanto vi è necessità di un adeguato apporto di sangue per la somministrazione di nutrimenti e scambi metabolici, per poter garantire la progressione della guarigione della ferita. In questa fase le cellule endoteliali degradano la membrana basale, migrano verso la sede della ferita, proliferano e formano contatti tra le cellule e promuovono la neoangiogenesi (39). Recentemente è stato osservato che sono necessarie delle cellule progenitrici endoteliali (EPC) per la rivascolarizzazione della ferita. Queste cellule sono normalmente localizzate nel midollo osseo e vengono richiamate in seguito a una lesione e durante la fase di rimodellamento vascolare, disponendosi in corrispondenza delle cellule endoteliali confinanti con il sito della lesione. La mobilitazione di queste cellule endoteliali progenitrici è mediata dall'ossido nitrico (NO), VEGF e metalloproteinasi della matrice (MMP), in particolare la MMP-9 (39,40). Dopo la proliferazione e sintesi della matrice, si ha l'ultima fase di rimodellamento e formazione della cicatrice. I fibroblasti proliferano all'interno della ferita e sintetizzano matrice extracellulare formando un tessuto di granulazione con vasi sanguigni neoformati. La matrice provvisoria, inizialmente costituita da fibrina, collagene III, fibronectina e acido ialuronico, viene sostituita progressivamente da collagene I. Successivamente la ferita, subisce una contrazione fisica a opera dei miofibroblasti e si ha un rimodellamento della

matrice. Infine, l'apoptosi delle cellule fibroblastiche determina la formazione di un tessuto cicatriziale acellulare, a opera del TGF-alfa, TNF e FGF (39).

1. Everts PAM, Hoffmann J, Weibrich G, Mahoney CB, Schönberger JPAM, van Zundert A, et al. Differences in platelet growth factor release and leucocyte kinetics during autologous platelet gel formation. *Transfus Med.* 2006 Oct;16(5):363–8.
2. Debili N, Coulombel L, Croisille L, Katz A, Guichard J, Breton-Gorius J, et al. Characterization of a bipotent erythromegakaryocytic progenitor in human bone marrow. *Blood.* 1996 Aug;88(4):1284–96.
3. Vitrat N, Cohen-Solal K, Pique C, Le Couedic JP, Norol F, Larsen AK, et al. Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis. *Blood.* 1998 May;91(10):3711–23.
4. Iancu-Rubin C, Nasrallah CA, Atweh GF. Stathmin prevents the transition from a normal to an endomitotic cell cycle during megakaryocytic differentiation. *Cell Cycle.* 2005 Dec;4(12):1774–82.
5. Schulze H, Korpál M, Hurov J, Kim S-W, Zhang J, Cantley LC, et al. Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood.* 2006 May;107(10):3868–75.
6. Richardson JL, Shivdasani RA, Boers C, Hartwig JH, Italiano JEJ. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood.* 2005 Dec;106(13):4066–75.
7. Bodin S, Soulet C, Tronchère H, Sié P, Gachet C, Plantavid M, et al. Integrin-dependent interaction of lipid rafts with the actin cytoskeleton in activated human platelets. *J Cell Sci.* 2005 Feb;118(Pt 4):759–69.
8. Bennett JS. Structure and function of the platelet integrin α IIb β 3. *J Clin Invest.* 2005 Dec;115(12):3363–9.
9. Dorahy DJ, Lincz LF, Meldrum CJ, Burns GF. Biochemical isolation of a membrane microdomain from resting platelets highly enriched in the plasma membrane glycoprotein CD36. *Biochem J.* 1996 Oct;319 (Pt 1(Pt 1):67–72.
10. Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, Whisstock JC, Berndt MC. Glycoprotein Ib-IX-V. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003 Aug;35(8):1170–4.
11. Gross BS, Melford SK, Watson SP. Evidence that phospholipase C-gamma2 interacts with SLP-76, Syk, Lyn, LAT and the Fc receptor gamma-chain after stimulation of the collagen receptor glycoprotein VI in human platelets. *Eur J Biochem.* 1999 Aug;263(3):612–23.

12. Oury C, Toth-Zsamboki E, Vermylen J, Hoylaerts MF. The platelet ATP and ADP receptors. *Curr Pharm Des.* 2006;12(7):859–75.
13. Jung SM, Moroi M. Signal-transducing mechanisms involved in activation of the platelet collagen receptor integrin $\alpha(2)\beta(1)$. *J Biol Chem.* 2000 Mar;275(11):8016–26.
14. Bennett JS, Chan C, Vilaire G, Mousa SA, DeGrado WF. Agonist-activated $\alpha v \beta 3$ on platelets and lymphocytes binds to the matrix protein osteopontin. *J Biol Chem.* 1997 Mar;272(13):8137–40.
15. Pereira J, Soto M, Palomo I, Ocqueteau M, Coetzee L-M, Astudillo S, et al. Platelet aging in vivo is associated with activation of apoptotic pathways: studies in a model of suppressed thrombopoiesis in dogs. *Thromb Haemost.* 2002 May;87(5):905–9.
16. Hartwig JH. The platelet: form and function. *Semin Hematol.* 2006 Jan;43(1 Suppl 1):S94-100.
17. White JG, Escolar G. The blood platelet open canalicular system: a two-way street. *Eur J Cell Biol.* 1991 Dec;56(2):233–42.
18. Kovács T, Berger G, Corvazier E, Pászty K, Brown A, Bobe R, et al. Immunolocalization of the multi-sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase system in human platelets. *Br J Haematol.* 1997 Apr;97(1):192–203.
19. McNicol A, Israels SJ. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb Res.* 1999 Jul;95(1):1–18.
20. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet α -granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* 2009 Jul;23(4):177–89.
21. Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* 2011 May;105 Suppl 1:S13-33.
22. Nurden AT, Nurden P, Sanchez M, Andia I, Anitua E. Platelets and wound healing. *Front Biosci.* 2008 May;13:3532–48.
23. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999;14(4):529–35.
24. Holmes DIR, Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol.* 2005;6(2):209.
25. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets.* 2001 Aug;12(5):261–73.
26. Kahner BN, Shankar H, Murugappan S, Prasad GL, Kunapuli SP.

- Nucleotide receptor signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 2006 Nov;4(11):2317–26.
27. Caen J, Wu Q. Hageman factor, platelets and polyphosphates: early history and recent connection. *J Thromb Haemost.* 2010 Aug;8(8):1670–4.
 28. Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost.* 2005;31(4):381–92.
 29. Ménard M, Meyers KM, Prieur DJ. Demonstration of secondary lysosomes in bovine megakaryocytes and platelets using acid phosphatase cytochemistry with cerium as a trapping agent. *Thromb Haemost.* 1990 Feb;63(1):127–32.
 30. Rozman P, Bolta Z. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. *Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica, Adriat.* 2007 Dec;16(4):156–65.
 31. Zimmerman GA, Weyrich AS. Signal-dependent protein synthesis by activated platelets: new pathways to altered phenotype and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Mar;28(3):s17-24.
 32. Toti F, Satta N, Fressinaud E, Meyer D, Freyssinet JM. Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder. *Blood.* 1996 Feb;87(4):1409–15.
 33. Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *ScientificWorldJournal.* 2014;2014:781857.
 34. Koupenova M, Clancy L, Corkrey HA, Freedman JE. Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis. *Circ Res.* 2018 Jan;122(2):337–51.
 35. Pakyari M, Farrokhi A, Maharlooei MK, Ghahary A. Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing. Vol. 2, *Advances in wound care.* 2013. p. 215–24.
 36. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010 Mar;89(3):219–29.
 37. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair Regen Off Publ Wound Heal Soc [and] Eur Tissue Repair Soc.* 2008;16(5):585–601.
 38. Janis JE, Harrison B. Wound Healing: Part I. Basic Science. *Plast Reconstr Surg.* 2016 Sep;138(3 Suppl):9S-17S.
 39. Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM. Acute and impaired

- wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Adv Skin Wound Care*. 2012 Jul;25(7):304–14.
40. Leone AM, Valgimigli M, Giannico MB, Zaccone V, Perfetti M, D’Amario D, et al. From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endothelial progenitor cells. *Eur Heart J*. 2009 Apr;30(8):890–9.

Capitolo 1

I concentrati piastrinici

1.1 Cenni storici sui concentrati piastrinici

I concentrati piastrinici sono strumenti innovativi utilizzati in medicina rigenerativa per numerose applicazioni cliniche e chirurgiche. In medicina umana sono ampiamente utilizzati in chirurgia plastica, ortopedica, oftalmica e maxillo-facciale (1). I concentrati piastrinici, utilizzati in chirurgia, sono principalmente prodotti autologhi ottenuti mediante centrifugazione di un campione di sangue del paziente (2). Sono state descritte diverse tecniche il cui obiettivo era la concentrazione di piastrine, fibrina e leucociti al fine di ottenere preparazioni in gel o soluzione, facilmente fruibili per favorire i processi di rigenerazione (1).

Storicamente i concentrati piastrinici sono stati introdotti in medicina trasfusionale per il trattamento e la prevenzione dell'emorragie intraoperatorie, dovute a trombocitopenia grave o leucemia acuta. Il concentrato piastrinico standard, chiamato PRP, conteneva $0,5 \times 10^{11}$ piastrine per unità (2).

La storia dei concentrati piastrinici è stata, però, spesso erroneamente associata al primo articolo di Marx et al. del 1998, riguardante gli effetti dei fattori di crescita nel plasma ricco di piastrine (PRP) (3)m. In realtà l'uso di questi emoderivati è iniziato circa 30 anni prima, nel 1970, con Matras, il quale descrisse la produzione e l'utilizzo delle colle di fibrina (tuttora utilizzata come TISSEEL, Baxter, USA), costituite da fibrinogeno concentrato (polimerizzazione indotta da trombina e calcio), per migliorare la guarigione di una ferita cutanea in un ratto (4).

Pochi anni dopo, tra il '75 e il '79, le colle di fibrina sono state arricchite con concentrazioni significative di piastrine e sono state definite "miscele piastriniche-fibrinogeno-trombina" (5). A partire da questi preparati, negli anni successivi furono sviluppati gel al plasma ricchi di piastrine più simili a quelli tuttora utilizzati; questi estratti venivano definiti "fattori di guarigione della ferita derivati dalle piastrine autologhe" (*platelet derived wound healing factors*, PDWHF) ed è stato clinicamente dimostrato che i fattori di crescita agiscono localmente promuovendo la guarigione di ulcere cutanee (6). Solo nel 1997 Whitman et al. ha pubblicato i risultati clinici e ha descritto la preparazione e l'uso di questo concentrato piastrinico autologo denominato "gel piastrinico", raccolto nell'immediato periodo pre-

operatorio e utilizzato con successo nelle chirurgie maxillo-facciali e chirurgia ricostruttiva orale (7).L'introduzione dei gel piastrinici ha segnato il punto di partenza per l'utilizzo dei fattori di crescita in medicina umana e per lo sviluppo di numerosi protocolli per la produzione di PRP (2).

