UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI UDINE

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE E TECNOLOGIE CLINICHE
CICLO XXVI

Tesi di Dottorato di Ricerca

CELLULE STAMINALI MULTIPOTENTI DEL TESSUTO ADIPOSO: VALUTAZIONE DELL'INFLUENZA DELLE TECNICHE DI LIPOASPIRAZIONE SULLE PROPRIETÀ DELLE ASC E APPLICAZIONI CLINICHE.

Relatore:
Prof. Carlo Moreschi

Correlatori:
Prof. Pier Camillo Parodi
Dr.ssa Daniela Cesselli

Dottorando:
Dr.ssa Lara Lazzaro

ANNO ACCADEMICO 2013 – 2014

'Il divertimento della ricerca scientifica è trovare sempre altre frontiere da superare, costruire mezzi più potenti d'indagine, teorie più complesse, cercare sempre di progredire pur sapendo che probabilmente ci si avvicinerà sempre di più a comprendere la realtà, senza arrivare mai a capirla completamente.'

Margherita Hack

SOMMARIO

1. L'ORGANO ADIPOSO

1.1 INTRODUZIONE 7

1.2 CATATTERISTICHE GENERALI 7

1.2.1 IL TESSUTO ADIPOSO BIANCO E BRUNO 7

1.2.2 COMPOSIZIONE DEL TESSUTO ADIPOSO 8

1.3 ADIPOGENESI 9

1.4 WAT E BAT 14

1.4.1 DIFFERENZE ISTOLOGICHE E CELLULARI 14

1.4.2 IL TESSUTO ADIPOSO BIANCO E LE SUE FUNZIONI 15

1.4.3 TESSUTO ADIPOSO BRUNO E LE SUE FUNZIONI 17

1.5 DISTRIBUZIONE DEI DEPOSITI ADIPOSI 19

1.5.1 DIFFERENZE FRA I DEPOSITI DI TESSUTO ADIPOSO 20

1.6 L'ORGANO ADIPOSO 24

1.6.1 RUOLO ENDOCRINO DELL'ORGANO ADIPOSO 24

1.6.2 CONTROLLO ORMONALE DEL TESSUTO ADIPOSO 28

1.6.3 INFUENZE FARMACOLOGICE SUL TESSUTO ADIPOSO 28

2. CELLULE STAMINALI DEL TESSUTO ADIPOSO

2.1 LA CELLULA STAMINALE 30

2.1.1 CELLULE STAMINALI: GENERALITA' 30

2.1.2 CELLULE STAMINALI EMBRIONALI 34

2.1.3 CELLULE STAMINALI FETALI 35

2.1.4 CELLULE STAMINALI ADULTE (O SOMATICHE) 35

2.2 CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI (MSC) 41

2.3 IL CONCETTO DI NICCHIA STAMINALE 43

2.4 CELLULE STAMINALI DEL TESSUTO ADIPOSO (ASC) 45

2.5 TESSUTO ADIPOSO E ASC: ATTUALI APPLICAZIONI CLINICHE 50

3. L'INNESTO DI TESSUTO ADIPOSO

3.1 INTRODUZIONE 50

3.2 STORIA ED EVOLUZIONE DELL'INNESTO DI TESSUTO ADIPOSO 54

3.3 LIPOSTRUTTURA "TRADIZIONALE" 58

3.4 LA NOSTRA ESPERIENZA CON L'APPLICAZIONE DEL PRESIDIO 'BODYJET' 63

3.5 DALLE TEORIE DELL'ATTECCHIMENTO AI FATTORI CHE INFLUENZANO LA STABILITÀ DELL'INNESTO 67

3.6 LA SOPRAVVIVENZA DELL'INNESTO ADIPOSO: FATTORI INFLUENTI E POSSIBILI STRATEGIE DI SUPPORTO 70

3.6.1 INFLIENZA DELLE AREE DI PRELIEVO 70

3.6.2 INFLUENZA DELLE METODICHE DI PROCESSAZIONE, LAVAGGIO E CENTRIFUGAZIONE 71

3.6.3 INFLUENZA DI FATTORI CHIMICI 72

3.6.4 INFLUENZA DELLE CELLULE STAMINALI DEL TESSUTO ADIPOSO 73

3.6.5 TESSUTO ADIPOSO E INGEGNERIA TISSUTALE 74

3.7 INNESTO DI TESSUTO ADIPOSO ARRICCHITO IN CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI 75

3.7.1 PREMESSA AL CONCETTO DI ARRICCHIMENTO 75

3.7.2 CAL (CELL-ASSISTED-LIPOTRANSFER) 76

3.8 SICUREZZA ONCOLOGICA NELL'IMPIEGO MAMMARIO DELL'INNESTO ADIPOSO ED INNESTO ADIPOSO ARRICHITO 79

4. ASPETTI LEGALI E CRITICITA'

4.1 INTRODUZIONE 83

4.2 TERAPIE AVANZATE 83

4.2.1 PRODOTTO DO INGEGNERIA TISSUTALE 84

4.2.2 PRODOTTO DI TERAPIA GENICA 84

4.2.3 PRODOTTO PER TERAPIA CELLULARE SOMATICA 85

4.3 IL CONCETTO DI "MANIPOLAZIONE" 86

4.4 SCOPO TERAPEUTICO DEL PRODOTTO CELLULARE IN BASE ALLA SUA FUNZIONE E LOCALIZZAZIONE PRIMARIA 87

4.4.1 USO OMOLOGO 87

4.4.2 USO NON OMOLOGO 87

4.5 APPLICAZIONE DELLE BUONE PRATICHE MANUFATTURIERE (GMP) 88

4.6 AVVIO DI STUDI CLINICI 88

4.7 INNESTO DI TESSUTO ADIPOSO: IL PUNTO DI VISTA GIURIDICO 90

4.8 CELLULE STAMINALI DEL TESSUTO ADIPOSO: PUNTO DI VISTA GIURIDICO 90

4.9 CRITICITA' 91

4.10 PROSPETTIVE FUTURE: LE BANCHE DEL TESSUTO ADIPOSO 92

5. LO STUDIO SCIENTIFICO

5.1 INTRODUZIONE DELLO STUDIO 93

5.2 MATERIALI E METODI 95

5.2.1 PAZIENTI ARRUOLATI PER LO STUDIO 95

5.2.2. VALUTAZIONE CLINICA E ECOGRAFICA 96

5.3 TECNICHE DI LIPOSTRUTTURA 98

5.3.1 TECNICA STANDARD 98

5.3.2 TECNICA A SEPARAZIONE ENZIMATICA 99

5.3.3 TECNICA A SEPARAZIONE MECCANICA 106

5.3.4 ISOLAMENTO E COLTURA DELLE CELLULE STAMINALI 108

5.3.5 SAGGI CELLULARI 110

5.3.6 CITOMETRIA A FLUSSO 112

5.3.7 IMMUNOFLUORESCENZA 112

5.3.8 ANALIASI STATISTICA 112

5.4 RISULTATI 114

5.4.1 RESA CELLULARE E CAPACITA' DI FORMARE COLONIE 115

5.4.2 VALUTAZIONE DELL'ARRICCHIMENTO IN CELLULE STAMINALI DOPO COLTURA ESTENSIVA 116

5.4.3 VALUTAZIONE DELLA DIFFERENZIAZIONE DELLE ASC 120

5.4.4 VALUTAZIONE CLINICO/ECOGRAFICA 124

5.5 DISCUSSIONE 127

5.6 CONCLUSIONI 132

6. CASI CLINICI

6.1 CASO CLINICO 1 134

6.2 CASO CLINICO 2 135

6.3 CASO CLINICO 3 136

6.4 CASO CLINICO 4 137

6.5 CASO CLINICO 5 138

6.6 CASI "SPECIALI": CASO CLINOCO 6 E 7 139

7. BIBLIOGRAFIA 141

1. L'ORGANO ADIPOSO

1.1 INTRODUZIONE

Il tessuto adiposo è un tessuto connettivo specializzato di origine mesodermica che fornisce supporto metabolico e strutturale agli altri tessuti e organi presenti all'interno dell'organismo.[1,2]

L'interesse della Comunità Scientifica sulle caratteristiche e l'utilizzo del tessuto adiposo è espresso dal crescente numero di studi scientifici riportati in Letteratura, che sono alla base dell'evoluzione delle conoscenze sul tessuto adiposo, in passato ritenuto svolgere un ruolo passivo nei confronti del metabolismo lipidico e dell'omeostasi energetica del corpo umano, oggi riconosciuto come un vero e proprio organo, complesso ed altamente dinamico.[2,3,4]

L'organo adiposo è strutturato a formare un sistema estremamente sofisticato, dotato di una propria anatomia con una distribuzione cellulare organizzata sostenuta da supporti vascolo-nervosi specifici, una citologia complessa e una fisiologica plasticità.[5,6]

Il riconoscimento delle caratteristiche di questo tessuto, ha fatto emergere il complesso ruolo che il tessuto adiposo riveste nei processi metabolici, endocrini e di sostegno dell'intero organismo e ha reso sempre più acceso l'interesse sul suo utilizzo a fine terapeutico nei più vari ambiti della medicina.[7,8]

1.2 CATATTERISTICHE GENERALI

1.2.1 IL TESSUTO ADIPOSO BIANCO E BRUNO

Tra le cellule che costituiscono il tessuto adiposo, quelle che lo rappresentano e identificano sono gli *adipociti*, cellule derivanti dal mesoderma embrionale, disposte a formare gruppi secondo un'architettura di tipo lobulare, e che fanno parte del cosiddetto 'tessuto connettivo di sostegno'.

Gli adipociti maturi si uniscono a formare due tipi di tessuti: il *tessuto adiposo bianco* (White Adipose Tissue – WAT) e il *tessuto adiposo bruno* (Brown Adipose Tissue - BAT).[9]

Mentre il WAT, costituito principalmente da adipociti definiti "bianchi", ha come principale funzione il deposito di trigliceridi come riserva metabolica, il BAT (adipociti "bruni") è specializzato nella dissipazione di energia attraverso la produzione di calore nella termogenesi.

Entrambi questi tessuti collaborano nel bilanciare l'energia contenuta nelle riserve lipidiche tra la termogenesi e altre funzioni metaboliche essenziali per la sopravvivenza dell'organismo, quali lattazione, risposta immune, energia per il metabolismo, funzione endocrina. Esiste anche un terzo tipo di adipocita, detto pauciloculare, che è caratterizzato da morfologia intermedia fra gli adipociti bianchi e bruni e che si può trovare in entrambi i tipi di tessuti. [6,10,11]

Negli umani adulti gli adipociti bianchi sono presenti primariamente nei depositi sottocutanei e nei depositi viscerali e le loro dimensioni variano in base all'attività della lipoprotein-lipasi (LPL), mentre gli adipociti bruni sono distribuiti principalmente in depositi molto più piccoli a livello cervicale, ascellare, sopraclavicolare, paravertebrale, mediastinico e nella parte superiore dell'addome.[12,13,14]

La percentuale relativa dei due tessuti varia in base a età, stress, condizioni metaboliche e ambientali: questa distribuzione variabile dei due tessuti implica che vi sia un'abilità di transdifferenziazione reversibile tra i due tipi adipocitari.[3]

1.2.2 COMPOSIZIONE DEL TESSUTO ADIPOSO

Gli adipociti costituiscono il 90% della massa del tessuto adiposo, anche se i tipi cellulari non adipocitari sono molto più numerosi (circa 1-2 milioni di adipociti contro 4-6 milioni di altre cellule sono presenti in 1 grammo di tessuto adiposo umano). La matrice connettivale, il tessuto nervoso, le cellule vasculo-stromali e le cellule immunitarie operano insieme agli adipociti come un'unità completamente integrata.

Tra il 60 e l'85% del peso del tessuto adiposo è composto da lipidi, di cui il 90-99% sono trigliceridi; la rimanente parte è composta da acidi grassi liberi, trigliceridi, colesterolo, fosfolipidi e piccole quantità di esteri di colesterolo e monogliceridi. Gli acidi grassi più rappresentati (90% del totale) sono il miristico, palmitico, palmitoleico, stearico, oleico e linoleico. Il restante peso del tessuto è dovuto a acqua (5-30%) e proteine (2-3%).[2,3,6]

Nel tessuto adiposo viscerale (Visceral Adipose Tissue – VAT) c'è abbondanza di stazioni linfonodali, dove si accumulano linfociti, che sembrano giocare un ruolo fondamentale nei processi immunitari, e potrebbero spiegare perché questi depositi crescano in presenza di certe patologie virali (vedi HIV).

La componente vasculo-stromale (stromal vascular cells – SVC o frazione vascolo-stromale VSF), è composta da preadipociti, cellule endoteliali, periciti, varie cellule immunitarie (macrofagi, linfociti T, neutrofili) e dalle cellule staminali multipotenti. Queste ultime, conosciute come ASCs "Adipose

(derived stromal) Stem Cells", rivestono un'importanza notevole nell'impiego del tessuto adiposo come materiale d'impianto e nello sviluppo della medicina rigenerativa e saranno ampiamente discusse nei capitoli seguenti. [2, 7, 15, 16,17]

1.3 ADIPOGENESI

Durante lo sviluppo, le cellule del tessuto adiposo originano dal mesoderma, a partire dalla quattordicesima settimana di gestazione. Nel corso del terzo trimestre, possiamo trovare adipociti nei principali siti di deposito, ma le cellule sono ancora piccole. Verso la fine della gestazione la maturazione del tessuto adiposo è guidata dalla produzione di grandi quantità della proteina UCP1, che andrà poi gradualmente a scomparire durante la vita postnatale in contemporanea alla scomparsa dei recettori per la prolattina.

L'espressione del WAT inizia subito dopo la nascita come risultato sia dell'aumento di dimensione degli adipociti esistenti (soprattutto nel primo anno di vita), sia della proliferazione dei precursori pre-adipocitari (soprattutto dopo i 18 mesi). In seguito nuove cellule saranno generate principalmente in base allo stato nutrizionale dell'individuo, fino ad arrivare al corredo medio adulto di 20-40 x 10^9 adipociti.[18,19,20,21]

La popolazione cellulare da cui origina il tessuto adiposo differenziato è costituita in prima istanza da una commistione di *pre-adipociti*/lipoblasti, dotati di caratteristiche citologiche e metaboliche peculiari.

L'adipogenesi è dunque un processo a due tappe: la prima consiste nella genesi dei precursori adipocitari a partire dalle cellule staminali mesenchimali pluripotenti o multipotenti presenti nel tessuto (MSC – mesenchymal stem cells), la seconda nella differenziazione terminale di questi pre-adipociti in cellule funzionalmente mature (*Figura 1.1*). [22]

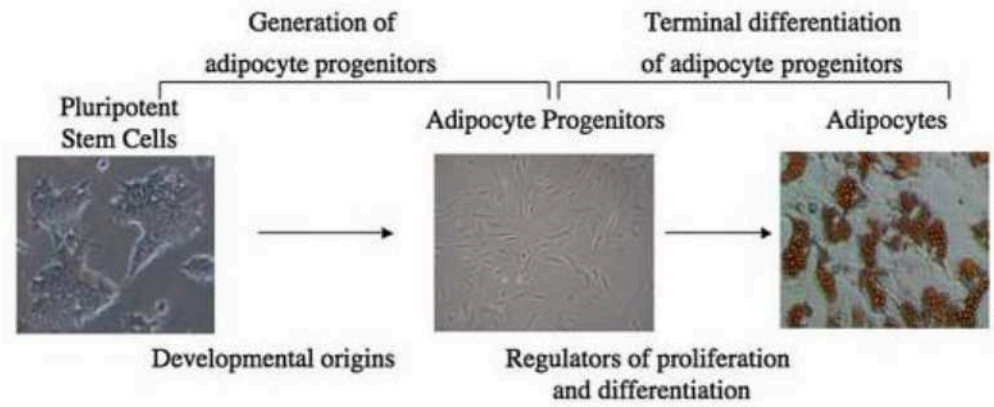


Figura1.1 Le due fasi dell'adipogenesi.
1^ fase: genesi dei precursori adipocitari; 2^fase: differenzazione.[23]

Gli adipociti hanno due possibili origini embriologiche, una dalla cresta neurale cefalica e una dal mesoderma dell'area in prossimità del tronco. Questi adipociti mostrano espressioni geniche, caratteristiche proliferative e potenzialità differenziative distinte, anche se il significato di questa variabilità è, ad oggi, sconosciuto.[23,24]

La vecchia ipotesi dell'esistenza di un progenitore comune per le cellule adipose bianche e brune è stata messa in discussione dalle evidenze scientifiche più recenti. Sembra, infatti, che le cellule adipose brune possano derivare dalla stessa cellula staminale che dà origine alle cellule muscolari (*Figura 1.2*).[11]

La frazione vasculo-stromale (SVF – Stromal Vascular Fraction) del tessuto adiposo è ricca di precursori adipocitari e, fin dal 2002, si è a conoscenza della presenza in essa di cellule CD34+/CD31- con caratteristiche immunofenotipiche di tipo mesenchimale.[23,25]

Le cellule staminali mesenchimali del tessuto adiposo (ASC) possono dare origine ai pre-adipociti (rinnovando quindi il tessuto adiposo stesso), ma anche differenziare, a seconda degli stimoli ricevuti durante lo sviluppo, verso altre linee cellulari, fra le quali ricordiamo l'endotelio, il tessuto osteo-cartilagineo e quello muscolare.

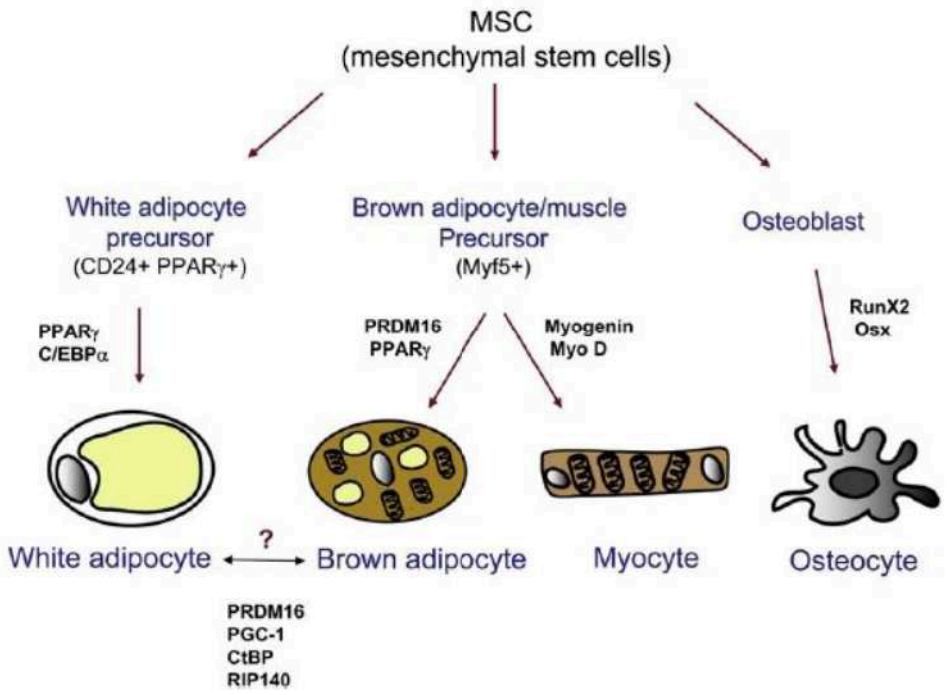


Figura1.2 Un modello per lo sviluppo delle cellule adipose bianche e brune, secondo la teoria dell'esistenza di un progenitore comune. [11]

La differenziazione adipocitaria è determinata dalla coordinata espressione di geni specifici che determinano il fenotipo caratteristico delle cellule adipose.

Possiamo distinguere tre fasi nella differenziazione: la fase precoce (early), la fase intermedia (intermediate), la fase tardiva (late), ciascuna caratterizzata da un pattern di espressione genico la cui regolazione avviene prima di tutto a livello trascrizionale (*Tabella 1.1*).[27]

FASE DI DIFFERENZAZIONE	***FATTORE ESPRESSO***
PRECOCE	C/EBPs; PPAR-γ; LPL; pref-1
INTERMEDIA	pref-1; FABP(aP2); ATP citrato liasi; Malato Deidrogenasi
TARDIVA	Adipsina; Angiotensinogeno II; Leptina; Acyl Co-A binding protein (ACBP)

Tabella 1.1 Tabella di confronto tra fase della differenziazione adipocitaria e i fattori espressi.[27]

I primi geni a essere espressi sono stati identificati studiando le linee cellulari preadipocitarie.

I precursori degli adipociti bianchi (tessuto molto più studiato e più interessante per le applicazioni in medicina rigenerativa) risiedono in prossimità delle pareti vascolari del sistema di vascolarizzazione adiposo e sono caratterizzati dall'espressione positiva di PPAR-γ (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma) e CD24.

Queste cellule precursori del WAT sono in grado di ricostruirne continuamente i depositi durante la vita adulta e possono rispondere ad un incremento della domanda di accumulo di energia aumentando la loro differenziazione.

I principali fattori di trascrizione che interrompono la proliferazione e commissionano le cellule verso la linea adipocitaria sono il, precedentemente citato, PPAR-γ e la famiglia delle C/EBPs (CCAAT/enhancer binding proteins), che sono quelle a comparsa più precoce. PPAR-γ, pur meno precoce, è considerato il principale e specifico regolatore dell'adipogenesi; senza questo recettore, i precursori cellulari sono infatti incapaci di esprimere qualsiasi aspetto riconosciuto del fenotipo adipocitario.

Più tardivamente viene espressa la lipo-protein-lipasi (LPL), indispensabile per il controllo dell'accumulo di lipidi.

Il fattore pre-adipocitario Factor-1 (pref-1) pare intervenga nel mantenimento dello stato preadipocitario, visto il decrescere dei suoi livelli durante la differenziazione.

Nelle fasi finali, gli adipociti aumentano i livelli di espressione di tutti i fattori enzimatici che servono al metabolismo dei lipidi: ATP citrato liasi, enzima malico (o malato deidrogenasi, che serve a catalizzare la carbossilazione riduttiva del piruvato a malato), GPDH (o glicerolo 3 fosfato deidrogenasi), acil sintetasi.

Altri 'prodotti tessuto specifici' che non sono direttamente collegati al metabolismo lipidico includono aP2 e la Acyl Co-A binding protein (ACBP), che fanno parte della famiglia della FABP (fatty acids binding protein).

L'Acyl Co-A binding protein si può trovare a differenti concentrazioni in molti tipi cellulari, ma i suoi livelli sono particolarmente elevati nel tessuto adiposo. Il fattore ACBP (Acyl Co-A binding protein) gioca un ruolo importante nella differenziazione degli adipociti, tanto che una sua riduzione si correla ad una perdita della differenziazione adipocitaria.

L'adipsina, l'angiotensinogeno II, la leptina e l'Acetil Co-A binding protein sono tutti considerati fattori che nell'adipogenesi contraddistinguono la fase tardiva.

Gli adipociti bruni condividono precursori (Myf5+) con le cellule muscolari, ma non con gli adipociti bianchi. L'induzione di PDRM16 nelle cellule Myf5+ dirige la differenziazione cellulare verso il fenotipo adipocitario bruno. In assenza di questo fattore, viceversa, le cellule si differenziano, in presenza di miogenina e MyoD, verso il fenotipo muscolare.

La matrice extracellulare (ECM – extra cellular matrix) è una struttura fondamentale per l'organizzazione del tessuto adiposo, essendone l'impalcatura di sostegno nella quale si svolgono alcune funzioni specifiche essenziali di questo tessuto.

Durante la differenziazione avvengono dei profondi cambiamenti nella morfologia delle cellule, nelle loro componenti citoscheletriche e nella quantità e qualità della matrice extracellulare. Uno dei cambiamenti più precoci è la perdita graduale del fenotipo simil-fibroblastico (già a livello preadipocitario). Diminuisce l'espressione di collagene di tipo I, III, VI, fibronectina, mentre aumenta la produzione del collagene di tipo IV, laminina (soprattutto isoforma 8, specifica per gli adipociti), glicosaminoglicani. La modulazione della matrice può modificare le proprietà adesive delle cellule e il rimodellamento della struttura. La sintesi attiva di collagene è indispensabile per l'acquisizione di un fenotipo cellulare maturo, come dimostrato dal fatto che la sua inibizione impedisce la differenziazione dei pre-adipociti.

