

Additive Manufacturing e Medicina Rigenerativa per la Ricostruzione Mammaria Post-Mastectomia per Cancro della Mammella

1. Introduzione

La Ricostruzione Mammaria dopo Mastectomia per Cancro della Mammella - Attuali Evidenze e Limiti

Un numero crescente di donne riceve ogni anno una diagnosi di cancro della mammella. Il rischio stimato di ammalarsi di cancro della mammella per una donna nella società occidentale è di 1 su 8 (1).

Grazie alla diffusione crescente dei programmi di screening mammografico, il numero di pazienti con diagnosi di cancro della mammella in fase iniziale è in crescita nei paesi occidentali. Inoltre, grazie alla diffusione della cosiddetta “chirurgia oncoplastica” della mammella, un crescente numero di pazienti ha la possibilità di ricevere una chirurgia conservativa curativa preservando una forma della mammella soddisfacente.

Nonostante questo, numerose pazienti affette da cancro della mammella in fase iniziale saranno sottoposte a mastectomia a causa della sfavorevole localizzazione della neoplasia o per scelta da parte della paziente stessa (2).

Negli ultimi 15 anni, le cosiddette “mastectomie conservative” (mastectomie con risparmio della cute o del complesso areola-capezzolo, insieme alla mastectomia con riduzione cutanea per mammelle di grandi dimensioni) (3,4) hanno visto una diffusione crescente fino a diventare l’attuale gold standard per il trattamento del

cancro della mammella in fase iniziale (5). La preservazione dell' "involucro" mammario, nella sua totalità o in parte, ha permesso ai chirurghi di ridurre l'impatto psicologico della mastectomia.

Le pazienti oggi sottoposte a mastectomia hanno poi a disposizione numerose opzioni ricostruttive, che permettono di ottenere buoni livelli di soddisfazione da parte delle pazienti ed offrono una buona qualità della vita post-operatoria, aiutando a ristabilire la fiducia da parte della paziente nella propria immagine corporea.

L'obiettivo della chirurgia ricostruttiva della mammella è quello di ottenere una mammella con una forma, un volume ed una superficie esteticamente gradevole.

Le tecniche ricostruttive attualmente disponibili non possono ristabilire la fisiologica funzione della ghiandola mammaria, ma possono restituire quell'immagine corporea che è persa dopo una mastectomia e questo aspetto è di fondamentale importanza nel ridonare alla paziente la stima in se stessa.

Le tecniche ricostruttive post-mastectomia utilizzate oggi possono essere suddivise in quelle che fanno uso di materiali alloplastici (impianti mammari) e quelle che utilizzano tessuti autologhi (i tessuti della paziente stessa). Esistono anche tecniche che combinano questi due approcci di base.

Gli impianti mammari possono essere sia in silicone che riempiti di soluzione salina e sono disponibili in diverse forme e dimensioni per poter far fronte a qualunque esigenza ricostruttiva (6). Gli impianti mammari necessitano di un'adeguata copertura in termini di tessuti superficiali, dunque, allo stato attuale, la maggior parte delle ricostruzioni viene eseguita in sede sotto-muscolare, con l'allestimento di una tasca per l'impianto al di sotto del muscolo grande pettorale. Nella maggior parte dei casi, la tasca viene espansa utilizzando un espansore tissutale temporaneo che viene in un secondo momento sostituito con un impianto definitivo a volume fisso.

Le tecniche di ricostruzione con tessuto autologo includono l'uso di lembi liberi e pedunculati. I principali vantaggi dei lembi autologhi sono rappresentati dalla consistenza e dell'aspetto degli stessi che risultano sovrapponibili a quelli dei tessuti asportati. I lembi resistono inoltre alla radioterapia meglio degli impianti mammari.

Nonostante ciò, bisogna considerare che le tecniche di ricostruzione autologa sono complesse e richiedono tempi operatori maggiori, con la possibilità di morbidità del sito donatore e recuperi post-operatori più lunghi.

La ricostruzione mammaria con impianti rimane la tecnica più diffusa, ma anche questa opzione ricostruttiva può essere associata ad alcune complicanze, la più frequente delle quali è la contrattura capsulare (7).

Dopo il posizionamento di un impianto mammario, l'organismo reagisce ad esso in quanto corpo estraneo, esitando nella formazione di un sottile strato di tessuto fibroso intorno alla protesi, conosciuto come "capsula". In alcuni pazienti la capsula può aumentare di spessore e contrarsi, causando diversi gradi di contrattura capsulare. L'incidenza di questa complicanza è notevolmente aumentata in pazienti sottoposte a radioterapia post-mastectomia. In queste pazienti è spesso più appropriato evitare una ricostruzione con impianti e preferire una ricostruzione con lembi di tessuto autologo. Inoltre gli impianti al silicone possono andare incontro a rottura con conseguente possibile migrazione del silicone al di fuori della capsula peri-protetica, con formazione di granulomi da silicone, i cosiddetti "siliconomi", anche a livello linfonodale (linfonodi del cavo ascellare, della catena mammaria interna, sopraclavari e laterocervicali) ed a carico di organi a distanza, come polmone, pleura e fegato (8).

La ricostruzione mammaria con impianti al silicone può determinare poi un risultato estetico poco stabile nel tempo, con un significativo peggioramento dell'esito ricostruttivo nel corso degli anni (9).

Tutte queste possibili complicanze impongono un re-intervento con rimozione della protesi e della capsula peri-protetica con la possibilità o meno di re-impianto protesico.

Con lo scopo di ridurre le complicanze correlate agli impianti e migliorare la qualità della vita ed i livelli di soddisfazione delle donne sottoposte a mastectomia per cancro della mammella, proponiamo una nuova strategia ricostruttiva con l'utilizzo di

scaffold “customizzati” prodotti con tecniche di stampa 3D e l’ausilio di tecniche di medicina rigenerativa con trapianto autologo di tessuto adiposo.

Una nuova opzione ricostruttiva: “Engineered Breast Reconstruction”

Gli impianti mammari utilizzati attualmente in chirurgia ricostruttiva sono caratterizzati da un involucro in materiale elastomerico (polidimetilsilossano, PDMS) ed un “core” in gel di PDMS con un minor livello di cross-linking.

I complessi comportamenti visco-elastici e la deformazione non lineare dei tessuti asportati possono essere riprodotti per mettere a punto impianti mammari avanzati con l’integrazione di differenti tecnologie e grazie alla conoscenza delle proprietà strutturali e delle interazioni tra materiali (Figura 1).

Due diversi approcci possono essere adottati per la ricostruzione mammaria.

Entrambi possono beneficiare dell’appropriata selezione di materiali compositi e polimerici, che sono largamente utilizzati in ingegneria tissutale e protesica (10) e dell’utilizzo di metodi di produzione avanzati (tecniche di “additive manufacturing”).

Negli ultimi anni l’interesse dei ricercatori è stato diretto allo sviluppo di impianti multifunzionali nelle forme di gel/hydrogel, reti di polimeri “semi-interpenetrating” (11-15) e scaffold 3D (16-19).

Una prima strategia potrebbe considerare la messa a punto di protesi “cucite su misura” utilizzando polimeri biostabili (non degradabili).

L’impianto mammario andrebbe a riprodurre l’esatta forma e dimensione del tessuto asportato così come le caratteristiche meccaniche dei tessuti “nativi”.

In relazione alle necessità, numerosi materiali “rubber-like” o “gel-like” possono essere selezionati e si potrebbe valutare la possibilità di sviluppare impianti a più strati e/o involucro/core, combinando tecniche di additive manufacturing con metodi convenzionali.

Una seconda strategia potrebbe considerare lo sviluppo di scaffold porosi tridimensionali, cuciti su misura e multifunzionali utilizzando polimeri biodegradabili sintetici e/o naturali.

In questo caso, tali scaffold tridimensionali saranno disegnati in modo da possedere caratteristiche strutturali, proprietà meccaniche e di trasporto di massa adatte alla specifica applicazione.

A questo scopo potranno essere utilizzati poliesteri alifatici come il poli (epsilon-caprolattone) (PCL) insieme ad altri polimeri sintetici biodegradabili usati comunemente per applicazioni di ingegneria tissutale (20).

Il nuovo cono mammario potrà essere ricostruito utilizzando tecniche di “reverse engineering” e “additive manufacturing” combinati con il trapianto autologo di tessuto adiposo.

Gli scaffold tridimensionali saranno posizionati in sede sottocutanea a livello della sede della mastectomia conservativa. Lo scaffold tridimensionale sarà poi colonizzato con tessuto adiposo autologo in alcune sessioni (21). La struttura cucita su misura aiuterà a mantenere la forma della mammella ed il tessuto adiposo trapiantato (con l'utilizzo di adeguate tecniche di enhancement per migliorarne la sopravvivenza) fornirà la consistenza naturale della stessa.

Questa strategia combina ed integra i principi della medicina rigenerativa con quelli del “reverse engineering” (cattura dell'immagine in 3D, 3D modeling e rapid prototyping) per disegnare strutture tridimensionali cucite su misura con proprietà personalizzate e geometrie tridimensionali complesse.

Utilizzando sistemi di “Computer Aided Design” (CAD), modelli tridimensionali delle mammelle da ricostruire saranno generati a partire da immagini di Tomografia Computerizzata (TC) o Risonanza Magnetica. Questi dati saranno poi elaborati attraverso software dedicati come Mimics, Rapidform e Rhinoceros per definire il modello 3D.

Lo scaffold potrà essere poi prodotto tramite un Bioplotter o 3D-printer con metodi di iniezione/estrazione. Nello specifico potrà essere costruito strato su strato con un

pattern lay-down, riproducendo le proprietà strutturali/funzionali del tessuto naturale. La deposizione di fibre 3D può essere considerata una tecnica modificata di 3D plotting per l'estrusione di polimeri altamente viscosi e rappresenta una tecnica di deposizione fusa tramite la quale un polimero fuso è iniettato/estruso tramite una siringa e quindi depositato (Figura 2).

Questo metodo permette la produzione di scaffold con una rete di pori completamente interconnessi e con specifiche caratteristiche per quanto riguarda la forma e la dimensione dei pori.

Rispetto alle tecniche convenzionali, il maggior controllo dell'architettura permette di massimizzare le proprietà di trasporto di massa.

Grazie all'utilizzo di tecniche CAD/CAM, gli scaffold possederanno strutture ed architetture definite e saranno costruiti in forme "customizzate".

Queste strutture rappresenteranno la base della nostra innovativa tecnica ricostruttiva. Le caratteristiche funzionali e le proprietà meccaniche e di trasporto di massa degli scaffold customizzati saranno "cucite su misura" variando la porosità ad il pattern "lay-down" (Figura 3).

Gli scaffold tridimensionali potranno anche essere combinati con materiali gel-like per mettere a punto strutture complesse in grado di guidare il processo rigenerativo. Le strutture tridimensionali riprodurranno le proprietà dei tessuti e le complesse caratteristiche anatomiche degli stessi, utilizzando materiali con elevate performance sviluppati sulla base dei concetti di guida cellulare (22,23).

Gli scaffold saranno poi colonizzati con tessuto adiposo autologo in alcune sessioni di lipofilling.

Questo approccio eviterà le difficoltà ed i rischi correlati sia con le complesse ricostruzioni con tessuti autologhi che con le ricostruzioni con impianti, con la possibilità di ottenere un cono mammario dalla consistenza naturale e con risultati estetici duraturi, potenzialmente rappresentando il futuro della ricostruzione mammaria.

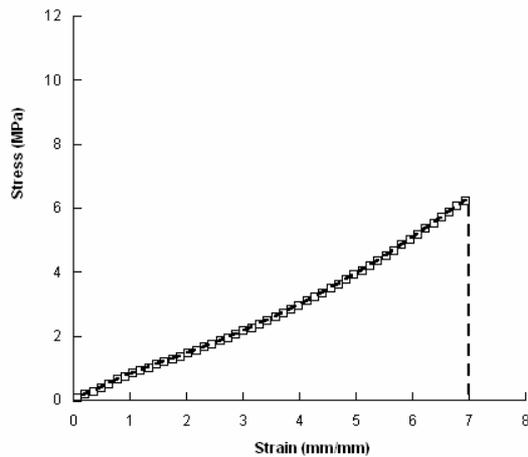


Figura 1. Tipica curva sforzo-deformazione per campioni di envelope protesico di impianti mammari al silicone.

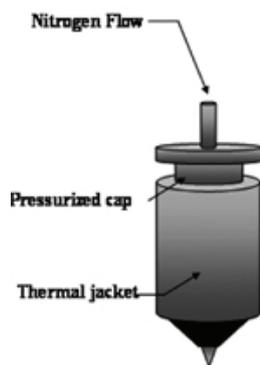


Figura 2. Rappresentazione schematica di cartuccia ed ago come elementi chiave della tecnica di deposizione del materiale in 3D.

Questa opzione ricostruttiva potrà anche essere offerta alle pazienti che saranno sottoposte a radioterapia post-mastectomia, dal momento che i materiali utilizzati non saranno influenzati dall'irradiazione.

Le tecniche di Additive Manufacturing

Grazie alle tecniche di Additive Manufacturing, possono essere realizzati oggetti a partire da data sets di modelli tridimensionali, mettendo insieme il materiale scelto “strato dopo strato”, al contrario della metodologia sottrattiva con cui lavorano i tradizionali metodi costruttivi (23).

Per quel che riguarda tessuti ed organi, la metodologia di tipo “additivo” assicura il minimo spreco di quei materiali rari e costosi rappresentati dalle cellule, i fattori di crescita ed i biomateriali.

L'utilizzo di dati provenienti da modelli 3D permette la produzione di tessuti personalizzati, la *condicio sine qua non* per una medicina orientata al singolo paziente.

Inoltre le tecniche di “additive manufacturing” permettono un elevato livello di controllo dell'architettura del costruito, garantiscono la riproducibilità e permettono la standardizzazione del processo.

Il primo passo per produrre un oggetto 3D tramite “additive manufacturing” è la generazione del corrispondente modello digitale con l'aiuto di 3D CAD software o tramite scanner 3D (24).

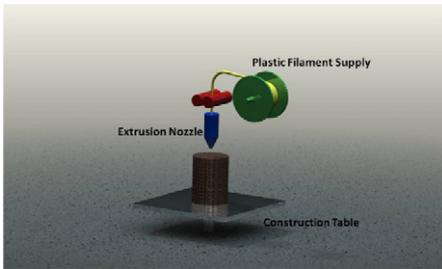
Esiste una vasta gamma di metodi per acquisire dati provenienti da componenti umane o animali, come la tomografia computerizzata e la risonanza magnetica.