Nel 2001, in Francia, è stata sviluppata da Choukroun una seconda generazione di concentrati piastrinici, denominata *Platelet Rich Fibrin* (PRF, ovvero fibrina ricca in piastrine) mediante una procedura innovativa che si discostava dalla precedenti in quanto richiedeva la centrifugazione del sangue venoso periferico del paziente, senza aggiunta di sostanze anticoagulanti e contenente il polimero matrice della fibrina, leucociti, citochine e cellule staminali (8,9).

1.2 Classificazione dei concentrati piastrinici

Dohan Ehrenfest et al. nel 2009 fa una prima classificazione dei concentrati piastrinici (2). Tale classificazione, considerata tutt'ora valida, prendendo in considerazione il contenuto ed il ruolo dei vari componenti delle preparazioni piastriniche divide i prodotti secondo tre principali parametri:

- A) i kit di preparazione e di centrifugazione usati;
- B) la presenza dei diversi contenuti cellulari (principalmente dei leucociti);
- C) l'architettura della rete di fibrina che supporta le piastrine ed i leucociti durante l'applicazione.

La prima serie di parametri (A) riguarda il kit di preparazione e la tipologia di centrifuga utilizzata per la procedura e dunque definisce le caratteristiche pratiche di ciascuna tecnica.

Fattori che possono definire la possibile ripetibilità di una procedura nella pratica clinica quotidiana sono strettamente dipendenti dalla tipologia e dalla dimensione della centrifuga, dalla durata della procedura, dal costo complessivo del dispositivo utilizzato o degli eventuali kit e dalla loro ergonomia. È chiaro che procedure caratterizzate da strumentazioni facilmente reperibile (come centrifughe da banco), o materiale poco costoso, assicurino l'applicazione su ampia scala della tecnica di preparazione del concentrato piastrinico.

Il secondo gruppo di parametri (B) prende in considerazione il contenuto del concentrato intenso sia come volume effettivo ottenibile da un prelievo ematico (rapporto tra volume di sangue intero e volume del concentrato ottenuto), ma anche per l'efficienza nella raccolta di piastrine, leucociti e della loro conservabilità durante tutto il processo.

Infine, la terza serie di parametri (C) fa riferimento alla rete di fibrina che supporta il concentrato di piastrine e leucociti; la densità della rete di fibrina è determinata principalmente dalla concentrazione iniziale di fibrinogeno e dal processo di polimerizzazione della fibrina. La diversa densità della fibrina influisce sulle proprietà biomeccaniche del concentrato piastrinico.

Sulla base di questi parametri, i preparati piastrinici, ottenuti con protocolli manuali o con sistemi automatizzati, sono stati classificati in 4 famiglie: (2,10).

1. **Plasma puro ricco di piastrine (*pure platelet-rich plasma*, P-PRP)** o “plasma ricco di piastrine e povero di leucociti”, caratterizzato

dall'assenza di leucociti e da una rete di fibrina a bassa densità). I concentrati piastrinici appartenenti a questa famiglia vengono utilizzati sotto forma di soluzioni liquide o come gel attivato rendendoli applicabili direttamente in situ tramite iniezione oppure applicazione dopo gelificazione su una ferita (in maniera sovrapponibile alle colle di fibrina).

2. **Plasma ricco di piastrine e leucociti (*leukocytes and platelet-rich plasma*, L-PRP)** caratterizzato dalla presenza di leucociti e piastrine e da una rete di fibrina a bassa densità. Al pari del P-PRP, i prodotti di questa famiglia possono essere utilizzati sia in formulazione liquida e dunque iniettati, sia dopo gelificazione con applicazione diretta su una ferita
3. **Fibrina ricca di piastrine pura (*pure platelet-rich fibrin*, P-PRF)** o “fibrina ricca di piastrine e povera di leucociti” caratterizzata dall'assenza di leucociti e con una rete di fibrina ad alta densità. In questo caso, data la forma fortemente gelificata del concentrato piastrinico, risulta impossibile l'inoculo, ma è possibile solo l'applicazione sulla lesione di continuo o la suturazione sulla stessa.
4. **Fibrina ricca di piastrine e leucociti (*leukocytes and platelet-rich fibrin*, L-PRF)** caratterizzata dalla presenza di leucociti e piastrine imbrigliati in una rete di fibrina ad alta densità e costituiti da una rete di fibrina ad alta densità, che permette loro di essere considerati un vero e proprio *bio scaffold* biologico.

1.3 II PRP

Il PRP, sia esso P-PRP o L-PRP, è ottenuto dalla centrifugazione di sangue intero del paziente, mediante l'utilizzo di anticoagulanti (2,11,12). Sono disponibili numerosi protocolli in commercio per la preparazione del PRP, distinguibili in due tipi di tecniche principali: tecniche complesse con un separatore cellulare e tecniche semplici che prevedono due cicli di centrifugazione mediante l'utilizzo di kit presenti in commercio. Il primo protocollo di preparazione del PRP, utilizzato per la chirurgia orale e maxillo-facciale, fu introdotto da Whitman et al. nel 1997 (7), tramite la plasmaferesi, ossia un separatore cellulare che utilizza un'ultracentrifugazione differenziale (circa 3000 g). Questa metodica automatica consentiva di prelevare circa 40 ml di PRP da 450 ml di sangue intero addizionato con l'anticoagulante citrato-fosfato-destrosio (CPD) a cui successivamente veniva aggiunta trombina bovina e calcio cloridrato per l'attivazione piastrinica (7).

Successivamente nel '99, fu proposto un protocollo manuale da Anitua et al. (13) per ottenere un P-PRP modificato, chiamato "plasma ricco di fattori di crescita o preparato ricco di fattori di crescita" (PRGF). In questo protocollo il sangue viene raccolto e centrifugato in provette piccole da 5 ml contenenti una soluzione di citrato di sodio al 10% come anticoagulante. Dopo la centrifugazione il sangue si separa in tre strati identificabili: globuli rossi, "buffy coat" e plasma acellulare, dal basso verso l'alto rispettivamente. Il plasma acellulare è costituito sia da plasma povero di fattori di crescita (PPGF) che da plasma ricco di fattori di crescita (PRGF). Il PPGF, che corrisponde alla frazione superiore del plasma acellulare, viene scartato da ciascuna provetta. Il PRGF, invece, situato appena sopra il buffy coat, viene raccolto pipettando delicatamente, dopodiché viene introdotta una soluzione di cloruro di calcio al 10% per indurre la polimerizzazione della fibrina. Dopo circa 15-20 minuti, si forma il gel PRGF che deve essere usato immediatamente (13). Quello proposto da Anitua per la produzione di PRP povero di leucociti è un protocollo poco costoso, tuttavia, presenta delle difficoltà nella riproducibilità (2). Dalla necessità di rendere la procedura riproducibile, senza la necessità di un laboratorio trasfusionale, nasce l'L-PRP, plasma ricco di piastrine e leucociti, molto usato in chirurgia generale, ortopedia e medicina sportiva. Negli ultimi anni sono stati sviluppati numerosi protocolli automatizzati che richiedono l'uso di kit specifici come

Harvest Smart-PreP¹ e Biomet GPS III² e altri kit più maneggevoli, come Plateltex³ o RegenPRP-Kit⁴ (2).

Relativamente ai fattori di crescita presenti nel PRP, invece, Marx et al. (3) in uno studio di medicina maxillofacciale vi individuò sette proteine secrete attivamente dalle piastrine; queste ultime includono i 3 isomeri del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF-AA, PGDF-BB e PGDF-AB), 2 fattori di crescita trasformanti beta (TGF- β 1 e TGF- β 2), il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e il fattore di crescita epiteliale (EGF). Sulla base dei risultati relativi ai tempi di guarigione di difetti dell'osso spugnoso mandibolare, propose pertanto una definizione di PRP secondo cui per la conta piastrinica doveva essere di almeno 10^6 piastrine/ μ l in 5 ml di PRP (14). Uno studio successivo evidenziò che la proliferazione delle cellule endoteliali era resa possibile da concentrazioni pari a $1,25 \times 10^6$ e l'angiogenesi a $1,5 \times 10^6$ piastrine/ml, rispettivamente. Per questo motivo, una conta piastrinica PRP di 10^6 piastrine/ml è diventata la nuova definizione per la preparazione del PRP (15).

¹Harvest Technologies, Plymouth, MA, USA

²Biomet Inc., Warsaw, USA

³Prague, Czech Republic

⁴RegenLab, Le Mont-sur-Lausanne, Switzerland

1.4 Il PRF

Il principale limite legato all'utilizzo del PRP è l'utilizzo di anticoagulanti per la sua preparazione. realizzazione, che interferiscono con i processi di guarigione della soluzione di continuo (16). Questo ha aperto la strada allo sviluppo di un concentrato piastrinico definito di seconda generazione: la fibrina ricca in piastrine (*platelet richi fibrin*-PRF). Il PRF è stato sviluppato nel 2001 da Choukroun et al. mediante l'applicazione di una metodica più rapida rispetto a quella degli altri concentrati piastrinici, che prevede la centrifugazione senza l'utilizzo di anticoagulanti, trombina bovina o altri agenti gelificanti (8). L'assenza di anticoagulante permette la formazione di trombina endogena, che successivamente attiva le piastrine contenute nel campione e innesca la formazione di fibrina (16). L'L-PRF, ossia fibrina ricca di piastrine e leucociti, è costituito da una matrice di fibrina autologa ricca leucociti, piastrine, fattori di crescita e numerose glicoproteine. Il vantaggio di questo concentrato piastrinico è rappresentato non solo dalla presenza di piastrine e leucociti, ma soprattutto dalla matrice di fibrina (9). Questo concentrato sembrerebbe in grado di migliorare la guarigione delle soluzioni di continui supportandola durante tutta la durata del processo (17). In particolar modo, neutrofili e macrofagi sono il primo gruppo di cellule a intervenire sul sito della lesione e grazie alla loro capacità di fagocitare i detriti, microbi e tessuto necrotico, prevengono l'infezione. I macrofagi, cellule derivate dal lignaggio mieloide, svolgono un ruolo chiave implicato nella secrezione dei fattori di crescita (TGF- β , PDGF e VEGF) insieme ai neutrofili e piastrine, e in combinazione con i loro fattori di crescita e citochine favoriscono la rigenerazione dei tessuti, la formazione di nuovi vasi (angiogenesi) e la prevenzione dell'infezione (18).