Il collagene viene depositato all'interfaccia tra le cellule e la matrice a formare una membrana basale che circonda ogni singola cellula. Oltre a proteggere il tessuto dagli stress meccanici, mantenendone l'integrità e la forma, sulla superficie di questa maglia complessa sono posti fattori specifici con affinità cellulare. Grazie a questi, il tessuto si organizza in strutture complesse, organizzate in *clusters* oppure lobuli di tessuto adiposo.

La forma, struttura e composizione della matrice extracellulare sembrano giocare un ruolo importante nella riuscita delle procedure di *lipofilling*, soprattutto per quanto riguarda la sopravvivenza e la differenzazione delle cellule nella nuova sede d'impianto. La matrice costituisce infatti, in quell'unità definita 'nicchia', anche una fonte di numerosi fattori-segnale utili per la neoangiogenesi, la migrazione e proliferazione cellulare e le risposte immuni.[26,27,28,29]

1.4 WAT E BAT

1.4.1 DIFFERENZE ISTOLOGICHE E CELLULARI

Una delle caratteristiche con cui distinguere grossolanamente i depositi di tessuto adiposo bianco da quelli di tessuto adiposo bruno è la natura delle gocce lipidiche contenute all'interno delle cellule, uniloculari nel primo e multiloculari nel secondo (*Figura 1.3*).

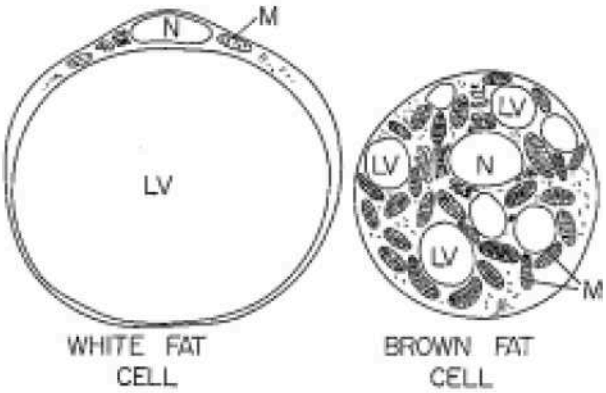


Figura1.3: Cellula adiposa bianca e bruna.

Si nota il singolo grande vacuolo della cellula "bianca" e i numerosi vacuoli più piccoli nella cellula "bruna. [2]

LV: vacuolo lipidico; M: mitocondri; N: nucleo

CELLULE UNIVACUOLARI (O BIANCHE):

Le cellule uniloculari sono caratteristiche del WAT, appaiono chiare ed hanno dimensioni che variano dai 25 ai 200 micrometri in diametro; contengono una singola goccia lipidica che, occupandone quasi l'intero volume cellulare, spinge il nucleo alla periferia della membrana plasmatica, dando alla cellula un aspetto "ad anello con castone".

I mitocondri, solitamente di forma allungata, si trovano principalmente nella porzione più spessa dell'anello citoplasmatico, vicino al nucleo, e sono quasi assenti nel resto della cellula. Sono inoltre in questa zona presenti le vescicole del Golgi, il reticolo endoplasmatico liscio (REL) e rugoso (RER) ed altri organelli.

Il vacuolo lipidico non sembra contenere al suo interno nessun organello intracellulare.

Nel WAT, pur non essendoci la spiccata vascolarizzazione caratteristica del BAT, ogni adipocita è a contatto con almeno un capillare. Questo apporto ematico è sufficiente a fornire nutrimento per il metabolismo cellulare, che avviene nel sottile anello citoplasmatico che circonda il vacuolo lipidico.[2,17]

CELLULE MULTIVACUOLARI (O BRUNE):

Dal punto di vista strutturale, le cellule multiloculari tipiche del BAT non possiedono un unico grande vacuolo ma tante vescicole intracellulari in mezzo a numerosi ribosomi e mitocondri liberi.

La cellula possiede un nucleo tondo, centrale, a margini irregolari, i mitocondri non sono allungati bensì "packed with crestae"; si possono individuare anche qui perossisomi, il complesso di Golgi, i reticoli endoplasmatici liscio (REL) e rugoso (RER), vescicole pinocitotiche ed una lamina esterna.[9]

Il colore bruno del BAT deriva dalla ricca vascolarizzazione del tessuto e dai mitocondri densamente stipati, uniti all'espressione dell'UCP1 (uncoupling protein 1). Anche il supporto nervoso è maggiormente rappresentato nel BAT rispetto al WAT.

BAT e WAT, pur essendo entrambi considerati tessuto adiposo, sono rappresentati da due tipi cellulari con caratteristiche differenti, e esprimono distinte caratteristiche anche nel loro metabolismo e nella loro funzione. La transdifferenziazione tra i due tipi cellulari, pur essendo stata dimostrata *in vitro*, è ancora sotto studio in condizioni fisiologiche.[2,5,6,30]

Le principali differenze tra BAT e WAT vengono riassunte nella seguente tabella (*Tabella.1.2*).

	Tessuto Adiposo Bianco (WAT)	***Tessuto Adiposo Bruno (BAT)***
FUNZIONE	Riserva Energetica	Produzione di Calore
MORFOLOGIA	Vacuolo lipidico singolo Numero variabile di mitocondri	Vacuoli lipidici multipli Numero abbondante di mitocondri
PROTEINA ESPRESSA	Leptina	UCP-1
EVOLUZIONE	Aumenta con l'età Dipendente da BMI	diminuisce con l'età

Tabella 1.2 Principali differenze tra WAT e BAT (modificato da [11]).

1.4.2 TESSUTO ADIPOSO BIANCO E LE SUE FUNZIONI

Il tessuto adiposo bianco costituisce la maggior parte del tessuto adiposo, è meno innervato e vascolarizzato del BAT ed è disposto prevalentemente in sede viscerale (retroperitoneale, omentale, mesenterica) e sottocutanea (a livello di fianchi, natiche, addome, regione mammaria e cosce (predisposizione femminile) e a livello del collo e delle spalle (predisposizione maschile).[31]

Il ruolo di riserva di energia, tradizionalmente attribuito al tessuto adiposo bianco, si è ormai evoluto e, per quanto sia nota la sua partecipazione ai processi energetici e termogenici, le sue capacità funzionali sono riconosciute essere molto più ampie.[32, 33]

Funzione di Riserva Energetica. Gli acidi grassi sono il prodotto quantitativamente maggiore fra i secreti del tessuto adiposo, evidenziando dunque la sua principale funzione di riserva energetica.

Funzione termoisolante. Il tessuto adiposo costituisce un pannicolo di rivestimento sottocutaneo ipodermico per gran parte della superficie corporea, grazie alle sue peculiarità chimico-fisiche evita la dispersione del calore interno formando un sistema di rivestimento coibente.

Funzione trofica, meccanica e di sostegno. Il tessuto adiposo riveste nervi, vasi e muscoli, occupa interstizi e contribuisce a delineare la forma di alcuni organi. Conferisce inoltre protezione meccanica dagli urti (ad esempio nella pianta del piede, nel palmo della mano, nei glutei, nelle membrane sinoviali, etc.).

Funzione endocrina, omeostatica e di regolazione del bilancio energetico. Le cellule adipose bianche sono anatomicamente e funzionalmente connesse con la rete vasale; i lipidi esogeni ed endogeni (di sintesi epatica) vengono rispettivamente trasportati nel flusso ematico sotto forma di chilomicroni e lipoproteine plasmatiche. Grazie alla scissione di tali composti ad opera delle lipoprotein-lipasi (LPL) presenti a livello del plasmalemma vasale, gli acidi grassi vengono captati dall'adipocita tramite pinocitosi o trasporto con albumina, per essere in un secondo momento riesterificati con il glicerolo a formare trigliceridi. L'adipocita può idrolizzare i trigliceridi neoformati in acidi grassi liberi e glicerolo, utilizzando, in qualsiasi momento, una lipasi responsiva alle catecolamine e ad alcuni ormoni, in particolare il glucagone, l'ormone somatotropo (GH), l'ACTH, la tiroxina e i glucocorticoidi che, insieme alle catecolamine, stimolano la lipolisi, mentre l'insulina stimola la lipogenesi. I lipidi conservati sono continuamente demoliti e rinnovati anche in individui in equilibrio calorico: il tessuto adiposo è una riserva energetica utilizzata esclusivamente durante le fasi di digiuno.[34]

Si è dimostrata l'attiva partecipazione del tessuto adiposo bianco a un'ampia gamma di processi fisiologici tra i quali l'infiammazione, l'apoptosi, l'angiogenesi, l'omeostasi vascolare, la coagulazione, la fibrinolisi, l'immunità e, inoltre, implicazioni dirette o indirette nei fenomeni di proliferazione, regolati dalle cellule staminali del tessuto adiposo.[35]

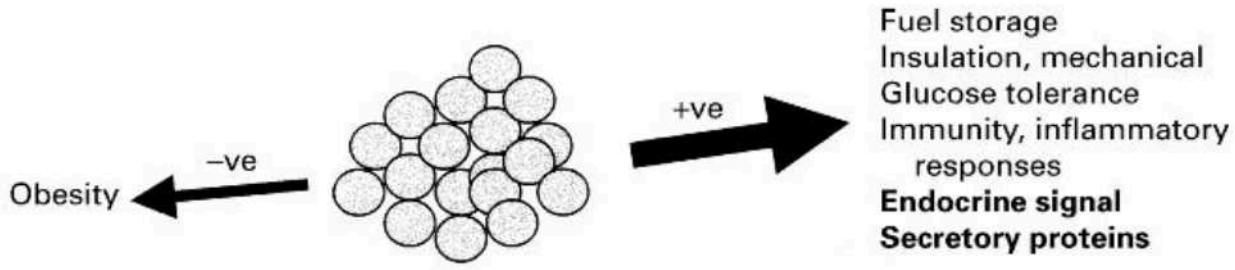


Figura 1.4 Funzioni del tessuto adiposo, è evidenziato il suo ruolo endocrino e secretivo.[26]

1.4.3 TESSUTO ADIPOSO BRUNO E LE SUE FUNZIONI

Il tessuto adiposo è molto raro, si osserva soprattutto nei neonati o negli animali ibernanti. E' differente, sia per aspetto che per caratteristiche, dal tessuto adiposo bianco.

La funzione principale del tessuto adiposo bruno è la termogenesi. Quest'azione viene svolta attraverso la degradazione dei lipidi presenti nei vacuoli ad opera di una proteina presente sulla membrana mitocondriale (*uncoupling protein 1, UCP1*), capace di disaccoppiare i processi di ossidazione e fosforilazione.[36]

Il fatto che siano presenti numerose piccole vescicole piene di acidi grassi fa sì che ci sia una maggiore superficie di contatto tra il citoplasma e il contenuto delle vescicole; gli acidi grassi sono rimossi dalla superficie delle gocce lipidiche a velocità elevata ed una loro enorme quantità è disponibile per la funzione dei mitocondri. I mitocondri ossidano gli acidi grassi producendo un gradiente protonico tra i due compartimenti mitocondriali (quello intermembrana e quello della matrice). Questo gradiente di solito viene utilizzato per produrre ATP attraverso il complesso ATPasi, ma qui avviene un processo diverso. Nella membrana interna dei mitocondri delle cellule adipose brune viene espressa una molecola caratteristica e specifica di questo tessuto, che fa da canale per il trasporto di protoni, l'UCP1 (uncoupling protein-1 / termogenina). Questa molecola induce la perdita del gradiente protonico che si è formato bypassando l'ATPasi, con produzione

diretta di calore. Gli acidi grassi sono consumati per produrre direttamente energia termica che viene ceduta al sangue circolante.

Gli accumuli di queste cellule sono localizzati nella regione interscapolare, nelle zone posterolaterali del collo, ascellare e perirenale (sede principale nell'adulto); sono riccamente vascolarizzate e contraggono rapporti stretti con fibre amieliniche, soprattutto simpatiche noradrenergiche.

Il controllo dell'attività del BAT è strettamente correlato alle fibre nervose che raggiungono ogni cellula, e, dipendente dall'adeguato supporto di ossigeno e substrati (lipidi), dai capillari che circondano le stesse.

La norepinefrina è la molecola che sembra avere la maggiore influenza sul BAT, promuovendo la proliferazione, differenziazione ed espressione del gene dell'UCP1, oltre a svolgere funzione antiapoptotica.

La perdita di questo tessuto è probabilmente effetto della transdifferenziabilità che lo caratterizza. E' stato infatti evidenziato che le cellule brune, quando non sono stimolate dal sistema nervoso, si trasformano in cellule adipose bianche uniloculari. Durante questo processo, primo fra tutto si evidenzia il cambiamento dei mitocondri che diventano più allungati, forma presente nelle cellule bianche. C'è inoltre una variazione radicale del rapporto con i vasi e i nervi. Questi cambiamenti morfologici sono accompagnati da una soppressione dell'espressione del gene della proteina UCP 1 e dal graduale aumento dell'espressione del gene della Leptina.

In ogni caso, anche se il tessuto adiposo nel suo complesso è stato riconosciuto come un organo endocrino, ad oggi il ruolo del BAT non è considerato significativo, e quindi è stato studiato in maniera molto meno estesa rispetto al WAT.[30,37]

1.5 DISTRIBUZIONE DEI DEPOSITI ADIPOSI

Nell'uomo, i depositi sottocutanei sono in continuità con il derma e sono presenti come uno strato continuo al di sotto della cute.[3]

E' evidente come sussistano differenze nei depositi di grasso corporeo che variano da individuo a individuo in base al *background* genetico (fattore principale di condizionamento), al sesso e a fattori ambientali.[2]

L'aumento o la perdita delle quantità di tessuto adiposo influisce sul peso corporeo totale, che può subire forti oscillazioni, fino a raggiungere e superare i limiti fisiologici e giungere a stati patologici quali l'obesità e l'anoressia.

Negli adulti mediamente l'organo adiposo conta per l'8-18% del peso nel sesso maschile e per il 14-28% del peso nel sesso femminile (e fino al 60% del peso in condizioni patologiche), essendo quindi uno dei tessuti più rappresentati.[3,15]

Il pannicolo adiposo sottocutaneo, fortemente sviluppato ed uniformemente distribuito alla nascita, tende successivamente a localizzarsi qualitativamente e quantitativamente in modo differente nelle varie regioni corporee, principalmente come conseguenza dello sviluppo sessuale e del progredire dell'età.[7]

I depositi sottocutanei (SAT – subcutaneous adipose tissue) contengono più dell'80% del grasso corporeo. Tra essi, i più studiati sono il gluteo, l'addominale e il trocanterico.

Sussistono, inoltre, depositi associati agli organi interni (VAT – visceral adipose tissue), soprattutto a livello intraperitoneale e retroperitoneale (10-20% circa del peso nell'uomo e 5-10% del peso nella donna). Tra essi, i più rappresentativi sono il grasso omentale, mesenterico ed epiploico.[15]

Ci sono anche numerosi altri piccoli depositi come l'epicardico e l'intermuscolare che possono svolgere funzioni specializzate per conto degli organi adiacenti o adiuvare le funzioni meccaniche e biologiche muscolari.[10]

Un recente studio condotto da Sbarbati e collaboratori [38] tramite microscopia ottica ed elettronica ha dimostrato una possibile ulteriore suddivisione del WAT basata su caratteristiche strutturali ed ultrastrutturali degli adipociti e del tessuto interstiziale interadipocitario.

Le tre tipologie di grasso sottocutaneo identificate sono:

- **tessuto adiposo bianco di deposito** (dWAT), si può trovare principalmente in grandi depositi adiposi nell'area addominale periombelicale. Le cellule, di grandi dimensioni sono a stretto contatto tra loro e interconnesse da poche fibre collagene isolate. La vascolarizzazione, scarsa, è caratterizzata da vasi a pareti sottili e bassa componente cellulare staminale del tessuto adiposo;

- **tessuto adiposo bianco strutturale** (sWAT), è localizzato in alcune aree degli arti (es. mediogenuale e sovratrocanterica) e dei fianchi. Ha una maggior componente stromale, buona vascolarizzazione ed elevata staminalità. Le cellule sono avvolte da una fitta impalcatura collagenica;

- **tessuto adiposo bianco fibroso** (fWAT), è localizzato nelle aree sottoposte a stress meccanico severo e cronico. Ha un'elevata componente fibrosa, ogni adipocita è individualmente circondato da un "guscio" di tessuto fibroso.

Sulla base di quest'ultima classificazione del tessuto adiposo è possibile ipotizzare che lo sWAT rappresenti il tessuto adiposo più idoneo da utilizzare nella pratica del *lipotransfer*.[38]

1.5.1 DIFFERENZE TRA I DEPOSITI DI TESSUTO ADIPOSO

I vari depositi dell'organismo differiscono in tutte le loro componenti: composizione cellulare, componente microvascolare, innervazione, caratteristiche metaboliche, matrice extracellulare e produzione secretoria.

In generale, il VAT rispetto al SAT è più cellulato, innervato, irrorato e contiene un gran numero di cellule infiammatorie e immunitarie, meno capacità differenziativa dei preadipociti e solitamente una maggior quantità percentuale di adipociti di grandi dimensioni.

Queste differenze nelle sottopopolazioni contribuiscono alla variabilità morfo-funzionale deposito-specifica del tessuto adiposo, messa in evidenza da distinte produzioni di adipochine (termine generalmente usato per indicare i prodotti di secrezione del tessuto adiposo) e relative interazioni paracrine.[15,39]

La localizzazione anatomica dei depositi sembra giocare un ruolo fondamentale nell'attività endocrina: gli ormoni che derivano dai depositi viscerali vengono rilasciati nell'albero portale e

hanno accesso diretto al fegato, mentre quelli secreti dai depositi sottocutanei sono rilasciati nel sistema circolatorio sistemico.[7]

Anche la lipolisi (ovvero l'idrolisi dei trigliceridi in acidi grassi liberi e glicerolo), la sintesi e il deposito di trigliceridi variano in base alla sede occupata dal tessuto nell'organismo.

Il numero delle cellule pre-adipocitarie per grammo di tessuto adiposo è maggiore nei depositi sottocutanei rispetto a quelli viscerali.[40] L'espressione delle citochine proinfiammatorie (IL-6, IL-8, MCP-1, RANTES, MIP-1a, PAI-1) è viceversa superiore nel VAT, mentre l'espressione di IL-10 e leptina è maggiore nel SAT.[41] Addizionalmente, le molecole coinvolte nell'immunità innata e nella risposta di fase acuta e i fattori del complemento sono iperespressi nel VAT. Le differenze ad oggi conosciute tra i depositi nell'espressione di TNFα e adiponectina sembrano invece non essere rilevanti.[15]

Addizionalmente vi sono differenze anche nell'espressione di specifici pattern recettoriali che influenzano l'abilità di rispondere ai segnali afferenti. Come esempio, l'espressione di AT1, glucocorticoidi e recettori androgeni è maggiore nei depositi viscerali rispetto ai sottocutanei.[7]

1.6 L'ORGANO ADIPOSO

1.6.1. RUOLO ENDOCRINO DELL'ORGANO ADIPOSO

Le cellule adipose e, più in generale, il tessuto che le contiene vengono oggi considerati come un vero e proprio organo endocrino con funzione autocrina e paracrina. L'adipocita è infatti in grado di rilasciare numerose molecole fondamentali per l'omeostasi di tutto l'organismo: leptina (ormone coinvolto nei meccanismi di sazietà, riproduzione, angiogenesi, immunità, fertilità), adiponectina, IL-6, IL-8, TNF e resistina (coinvolti nel metabolismo glucidico e nei meccanismi d'insulino-resistenza), angiotensinogeno e PAI-1 (con influenza sul sistema cardiovascolare).[42]

Le aromatasi presenti sulla superficie adipocitaria determinano inoltre la capacità di tali cellule di agire su alcuni ormoni, in particolare gli steroidi sessuali, ed, in alcuni casi, a modificare l'equilibrio ormonale (es. la mascolinizzazione delle donne obese).

A sua volta la distribuzione dell'adipe nel corpo risente, oltre che della predisposizione genetica, dell'influenza degli ormoni sessuali; il testosterone tende a distribuire il grasso principalmente nell'addome mentre gli estrogeni sui fianchi.[32, 37,43]

Le principali adipochine rilasciate dall'organo adiposo sono la leptina e l'adiponectina:

- **Leptina**:

  è una "cytokine-like protein" secreta dal tessuto adiposo, anche se piccoli livelli possono essere rinvenuti a livello placentare, muscolare scheletrico, gastrico, cerebrale e nell'epitelio mammario. La leptina in circolo aumenta con l'aumento della massa grassa.

  Il principale ruolo della leptina è il controllo dell'appetito.

  Visto all'inizio come un ormone anti-obesità, in realtà il suo ruolo principale è di segnale metabolico d'insufficienza energetica piuttosto che di eccesso.

  Addizionalmente ai suoi effetti sull'omeostasi energetica, la leptina regola la funzione neuroendocrina e il sistema endocrino tradizionale, la funzione immunitaria, l'angiogenesi e lo sviluppo osseo, promuove la proliferazione e la differenziazione delle cellule ematopoietiche, altera la produzione delle citochine da parte delle cellule immunitarie, stimola la crescita delle cellule endoteliali e accelera la guarigione delle ferite.[4,7,32,43,44]

La leptina è stata identificata nella regolazione della proliferazione cellulare e nella neovascolarizzazione in tessuti tumorali e tessuti sani di diverse origini (ad es. nel tessuto mammario normale e nel carcinoma della mammella).[45]

- **Adiponectina**:
  è altamente e specificatamente espressa negli adipociti differenziati e circola ad alte concentrazioni nel flusso sanguigno. Aumenta la sensibilità all'insulina, riduce l'*output* epatico del glucosio, stimola l'utilizzo del glucosio e l'ossidazione degli acidi grassi a livello muscolare.

  Inibisce, inoltre, l'adesione monocitaria, la trasformazione macrofagica in cellule schiumose e decresce la proliferazione delle cellule muscolari lisce migranti in risposta ai fattori di crescita, avendo quindi un effetto positivo sull'aterosclerosi.

  Addizionalmente stimola l'angiogenesi e la produzione di NO, ha effetti modulatori sull'NfκB e inibisce il TNF-α.

  Sommando tutte queste caratteristiche, possiamo affermare come l'adiponectina sia uno specifico ormone di derivazione adipocitaria con effetti anti-diabetici, anti-infiammatori e anti-aterogenici. [4,7,32,43,46,47]

  I livelli di Adiponectina sono correlati inversamente con lo sviluppo del carcinoma dell'endometrio e del carcinoma della mammella, con un meccanismo non ancora chiaramente definito.

