

TRIMESTRALE - ANNO II - NUMERO I - GENNAIO/MARZO 2003

DermaCosmetologia



CIC Edizioni Internazionali

Evidenza delle modificazioni cutanee indotte dalla tecnica LPG® mediante analisi d'immagine

D. INNOCENZI,
A. BALZANI,
G. MONTESI,
G. LA TORRE*,
S. TENNA,
N. SCUDERI,
S. CALVIERI

Dipartimento di Malattie
Cutanee-Veneree e Chirurgia
Plastica-Ricostruttiva
Università degli Studi di Roma
"La Sapienza"

* Cattedra di Igiene
Università di Cassino

Introduzione

Molti studi hanno dimostrato il ruolo che le forze svolgono in diversi distretti biologici evidenziando gli effetti che lo stress meccanico produce a carico di numerosi organi ed apparati. Esso, ad esempio, è implicato nel rimodellamento dei vasi e nei meccanismi angiogenetici. Infatti la pressione sanguigna esercita una tensione di parete sulle cellule endoteliali, determinando la liberazione di fattori di crescita e inducendo la migrazione e la proliferazione di tali cellule con conseguente neovascolarizzazione tissutale (1).

Nonostante la cute sia un organo sottoposto continuamente a stress meccanico fisiologico, esistono pochi lavori pubblicati in letteratura riguardo l'azione delle forze meccaniche sulla cute stessa ed in particolare sulle modificazioni indotte da tali forze sui diversi componenti dell'epidermide e del derma.

Ad esempio, studi condotti *in vitro* su colture di cheratinociti sottoposti a tensione continua, dimostrano che essi vanno incontro a proliferazione e differenziazione, con un aumento di espressione di cheratina soprabasale e di altri *markers* di differenziazione (2).

Inoltre, sappiamo che le forze meccaniche sono in grado di aumentare la capacità prolifera-

tiva dei fibroblasti tramite l'aumento della sintesi di DNA e che, al cessare dell'applicazione di tali forze, la sintesi di DNA si arresta.

Lo stress meccanico induce la trasformazione del fibroblasto che da "normale" acquista un fenotipo "secernente" con aumento della sintesi di collagene ed inibizione delle proteasi. Tutto ciò ha come conseguenza un incremento dello spessore delle fibre collagene del compartimento extracellulare.

Quando lo stress cessa di agire sui fibroblasti, le collagenasi aumentano e la sintesi di collagene diminuisce (3).

A carico delle strutture vasali della cute è stata osservata una risposta proliferativa in seguito alla prolungata applicazione di forze meccaniche, ed a livello dei vasi linfatici tale effetto è mediato dall'aumentata concentrazione di specifici fattori di crescita. Per i vasi venosi l'effetto è meno marcato.

Partendo da tali presupposti, allo scopo di dimostrare e quantificare ipotetiche modificazioni morfologiche indotte sulla cute da forze meccaniche applicate costantemente nel tempo, abbiamo valutato istologicamente le differenze osservate *in vivo* nella cute sottoposta a stress meccanico rispetto alla cute non stimolata in 15 pazienti sottoposti a biopsia cutanea.

Lo stress meccanico è stato indotto mediante uno strumento utilizzato nella tecnica LPG®



che è basata sull'applicazione di forze meccaniche (positive e negative) e rappresenta, a nostro modo di vedere, un buon modello per studiare, *in vivo*, gli effetti di tali forze sulla cute, ed in particolare sui cheratinociti, sui fibroblasti e sulle cellule endoteliali. La tecnica LPG® utilizza un sistema basato su 2 rulli motorizzati che comprimono la cute mobilizzando una plica cutanea che viene sollevata da un sistema di aspirazione. La pressione negativa esercitata dall'aspirazione, così come quella positiva esercitata dai rulli, è *biologicamente* responsabile di una condizione di stress meccanico al quale sono sottoposte tutte le strutture anatomiche che costituiscono la cute e il tessuto sottocutaneo. Il substrato biologico dell'azione positiva della tecnica LPG® è probabilmente da ricercare nelle modificazioni a carico dei cheratinociti, indotte dall'azione dello stimolo meccanico sulla giunzione dermo-epidermica, dei fibroblasti e di altre strutture dermiche, quali ad esempio i vasi sanguigni. Studi condotti sull'uomo hanno dimostrato che la tecnica LPG® aumenta non soltanto il flusso sanguigno e linfatico (4) ma migliora anche l'aspetto del tessuto cicatriziale e della cellulite. Essa viene infatti utilizzata in diversi settori sia estetici (Endermologie®) sia medici: *body contouring*, post liposuzione (5), cicatrici da ustione e post chirurgiche, edemi (6), rigidità articolare. È stato inoltre dimostrato, su modello animale, che la tecnica LPG® aumenta la produzione di collagene (7). Tuttavia il suo meccanismo di azione, e in particolare gli effetti sui cheratinociti e sui fibroblasti, sono ancora poco conosciuti.