Il PRF presenta numerosi vantaggi rispetto al PRP, non solo per il mancato utilizzo di trombina bovina e anticoagulanti, ma anche per un processo di lavorazione semplificato e più economico (19) e da un'elevata concentrazione di leucociti che agiscono non solo nella risposta immunitaria e antibatterica, ma promuovono il processo di guarigione delle ferite (20). Inoltre, a differenza del PRP, il PRF forma spontaneamente una fitta rete di fibrina, che consente una velocità di degradazione più lenta e un rilascio ritardato dei fattori di crescita al tessuto circostante, dimostrato fino a 7 giorni e oltre (21,22).

La tecnica prevista da Choukroun et al. richiede un solo campione di sangue e una centrifuga da tavolo (8). I campioni di sangue vengono raccolti in provette da 10 ml, senza anticoagulante o gel separatore, e vengono immediatamente centrifugati per 12 minuti a 2.700 rpm (8). Dopo la centrifugazione, nella provetta è possibile distinguere 3 strati dal basso verso l'alto: coagulo rosso costituito principalmente da globuli rossi, coagulo di fibrina (PRF) e plasma acellulare. Successivamente, con una pinza viene estratto il PRF e separato dal coagulo mediante l'utilizzo di un paio di forbici chirurgiche, sebbene talvolta la separazione avvenga spontaneamente. L'immediata centrifugazione del campione è un aspetto critico per la produzione di una membrana spessa, idratata e con essudato ricco di leucociti, vitronectina e fibronectina espressa dai coaguli di fibrina (16). L'obiettivo del protocollo è quello di favorire l'attivazione piastrinica e la polimerizzazione della fibrina come avverrebbe fisiologicamente, ma all'interno della provetta. L'attivazione piastrinica inizia immediatamente a contatto con le pareti della provetta; per questo motivo l'intervallo di tempo tra il prelievo e la centrifugazione del campione deve avvenire entro massimo 2 minuti e 30 secondi, per evitare il rischio di una polimerizzazione diffusa della fibrina (18,23).

Il coagulo di PRF risulta di consistenza viscoelastica: può essere utilizzato come tale, oppure schiacciato e trasformato in membrana biologica, rendendola pertanto suturabile. Per ottenere la membrana di L-PRF, nel 2017 Crisci et al. (16) ha proposto un protocollo che si discostava leggermente da quello originariamente descritto da Choukroun et al. (8). La differenza si basa sugli intervalli di tempo utilizzati per la centrifugazione e sulla velocità degli stessi. In particolare, il protocollo di centrifugazione prevede le seguenti fasi: 30" di accelerazione, 2' a 2700 rpm, 4' a 2400 rpm, 3' a 3000 rpm e infine, 36" di decelerazione. Per l'ottenimento della compressione del coagulo PRF, è descritto l'utilizzo di una *wound box* avente una piastra di compressione in acciaio chirurgico di 148 grammi che assicura una pressione omogenea di 142,437 Pa (24). Tale strumento consente altresì il recupero dell'essudato sierico dei coaguli, ricco di proteine come vitronectina e fibronectina (17).

Oltre L-PRF, negli ultimi anni il protocollo del PRF ha subito delle modifiche, che hanno portato alla formazione di vari prodotti con diverse caratteristiche e potenziali d'uso. È noto che elevate forze centrifughe spingano le cellule verso il fondo della provetta, si è pensato, pertanto, di

ridurre la velocità di centrifugazione. L'Advance PRF (A-PRF) viene prodotto utilizzando una forza centrifuga di 1300 rpm per 14 minuti, determinando un numero totale di cellule vitali (neutrofili, linfociti e piastrine) superiore rispetto all'L-PRF (23,24). Inoltre, anche la quantità totale dei fattori di crescita (TGF- β 1, VEGF, PDGF, EGF, e IGF1) risulta più alta rispetto all'L-PRF (25).

1.5 Caratteristiche strutturali e biologiche

Valutando le principali differenze strutturali tra il PRP e il PRF, emerge che la prima differenziazione è data dalla diversa modalità di gelificazione. I concentrati piastrinici, come il PRP, usano trombina bovina associata a cloruro di calcio per determinare l'ultima fase della coagulazione e la polimerizzazione rapida della fibrina, mentre il PRF polimerizza naturalmente e lentamente durante la centrifugazione. Tutto ciò determinerà una diversa organizzazione tridimensionale della rete di fibrina, in quanto il processo di polimerizzazione della fibrina si basa sulle concentrazioni di fibrinogeno e trombina (9). La conversione del fibrinogeno in fibrina insolubile dipende dalla trombina disponibile nel campione di sangue. Le diverse modalità di polimerizzazione influenzano le caratteristiche biologiche della matrice di fibrina finale. La polimerizzazione della fibrina può risultare nella formazione di giunzioni bilaterali condensate o tetramolecolari (figura 1) e giunzioni equilaterali collegate o trimolecolari (figura 1) (27).

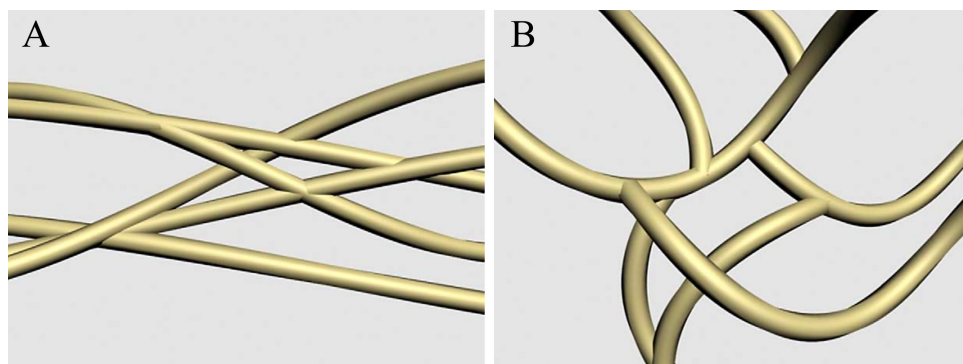


Figura 1: A. Ricostruzione digitale delle giunzioni tetramolecolari esistenti fra le fibrille di fibrina. Si noti la rigidità di questa architettura B. Ricostruzione digitale delle giunzioni trimolecolari tra le fibrille di fibrina. Si noti la flessibilità della rete fibrinica. Modificato da Dohan et.al 2006

Le giunzioni bilaterali, riscontrabili ad esempio nel PRP in cui sono presenti alte concentrazioni di trombina, portano alla formazione di una fitta e spessa rete di fibrina, data dalla rapida polimerizzazione, poco favorevole all'intrappolamento di citochine e alla migrazione cellulare; la rete di fibrina che ne deriva supporta le piastrine durante l'applicazione, ma dissolve rapidamente come le colle di fibrina. Contrariamente, le giunzioni equilaterali, tipiche del PRF in cui sono presenti basse concentrazioni di trombina, presentano una matrice di fibrina più flessibile e sottile, data da una lenta polimerizzazione, che consente l'intrappolamento di citochine e la migrazione cellulare, un rilascio più lento di queste molecole e quindi un effetto a lungo termine delle citochine sul sito della ferita (2). Inoltre, l'organizzazione tridimensionale conferisce elevata elasticità alla matrice di fibrina, tale da costituire una membrana di PRF flessibile, elastica e resistente affinché possa essere considerata un biomateriale di fibrina (17).

Numerosi studi in letteratura scientifica, hanno dimostrato che il PRF rilascia una serie di fattori di crescita nell'ambiente circostante al sito di applicazione e coopera nella guarigione dei tessuti molli (17). In uno studio di Kobayashi et al. (26), è stato valutato il rilascio dei fattori di crescita nei vari concentrati piastrinici (PRP, PRF e A-PRF) a 15 minuti, 60 minuti, 8 ore, 1 giorno, 3 giorni e 10 giorni. Successivamente, il rilascio dei fattori di crescita di PGDF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, TGF β -1, VEGF, EGF e IGF è stato quantificato con metodo Elisa. I risultati hanno evidenziato che il fattore di crescita maggiormente rilasciato nei concentrati piastrinici è il PDGF-AA e poi a seguire il PGDF-BB, TGF β -1, VEGF e PGDF-AB. Confrontando i vari concentrati si è notato che il PRP ha un rilascio di fattori di crescita immediato e maggiore nei primi 15-60 minuti rispetto a PRF; mentre a 10 giorni si aveva un rilascio di fattori maggiore nel PRF, dimostrando un rilascio continuo e costante dei fattori di crescita (26). Ciascuno dei fattori presi in considerazione, inoltre, ha un ruolo specifico nella rigenerazione dei tessuti:

- **Fattori di crescita derivati dalle piastrine (PDGF)** sono regolatori essenziali per la migrazione, la proliferazione e la sopravvivenza delle linee cellulari mesenchimali, giocano un ruolo fondamentale nella guarigione fisiologica delle ferite. Si trovano naturalmente nei coaguli di PRF e sono prodotti in maniera costante dai leucociti (18).
- **Fattore di crescita trasformante beta (TGF β)** è una vasta superfamiglia composta da numerosi membri. Il TGF β -1 è

l'isoforma più abbondante, è uno stimolatore della proliferazione di vari tipi di cellule mesenchimali, compresi gli osteoblasti. È considerato l'agente di fibrosi più potente tra tutte le citochine ed è definito regolatore dell'infiammazione per la capacità di indurre cicatrizzazione (17).

- **Fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF)** è il più potente fattore di crescita responsabile dell'angiogenesi dei tessuti e ha importanti effetti sul rimodellamento dei tessuti, in particolare in quello osseo, dimostrando effetti significativi sulla formazione di nuovo osso (18)
- **Fattore di crescita insulino-simile (IGF)** è presente in quantità elevate nella circolazione sanguigna, ma viene rilasciato anche durante la degranulazione piastrinica. Agisce come agente di protezione delle cellule, in particolare induce segnali di sopravvivenza per proteggere le cellule da stimoli apoptotici (17)..

In uno studio del 2009 di Dohan et al. è stato dimostrato che le membrane di L-PRF rilasciano lentamente per almeno 7 giorni i fattori precedentemente citati e la trombospodina-1 (TSP-1), una proteina di matrice. Mentre, dopo 7 giorni, le quantità iniziali di PDGF-AB risultavano simili a quelle rilasciate alla fine, ma le quantità di TGF β -1 e VEGF risultavano circa 6 volte superiori rispetto al contenuto iniziale(61). In particolare, oltre al rilascio di vari fattori di crescita, durante l'elaborazione del PRF, i leucociti possono secernere citochine in reazione ai fenomeni emostatici e infiammatori indotti artificialmente nella provetta centrifugata. Lo stesso lavoro ha preso in considerazione 5 mediatori cellulari principali: 3 citochine proinfiammatorie (IL-1 β , IL-6, TNF- α), una citochina antiinfiammatoria o cicatrizzale (IL-4) e un promotore della crescita dell'angiogenesi (VEGF) e sono stati quantificati sia nel surnatante plasmatico povero di piastrine (PPP) che nel siero dell'essudato del coagulo di PRF. È stato riscontrato che c'è una differente concentrazione di citochine nel PPP rispetto al coagulo di PRF, e anche tra l'essudato del coagulo di PRF e nel plasma e siero. Questi risultati dimostrano che la maggiore secrezione di queste interleuchine infiammatorie o cicatrizzali è da attribuire alla degranulazione dei leucociti, e che restano progressivamente intrappolate nella rete di fibrina durante la polimerizzazione (28).