Il modello CAD viene poi “tassellato” come file STL, che rappresenta attualmente lo standard per i modelli da riprodurre in 3D. Prima di procedere alla “produzione”, il

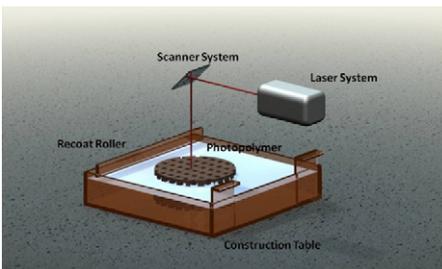
modello STL è “affettato” matematicamente in strati sottili, che sono “assemblati” in un oggetto tridimensionale dallo strumento di “additive manufacturing”.

Numerose tecniche di additive manufacturing sono disponibili in commercio per disegnare e produrre scaffold per applicazioni di ingegneria tissutale (Figura 3).

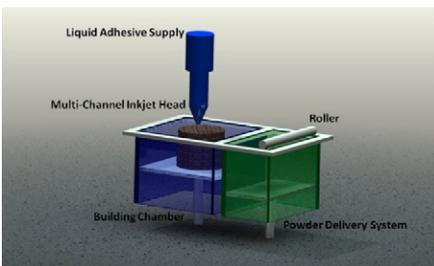
Le diverse tecnologie di additive manufacturing permettono la produzione di componenti 3D a partire dalla manipolazione spaziale dei materiali in numerosi modi: termico, chimico, meccanico e/o ottico. Nei processi termici, il materiale è trasformato in oggetto dopo essere andato incontro ad una transizione termica che ne fissa la forma. Nei processi di tipo chimico, la forma dell’oggetto è fissata da una reazione chimica (spesso polimerizzazione). I processi meccanici si basano sulla deposizione fisica delle cellule o dei materiali mentre nei processi ottici, le cellule o i polimeri sono manipolati utilizzando la luce. Spesso diversi metodi di processazione sono combinati in un’ unica tecnica di additive manufacturing. In generale, le tecniche che utilizzano sistemi ottici possono raggiungere le risoluzioni più elevate. Esempi di metodi di produzione ottica accurata sono la stereolitografia, la scrittura laser diretta e il bio laser printing. Inoltre, la polimerizzazione avviata con processo ottico può essere utilizzata per l’incapsulamento di cellule e fattori di crescita esogeni all’interno di hydrogel. Le tecniche termiche come il “selective laser sintering” o il “fused deposition modeling” non sono compatibili con le cellule se richiedono temperature al di sopra di quelle fisiologiche, ma possono essere adattate per processare hydrogel termosensibili. I processi meccanici spesso permettono di includere le cellule nel processo di fabbricazione, finché le forze tangenziali a cui sono sottoposte le cellule come la deposizione tramite un ago o l’orifizio di una cartuccia ad inchiostro rimangono sufficientemente basse. La stereolitografia è la metodica più datata, più sviluppata e più accurata di tutte le tecnologie di additive manufacturing ed è stata utilizzata in numerose applicazioni biomediche (25). Sebbene sia una delle poche tecniche con accuratezza comparabile alla dimensione di una cellula, il suo utilizzo non si è diffuso perché, ad oggi, non è stato sviluppato un metodo per utilizzare diverse composizioni di materiali o cellule.



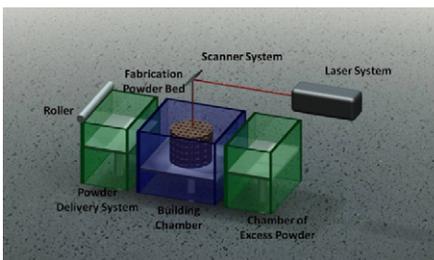
a. Melt extrusion/Fused Deposition Modeling (FDM)



b. Stereolitografia (SLA)



c. Stampa a getto d'inchiostro



d. Selective Laser Sintering (SLS)

Figura 3. Tecniche di Additive Manufacturing utilizzate per la produzione di scaffold per ingegneria tissutale (Adattata da: Melchels FPW, Domingos MAN, Klein TJ, Malda J, Bartolo PJ, Hutmacher DW. Additive manufacturing of tissues and organs. Progress in Polymer Science 2012; 37: 1079-1104).

Le prime esperienze con la produzione di tessuti sono state fatte con stampa a getto d'inchiostro o laser. In ogni caso, negli ultimi anni, l'attenzione è stata focalizzata soprattutto sulla fornitura robotica di hydrogel con cellule incapsulate. Con queste tecniche, sospensioni altamente viscosi di cellule o precursori liquidi di gel sono estrusi a partire da cartucce o siringhe attraverso un ugello e depositate in strati. Il metodo è versatile in termini di materiali potenzialmente utilizzabili, nel controllo delle condizioni ambientali e nelle varietà di meccanismi di rilascio del materiale (pneumatico, pompe siringhe, extruder screws).

Additive Manufacturing: 3D Fiber Deposition

Numerosi sono i metodi di fabbricazione, sia convenzionali che non convenzionali, sviluppati per elaborare il policaprolattone in scaffold polimerici 3D con elevata porosità e superficie, con differenti geometrie ed adeguate proprietà meccaniche. Per il nostro progetto abbiamo utilizzato la tecnica di Additive Manufacturing "Three-dimensional Fiber Deposition" con l'ausilio di un Bioplotter. Tale tecnica è monitorata dal computer attraverso i software CAD/CAM e prevede l'estrusione di materiale termoplastico semifuso attraverso un ugello di estrusione. Gli scaffold sono realizzati layer-by-layer attraverso la deposizione di un polimero, mediante l'applicazione di pressione, con un ago molto sottile contenuto in una cartuccia su un supporto, in presenza di sola aria o in soluzione. In tal modo si ottiene una sequenza di fibre sovrapposte. Nel caso di deposizione in soluzione si ha il vantaggio di prevenire la deformazione degli strati già depositati ma non ancora solidificati adeguatamente. Un aspetto importante è che, strato per strato, è possibile cambiare, in funzione del pattern di deposizione "lay-down", l'orientazione delle fibre. Questo permette la variazione della forma e della dimensione dei pori, con conseguente variazione delle proprietà meccaniche e di trasporto di massa della struttura

realizzata. Per quanto riguarda la solidificazione, questa può essere indotta termicamente, da reazione chimica o da precipitazione. Inoltre, risulta necessario, al fine di ottenere strutture tridimensionali con ottime qualità, che gli strati siano ben legati gli uni agli altri e che il materiale estruso non si gonfi né si contragga troppo durante il processo. Il Bioplotter è un elemento essenziale del processo considerato, in quanto sistema di produzione di base per l'ingegneria tissutale. Esso prevede due meccanismi di deposizione, ma quello più adatto per la nostra analisi e su cui focalizzeremo la nostra attenzione è il sistema con vite per l'estrusione del singolo materiale. La conoscenza di una grande quantità di parametri, valutati sperimentalmente su diversi tipi di materiali, è essenziale per la creazione di scaffold 3D polimerici ottenuti attraverso la tecnica di 3D Fiber Deposition con Bioplotter. I parametri relativi al needle (ago estrusore attraverso cui avviene la deposizione) sono: materiale di costruzione, forma e dimensioni. Per ciò che concerne il materiale di costruzione dell'ago, la scelta dipende da varie considerazioni, essendo il needle sottoposto a stress termici e meccanici. Per temperature di processo superiori a 80°C sono usati, generalmente, aghi metallici. Inoltre, per evitare che il materiale estruso si attacchi all'ago, vengono usati aghi di teflon. Per quel che riguarda la forma dell'ago (aghi lunghi, corti e conici), la scelta dipende dalla viscosità del materiale: nel caso di materiali poco viscosi si utilizza un ago lungo al fine di evitare che il materiale sia depositato troppo velocemente rispetto alla durata del processo. Nel caso di materiali altamente viscosi si usano aghi corti o conici al fine di evitare che il materiale sia depositato troppo lentamente rispetto al tempo di processo. Un altro parametro da considerare è il materiale estruso. Tanto più è elevata la viscosità del materiale, più facile sarà il processo di realizzazione dello scaffold. Per aumentare la viscosità del materiale estruso si possono usare polimeri o piccoli granuli insolubili di dimensioni tali da non ostacolare il passaggio del fuso attraverso l'ago.

Un altro parametro di processo è il mezzo di base (aria o liquido) che viene scelto in relazione al materiale estruso. È fondamentale considerare e confrontare densità, polarità e viscosità del materiale e del mezzo. La viscosità è fondamentale perché, nel caso in cui materiale e mezzo abbiano viscosità simile, il mezzo potrebbe dissolvere il materiale o farlo rigonfiare. Un altro parametro di processo di fondamentale importanza rimane la velocità di deposizione correlata alla portata ed alla velocità di solidificazione del materiale estruso: maggiore è la velocità di solidificazione, maggiore dovrà essere la velocità di deposizione. Se, viceversa, la velocità di solidificazione è più bassa (tempo di solidificazione più lungo) risulta necessaria una bassa velocità di deposizione, in modo tale che il materiale riesca ad indurire adeguatamente prima della sovrapposizione di un nuovo strato. Velocità troppo elevate causano uno stiramento del materiale e un ritardo nel legame tra gli strati. Viceversa, velocità troppo basse possono causare il rigonfiamento del materiale estruso. Al fine di evitare il verificarsi di una di queste situazioni sfavorevoli è possibile agire sulla pressione: questa è modificabile durante il processo ed è usata per il “setting” del materiale e dipende dalla velocità di deposizione, che inevitabilmente influisce sul flusso del materiale. Nel caso di velocità di estrusione troppo elevate la pressione deve essere aumentata, viceversa, se la velocità è troppo bassa questa deve essere diminuita. Inoltre la velocità di deposizione incide sulla geometria dei pori, sulla porosità complessiva dello scaffold e sul diametro delle fibre. Lo spessore degli strati rappresenta un ulteriore parametro di progetto. Esso è connesso al modo in cui gli strati si legano. Se lo spessore degli strati è tale che gli stessi si tocchino, allora il “layer thickness” deve essere leggermente più piccolo del diametro della fibra. Se invece lo spessore è troppo piccolo si creeranno delle deformazioni nella zona di sovrapposizione delle fibre e la porosità diminuirà considerevolmente. Inoltre ciò accade anche nel caso in cui non ci sia una netta separazione fra gli strati. Per assicurare il contatto tra due strati successivi (condizione necessaria) la minima distanza fra le fibre deve essere pari all'incirca all'80% del loro diametro. Quindi, con “strand distance” si intende la

distanza (lungo l'asse x e lungo l'asse y) valutata "centro-centro" di due fibre parallele giacenti sullo stesso piano. Tale parametro influenza fortemente la porosità della struttura. Ciascuna struttura, inoltre, è caratterizzata da diverse sequenze di sovrapposizione delle fibre. Attraverso il monitoraggio mediante software e attraverso il bioplotter si può modificare l'orientamento delle fibre, assicurando il contatto tra gli strati al fine di garantire la stabilità della struttura. Per tale motivo il bioplotter non può essere adoperato nel caso in cui le fibre debbano essere disposte nella stessa maniera in ogni strato. Fissando opportunamente i diversi parametri di progetto, è possibile realizzare scaffold con architettura, porosità ed interconnettività controllate e con adeguate proprietà meccaniche. Dalle precedenti considerazioni si evince l'importanza dell'uso di tale tecnologia di processo al fine di realizzare strutture multifunzionali con determinate proprietà meccaniche e di superficie e con microstruttura organizzata e ripetibile (adatta alla diffusione di cellule e nutrienti) che assolvano alle esigenze dell'Ingegneria dei Tessuti.

Biomateriali

Negli ultimi anni, numerosi materiali biodegradabili sono stati utilizzati e sviluppati per la produzione di scaffold e matrici, inclusi polimeri (naturali e sintetici) (26,27), ceramiche (28) e compositi (29). I polimeri e le ceramiche utilizzati per l'additive manufacturing per mettere a punto scaffold sono stati tutti, tranne poche eccezioni, modificati o sintetizzati in maniera specifica per l'uso con una determinata tecnica di additive manufacturing, permettendo una produzione accurata e riproducibile di architetture ben definite con le caratteristiche fisico-chimiche previste.

In ogni caso, questi materiali richiedono parametri di processo (alta temperatura, solventi, mancanza di acqua) che non permettono la diretta inclusione di cellule. Proprio per questo, gli hydrogel stanno attirando crescente interesse per la produzione di tessuti (30).

Materiali per gli scaffold

Gli scaffold per l'ingegneria tissutale sono preparati principalmente con polimeri, ceramiche o dalla loro combinazione (compositi). Per ottenere una rete porosa interconnessa, molte tecniche sono state utilizzate incluse il "porogen leaching", il "gas foaming" e il "phase-separation/freeze-drying". Le tecniche di additive manufacturing sono caratterizzate da una elevata possibilità di controllo dell'architettura degli scaffold (31) e dalla possibilità di impiego di una notevole gamma di diversi materiali. La stereolitografia, il metodo più datato e più utilizzato, richiede un materiale "photo-curable". Questa tecnica è stata utilizzata per preparare scaffold in polipropilene fumarato (32) meta-acrilato poli-trimetilene-carbonato-co-caprolattone (33), polilattide (34), policaprolattone (35) e polietilenglicole (36,37), soprattutto in presenza di diluente che può essere reattivo o non reattivo. Compositi sono stati preparati unendo alle resine di stereolitografia piccole particelle di ceramica (38).

Il "selective laser sintering" è stato utilizzato per preparare scaffold porosi in policaprolattone con o senza l'aggiunta di particelle di calcio fosfato (39).

Nuove tecniche di additive manufacturing hanno permesso di mettere insieme la produzione di scaffold con la deposizione di cellule, combinando il supporto meccanico di uno scaffold con il posizionamento controllato ed automatizzato delle cellule.