Il ruolo di questi secretormoni è stato indagato in riferimento al possibile effetto dell'innesto di tessuto adiposo in tessuti tumorali (*Tabella 1.3, Figura 1.4*).[45]

Riferimento	*Anno*	*Tipo di studio*	*N°pz.*	*Risultati*
Mantzoros C. e coll.	2004	Caso-controllo	174	Correlazione inversa tra livelli di adiponectina sierica e rischio di cancro al seno nelle donne in postmenopausa
Kömer A. e coll.	2007	Caso-controllo e sperimentale	74	Donne con livelli di adiponectina maggiori mostrano un rischio di cancro al seno minore del 65%
Tworoger SS. e coll.	2007	Caso-controllo prospettico	1477	Correlazione inversa tra livelli di adiponectina sierica e rischio di cancro al seno nelle donne in postmenopausa
Kang JH. e coll.	2005	Sperimentale in vitro	/	Arresto della crescita cellulare e stimolo apoptotico da parte dell'adiponectina nelle linee cellulari del cancro al seno ER negative
Nakayama S. e coll.	2008	Sperimentale in vitro	/	L'adiponectina diminuisce la proliferazione delle cellule tumorali inibendo l'ingresso nella fase S del ciclo cellulare senza indurre apoptosi
Miyoshi Y. e coll.	2006	Sperimentale su campioni tissutali	91	La leptina e i pathway Lep-R(L)/Lep-R(S) sono implicate nella tumorigenesi del cancro del seno
Mantzoros CS. e coll.	1999	Caso-controllo	83	La leptina non sembra incrementare il rischio di cancro nelle pazienti in pre-menopausa
Wu MH. e coll.	2009	Caso-controllo	297	Valori maggiori di Leptina sembrano significativamente associati con un aumento del rischio di cancro al seno
Nkhata KJ. e coll.	2009	Sperimentale in vitro	/	L'incremento Adiponectina/Leptina risulta in una diminuita proliferazione delle linee cellulari cancerose MCF-4 e T47-D

Tabella 1.3 Indagini sulla correlazione tra i livelli di adiponectina e leptina e il rischio di carcinoma mammario. [45]

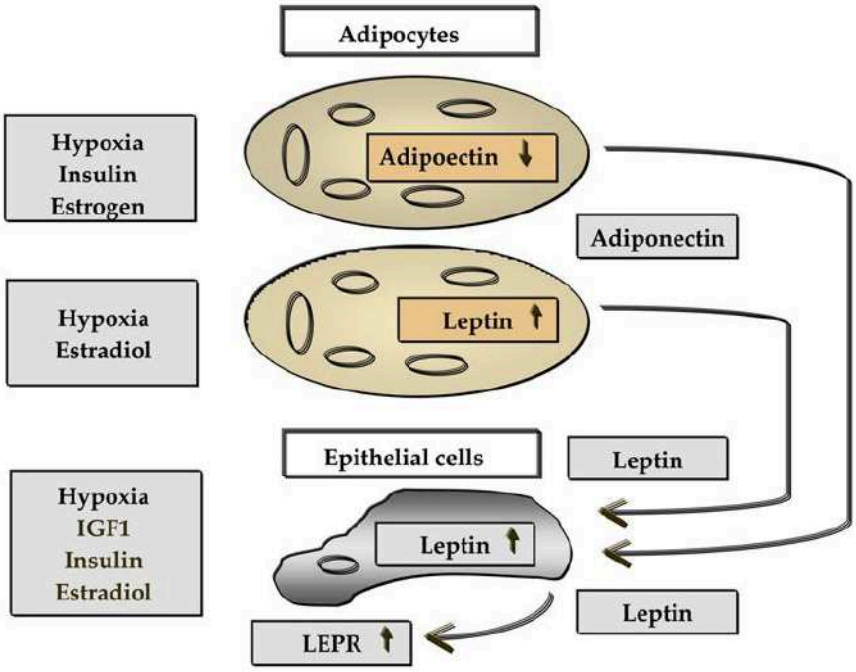


Figura.1.4: Effetto di alcuni ormoni e dell'ipossia sui livelli di Adiponectina e Leptina. [45]

Il tessuto adiposo è in grado di esprimere adipokine coinvolte nell'infiammazione.

Quest' aspetto sembra influire in ambiti quali la coltura adipocitaria, la funzione trofica e rigenerativa dell'innesto adiposo, nonché la sopravvivenza e stabilità degli innesti nella lipostruttura (*Figura 1.5*).[4]

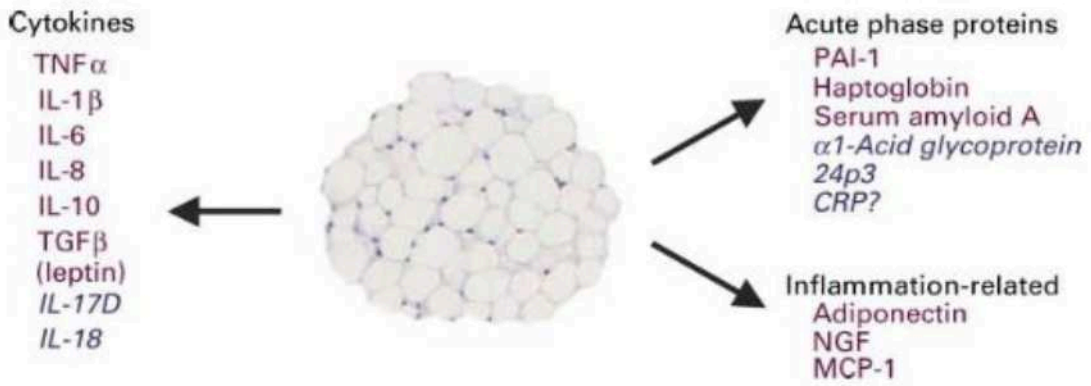


Figura 1.5: Proteine infiammatorie e della fase acuta secrete dagli adipociti. Le proteine in viola sono state identificate come adipochine (è stata dimostrata la loro secrezione adipocitaria), quelle in blu sono ipotizzate come tali.[43] CRP: proteina C-reattiva; IL: interleukchina; NGF: nerve growth factor; PAI-1: inibitore dell'attivazione del plasminogeno-1; TGF-b: transforming growth factor-b; TNF-a: tumour necrosis factor-a; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1.

- **TNF-α:**

  è attualmente l'elemento di maggior interesse scientifico. E' una citochina inizialmente descritta come un fattore endotossina-indotto che causa la necrosi dei tumori, ma è conosciuto anche per le sue proprietà immunomodulatorie e proinfiammatorie.

  Gioca anche un ruolo centrale nell'apoptosi e nella citotossicità e nella produzione di IL-1, IL-6, delle proteine di fase acuta, dell'aptoglobina e della neurotrofina NGF.

  Nel tessuto adiposo, il TNF-α reprime i geni coinvolti nella captazione e nel deposito dei NEFA (acidi grassi non esterificati) e del glucosio, sopprime i geni che codificano per i fattori della trascrizione coinvolti nell'adipogenesi e nella lipogenesi, e cambia l'espressione di svariate adipochine, quali l'adiponectina e l'IL-6.[4,7, 37,43,48,49,50]

- **IL-6:**

  citochina pro-infiammatoria ampiamente studiata nel WAT.

E' espressa e secreta dagli adipociti, e circola ad alti livelli nel flusso sanguigno. La quantità prodotta dal tessuto adiposo conta per circa un terzo di tutta l'IL-6 circolante. Essa agisce a svariati livelli centrali e periferici per influenzare il peso dell'organismo, l'omeostasi energetica e la sensibilità insulinica.

I livelli di IL-6 circolanti sono, inoltre, di primaria importanza nel controllo della produzione delle proteine della fase acuta a livello epatico (ovvero la rapida risposta coordinata dall'organismo per attivare i meccanismi difensivi, eliminare le cellule danneggiate, contenere i patogeni e iniziare la riparazione tissutale).

Il-6 inoltre inibisce l'adipogenesi e diminuisce la secrezione di adiponectina. [4,7, 37,51,52]

La lista dei fattori, proteici e non, secreti dal WAT è ormai estremamente estesa, e la conoscenza delle funzioni che influenza all'interno di processi metabolici dell'organismo si sta ampliando (T*abella 1.4*).

Sostanza	*Effetto Biologico*
Leptina	Segnale verso il SNC riguardo le riserve energetiche dell'organismo
Adiponectina	Incrementa la sensibilità all'insulina, è antiinfiammatoria e attenua la progressione dell'aterosclerosi
Resistina	Incrementa la sensibilità all'insulina
TNF-α	Lipolitica, incrementa il consumo di energia e riduce la sensibilità all'insulina
Interleuchina-6	Proinfiammatoria, lipolitica, riduce la sensibilità all'insulina
Adipsina	Attiva la via alternativa del complemento
ASP	Stimola la sintesi di triacilglicerolo nel WAT
Angiotensinogeno	Precursore dell'Angiotensina II, coinvolta nella regolazione della pressione arteriosa
PAI-1	Inibisce l'attivazione del plasminogeno, bloccando la fibrinolisi
Fattore tissutale	Inizia la cascata coagulativa
VEGF	Stimola l'angiogenesi nel WAT
Visfatina	Insulinomimetico principalmente prodotto dal grasso viscerale
Monobutirina	Vasodilatatore e induttore dell'angiogenesi
TGF-β	Regola processi importanti nel WAT, quali proliferazione dei Pre-adipociti e differenziazione, sviluppo e apoptosi degli adipociti
IGF-1	Stimola la proliferazione e la differenziazione adipocitaria
HGF	Stimola la differenziazione e lo sviluppo degli adipociti
MIF	Immunoregolatore del WAT ad azione paracrina
LLP	Enzima stimolante l'idrolisi dei tricaligliceroli contenuti nelle lipoproteine (VLDL e chilomicroni)
CETP	Trasferisce gli esteri del colesterolo tra le lipoproteine
Apo-E	Componente delle lipoproteine, soprattutto VLDL
Prostaglandine	Regolazione di molti processi cellulari, attiva durante l'infiammazione, coagulazione sanguigna, ovulazione e secrezione gastrica acida
Estrogeni	Prodotti grazie all'azione dell'aromatasi, è la principale fonte di estrogeni nell'uomo e nella donna in post-menopausa
Glucocorticoidi	Generati dall'azione della 11-idrossisteroido deidrogenasi tipo II, che trasforma il cortisone in cortisolo nel WAT.

Tabella 1.4 Fattori proteici e non proteici prodotti e secreti dal WAT. [43]

ASP – Acylation stimulating protein; CETP – cholesterol ester transferase protein; CNS – central nervous system; HGF – Hepatocyte growth factor; IGF-1 – insulin-like grow factor 1; LLP – lipoprotein lipase; MIF – Macrophage migration inhibitory factor; PAI-1 – plasminogen activation inhibitor; TGF-β – transforming growth factor-β; TNF-α – tumor necrosis factor-α; VEGF – vascular endothelial growth factor; VLDL – very low density lipoprotein.

Dall'ampio spettro di segnali proteici e fattori identificati appare dunque evidente come il tessuto adiposo sia in realtà un organo secretorio ed endocrino di notevole complessità, altamente integrato nei processi fisiologici e nel controllo metabolico dei mammiferi. [37]

1.6.2. CONTROLLO ORMONALE DEL TESSUTO ADIPOSO

Studi *in vitro* in condizioni controllate indicano come il cortisolo e l'insulina facilitino l'accumulo lipidico tramite l'aumento dell'espressione della LPL.

L'ormone della crescita (GH – growth hormone) e il testosterone hanno l'effetto opposto e spingono il metabolismo verso una mobilizzazione lipidica.

Gli effetti del cortisolo sono mediati da un recettore glucocorticoide: in presenza di insulina, il cortisolo esercita una potente azione pro-accumulatoria nei confronti dei lipidi; questa azione viene viceversa abolita in presenza di GH.

Gli effetti del testosterone vengono mediati da un recettore androgeno: questo ormone inibisce l'effetto LPL-attivante del cortisolo e regola la mobilitazione lipidica in una maniera spiccata e multisfaccettata.

La densità dei recettori di questi ormoni appare maggiore nel VAT.

Gli ormoni sessuali femminili hanno a loro volta effetti sul metabolismo del tessuto adiposo, ma necessitano anch'essi di recettori specifici, mediando un effetto che sembra simile a quello del testosterone.[53]

1.6.3. INFLUENZE FARMACOLOGICHE SUL TESSUTO ADIPOSO

Diversi sono gli impulsi o gli interventi (sia farmacologici che non farmacologici) che influenzano le citochine plasmatiche e, quindi, il livello delle adipochine circolanti.

Farmaci studiati per i loro effetti sul tessuto adiposo includono: orlistat, sibutramina, salicilati, β-bloccanti, antagonisti aldosteronici, ACE-inibitori, sartanici, statine, fibrati, metformina, tiazolidinedioni. Possiamo di seguito osservare una tabella che va a riassumere il loro meccanismo di azione e i loro effetti sulle adipochine (*Tabella 1.5*).[54]

Intervento-Farmaci	*Meccanismo di azione*	*Effetto su citochine e adipochine*
Dieta	Perdita di peso	Adiponectina ↑, leptina ↓, IL-6 ↓, sTNF-α recettore tipo 1 ↓
Chirurgia bariatrica	Perdita di peso Effetti sugli ormoni intestinali	Adiponectina ↑, HMW adiponectina ↑, RBP-4 ↓, PAI-1 ↓, MIF ↓, MCP-1 ↓, Il-18 ↓
Esercizio	Perdita di peso	Adiponectina ↑, resistina ↓, RBP-4 ↓, IL-6 ↓, IL-18 ↓
Sibutramina	Perdita di peso	Adiponectina ↑, resistina ↓, leptina ↓, IL-6 ↓, TNF-α ↓, IL-10 ↓
CB1-antagonisti	Perdita di peso Effetti tramite l'attivazione della PPARγ	Adiponectina ↑, leptina ↓,
Salicilati	Perdita di peso Inibizione COX-2	Adiponectina ↑,
Beta-bloccanti	Attivazione del recettore β2	Adiponectina ↑, leptina ↓,
Antagonisti aldosteronici	Antagonismo all'azione dell'aldosterone	PAI-1 ↓
ACE-inibitori	Inibizione del sistema renina-angiotensina	Adiponectina ↑
Bloccanti Rec.Tipo 1 angiotensina II	Inibizione del sistema renina-angiotensina Effetti tramite l'attivazione della via PPARγ	Adiponectina ↑, IL-6 ↓, TNF-α ↓
Inibitori dell'HMG-CoAReduttasi	Effetti anti-infiammatori	Adiponectina ↑↓, visfatina ↓
Fibrati	Effetti tramite l'attivazione della via PPARα Effetti tramite l'attivazione della via PPARγ	Adiponectina ↑, RBP-4 ↓, PAI-1 ↓,MCP-1 ↓, IL-6 ↓, TNF-α ↓
Metformina	Effetti anti-infiammatori Attivazione AMPK	Vaspina ↓, MIF ↓
Tiazolidinedioni	Effetti tramite l'attivazione della via PPARγ	Adiponectina ↑, HMW adiponectina ↑, Leptina ↑, RBP-4 ↓, PAI-1 ↓

Tabella 1.5 Effetti differenziali di svariate strategie terapeutiche sul tessuto adiposo.[54]

AMPK: AMP protein-kinasi attivata; CB-1 antagonisti: antagonisti dei cannabinoidi-1; IL: interleuchina; MCP-1: proteina chemoattrattiva per i monociti-1; MIF: fattore inibitore dei macrofagi; PAI-1: inibitore dell'attivatore del plasminogeno; PPAR: recettori attivati della proliferazione perossisomiale; RBP-4 Proteina legante il retinolo-4; TNF-α: tumor necrosis factor α.

2. CELLULE STAMINALI DEL TESSUTO ADIPOSO

2.1 LA CELLULA STAMINALE

2.1.1 CELLULE STAMINALI: GENERALITA'

Lo sviluppo di un organismo multicellulare è raggiunto attraverso una serie di eventi programmati nel genoma di ogni individuo. Le cellule fondamentali per questo processo sono indubbiamente le cellule staminali, che vengono definite e contraddistinte da tutte le altre cellule del corpo in base a due caratteristiche principali:

1. *Autorinnovamento*: sono cellule specializzate/indifferenziate con capacità di autorinnovamento (self-renewal) tramite divisione cellulare (intesa come abilità di dare origine a una –divisione asimmetrica- o entrambe –divisone simmetrica- le cellule figlie aventi lo stesso potenziale di divisione) per un tempo indefinito, alle volte anche dopo lunghi periodi di inattività.

2. *Differenziamento*: se sussistono le giuste condizioni ambientali, o i giusti segnali da parte dell'ambiente circostante, possono essere indotte a diventare cellule tessuto- o organo-specifiche (cellule progenitrici senza abilità di autorinnovamento - nonrenewing progenitors – o cellule effettrici con differenziazione terminale) aventi l'abilità di differenziarsi (ovvero il potenziale di evolvere in altri tipi cellulari).

La cellula staminale fondamentale è lo *Zigote*. E' una cellula definita totipotente, poiché capace di dare origine a tutti i tipi cellulari presenti nell'individuo al termine dello sviluppo, incluso il trofoblasto e tutte le membrane embrionali (*Figura 2.1*).

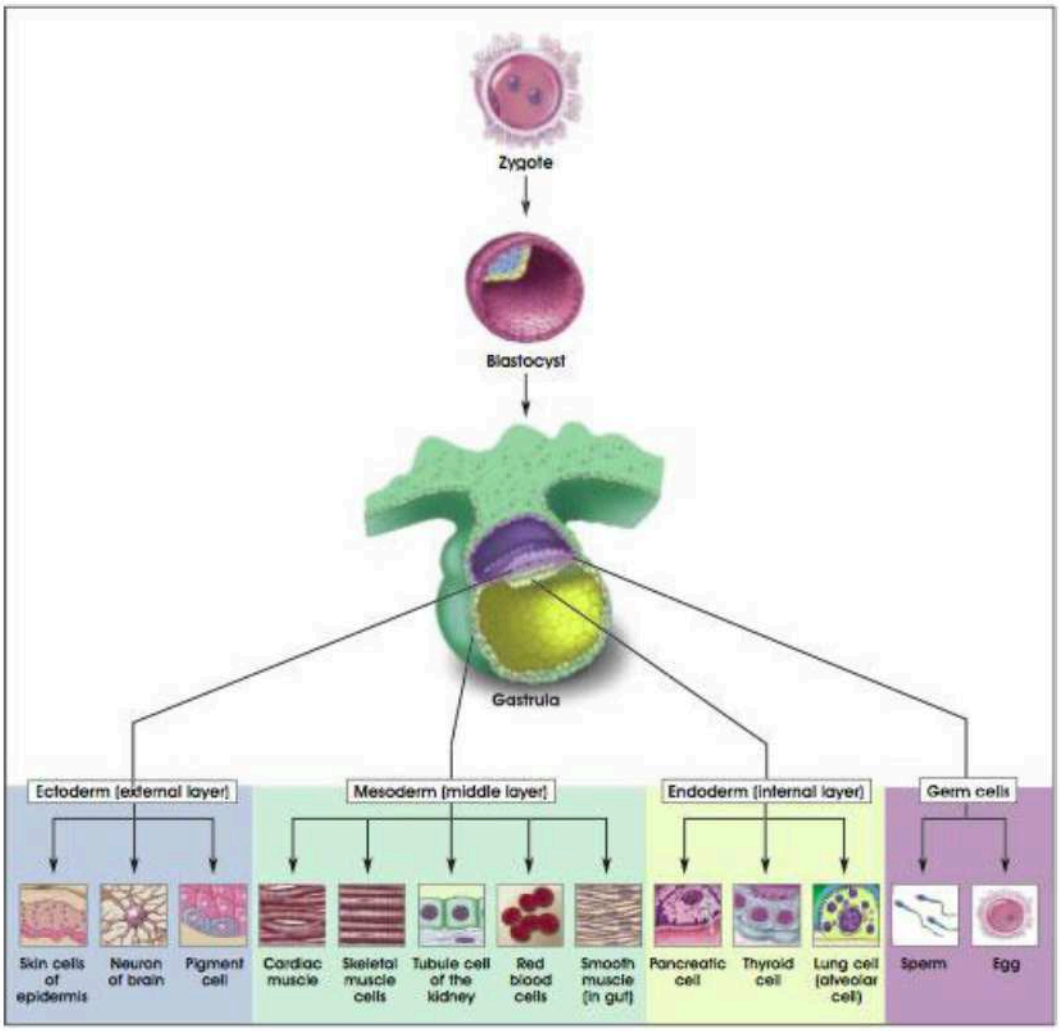


Figura 2.1 Differenzazione dei tessuti umani. (© 2001 Terese Winslow, Caitlin Duckwall, 2017)

Nelle fasi iniziali dello sviluppo la divisione cellulare è *simmetrica*, le cellule figlie hanno cioè lo stesso potenziale della cellula madre, e sono uguali ad essa (*Figura 2.2)*: [55]

Figura 2.2 Divisione simmetrica. [55]

Dopo diverse divisioni cellulari, questa cellula staminale origina i tre foglietti embrionari (ectoderma, mesoderma, endoderma) e le cellule germinali.

Con la prosecuzione dello sviluppo, oltre alla proliferazione cellulare, si susseguono una serie di eventi, inclusi il commissionamento verso un fenotipo specifico, la progressione lungo questo nuovo fenotipo e la sua piena espressione a livello cellulare (lineage commitment, progression, expression).

In questa fase le cellule cominciano a dividersi in maniera *asimmetrica*, dando origine a cellule figlie di natura differente l'una dall'altra: una cellula manterrà le caratteristiche della cellula staminale, mentre l'altra, che verrà chiamata cellula progenitrice, acquisirà un potenziale differenziativo specifico verso un fenotipo tissutale specializzato (*Figura 2.3*).[56,57]

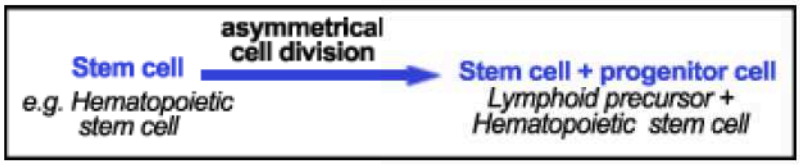


Figura 2.3 Divisione asimmetrica 1: una cellula manterrà le caratteristiche della cellula staminale, mentre l'altra acquisirà un potenziale differenziativo specifico verso un fenotipo tissutale specializzato.[55]

Nell'ultima parte dello sviluppo, queste cellule progenitrici così formate si dividono in maniera sempre asimmetrica, ma non sarà più presente nessuna cellula con caratteristiche staminali tra le cellule figlie (*Figura 2.4*).

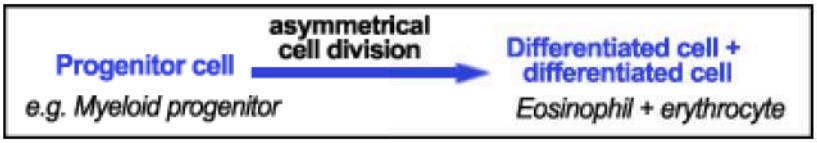


Figura 2.4 Divisione asimmetrica 2. Non vi è più alcuna cellula staminale tra le cellule figlie.[55]

La progressione sequenziale delle cellule tra questi cicli di eventi porta, attraverso l'ottenimento di cellule differenziate prima, e di veri e propri tessuti ed organi poi, alla formazione dell'intero individuo.

La maggior parte delle cellule staminali entrano nel ciclo descritto, fino alla differenziazione terminale, ma alcune di esse lasciano questo continuum evolutivo per divenire cellule di riserva

(precursori/cellule progenitrici), coinvolte nel mantenimento e nella riparazione dei tessuti e degli organi lungo l'intera durata della vita.

Possiamo anche dividere queste cellule in due macro-categorie in base al loro potenziale differenziativo (*tabella 2.1*): cellule progenitrici *lineage-committed* (multipotenti, oligopotenti, unipotenti) e cellule progenitrici *lineage-uncommitted* pluripotenti (epiblasto-simili). [58]

Nel passato, era universalmente riconosciuto che le cellule precursori post-natali fossero limitate al tipo *lineage-committed,* specifiche per singoli organi o tessuti, ma non capaci di autorinnovamento. Più recentemente, Young e colleghi hanno scoperto la presenza di cellule di tipo *lineage-uncommitted* nei tessuti post-natali.[58]

Categoria	Potenziale differenziativo	Definizione	Esempio cell. staminale
Lineage-uncommitted Pluripotent Stem Cells (Cellule staminali Pluripotenti)	*Totipotenti*	Abili a differenziare in tutti i tessuti embrionari ed extra-embrionari e sufficienti a formare l'intero organismo	Zigote, blastomero
	Pluripotenti	Abili a formare tutte le linee cellulari dell'organismo (incluse le cellule germinali), e alcuni o tutti i tipi cellulari extraembrionari	Cellule staminali embrionarie, cellule degli strati ectodermico, mesodermico, epidermico
Lineage-committed Progenitor Cells (Cellule progenitrici)	*Multipotenti*	Abili a formare interi tessuti, anche più di uno	Cellule ematopoietiche
	Oligopotenti	Abili a dare forma a un insieme di lignaggi cellulari più ristretto delle cellule staminali multipotenti, di solito uno o due lignaggi in un tessuto	Precursore mieloide
	Unipotenti	Abili a contribuire alla formazione di un solo tipo cellulare maturo	Precursori dei mastociti

Tabella 2.1 Classificazione delle cellule staminali.