1.6 Implicazioni cliniche dei diversi preparati

A seconda delle caratteristiche biologiche e strutturali dei differenti concentrati piastrinici è possibile ipotizzare una differente applicazione clinica degli stessi al fine di poter usufruire a pieno delle loro caratteristiche.

Il PRF viene utilizzato in maniera diffusa in chirurgia maxillo-facciale (12) ma si adatta perfettamente anche a contesti differenti in ambito chirurgico. I coaguli e le membrane presentano un volume ed una forma facili da combinare con la maggior parte delle tecniche chirurgiche per riempimento ed interposizione dei biomateriali o per utilizzo degli stessi come membrane protettive, le quali risultano resistenti e permettono un rilascio di fattori di crescita dilazionato nel tempo (29). La biologia di questi preparati spiega perfettamente il reale potenziale terapeutico del PRF in quanto, essendo un concentrato che raccoglie cellule del sistema immunitario e piastrine immerse in una matrice fibrinica, determina un'accelerata cicatrizzazione dei tessuti per lo sviluppo di un'efficace neovascolarizzazione, coadiuvando la chiusura delle ferite con un veloce rimodellamento cicatriziale dei tessuti e con la quasi totale assenza di eventi infettivi.

Nelle fasi di guarigione delle ferite risultano fondamentali quattro eventi: angiogenesi, controllo immunitario, cattura delle cellule staminali circolanti, riepitelizzazione. Le membrane di PRF sono in grado di sostenere tutte queste fasi, ragion per cui possono essere utilizzate per tutti i tipi di guarigione superficiale, sia cutanea che mucosa (19).

Differenti studi dimostrano che in contesti chirurgici, il PRF diminuisce la frequenza del sanguinamento intraoperatorio e postoperatorio, accelera la guarigione dei tessuti molli, supporta l'iniziale stabilità del tessuto innestato come conseguenza della sua natura coesiva e adesiva, favorisce una rapida vascolarizzazione di guarigione del tessuto consegnando fattori di crescita e, quando usato in combinazione con materiali di sostituzione ossea, induce la rigenerazione (9).

Il PRP possiede il vantaggio di essere liquido prima della gelificazione, il che rende questi materiali disponibili ad essere iniettati per trattamenti ortopedici e di medicina sportiva. In questa strategia di medicina rigenerativa, la sospensione di piastrine viene iniettata come le altre preparazioni farmaceutiche (30). Tuttavia, i vari PRP in forma gelificata

risultano molto utili in ambito chirurgico, in particolare per la riparazione di ferite cutanee (31).

1. Bielecki T, M. Dohan Ehrenfest D. Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF): Surgical Adjuvants, Preparations for In Situ Regenerative Medicine and Tools for Tissue Engineering. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(7):1121–30.
2. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 2009;27(3):158–67.
3. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998 Jun;85(6):638–46.
4. Matras H. [Effect of various fibrin preparations on reimplantations in the rat skin]. *Osterr Z Stomatol*. 1970 Sep;67(9):338–59.
5. Rosenthal AR, Egbert PR, Harbury C, Hopkins JL, Rubenstein E. Use of platelet-fibrinogen-thrombin mixture to seal experimental penetrating corneal wounds. *Albr von Graefes Arch fur Klin und Exp Ophthalmol Albr von Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1978 Jul;207(2):111–5.
6. 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.
7. 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 Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg*. 1997 Nov;55(11):1294–9.
8. Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une opportunit?? en paro-implantologie: Le PRF. *Implantodontie*. 2001 Jan 1;42:55–62.
9. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2006;101(3).
10. Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang CQ, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, platelet-rich fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: Current

- consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2014;4(1):3–9.
11. Del Corso M, Vervelle A, Simonpieri A, Jimbo R, Inchingolo F, Sammartino G, et al. Current Knowledge and Perspectives for the Use of Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF) in Oral and Maxillofacial Surgery Part 1: Periodontal and Dentoalveolar Surgery. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):1207–30.
 12. Simonpieri A, Del Corso M, Vervelle A, Jimbo R, Inchingolo F, Sammartino G, et al. Current Knowledge and Perspectives for the Use of Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF) in Oral and Maxillofacial Surgery Part 2: Bone Graft, Implant and Reconstructive Surgery. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):1231–56.
 13. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999;14(4):529–35.
 14. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001;10(4):225–8.
 15. Rughetti A, Giusti I, D’Ascenzo S, Leocata P, Carta G, Pavan A, et al. Platelet gel-released supernatant modulates the angiogenic capability of human endothelial cells. *Blood Transfus.* 2008 Jan;6(1):12–7.
 16. Crisci A, Lombardi D, Serra E, Lombardi G, Cardillo F, Crisci M. Standardized protocol proposed for clinical use of L-PRF and the use of L-PRF Wound Box®. *J Unexplored Med Data.* 2017;2:77.
 17. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2006;101(3).
 18. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Bishara M, Zhang Y, Hernandez M, Choukroun J. Platelet-Rich Fibrin and Soft Tissue Wound Healing: A Systematic Review. *Tissue Eng - Part B Rev.* 2017;23(1):83–99.
 19. Cieslik-Bielecka A, Choukroun J, Odin G, Dohan Ehrenfest DM. L-PRP/L-PRF in esthetic plastic surgery, regenerative medicine of the skin and chronic wounds. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012 Jun;13(7):1266–77.

20. Fioravanti C, Frustaci I, Armellin E, Condò R, Arcuri C, Cerroni L. review a uTologous blood preparaTions rich in plaTeleTs , fibrin and. *Oral Implantol (Rome)*. 2015;8(4):96–113.
21. He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu H. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Nov;108(5):707–13.
22. Dohan Ehrenfest DM, de Peppo GM, Doglioli P, Sammartino G. Slow release of growth factors a.nd thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors*. 2009 Feb;27(1):63–9
23. Pavlovic V, Ciric M, Jovanovic V, Stojanovic P. Platelet - rich fi brin : Basics of biological actions and protocol modi fi cations. 2021;446–54.
24. Crisci A. Le membrane L-PRF ® utili in chirurgia. 2015;75–90.
25. Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Choukroun J. Optimized Platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response. *J Periodontol*. 2017 Jan;88(1):112–21.
26. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean A, Schaller B, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig*. 2016;20(9):2353–60.
27. Mosesson MW, Siebenlist KR, Meh DA. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:11–30.
28. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Mar;101(3):e51-5.
29. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier J-B. Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *J Periodontol*. 2010;81(4):546–55

30. Mishra A, Harmon K, Woodall J, Vieira A. Sports medicine applications of platelet rich plasma. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012 Jun;13(7):1185–95.
31. Everts PAM, Hoogbergen MM, Weber TA, Devilee RJJ, van Monfort G, de Hingh IHJT. Is the use of autologous platelet-rich plasma gels in gynecologic, cardiac, and general, reconstructive surgery beneficial? *Curr Pharm Biotechnol.* 2012 Jun;13(7):1163–72.

Capitolo 2

Parte Sperimentale

2.1 Scopo della tesi

La medicina rigenerativa e l'ingegneria tissutale hanno ottenuto nel corso degli ultimi decenni un interesse crescente sia in medicina umana che veterinaria. In particolare, l'utilizzo di concentrati piastrinici considerati emoderivati in base alla legge 219 del 21/10/2005 "nuova disciplina delle attività trasfusionali e della produzione nazionale degli emoderivati" ha visto negli ultimi decenni uno sviluppo in diversi campi della medicina in ragione, soprattutto, della sua biocompatibilità, versatilità e ridotto costo. Risulta, infatti, ampiamente applicata in chirurgia maxillofacciale (1), ma anche in medicina sportiva e ortopedia (2,3).

Il concetto alla base dell'applicazione clinica dei concentrati piastrinici è fondato sulla capacità delle piastrine di rilasciare fattori di crescita in esse contenute e promuovere, così, la proliferazione, la differenziazione cellulare, la chemotassi e la migrazione di varie cellule coinvolte nei meccanismi di guarigione tissutale.

Come descritto in letteratura, concentrazioni sopra fisiologiche di fattori di crescita apporterebbero benefici accelerando la guarigione tissutale diminuendo la risposta infiammatoria e promuovendo la guarigione del tessuto (4).

Tra i vari concentrati piastrinici, il PRF risulta l'emoderivato che assicura un rilascio di fattori di crescita modulato nel tempo (5).

In medicina veterinaria, manca un protocollo di produzione del coagulo e di membrana PRF: gli studi presenti in letteratura si riferiscono principalmente a cani utilizzati solo come modello di studio animale. Nella maggior parte dei casi il protocollo prevede 3000 rpm per 10 min (6–9), altri 1300 rpm per 8 min (10), oppure 2700 rpm per 12 min (11), ed altri infine da 200 a 400 g per 8-10 min (12–15).

Nel 2001, Choukroun et al. descrissero un protocollo di produzione del PRF umano che permette di ottenere un coagulo PRF tramite un prelievo effettuato rapidamente e successiva centrifugazione dello stesso (1). Nel 2017, Crisci et al. hanno proposto una lieve modifica a tale protocollo applicandolo, poi, nella specie equina per la produzione delle membrane L-PRF (16).

Recentemente Soares et al. (7), hanno proposto un protocollo di centrifugazione per la produzione del coagulo PRF da sangue venoso di specie canina e felina ed hanno effettuato studi relativamente alle citochine ed ai fattori di crescita rilasciati.

Ad oggi non esiste, però, alcuno studio che descriva un protocollo di formazione di coagulo L-PRF, membrana L-PRF tramite l'utilizzo di uno strumento che ne faciliti la produzione e che, nel contempo, analizzi le membrane ottenute e da un punto di vista macroscopico e istologico e che, infine, valuti ed analizzi il progressivo rilascio dei principali fattori di crescita.

A tal proposito, il primo obiettivo che si prefigge tale studio è pertanto la standardizzazione di un protocollo di produzione di coaguli PRF nella specie canina partendo dal protocollo di centrifugazione di Choukroun modificato da Crisci e di standardizzazione, di conseguenza, anche l'utilizzo della L-PRF "*wound box*".