Il Policaprolattone

Il policaprolattone (PCL) è uno dei biomateriali di nuova concezione maggiormente diffuso nel settore dell'Ingegneria dei Tessuti (Figura 4). Tra il 1970 e il 1980, periodo caratterizzato dal boom dei polimeri riassorbibili, il PCL fu ampiamente usato nel campo dei biomateriali e per la realizzazione di dispositivi per il rilascio di farmaci. Poco dopo, a causa dei suoi svantaggi (degradazione a lungo termine, percorsi di riassorbimento intracellulare), l'uso del PCL fu sostituito da quello di polimeri più rapidamente riassorbibili. Recentemente il PCL ha avuto una nuova rinascita grazie alle sue proprietà reologiche e visco-elastiche superiori rispetto a quelle degli omologhi poliesteri alifatici. Oggi trova largo impiego in vari settori delle biotecnologie quali l'*organ substitution*, nella realizzazione di suture riassorbibili, nel *drug delivery* per sistemi a rilascio controllato di farmaci e nella *tissue regeneration* per la realizzazione di sistemi sostitutivi del tessuto osseo naturale. Pertanto, per le sue particolari proprietà chimiche e fisiche e per la sua elevata biocompatibilità, il PCL risulta essere uno dei materiali maggiormente usati per le applicazioni biomediche. Il PCL è un poliesteri alifatico lineare altamente biocompatibile ottenuto dalla polimerizzazione ring-opening dell' ϵ -caprolattone in presenza di una vasta gamma di catalizzatori (e.g. ottoato stannoso) (Figura 5). La polimerizzazione del PCL è influenzata da meccanismi di varia natura: anionici, cationici, di coordinamento e con radicali liberi. Ogni metodo influisce sul peso molecolare risultante, sulla distribuzione del peso molecolare e sulla struttura chimica dei copolimeri. Il PCL è un polimero idrofobico e semicristallino. La sua cristallinità tende a diminuire con l'aumentare del peso molecolare. Ha una temperatura di transizione vetrosa (T_g) di circa -60°C (inferiore rispetto a quella di altri polimeri biorassorbibili usati in campo biomedicale) e un punto di fusione compreso tra 59°C e

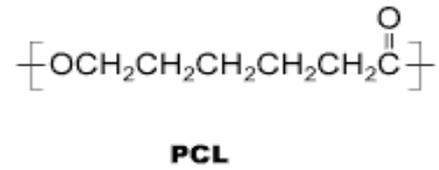


Figura 4. Formula di struttura del Policaprolattone.

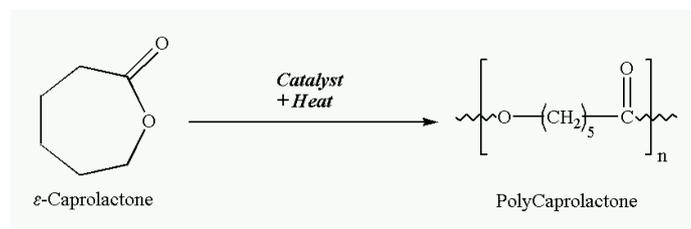


Figura 5. Reazione di polimerizzazione per ottenere il Policaprolattone.

64°C, dettato dalla sua natura cristallina che permette una facile conformabilità a temperature relativamente basse. Il PCL ha svariati vantaggi: cinetica di degradazione tollerabile, facilità di modellazione con la possibilità di creazione di pori di dimensioni favorevoli alla crescita tissutale ed al rilascio controllato di farmaci contenuti nella loro matrice, biocompatibilità, elevata stabilità termica, ottima processabilità. Inoltre, è anche possibile aggiungere al PCL gruppi funzionali al fine di rendere il polimero più idrofilo, adesivo e/o biocompatibile così da permettere risposte favorevoli delle cellule. Il PCL è un materiale con elevata biodegradabilità (capacità di degradazione in ambiente fisiologico) per la presenza di legami ester-alifatici idroliticamente instabili nella catena principale del polimero. Esso è, pertanto, uno dei principali polimeri idrofobi bioerodibili. Se si analizza l'andamento del peso molecolare ponderale del PCL in acqua distillata in funzione del tempo, si osserva la rottura di legami alifatici delle macromolecole con conseguente accorciamento della catena e, quindi, diminuzione del peso ponderale del polimero e, progressivamente, della sua massa. A causa dei lunghi tempi di degradazione (tra i 6 e i 36 mesi) dovuti al peso molecolare del mezzo in cui si trova, il PCL è analizzato al fine di realizzare scaffold capaci di sostenere sollecitazioni di diversa entità e di fungere da supporto per la diffusione e la proliferazione cellulare.

Le cellule staminali di derivazione adiposa per l'ingegneria tissutale e la medicina rigenerativa

Le cellule staminali di derivazione adiposa (Adipose-derived Stem Cells (ASCs)) rappresentano una risorsa di cellule staminali mesenchimali con proprietà auto-rigenerative e di differenziazione multipotente (40). Le ASCs possono differenziare in adipociti, osteoblasti, condrociti, miociti ed altri tipi cellulari (41-46). Le ASCs

offrono anche la possibilità di trattare numerose patologie, come la graft-versus-host disease, malattie autoimmuni, la sclerosi multipla, il diabete mellito e le fistole tracheo-mediastiniche (47-52). Confrontate con altri tipi di cellule staminali, le ASCs offrono due principali vantaggi: le ASCs sono facilmente accessibili tramite prelievo a partire dal tessuto adiposo sottocutaneo (53), inoltre le ASCs non presentano problematiche etiche comparate con le cellule staminali embrionali perchè possono essere prelevate da tessuto adiposo autologo (54). Queste due caratteristiche rendono le ASCs una risorsa ottimale in medicina rigenerativa (55,56).

Le ASCs tradizionalmente sono messe in coltura in convenzionali modelli bidimensionali, che appaiono però inappropriati per mimare le interazioni cellula-cellula e cellula-ambiente che avvengono in vivo (57,58). Gli scaffold tridimensionali prodotti con tecniche di ingegneria tissutale hanno la straordinaria capacità di riprodurre le condizioni cellulari in vivo (59,60). Gli scaffold 3D sono prodotti con metodiche di “biofabbricazione” combinando biomateriali, fattori di crescita e componenti della matrice extracellulare messi insieme per riprodurre microambienti tridimensionali per la proliferazione e la differenziazione cellulare, che regolano ulteriormente la crescita di tessuti ed organi (61). All’interno degli scaffold tridimensionali, la differenziazione secondo diverse linee cellulari delle ASCs può essere controllata da stimoli meccanici, chimici e di altra natura provenienti dal microambiente (62). Al di là del controllo della differenziazione, gli scaffold 3D possono anche migliorare la vitalità cellulare durante la proliferazione (63). I biomateriali utilizzati per la produzione degli scaffold tridimensionali devono essere ovviamente biocompatibili e non causare reazioni immunitarie a lungo termine (64); secondo, i biomateriali devono presentare strutture altamente porose con architettura interconnessa per imitare i tessuti nativi (65); terzo, i biomateriali dovrebbero presentare proprietà meccaniche modificabili per regolare il microambiente cellulare. Mantenere le proprietà biochimiche, biomeccaniche e biologiche durante la proliferazione è importante per far fronte all’impatto dell’ambiente esterno (64). Con lo sviluppo dei biomateriali e la “biofabbricazione”,

molte metodologie sono state impiegate per produrre scaffold 3D per colture cellulari, incluse il “bioprinting” (66), il “patterning” (67), l’auto-assemblaggio (66) e gli organi sul chip (organ-on-a-chip) (68).

La maggior parte di queste tecniche sono state utilizzate per incapsulare le ASCs all’interno degli scaffold con la struttura desiderata e che stimoli la differenziazione delle ASCs nel tipo cellulare desiderato per la specifica applicazione clinica.

Numerosi studi clinici hanno dimostrato l’utilità delle ASCs all’interno di scaffold 3D come potenziale alternativa per la guarigione delle ferite (69), graft cardiovascolari (70), il riparo di lesioni ortopediche (71) e la ricostruzione tissutale dopo chirurgia (72).

Il successo di queste applicazioni comprova il grande potenziale delle ASCs come terapia su base cellulare per la medicina rigenerativa.

Sebbene le ASCs utilizzate in applicazioni di ingegneria tissutale rappresentino un’ottima risorsa per la medicina rigenerativa, rimangono alcune problematiche da risolvere, come i meccanismi di interazione tra ASCs, le metodologie di coltura “serum-free” e la sicurezza a lungo termine. A tale scopo numerosi studi hanno valutato queste applicazioni i modelli di laboratorio ed animali ma solo pochi trial clinici sono stati condotti.

Rimane come nostro obiettivo quello di sperimentare la sicurezza del nostro approccio ricostruttivo in modelli animali per poi effettuare un trial randomizzato e controllato che confronti l’engineered breast reconstruction con le metodiche ricostruttive tradizionali dopo trattamento chirurgico per cancro della mammella.

Caratteristiche delle ASCs

Le cellule staminali possono essere divise in quattro categorie in base alla loro origine: embrionali (73), fetali (74), cellule staminali adulte e cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) (75) (Tabella 1).

Categoria	Origine	Vantaggi	Svantaggi
Cellule staminali umane embrionali (hESCs)	Blastocisti umane	Pluripotenti, non immunogeniche	Risorse insufficienti, problematiche religiose ed etiche
Cellule staminali umane fetali (hFSCs)	Tessuti fetali (sangue fetale da cordone ombelicale e liquido amniotico); appendici fetali (membrane fetali e placenta)	multipotenti, non immunogeniche, minori problematiche etiche e religiose	Risorse insufficienti
Cellule staminali adulte	Tessuti adulti, come midollo osseo, tessuto adiposo e cute	Multipotenti, minori problematiche etiche e religiose; risorse abbondanti; facilmente accessibili	Relativamente difficili da espandere in vitro; uso limitato nella pratica clinica
Cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs)	Cellule somatiche	Pluripotenti come le ESCs; assenza di problematiche etiche e religiose; risorse abbondanti	Difficoltà di induzione; risorse abbondanti

Tabella 1. Caratteristiche di differenti tipi di cellule staminali.

Le cellule staminali embrionali (ESCs) derivano dalla massa cellulare interna delle blastocisti (76) e sono largamente utilizzate in medicina rigenerativa per la loro elevata capacità di differenziazione. Le ESCs sono pluripotenti, possono essere differenziate in cellule adulte post-natali ed hanno un potenziale rigenerativo maggiore rispetto alle cellule staminali adulte. Ciononostante, le problematiche di tipo etico per la loro utilizzazione e le limitate quantità disponibili ne limitano l'uso clinico (76).

Le cellule staminali umane fetali, come le cellule staminali presenti nel liquido amniotico e nel cordone ombelicale sono multipotenti e presentano minori problematiche etiche rispetto alle ESCs (77). La ridotta disponibilità di questo tipo di cellule staminali hanno comunque ristretto le loro possibili applicazioni cliniche. Le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) scoperte da Takahashi e coll. nel 2007 (78) hanno rappresentato una straordinaria novità in medicina rigenerativa. Le iPSCs non presentano problematiche di tipo etico e sono disponibili in grandi quantità. Ciononostante, le cellule target sono difficili da indurre con le attuali metodologie e tecnologie. Dunque, grazie alla vasta disponibilità, la facile accessibilità e le relativamente poche problematiche di tipo etico, le cellule staminali adulte sono diventate una soluzione attraente e promettente per l'attuale ricerca e le applicazioni mediche in medicina rigenerativa.

Le ASCs rappresentano una risorsa di cellule staminali mesenchimali facilmente isolabile dal tessuto adiposo. Così come le altre cellule staminali, le ASCs possono auto-rinnovarsi e differenziare in altri tipi cellulari. Le ASCs sono state descritte per la prima volta da Zuk e coll. nel 2001 come una popolazione cellulare proveniente dal tessuto adiposo umano con la capacità di differenziazione multilineare (79). Questo studio ha aperto una nuova finestra per la medicina rigenerativa grazie all'utilizzo del tessuto adiposo.

Il tessuto adiposo deriva dal mesoderma nel periodo embrionale (80) ed è composto da adipociti ed una frazione stromale vascolare (SVF), rappresentata da numerosi gruppi cellulari, compresi pre-adipociti, fibroblasti, cellule muscolari lisce, cellule endoteliali, macrofagi, linfociti ed ASCs (81,82). La differenziazione delle ASCs sembrava limitata inizialmente solo ai tessuti di origine mesodermica. Recenti studi hanno esteso l'uso delle ASCs alla differenziazione in tessuti ed organi anche di origine ectodermica (56), con possibilità di adipogenesi, osteogenesi, condrogenesi ed altre linee cellulari (46).

Le cellule staminali provenienti dal midollo osseo (BMSCs) sono le cellule staminali adulte più comunemente utilizzate. Ciononostante, le ASCs presentano numerosi vantaggi rispetto alle BMSCs. Innanzitutto la procedura per il prelievo delle BMSCs è dolorosa ed il tasso di cellule staminali prelevate è relativamente basso (46), mentre le ASCs presentano fonti abbondanti nel tessuto sottocutaneo in tutto il corpo. Inoltre il prelievo delle ASCs risulta molto meno indaginoso e doloroso grazie a metodiche di lipoaspirazione a bassa pressione e la percentuale di cellule staminali ottenute è relativamente maggiore rispetto alle altre fonti di cellule staminali (83). Inoltre le ASCs possono essere trapiantate in maniera autologa o allogenica in maniera sicura e con ottima tollerabilità (64). Grazie a queste caratteristiche, le ASCs sono diventate la fonte di cellule staminali più "attraente" per l'ingegneria tissutale e la medicina rigenerativa.

La Medicina Rigenerativa ed il Trapianto Autologo di tessuto Adiposo

Il trapianto autologo di tessuto adiposo è stato descritto per la prima volta dal chirurgo tedesco Neuber (84) ed è oggi largamente utilizzato a fini ricostruttivi ed estetici in chirurgia della mammella. Il lipofilling, o trapianto autologo di cellule di tessuto adiposo, rappresenta una delle possibili tecniche chirurgiche per la

correzione di difetti volumetrici di diversi distretti corporei, sia congeniti (sindromi malformative) che acquisiti (ricostruzione post-chirurgia oncologica). Il tessuto adiposo umano rappresenta infatti una risorsa facilmente accessibile di cellule staminali mesenchimali, utilissime per la ricostruzione post-oncologica, in particolare dopo chirurgia per cancro della mammella. Grande dibattito esiste oggi circa la sicurezza oncologica di tale procedura nell'applicazione in pazienti sottoposti a precedente chirurgia per cancro della mammella (85). Molti studi hanno negli ultimi anni posto in dubbio la 'safety' oncologica del lipofilling, valutando la possibilità che gli adipociti e le adipose-derived stem cells (ASCs) ed i loro prodotti (fattori di crescita come il transforming growth factor (TGF), il platelet-derived growth factor (PDGF), il fibroblast growth factor (FGF), l'hepatocyte growth factor (HGF) e vari membri della famiglia dei fattori di crescita epiteliali (EGF)) siano coinvolti nel ciclo delle cellule tumorali attraverso secrezioni autocrine, paracrine, esocrine ed endocrine (86,87). Tali molecole, rilasciate a livello del sito di rimozione di un tumore, potrebbero giocare un ruolo nella progressione tumorale, nella recidiva tumorale e nella metastatizzazione. Infatti, insieme con gli adipociti, il tessuto adiposo contiene un complesso di cellule vascolari e stromali, che potrebbe contribuire a creare un microambiente con un potenziale di crescita tumorale (88-91). Al contrario, alcuni fattori potrebbero comportarsi da inibitori di alcuni stadi del ciclo cellulare della cellula cancerosa. Rimane dunque l'importante quesito clinico circa la sicurezza oncologica del lipofilling dopo trattamento chirurgico per cancro della mammella, soprattutto dopo chirurgia conservativa (92-97). La 'tumor-stromal interaction' o azione paracrina del tessuto adiposo iniettato potrebbe modificare i tassi di recidiva loco-regionale. Ad oggi non esiste alcuno studio circa gli effetti del 'lipofilling' su cellule umane di cancro della mammella 'in vivo'. Non esiste consenso a livello internazionale circa l'utilizzo del lipofilling dopo trattamento chirurgico per cancro della mammella. Nel 2007 la Società Francese di Chirurgia Plastica, Ricostruttiva ed Estetica (98) ha affrontato il problema della sicurezza oncologica del lipofilling nelle pazienti con tumore della mammella, inviando ai chirurghi plastici

francesi la raccomandazione di evitare il lipofilling alla mammella con o senza tumore al di fuori di trial clinici. Nel 2009 l'American Society of Plastic Surgeons Fat Graft Task Force ha concluso che nessuno studio affidabile può confermare in maniera definitiva la sicurezza oncologica del lipofilling nelle pazienti con cancro della mammella (99). La Società Italiana di Chirurgia Plastica nel 2010 ha suggerito di praticare il lipofilling con attenzione e dopo la discussione di un preciso consenso informato, ma non ha imposto restrizioni circa le indicazioni al lipofilling (100-105). Numerosi studi hanno affrontato il problema dell'oncological safety del lipofilling: Illouz e Sterodimas concludono che le recidive loco-regionali nei pazienti con cancro della mammella non appaiono aumentate dopo lipofilling, ma bisogna considerare i limiti dello studio (studio retrospettivo, senza informazioni circa il follow-up oncologico delle pazienti e assenza di informazioni circa lo stadio tumorale) (105). Petit e colleghi presentano i risultati preliminari del follow-up oncologico di 513 pazienti sottoposte a lipofilling dopo chirurgia conservativa o radicale per cancro della mammella, mostrando un lieve aumento della percentuale di recidive loco-regionali dopo lipofilling nelle pazienti sottoposte a chirurgia conservativa e nessuna differenza nelle pazienti sottoposte a mastectomia (104).