Questa classificazione rigida delle potenzialità delle cellule staminali, è diventata oggi più sfumata grazie alla recente introduzione del concetto di *plasticità*, presente soprattutto tra cellule pluripotenti e multipotenti.[59,60]

Le cellule staminali possono essere classificate anche in base alla fonte d'origine: embrionali, fetali o adulte.

2.1.2 CELLULE STAMINALI EMBRIONALI

Le cellule staminali embrionali sono pluripotenti e sono ricavate dalla massa cellulare interna della blastocisti pre-impianto (embrione di 3-5 giorni di vita).[61]

Le cellule staminali embrionali umane, che possiedono l'abilità di proliferare apparentemente in maniera indefinita *in vitro* e che hanno la capacità di differenziare in ogni tipo di cellula somatica, sono un'importante fonte potenziale di cellule staminali da utilizzare a scopi terapeutici.[62] Queste cellule possiedono *in vitro* un potenziale differenziativo e di divisione superiore rispetto alle cellule staminali fetali e adulte, verso cellule di tipo neuronale (neuroni, oligodendrociti e glia),[63] cardiomiocitario [64], osteoblastico[65], epatocitario e ematopoietico[66], dimostrando l'enorme futuro che potrebbe avere la sperimentazione in questo campo (*Figura 2.5*).

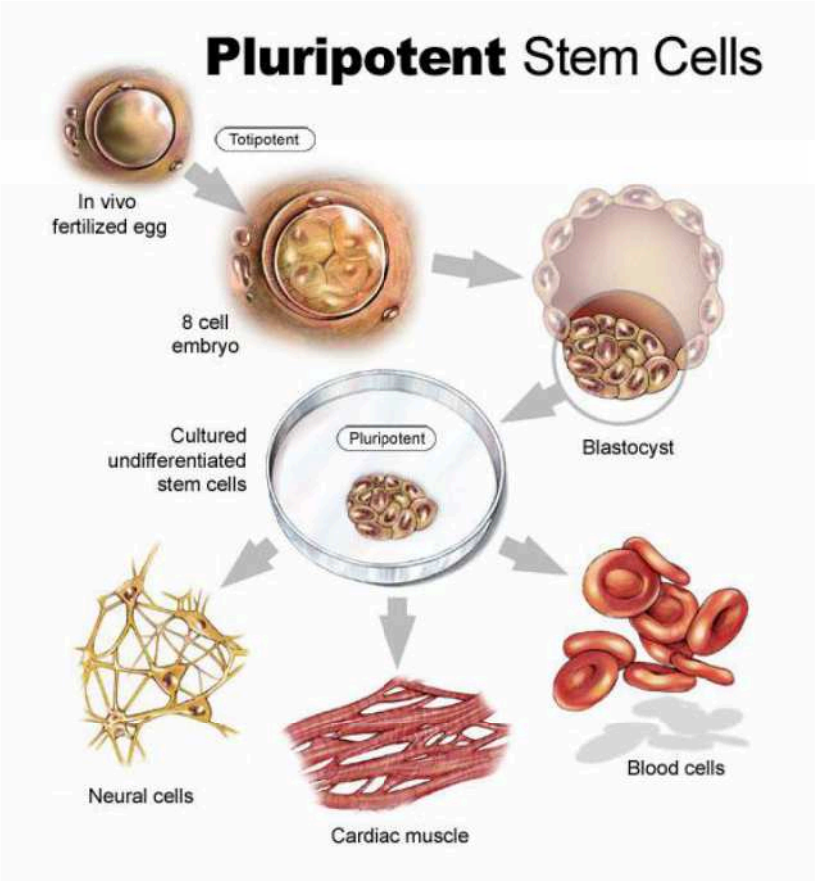


Figura 2.5 Tra le cellule staminali pluripotenti troviamo la cellula staminali embrionarie.[55]

Numerosi studi dimostrano come l'impianto delle cellule staminali embrionarie nei tessuti e organi murini è un metodo efficace per indurre queste cellule ad acquisire un fenotipo tessuto-specifico, enfatizzando sull'influenza dell'ambiente che circonda la cellula per l'acquisizione di un particolare fenotipo.

Numerose applicazioni sono state suggerite per le cellule staminali embrionarie, dal loro utilizzo per rimpiazzare o ripristinare i tessuti danneggiati da malattie o lesioni [67], all'applicazione per la riparazione e la rigenerazione tissutale, grazie a tecniche che rendano queste cellule tollerate immunologicamente dall'organismo ricevente (attraverso tecniche di trasferimento nucleare o a modifiche al complesso maggiore di istocompatibilità).[60,62,68]

La ricerca sta proseguendo in tutto il mondo, ma è limitata fortemente dalle implicazioni etiche che l'argomento suscita in numerosi Paesi e dalla problematica legata alla teratogenicità di questa sorgente cellulare. [69]

2.1.3 CELLULE STAMINALI FETALI

Anche se molte popolazioni di cellule staminali sono presenti nel feto durante la gestazione, dati i problemi etici che vengono posti all'utilizzo di queste cellule e i rischi delle procedure intrauterine, i loro possibili utilizzi clinici sono stati poco esplorati.[60]

L'identificazione di cellule staminali mesenchimali fetali circolanti ha aumentato le possibilità di utilizzare una fonte cellulare meno controversa.[70] Queste cellule si possono trovare solo nel primo trimestre, sono simili alle popolazioni ematopoietiche presenti a questa età nel fegato e nel midollo osseo e possono differenziare verso la linea ematopoietica, ma anche mesenchimale (inclusi osso e cartilagine) e oligodendrocitario.

Queste cellule potrebbero trovare applicazione nella terapia genica autologa intrauterina.[68]

2.1.4 CELLULE STAMINALI ADULTE (O SOMATICHE)

L'abilità di alcuni tessuti nell'adulto (come ad esempio la cute, il sistema ematopoietico, l'osso e il fegato) di ripararsi o rinnovarsi indica la presenza nei tessuti differenziati di cellule staminali/progenitrici.[68]

Queste cellule indifferenziate hanno capacità di autorinnovo, e possono differenziare verso alcune o tutte le cellule specializzate che compongono suddetti organi o tessuti.[56]

Il termine "cellula staminale adulta" è in qualche maniera fuorviante perché in realtà queste cellule si possono trovare fin dalla nascita anche nel cordone ombelicale e nella placenta. Una terminologia più appropriata le identifica come *cellule staminali tissutali*, *cellule staminali somatiche* o *cellule staminali post-natali*.[71]

A differenza delle cellule embrionali, che vengono identificate dal loro sito di acquisizione (la porzione cellulare centrale della blastocisti), queste cellule non possiedono un unico progenitore comune né un'unica sede di prelievo, e in qualche tessuto la loro origine è ancora oggetto di studio.[56]

L'ormai riconosciuta abilità delle cellule staminali adulte di differenziare verso differenti tipi cellulari, e il loro ritrovamento in diversi tessuti, ha portato la comunità scientifica a dimostrare un interesse crescente verso questo nuovo settore della ricerca (*Tabella 2.2*).

Tipo di cellula staminale	*Tessuti nei quali può differenziare*
Mesenchimale del midollo osseo	osseo, cartilagineo, adipocitario, neuronale, cardiaco, muscolare scheletrico, mesenchimale, epiteliale timico, midollare osseo, epatico, cutaneo, enterale, renale, Pancreatico, polmonare
Ematopoietica del midollo osseo	ematopoietico
Del sangue periferico	ematopoietico, epiteliale, neuronale, epatico, cardiaco
Neuronale	neuronale, ematopoietico, muscolare
Derivata dal teratocarcinoma	neuronale
Muscolare	mioblastico
Fegato/Pancreas	epatico, pancreatico, possono interconvertire tra i due tessuti
Corneale	corneale, neuronale
Mammaria	epiteliale duttale
Salivare	epatico e pancreatico
Della cute	neuronale, gliale, muscolare liscio, adipocitario, ematopoietico
Tendinea	osseo, cartilagineo, adipocitario
Della membrana sinoviale	miogenetico
Cardiaca	cardiaco
Cartilaginea	condrocitario
Dei progenitori timici	epiteliale timico
Della polpa dentale del bambino	neuronale, adipocitario, odontoblastico, osseo
Del cordone ombelicale	ematopoietico, epatico, neuronale
Amniotica	neuronale
Mesangioblastica	muscolare

Tabella 2.2 Cellule staminali nei vari tessuti corporei.[71]

Vie differenziative normali delle cellule staminali adulte

Le cellule staminali adulte vanno incontro a differenziazione per generare i tipi cellulari con le caratteristiche del tessuto nel quale risiedono (*Tabella 2.3*).[56]

Tipo di cellula staminale	*Cellule figlie differenziate*
Ematopoietica	Tutte le cellule della linea rossa, linfociti B e T, cellule NK, neutrofili, basofili, eosinofili, monociti e macrofagi
Mesenchimale	Cellule ossee (osteociti), cellule cartilaginee (condrociti), cellule del tessuto adiposo (adipociti) e altri tipi di cellule del tessuto connettivo come le tendinee
Neurale	Cellule neurali e due categorie di cellule non-neurali – astrociti e oligodendrociti
Epiteliale (tratto digestivo)	Cellule dell'assorbimento, cellule globose, cellule di Paneth e cellule enteroendocrine
Cutanea (epidermide e base del follicolo pilifero)	Le cellule staminali dell'epidermide portano alla formazione dei cheratinociti le cellule staminali follicolari possono dare origine sia al follicolo pilifero che all'epidermide

Tabella 2.3 Differenziazione delle cellule staminali.[56]

Transdifferenziazione

Alcune cellule staminali adulte possono differenziare verso un tipo cellulare differente rispetto a quello atteso in base al loro lignaggio (ad es. cellule staminali cerebrali che differenziano in cellule sanguigne o cellule ematopoietiche che differenziano in cellule muscolari cardiache).

Questo fenomeno è stato chiamato *transdifferenziazione*, ma è anche conosciuto come *plasticità cellulare*. [56,60]

Anche se la transdifferenziazione è stata osservata in alcune specie vertebrate, è ancora oggetto di discussione se questo fenomeno avvenga effettivamente negli umani, dove attualmente si ritiene che questa trasformazione inattesa sia estremamente rara.[72]

Svariate ipotesi sono state fatte per spiegare questo meccanismo (*Figura 2.6*).

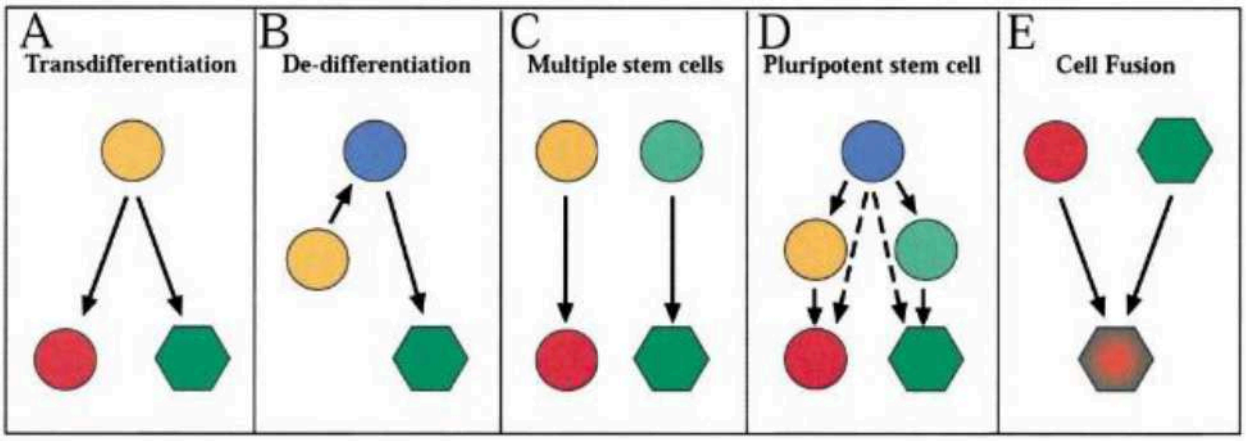


Figura 2.6 Diagramma schematico dei potenziali meccanismi e delle spiegazioni ipotizzate per la plasticità delle cellule staminali. Le cellule tessuto-specifiche sono rappresentate in giallo o verde, le pluripotenti in blu, e le cellule differenziate dalla linea "gialla" in rosso, quelle dalla linea "verde" da esagoni verdi.[72]

La transdifferenziazione "diretta" è un meccanismo tramite il quale le cellule staminali potrebbero contribuire a formare tipi cellulari di lignaggio diverso tramite l'attivazione di un programma differenziativo altrimenti dormiente (*Figura 2.6.A*) oppure attraverso una de-differenziazione di una cellula specializzata ad uno stadio più primitivo che va poi a ri-differenziarsi lungo nuove vie (*Figura 2.6.B*). Ad oggi transdifferenziazione e de-differenziazione non sono state chiaramente e inequivocabilmente documentate e non sembrano essere esempi di plasticità che possa avvenire *in vivo*.

Per dimostrare che la transdifferenziazione è effettivamente presente, si deve prima escludere in maniera certa la possibile presenza di cellule staminali distinte e multiple che potrebbero contribuire ai risultati osservati ed esserne la vera spiegazione (*Figura 2.6.C*).

La differenzazione verso tipi cellulari di diversi tessuti potrebbe essere anche dovuto all'azione di una singola e rara cellula staminale multipotente, capace di differenziarsi verso un unico lignaggio o più lignaggi a seconda del terreno di coltura utilizzato (*Figura 2.6.D*).[73] Altri studi sono necessari per escludere che il loro enorme potenziale differenziativo non sia coltura-indotto.

Il quinto meccanismo che viene ipotizzato per spiegare il concetto di plasticità cellulare è la fusione di una cellula donatrice con una cellula ricevente (*Figura 2.6.E*). Negli animali adulti la fusione cellulare avviene naturalmente nella generazione delle miofibrille muscolari scheletriche dai mioblasti e nella formazione degli osteoclasti a partire dalle cellule monocito/macrofagiche.

La fusione cellulare è però estremamente rara sia *in vivo* che *in vitro* (1/100'000 cellule) e sembra avvenire quasi solamente nelle cellule dove viene osservata comunemente la poliploidia, come negli epatociti, nel muscolo scheletrico, nelle cellule cardiache e nelle cellule del Purkinje.[72,73,74,75,76]

Una possibile ulteriore spiegazione è che le cellule trapiantate secernano fattori che inducano le cellule staminali del ricevente a iniziare il programma di riparazione, modificando quindi il programma differenziativo pre-programmato a favore di quello introdotto dalle cellule trapiantate.

E' oggi possibile riprogrammare le cellule staminali somatiche in senso embrionario tramite l'iperespressione di geni embrionari. Le cellule così ottenute sono state chiamate cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs – induced pluripotent stem cells). Anche se le caratteristiche di queste cellule rientrano in tutti i criteri identificativi delle cellule staminali pluripotenti, ulteriori studi sono necessari per stabilire se vi siano differenze con le cellule staminali embrionarie. [77]

In ogni caso, come per le cellule staminali embrionarie, le metodiche necessarie per una completa, prevedibile e riproducibile differenziazione verso un lignaggio appropriato sono ancora indagate. Le iPSC sono comunque già oggi ottimi modelli per lo studio delle patologie e per la sintesi farmacologica, con la speranza che possano un giorno essere utilizzate in altri ambiti della medicina, come i trapianti.[56,77]

2.2 CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI (MSC)

Il patologo Cohnheim è riconosciuto come il primo ad aver osservato la presenza di cellule staminali non ematopoietiche nel midollo osseo nel 1867. Egli ipotizzò al tempo che queste cellule con un fenotipo fibroblasto-simile migrassero verso le sedi di lesione e aiutassero l'organismo a rigenerare i tessuti danneggiati.[78]

Il pionieristico lavoro di Friedenstein e coll. negli anni '60 sull'isolamento, la cultura e la differenziazione in senso osteogenico di cellule derivanti dal midollo osseo aprì un nuovo campo di ricerca nell'ambito delle cellule staminali. [79,80]

Circa 20 anni dopo, Owen[81] e Caplan[82] introdussero i termini "stromal stem cells" e "mesenchymal stem cells" alla comunità scientifica.

Inizialmente isolate dal midollo osseo, le cellule staminali mesenchimali dell'adulto sono state poi trovate in diversi tessuti molli (tessuto adiposo, sinovie, derma, periostio, polpa dentaria, muscolo), nel sangue periferico e in organi solidi quali fegato, milza, polmoni, cervello. Tutte queste cellule hanno morfologia e immunofenotipo simili dopo diversi cicli di espansione in terreno di coltura.[83,84]

La caratterizzazione delle MSC appariva difficoltosa per l'assenza di un *marker* cellulare univoco e specifico.[85] Nel 2006 la società internazionale per la terapia cellulare (International Society for Cellular Therapy) propose tre criteri minimi perché le cellule coltivate potessero essere definite MSC:

1. aderenza alla piastra nelle condizioni di coltura standardizzate
2. espressione di CD73, CD90 e CD105 e assenza di CD11b, CD14, CD34, CD 19, CD79α, CD45 e HLA-DR
3. potenziale di differenziazione in tre diverse linee mesenchimali (adipocitaria, condrocitaria e osteoblastica) *in vitro*.[86]

Le potenzialità applicative trovano un razionale sfruttando le proprietà biologiche fondamentali delle MSC:

- migrare verso i siti di infiammazione, raggiungendo la sede di danno tissutale, quando iniettate per via intravenosa,
- differenziare verso vari tipi cellulari,

- secernere numerose molecole biologicamente attive capaci di stimolare la ripresa delle cellule danneggiate
- inibire l'infiammazione e svolgere funzione immunomodulatoria.[87,88,89]

Numerosi studi clinici hanno dimostrato l'efficacia dell'infusione di MSC in patologie quali l'ischemia miocardica, la cirrosi epatica, la sclerosi laterale amiotrofica e la *Graft-versus-Host Disease*, ma gli ambiti applicativi sono in continua crescita.[89]

Altre caratteristiche che rendono le MSC così attraenti sono l'assenza di problemi etici riguardanti il loro utilizzo, la possibilità di isolarle in quantità appropriata da diverse sedi dell'organismo e la loro capacità di espansione in coltura senza perdita delle caratteristiche ultrastrutturali.[85-89]

Nonostante l'argomento susciti interesse e siano molti gli studi in corso sull'utilizzo delle MSC, gran parte di questi sono ancora in fase precoce e, la numerosità ancora scarsa della popolazione clinica trattata con le MSC e i limitati tempi di *follow-up* non consentono ancora la stesura di conclusioni definitive. Inoltre, rimangono ancora oggetto di discussione ambiti importanti quali il ruolo delle MSC nella crescita e diffusione tumorale.[89,90,91,92]

2.3 IL CONCETTO DI NICCHIA STAMINALE

Il concetto di 'nicchia', come un microambiente a sede perivascolare altamente specializzato nel quale risiedono le cellule staminali, era stato proposto da Schofield circa 30 anni fa studiando il sistema emopoietico dei mammiferi, anche se le prime evidenze scientifiche di tale sistema architetturale risalgono ai modelli invertebrati (Drosophila melanogaster e Caenorhabditis elegans).[93]

La nicchia rappresenta tutti gli elementi che circondano strettamente le cellule staminali, soprattutto quando esse sono dormienti, e include cellule di supporto, matrice extra-cellulare e altre molecole solubili.[94]

Il rapporto di interdipendenza tra le cellule staminali e la loro nicchia è un delicato sistema dinamico necessario al supporto e accoglimento delle cellule staminali, alla verifica della loro proliferazione e differenzazione in base alle necessità dell'organismo e al controllo del sistema di mantenimento e riparazione, proteggendo l'individuo da una proliferazione esuberante o aberrante che potrebbe risultare dannosa (*Figura 2.7*).

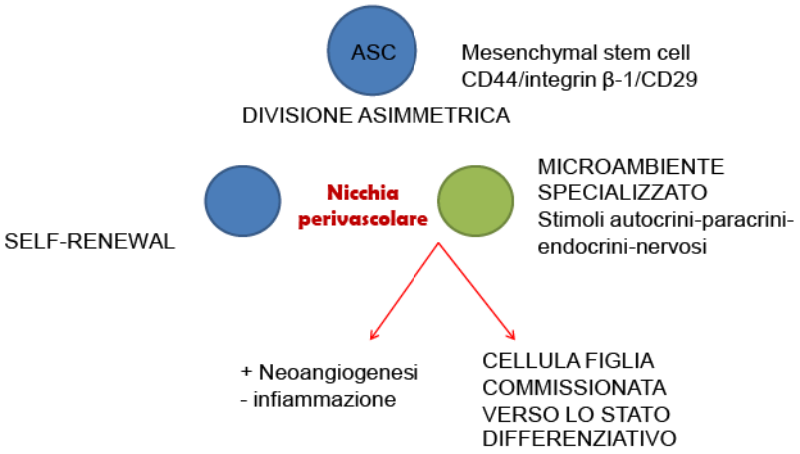


Figura 2.7 Struttura asimmetrica della nicchia: alla divisione cellulare, mentre una cellula viene mantenuta nella nicchia come staminale (autorinnovamento), l'altra figlia lascia questa zona per proliferare e differenziare, eventualmente diventando una cellula funzionalmente matura.