Il secondo obiettivo è la valutazione dell'applicabilità in campo clinico veterinario delle membrane L-PRF ottenute, tramite lo screening qualitativo dei fattori di crescita rilasciati dalle piastrine in un arco temporale di 7 giorni.

2.2 Materiali e Metodi

Il protocollo e le procedure applicate sono stati revisionati ed approvati dal Comitato Etico dell'Università di Napoli "Federico II" (prot. N. PG/2018/0113033 of 28/11/2018).

Il campione di studio era costituito da 300 cani provenienti da un canile in provincia di Caserta, in Campania. Tutti i soggetti presenti in tale struttura erano sottoposti settimanalmente a visita clinica completa e periodicamente (ogni 6-12 mesi) ad analisi ematobiochimiche comprendenti esame emocromocitometrico con formula leucocitaria, biochimica su siero (enzimi epatici, parametri renali, elettroliti e quadro proteico), nonché test IFAT (Indirect Immunofluorescent Antibody Test) per rilevare leishmaniosi o ehrlichiosi.

Nell'ambito delle analisi ematologiche e biochimiche routinarie, tra settembre ed ottobre 2020, erano prelevati da ciascun cane 20 mL di sangue venoso divisi, poi, in tre aliquote: 1 mL era destinato all'esame emocromocitometrico, 1 mL era utilizzato per l'esame ematobiochimico e per i test IFAT e i rimanenti 18 mL erano divisi in due aliquote da 9 mL ciascuna per la produzione del coagulo e consequenzialmente della membrana L-PRF.

Una delle due membrane era destinata all'esame macroscopico ed istologico; la seconda, invece, era utilizzata per la valutazione qualitativa dei fattori di crescita.

Criteri di inclusione erano età non inferiore ai 12 mesi, peso non inferiore ai 20 kg, *body condition score* non inferiore a 3 (scala 1-5), nessuna alterazione all'esame emocromocitometrico e l'assenza del concomitante stato di gravidanza. si annoverava invece l'età superiore ai 12 mesi.

I criteri di esclusione per tale studio includevano la presenza di patologie caratterizzate da trombocitopenia, presenza di neoplasie, malattie infettive o setticemia. L'assunzione di FANS o di cortisonici rappresentava altresì criterio di esclusione; al contrario, se tra la somministrazione del farmaco e l'arruolamento fossero intercorsi più di 15 giorni per i FANS e per i cortisonici a breve durata, e 30 giorni per i cortisonici a lunga durata, i pazienti potevano essere comunque considerati nel gruppo campione.

Per ogni soggetto erano registrati: razza, sesso, età (espressa in mesi) e peso (espresso in kg). Per ciascuna membrana erano registrate le dimensioni (lunghezza e larghezza espressi in cm), peso (espresso in grammi), l'esame istologico ed infine i risultati dell'esame ELISA per la quantificazione dei fattori di crescita.

2.2.1 Modalità di prelievo

Prima di effettuare il prelievo ematico e la visita clinica, ciascun soggetto era lasciato libero per almeno 15 minuti per prendere confidenza con l'ambiente circostante e con gli operatori. Nell'ambito delle analisi ematologiche e biochimiche routinarie, il prelievo ematico prevedeva la raccolta di 18 mL di sangue venoso mediante prelievo giugulare con l'utilizzo di un vacutainer (BD Vacutainer Safety-Lok-Blood Collection Set 21g $\times$ 3/4" $\times$ 7", Becton, Dickinson and Company), diviso in due campioni da 9 mL ciascuno per la produzione del coagulo L-PRF per la successiva formazione della membrana.

2.2.2 Protocollo di centrifugazione

Entro due minuti dal prelievo ematico, le provette (BD Vacutainer, Becton, Dickinson and Company) erano sottoposte a centrifugazione mediante l'utilizzo di una centrifuga da banco (TD4A-WS, In LoveArts) applicando il seguente protocollo (16) 30" di accelerazione, 2' a 2700 rpm, 4' a 2400 rpm, 3' a 3000 rpm and infine 36" di decelerazione (tabella 2). La temperatura ambiente era settata a 25°C, mentre, la temperatura interna della centrifuga era monitorata mediante un termometro (TEMP 7 NTC, XS Instruments) dotato di una sonda (NT 7L, XS Instruments) applicabile all'interno dell'apparecchio.

Tempo	Velocità di centrifugazione (rpm)
30 sec.	Accelerazione
2 min.	2700
4 min.	2400
3 min.	3000
36 sec.	Decelerazione

Tabella 2: Protocollo di centrifugazione

2.2.3 Preparazione della membrana L-PRF

Al termine della centrifugazione, all'interno di ciascuna provetta erano evidenziabili tre strati, partendo dall'alto verso il basso: il plasma privo di piastrine, il coagulo di fibrina (coagulo L-PRF) al centro, e il coagulo rosso (costituito da globuli rossi) sul fondo.

Il coagulo rosso era rimosso mediante l'utilizzo di un paio di forbici effettuando un taglio quanto più vicino possibile al coagulo L-PRF senza però intaccare lo stesso; la fase successiva prevedeva il posizionamento di quest'ultimo all'interno della Wound Box (figura 2). Tale strumento è caratterizzato da una piastra di acciaio chirurgico di 148 grammi che assicura una pressione omogenea di 142,437 Pa (17). Il coagulo veniva lasciato sotto pressione per 15 minuti.

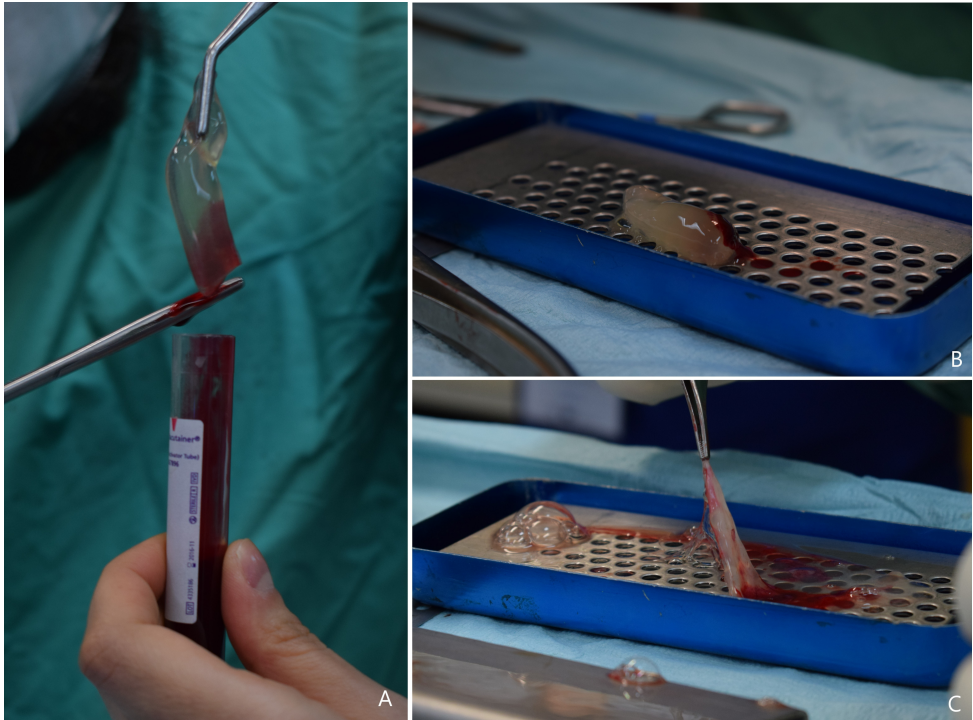


Figura 2: A. Coagulo L-PRF ottenuto dopo la centrifugazione, il coagulo rosso è rimosso delicatamente utilizzando un paio di forbici; B. Coagulo L-PRF all'interno della "wound box" (concesione del Dr. A.Crisci); C Membrana L-PRF ottenuta dopo una pressione di 15 minuti.

2.2.4 Valutazione macroscopica

Terminati i 15 minuti di pressione, la lunghezza (cm) e la larghezza (cm) di ciascuna membrana era misurata mediante l'utilizzo di un calibro di precisione (CDJB15-LTF, Borletti); una bilancia di precisione (PLC200B-C, G&G) era invece utilizzata per valutare il peso (espresso in grammi) delle stesse.

Terminata la valutazione macroscopica, le due membrane ottenute dal medesimo paziente erano poste in due distinte provette sterili (Demas, tubes

in PS, 3 ml, 12x55 mm, cod. 00579192), ed entro 6h erano trasportate presso il laboratorio mantenendo la temperatura di stoccaggio costantemente a 4°C.

2.2.5 Valutazione morfologica

Ciascuna membrana destinata all'esame istologico era posta in formalina neutralizzata al 10% (code no. 05-01007Q, Bio-Optica) e conservata, poi, a temperatura ambiente. La fase successiva prevedeva la disidratazione dei campioni mediante varie concentrazioni di alcool ed infine l'inclusione in paraffina. Le sezioni ottenute al microtomo avevano 5 µm di spessore ed erano poi colorate con ematossilina ed eosina al fine dell'analisi morfologica delle cellule contenute.

2.2.6 Quantificazione dei fattori di crescita

Le membrane destinate ai test ELISA per la quantificazione dei fattori di crescita, erano poste, una volta arrivate in laboratorio, all'interno di provette sterili da 10 mL; era poi posti in ciascuna di quest'ultime 4 mL di Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; 11965092, Gibco) sterile.

Ciascuna membrana era poi posta in una nuova provetta con 4mL di nuova soluzione DMEM sterile ad ognuno dei tempi stabiliti ovvero, dopo 1h (T0), dopo 4h (T1), dopo 24h (1°giorno, T2) e infine dopo 168h (7° giorno, T3). Tra un tempo di controllo e il successivo, le provette erano poste a 37°C in incubatrice umidificata e al 5% di anidride carbonica.

Il liquido prelevato da ciascuna provetta, prima di effettuare la sostituzione con una nuova contenente 4mL di DMEM sterile, era sottoposto a rapida centrifugazione (15000 rpm per 10 min) per rimuovere eventuali residui corpuscolati. Circa 1 mL di soluzione era poi congelata -20°C fino al test ELISA.

Ottenuti tutti i campioni, il TGF-β1, l'IGF-1, il PDGF-AB e il VEGF-A erano quantificati mediante l'utilizzo di kit ELISA specifici per la specie canina presenti in commercio (Cat. No. MBS2607521, MyBioSource). Tutti I kit ELISA sono stati preparati rispettando le istruzioni in essi riportate.