Materiali e metodi

La stimolazione meccanica cutanea delle 15 pazienti è stata praticata con l'ausilio di un dispositivo medico chiamato Cellu M6® (LPG® Systems, Valence, France), composto da un sistema d'aspirazione che solleva la cute e da 2 rulli motorizzati che effettuano una mobilizzazione della plica cutanea.

Per il nostro studio sono state selezionate 15 pazienti affette da lipodistrofia degli arti inferiori o dell'addome, di età compresa tra i 23 ed

i 57 anni (età media 40 anni) con un *body max index* compreso tra 21 e 26. Sono state escluse pazienti affette da alterazioni ormonali, patologie neoplastiche, patologie del connettivo, diabete mellito, alcoolismo, tabagismo.

Tutte le pazienti sono state sottoposte a 14 sedute con cadenza bi/tri settimanale, ognuna della durata di 11 minuti. Il trattamento delle zone affette da lipodistrofia (fianchi e/o glutei, regione sovrapubica) è stato eseguito soltanto su di un lato (destra o sinistra). Al termine dell'ultimo ciclo è stata praticata, sia sul lato trattato che su quello non trattato, una *punch biopsy* cutanea del diametro di 3 mm.

Sui 30 campioni (15 del lato sottoposto a stress meccanico e 15 del lato non stimolato) abbiamo eseguito un'analisi di immagine con software di misurazione multicanale.

Le immagini sono state acquisite tramite una videocamera a colori montata su un microscopio ottico e collegata ad un personal computer dotato di un hard disk. Tramite i due moduli di misurazione multicanale inclusi nel pacchetto software IAS 2000 le immagini sono state digitalizzate a 32 bit con una risoluzione di 768 x 576 pixels e archiviate in specifiche sessioni di lavoro. I due moduli multicanale utilizzati permettono in un caso una misurazione automatica e nell'altro una misurazione manuale, con conseguente digitalizzazione, analisi ed archiviazione delle immagini ottenute dai preparati istologici. L'analisi quantitativa delle immagini archiviate è basata su parametri colorimetrici che il computer calcola traducendo le aree e le lunghezze misurate in un valore numerico, espresso rispettivamente in μm^2 e in μm .

Utilizzando l'analisi di immagine, abbiamo misurato elementi dermici ed epidermici:

- nel derma abbiamo analizzato numero ed area dei nuclei dei fibroblasti, area dei vasi sanguigni e linfatici ed area dell'interstizio tra le fibre collagene;
- nell'epidermide, lo spessore totale dallo strato basale al corneo, lo spessore dallo strato basale al granuloso (escluso il corneo) e la lunghezza della giunzione dermo-epidermica (GDE).

Sui dati ottenuti con l'analisi di immagine abbiamo effettuato un'analisi statistica. Essa ha

previsto il calcolo della media e delle deviazioni standard per tutte le variabili di tipo quantitativo, cioè sia per i valori ottenuti dalle sezioni di cute trattata con tecnica LPG®, che per i valori risultanti dalle sezioni di cute non trattata.

Per valutare l'esistenza di differenza fra le medie dei due gruppi abbiamo utilizzato il test di Wilcoxon dei ranghi con segno, considerando significative dal punto di vista statistico quelle differenze per cui $p < 0,05$.