Identificato prevalentemente in sede perivascolare (la parete dei vasi sanguigni sembra la sede più comune di residenza delle cellule staminali), questo microambiente specializzato è riscontrabile in tutti gli organi e tessuti. È importante sottolineare che l'identità cellulare risulta essere strettamente condizionata dalla nicchia in cui la cellula risiede (*Figura 2.8)*.[95] Gli studi che suggeriscono questa natura perivascolare della nicchia staminale mesenchimale sono basati sulla valutazione dell'espressione di actina muscolo liscio α (αSMA) in tutti i tipi tissutali posti in analisi[84] e dalla localizzazione tramite metodo immunoistochimico di cellule CD45–/CD31–/Sca-1+/Thy-1+ nei siti perivascolari.[96]

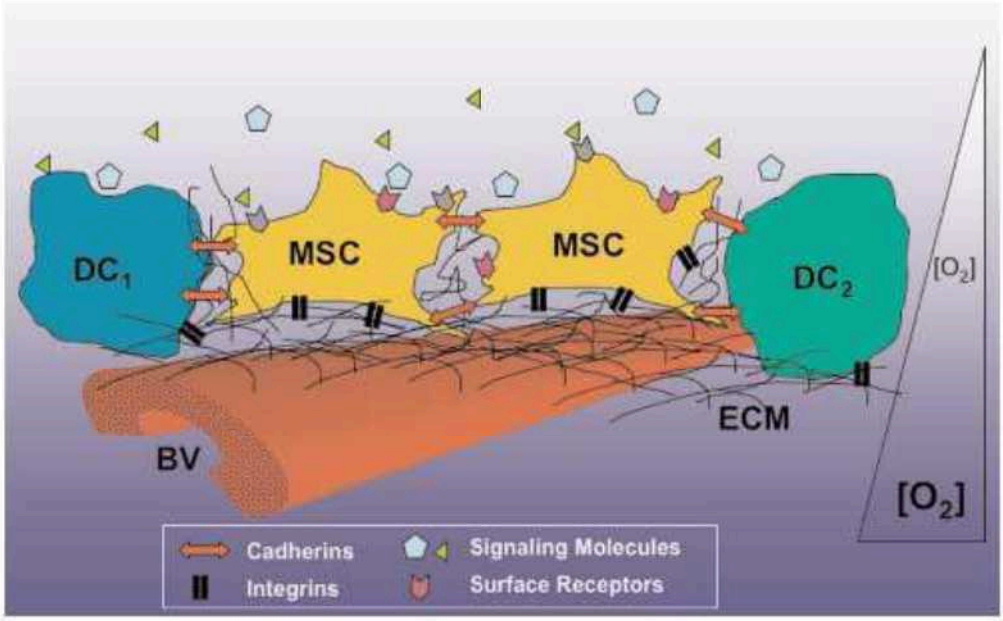


Figura 2.8 Nicchia delle cellule staminali. Le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono mostrate nella loro nicchia perivascolare (BV, vaso sanguigno) mentre interagiscono: 1 - con altre cellule differenziate (DC1, DC2, etc.) tramite molecole di adesione come le caderine; 2 - con la matrice extracellulare (ECM) depositata dalle cellule della nicchia e mediata dai recettori integrinici; 3 - con molecole segnale, che possono includere fattori autocrini, paracrini ed endocrini. Un'altra variabile sembra essere la tensione di ossigeno (O2), essendo l'ipossia associata a variazioni nel funzionamento delle MSC presenti nel midollo osseo.[94]

L'importanza della nicchia è comprovata dalla dimostrazione che le cellule staminali adulte (o somatiche) hanno funzioni limitate (specialmente minor capacità differenziativa) al di fuori di questo microambiente altamente specializzato. Un esempio è dato dalla cellula staminale ematopoietica, che rigenera le cellule del sangue e il sistema immunitario, ed è in grado di generare copie di se stessa dopo essere stata trapiantata: essa circola liberamente ma non ha quasi nessuna funzionalità se non all'interno di specifiche aree anatomiche.[97]

2.4 CELLULE STAMINALI DEL TESSUTO ADIPOSO (ASC)

Zuk e coll. nel 2001 individuarono per la prima volta la presenza di cellule staminali multipotenti (Adipose tissue-derived stem cells – ASCs) nella frazione vascolo-stromale (stromal vascular fraction – SVF) del tessuto adiposo.[98]

La SVF del tessuto adiposo viene definita come un'entità, costituita da cellule staminali di tipo mesenchimale e altri tipi cellulari, ottenuta immediatamente dopo la digestione tramite collagenasi del grasso e la sua successiva centrifugazione.[99] La SVF appare costituita da:

- ASCs (70-90%): Cellule staminali di derivazione adiposa
  (CD31-, CD34+, CD45-, CD90+, CD105-, CD146-)
- Cellule progenitrici vascolari-endoteliali (3-9%)
  (CD31+, CD34+, CD45-, CD90+, CD105-)
- Periciti (2-5%)
  (CD31-, CD3-4, CD45-, CD9+, CD105-, CD146+)
- Altre cellule

Nel 2002, Zuk fu nuovamente la prima a scoprire come questa popolazione possedesse l'abilità di differenziare *in vitro* verso numerosi lignaggi mesenchimali (osteogenico, adipogenico, miogenico, condrogenico) in maniera simile alle MSC.[100]

E' oggi noto che queste cellule possano differenziare non solo in senso mesodermico ma verso tutte le cellule dei tre foglietti germinativi (*Figura 2.9)*. [101,102,103,104,105]

Le cellule staminali ottenute dal tessuto adiposo, esprimono un immunofenotipo di tipo mesenchimale (*Figura 2.10).*

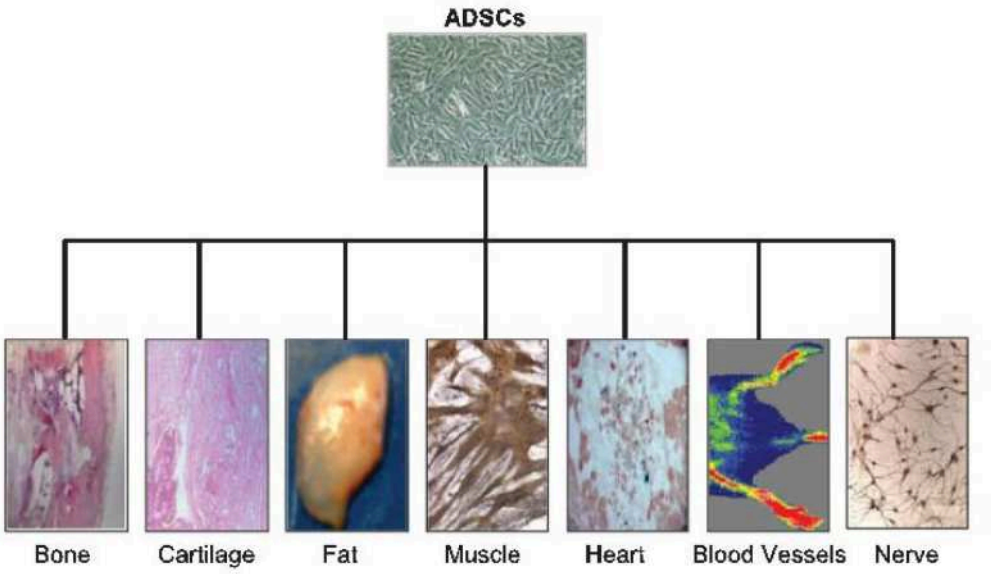


Figura 2.9 Multipotenzialità delle cellule staminali mesenchimali del tessuto adiposo.[105]

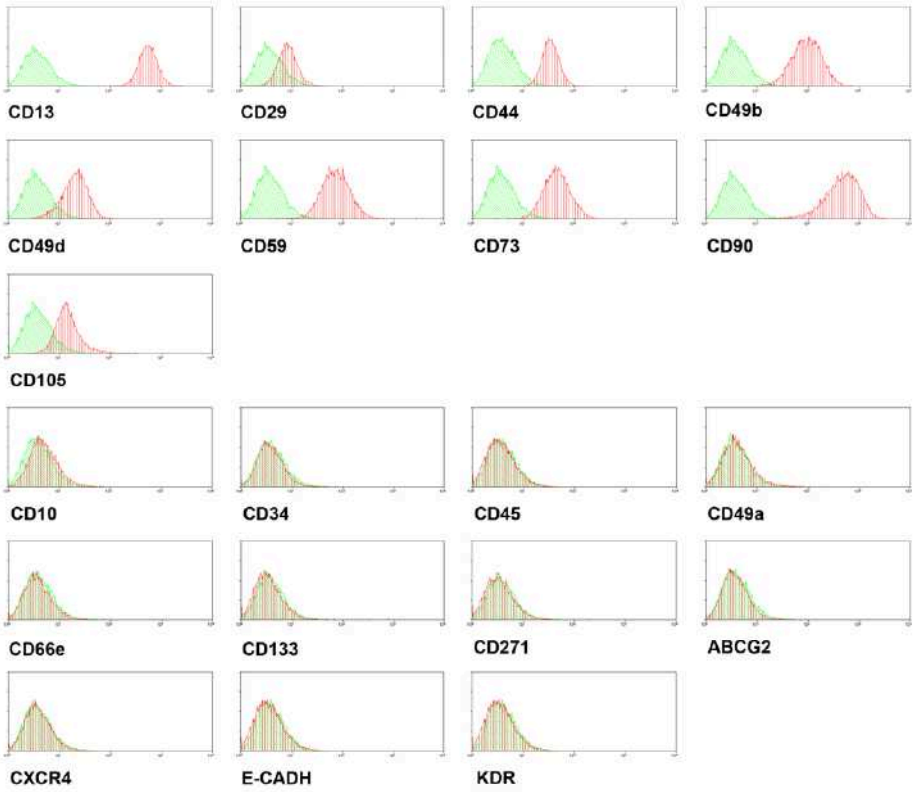


Figura2.10 Immunofenotipo mesenchimale delle ASC. All'immunofluorescenza: Positività per markers di tipo mesenchimale (CD13, CD29, CD90); Negatività per markers di tipo emopoietico (CD34, CD45).

Le ASC, inoltre, esprimono fattori di trascrizione tipici dello stato pluripotente, quali Nanog, Sox-2 e Oct-4 (*Figura 2.11*).

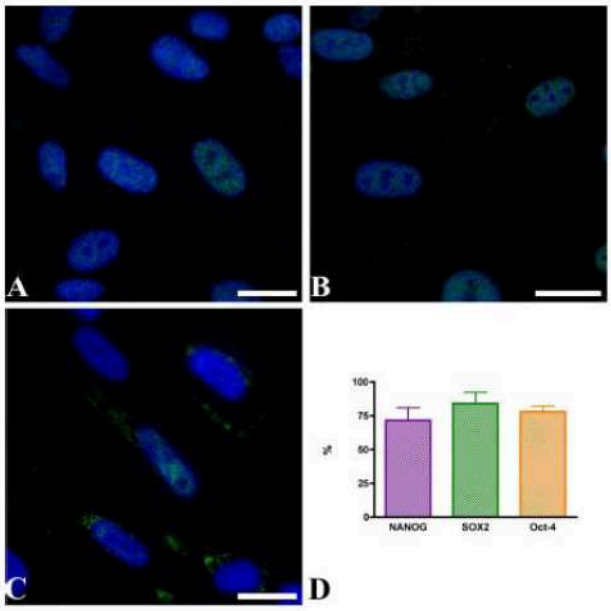


Figura 2.11 Fattori di trascrizione dello stato pluripotente espressi dalle cellule staminali del tessuto adiposo in immunofluorescenza: Nanog (A), Oct-4 (B), Sox-2(C).

Attualmente sono stati codificati molti medium di coltura che consentono il differenziamento *in vitro* delle ASC verso un particolare lignaggio cellulare (*Tabella 2.4*).

Destino differenziativo	***Fattori differenziativi***
Adipogenico	Insulina, IBMX, desametasone, rosiglitazone, indometacina
Condrogenico	BMP-6, BMP-7, FGF-2, TGF-1, TGF-2, TGF-3, desametasone, IGF-1 ascorbato-2-fosfato
Osteogenico	1,25(OH)2D3, β-glicerolfosfato, acido ascorbico, BMP-2, desametasone acido valproico
Miogenico	Desametasone, idrocortisone, siero di cavallo
Cardiomiogenico	IL-3, IL-6, SCF, transferrina
Vascolare/endoteliale	Medium proprietario (EGM-2-MV; Cambrex) contenente acido ascorbico EGF, FGF, idrocortisone
Neurogenico	Acido valproico, insulina, idrossianisolo butilato, idrocortisone, EGF, FGF, β-mercaptoetanolo
Pancreatico/endocrino	Activina-A, esendina-4, pentagastrina, HGF, nicotinamide alta concentrazione di glucosio
Epatico	HGF, OSM, DMSO
Ematopoietico	Microambiente specifico richiesto?

Tabella 2.4 Fattori sperimentali utilizzati per il condizionamento della differenziazione cellulare delle ASCs Abbreviazioni: 1,25(OH)2D3: 1,25 diidrossi-colecalciferolo; BMP: bone morphogenetic protein; DMSO: dimetil sulfosside; EGF: epidermal growth factor; FGF: fibroblast growth factor; HGF: hepatocyte growth factor; IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina; IGF: isulin-like growth factor; IL: interleuchina; OSM: oncostatna M; SCF: stem cell factor; TGF: transforming growth factor.

Dopo esser state definite inizialmente come "Processed LipoAspirate (PLA) cells", altri termini, quali “adipose-derived adult stromal/stem (ADAS) cells, “adipose-derived stromal cells (ADSC) ”, “adipose stromal cells (ASC) ”, “adipose mesenchymal stem cells/ (AdMSC-MASC)”, “preadipocytes”, "lypoblast", "perycites", sono stati utilizzati per definire le cellule staminali del tessuto adiposo, generando confusione nella nomenclatura. L’”International Fat Applied Technology Society (IFATS)” ha quindi stabilito di adottare il termine *Cellule Staminali Derivate dal Tessuto Adiposo* (adipose-derived stromal/stem cells – **ASCs**) per identificare la popolazione cellulare multipotente ottenuta dal tessuto adiposo dopo aderenza alla plastica e svariati passaggi seriati colturali.

Identificare la localizzazione di questa popolazione di cellule staminali nel tessuto adiposo intatto è complicato poiché non esiste un singolo marcatore che specificatamente e inequivocabilmente è in grado di identificare le ASCs indifferenziate (esattamente come per le MSC più in generale). I risultati ottenuti da studi di immunoistochimica e immunofluorescenza suggeriscono che questa popolazione risieda in sede perivascolare, dove le ASCs coesistono con i periciti e le cellule endoteliali, in quel microambiente precedentemente identificato come ‘nicchia’.

E' stato anche supposto che le ASCs siano in realtà un sottogruppo di periciti o di cellule staminali/precursori vascolari in vari stadi di differenziazione e localizzati sulla parete che circonda l'albero vascolare.[106,107]

Le ASCs stanno acquisendo un ruolo sempre più di rilievo come possibile sorgente da utilizzare in medicina rigenerativa per le caratteristiche identificate e il riscontro di svariati vantaggi se confrontate alle MSC ottenute dal midollo osseo, che sono ad oggi la popolazione di cellule staminali più studiata:

- I depositi sottocutanei di tessuto adiposo sono ubiquitari e facilmente accessibili in grandi quantità con una procedura minimamente invasiva (liposuzione),
- la liposuzione è una procedura ben tollerata e sicura e può donare potenzialmente grandi quantità di aspirato,
- la liposuzione è una metodologia più economica e meno invasiva rispetto all'aspirazione midollare, e possiede meno effetti collaterali (la procedura per l'ottenimento di midollo osseo può essere dolorosa e richiedere un'anestesia profonda e prolungata)
- dal midollo osseo si ottengono approssimativamente 6 x 10^6 cellule per mL, di cui solo lo 0,001-0,01% sono cellule staminali; per comparazione, il numero di cellule ottenibili dalla SVF dopo liposuzione è di 0,5-2 x 10^6 cellule per grammo di tessuto adiposo ma la

percentuale di cellule staminali può andare dall'1 al 10%, ottenendo un numero di cellule staminali compreso tra lo 0,5 x 10^4 e 2 x 10^5 per grammo di tessuto adiposo.[85,98,107,108]

- Il piccolo numero di MSC ottenute dal midollo osseo rende necessaria la loro espansione *ex-vivo* prima dell'utilizzo, con tutte le implicazioni pratiche e legislative che questo comporta, mentre le ASCs possono essere re-iniettate immediatamente.

Le ASCs sono dunque pienamente in grado di soddisfare i "5 criteri per un efficace impiego clinico a scopo rigenerativo delle cellule staminali mesenchimali" proposti da Gimble nel 2003 (*Tabella 2.5*).[109]

Criteri per un efficace uso delle MSC a scopo rigenerativo
1. Quantità: devono essere disponibili in gran numero (da milioni a miliardi)
2. Accessibilità: devono essere prelevabili con procedura minimamente invasiva
3. Multipotenza: devono essere in grado di differenziarsi in linee cellulari diverse In modo controllabile e riproducibile
4. Sicurezza ed Efficienza: devono essere trasferibili in modo sicuro ed efficiente autologo ed allologo
5. Manipolabilità: devono poter essere manipolabili secondo le linee guida imposte dalle Good Manifacturing Practice (GMP).*

Tab.2.6 Criteri proposti da Gimble per un efficace uso delle cellule staminali. [109]

* Le ASCs (a differenza delle MSC comunemente prelevate dal midollo osseo) non necessitano di processi di espansione in laboratorio, essendo il loro numero sufficiente per un uso immediato in alcune procedure chirurgiche. Per questo motivo, in alcune situazioni, non sono soggette alle linee guida imposte dalle GMP.

2.5 TESSUTO ADIPOSO E ASC: ATTUALI APPLICAZIONI CLINICHE

La versatilità dell'innesto di tessuto adiposo ha reso il suo impiego sempre più ampio, nei più vari distretti corporei e con indicazioni terapeutiche sempre più specifiche, nelle mani di specialisti di diverse discipline.

Lipoblasti, cellule endoteliali e cellule staminali mesenchimali ricavate dal tessuto adiposo ormai ricoprono non solo un ruolo centrale nella chirurgia plastica e ricostruttiva, ma sono anche l'epicentro di ricerca per un insieme di terapie dirette a patologie che colpiscono l'osso, la cartilagine, i muscoli, il fegato, i reni, il cuore, il tessuto nervoso e il pancreas, ed hanno quindi consentito l'espansione delle possibili indicazioni e delle potenzialità nelle terapie cellulari e rigenerative (*Figura 2.12*).[110,111]

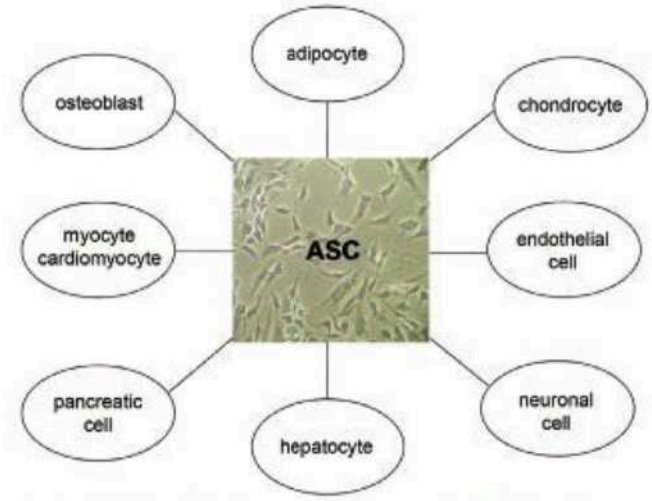


Figura 2.12 Differenziamento delle cellule staminali del tessuto adiposo (ASC) verso svariati lignaggi.[111]

Il chirurgo plastico, unendo lo scopo puramente 'riempitivo' del trasferimento di grasso a quello definito 'rigenerativo', legato all'utilizzo delle cellule staminali del tessuto adiposo, resta il professionista maggiormente coinvolto nell'utilizzo e nello studio di questa metodica, per quanto il facile ottenimento di cellule staminali mesenchimali dal grasso ha reso questo tessuto d'interesse per i più diversi ambiti della medicina.

L'elenco delle applicazioni descritte in Letteratura dell'innesto adiposo è lungo. L'introduzione del concetto di innesto adiposo arricchito (CAL) e dell'utilizzo della frazione vascolo-stromale e delle cellule staminali ivi contenute, ha ampliato il campo d'azione di questa procedura verso problematiche degenerative, involutive, di danno tissutale cronico e richiedenti un supporto alla rigenerazione tissutale, quali: deficit dei tessuti molli esiti di traumi, trattamenti chirurgici, infezioni o terapie specifiche (ad esempio lipoatrofia da antiretrovirali o sequele da Poliomelite), sindrome di Parry-Romberg, sclerodermia, dermofibromatosi, danneggiamento delle corde vocali, ulcerazioni croniche, guarigione delle ferite, ustioni e tendiniti, ma anche danno ischemico del miocardio, degenerazione del disco intervertebrale, sclerosi multipla e morbo di Parkinson, deficit delle ossa lunghe e microsomia cranio-facciale, morbo di Crohn, trapianti di midollo osseo, osteoartrite, rigenerazione epatica, diabete di tipo 1 e sue sequele, e tante altre.[112,113,114]

Basandosi sulle capacità differenziative dimostrate dalle ASCs, , le applicazioni cliniche delle diverse tecniche di ingegneria tissutale sono infatti enormi, seppur parte di queste siano ancora solo teoriche e ben lontane dall'utilizzo clinico (*Tabella 2.7*):[115]

Destino differenziativo	***Possibili implicazioni cliniche***
Adipogenico	Correzione dei deficit dei tessuti molli e sottodermici da qualsiasi causa (genetica, chirurgica, traumatica, ustioni, radiazioni)
Condrogenico	Riparazione cartilaginea articolare e difetti dei dischi, ricostruzione di deficit nasali o auricolari
Osteogenico	Rigenerazione dei difetti ossei genetici, traumatici o tumorali
Miogenico	Ricostruzione tissutale dopo chirurgia o trauma, correzione delle distrofie muscolari
Cardiomiogenico	Rigenerazione cardiaca, miglioramento funzionale post-infarto, scompenso cardiaco
Vascolare/endoteliale	Neovascolarizzazione, patologie ischemiche
Neurogenico	Danni cerebrali, ictus, danni ai nervi periferici
Pancreatico/endocrino	Cellule secernenti insulina, cura del diabete tipo 1
Epatico	Insufficienza epatica cronica, rigenerazione epatica, trapianto di epatociti
Ematopoietico	Graft-vs-Host Disease, supporto al midollo osseo

Tabella 2.7: Potenziali applicazioni cliniche dell'ingegneria tissutale in relazione alle possibilità differenziative delle cellule staminali del tessuto adiposo.[115]

In questa tesi, ci si soffermerà sull'ambito d'interesse per lo studio di settore eseguito, ovvero sull'utilizzo della lipostruttura in chirurgia mammaria, per quanto, al termine della descrizione dello studio verrà presentata l'esperienza preliminare della Clinica di Chirurgia Plastica dell'Università degli Studi di Udine, tratta dalla collaborazione tra diversi ambiti di interesse, sull'utilizzo del tessuto adiposo arricchito nella componente staminale in altri settori, quali l'oculistica, la degenerazione nervosa e le ulcere in pazienti vasculopatici gravi.

L'elenco delle problematiche che coinvolgono la mammella che possono beneficiare dell'innesto di tessuto adiposo è lungo e va dai deficit tissutali esito di chirurgia demolitiva post-oncologica (quadrantectomia, mastectomia), agli esiti di radioterapia, alle deformità o asimmetrie da malformazioni mammarie (sindrome di Poland, mammella tuberosa, sindrome di Parry-Romberg, *pectus excavatum*)[116,117], all'ipoplasia mammaria, il cui trattamento si pone al confine con la chirurgia prettamente estetica. La correzione di difetti di volume (*minus*) post chirurgia conservativa pone il problema dell'adeguato 'timing' per ovviare al rischio di recidiva sulla ghiandola mammaria residua. Alcuni Autori identificano nei 3 anni il tempo minimo libero da malattia che la paziente deve attendere prima di essere sottoposta, previo adeguato consenso pre-operatorio, a lipostruttura. La pazienti mastectomizzate possono beneficiare dell'innesto di grasso, arricchito o meno in cellule staminali, sia per una ricostruzione mammaria autologa completa con il solo tessuto adiposo innestato (metodica che richiede più trattamenti e può essere facilitata associando un presidio che crea una pressione negativa esterna, il Brava System), che nella correzione del profilo dopo ricostruzione autologa con lembi liberi, perforanti o peduncolati (tra cui, DIEP, TRAM, LD, TDAP) o protesica. La ricostruzione protesica è una delle indicazioni più efficaci e quella che può trovare attuazione nelle diverse fasi ricostruttive, in quanto l'innesto di tessuto adiposo va ad aumentare lo spessore sottocutaneo sovra protesico, diminuendo il *rippling* e il rischio di esposizione dell'impianto, oltre a ridurre la possibilità di andare incontro a contrattura capsulare.[118,116] L'utilizzo dell'innesto di tessuto adiposo si è dimostrato efficace nel portare a termine una ricostruzione protesica di buona qualità in tessuti particolarmente sottili, in pazienti molto magre o in distrofie esito di radioterapia e in quei casi in cui non è possibile sottoporre la paziente a una ricostruzione autologa.

3. L'INNESTO DI TESSUTO ADIPOSO

3.1 INTRODUZIONE

Trasferire un tessuto da un distretto corporeo (area donatrice) all'altro (area ricevente) è uno degli elementi costitutivi della chirurgia plastica. Il principio fondamentale alla base di tale concetto è la sopravvivenza della parte trasferita: è necessario garantire un apporto di nutrienti e ossigeno tale da soddisfare le necessità metaboliche del tessuto/organo che si trova in una sede diversa da quella di origine, che può avvenire come:

- *Sostentamento per via diretta*, nel quale i nutrienti e l'ossigeno derivano da una fonte vascolare arteriosa intrinseca all'unità trasferita. Il flusso sanguigno è in questi casi indipendente dal sito ricevente. E' questo il caso dei trapianti e dei lembi di vicinanza siano essi di tipo *random*, assiali o perforanti; caso particolare è quello dei lembi liberi, riforniti da un sistema vascolare intrinseco, il cui flusso ematico è però fornito dal sito ricevente.