2. Materiali e Metodi

La scelta dei materiali: valutazioni di tipo fisico

Il primo passo del progetto di ricerca è consistito nella selezione e sintesi dei materiali appropriati per mettere a punto gli scaffold tridimensionali.

Sono stati considerati come potenzialmente utilizzabili materiali nella forma di gel/hydrogel iniettabili, reti polimeriche o substrati “solidi”. In particolare sono stati analizzati poliesteri alifatici (policaprolattone) insieme ad altri polimeri sintetici e naturali.

Abbiamo effettuato analisi meccaniche (prove meccaniche di trazione, di flessione, small punch test), studi reologici (test dinamico-meccanico) e test di iniettabilità utilizzando diversi sistemi per valutare le proprietà dei materiali selezionati e sintetizzati ed i relativi parametri di processo per poter progettare strutture 3D altamente funzionali per la riparazione/rigenerazione dei tessuti a livello mammario.

Realizzazione di scaffold 3D a morfologia controllata

Attraverso l'uso della tecnica di Additive Manufacturing “3D Fiber Deposition” abbiamo realizzato alcuni scaffold in PCL di forma cilindrica. Tali strutture sono state ottenute attraverso due processi consecutivi: estrusione del materiale e deposizione alternata delle fibre secondo direzioni variabili tra strati consecutivi. I pellet di PCL sono stati introdotti nella siringa di acciaio inossidabile del Bioplotter e condotti ad una temperatura di 120°C tramite una cartuccia posta sul braccio mobile

della macchina. In seguito, il fuso è stato forzato attraverso l'ago, usando una velocità della vite all'interno della cartuccia di 30 RPM, depositando le fibre in modo alternato secondo diverse orientazioni. Sono stati preparati tre scaffold cilindrici caratterizzati, rispettivamente, dai seguenti pattern: $0^\circ/90^\circ$ - $0^\circ/60^\circ/120^\circ$ - $0^\circ/45^\circ/90^\circ/135^\circ$ (Figure 6-8). L'ago utilizzato, in acciaio inossidabile, ha un diametro interno pari a $500\mu\text{m}$. Le proprietà che hanno influenzato le dimensioni complessive dei pori sono: il diametro delle fibre (dipendente dal diametro interno dell'ago e/o dalla velocità di deposizione); la spaziatura tra le fibre (strand distance, ovvero la distanza centro-centro), pari a $800\mu\text{m}$ ed il layer thickness, pari a $380\mu\text{m}$. L'architettura degli scaffold è stata ottenuta attraverso il deposito di fibre di PCL con una velocità di 45 mm/min.

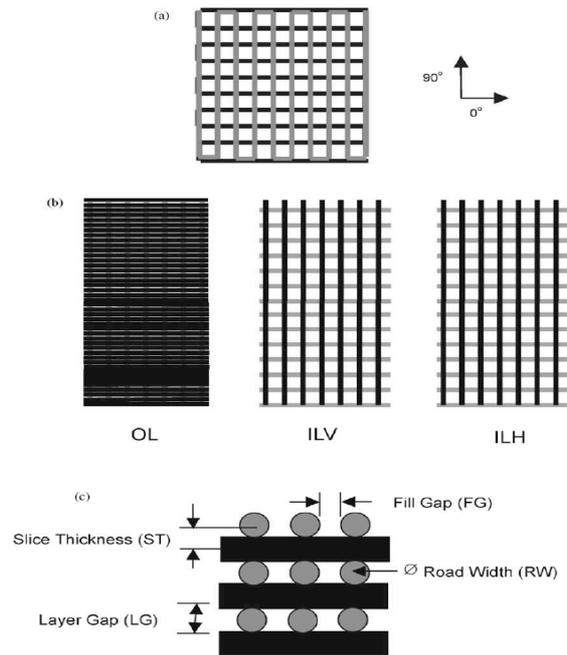
Prove meccaniche di compressione sugli scaffold

Abbiamo eseguito test di compressione sugli scaffold 3D cilindrici di PCL caratterizzati da un diametro (D) di 6 mm, un'altezza di 6 mm ed un pattern 0°/90°-0°/60°/120°- 0°/45°/90°/135° per poter valutare l'effetto dell'architettura sulle caratteristiche meccaniche. I test sono stati condotti alla velocità di 1 mm/min fino ad un livello massimo di deformazione pari a 0.4 mm/mm utilizzando un dinamometro INSTRON 5566 (Figura 9).

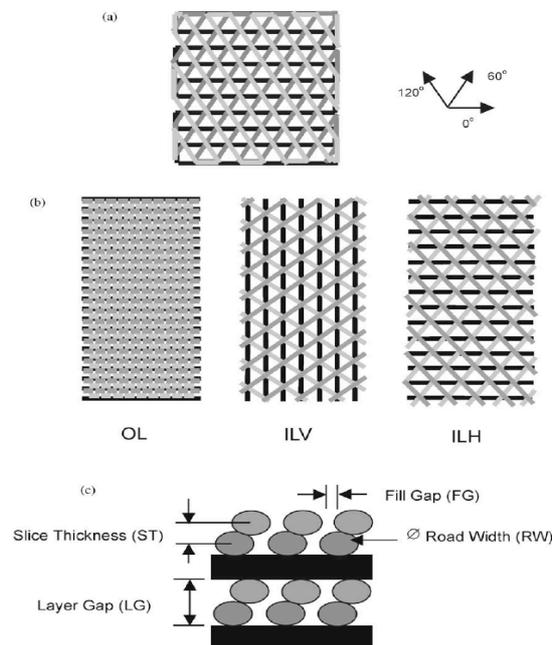
Lo sforzo ingegneristico e la deformazione ingegneristica sono stati valutati con le seguenti relazioni:

$$\sigma_0 = \frac{F}{A_0} \quad \varepsilon_0 = \frac{\Delta h}{h_0}$$

in cui: F = carico; A_0 = area della sezione trasversale dello scaffold ($A_0 = \pi D^2 / 4$); Δh = variazione dell'altezza dello scaffold; h_0 = altezza iniziale del campione.



a



b

Figura 6. a. Lay-down pattern di 0°/90°; b. lay-down pattern di 0°/60°/120° con varie direzioni di orientamento delle fibre.

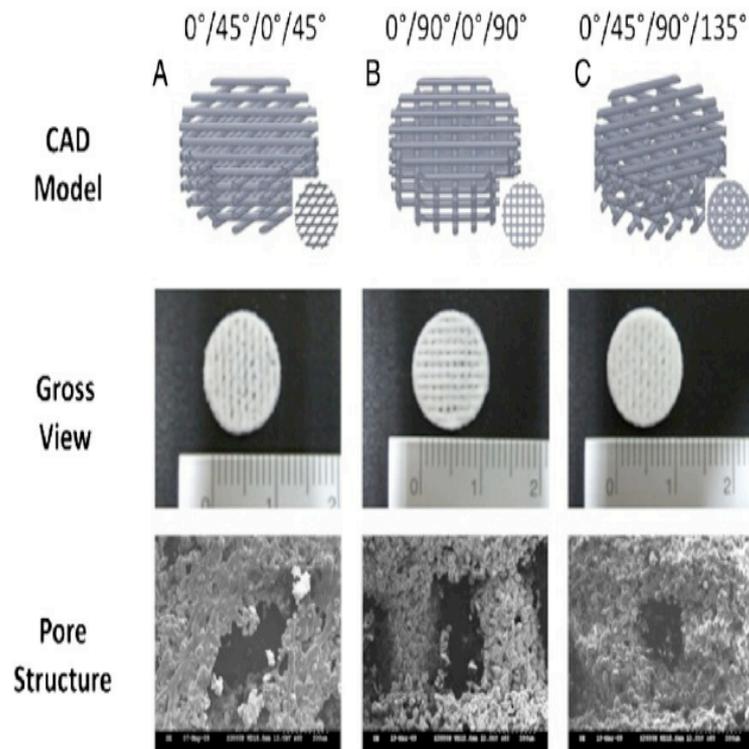


Figura 7. Scaffold con differenti pattern di orientamento delle fibre.

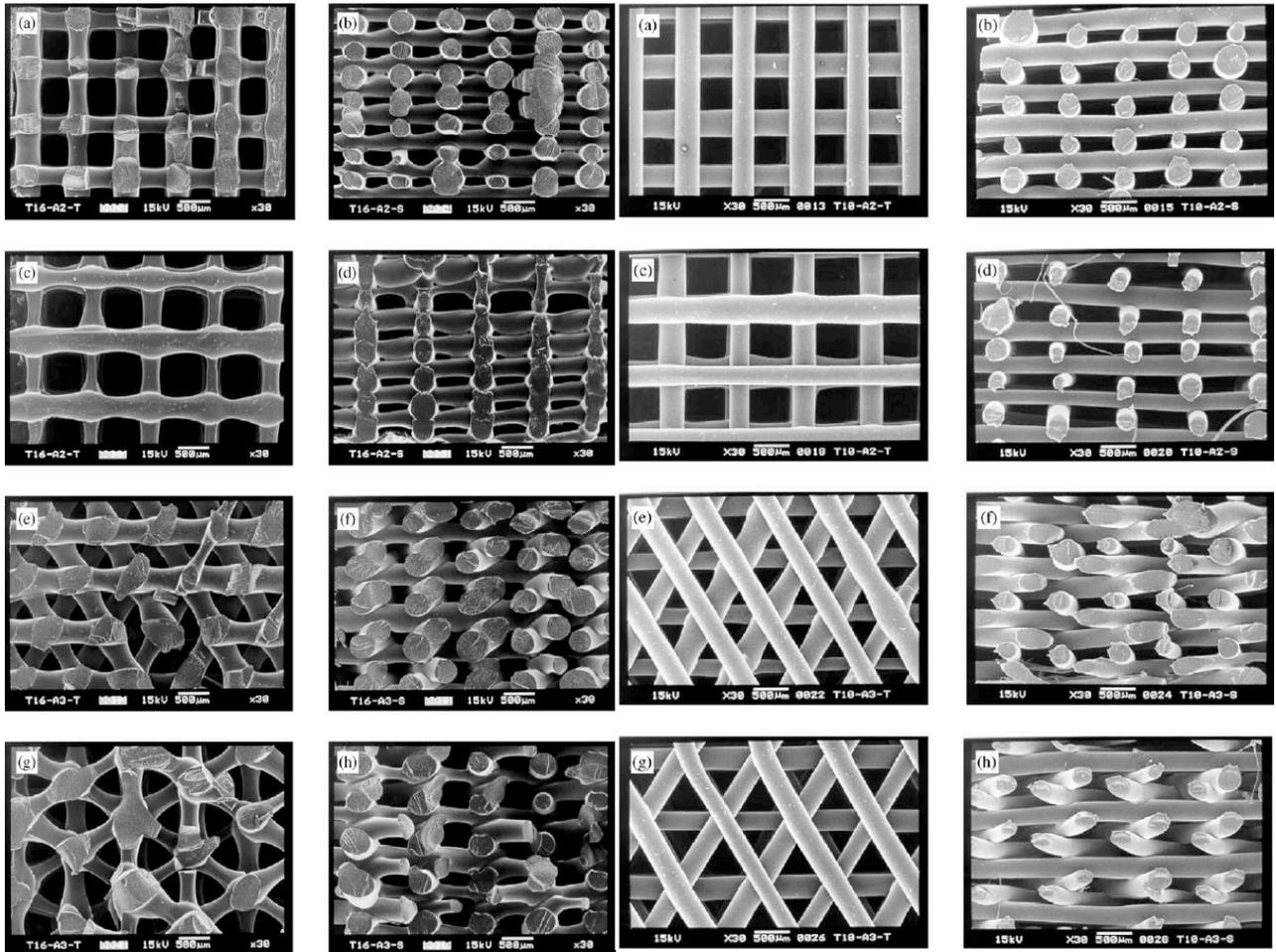


Figura 8. Scaffold in PCL con differenti pattern di orientazione delle fibre.



Figura 9. Dinamometro INSTRON 5566.

Il prelievo di tessuto adiposo

Allo stato delle attuali conoscenze, il miglior metodo di prelievo di tessuto adiposo per ottenere il miglior rendimento di ASCs e la miglior resa biologica rimane da definire (1,2).

La tecnica chirurgica utilizzata per il prelievo di tessuto adiposo è stata la seguente: la procedura è stata effettuata in anestesia generale. Il sito donatore è stato infiltrato con soluzione di Klein consistente in 1 cc di epinefrina diluito in 500 cc di Ringer lattato allo 0,001%.

Per il prelievo sono state utilizzate cannule di Coleman con punta smussa collegate a siringhe Luer Lock da 20 cc con una lieve pressione negativa.