Risultati

L'analisi quantitativa dei parametri da noi esaminati eseguita sui prelievi biotipici, sia della cute sottoposta a stress meccanico che di quella non sottoposta, ha messo in evidenza risultati significativi sia per i parametri dermici che per quelli epidermici.

Abbiamo rilevato importanti variazioni a carico del numero (A) e dell'area dei fibroblasti (B) tra i preparati di cute sottoposta a stress e quelli di cute non stimolata.

Analoghe rilevazioni sono state fatte per l'interstizio (C), per l'area del lume vasale (D), per lo spessore epidermico dallo strato basale allo strato granuloso (E), per lo spessore epidermico dallo strato basale allo strato corneo (F) e per la lunghezza della giunzione dermo-epidermica (G).

A) Il numero dei nuclei dei fibroblasti è risultato aumentato nelle sezioni di 13 pazienti su 15, pari all'87% dei casi osservati (Figg. 1, 2).

In 2 pazienti il numero dei nuclei non è aumentato in seguito al trattamento, risultando un valore numerico superiore nelle sezioni del lato non trattato.

Calcolando l'aumento in percentuale nei singoli casi ed eseguendo una media, abbiamo ottenuto un incremento medio pari al 37,5% nelle biopsie di cute sollecitata meccanicamente rispetto a quelle di cute non sollecitata.

B) Per quanto riguarda l'area dei nuclei dei fibroblasti, l'incremento rilevato è stato identico a quello osservato per il numero dei nuclei: infatti la superficie dei nuclei dei fibroblasti risultava aumentata nelle stesse 13 pazienti (87%) in cui il numero dei nuclei era apparso aumentato.

Anche per questo parametro abbiamo calcolato l'incremento percentuale dei singoli casi ed abbiamo eseguito la media delle percentuali ottenute: è risultato un aumento medio complessivo pari al 54,6%, che rappresenta un valore superiore rispetto a quello osservato per il numero dei nuclei (37,5%).

In 2 casi l'area dei nuclei dei fibroblasti è risultata maggiore nelle sezioni non trattate.

C) Come era logico attendersi, vista l'azione drenante esercitata dal Cellu M6® tramite i 2

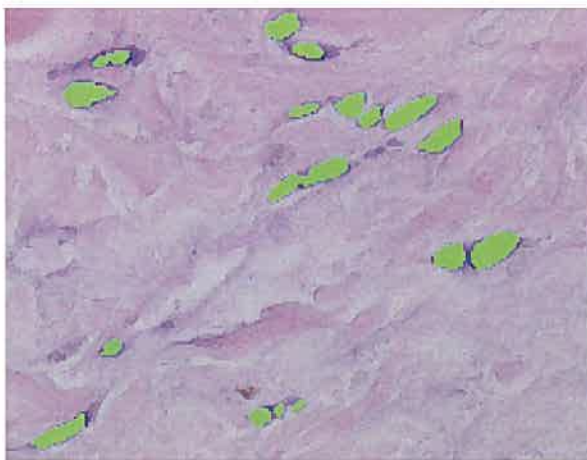


Fig. 1 - Numero nuclei di fibroblasti. Cute trattata con Tecnica LPG®.

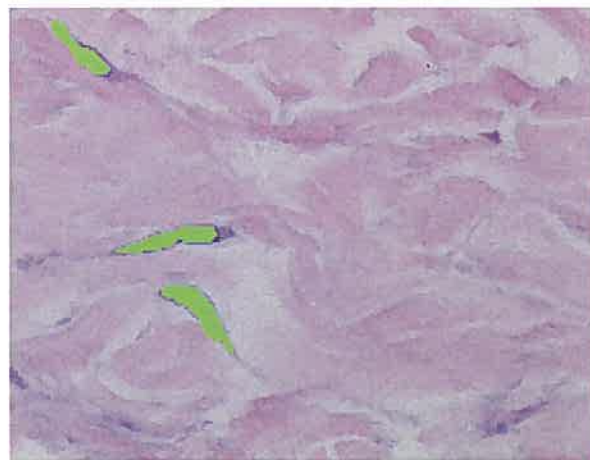


Fig. 2 - Numero nuclei di fibroblasti. Cute non trattata con Tecnica LPG®.



rulli motorizzati che mobilizzano una plica cutanea e tramite il sistema di aspirazione che solleva la plica stessa, l'area dell'interstizio è risultata diminuita nelle biopsie delle pazienti trattate nell'80% dei casi (12 su 15) (Figg. 3, 4). La diminuzione media, calcolata come già detto sulla media delle percentuali dei singoli casi, è stata del 37,9%.