- *Sostentamento per via indiretta*, nel quale il sostegno giunge, nelle prime fasi del trasferimento, per diffusione dal tessuto ricevente, e che richiede pertanto un'adeguata vascolarizzazione di quest'ultimo. E' questo il caso degli innesti (cutanei, condrali, ossei etc...). La sopravvivenza dell'innesto a lungo termine è tuttavia garantita dall'attecchimento del tessuto trasferito, che si renderà, attraverso la formazione di una rete vascolare autosufficiente, indipendente dal sito ricevente. L'attecchimento e la sopravvivenza dell'innesto di tessuto adiposo possono essere definite 'a via indiretta', ma i dettagli della teoria dell'attecchimento del grasso trasferito sono stati ampiamente studiati e meritano un trattamento a parte.

La procedura ormai universalmente utilizzata per l'ottenimento del tessuto adiposo e per l'estrazione delle ASCs è la liposuzione, tecnica divenuta d'uso comune nelle mani del chirurgo plastico e riconosciuta per le sue caratteristiche:

- è una metodica economica, ben tollerata e minimamente invasiva,

- è una procedura codificata e supportata da studi clinici, considerata sicura e gravata da scarsi effetti collaterali.

- i depositi sottocutanei di tessuto adiposo sono ubiquitari, facilmente accessibili e forniscono potenzialmente grandi quantità di lipoaspirato e, di conseguenza, di cellule staminali,
- il lipoaspirato, adeguatamente preparato, viene considerato il 'filler' ideale, in quanto, una volta trasferito, unisce il concetto di 'replace like to like' a quello di 'riempimento' volumetrico con un tessuto autologo e vitale, capace di integrarsi con il tessuto ricevente.

3.2 STORIA ED EVOLUZIONE DELL'INNESTO DI TESSUTO ADIPOSO

L'utilizzo di tessuto adiposo autologo per l'autotrapianto è documentato fin dalla fine del XIX secolo, per scopi sia ricostruttivi che estetici.

Neuber, nel 1893, fu il primo a utilizzare, per quanto con risultato insoddisfacente per l'elevato tasso di riassorbimento, l'autotrapianto di tessuto adiposo prelevato dal braccio di una paziente per colmare un difetto facciale.

Già nei primi approcci all'innesto di tessuto adiposo, ci si accorse che gran parte del volume innestato andava incontro a riassorbimento e che il grado di tale processo era minore quando si trasferivano frazioni adipose di dimensioni ridotte.[119]

Nel 1910, Lexer pubblico un lavoro riguardante l'uso dell'adipe nella correzione volumetrica della regione malare e mentoniera, e come *filler* per rughe e difetti cutanei.[120]

La tecnica originale di Neuber fu quindi modificata da Brunning nel 1911, che descrisse la procedura non più come trasferimento di un unico voluminoso frammento di tessuto ma come iniezione di particelle ottenute dallo sminuzzamento del grasso escisso.[121]

A distanza di 14 anni, Miller presentò 36 casi di revisione cicatriziale su volto e collo e di 2 casi di fistole parotidee persistenti, infiltrando l'adipe attraverso cannule. Nonostante i risultati eccellenti riportati, non ebbe un importante riscontro dalla comunità scientifica del tempo.[122]

Nei 100 anni successivi molti sono stati gli ambiti di utilizzo riportati, ma le migliorie apportate alla metodica furono modeste.[123,124] Occorre arrivare alla seconda metà del '900, prima di avere un avanzamento tecnico significativo.[125,126,127,128]

Nel mentre, l'interesse riguardo al comportamento biologico del tessuto adiposo innestato portò allo sviluppo di tecniche in grado di studiare concretamente l'ultrastruttura tissutale adiposa.

Leaf e Zarem, tra gli anni '70 e '80, furono i primi a interessarsi all'innesto di tessuto adiposo sottocutaneo per il c*ountouring* facciale e iniziarono a pensare alla manipolazione del tessuto asportato per ridurre la percentuale di riassorbimento dell'innesto.

Il 1976 è considerata l'alba della liposuzione moderna (e, per riflesso, della lipostruttura moderna) grazie alle tecniche e alla strumentazione introdotta da Arpad e Giorgio Fischer. A Roma, i Fischer svilupparono una cannula smussata e cava al suo interno collegata ad un aspiratore, unita o meno ad una lama tagliente. Anche se rivoluzionaria, la loro tecnica "asciutta" era complicata dalla formazione di ematomi e sieromi. Più tardi essi svilupparono anche la tecnica "criss-crossing" nella quale il grasso veniva aspirato da siti d'ingresso multipli, e aiutarono con essa la diffusione del concetto di "liposcultura".[129,130]

Nell'Europa dell'Ovest, negli anni Ottanta, Pierre Fournier e Yves Illouz iniziarono a interessarsi alla liposuzione e a praticare a Parigi la tecnica "asciutta" dei Fischer, con la tecnica di prelievo del grasso con cannule o aghi.[131,132,133] Questo tipo di liposuzione veniva definita "dry liposuction" (liposuzione secca) in quanto solo una quota limitata di fluidi era infiltrata nell'adipe.[134,135,136]

In seguito, si sono sviluppate tecniche che prevedevano una maggior infiltrazione di liquidi nel grasso da aspirare, raggruppabili nella categoria della "wet liposuction" o liposuzione bagnata.

Il contributo della "wet liposuction" fu rivoluzionario perché rendeva la tecnica meno traumatica, mitigava le perdite ematiche e preservava i fasci vascolo-nervosi a decorso sottocutaneo.

Un evento significativo nella storia della chirurgia del tessuto adiposo avvenne nel 1987, grazie alle scoperte di Jeffrey Klein, un dermatologo californiano, che trovò una via sicura per effettuare la liposuzione in anestesia locale grazie all'aggiunta di lidocaina diluita all'interno del fluido utilizzato per creare la tumescenza. La formula ottimale proposta da Klein fu: 0,05% lidocaina, 1:1,000,000 epinefrina, 10 mL di bicarbonato in un litro di soluzione salina.[137,138]

Prima dell'avvento della tecnica anestetica tumescente nei primi anni 80, la liposuzione era eseguita esclusivamente in anestesia totale ed era complicata frequentemente da gravi perdite di sangue. La tecnica tumescente rivoluzionò la liposuzione e il trasferimento del tessuto adiposo.

La dose massima di lidocaina infiltrabile nella soluzione anestetica, è stata identificata in un range di 35 - 55mg/kg. Il limite superiore di 55mg/kg è stato messo in discussione da molti autori tra cui lo stesso Klein, che in un lavoro suggeriva di porre il limite massimo di lidocaina a 35 mg/kg.[139,140,141]

Diversi fattori sono invece usati a supporto di dosaggi più elevati di anestetico, tra cui la vasocostrizione adrenalina-indotta, la bassa vascolarizzazione del tessuto adiposo e la lipofilicita della lidocaina che ne favorisce un sequestro nel tessuto adiposo.[133]

La concentrazione di lidocaina aggiunta alla soluzione fisiologica varia in base al sito sottoposto a liposuzione. Nelle aree più innervate e più vascolarizzate, come la mammella e l'addome, viene suggerito fino a 1500 mg di lidocaina per ogni litro di soluzione salina. Questa quantità è invece diminuita a 500mg/L nelle aree meno sensibili come la coscia.[142]

Queste variazioni valgono anche per l'adrenalina che fino a 1 mg/L è indicata nelle aree più sensibili e vascolarizzate mentre fino a 0,5 mg/L e la concentrazione indicata nelle aree meno vascolarizzate. [134]

Nel 1991 Ersek descrive la sua metodica, definita poi traumatica, per ottenere grasso purificato, esprimendo il suo dissenso sui risultati ottenuti con l'autotrapianto di tessuto adiposo, e creando un precedente importante che poteva far scemare l'interesse scientifico in materia di innesti di grasso.[143] Pubblicazioni degli stessi anni riportanti al contrario risultati positivi mantennero vivo l'interesse verso tale procedura.[144,145,146]

Nel 1994 Sydney Coleman, introdusse il moderno concetto di *lipofilling* coniando il termine "Lipostructure", pubblicando nel 1997 la sua esperienza che è ancora oggi la base delle linee guida in materia.[147] La tecnica descritta da Coleman, definita come liposuzione atraumatica con iniezione di adipociti purificati, fu da egli stesso codificata in tre fasi: prelievo, purificazione tramite centrifugazione, iniezione.

Il termine 'lipostruttura' indica l'utilizzo del tessuto adiposo ottenuto mediante lipoaspirazione a fini di rimodellamento, tramite innesto dello stesso previa adeguata processazione. La metodica suggerita da Coleman fa dell'atraumaticità un caposaldo e, a tale scopo, si avvale dell'utilizzo di una cannula smussa collegata a un sistema di aspirazione a bassa pressione, unitamente alla tecnica 'tumescente' e all'utilizzo di una centrifugazione blanda.

In questi lavori l'autore, non solo mostrava gli effetti a lungo termine degli innesti di grasso, ma sosteneva i benefici clinici che l'adipe innestato aveva nei confronti dei tessuti circostanti. I risultati di Coleman sono stati poi confermati da lavori successivi di autori come Ersek e Ellenbogen, che dapprima si erano mostrati scettici.[148,125,126]

La lipostruttura di Coleman si è diffusa ed è divenuta la metodica maggiormente studiata, indagata ed applicata in materia di trasferimento di tessuto adiposo e, nonostante svariate modifiche, permane nei suoi punti 'chiave' la tecnica utilizzata oggi da ogni chirurgo plastico.

Le tecniche utilizzate per il prelievo, il trattamento e il trapianto dell'adipe sono nel tempo state 'personalizzate' da molti chirurghi, che hanno il più delle volte però mantenuto come 'costanti' le linee guida di base descritte da Coleman.

Il successivo 'step' evolutivo del lipofilling è stato introdotto da Zuk e colleghi nel 2001, grazie alla scoperta della presenza nel tessuto adiposo di cellule staminali multipotenti (ASCs).[98]

La presenza di queste cellule in grandi quantità in un tessuto facilmente raggiungibile e delle loro potenzialità differenziative hanno reso il grasso un tessuto d'interesse per le più diverse discipline.

I primi studi documentati sulle applicazioni cliniche delle ASC risalgono al 2004 grazie a Garcia-Olmo e colleghi.[149] Nel 2006 Riccardo Mazzola, durante un congresso europeo dell'EURAPS (associazione europea dei chirurghi plastici, di cui era presidente) dal titolo 'Fat injection – Expanding opportunities', mise in rilievo le potenzialità del tessuto adiposo, come tessuto trasferibile e/o come fonte di cellule staminali utilizzabili nel trattamento di numerose patologie (tra cui l'atrofia dei tessuti molli del volto, l'ipotrofia mammaria e delle corde vocali, gli esiti di ustione, i danni da radiazione e l'incompetenza faringea). Da allora l'interesse sulle ASCs si fece crescente e si scatenò un entusiasmo raramente visto nell'ambito della ricerca scientifica.

Dal 2006 diversi studi hanno indagato sul ruolo delle cellule staminali sulla stabilità dell'innesto adiposo, portando risultati che dimostravano come questi innesti "arricchiti" aumentassero il volume, il peso e la qualità degli innesti dopo un *follow-up* a sei mesi sia nei topi sia negli umani. [150]

Di solo un anno dopo è il primo studio sugli effetti terapeutici delle ASCs da parte di Rigotti e colleghi nella terapia dei danni da radiazione, che dimostrò risultati strabilianti, anche fino alla completa *restitutio ad integrum* dell'area danneggiata.[151, 118]

In questi ultimi anni i lavori di Yoshimura hanno caratterizzato le ASCs e introdotto il concetto di 'CAL' (*cell-assisted-lipotransfer*), la possibilità cioè di arricchire il lipoaspirato prima del suo innesto per aumentarne le potenzialità rigenerative e la capacità di attecchimento.[152,153,154,155,156]

L'esigenza di standardizzare l'estrazione traumatica delle cellule staminali dal tessuto adiposo e renderle, dal punto di vista giuridico, utilizzabili direttamente in clinica, ha spinto numerose industrie a progettare delle apparecchiature a circuito chiuso adibite a tale scopo, come dimostrato dagli studi condotti delle Cytori Industries dal 2010.

Sono ormai numerosi i presidi creati per l'estrazione e purificazione della frazione vascolo-stromale e delle cellule staminali.

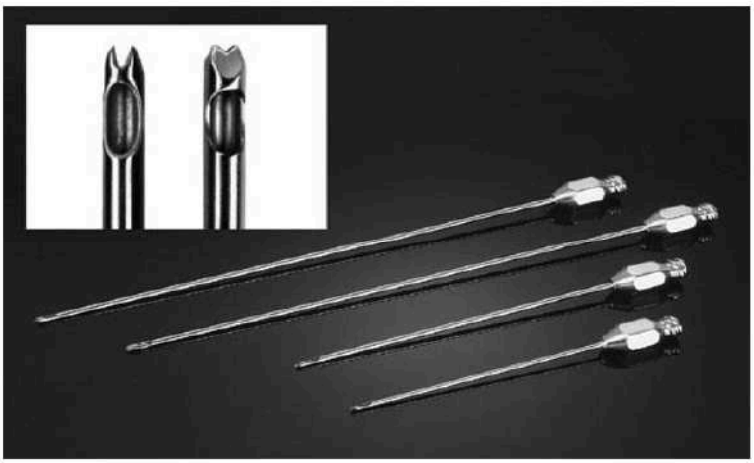
Studi sul lipoaspirato, i suoi componenti, l'ampia versatilità e i rischi dell'innesto di tessuto adiposo, associato o meno ad un arricchimento in cellule staminali, sono in corso e porteranno a risultati determinanti riguardanti il suo utilizzo nei prossimi anni.[157,158,159,160]

3.3 LIPOSTRUTTURA "TRADIZIONALE"

La lipostruttura, metodica introdotta e ampiamente descritta da Sydney R. Coleman, è una tecnica che consiste nel trasferimento autologo di tessuto adiposo, prelevato e purificato in maniera il più possibile atraumatica, da un sito donatore ad un sito ricevente. La metodica di prelievo del tessuto adiposo utilizzata è la lipoaspirazione, tecnica ormai d'uso comune e riconosciuta per le caratteristiche di semplicità di esecuzione, bassa morbilità ed elevata disponibilità del sito donatore, tempi operatori e costi non elevati.[147,127,161]

Nel rispetto del concetto di 'atraumaticità preservazione dell'integrità del tessuto da trasporre', Coleman suggerisce di osservare delle linee guida standard, che nel tempo hanno comunque subito delle 'personalizzazioni' operatore-dipendente, supportate da numerosi studi di settore:

- rispetto delle regole standard di *asepsi* in tutte le fasi della procedura;
- utilizzo di *strumenti atraumatici* specifici: cannula con punta smussa da 2,5- 3 mm di calibro e con due forellini distalmente (Coleman harvesting cannula), collegata ad una siringa Luer-Lock di 10mL (*Figura 3.1*);


(a)

(b)

Figura 3.1 Cannula smussa di Coleman (a) e siringa luer-lock da 10 mL (b).

- la *sede donatrice* viene scelta in base alle caratteristiche morfologiche, preferendo la regione dei fianchi, quella trocanterica e della regione interna del ginocchio e risparmiando i tessuti utilizzabili in un'ipotetica esigenza ricostruttiva di tipo autologo (es. si evita il prelievo in addome se potenzialmente eseguibile una ricostruzione autologa con lembo addominale-DIEP), rispettando, quando possibile, i desideri del/della paziente;

- la *preparazione* del sito donatore viene effettuata tramite l'infiltrazione di una soluzione anestetica vasocostrittrice, composta, secondo proposta di Klein, da soluzione di Ringer Lattato a temperatura ambiente e adrenalina (1:400.000).[162] La liposuzione tumescente permette di ottenere, minimizzando le perdite ematiche, una maggior quantità di lipoaspirato in maniera atraumatica e con minimo disagio percepito dal paziente, che, in molte occasioni, può sottoporsi all'intervento programmato in anestesia locale con sedazione;

- il *prelievo* va eseguito mediante inserimento nello spazio sottocutaneo, attraverso una piccola incisione cutanea, di una cannula smussa di 3 mm di diametro, di lunghezza variabile, connessa ad una siringa da 10 mL, in cui viene creata una pressione negativa di bassa entità tramite il ritiro dello stantuffo per circa 2 cm.

  La cannula verrà quindi mossa attraverso il comparto adiposo in maniera meccanica, allentando il tessuto e aspirandolo all'interno della siringa. Una combinazione tra la delicata pressione negativa e l'azione di raschiamento della cannula attraverso l'adipe, permette alle particelle di grasso di essere aspirate e di procedere attraverso la cannula e l'apertura LuerLok all'interno della siringa (*Figura 3.2*);

(a)

(b)

Figura 3.2 Lipoaspirazione in diversi siti donatori (coscia, a; addome, b) infiltrazione di soluzione anestetica-vasocostrittrice (tecnica 'tumescent')

- si pongono quindi le siringhe riempite di lipoaspirato in contenitori sterili fino al successivo trasferimento (a stantuffo rimosso) negli appositi alloggiamenti in una *centrifuga a rotore centrale* con impostazioni di centrifugazione a 3000 rpm per 3 minuti (*Figura 3.3*).[163]

Figura 3.3 Lipostruttura 'standard'. Il lipoasprato prelevato a bassa pressione con cannula smussa e siringa, viene lasciato decantare e centrifugato. Dopo rimozione dell'olio e del liquido di scarto, rispettivamente concentratisi nella parte più craniale e in quella più caudale della siringa, si trasferisce il tessuto adiposo ottenuto in siringhe da 1 o 2 mL., e si procede all'innesto. [163]

La Letteratura è generalmente concorde nell'asserire che la soluzione vasocostrittrice-anestetica utilizzata (soluzione fisiologica o Ringer, lidocaina e adrenalina) non ha nessun effetto sulle caratteristiche delle cellule del lipoaspirato e non influisce quindi sull'attecchimento del tessuto innestato.[164,165]

Alcuni autori optano per il lavaggio del lipoaspirato con soluzione fisiologica o Ringer, altri sostengono che la sola decantazione del lipoaspirato ne permetta una separazione atraumatica, altri utilizzano presidi specifici per la lipoaspirazione a circuito chiuso (come la Water-assisted liposuction -WAL-/Body-Jet) (*Figura 3.4, a-b*).[166,167,168,169]

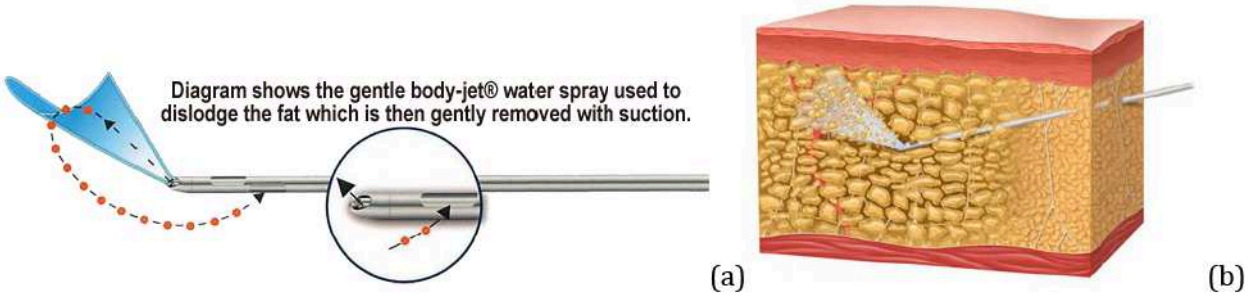


Figura 3.4 Cannula del presidio "Body-Jet" (a) per la lipoaspirazione traumatica facilitata dall'idrodissezione.(b). (Water-assisted liposuction –WAL).[167]

La centrifugazione porterà alla separazione del lipoaspirato raccolto in tre strati (*figura 3.5*):

- sovranatante (strato superiore, meno denso e costituito da olio e cellule adipose rotte)
- porzione intermedia (tessuto adiposo concentrato, dal 30 al 70% del volume)
- infranatante (composto da sangue, fluidi tissutali e anestetico locale)

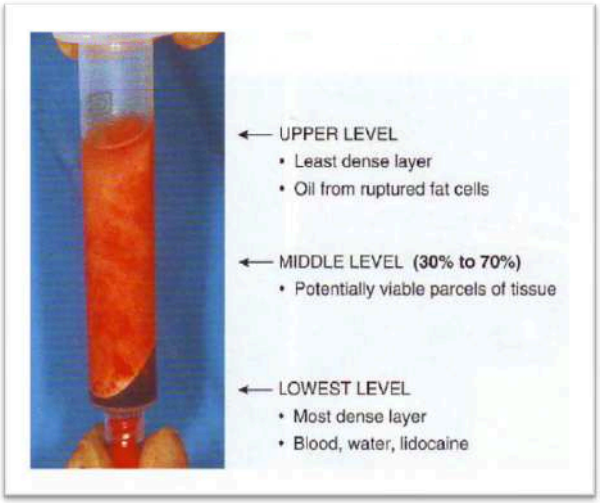


Figura 3.5 Fasi separate dopo la centrifugazione.

Attualmente, analisi specifiche sull'effetto della *centrifugazione* sulla qualità del tessuto adiposo, suggeriscono l'utilizzo di parametri uguali o inferiori ai 1000 giri/min (1200 rpm).[170, 171]

Le componenti dell'infranatante possono essere espulse dalla base della siringa, mentre il sopranatante può essere eliminato utilizzando materiali assorbenti. Alcuni chirurghi

aspirano e salvaguardano la porzione più periferica dell'infranatante, che pare essere caratterizzata da un'alta concentrazione di cellule staminali mesenchimali e preadipociti.[151,170,171]

- Una volta centrifugato e purificato il tessuto adiposo concentrato ottenuto viene trasferito in siringhe da 1 mL per la re-iniezione in area ricevente. L'innesto del tessuto va eseguito a bassa pressione, in fase di retrazione della cannula smussa, su piani distinti posti a diverse profondità e in piccoli boli al fine di ottimizzarne la vascolarizzazione (*Figura 3.6*).
- È fondamentale limitare al minimo l'esposizione del grasso all'aria, sia per mantenere la sterilità sia per evitare la lisi adipocitaria che risulta colpire fino il 50% delle cellule dopo 15 minuti di esposizione.
- L'innesto è da considerarsi concluso con il raggiungimento di una lieve ipercorrezione dell'area trattata.
-

Figura 3.6 Fase di innesto.