Quindi il tessuto adiposo è stato centrifugato a 3000 giri per 1 minuto per separare, in base al gradiente di densità, le componenti oleose (strato superficiale contenente cellule danneggiate) ed ematiche (strato più profondo composto in maggior parte da componenti ematici concentrati) dal tessuto adiposo (strato intermedio consistente nel tessuto adiposo concentrato contenente la SVF (Stromal Vascular Fraction) con le ASCs).

Isolamento degli adipociti e delle ASCs

Il tessuto adiposo proveniente dal grasso sottocutaneo addominale di una paziente sottoposta a chirurgia plastica post-bariatrica (che ha discusso e sottoscritto adeguato consenso informato per l'utilizzo del proprio materiale biologico per scopi di ricerca), prelevato secondo la metodica descritta, è stato trasportato all'interno di un

contenitore riscaldato (37°C) al laboratorio di isolamento cellulare (Istituto per i Polimeri, Compositi e Biomateriali del Consiglio Nazionale delle Ricerche di Napoli). Per l'estrazione degli adipociti maturi, abbiamo utilizzato un protocollo di isolamento adattato da Danielsson e coll. (3). Il tessuto adiposo è stato digerito in maniera enzimatica con collagenasi di tipo II (Worthington, Lakewood, NJ, USA) in Falcon da 50 ml (Corning New York, NY, USA) in un incubatore scuotente a 37°C (65 rpm). Il tessuto digerito è stato dunque filtrato attraverso una rete di nylon e gli adipociti maturi sono stati separati dagli altri tipi cellulari per galleggiamento. Gli adipociti maturi sono stati risciacquati 3 volte in un tampone modificato di Krebs-Ringer (KRHG), 0.12 M NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 20 mM HEPES (pH 7.4), 0.1% (w/v) albumina sierica bovina priva di acidi grassi, 100 nM fenilisopropiladenosina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0.5 U/mL adenosina deaminasi (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e glucosio 2 mM.

La frazione vascolare stromale (SVF) è stata isolata dal tessuto filtrato e digerito con collagenasi tramite centrifugazione e purificato utilizzando un tampone ipotonico per lisi dei globuli rossi (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Le cellule rimanenti sono state seminate (passaggio 0), espanse per 2 passaggi in BM-1 (ZenBio) supplementato con siero di vitello inattivato con calore al 10% (PAA, Houston, TX, USA), penicillina e streptomina (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e bFGF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e conservate a -150°C prima dell'uso.

Valutazioni di tipo biologico sull'interazione scaffold/ASCs

Abbiamo dunque effettuato uno studio della “colonizzazione” degli scaffold 3D in PCL con diversi pattern di orientamento delle fibre da parte delle ASCs. Abbiamo valutato la vitalità e la proliferazione cellulare all'interno degli scaffold.

Vitalità/Proliferaazione cellulare: AlamarBlue Assay

Le ASCs sono state coltivate in un terreno di coltura α -MEM (Bio-Whittaker, Belgium) contenente siero fetale bovino al 10%, antibiotici (come Penicillina e Streptomina) e Glutamina. Le colture cellulari così ottenute sono state poste in un incubatore (Forma Scientific, Inc) a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Gli scaffold 3D a base di PCL, ognuno dei quali caratterizzato da un diverso pattern, sono stati adeguatamente sterilizzati e, in seguito, seminati con una sospensione cellulare (10000 cellule/scaffold). Abbiamo, in questo modo, ottenuto dei costrutti cellulari (cellule su matrice polimerica) incubati a 37°C in un mezzo di coltura al fine di favorire l'adesione cellulare. Su tali costrutti cellulari sono stati effettuati test biologici di vitalità e proliferazione cellulare attraverso l'AlamarBlue Assay (Biosource) (Figura 10). Tale saggio ci permette di quantificare la proliferazione cellulare attraverso un indicatore di ossido-riduzione, che reagendo cambia fluorescenza e colore in relazione alla riduzione chimica del mezzo di coltura a seguito della crescita cellulare. La reazione di riduzione è correlata al numero di cellule vitali: quanto più è intensa l'attività di proliferazione cellulare, tanto più l'AlamarBlue (indicatore redox colorimetrico) viene ridotto e poi restituito al mezzo

di coltura. La variazione di fluorescenza/colore, direttamente proporzionale alla quantità di indicatore trasformato, ci fornisce una stima del numero di cellule vitali sottoposte al saggio. Nel presente studio sperimentale abbiamo condotto, attraverso uno spettrofotometro, misure di assorbanza dell'AlamarBlue a due differenti lunghezze d'onda: $\lambda=570\text{nm}$ e $\lambda=595\text{nm}$.

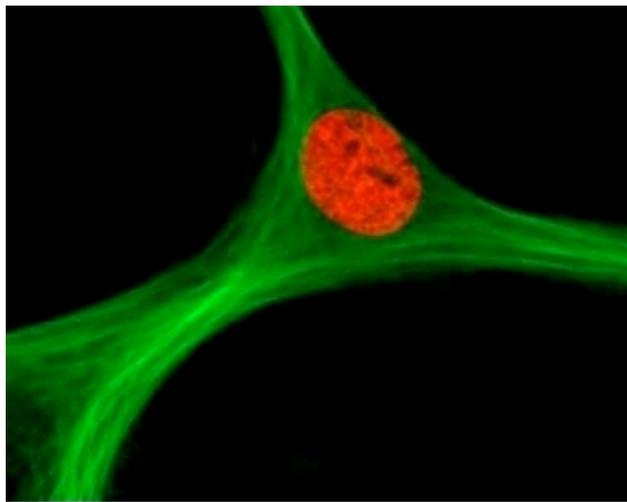


Figura 10. Analisi della vitalità cellulare utilizzando l'AlamarBlue Assay.

La produzione degli scaffold “customizzati”: Reverse Engineering e 3D Printing

In relazione ai dati meccanici e biologici derivanti dalle analisi effettuate, siamo passati al secondo step del nostro progetto con la produzione di uno scaffold 3D poroso che riproducesse la mammella da ricostruire, grazie a tecniche di “reverse engineering”.

I dati derivanti da una Tomografia Computerizzata di una donna volontaria sono stati “incrociati” con quelli derivanti da una scansione laser 3D del profilo mammario della stessa donna in posizione ortostatica. In tal modo abbiamo ottenuto una immagine 3D delle mammelle della volontaria.

Tali dati sono stati processati mediante software dedicati (Rapidform) fino ad ottenere il Computer Aided Design (CAD) del volume mammario da ricostruire, con le caratteristiche di porosità e di spessore dei bracci della mesh richieste (dati derivanti dalle precedenti analisi effettuate).

Il CAD è stato dunque trasferito ad un Bioplotter che ha “stampato” in 3D lo scaffold “cucito su misura” sulla forma ed il volume della mammella della volontaria.

3. Risultati

Prove meccaniche di compressione

Abbiamo esaminato le proprietà meccaniche di compressione degli scaffold 3D realizzati attraverso la tecnologia AM 3D Fiber Deposition (nel caso specifico con l'ausilio di un Bioplotter) con l'obiettivo di valutare l'influenza dei pattern di orientamento delle fibre sul comportamento meccanico di tali strutture 3D. Le curve sforzo-deformazione ottenute da tali test a compressione sono caratterizzate da un tratto iniziale lineare, corrispondente ad una risposta meccanica relativamente rigida; un secondo tratto non lineare, corrispondente ad una regione a bassa rigidità ed un tratto finale, corrispondente ad una regione ad alta rigidità che termina al raggiungimento di un livello di deformazione pari a 0.4 mm/mm (Figura 11). Le curve sforzo-deformazione ottenute sono sovrapponibili a quelle delle schiume polimeriche. La differenza sta nel tratto centrale. Infatti, a differenza della curva sforzo-deformazione delle schiume polimeriche che presenta nella regione centrale un tratto a pendenza nulla o "plateau", la nostra curva presenta un tratto centrale a pendenza inferiore rispetto a quella del tratto iniziale e del tratto finale. In Tabella 2 sono riportati i valori del modulo a compressione (calcolato come pendenza del tratto iniziale lineare della curva) e dello sforzo massimo (valutato in corrispondenza di una deformazione del 40%) inerenti ai differenti scaffold in PCL esaminati (scaffold con differenti pattern di orientamento delle fibre: $0^\circ/90^\circ$ - $0^\circ/60^\circ/120^\circ$ - $0^\circ/45^\circ/90^\circ/135^\circ$). I valori riportati evidenziano come il pattern incida sulle performance meccaniche delle strutture 3D fabbricate. A parità di *layer thickness*, *strand distance*, *diametro delle fibre* e "*sezione apparente*", è possibile modulare la rigidità iniziale della struttura cambiando, opportunamente, la sequenza di sovrapposizione. La dipendenza delle proprietà meccaniche dalla distanza tra le fibre è attribuibile al comportamento

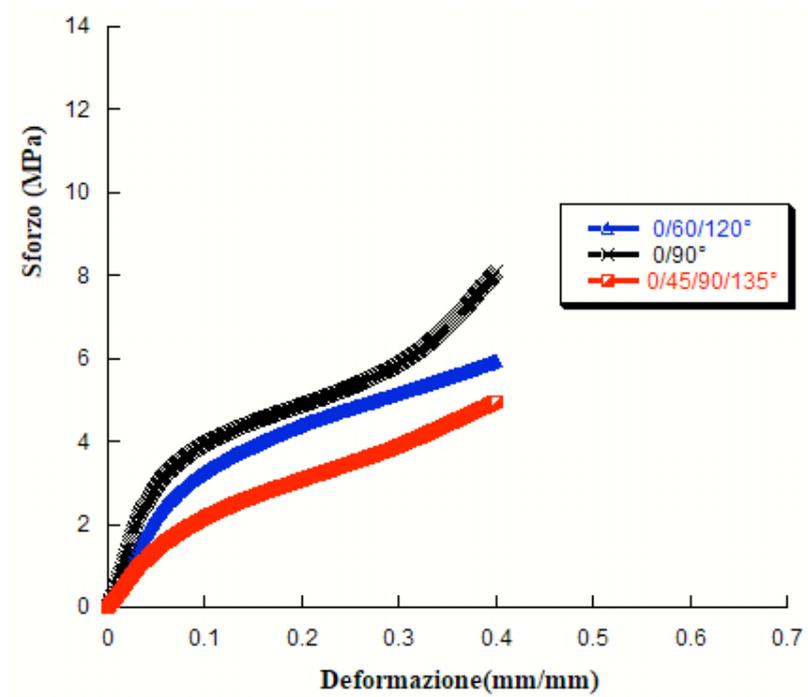


Figura 11. Curve sforzo-deformazione per scaffold in PCL, caratterizzati da tre diversi pattern (0°/90°- 0°/60°/120°- 0°/45°/90°/135°)

column-like delle giunzioni tra i filamenti in seguito alla compressione. Gli scaffold costituiti da fibre a minor distanza tra loro sono caratterizzati da un maggior numero di colonne. Ciò comporta, di conseguenza, un aumento del modulo a compressione (E) della struttura. Una volta fissati il valore di tale distanza e i parametri di processo, il comportamento meccanico degli scaffold è condizionato dal *lay-down pattern*. Gli scaffold contraddistinti da un pattern $0^\circ/90^\circ$ (i.e. con due diversi angoli di orientamento) mostrano un modulo a compressione e uno sforzo massimo maggiori rispetto a quelli ottenuti da scaffold con pattern $0^\circ/60^\circ/120^\circ$ (i.e. con tre diversi angoli di orientamento) e $0^\circ/45^\circ/90^\circ/135^\circ$ (i.e. con quattro diversi angoli di orientamento). Infatti, se nel caso di scaffold con pattern $0^\circ/90^\circ$ il modulo a compressione E è di 63.0 ± 4.7 MPa, nel caso di scaffold con pattern $0^\circ/60^\circ/120^\circ$ e $0^\circ/45^\circ/90^\circ/135^\circ$ tale modulo diminuisce fino ai valori, rispettivamente, di 48.2 ± 4.8 MPa e 30.1 ± 3.4 MPa. Allo stesso modo, lo sforzo massimo passa da 8.1 ± 0.9 MPa per pattern $0^\circ/90^\circ$ a 6.0 ± 0.5 MPa per quello a $0^\circ/60^\circ/120^\circ$ e a 4.9 ± 0.4 MPa per quello $0^\circ/45^\circ/90^\circ/135^\circ$. In particolare gli scaffold caratterizzati da un pattern $0^\circ/45^\circ/90^\circ/135^\circ$ sono le strutture più deformabili. Ciò è determinato dal fatto che un decremento dell'ampiezza dell'angolo fra le fibre aumenta l'area di contatto diminuendo, così, lo stress locale e dando la possibilità ai filamenti depositati di scorrere più facilmente gli uni sugli altri.

Lay-Down Pattern	Modulo a compressione E (MPa)	Sforzo Massimo (MPa)
0°/90°	63.0±4.7	8.1±0.9
0°/60°/120	48.2±4.8	6.0±0.5
0°/45°/90°/135°	30.1±3.4	4.9 ±0.4

Tabella 2. Risultati dei test meccanici di compressione: modulo a compressione e sforzo massimo, riportati come valore medio ± deviazione standard, di scaffold in PCL caratterizzati da tre differenti pattern (0°/90°- 0°/60°/120°- 0°/45°/90°/135°).

Vitalità/Proliferaazione cellulare: AlamarBlue Assay

Al fine di valutare la vitalità e la proliferazione cellulare nel tempo, abbiamo condotto esperimenti di *cell-seeding* delle ASCs su costrutti di scaffold 3D. Tale analisi è stata effettuata attraverso l'AlamarBlue Assay (le cellule sono vitali solo se si verifica una riduzione dell'AlamarBlue Assay). Nella Tabella 3 sono riportati i valori di riduzione percentuale dell'AlamarBlue a 7, 14 e 21 giorni dalla semina delle ASCs negli scaffold di PCL caratterizzati da tre diversi pattern ($0^{\circ}/90^{\circ}$ - $0^{\circ}/60^{\circ}/120^{\circ}$ - $0^{\circ}/45^{\circ}/90^{\circ}/135^{\circ}$). Le cellule sono vitali in tutti i campioni analizzati. Tuttavia si nota un'evidente vitalità cellulare nello scaffold con pattern $0^{\circ}/90^{\circ}$.

% Riduzione AlamarBlue			
PCL/hMSC	7 giorni	14 giorni	21 giorni
$0^{\circ}/90^{\circ}$	7.7±0.7	13.8±1.0	24.6±2.1
$0^{\circ}/60^{\circ}/120^{\circ}$	6.9±0.6	11.0±1.2	18.5±2.0
$0^{\circ}/45^{\circ}/90^{\circ}/135^{\circ}$	7.0±0.6	11.5±1.55	17.6±1.7

Tabella 3. Riduzione percentuale di AlamarBlue a 7, 14 e 21 giorni dalla semina cellulare su scaffold 3D a morfologia cellulare caratterizzata da pattern differenti.