In 3 pazienti le sezioni trattate mostravano un'area interstiziale maggiore della controparte non trattata.

D) Il calcolo dell'area dei vasi sanguigni mostra dei risultati che evidenziano in modo netto il

miglioramento trofico che si osserva in seguito a stimolazione meccanica della cute: infatti nelle biopsie di cute sottoposta a tecnica LPG® di 14 pazienti su 15, cioè nel 93% dei casi, è stato rilevato un aumento dell'area del lume vasale (Figg. 5, 6).

L'incremento medio complessivo è stato del 116,7%, cioè si è osservata una crescita più che raddoppiata dell'area vasale nelle biopsie di cute sottoposta a stress meccanico rispetto a quella non stimolata.

In 1 sola paziente, l'area del lume vasale è risultata maggiore nelle sezioni del lato non trattato.



Fig. 3 - Area interstizio (40x). Cute trattata con Tecnica LPG®.

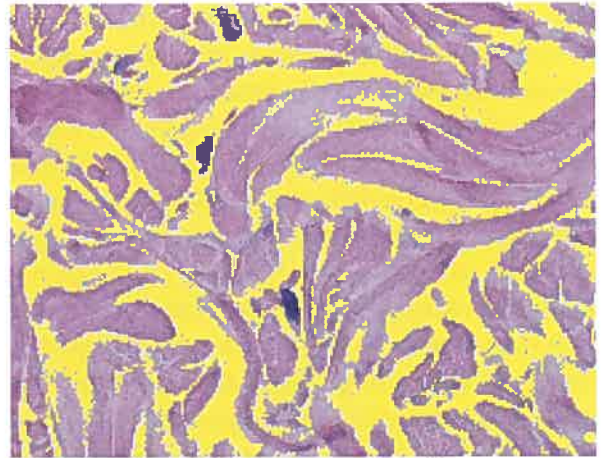


Fig. 4 - Area interstizio (40x). Cute non trattata con Tecnica LPG®.

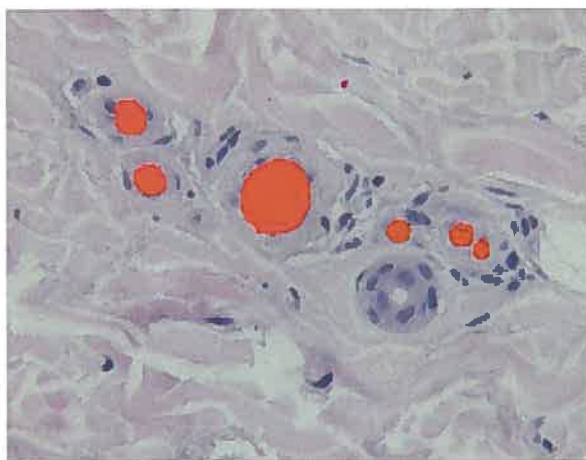


Fig. 5 - Area vasi (20x). Cute trattata con Tecnica LPG®.

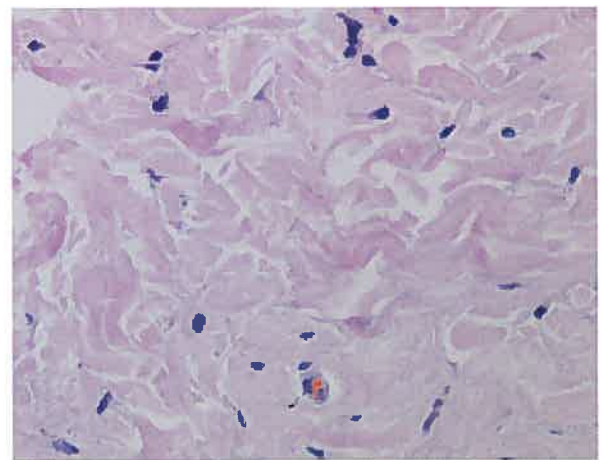


Fig. 6 - Area vasi (20x). Cute non trattata con Tecnica LPG®.