La strumentazione utilizzata per la fase di innesto è costituita da cannule diverse rispetto a quelle usate per la lipoaspirazione, di calibro minore e con un solo forellino al limite distale. Il calibro, la lunghezza, la forma, il tipo di punta della cannula è scelto in base alla zona da trattare. L'uso di cannule a punta smussa consente di eseguire un trapianto in modo più stabile e meno traumatico. Cannule appuntite o taglienti, invece, potrebbero assicurare un miglior controllo del posizionamento dell'adipe nello spazio sottodermico, nel tessuto fibroso e cicatriziale. A discapito di un maggior rischio di sanguinamento, sono queste utili per liberare aderenze. A questo scopo può essere preferita l'attuazione della tecnica ad ago proposta da Rigotti, che ormai ha preso nella

pratica quotidiana la nomenclatura di 'rigottomie' (*Figura 3.7*). Il grasso ottenuto al termine della 'procedura standard' viene definito *tessuto adiposo povero in ASCs (ASC-poor aspirated fat).*

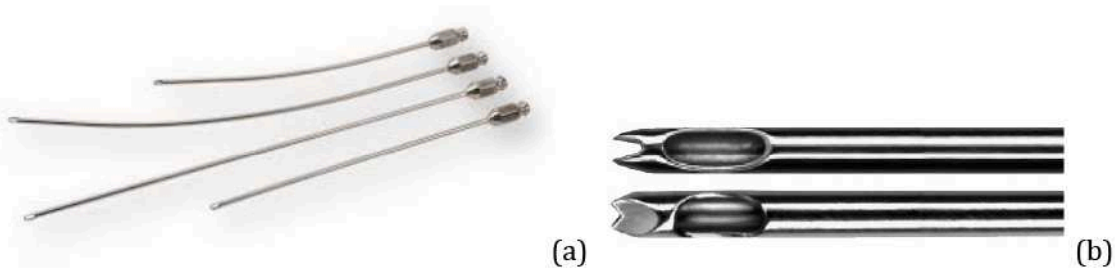


Figura 3.7 Cannule smusse per di infiltrazione traumatica (a). Cannule dall'estremità più tagliente (come ad esempio quella disegnata da Toledo)

Diverse sono le variazioni alla metodica applicate dai chirurghi plastici negli anni successivi alla sua introduzione nella pratica clinica, proponendo delle differenze nella composizione del liquido usato per la tumescenza, nel diametro della cannula di aspirazione, nella forza centrifuga e nel tempo di centrifugazione. Nonostante numerosi studi laboratoristici e una lunga storia clinica, non esiste ad oggi un consenso che abbia stabilito un 'gold standard' nella procedura o che abbia comparato con risultati dirimenti i dati a lungo termine.[172]

3.4 LA NOSTRA ESPERIENZA CON L'APPLICAZIONE DEL PRESIDIO BODYJET

Nel 2010 abbiamo eseguito uno studio atto ad analizzare le caratteristiche del lipoaspirato ottenuto mediante utilizzo del dispositivo Bodyjet rispetto alla metodica tradizionale (lipoaspirazione con siringa). La clinica di Chirurgia Plastica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Udine si è occupata della selezione dei pazienti, della raccolta dati e dell'esecuzione della procedura chirurgica, nonché del controllo post-operatorio delle pazienti. L'equipe appartenente al Dipartimento di Scienze Mediche e Biologiche si è occupato dell'analisi dei tessuti.

Abbiamo isolato e analizzato le ASCs provenienti da campioni di lipoaspirato di 71 pazienti sottoposte a lipofilling, divise in due popolazioni, una trattata con la metodica da noi definita "Standard", ed una trattata con il dispositivo Bodyjet

La metodica "Standard" segue le indicazioni della procedura proposta da Coleman con alcune specifiche variazioni: viene utilizzata un'infiltrazione con soluzione tumescente (1L di soluzione fisiologica + 30 mg di lidocaina o carbocaina al 2% + 1 mg di adrenalina), l'aspirazione viene eseguita con cannula del diametro di 3mm e la centrifugazione del materiale aspirato avviene per un minuto a 1000 giri.

Body-jet® (water-jet assisted lipoplasty (WAL)from human med® Bodyjet (Eclipse Ltd., Dallas, Texas) è un dispositivo che utilizza una cannula che permette la contemporanea irrigazione ed aspirazione del grasso. Esso fonda la sua azione sull'erogazione di getti d'acqua, generati da una pompa peristaltica, che vengono trasformati in un flusso laminare a forma di ventaglio deviato verso l'alto grazie alla particolare geometria della cannula. Tale flusso consente la dislocazione dei lobuli di grasso preservando l'integrità dei vasi sanguigni e linfatici, dei nervi e dei *septae retinaculi cutis*. Il tessuto adiposo, gentilmente rimosso, viene evacuato tramite un canale separato all'interno della cannula *(Figura 3.8).*

In Letteratura viene descritto il vantaggio riscontrato nell'utilizzo di questo presidio, in termini di un minor dolore in sito di lipoaspirazione espresso dalle pazienti trattate, di minori aree ecchimotiche e dati preliminari riguardo a validi risultati clinici a medio termine.

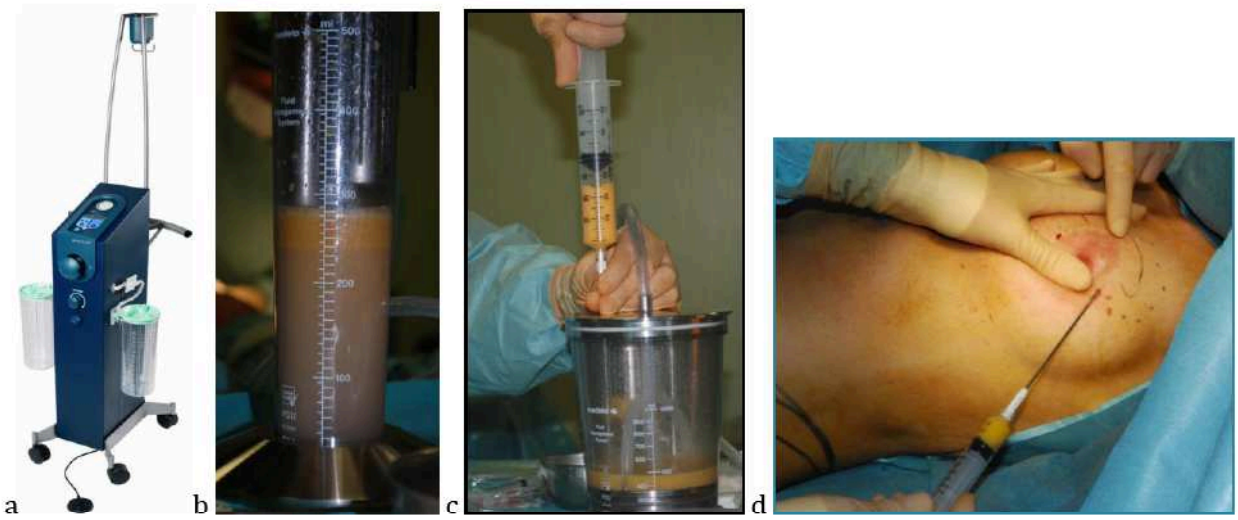


Figura 3.8 Sistema Bodyjet (a). Dopo infiltrazione della soluzione anestetica-vaocostrittrice, la speciale cannula permette una simultanea irrigazione e aspirazione del tessuto adiposo, che viene poi separato dai tessuti di scarto attraverso il Lipocollettore (b, c). il tessuto adiposo ottenuto può quindi essere facilmente trasferito dal Lipocollettore alle siringhe per l'innesto (d).

I dati ottenuti da queste due distinte procedure di lipoaspirazione sono poi stati messi a confronto con le caratteristiche cellulari ottenute dall'analisi di 3 campioni di tessuto adiposo, prelevati in corso di dermolipectomie addominali.

Tutti i campioni ottenuti sono stati sottoposti a processazione enzimatica e meccanica per isolare le cellule staminali, espanse poi in terreni di coltura selettivi per la crescita di tali cellule.

L'analisi in laboratorio ha consentito di svelare alcuni dati molto interessanti.

In analogia con cellule staminali multipotenti dell'adulto provenienti da altri tessuti, anche le cellule staminali ottenute dal tessuto adiposo, indipendentemente dalla tecnica di lipoaspirazione utilizzata, esprimono fattori di trascrizione specifici di uno stato pluripotente (Oct4, Nanog e Sox2), sono multipotenti (sono infatti in grado di dare origine a cellule appartenenti a tutti e tre i foglietti embrionali) e clonogeniche. Inoltre le cellule hanno dimostrato che, anche a livello clonale, mantengono la capacità di dare origine, se sottoposte ad opportuni stimoli differenziativi, a cellule mature di tutti e tre i foglietti germinali (osteoblasti, adipociti, epatociti, cellule endoteliali, miociti e cellule neurali). Lo studio del profilo di espressione genica effettuato mediante DNA-microarray ha confermato l'analogia esistente fra le cellule staminali ottenute da tessuto adiposo rispetto a colture ottenute da altri distretti. Le cellule, sia quelle provenienti da campioni trattati con tecnica "Standard" che quelle provenienti da "Bodyjet", presentano un immunofenotipo mesenchimale, ma vi sono delle differenze significative: a P0, quindi prima di mettere in coltura le cellule isolate, tra quelle che non esprimono CD45, c'è una presenza maggiore (tecnica "Standard" 71%+/-11 Bodyjet 43%+/-16) di CD34+ nei campioni del gruppo trattato con Bodyjet. Vi è inoltre, nel medesimo gruppo, un'espressione inferiore di CD31- (tecnica "Standard" 21%+/-13 Bodyjet 8%+/-5). Come sappiamo, l'espressione di questo fenotipo è tipica di una popolazione di precursori più primitivi di adipociti che si localizzano in sede perivascolare all'interno della frazione vascolo-stromale.

Inoltre un'altra differenza da segnalare è emersa al terzo passaggio in coltura, dove si è evidenziata una maggiore espressione di CD271 (marker di cellula staminale mesenchimale) nei campioni ottenuti utilizzando Bodyjet.

Oltre a differenziare le proprietà delle cellule ottenute, le diverse metodiche utilizzate per il prelievo del tessuto adiposo si sono distinte per quel che riguarda la resa, pur essendo il numero di cellule ottenute per grammo di tessuto in linea nei due gruppi (tecnica "Standard": 1,85+/-0,36; Bodyjet: 1,73+/-0,7 milioni di cellule per grammo). In particolare, la tecnica del body jet (n=7) ha consentito di selezionare una popolazione di cellule che, pur dando origine a colture proliferanti in tempi significativamente maggiori rispetto alla tecnica "Standard" (5±2gg vs 1±1g, $p<0.05$), sono caratterizzate da una più alta frequenza di cellule staminali clonogeniche, consentendo di ottenere

in due - tre settimane un numero di cellule adeguato per interventi di medicina rigenerativa e di chirurgia ricostruttiva.

Lo studio condotto ci permette di riportare i dati emersi dai nostri risultati, nei quali le cellule ottenute dai campioni dei due gruppi condividono la medesima caratterizzazione. Tuttavia, nel gruppo trattato con Bodyjet sembrerebbe esserci una popolazione di progenitori adipocitari più primitiva, che potrebbe spiegare sia il maggior ritardo nell'inizio della replicazione cellulare, sia l'aumentata clonogenicità rilevate dopo coltura (Figura 3.9).

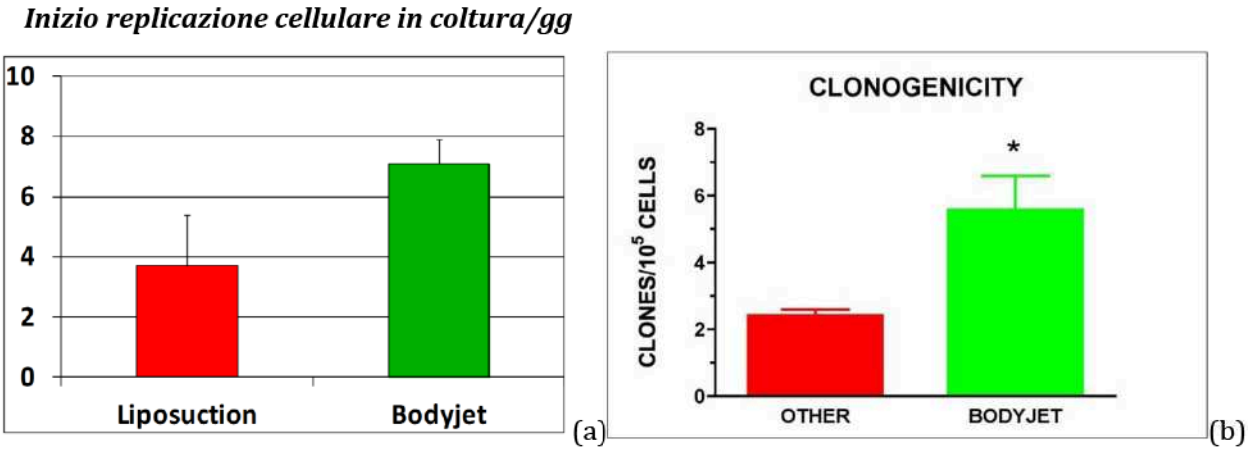


Figura 3.9 Sistema Bodyjet. L'analisi delle cellule staminali estratte mostra un ritardo nell'inizio della replicazione cellulare dopo semina (a), ma una clonogenicità più elevata rispetto a cellule staminali di un lipoaspirato ottenuto con procedura 'standard'

Figura 3.10 Caso clinico. Paziente trattata con lipostruttura con sistema Bodyjet a livello di area di depressione esito di quadrantectomia del quadrante supero-interno (QSI) della mammella destra. (a-c) pre-operatorio ; (b-d) post- operatorio.

3.5 DALLE TEORIE DELL'ATTECCHIMENTO AI FATTORI CHE INFLUENZANO LA STABILITÀ DELL'INNESTO

I risultati clinici incoraggianti ottenuti e l'ottimizzazione della metodica hanno reso il lipofilling sempre più versatile, per quanto ancora sia ampiamente indagata e discussa in Letteratura la prevedibilità del risultato e la sicurezza in ambito oncologico della procedura.[127,128]

Uno dei maggiori limiti del trapianto di tessuto adiposo è l'alto tasso di riassorbimento, riportato con variabilità tra il 20 e il 90% del volume inizialmente impiantato. La sopravvivenza a lungo termine del tessuto adiposo innestato non è omogenea, e può generare irregolarità e deficit tissutali non prevedibili nel sito ricevente.[161,173,174,175,176]

Nel 1923, Neuhof ed Hirshfeld esaminarono tramite microscopio ottico l'evoluzione nel tempo del tessuto adiposo ed osservarono che, durante i primi due o tre mesi dopo l'inoculo, l'innesto era caratterizzato da processi degenerativi. Dal secondo mese notarono un particolare processo di rigenerazione che a partire da alcune cellule istiocitarie sparse del sito ricevente portava alla formazione di grasso di tipo embrionario ed eventuale trasformazione di quest'ultimo in tessuto adiposo adulto entro il quinto mese. Dal sesto mese dopo il trasferimento, infatti, l'innesto appariva privo qualsiasi processo evolutivo figurando come tessuto adiposo di tipo adulto. Alternativamente, dopo il processo degenerativo dei primi mesi il grasso innestato poteva andare incontro ad un infarcimento di tessuto connettivo fibroso senza alcun processo di rigenerazione.

Le conclusioni furono che il tessuto adiposo primariamente innestato era destinato a soccombere, in alcuni casi lasciando spazio ad un processo rigenerativo con formazione di grasso "metaplastico", in altri esitando in fibrosi.[177] Queste furono le basi della "Host cell replacement theory". (Teoria del Rimpiazzo delle Cellule Ospite).

Gli studi successivi svolti da Peer negli anni '50, lo portarono ad asserire che non tutti gli adipociti erano destinati a morire, delineando la "Teoria della Sopravvivenza Cellulare",[178] per la quale il numero di adipociti vitali nell'inclusione lipidica correlava con il volume dell'innesto finale. Nel suo studio Peer riportava una perdita di peso e volume dell'innesto del 50%.[173,179,180]

Questa teoria pone grande attenzione sulla sopravvivenza cellulare fin dai primi momenti dopo il trasferimento; analogamente alla fisiologia dell'innesto epidermico il processo di diffusione /angiogenesi sembra quindi essere una tappa cruciale nel destino a lungo termine dell'innesto adiposo. A tal proposito è stato provato che le aree adiacenti alle strutture vascolari del sito ricevente siano in grado di sopravvivere fino alla neoangiogenesi e che le aree invece troppo

lontane (nel cuore dell'innesto) non ricevano abbastanza supporto e muoiano prima di essere raggiunte dai nuovi vasi.[181,182,183]

Tuttavia la sopravvivenza dell'innesto non risulta essere del tutto inversamente proporzionale alla dimensione lobulare di tessuto innestata ma è necessario che essa mantenga una certa architettura per ospitare la successiva neovascolarizzazione.[184]

E' stato proposto, in base ad osservazione istologica, che la sopravvivenza diminuisca quando il diametro lobulare dell'innesto supera i 3 mm, avendo il plasma capacità di fornire nutrimento per imbibizione di circa 1.5mm.[185] Secondo un più recente lavoro, basato sullo studio immunoistochimico della "perilipina" (proteina espressa dagli adipociti vitali) lo spessore limite per la sopravvivenza diretta dell'innesto sarebbe addirittura di 0,3mm. Queste misure non sono però da considerarsi vincolanti una certa variazione viene tollerata a seconda delle caratteristiche ed esigenze morfologiche/estetiche del sito di inoculo (l'innesto adiposo di una mammella ammetterà volumi lobulari maggiori, quello di una palpebra volumi minori).[186]

Questi concetti sono già stati applicati e formalizzati nella "*Lipostruttura*" descritta da Coleman per la prima volta nel 1994 e standardizzata negli anni successivi.[127,128]

Le specifiche conoscenze sulla composizione cellulare del tessuto adiposo, caratterizzata dalla presenza, nel concetto di frazione vascolo-stromale di un insieme di cellule a diversi stadi di maturità (adipociti maturi, preadipociti, cellule staminali…) hanno portato ad indagare sul ruolo delle distinte cellule e dell'ambiente in cui esse vivono sull'integralizzazione del tessuto adiposo in area ricevente.

Gli adipociti, sempre che resistano alla procedura di raccolta e di innesto, devono essere rivascolarizzati entro 4-8 giorni per sopravvivere. [187] I preadipociti appaiono maggiormente resistenti al trauma rispetto agli adipociti maturi sia nella fase di liposuzione sia nella fase di ischemia-rivascolarizzazione post-impianto. Questo sembra essere legato alle minime richieste metaboliche delle cellule progenitrici che consentono una sopravvivenza maggiore in condizioni di scarso apporto nutritivo e scarsa ossigenazione. Di conseguenza i preadipociti e le cellule staminali del tessuto adiposo potrebbero ben rappresentare il solo tessuto che in realtà sopravvive alla procedura di trapianto, e la variabilità di concentrazione di queste cellule nel tessuto trapiantato potrebbe essere un fattore critico, responsabile della variabilità osservata nella sopravvivenza a lungo termine degli innesti.[188]

Sulla stessa linea di pensiero, Stillaert sottolinea come, mentre un tempo si pensava che l'innesto giocasse un ruolo centrale per l'induzione delle risposte cellulari nell'ospite, sia la SVF ad avere un

ruolo fondamentale nella stabilità dell'innesto, in assenza della quale nessun risultato soddisfacente può essere ottenuto a lungo termine.[189]

L'interazione tra il tessuto adiposo trapiantato e i tessuti riceventi in zona d'innesto possono risultare in un'attivazione diretta o indiretta dei meccanismi di riparo tissutale e di stimolo all'angiogenesi, ed avere un possibile ruolo nella plasticità tra preadipociti e macrofagi.

Yoshimura nel 2009 ha indagato sul ruolo delle cellule più primitive nella stabilità dell'innesto adiposo, sostenendo la "teoria alternativa sulle cellule staminali" che supporta il ruolo centrale delle ASCs nella sopravvivenza del tessuto adiposo trapiantato. Gli adipociti maturi e i pre-adipociti innestati, secondo questa teoria, vengono in pochi mesi rimpiazzati da nuovi adipociti nati a partire dalle ASCs, in seguito al condizionamento degli stimoli dell'ambiente ricevente (processo di *signaling* tra cellule vitali e apoptotiche, donatrici e riceventi indotto dalle citochine).[154,190]

Un'altra ipotesi propone che tutte le cellule iniettate vadano incontro a morte fungendo però da impalcatura inerte, una specie di 'scaffold', adatta ad ospitare in un primo momento la migrazione degli istiociti e successivamente la neoangiogenesi ed adipogenesi staminale dipendente.[191]

Nonostante questi studi non siano univoci nelle loro conclusioni, in tutti appare sempre più centrale il ruolo delle cellule staminali mesenchimali presenti nel lipoaspirato per la sopravvivenza e stabilità dell'innesto.

Studi condotti sull'innesto arricchito in cellule staminali dimostrano i benefici in termini qualitativi e quantitativi del tessuto trasferito a livello delle aree riceventi, mostrando un evidente incremento dell'angiogenesi tissutale . La capacità delle ASCs di differenziare in cellule endoteliali promuove la neovascolarizzazione e la stessa differenziazione adipocitaria, favorisce l'ossigenazione delle cellule trasferite e inibisce l'apoptosi tramite l'espressione di VEGF e IGF-1.[192]

Tutto questo ha spostato l'interesse della comunità scientifica verso lo studio della FVS e del sistema cellulare, tra cui quello delle ASCs, che la caratterizza, per ottimizzare un intervento ormai diventato d'uso comune e valutarne effetti benefici, rischi e possibili applicazioni in sempre diversi ambiti.[193,194,195,196,197,198,199,200]

3.6 LA SOPRAVVIVENZA DELL'INNESTO ADIPOSO: FATTORI INFLUENTI E POSSIBILI STRATEGIE DI SUPPORTO.

Nonostante gli indiscussi progressi dell'ultimo decennio nel campo dell'innesto adiposo, la percentuale di riassorbimento è ancora molto imprevedibile, con oscillazioni tra il 20% e l'80%.[156,201,202,203,204] Gli studi sull'attecchimento precedentemente descritti hanno portato ad indagare parallelamente sulle differenti determinanti coinvolte nella sopravvivenza del tessuto adiposo innestato, dalle variazioni delle specifiche fasi della procedura di lipofilling (sede di prelievo, soluzione anestetica usata, forza di centrifugazione, tipo di processazione etc...) agli elementi di arricchimento che associati alla metodica tradizionale sono stati studiati come fattori di stabilizzazione dell'innesto (PRP, fattori di crescita, ASC, etc.).

3.6.1 INFLUENZA DELLE AREE DI PRELIEVO

La scelta del sito donatore ideale è principalmente dipendente dall'habitus del singolo paziente. I depositi di grasso che vengono sfruttati maggiormente per la lipoaspirazione sono la regione addominale, i fianchi, l'area trocanterica, la porzione interna ed esterna delle cosce, la faccia interna del ginocchio, anche se potenzialmente ogni area di accumulo adiposo può essere utilizzata come donatrice (*Figura 3.11*).[194]

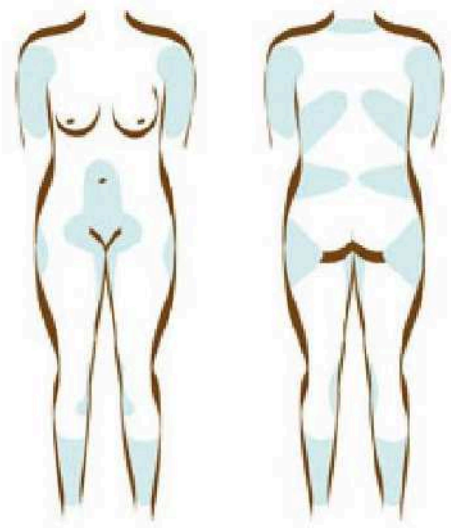


Figura 3.11 Siti più comunemente usati per la liposuzione.

Diverse e non concordi sono le opinioni emerse dagli studi che negli ultimi anni sono stati eseguiti al fine di identificare la sede di prelievo ottimale. Alcuni lavori descrivono un'abilità delle cellule precursori del tessuto adiposo di crescere e differenziare variabile in base a sede del deposito e all'età. I pazienti più giovani mostrano un potenziale differenziativo delle cellule aumentato rispetto alla media in tutti i depositi.[195]

Gli studi sulla vitalità adipocitaria di Rohrich e colleghi[196] non hanno trovato differenze statisticamente significative negli adulti tra i depositi addominali, dei fianchi, delle cosce e del ginocchio. Altri Studi più recenti supportano, invece, i depositi addominale e delle cosce come quelli a più elevata concentrazione di ASC, per quanto non vi sia variazione nel numero assoluto delle cellule e nella capacità di differenziazione cellulare. Altri, ritengono l'addome essere la sede ideale di prelievo, sottolineando come le cellule ottenute dal deposito superficiale addominale (sopra la fascia di Scarpa) fossero significativamente più resistenti all'apoptosi rispetto agli altri depositi sottocutanei.[195,197,198]

Lo studio condotto da Sbarbati e coll. identifica nel *tessuto adiposo bianco strutturale* (sWAT), localizzato in alcune aree degli arti (es mediogenuale e sovratrocanterica) e dei fianchi, quello con una maggior componente stromale, buona vascolarizzazione ed elevata staminalità, e quindi considerato il più idoneo nella pratica del lipotransfer.[38]

In conclusione, sebbene alcuni studi abbiano dimostrato differenze nel numero di ASC per sede, non appaiono delle evidenti differenze nelle proprietà delle cellule stesse e non esiste dunque una chiara correlazione tra sede di prelievo e stabilità dell'innesto adiposo.