La produzione degli scaffold “customizzati”: Reverse Engineering e 3D Printing

Con tecniche di “reverse engineering” abbiamo quindi prodotto uno scaffold 3D poroso da utilizzare per il nostro nuovo modello ricostruzione mammaria.

Abbiamo effettuato un laser scanning del torace di una donna sana volontaria a partire da tre angoli (0° o frontale, -30° e $+30^\circ$ obliqui anteriori) con la donna in posizione ortostatica e le braccia abdotte a 90° utilizzando un laser scanner (Vivid 910) associato ad una macchina fotografica di alta precisione (Konica-Minolta). Le immagini sono state dunque importate in Rapidform 2006 (Inus Technology, Seoul, Korea), un software di CAD e unite in una unica immagine che rappresenta la superficie toracica in una visione a 180° (frontale) (Figura 12). In Rapidform è stato anche utilizzato un algoritmo per creare una parete toracica virtuale a partire dall'interpolazione delle immagini laser con quelle derivanti dalla Tomografia Computerizzata della stessa donna.

Un modello solido è stato creato a partire da questa immagine ed esportato in “Surface Tessellation Language” (STL file format) (Figura 13). Il file STL può poi essere letto dai più comuni software per manufacturing usati per stereolitografia, 3D printing o FDM.

La porosità dello scaffold è stata ottenuta grazie ad uno specifico expertise: meshes volumetriche tetraedriche sono create come intermedi, usando un modelling ad elementi finiti. Successivamente, grazie ad uno specifico algoritmo sono stati creati bracci di un determinato spessore intorno ad ogni vertice dei tetraedri, uniti alle loro intersezioni per creare lo scaffold.

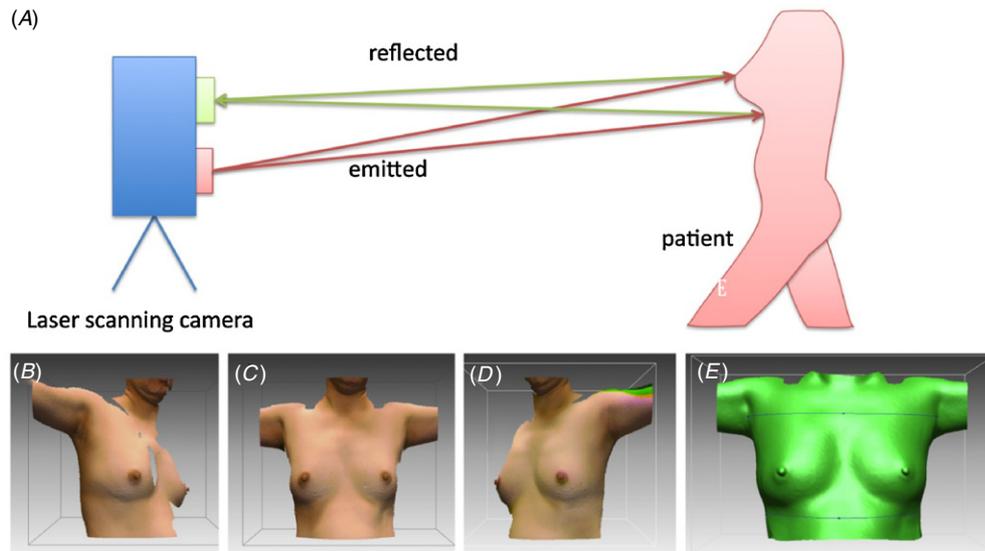


Figura 12. Imaging della parete toracica con l'uso del laser scanning. (A) Lo scanner laser registra i fasci laser riflessi. (B)-(D) Immagini della paziente con angoli rispetto al fascio laser di -30° , 0° e 30° rispettivamente. (E) Modello di superficie ottenuto dalla combinazione delle immagini (B)-(D). (Adattata da: Melchels F, Wiggerhauser PS, Warne D, Barry M, Ong FR, Chong WS, Hutmacher DW, Schantz JT. CAD/CAM-assisted breast reconstruction. *Biofabrication* 2011; 3; 034114 (8pp)).

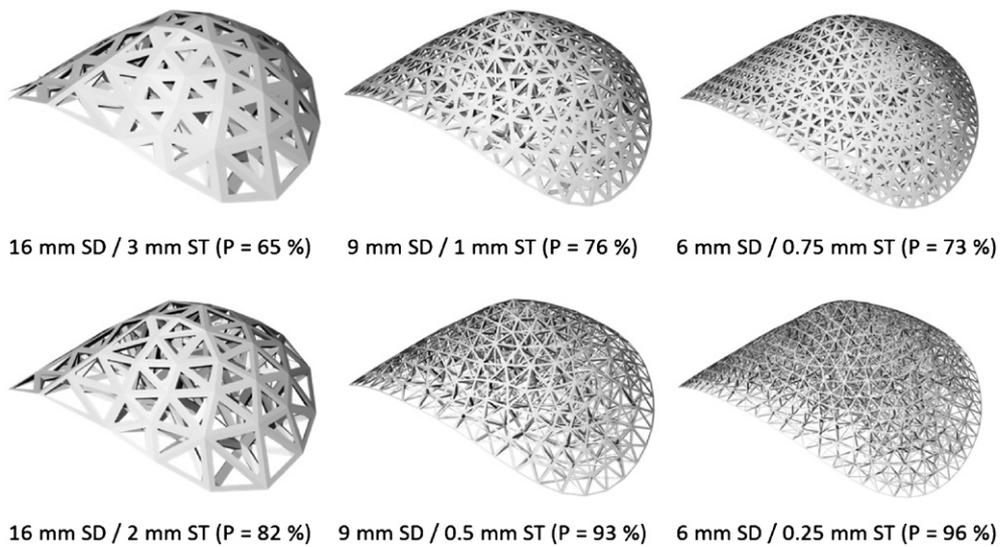


Figura 13. Scaffold mammari porosi. Gli scaffold sono basati su reti con tre differenti densità di deposizione (distanza 16, 9 e 6 mm), ognuno con due differenti valori di spessore dei bracci (ST). (Adattata da: Melchels F, Wiggemhauser PS, Warne D, Barry M, Ong FR, Chong WS, Hutmacher DW, Schantz JT. CAD/CAM-assisted breast reconstruction. *Biofabrication* 2011; 3; 034114 (8pp)).

Lo scaffold è stato quindi fabbricato con policaprolattone (PCL) con un Bioplotter. I modelli porosi prodotti appaiono meccanicamente molto stabili grazie all'alto numero di punti di fusione tra i bracci.

Abbiamo messo a punto scaffold mammari di diversa porosità creati con diverse densità di deposizione (6, 9 e 16 mm) e con differente spessore dei bracci della mesh (0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 e 3 mm) (Figura 14), in modo tale da poter testare in vitro l'interazione tra le ASCs e i diversi "allestimenti" dello scaffold e comprendere quale combinazione di porosità e spessore dei bracci potesse essere il più efficace in termini di "colonizzazione" e sopravvivenza cellulare.

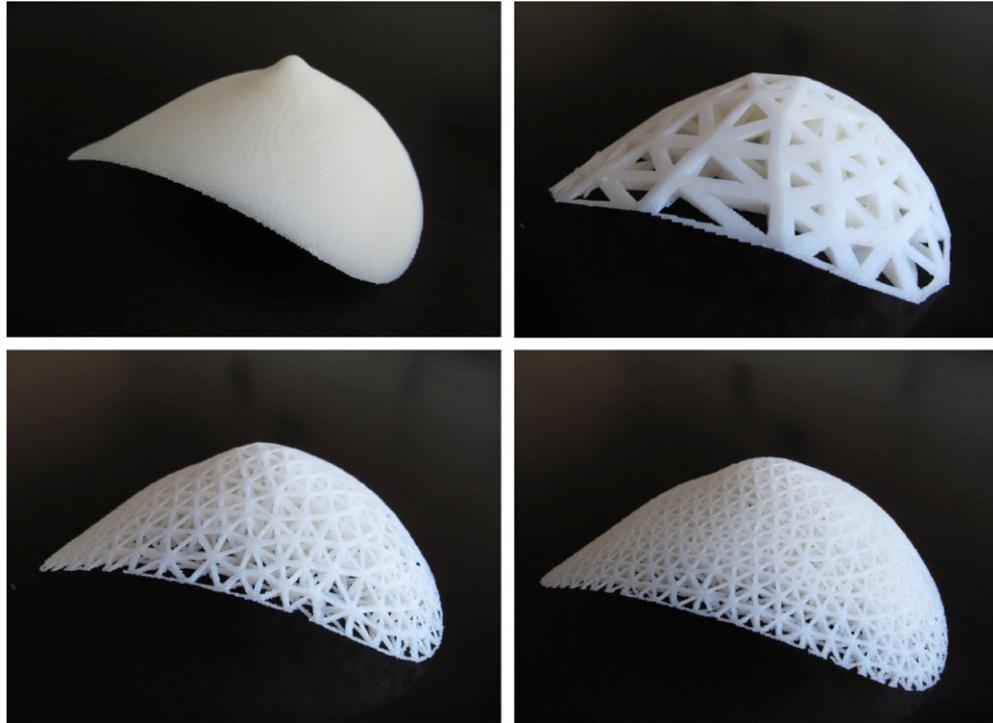


Figura 14. Prototipi di un modello solido e tre modelli porosi per uno scaffold personalizzato, messo a punto con FD. I Modelli porosi sono stati creati grazie al programma descritto, con densità di deposizione di 16, 9 e 6 mm e spessore dei bracci di 3, 1 e 0.75 mm, rispettivamente. (Adattata da: Melchels F, Wiggerhauser PS, Warne D, Barry M, Ong FR, Chong WS, Hutmacher DW, Schantz JT. CAD/CAM-assisted breast reconstruction. *Biofabrication* 2011; 3; 034114 (8pp)).

4. Discussione

Importanti sviluppi nell'Ingegneria dei Tessuti insieme ad una commistione di saperi inerenti a diversi settori hanno permesso la produzione di strutture in grado di rigenerare e/o riparare tessuti e organi danneggiati. Il continuo successo in tale campo di ricerca in concomitanza con lo sviluppo di tecnologie di fabbricazione di strutture in grado di sostituire parti umane aumenta, giorno dopo giorno, grazie alla convergenza dell'ingegneria e della ricerca di base per tessuti, matrice extracellulare, fattori di crescita, cellule staminali e biologia di sviluppo nonché della scienza dei materiali e della bio-informatica. Infatti, i recenti sviluppi scientifici nel campo dei biomateriali, dei fattori di crescita, della differenziazione delle cellule staminali e degli ambienti biomimetici hanno permesso la realizzazione di tessuti in laboratorio a partire dalla combinazione di scaffold (matrici extracellulari ingegnerizzate), cellule e molecole biologicamente attive. Lo scaffold deve essere in grado di sostenere l'adesione cellulare, la proliferazione e la differenziazione *in vitro* al fine di poter essere trapiantato *in vivo*. Dunque, risulta fondamentale l'ottimizzazione topologica degli scaffold. I parametri degli scaffold, come il pattern, la porosità, le proprietà meccaniche, fisico-chimiche e biologiche, devono essere in determinati equilibri in relazione all'uso a cui sono destinati. Grazie all'uso dell'Additive Manufacturing è possibile realizzare scaffold porosi a morfologia interna controllata. In particolare, abbiamo utilizzato la tecnica di 3D Fiber Deposition che permette sia la fabbricazione di scaffold porosi con massima interconnessione dei pori (100%) che di operare con un ampio range di materiali. Per quanto concerne i materiali, quelli che si adattano meglio al nostro scopo sono i materiali polimerici. È fondamentale realizzare lo scaffold con un materiale polimerico che abbia un tempo di degradazione e di riassorbimento sincrono con quello della formazione del neo-tessuto. Infatti, lo scaffold 3D (che rappresenta il supporto fisico per la crescita e la differenziazione

cellulare) viene mantenuto fino a quando il nuovo tessuto non raggiunge l'integrità meccanica sufficiente per autosostenersi. Un biomateriale che si presta molto bene nella progettazione di scaffold 3D è il policaprolattone (PCL). Pertanto, abbiamo portato avanti un approccio sistematico dell'analisi di scaffold 3D in PCL prodotti mediante tecnica 3D Fiber Deposition con l'ausilio di Bioplotter. L'obiettivo è quello di valutare l'effetto delle caratterizzazioni morfologiche sulle performance meccaniche di tali strutture. Quindi, mantenendo costante il diametro delle fibre e la strand distance, abbiamo realizzato scaffold 3D in PCL adottando tre differenti lay-down pattern: $0^\circ/90^\circ$ - $0^\circ/60^\circ/120^\circ$ - $0^\circ/45^\circ/90^\circ/135^\circ$ (rispettivamente struttura interna quadrangolare, triangolare e complessa). I test di compressione hanno mostrato come le proprietà meccaniche e quindi quelle del trasporto di massa delle strutture ottenute dipendono dalla disposizione delle fibre. Quindi, modificando il pattern è possibile realizzare strutture per diverse e specifiche applicazioni. In particolare gli studi condotti hanno mostrato che gli scaffold con pattern $0^\circ/90^\circ$ hanno un modulo a compressione e uno sforzo massimo superiore rispetto a quelli degli scaffold con pattern $0^\circ/60^\circ/120^\circ$ e $0^\circ/45^\circ/90^\circ/135^\circ$. Sono stati effettuati anche test di vitalità/proliferazione cellulare (AlamarBlue Assay) che hanno evidenziato una vitalità cellulare maggiore negli scaffold con pattern $0^\circ/90^\circ$ rispetto a quelli con pattern $0^\circ/60^\circ/120^\circ$ e $0^\circ/45^\circ/90^\circ/135^\circ$.

Sviluppi futuri del progetto di ricerca

La biocompatibilità ed il comportamento in vivo dello scaffold “customizzato” prodotto sarà testato in animali nei prossimi mesi.

In seguito, si eseguirà un trial clinico randomizzato in pazienti affette da cancro della mammella, in cui le pazienti saranno randomizzate ad una ricostruzione con protesi mammarie in silicone in sede sub-pettorale (metodica standard) o alla “engineered breast reconstruction” con il posizionamento in sede pre-pettorale di uno scaffold “cucito su misura” a partire dalle scansioni TC e laser scanning pre-operatorie della mammella da ricostruire dopo mastectomia conservativa (mastectomie con risparmio della cute o del complesso areola-capezzolo).

Per le donne randomizzate al gruppo sperimentale, il posizionamento dello scaffold rappresenterà il primo step verso una ricostruzione ingegnerizzata che vedrà la colonizzazione dello scaffold con tessuto adiposo di derivazione autologa.