E) Il migliorato trofismo della cute sottoposta a stress meccanico è apparso evidente anche all'analisi dello spessore epidermico dallo strato basale al granuloso e dal basale al corneo.

Per quanto riguarda lo spessore epidermico basale-granuloso, è stato osservato un aumento nelle biopsie di 10 delle 15 pazienti trattate, cioè nel 67% dei casi.

L'incremento medio rilevato è stato del 31%; in 5 pazienti invece, sono stati riscontrati valori più elevati sulle sezioni del lato non trattato.

F) Lo spessore epidermico totale (strato basale-corneo) è risultato più elevato nei preparati istologici di 11 pazienti trattate con LPG®, cioè nel 73% dei casi osservati.

L'incremento si è verificato a carico degli stessi pazienti in cui avevamo riscontrato un aumento dello spessore basale-granuloso, eccetto 1 caso.

In questo caso infatti, lo spessore basale-granuloso è maggiore nelle sezioni del lato non trattato mentre lo spessore basale-corneo è aumentato in quelle del lato trattato.

L'incremento medio rilevato è stato, per questo parametro, del 26%.

Nei preparati del lato non trattato di 4 pazienti invece, lo spessore basale-corneo è risultato aumentato.

G) L'ultimo parametro valutato è stata la lunghezza della giunzione dermo-epidermica, risultata aumentata nelle sezioni del lato trattato di 10 pazienti, cioè nel 67% dei casi osservati.

Anche per la giunzione dermo-epidermica, l'aumento è stato rilevato a carico degli stessi pazienti in cui era incrementato lo spessore epidermico basale-granuloso.

L'incremento medio rilevato è stato del 24,8%.

Nei preparati del lato non trattato di 5 pazienti la lunghezza della GDE è risultata maggiore della controparte trattata.

L'analisi statistica ha fornito risultati significativi per tutte le variabili esaminate. Infatti, tranne che per la variabile "area interstizio", i valori medi del lato trattato sono sempre maggiori di quello non trattato. Inoltre, con eccezione della variabile "lunghezza della giunzione dermoepidermica (GDE)", esiste una differenza

statisticamente significativa fra le medie del lato trattato e di quelle del lato non trattato, con i più alti valori di significatività che si osservano per le variabili "numero nuclei fibroblasti" ($p = 0.004$), "area vasi sanguigni" ($p = 0.009$), e "area interstizio" ($p = 0.02$).

Discussione

Come sappiamo, la cute sottoposta all'azione di forze meccaniche va incontro a modificazioni strutturali a carico dei diversi componenti del compartimento sia epidermico che dermico.

A livello epidermico, lo stiramento meccanico determina incremento della sintesi di DNA e proliferazione dei cheratinociti (2).

A livello dermico, è stato dimostrato che le forze meccaniche determinano un incremento della proliferazione dei fibroblasti tramite un aumento della sintesi di DNA, mentre si è visto che cessando l'applicazione dello stress meccanico, i fibroblasti entrano in fase G₀/G₁ e la sintesi di DNA diminuisce fino ad arrestarsi. Lo stress meccanico è in grado di determinare anche modificazioni del fenotipo dei fibroblasti, che si trasforma da "normale" a "secerne".

Il rilascio dei fattori di crescita indotti dalle forze meccaniche, comporta un incremento significativo della matrice extracellulare ed in particolare modo del collagene di tipo I ($\alpha 1$ e $\alpha 2$), collagene di tipo III ($\alpha 1$), collagene di tipo IV ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$), collagene di tipo XII, fibronectina, β -actina e Tenascina-C (3).

La stimolazione meccanica è inoltre in grado di indurre modificazioni delle strutture vasali cutanee tramite l'induzione di specifici fattori di crescita.