2.2.7 Analisi statistica

I dati raccolti sono stati importati su un software per la gestione dei fogli elettronici (Microsoft Excel 2019, Microsoft Corporation) e analizzati mediante uno specifico software di statistica (IBM® SPSS® Statistics Version 27.0, IBM Corporation, Armonk, New York).

I risultati ottenuti dalla valutazione macroscopica sono stati valutanti tramite una statistica descrittiva e sono stati indicati come valore medio e deviazione standard (media $\pm$ DS). Il valore medio $\pm$ DS dei valori ottenuti dall'esame emocromocitometrico, sono stati valutati e poi confrontati con il range indicato in letteratura per la specie canina.

Il test ANOVA di Friedman per campioni dipendenti è stato applicato per valutare l'esistenza di una differenza statisticamente significativa nel valore medio di ciascun fattore di crescita tra i tempi di controllo presi in esame (T0, T1, T2, T3). Il test di Tukey-Kramer è stato utilizzato come post-hoc test. Il livello di significatività è stato impostato per tutti i test a priori con $p \leq 0.05$.

2.3 Risultati

Il gruppo campione era costituito da 128 cani rispettanti i criteri di inclusione: 43 erano femmine (18 intere e 25 sterilizzate, rispettivamente il 14% e il 19,5%), 85 maschi (62 interi e 23 castrati, rispettivamente il 48,4% e il 17,9%).

L'età media dei soggetti arruolati era di 60,47 mesi (± 22 ; range 18–110 mesi), il peso medio, invece, era di 31,9 kg ($\pm 5,11$; range 20,5–44 kg). La tabella 3 mostra la distribuzione delle razze canine.

Razza	Maschi	Femmine	Totale
Meticci	46 (8 castrati)	30 (16 sterilizzate)	76
Labrador Retriever	5 (4 castrati)	-	5
Pitbull Terrier	3	1 (sterilizzata)	4
Setter Inglese	1	-	1
Totale	55	31	86

Tabella 3: Distribuzione delle razze e del sesso nel gruppo campione

I valori dell'esame emocromocitometrico erano tutti nei range normali (tabella 4).

	Media	Deviazione Standard (DS)	Range (min - max)
RBC	7,13 M/ μ L	$\pm 0,63$ M/ μ L	5,65 - 8,87 M/ μ L
WBC	10,33 K/ μ L	$\pm 1,63$ K/ μ L	5,05 - 16,76 K/ μ L
PLT	322,74 K/ μ L	$\pm 85,51$ K/ μ L	148 - 484 K/ μ L

Tabella 4: Esame emocromocitometrico; RBC= eritrociti; WBC=leucociti; PLT=piastrine.

Partendo da 128 campioni di sangue, ottenevamo 86 coaguli L-PRF (67,17%): da 42 campioni non era possibile ottenere un coagulo adatto alla preparazione di una membrana L-PRF.

Partendo da 86 coaguli L-PRF, si ottenevano il medesimo numero di membrane L-PRF la cui lunghezza media era di 1,97 cm ($\pm 0,89$) [range: 0,5–4,0 cm], la larghezza media era di 0,95 cm ($\pm 0,36$) [range 0,5–2,0 cm], e in peso medio era di 0,46 g ($\pm 0,20$) [range 0,1–1,1 g].

L'esame istologico delle membrane L-PRF evidenziava la presenza di 5 zone o strati, distinguibili fra loro per la diversa distribuzione e densità delle cellule ematiche imbrigliate tra le fibrille di fibrina (Fig.3). Il primo strato era caratterizzato dalla presenza, quasi esclusiva, di globuli rossi, seguito poi da una zona di transizione all'interno della quale erano riconoscibili leucociti, eritrociti e piastrine; uno strato ben definito di leucociti, seguito da uno di piastrine ed infine uno strato di fibrina.

Gli eritrociti erano colorati in rosso, mentre le piastrine e gli aggregati piastrinici avevano un colore rosa intenso. La fibrina non assorbiva colore presentandosi quasi bianca e conteneva solo qualche cellula.

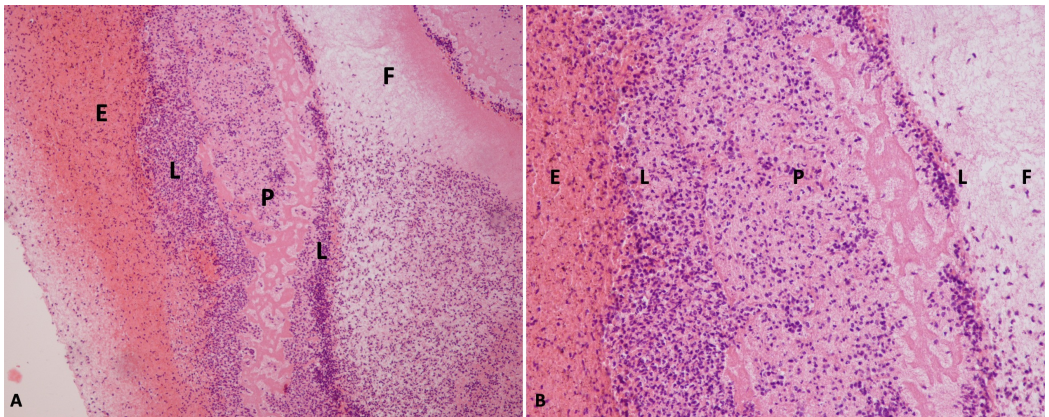


Figura 3: Istologia di un coagulo L-PRF. A. Porzione cellulare di un coagulo PRF (magnificazione X10). B. Coagulo PRF (magnificazione X40). P = piastrine; E = eritrociti; F = fibrina; L = leucociti; PRF = fibrina ricca di piastrine (platelet-rich fibrin).

In tabella 5 sono indicate i valori medi $\pm$ DS della concentrazione dei fattori di crescita nei tempi di controllo.

Fattore di crescita	T0 (media $\pm$ DS)	T1 (media $\pm$ DS)	T2 (media $\pm$ DS)	T3 (media $\pm$ DS)
VEGF pg/mL	539,93 $\pm$ 85,58	515,44 $\pm$ 161,1	340,18 $\pm$ 70,72	433,53 $\pm$ 42,31
PDGF-AA ng/mL	9,47 $\pm$ 0,95	4,04 $\pm$ 2,44	2,67 $\pm$ 1,80	4,65 $\pm$ 2,47
IGF-1 pg/mL	24.305,79 $\pm$ 4.255,37	15.386 $\pm$ 7.934,96	16.718,72 $\pm$ 4.018,45	16.367,36 $\pm$ 2.211,9
TGF- β 1 (pg/mL)	334,40 $\pm$ 153,75	621,56 $\pm$ 245,28	507,47 $\pm$ 175,53	573,91 $\pm$ 151,59

Tabella 5: Risultati del test ELISA a T0, T1, T2 e T3. DS= deviazione standard; VEGF=, vascular endothelial growth factor; PDGF= platelet-derived growth factor; IGF-1=insulin-like growth factor-1; TGF- β 1=transforming growth factor beta 1.

Il test ANOVA di Friedman ha evidenziato una differenza statisticamente significativa nella concentrazione media dei fattori di crescita durante i tempi di controllo ($p \leq 0,01$).

Il test post hoc di Tukey-Kramer ha evidenziato, in particolare l'esistenza di una differenza statisticamente significativa nel quantitativo medio del VEGF tra T0 e T2 ($p < 0,001$), T0 e T3 ($p < 0,01$), T1 e T2 ($p < 0,001$), T1 and T3 ($p < 0,05$), and T2 and T3 ($p < 0,05$) (Fig 4). Si è assistito pertanto ad una diminuzione della concentrazione media del VEGF tra T0 e T2, sebbene a T3 vi sia stato un leggero aumento del valore medio.

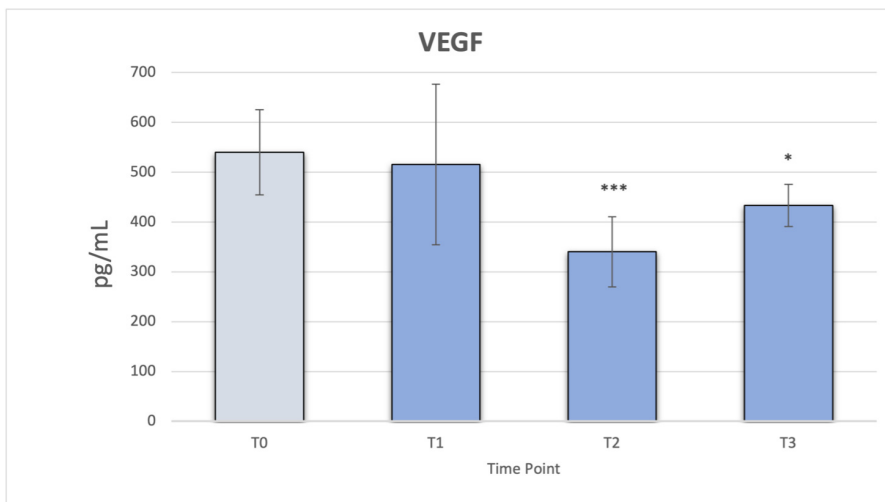


Figura 4: Risultati dell'ANOVA test di Friedman per il VEGF; * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$

Anche per il PDGF-AA si è evidenziata una differenza statisticamente significativa tra T0 e T1, T0 e T2, e T0 e T3 ($p < 0,001$), e tra T2 e T3 ($p < 0,05$) (Fig 5). Sebbene ci fosse una lieve diminuzione della concentrazione media tra T1 e T2 e un lieve aumento tra T2 e T3, in questo caso la differenza non era statisticamente significativa.