La sopravvivenza del tessuto adiposo autologo trapiantato all’interno dello scaffold rimane una criticità, ma come abbiamo detto, le caratteristiche stesse dei materiali scelti per la produzione dello scaffold guideranno la sopravvivenza e la differenziazione cellulare delle ASCs trapiantate con la frazione vascolare stromale proveniente dal tessuto adiposo autologo verso il tessuto adiposo, in modo tale da far sopravvivere le cellule adipose adulte trapiantate e far sì che le cellule staminali autorigeneranti presenti all’interno del trapianto differenzino secondo la linea adiposa. Secondo quanto evidenziato da Chhaya e colleghi (1), per facilitare il processo di vascolarizzazione dello scaffold, si potrà utilizzare quella che gli autori chiamano “prevascolarizzazione”. Lo scaffold vuoto sarà inserito in sede di mastectomia, senza trapianto di cellule adipose autologhe al momento dell’impianto.

Nelle 2-3 settimane successive, il tessuto connettivo ed i vasi sanguigni “colonizzeranno” la struttura, formando un letto di capillari all’interno dei pori dello scaffold. Sarà allora che si procederà al trapianto di tessuto adiposo all’interno della struttura, dove il letto vascolare preformato, renderà stabile il tessuto adiposo nel sito di impianto.

In altre parole, lo scaffold in policaprolattone permetterà la formazione di un “coagulo” formato da piastrine in una rete di fibrina cross-linkata insieme ad un cocktail di fibronectina, vitronectina e trombospondina ricco di fattori di crescita. Questo network di fibrina, insieme al “cocktail” di fattori di crescita stimolerebbe una forte risposta neoangiogenetica e indurrebbe la penetrazione di tessuto connettivo altamente organizzato all’interno dello scaffold.

Dopo 14 giorni dall’impianto, quando la risposta angiogenetica sarà al suo picco, si effettuerà una prima sessione di trapianto di tessuto adiposo autologo all’interno dello scaffold.

Alcune (2-3) ulteriori sessioni di trapianto di tessuto adiposo autologo potranno essere necessarie per ottenere il risultato ricostruttivo previsto.

Chhaya e coll. hanno posizionato scaffold in PCL in sede sottocutanea in modelli suini e li hanno sottoposti a trapianto ritardato di tessuto adiposo autologo. A 6 mesi l’impianto è risultato essere ben tollerato con un’ottima integrazione degli scaffold con i tessuti dell’ospite ed una buona vascolarizzazione all’esame istologico.

5. Conclusioni

L' "engineered breast reconstruction" con l' utilizzo di scaffold messi a punto con tecniche di additive manufacturing colonizzati con cellule adipose di derivazione autologa messa a confronto con l' attuale standard ricostruttivo costituito dagli impianti al silicone mostra numerosi vantaggi: si tratta di una ricostruzione "cucita su misura" sulla singola paziente, in assenza di materiali permanenti, eliminando dunque tutte le complicanze legate alle protesi al silicone, così come le possibili complicanze legate alla ricostruzione con lembi di tessuto autologo. La "engineered breast reconstruction" rappresenta una procedura semplice dal punto di vista tecnico con la possibilità di ottenere risultati estetici naturali e stabili nel tempo. Inoltre è una opzione ricostruttiva che può trovare applicazione anche in pazienti precedentemente radiotrattate o che dovranno essere sottoposte a radioterapia post-mastectomia. Inoltre il posizionamento dello scaffold sarà effettuato in sede pre-pettorale, evitando il dolore e le sequele funzionali legate alla disinserzione del muscolo grande pettorale a livello costale e al possibile utilizzo del muscolo gran dentato per l' allestimento della tasca peri-protetica.

Possibili limiti di tale tecnica ricostruttiva possono essere legati alla "imprevedibilità" del tasso di sopravvivenza del tessuto adiposo trapiantato, con riassorbimento dello stesso nel corso del tempo per mancata vascolarizzazione, anche se con la tecnica di "prevascolarizzazione" presentata da Chhaya e colleghi (1) si può ovviare in buona parte a questa criticità.

C'è da tener presente che si tratta di una tecnica ricostruttiva "multi-step" con necessità di più accessi alla sala operatoria, per il posizionamento dello scaffold al momento della mastectomia e dunque 2 o più ulteriori accessi per il trapianto di tessuto adiposo autologo.

Non è da trascurare la problematica legata alla sicurezza oncologica del trapianto di tessuto adiposo autologo in donne affette da cancro della mammella, sebbene le più

recenti evidenze di letteratura sembrerebbero non mostrare aumentati tassi di recidive locali o peggiori tassi di sopravvivenza globale legati all'utilizzo del tessuto adiposo autologo per la ricostruzione mammaria.

Un limite assoluto all'utilizzo della "engineered breast reconstruction" è rappresentato dalle pazienti con scarsa biodisponibilità di tessuto adiposo (BMI < 20) che non potranno beneficiare di questa opzione ricostruttiva.

Lo studio dei materiali e la messa a punto di uno scaffold poroso in policaprolattone con tecniche di additive manufacturing a partire da immagini di Tomografia Computerizzata o Risonanza Magnetica di una paziente affetta da cancro della mammella rappresentano solo il punto di partenza per lo sviluppo e l'applicazione clinica della "engineered breast reconstruction".

Il prossimo step vedrà lo studio su animali della biocompatibilità delle strutture messe a punto e la valutazione dell'interazione in vivo tra il tessuto adiposo e lo scaffold stesso.

Successivamente si proporrà uno studio clinico randomizzato e controllato che metterà a confronto l'attuale gold standard, ossia la ricostruzione con impianti protesici con la "engineered breast reconstruction" in donne sottoposte a mastectomia conservativa per cancro della mammella in fase iniziale con la possibilità di valutare outcome clinico-chirurgici a breve termine, complicanze post-operatorie precoci, outcome estetico e livello di soddisfazione e qualità di vita delle pazienti e, con follow-up più lunghi, outcome chirurgici a lungo termine, outcome radiologici per valutare l'interferenza delle opzioni ricostruttive con l'imaging, outcome estetico, livello di soddisfazione della paziente e qualità di vita a lungo termine ed outcome oncologici, tassi di recidiva locale, recidiva a distanza e sopravvivenza globale.

6. Bibliografia

Introduzione

1. Cancer Research UK. <http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/types/breast/incidence>. Accessed on 19 Nov 2017
2. Catanuto G, Rocco N, Nava MB. Surgical decision making in conservative mastectomies. *Gland Surg* 2015. doi: 10.3978/j.issn.2227-684X.2015.05.12.
3. Nava MB, Rocco N, Catanuto G. Conservative mastectomies: an overview. *Gland Surg* 2015. doi: 10.3978/j.issn.2227-684X.2015.04.06.
4. Nava MB, Ottolenghi J, Pennati A, Spano A, Bruno N, Catanuto G, Boliglowa D, Visintini V, Santoro S, Folli S. Skin/nipple sparing mastectomies and implant-based reconstruction in patients with large and ptotic breast: oncological and reconstructive results. *Breast* 2012; 21 (3): 267-71.
5. Rocco N, Catanuto G, Nava MB. What is the evidence behind conservative mastectomies? *Gland Surg* 2015. doi: 10.3978/j.issn.2227-684X.2015.04.19.
6. Rocco N, Rispoli C, Moja L, Amato B, Iannone L, Testa S, Spano A, Catanuto G, Accurso A, Nava MB. Different types of implants for reconstructive breast surgery. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014, Issue 1. Art. No.: CD010895. DOI: 10.1002/14651858.CD010895.
7. Spear SL, Baker JL Jr. Classification of capsular contracture after prosthetic breast reconstruction. *Plast reconstr Surg* 1995; 96: 1119-23.

8. Zambacos GJ, Molnar C, Mandrekas AD. Silicone Lymphadenopathy after breast augmentation: case reports, review of the literature , and current thoughts. *Aesth Plast Surg* 2013; 37: 278-289.
9. Clough KB, Sarfati I, Fitoussi A, Leblanc-Talent P. Breast reconstruction: late cosmetic results of implant reconstruction. *Ann Chir Plast Esthet* 2005;50(5):560-74.
10. Gloria A, Ronca D, Russo T, D'Amora U, Chierchia M, De Santis R, Nicolais L, Ambrosio L. Technical features and criteria in designing fiber-reinforced composite materials: from the aerospace and aeronautical field to biomedical applications. *J Appl Biomater Biomech* 2011; 9: 151-163.
11. Silva-Correia J, Gloria A, Oliveira MB, Mano JF, Oliveira JM, Ambrosio L, Reis RL. Rheological and mechanical properties of acellular and cell-laden methacrylated gellan gum hydrogels. *J Biomed Mater Res A* 2013; 101: 3438-46.
12. Russo T, D'Amora U, Gloria A, Tunesi M, Sandri M, Rodilossi S, Albani D, Forloni G, Giordano C, Cigada A, Tampieri A, De Santis R, Ambrosio L. Systematic Analysis of Injectable Materials and 3D Rapid Prototyped Magnetic Scaffolds: From CNS Applications to Soft and Hard Tissue Repair/Regeneration. *Procedia Eng* 2013; 59: 233–239.
13. Tsaryk R, Gloria A, Russo T, Anspach L, De Santis R, Ghanaati S, Unger RE, Ambrosio L, Kirkpatrick CJ. Collagen-low molecular weight hyaluronic acid semi-interpenetrating network loaded with gelatin microspheres for cell and growth factor delivery for nucleus pulposus regeneration. *Acta Biomaterialia* 2015; 20: 10–21.

14. Giordano C, Albani D, Gloria A, Tunesi M, Batelli S, Russo T, Forloni G, Ambrosio L, Cigada A. Multidisciplinary perspectives for Alzheimer's and Parkinson's diseases: hydrogels for protein delivery and cell-based drug delivery as therapeutic strategies. *Int J Artif Organs* 2009; 32: 836-850.
15. Giordano C, Albani D, Gloria A, Tunesi M, Rodilossi S, Russo T, Forloni G, Ambrosio L, Cigada A. Nanocomposites for neurodegenerative diseases: hydrogel-nanoparticle combinations for a challenging drug delivery. *Int J Artif Organs* 2011; 34: 1115-27.
16. De Santis R, Gloria A, Russo T, D'Amora U, D'Antò V et al. Advanced composites for hard-tissue engineering based on PCL/organic– inorganic hybrid fillers: From the design of 2D substrates to 3D rapid prototyped scaffolds. *Polymer Composites* 2013; 34: 1413-1417.
17. Puppi D, Mota C, Gazzarri M, Dinucci D, Gloria A, Myzabekova M, Ambrosio L, Chiellini F. Additive manufacturing of wet-spun polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Biomed Microdevices* 2012; 14: 1115-1127.
18. Domingos M, Intranuovo F, Russo T, De Santis R, Gloria A, Ambrosio L, Ciurana J, Bartolo P. The first systematic analysis of 3D rapid prototyped poly(ϵ -caprolactone) scaffolds manufactured through BioCell printing: the effect of pore size and geometry on compressive mechanical behaviour and in vitro hMSC viability. *Biofabrication*, 2013; 5: 045004-1 – 045004-13.
19. De Santis R, Russo A, Gloria A, D'Amora U, Russo T, Panseri S, Sandri M, Tampieri A, Marcacci M, Dediu VA, Wilde CJ, Ambrosio L. Towards the Design of 3D Fiber- Deposited Poly(ϵ -caprolactone)/Iron-Doped Hydroxyapatite Nanocomposite Magnetic Scaffolds for Bone Regeneration. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 2015; 11: 1236–1246.

20. Gloria A, Russo T, De Santis R, Ambrosio L. 3D fiber deposition technique to make multifunctional and tailor- made scaffolds for tissue engineering applications. *J Appl Biomater Biomech* 2009; 7, 141-152.
21. Nava MB, Catanuto G, Pennati AE, Rocco N, Spano A, Villa R, Daidone M. Lack of activation of telomere maintenance mechanisms in human adipose stromal cells derived from fatty portion of lipospirates. *Plast Reconstr Surg* 2015; 135 (1): 114e-23e.
22. Bartolo PJD, Mendes A, Jardini A. Bio-prototyping. In: Collins MW, Brebbia CA, editors. *Design and nature II – comparing design in nature with science and engineering*. London: WIT Press; 2004. p. 535–66.
23. Melchels FPW, Domingos MAN, Klein TJ, Malda J, Bartolo PJ, Hutmacher DW. Additive manufacturing of tissues and organs. *Progress in Polymer Science* 2012; 37: 1079-1104
24. Bartolo PJD, Mendes A, Jardini A. Bio-prototyping. In: Collins MW, Brebbia CA, editors. *Design and nature II – comparing design in nature with science and engineering*. London: WIT Press; 2004. p. 535–66.
25. Melchels FPW, Feijen J, Grijpma DW. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials* 2010;31:6121–30.
26. Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Prog Polym Sci* 2010;35:403–40.
27. Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci* 2007;32:762–98.

28. Best SM, Porter AE, Thian ES, Huang J. Bioceramics: past, present and for the future. *J Eur Ceram Soc* 2008;28:1319–27.
29. Boccaccini AR, Blaker JJ. Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices* 2005;2:303–17.
30. Fedorovich NE, Alblas J, de Wijn JR, Hennink WE, Verbout AJ, Dhert WJA. Hydrogels as extracellular matrices for skeletal tissue engineering: state-of-the-art and novel application in organ printing. *Tissue Eng* 2007;13:1905–25.
31. Peltola SM, Melchels FPW, Grijpma DW, Kellomaki M. A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes. *Ann Med* 2008;40:268–80.
32. Cooke MN, Fisher JP, Dean D, Rinnac C, Mikos AG. Use of stereolithography to manufacture critical-sized 3D biodegradable scaffolds for bone ingrowth. *J Biomed Mater Res B* 2003;64:65–9.
33. Matsuda T, Mizutani M. Liquid acrylate-endcapped biodegradable poly(ϵ -caprolactone-co-trimethylene carbonate). II. Computer-aided stereolithographic microarchitectural surface photoconstructs. *J Biomed Mater Res* 2002;62:395–403.
34. Melchels FPW, Feijen J, Grijpma DW. A poly(dl-lactide) resin for the preparation of tissue engineering scaffolds by stereolithography. *Biomaterials* 2009;30:3801–9.
35. Elomaa L, Teixeira S, Hakala R, Korhonen H, Grijpma DW, Seppälä JV. Preparation of poly(ϵ -caprolactone)-based tissue engineering scaffolds by stereolithography. *Acta Biomater* 2011;7:3850–6.
36. Arcaute K, Mann B, Wicker R. Stereolithography of spatially controlled multi-material bioactive poly(ethylene glycol) scaffolds. *Acta Biomater* 2010;6:1047–54.