Ad esempio è stato rilevato un incremento del TGF- β col successivo aumento del VEGF che determina proliferazione delle cellule dell'endotelio vasale. In particolare il VEGF-C indotto dallo stress meccanico, si complessa con il proprio recettore (VEGFR-3) e determina la proliferazione dell'endotelio dei vasi linfatici (8).

A nostra conoscenza, non esistono a tutt'oggi in letteratura lavori pubblicati circa le modificazioni indotte *in vivo* dall'applicazione di forze meccaniche sulla cute.



Il nostro studio dimostra inequivocabilmente come tale sollecitazione sia in grado di provocare modificazioni morfologiche e probabilmente anche funzionali, responsabili di un'azione desmoplastica e di un migliorato trofismo della cute stessa.

Tutto ciò è dimostrato, in primo luogo dal maggior numero di strutture vasali, evidente soprattutto a livello del plesso vascolare superficiale in cui i vasi appaiono ectasici ed aumentati di numero. L'aumento dei vasi è stato osservato nel 93% (14 casi su 15) delle biopsie di cute sollecitata meccanicamente e l'incremento percentuale medio rilevato è stato del 116,7%. Ciò significa che l'area dei vasi è più che raddoppiata in seguito all'applicazione di stress meccanico sulla cute.

Altro risultato di rilievo, è l'aumento del numero dei fibroblasti e dell'area dei nuclei di tali cellule. Abbiamo rilevato un incremento di tali parametri nell'87% (13 casi su 15) delle biopsie di cute meccanicamente stressata rispetto a quella non sollecitata. L'incremento percentuale medio è stato per il numero dei nuclei di fibroblasti del 37,5% e per l'area dei nuclei del 54,6%.

Questi parametri indicano chiaramente che lo stress meccanico è in grado di stimolare la crescita e la funzione dei fibroblasti dermici, che aumentano di numero e presentano una superficie nucleare notevolmente incrementata: ciò rappresenta probabilmente il presupposto morfologico affinché i fibroblasti acquistino quel fenotipo "secernente" che è stato dimostrato in vitro essere conseguenza della stimolazione meccanica.

La maggiore proliferazione dei fibroblasti e l'aumentata vascolarizzazione del derma, portano ad una attività desmoplastica e ad un migliorato trofismo dermico, che contribuiscono a loro volta al miglioramento della condizione dell'epitelio. Teoricamente la condizione dell'epidermide potrebbe essere influenzata dalla proliferazione dei cheratinociti, che sono stimolati dalle forze meccaniche che la Tecnica LPG, esercita sulla GDE. Abbiamo rilevato una maggiore superficie dell'epidermide, che nella valutazione dello spessore dallo strato basale al granuloso risulta aumentata nel 67% (10 pazienti su 15) delle sezioni di cute sottoposta a

forze meccaniche rispetto alla controparte non sollecitata (incremento percentuale medio del 31%), ed un aumento della lunghezza della GDE, incrementata anch'essa nel 67% dei preparati di cute trattata (10 su 15 con un incremento percentuale medio del 24,8%).

Per ciò che riguarda lo spessore epidermico dallo strato basale allo strato corneo, abbiamo osservato un incremento di tale parametro nel 73% (11 casi su 15 con un incremento percentuale medio del 26%) delle sezioni di cute sollecitata meccanicamente rispetto alla cute non stimolata.

La diminuzione dello spazio interstiziale, presente nel nostro studio nell'80% (12 casi su 15) delle biopsie di cute sottoposta a stress meccanico, dovrebbe rappresentare la conseguenza dell'azione drenante esercitata dai rulli utilizzati nella Tecnica LPG®, che ci hanno permesso di applicare le forze meccaniche sulla cute.

Possiamo a questo punto soltanto ipotizzare quali potrebbero essere le sostanze che, liberate in seguito all'azione delle forze meccaniche, siano in grado di provocare un aumento del numero dei cheratinociti, dei fibroblasti, delle strutture vasali ed un miglioramento delle condizioni dell'epidermide. Probabilmente fattori di crescita e la ricca rete di citochine, la cui presenza nella cute è stata dimostrata in numerosi studi condotti in vitro, controllano l'attività di tutte le cellule della cute stessa.