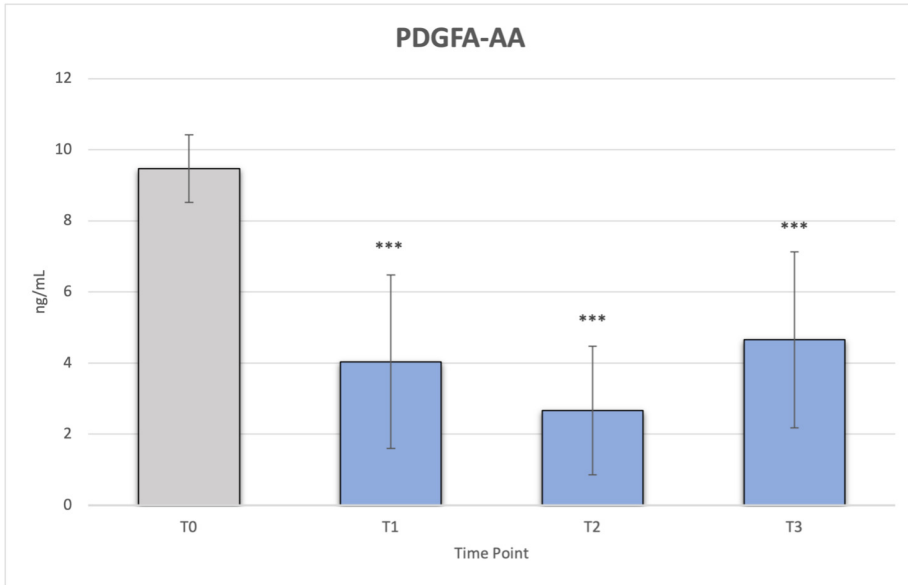
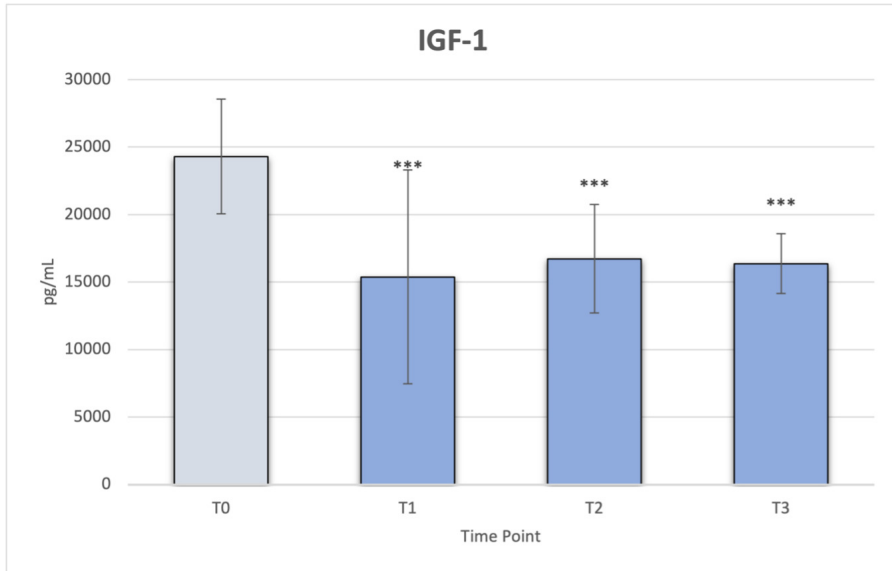


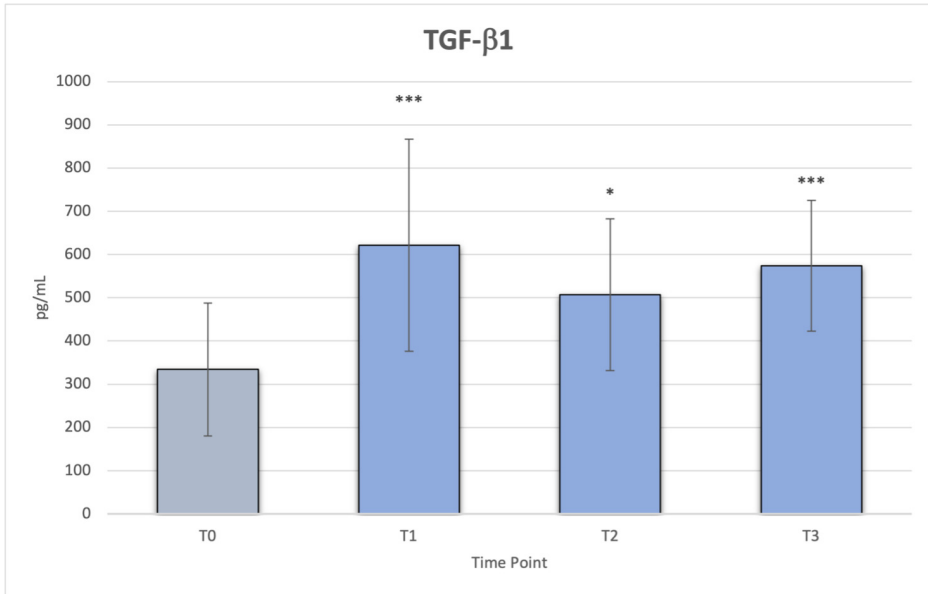
Figura 5: Risultati dell'ANOVA test di Friedman per il PDGF-AA; *** = $p < 0,001$

Relativamente all'IGF-1, in maniera sovrapponibile agli altri fattori di crescita indagati, vi era una differenza statisticamente significativa tra T0 e T1, tra T0 e T2, e tra T0 e T3 ($p < 0.001$) (Fig. 6). In questo caso, però la concentrazione media è diminuita, sebbene in maniera lieve, costantemente tra i vari tempi di controllo.



*Figura 6: Risultati dell'ANOVA test di Friedman per il IGF-1; *** = $p < 0,001$*

Infine, per TGF- β 1 vi era una differenza statisticamente significativa solo fra T0 e T1, T0 e T3 ($p < 0,001$), e T0 e T2 ($p < 0,05$) (Fig. 7).



*Figura 7: Risultati dell' ANOVA test di Friedman per il TGF- β 1; *** = $p < 0,001$*

2.4 Discussione

Il primo obiettivo del presente studio consisteva nella standardizzazione di un protocollo per la produzione di coaguli L-PRF che permettesse di ottenere membrane L-PRF utilizzando lo stesso protocollo utilizzato da Crisci et al. nel cavallo (16).

Abbiamo ottenuto 86 membrane esercitando una pressione controllata tramite la “wound box”, e successivamente abbiamo valutato prima le caratteristiche macroscopiche ed istologiche delle stesse e infine tramite analisi in vitro, abbiamo valutato quali-quantitativamente il rilascio di fattori di crescita da parte delle piastrine imbrigliate all’interno di tali membrane in un arco temporale di 7 giorni.

La procedura per l’ottenimento di PRF è di semplice applicazione, risulta essere anche molto economica in quanto richiede l’utilizzo di una semplice centrifuga da banco e di provette non contenenti né anticoagulanti né pro-aggreganti, sfruttando, pertanto, il normale processo di aggregazione piastrinica.

Alcuni farmaci largamente utilizzati in ambito clinico (per esempio FANS o corticosteroidi) possono alterare l’emostasi primaria tramite l’inibizione della ciclossigenasi-1, determinando una riduzione della sintesi del trombassano-A2 che esita in una riduzione dell’aggregazione piastrinica (18–21).

La procedura prevedeva un semplice prelievo giugulare che era ben tollerato dai soggetti facenti parte del gruppo campione: tutti i soggetti arruolati non presentavano alterazioni rilevabili alla visita clinica e all’esame emocromocitometrico. Inoltre, i criteri di inclusione hanno permesso di selezionare unicamente pazienti che non avessero assunto e non assumessero al momento del prelievo ematico, farmaci che potessero alterare il normale processo di coagulazione ed aggregazione piastrinica e il numero di piastrine circolanti.

Punto cruciale per la formazione di un coagulo L-PRF che possa essere destinato alla produzione di una membrana L-PRF, è il tempo intercorrente tra il prelievo ematico e l’inizio della centrifugazione dal momento che la formazione del coagulo si basa sul naturale processo di polimerizzazione della fibrina (22).

Un intervallo di tempo superiore ai 2 minuti determina la formazione di un coagulo amorfo, di colore rosso che esita, dopo la compressione con la “wound box”, in una membrana con caratteristiche macroscopiche non definite o nella completa mancata formazione della membrana (14).

Crisci et al. riportano che nel cavallo per ottenere il risultato migliore, in termini di caratteristiche macroscopiche (dimensioni e peso della membrana) ed istologiche, tra il prelievo ematico e la centrifugazione non devono trascorrere più di 2 min e che la centrifugazione deve avvenire ad una temperatura tra i 21-30°C (16).

I nostri risultati trovano conferma con quanto riportato nella recente letteratura scientifica, in quanto 42/128 coaguli (32,8%) non erano adatti per la formazione di membrane, mentre 86/128 coaguli (67,18%). Analizzando retrospettivamente questa condizione, abbiamo rilevato che nel primo caso vi era stato un ritardo tra il prelievo ematico e la centrifugazione del sangue (tempo >2', legato al temperamento di alcuni soggetti) e che la temperatura ambientale era superiore ai 30°C. Nel secondo caso, invece, erano stati rispettati i tempi fra prelievo e centrifugazione e la temperatura era costante a 25°C.

Tali dati confermano, pertanto, la nostra prima ipotesi, ovvero che il protocollo applicato permette di ottenere coaguli e membrane L-PRF da sangue canino.

In base alla nostra esperienza, possiamo affermare che l'omogeneità dei coaguli è altresì strettamente dipendente dal particolare protocollo di centrifugazione (1). Infatti, la “*soft spin*” iniziale di 2' a 2700 rpm e i 4' a 2400 rpm, permettono la separazione completa del plasma dalle piastrine e dai globuli rossi, mentre una separazione parziale dai globuli bianchi (23). L'alta velocità, (“*hard spin*”) consistente in 3' a 3000 rpm, determina la condensazione della fibrina ottenendo un coagulo con una struttura della fibrina ad alta densità.

Sulla base di ricerche effettuate con i maggiori motori di ricerca scientifici, fino ad oggi non vi sono studi che descrivano e standardizzino un protocollo per la formazione di membrane L-PRF nel cane.

McLellan e Plevin (24) e Crisci et al (17) hanno dimostrato che il PRF ottenuto da sangue venoso equino presenta caratteristiche simili a quello umano in termini di aspetto macroscopico e fattori di crescita. Recentemente, Soares et al. (7) ha dimostrato che è possibile ottenere PRF da sangue venoso canino e felino, ed ha descritto i fattori di crescita rilasciati dai medesi coaguli.

In chirurgia, gli *scaffold* suturabili in corrispondenza di una lesione sono ampiamente utilizzati. Le membrane L-PRF ottenute dall'azione di premitura di coaguli L-PRF tramite l'uso di garze sono utilizzate principalmente per le lesioni alveolari o di retrazione gengivale(11–13). Le

membrane ottenute mediante una pressione costante, come quelle ottenute mediante l'utilizzo della wound box presentano caratteristiche differenti rispetto alle precedenti. Crisci et al. (16) ha descritto e standardizzato l'utilizzo della wound box per produrre membrane L-PRF nel cavallo.

La L-PRF Wound Box è uno strumento presente in commercio in varie dimensioni e con la piastra di compressione di peso (e quindi di pressione) variabile. Lo spessore, la larghezza e la lunghezza delle membrane sono direttamente correlati al peso della piastra a durata della pressione. Ad oggi, non sono presenti studi in letteratura veterinaria che indicano in maniera chiara ed univoca quale siano le caratteristiche di tale strumento per la specie canina. Per questo studio, abbiamo utilizzato una L-PRF wound box con una piastra di pressione di 148g che permette di ottenere una pressione costante di $142,437 \text{ Pa/cm}^2$, per un intervallo di tempo di 15 minuti. Tale procedura permette di ottenere una membrana con una lunghezza e larghezza media di 2 cm, rendendola pertanto adatta all'applicazione clinica.