37. Lu Y, Mapili G, Suhali G, Chen SC, Roy K. A digital micro-mirror device-based system for the microfabrication of complex, spatially patterned tissue engineering scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2006;77:396–405.
38. Melchels FPW, Feijen J, Grijpma DW. Poly(dl-lactide)/hydroxyapatite composite tissue engineering scaffolds prepared by stereolithography. In: 2nd Chinese–European symposium on biomaterials in regenerative medicine. 2009, paper 39015/1
39. Williams JM, Adewunmi A, Schek RM, Flanagan CL, Krebsbach PH, Feinberg SE, Hollister SJ, Das S. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials* 2005;26:4817–27.
40. Dai R, Wang Z, Samanipour R, Koo K, Kim K. Adipose-Derived Stem Cells for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Stem Cells International* 2016. Article ID 6737345, 19 pages
41. Halvorsen YDC, Bond A, Sen A, et al. Iazolidinediones and glucocorticoids synergistically induce differentiation of human adipose tissue stromal cells: biochemical, cellular, and molecular analysis. *Metabolism*, vol. 50, no. 4, pp. 407–413, 2001.
42. Halvorsen YDC, Franklin D, Bond A et al. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Engineering*, vol. 7, no. 6, pp. 729–741, 2001.

43. Estes BT, Wu AW, Guilak F. Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. *Arthritis & Rheumatism*, vol. 54, no. 4, pp. 1222–1232, 2006.
44. Y. S. Choi, K. Matsuda, G. J. Dusing, W. A. Morrison, and R. J. Dille, Engineering cardiac tissue in vivo from human adipose- derived stem cells. *Biomaterials*, vol. 31, no. 8, pp. 2236–2242, 2010.
45. S. A. Choi, J. Y. Lee, K.-C. Wang et al. Human adipose tissue- derived mesenchymal stem cells: characteristics and therapeutic potential as cellular vehicles for prodrug gene therapy against brainstem gliomas. *European Journal of Cancer*, vol. 48, no. 1, pp. 129–137, 2012.
46. B. Lindroos, R. Suuronen, and S. Miettinen. The Potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Reviews and Reports*, vol. 7, no. 2, pp. 269–291, 2011.
47. B. Fang, Y. Song, L. Liao, Y. Zhang, and R. C. Zhao. Favorable response to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in steroid-refractory acute graft -versus-host disease. *Transplantation Proceedings*, vol. 39, no. 10, pp. 3358–3362, 2007.
48. E. Gonzalez-Rey, P. Anderson, M. A. Gonzalez, L. Rico, D. Buscher, and M. Delgado. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut*, vol. 58, no. 7, pp. 929–939, 2009.
49. E. Gonzalez-Rey, M. A. Gonzalez, N. Varela et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 69, no. 1, pp. 241–248, 2010.

50. N. H. Riordan, T. E. Ichim, W.-P. Min et al. Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *Journal of Translational Medicine*, vol. 7, article 29, 2009.
51. H. L. Trivedi, A. V. Vanikar, U. akker et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells combined with hematopoietic stem cell transplantation synthesize insulin. *Transplantation Proceedings*, vol. 40, no. 4, pp. 1135–1139, 2008.
52. P.D.A.Alvarez, M. García-Arranz, T. Georgiev-Hristov, D. Garcia-Olmo. A new bronchoscopic treatment of tracheomediastinal fistula using autologous adipose-derived stem cells. *Thorax*, vol. 63, no. 4, pp. 374–376, 2008.
53. P. C. Baer and H. Geiger. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells International*, vol. 2012, Article ID 812693, 11 pages, 2012.
54. W.P. Cawthorn, E.L.Scheller, O.A.MacDougald. Adipose tissue stem cells: the great WAT hope. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 23, no. 6, pp. 270–277, 2012.
55. L. Casteilla and C. Dani. Adipose tissue-derived cells: from physiology to regenerative medicine. *Diabetes and Metabolism*, vol. 32, no. 5, pp. 393–401, 2006.
56. E. Z. Keung, P. J. Nelson, and C. Conrad. Concise review: genetically engineered stem cell therapy targeting angiogenesis and tumor stroma in gastrointestinal malignancy. *Stem Cells*, vol. 31, no. 2, pp. 227–235, 2013.
57. E. Cukierman, R. Pankov, and K. M. Yamada. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 14, no. 5, pp. 633–639, 2002.

58. D. B. Edelman and E. W. Keefer. A cultural renaissance: in vitro cell biology embraces three-dimensional context. *Experimental Neurology*, vol. 192, no. 1, pp. 1–6, 2005.
59. R. Landers, A. P. Ster, U. Hu' bner, H. John, R. Schmelzeisen, and R. Mulhaupt. Fabrication of soft tissue engineering scaffolds by means of rapid prototyping techniques. *Journal of Materials Science*, vol. 37, no. 15, pp. 3107–3116, 2002.
60. Z. Wang, R. Samanipour, K. Kim, and Z. Wang. Organ-on-a-chip platforms for drug screening and tissue engineering. In *Biomedical Engineering: Frontier Research and Converging Technologies*, vol. 9 of *Biosystems & Biorobotics*, pp. 209–233, Springer, Berlin, Germany, 2016.
61. A. G. Mikos, S. W. Herring, P. Ochareon et al. Engineering complex tissues. *Tissue Engineering*, vol. 12, no. 12, pp. 3307–3339, 2006
62. Y. Xu, G. Balooch, M. Chiou, E. Bekerman, R. O. Ritchie, and M. T. Longaker. Analysis of the material properties of early chondrogenic differentiated adipose-derived stromal cells (ASC) using an in vitro three-dimensional micromass culture system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 359, no. 2, pp. 311–316, 2007.
63. E. Cimetta, M. Flaibani, M. Mella et al. Enhancement of viability of muscle precursor cells on 3D scaffold in a perfusion bioreactor. *International Journal of Artificial Organs*, vol. 30, no. 5, pp. 415–428, 2007.
64. A. Sterodimas, J. de Faria, B. Nicaretta, and I. Pitanguy. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*, vol. 63, no. 11, pp. 1886–1892, 2010.
65. F.J. O'Brien, B.A. Harley, M.A. Waller, I.V. Yannas, L.J. Gibson, P. J. Prendergast. The effect of pore size on permeability and cell attachment in collagen scaffolds for tissue engineering. *Technology and Health Care*, vol. 15, no. 1, pp. 3–17, 2007.

66. K. Jakab, C. Norotte, F. Marga, K. Murphy, G. Vunjak-Novakovic, and G. Forgacs. Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells. *Biofabrication*, vol. 2, no. 2, Article ID 022001, 2010.
67. Y. S. Choi, L. G. Vincent, A. R. Lee et al. The alignment and fusion assembly of adipose-derived stem cells on mechanically patterned matrices. *Biomaterials*, vol. 33, no. 29, pp. 6943–6951, 2012.
68. Z. Wang, R. Samanipour, K. Koo, and K. Kim. Organ-on-a-chip platforms for drug delivery and cell characterization: a review. *Sensors and Materials*, vol. 27, no. 6, pp. 487–506, 2015.
69. C. Nie, D. Yang, and S. F. Morris. Local delivery of adipose-derived stem cells via acellular dermal matrix as a scaffold: a new promising strategy to accelerate wound healing. *Medical Hypotheses*, vol. 72, no. 6, pp. 679–682, 2009.
70. S. Heydarkhan-Hagvall, K. Schenke-Layland, J. Q. Yang et al. Human adipose stem cells: a potential cell source for cardiovascular tissue engineering. *Cells Tissues Organs*, vol. 187, no. 4, pp. 263–274, 2008.
71. H. Tapp, E. N. Hanley Jr., J. C. Patt, and H. E. Gruber. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Experimental Biology and Medicine*, vol. 234, no. 1, pp. 1–9, 2009.
72. A. Alhadlaq, M. Tang, and J. J. Mao. Engineered adipose tissue from human mesenchymal stem cells maintains pre-defined shape and dimension: implications in soft tissue augmentation and reconstruction. *Tissue Engineering*, vol. 11, no. 3-4, pp. 556–566, 2005.
73. J. Aomson, J. Itskovitz-eldor, S. S. Shapiro et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, vol. 282, no. 5391, pp. 1145–1147, 2011.

74. L. Gucciardo, R.Lories, N.Ochsenbein-Kolble, E.Done',A. Zwijsen, J. Deprest. Fetal mesenchymal stem cells: isolation, properties and potential use in perinatology and regenerative medicine. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, vol. 116, no. 2, pp. 166–172, 2009.
75. H. Zaehres and H. R. Scholer. Induction of pluripotency: from mouse to human. *Cell*, vol. 131, no. 5, pp. 834–835, 2007.
76. J. A. Thomson, J. Itskovitz-eldor, S. S. Shapiro et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, vol. 282, no. 5391, pp. 1145–1147, 2011.
77. C. Gotherstrom. Human foetal mesenchymal stem cells. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 2015.
78. K. Takahashi, K. Okita, M. Nakagawa, and S. Yamanaka. Induction of pluripotent stem cells from broblast cultures. *Nature Protocols*, vol. 2, no. 12, pp. 3081–3089, 2007.
79. P. A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, vol. 7, no. 2, pp. 211–228, 2001.
80. R.J. Martin, G.J. Hausman, D.B.Hausman. Regulation of adipose cell development in utero. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 219, no. 3, pp. 200–210, 1998.
81. S. P. Weisberg, D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel, and A. W. Ferrante Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, vol. 112, no. 12, pp. 1796–1808, 2003.
82. H. Xu, G.T.Barnes, Q.Yangetal. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 112, no. 12, pp. 1821–1830, 2003.

83. Y. G. Illouz. Body contouring by lipolysis: a 5-year experience with over 3000 cases. *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol.72, no. 5, pp. 591–597, 1983.
84. Neuber, G. Lipofilling. In Conference Proceedings of the 22nd meeting of the Deutschen Gesellschaft für Chirurgie (Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, 1893).
85. Rietjens M, Urban CA, Rey PC, et al. Long-term oncological results of breast conservative treatment with oncoplastic surgery. *Breast* 2007;16:387–395.
86. Vona-Davis L, Rose DP. Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. *Endocr Relat Cancer* 2007;14:189–206.
87. Lamszus K, Jin L, Fuchs A, et al. Scatter factor stimulates tumor growth and tumor angiogenesis in human breast cancers in the mammary fat pads of nude mice. *Lab Invest*. 1997;76:339–353.
88. Zuk PA. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell* 2010. 21: 1783-1787.
89. Park CC, Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH. The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol Med Today* 2000. 6: 324-329
90. Yu JM, Jun ES, Bae YC, Jung JS. Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo. *Stem Cell Dev* 2008. 17:463-473
91. Martin-Padura I, Gregato G, Marighetti P, Mancuso P et al. The white adipose tissue used in lipotransfer procedures is a rich reservoir of CD34⁺ progenitors able to promote cancer progression. *Cancer Res* 2012. 72: 325-334.

92. Manabe Y, Toda S, Miyazaki K, Sugihara H. Mature adipocytes, but not preadipocytes, promote the growth of breast carcinoma cells in collagen gel matrix culture through cancer-stromal cell interactions. *J Pathol*. 2003;201:221–228.
93. Schaffler A, Scholmerich J, Buechler C. Mechanisms of disease: Adipokines and breast cancer. Endocrine and paracrine mechanisms that connect adiposity and breast cancer. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007;3:345–354.
94. Iyengar P, Espina V, Williams TW, et al. Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression in vivo, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment. *J Clin Invest*. 2005;115:1163–1176.
95. Motrescu ER, Rio MC. Cancer cells, adipocytes and matrix metalloproteinase 11: A vicious tumor progression cycle. *Biol Chem*. 2008;389:1037–1041.
96. Rahimi N, Tremblay E, McAdam L, Roberts A, Elliott B. Autocrine secretion of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 by pre- adipocytes and adipocytes: A potent negative regulator of adipocyte differentiation and proliferation of mammary carcinoma cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1998;34:412–420.
97. Garofalo C, Surmacz E. Leptin and cancer. *J Cell Physiol*. 2006;207:12–22
98. French Society of Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery (Societe Francaise de Chirurgie Plastique Reconstructrice et Esthetique). Portail de la de Chirurgie Plastique, Reconstructrice et Esthetique. Available at: <http://www.plasticiens.org/>. Accessed November 17, 2017.

99. Gutowski KA; ASPS Fat Graft Task Force. Current applications and safety of autologous fat grafts: a report of the ASPS Fat Graft Task Force. *Plast Reconstr Surg*. 2009;124:272–280.
100. Rigotti G, Marchi A, Stringhini P, Baroni G, Galie` M, Molino AM, Mercanti A, Micciolo R, Sbarbati A. Determining the oncological risk of autologous lipoaspirate grafting for post- mastectomy breast reconstruction. *Aesthetic Plast Surg* 2010. 34:475
101. Delay E, Garson S, Tousson G, Sinna R. Fat injection to the breast: technique, results, and indications based on 880 procedures over 10 years. *Aesthet Surg J* 2009. 29(5):360–376.
102. Petit JY, Lohsiriwat V, Clough KB et al. The oncologic outcome and immediate surgical complications of lipofilling in breast cancer patients: a multicenter study - Milan-Paris-Lyon experience of 646 lipofilling procedures. *Plast Rec Surg* 2011. 128 (2):341-346
103. Botteri E, Bagnardi V, Rotmensz N, et al. Analysis of local and regional recurrences in breast cancer after conservative surgery. *Ann Oncol*. 2010;21:723–728.
104. Petit JY, Gentilini O, Rotmensz N, et al. Oncological results of immediate breast reconstruction: Long term follow-up of a large series at a single institution. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;112:545–549.
105. Illouz YG, Sterodimas A. Autologous fat transplantation to the breast: A personal technique with 25 years of experience. *Aesthetic Plast Surg*. 2009;33:706–715.

Materiali e Metodi

1. Iyyanki T, Hubenak J, Liu J, Chang EI, Beahm EK, Zhang Q. Harvesting technique affects adipose-derived stem cell yield. *Aesthetic Surgery Journal* 2015; 35 (4): 467–476.
2. Kornicka K, Marycz K, Tomaszewski KA, Marędziak M, Smieszek A. The effect of age on osteogenic and adipogenic differentiation potential of human adipose derived stromal stem cells (hASCs) and the impact of stress factors in the course of the differentiation process. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015; Article ID 309169, 20 pages.
3. Danielsson A, Ost A, Lystedt E, Kjolhede P, Gustavsson J, et al. Insulin resistance in human adipocytes occurs downstream of IRS1 after surgical cell isolation but at the level of phosphorylation of IRS1 in type 2 diabetes. *FEBS J* 2005; 272: 141–151.

Discussione

1. Chhaya MP, Balmayor ER, Hutmacher ER, Schantz JT. Transformation of Breast Reconstruction via Additive Biomanufacturing. *Nature Scientific Reports* 2016; 6: 28030; DOI: 10.1038/srep28030.