Quindi i cheratinociti, i fibroblasti, le cellule endoteliali ed altre cellule della cute liberano, per azione dello stress meccanico, fattori di crescita o citochine che condizionano a loro volta tutte le modificazioni morfologiche e strutturali della cute. Essi sono in grado di agire stimolando i recettori dei diversi tipi di cellule presenti nel compartimento cutaneo. Come conseguenza si ha una aumentata attività cinetica e funzionale di tali elementi cellulari, responsabile di tutte le modificazioni che abbiamo osservato nel nostro studio.

Conclusioni

Le modificazioni morfologiche osservate in questo studio, sono da interpretare come con-

sequenza di un processo di attivazione dei fibroblasti che proliferano ed acquisiscono fenotipo secernente in seguito all' applicazione di forze meccaniche. Anche la vascolarizzazione risulta migliorata nella maggior parte dei casi esaminati. Tutto ciò porta ad un rimodellamento e ad un migliorato trofismo del derma e dell'epidermide con conseguente migliore funzione di tutti i distretti anatomici cutanei e sottocutanei. Le forze meccaniche inoltre, inducono aumento della proliferazione dei cheratinociti in due modi: o agiscono direttamente sui cheratinociti stessi, oppure l'azione è a carico dei fibroblasti e di altre cellule del compartimento dermico, con liberazione di citochine e di fattori di crescita e conseguente proliferazione cheratinocitaria. Per tali motivi, sarebbe interessante valutare l'attività dello stress meccanico in alcune patologie dermatologiche nelle quali sia richiesto un processo plastico e trofico dei tessuti, soprattutto nei casi in cui risulti alterata la funzione del fibroblasto e del tessuto connettivo. Un tale utilizzo deve essere preceduto da adeguate sperimentazioni cliniche per verificare la correttezza del presupposto scientifico evidenziato in questo lavoro e per illustrare l'effetto in vivo dello stress meccanico sulle strutture biologiche cutanee in corso di patologie.

Bibliografia

1. Gruden G., Thomas S., Burt D., Zhou W., Chusney G., Gnudi L., Viberti G.: *Interaction of angiotensin II and mechanical stretch on vascular endothelial growth factor production by human mesangial cells*. J. Am. Soc. Nephrol. 1999; 10 : 730-737.
2. Kippenberger S., Bernd A., Loitsch S., Guscel M., Müller J., Bereiter-Hahn J., Kaufmann R.: *Signaling of mechanical stress in human keratinocytes via MAP kinases*. J. Inv. Dermatol. 2001 March; 114 (3): 408-12.
3. Kessler D., Dethlefsen S., Haase I., Plomann M., Hirche F., Krieg T., Eckes B.: *Fibroblasts in mechanically stressed collagen lattices assume a "synthetic" phenotype*. J. Biol. Chem. 2001 September; 276 (39): 36575-85.
4. Watson J., Fofor P.B., Cutcliffe B., Sayah D., Shaw W.: *Physiological effects of Endermologie: A Preliminary Report*. Aesthetic Surgery Journal 1999, 19 (1); 27-33.
5. La Trenta G.: *Endermologie versus Liposuction with External Ultrasound Assist*. Aesthetic Surgery Journal 1999; 19 (6): 452-58.
6. Leduc A., Leduc O.: *Technique LPG et traitement de l'œdème. Drainage de la grosse jambe*. Lymphokinetics 2001; 83-87.
7. Adcock D., Paulsen S., Jabour K., Davis S., Nanney L.B., Bruce Shack R.: *Analysis of the Effects of Deep Mechanical Massage in the Porcine Model*. Plast. Reconstr. Surg. 2001 Jul.; 108 (1): 233-40.
8. Eckes B., Dogic D., Colucci-Guyon E., Wang N., Maniotis A., Ingber D., Merckling A., Langa F., Aumailley M., Delouvee A., Koteliensky V., Babinet C. Krieg T.: J. Cell. Sci. 1998; 111: 1897-1907.