I nostri risultati trovano, pertanto, conferma con quanto descritto in letteratura, confermando l'efficacia della L-PRF Wound Box(16) per la produzione di membrane L-PRF nella specie canina. Le membrane presentavano una lunghezza variabile da 0,5 ai 4 cm, mentre la larghezza variava da 0,5 a 2 cm. Secondo la nostra opinione ed esperienza, l'ampio range di misure è correlato all'intervallo temporale esistente tra la centrifugazione e la compressione del coagulo. Castro et al. (14) ha individuato tale intervallo come ulteriore punto cruciale nel processo di produzione delle membrane L-PRF: in particolare maggiore è il tempo che intercorre tra la formazione del coagulo e l'inizio della compressione, minore sarà la dimensione della membrana ottenuta.

Analizzando retrospettivamente i nostri dati, possiamo dedurre che le membrane di dimensioni minori erano quelle ottenute quando il livello di esperienza e di coordinazione non era ancora stato perfettamente affinato; superato questo limite, le membrane ottenute si presentavano tutte di dimensioni notevolmente maggiori.

Tralasciando le differenze di dimensioni, l'esame istologico delle membrane ha permesso di evidenziare come, sia nelle membrane più piccole, che in quelle più grandi, l'istoarchitettura fosse costante. In particolare, si riconoscevano 5 strati caratterizzati da piastrine, leucociti ed eritrociti, intrappolati nella maglia di fibrina. Tale condizione è giustificabile dal fatto che durante la sintesi di *scaffold* autologhi di fibrina, le fibre della fibrina (sia quelle di diametro maggiore che minore) incorporano al loro interno le piastrine che rimangono, pertanto, imbrigliate senza la possibilità di essere

disperse, ma al contempo la macro e microporosità che caratterizza lo *scaffold* permette ai fattori di crescita di essere rilasciati nell'ambiente circostante. La medesima istoarchitettura è anche descritta nell'uomo e nel cavallo(16,25,4).

In umana, sono stati effettuati studi che hanno confrontato il rilascio dei fattori di crescita delle piastrine da parte del PRF e del PRP; nella fattispecie, è emerso che il primo concentrato piastrinico permette un rilascio pressoché costante di fattori di crescita in un arco temporale variabile da 7 a 14 giorni, mentre il secondo rilascia tali sostanze principalmente nelle prime 24h dopo la produzione (5,26).

Per la valutazione quali-quantitativa dei fattori di crescita rilasciati dalle membrane L-PRF abbiamo utilizzato dei kit ELISA specifici per la specie canina. I risultati ottenuti trovano conferma con quanto già descritto in medicina umana e veterinaria (5,7). Per il VEGF, PDGFA-A e IGF-1dopo una iniziale diminuzione del contenuto medio percentuale di tali fattori, abbiamo osservato un incremento tra le 24 e le 168h. Al contrario, abbiamo trovato risultati discordanti con quanto indicato in precedenti studi per il TGF- β 1(7), in quanto nel nostro studio abbiamo rilevato un aumento della concentrazione media percentuale durante i tempi di controllo. L'andamento del rilascio dei fattori di crescita può essere giustificato dal fatto che le cellule all'interno della maglia di fibrina (piastrine e leucociti) si mantengono biologicamente attive e in grado di rilasciare in maniera modulata nel tempo (fino a 10 giorni) tali fattori di crescita (26).

1. Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une opportunit?? en paro-implantologie: Le PRF. *Implantodontie*. 2001 Jan 1;42:55–62.
2. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Bishara M, Zhang Y, Hernandez M, Choukroun J. Platelet-Rich Fibrin and Soft Tissue Wound Healing: A Systematic Review. *Tissue Eng - Part B Rev*. 2017;23(1):83–99.
3. Amable PR, Carias RBV, Teixeira MVT, Da Cruz Pacheco Í, Corrêa Do Amaral RJF, Granjeiro JM, et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: Optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(3):1–13.
4. Jiménez-Aristazábal RF, Carmona JU, Prades M. Changes on the Structural Architecture and Growth Factor Release, and Degradation in Equine Platelet-Rich Fibrin Clots Cultured Over Time. *J equine Vet Sci*. 2019 Nov;82:102789.
5. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean A, Schaller B, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig*. 2016;20(9):2353–60.
6. Alenazy MS, Al-Nazhan S, Mosadomi HA. Histologic, Radiographic, and Micro-Computed Tomography Evaluation of Experimentally Enlarged Root Apices in Dog Teeth with Apical Periodontitis after Regenerative Treatment. *Curr Ther Res - Clin Exp* [Internet]. 2021;94:100620. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.curtheres.2020.100620>
7. Soares CS, Babo PS, Faria S, Pires MA, Carvalho PP. Standardized Platelet-Rich Fibrin (PRF) from canine and feline origin: An analysis on its secretome pattern and architectural structure. *Cytokine* [Internet]. 2021;148(September):155695. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155695>
8. El Halaby HM, Abu-Seida AM, Fawzy MI, Farid MH, Bastawy HA. Evaluation of the regenerative potential of dentin conditioning and naturally derived scaffold for necrotic immature permanent teeth in a dog model. *Int J Exp Pathol*. 2020;101(6):264–76.
9. Kazemi D, Fakhrjou A, Mirzazadeh Dizaji V, Khanzadeh Alishahi M. Effect of autologous platelet rich fibrin on the healing of

- experimental articular cartilage defects of the knee in an animal model. *Biomed Res Int.* 2014;2014:8–10.
10. Kornsutthisopon C, Pirarat N, Osathanon T, Kalpravidh C. Autologous platelet-rich fibrin stimulates canine periodontal regeneration. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–14.
 11. Neiva RF, Gil LF, Tovar N, Janal MN, Marao HF, Bonfante EA, et al. The synergistic effect of leukocyte platelet-rich fibrin and micrometer/nanometer surface texturing on bone healing around immediately placed implants: An experimental study in dogs. *Biomed Res Int.* 2016;2016.
 12. Chen YJ, Zhao YH, Zhao YJ, Liu NX, Lv X, Li Q, et al. Potential dental pulp revascularization and odonto-/osteogenic capacity of a novel transplant combined with dental pulp stem cells and platelet-rich fibrin. *Cell Tissue Res.* 2015;361(2):439–55.
 13. Tambella AM, Bartocetti F, Rossi G, Galosi L, Catone G, Falcone A, et al. Effects of autologous platelet-rich fibrin in post-extraction alveolar sockets: A randomized, controlled split-mouth trial in dogs with spontaneous periodontal disease. *Animals.* 2020;10(8):1–18.
 14. Castro AB, Andrade C, Li X, Pinto N, Teughels W, Quirynen M. Impact of g force and timing on the characteristics of platelet-rich fibrin matrices. *Sci Rep.* 2021;11(1):1–13.
 15. To M, Su C yao, Hidaka K, Okudera T, Matsuo M. Effect of advanced platelet-rich fibrin on accelerating alveolar bone formation in dogs: a histological and immunofluorescence evaluation. *Anat Sci Int [Internet].* 2019;94(3):238–44. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12565-019-00479-1>
 16. Crisci A, Lombardi D, Serra E, Lombardi G, Cardillo F, Crisci M. Standardized protocol proposed for clinical use of L-PRF and the use of L-PRF Wound Box®. *J Unexplored Med Data.* 2017;2:77.
 17. Crisci A. Le membrane L-PRF ® utili in chirurgia. 2015;75–90.
 18. Lundquist R, Dziegiel MH, Agren MS. Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in platelet-rich fibrin. *Wound repair Regen Off Publ Wound Heal Soc [and] Eur Tissue Repair Soc.* 2008;16(3):356–63.
 19. Vahabi S, Vaziri S, Torshabi M, Rezaei Esfahrood Z. Effects of Plasma Rich in Growth Factors and Platelet-Rich Fibrin on Proliferation and Viability of Human Gingival Fibroblasts. *J Dent (Tehran).* 2015 Jul;12(7):504–12.

20. Clipet F, Tricot S, Alno N, Massot M, Solhi H, Cathelineau G, et al. In vitro effects of Choukroun's platelet-rich fibrin conditioned medium on 3 different cell lines implicated in dental implantology. *Implant Dent.* 2012 Feb;21(1):51–6
21. Roy S, Driggs J, Elgharably H, Biswas S, Findley M, Khanna S, et al. Platelet-rich fibrin matrix improves wound angiogenesis via inducing endothelial cell proliferation. *Wound repair Regen Off Publ Wound Heal Soc [and] Eur Tissue Repair Soc.* 2011 Nov;19(6):753–66.
22. Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, Jiménez P, Corso M Del, Kang BS, et al. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets [Internet].* 2018;29(2):171–84. Available from: <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1293812>
23. Arnoczky SP, Shebani-Rad S. The basic science of platelet-rich plasma (PRP): What clinicians need to know. *Sports Med Arthrosc.* 2013;21(4):180–5.
24. McLellan J, Plevin S. Temporal release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) in the horse: a comparative in vitro analysis. *Int J Appl Res Vet Med.* 2014;12:44–53.
25. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2006;101(3).
26. Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, Kubesch A, Lorenz J, Rutkowski J, et al. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol.* 2014 Dec;40(6):679–89

Capitolo 3

Conclusioni

I risultati del nostro studio confermano che un protocollo di produzione caratterizzato da un rapido prelievo ematico seguito immediatamente dalla centrifugazione con il protocollo descritto e premitura del coagulo, permette di ottenere una membrana L-PRF caratterizzata da una maglia di fibrina ad alta densità.

La valutazione quali-quantitativa del rilascio dei fattori di crescita nel tempo conferma il potenziale di questo *bioscaffold* per migliorare, regolare e promuovere la migrazione diretta delle cellule staminali e l'induzione di vie di guarigione. La standardizzazione di un protocollo di produzione di coaguli e membrane L-PRF nella specie canina e la valutazione delle caratteristiche macroscopiche e istologiche è necessaria per valutare in maniera oggettiva l'efficacia clinica delle membrane L-PRF.

Tuttavia, sono necessari ulteriori studi in vivo per valutare le potenziali applicazioni cliniche delle membrane L-PRF con queste caratteristiche microscopiche e macroscopiche, soprattutto per il trattamento di ferite con perdita di tessuto in cui il processo di guarigione sembra essere ritardato (ulcere) oppure in tutte quelle situazioni in cui l'applicazione di tale *bioscaffold* possa permettere la riduzione dell'utilizzo di antibiotici.