3.6.2 INFLUENZA DELLE METODICHE DI PROCESSAZIONE, LAVAGGIO E CENTRIFUGAZIONE

Molti sono gli studi che hanno indagato sul ruolo svolto dalle varie fasi della procedura di lipofilling sull'attecchimento del tessuto adiposo.
Nonostante in Letteratura vi siano studi a supporto del lavaggio del lipoaspirato, piuttosto che della centrifugazione o che appoggiano l'utilizzo di un certo calibro della cannula (3 mm) etc..ancora non vi è un atteggiamento univoco, per quanto rimangano saldi i concetti base, che garantiscano la massima atraumaticità sul lipoaspirato e la massima longevità del tessuto trasferito. [175,205]

- Aspirazione a bassa pressione: l'aspirazione con siringa 10mL con retrazione graduale e gentile dello stantuffo, o quella comunque inferiore a 4 mbar, rappresenterebbe il metodo che comporta minor turbolenza in fase di prelievo.[169,206,207,208]

- Utilizzo di strumenti che determinino bassa resistenza al flusso: diminuendo la lunghezza della cannula, aumentandone il calibro, si ridurrebbe anche il rischio di danneggiamento meccanico del grasso. (legge di Hagen-Pouiselle, valida per i liquidi ideali, e generalizzabile con le dovute cautele e correzioni, $R = 8 \eta L / \pi r4$).

- Ricerca di una condizione di giusto compromesso tra traumaticità (chimica e/o meccanica) sull'adipe prelevato eseguita allo scopo purificazione e un altro tipo di shock chimico, derivante dalla contaminazione del prelievo con sangue, siero, lidocaina.

- Il grasso prelevato e conservato a temperatura ambiente deve essere trapiantato più velocemente possibile. (per quanto, la conservazione dello stesso a temperatura di 4°C non influenzerebbe negativamente il potenziale e la vitalità delle cellule staminali derivate dal grasso per un periodo di circa 3 giorni; la criopreservazione si e visto favorire la conservazione delle caratteristiche di tali cellule per un periodo di almeno 6 mesi).[209]

- Già suggerito da Bircol[210], in seguito Coleman stesso suggerisce di trapiantare il grasso in piccolissime quantità per ogni passaggio, per aumentare la superficie di contatto tra ogni porzione trapiantata e il tessuto ricevente ben vascolarizzato e ridurre la possibile migrazione dello stesso, e favorire dunque l'attecchimento dell'innesto e la stabilizzazione meccanicamente l'adipe trapiantato.[147,157]

3.6.3 INFLUENZA DI FATTORI CHIMICO-FISICI

Gli studi più significativi figurano quelli volti a rimuovere i fattori dell'infiammazione, minimizzare il traumatismo cellulare di tipo meccanico e ristabilire l'integrità delle membrane.[211,212]

Alcuni Autori hanno tentato di raggiungere lo stesso scopo tramite l'uso additivo di ormoni, fattori di crescita e interleuchine, come insulina, FGF (fattori di crescita dei fibroblasti), *Ad-VEGF (vascular endothelial growth factor adenovirus mediato)*[213], *IL-8 (interleuchina 8)*[214] e PRP (plasma ricco di piastrine).[215,216,217,218,219,220,221,222]

Il razionale comune nell'uso di questi fattori é costituito dalla loro capacità di accelerare il processo di vascolarizzazione dell'innesto; tuttavia, nel nostro paese (come in tutti i paesi della Comunità Europea), l'uso di sostanze in grado di attivare o alterare composti cellulari destinati al reimpianto

è soggetto ad una severa legislazione (vedi capitolo specifico); ciò implica limiti di costo e tempo che influenzano sensibilmente il loro impiego nella pratica clinica.

3.6.4 INFLUENZA DELLE CELLULE STAMINALI DEL TESSUTO ADIPOSO (ASC)

Le ASCs sono cellule staminali in grado di soddisfare pienamente i "5 criteri per un efficace impiego clinico a scopo rigenerativo delle cellule staminali mesenchimali" proposti nel 2003 da Gimble:[223]

1. *Quantità*: devono essere disponibili in gran numero (da milioni a miliardi).

2. *Accessibilità*: devono essere prelevabili con procedura minimamente invasiva.

   Il tessuto adiposo costituisce il tessuto più accessibile e con la percentuale maggiore di cellule staminali adulte di tutto l'organismo; il numero di cellule staminali (esclusi i preadipociti) presenti in 1g di tessuto adiposo escisso è da 5 a 50 volte maggiore ad 1mL di aspirato midollare.[224]

3. *Multipotenza:* devono essere in grado di differenziarsi in linee cellulari diverse in modo controllabile e riproducibile.

   Le cellule staminali derivate da tessuto adiposo (ASCs) sono cellule in grado sia di autorigenerarsi, sia di differenziarsi nelle linee cellulari dei tre foglietti germinativi, e verso linee cellulari di derivazione mesenchimale (CD13+, CD90+, CD29+, CD34-, CD45-),tra cui cellule adipose e cellule endoteliali. [225,226,227,228,33,63-67] Le ASCs sono in grado di secernere fattori con effetto pro-angiogenico, anti-apoptotico, pro-adipogenico, antinfiammatori e stimolanti la rigenerazione nervosa.[229,230,231]

4. *Sicurezza ed Efficienza*: devono essere trasferibili in modo sicuro ed efficiente autologo ed allologo.

5. *Manipolabilità*: devono poter essere manipolabili secondo le linee guida imposte dalla Good Manifacturing Practice (GMP).

   L'ampia disponibilità di cellule staminali mesenchimali/progenitrici derivate da tessuto adiposo permette un immediato uso terapeutico, senza necessità di cultura in laboratorio.[46,47,67,74-77] Per questo motivo non sono soggette alle limitazioni imposte dalla Good Manifacturing Practice (GMP).[156,155,154]

Come già discusso nei paragrafi precedenti, alcuni ricercatori pensano che la sopravvivenza delle cellule staminali giochi un ruolo importante nella vitalità a lungo termine del trapianto e, quindi nel mantenimento del volume trapiantato. Per quanto vi siano Autori che obiettano tale teoria, [232] secondo recenti osservazioni, i preadipociti e le cellule staminali del tessuto adiposo potrebbero rappresentare le uniche cellule che sopravvivono al trapianto e, proprio la variabilità di numero di queste cellule tra i diversi soggetti, possa influenzare l'outcome long-term e giustificare l'enorme variabilità del risultato osservata nei pazienti. [118,233,128,234]

3.6.5 TESSUTO ADIPOSO E INGEGNERIA TISSUTALE

Nel campo dell'ingegneria biomedica molta attenzione è stata rivolta allo sviluppo di tessuti in grado di integrare le cellule staminali adipose/preadipociti ad un composto acellulare inerte con funzione di matrice o scaffold (es. PLGA o collagene), ovvero ad ottenere un tessuto adiposo artificiale pronto per l'impianto. [235,236,237,238]

Alcuni Autori hanno anche sperimentato nei ratti l'uso di omento (tessuto ricco di cellule endoteliali e VEGF) come struttura di sostegno per i preadipociti, creando quindi un tessuto ingegnerizzato con una doppia componente biologica direttamente prelevabile dall'organismo.[239]

Altre branche dell'ingegneria tissutale hanno invece sviluppato metodiche per stimolare l'adipogenesi staminale dipendente, *in vivo* e senza l'uso diretto delle ASCs o preadipociti.[240,241,242]

Nonostante questi studi confermino la grande potenzialità e versatilità della popolazione staminale adiposa, la mancanza di alcune conoscenze su aspetti fondamentali dei microambienti, del "signaling" intercellulare e delle interazioni cellula-matrice costituisce ancora un ostacolo verso l'efficiente uso clinico di tali biomateriali. Il fattore determinante sembra essere, anche in questo caso, la necessità di una precoce ed efficace vascolarizzazione del tessuto utilizzato.[243,244]

A queste considerazioni si aggiungono quelle di natura legale, che verranno affrontate in un capitolo a parte.

3.7 INNESTO DI TESSUTO ADIPOSO ARRICCHITO IN CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

3.7.1 PREMESSA AL CONCETTO DI ARRICCHIMENTO.

Nell'ambito pratico della Chirurgia Plastica Ricostruttiva le nozioni acquisite sulle ASCs hanno portato, come prima cosa, al tentativo di ottimizzazione qualitativa del tessuto adiposo prima del suo innesto, ovvero alla selezione di quella frazione di lipoaspirato con la maggior concentrazione di cellule adipogeniche e degli altri fattori potenzialmente in grado di ridurre il riassorbimento e migliorare la sopravvivenza dell'innesto stesso.

L'analisi del tessuto adiposo ottenuto dopo centrifugazione, ha permesso di identificare una differenzazione cellulare del tessuto adiposo purificato. La frazione adiposa viene, cioè, a sua volta suddivisa in una frazione ad alta densità (HD Fat) ed una frazione a bassa densità (LD Fat) con distinte caratteristiche biologiche/cellulari *(Figura 3.12)*.[245]

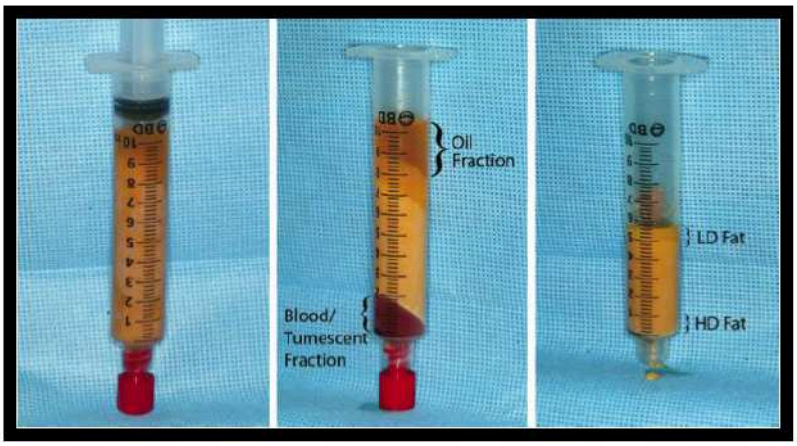


Figura 3.12 Lipoaspirato in siringa Luer-lock da 10mL prima (a) e dopo centrifugazione (b, c). Dopo centrifugazione a 1188g per 3 minuti il tessuto adiposo si divide nelle tre fasi: 1. frazione oleosa (Oil Fraction), 2. frazione contenente sangue e soluzione tumescente (Blood/Tumescent Fraction), 3. frazione fibro-adiposa (tra le altre due). Dopo l'isolamento della frazione adiposa che verrà utilizzata per l'innesto attraverso assorbimento e drenaggio delle altre due soluzioni, si evidenziano la porzione a maggior densità (HD Fat) e quella a minore densità (LD Fat).

La frazione adiposa ad alta densità contiene una maggior quantità di ASCs/cellule progenitrici e citochine vasculogeniche ed antiinfiammatorie (quali VEGF e SDF) rispetto alla frazione adiposa a bassa densità. Da esperimenti condotti *in vivo* (su modello murino) si è riscontrato che l'innesto della frazione ad alta densità del tessuto adiposo, si caratterizza per una più rapida vascolarizzazione e lo sviluppo di una ridotta componente fibrosa in area di innesto, e mostra una maggiore sopravvivenza rispetto all'innesto di frazione a bassa densità. [246,247]

Tuttavia, nella pratica clinica, utilizzare come innesto la sola frazione adiposa ad alta densità è difficilmente realizzabile. Il grasso ad alta densità è infatti solo il 10% del prelievo totale, ciò, oltre ad implicare lo scarto del 90% del rimanente lipoaspirato richiederebbe il prelievo di volumi molto elevati. [245]

La strategia dell'arricchimento cellulare è l'innovazione più recente nell'ambito dell'innesto adiposo e costituisce, concettualmente, la soluzione più completa ai problemi fino ad ora conosciuti.

3.7.2 CAL (CELL- ASSISTED-LIPOTRANSFER)

Nell'arricchimento cellulare dell'innesto adiposo, anche detto CAL (Cell-Assisted Lipotransfer), parte del lipoaspirato viene processata con il solo fine di estrarne la frazione vascolo-stromale (SVF), quella parte del lipoaspirato contenente le ASCs, cellule vascolo-endoteliali (progenitrici), periciti e cellule di derivazione ematica. Contemporaneamente, l'altra metà del lipoaspirato viene preparata per l'innesto. La SVF viene purificata successivamente miscelata al grasso purificato il quale, tornando ai concetti di ingegneria tissutale, funge da scaffold cellulare vitale nei confronti delle ASCs.[248, **Errore. Il segnalibro non è definito.**,244]

Con il CAL è dunque possibile, partendo da un normale lipoaspirato povero in ASCs, ottenere un tessuto adiposo ad alto contenuto staminale scartando solo una modesta percentuale del volume prelevato tramite liposuzione (variabile a seconda del macchinario impiegato) (*Figura 3.13*).[155]

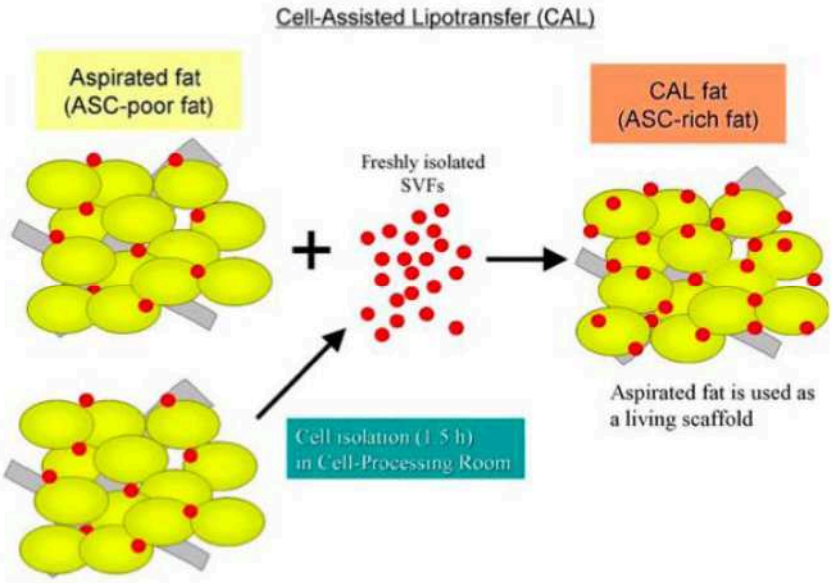


Figura 3.13 Illustrazione schematica dell'arricchimento adiposo con ASCs (CAL). Il tessuto adiposo relativamente povero di ASCs viene supplementato delle ASCs provenienti dall'altra metà del lipoaspirato, ne risulta un tessuto adiposo ricco di ASCs pronto per il trasferimento.[155]

Il procedimento per l'isolamento della SVF e relativa concentrazione delle cellule staminali deve assicurare la massima attenzione in termini di sterilità, preservazione dell'integrità cellulare, minima esposizione all'aria. Molti sono i presidi messi in commercio per ottenere tali obiettivi.

I dispositivi attualmente in commercio per il '*CAL*' sfruttano due distinti principi per l'estrazione della frazione vascolo-stromale: enzimatico (ad esempio i sistemi Celution, Unistation, Lipokit) e meccanico (ad esempio i sistemi Fastem, Lipogem). Alcuni di questi sono stati utilizzati presso la Clinica di Chirurgia Plastica dell'Università degli Studi di Udine e verranno descritti ed analizzati nel Nostro Studio (Figura 3.14).

Gli studi sul lipofilling arricchito con ASCs, per quanto forniscano risultati incoraggianti, sono ancora ad uno stadio troppo precoce per poter rispondere alle molte domande ed aspettative insorte a partire dalla prima applicazione di questa tecnica nel 2006 da parte del gruppo di Yoshimura.[155, 156,249,250]

Il proseguimento degli studi clinici e di laboratorio è dunque fondamentale per l'ottenimento di risultati a lungo termine su quello che si prospetta essere il "gold standard" per diversi trattamenti ricostruttivi ed estetici in un futuro neanche poi cosi lontano.

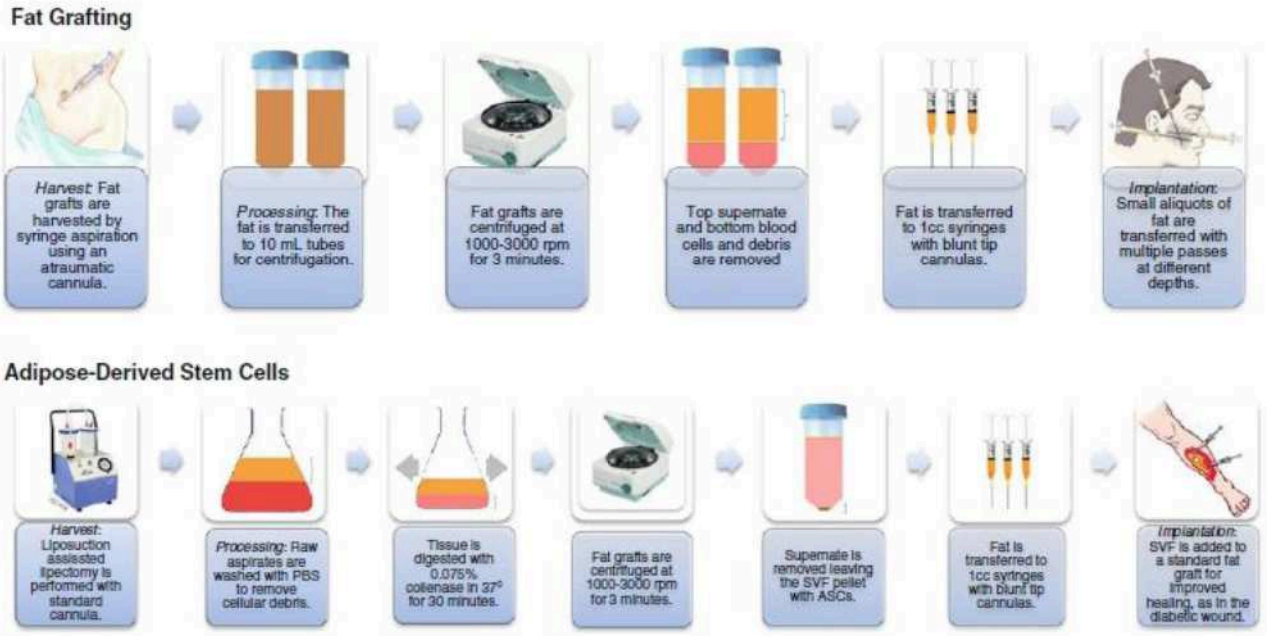


Figura 3.14 Procedura di raccolta, processazione e impianto. Gli innesti di tessuto adiposo sono raccolti usando una cannula atraumatica in un sito donatore (esempio in figura, l'addome), per poi essere processate (tramite centrifugazione e rimozione del sovranatante) e iniettate tramite siringhe nel sito di innesto nello stesso paziente. Le ASC, sono raccolte usando una cannula standard da liposuzione, poi processate tramite lavaggio, digestione (con collagenasi), e centrifugazione per ottenerne la concentrazione.[172]

3.8 SICUREZZA ONCOLOGICA NELL'IMPIEGO MAMMARIO DELL'INNESTO ADIPOSO ED INNESTO ADIPOSO ARRICHITO

Una delle preoccupazioni che hanno a lungo limitato l'utilizzo del trapianto di tessuto adiposo autologo a livello mammario, sia per interventi post-oncologici sia estetici, è che questo possa interferire con le metodiche radiodiagnostiche di screening e follow-up per carcinoma mammario, attraverso il rilievo in mammografia, RMN ed ecografia di lesioni cistiche e calcificazioni di dubbia significatività, ponendo talvolta dei dubbi difficilmente risolvibili. Attualmente tale problematica è stata perlopiù superata, grazie all'acquisizione da parte dei radiologi di maggiore esperienza nei confronti di una metodica di uso comune, che ha loro permesso di riuscire a differenziare con relativa facilità quadri sospetti per lesione neoplastica. e esiti di lipostruttura (liponecrosi, fibrosi, calcificazioni asimmetriche, opacità sospette).[251,252,253,254,]

Le metodiche di imaging attuali appaiono in grado di poter discriminare le lesioni maligne dalle benigne e, anzi, sono utilizzate nella valutazione della stabilità dell'innesto adiposo grazie allo studio di parametri quantitativi (spessore del tessuto innestato) e qualitativi (vascolarizzazione e vitalità) a lungo termine dell'innesto adiposo.

Oltre alla problematica diagnostica, le proprietà riconosciute al tessuto adiposo riguardanti la sua potenziale attività di stimolo alla proliferazione cellulare, alla neoangiogenesi e alla differenzazione cellulare, ha messo in discussione la sicurezza di questa procedura, soprattutto quando utilizzata in pazienti oncologiche. [255, 256,257]

Alcuni studi condotti *in vitro* ed *in vivo* sembrano confermare che le cellule staminali ed i precursori contenuti nell'innesto adiposo promuovano la proliferazione e la disseminazione di alcuni tipi di cellule tumorali. [258,259,260,261,262] Tale influenza si rifletterebbe in modo minore o nullo sulle cellule sane e tumorali quiescenti rispetto a quelle anche solo parzialmente attive.[263] Altri studi dello stesso genere affermano al contrario che le ASCs abbiano in alcuni casi un ruolo addirittura potenzialmente protettivo / anti-tumorale.[264,265]

Indipendentemente da questi esperimenti *in vitro* o su modello murino, i primi studi clinici hanno fornito ulteriori, e più confortanti, elementi di valutazione. Le complicanze note dell'innesto adiposo, tra cui la formazione di cisti oleose, fibrosi, necrosi del grasso e calcificazioni non costituiscono un ostacolo evidente nella diagnosi precoce di cancro al seno, né causano significanti morbidità.[**Errore. Il segnalibro non è definito.**,155,266,267]

Rimane ancora da stabilire con maggiori evidenze scientifiche se, ed in che modo, l'innesto di tessuto adiposo determini, di per se, un aumento del rischio oncologico (recidiva locale, potenzialità metastatica o carcinogenesi).[268]

Come riportato da recenti review,[268, 269] la metodica è stata in più occasioni riconosciuta come uno strumento sicuro in aggiunta alle altre affermate tecniche, nella pratica clinica della ricostruzione mammaria e supportata da alcuni autori come alternativa all'impianto protesico nella mastoplastica additiva.[270,271,272,273] Anche società scientifiche che inizialmente sconsigliavano o addirittura bandivano l'impiego del lipofilling mammario hanno gradualmente cambiato la loro linea di pensiero.

La French Association of Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery (SOFCPRE) tramite un comunicato del 2012 ha stabilito, in materia, le seguenti indicazioni: [255]

- **nelle pazienti sottoposte a chirurgia conservativa** l'innesto adiposo autologo è un'opzione percorribile dopo un periodo di almeno 3 anni dall'intervento demolitivo liberi da malattia. Viene indicato il successivo stretto follow-up da eseguirsi in un centro specializzato secondo protocollo oncologico;

- **dopo mastectomia completa** è un'opzione percorribile in ogni momento previo esame clinico ed ecografico preoperatorio alla ricerca di residui di malattia, tecnica non indicata per il seno contro laterale. Viene indicato il successivo stretto follow-up da eseguirsi in un centro specializzato secondo protocollo oncologico;

- **nei difetti congeniti o a scopo puramente estetico** è un'opzione sempre percorribile a patto di un basso rischio della paziente di sviluppare cancro al seno (ad esempio età inferiore ai 35 anni, assenza di storia familiare o personale di carcinoma mammario, assenza di mutazioni BRCA I/II, screening clinico e radiologico preoperatorio negativo). Viene indicato un controllo post-operatorio radiologico ad 1 anno.

Nel 2009 l'American Society of Plastic Surgeons (ASPS) tramite la sua "task force" dedicata aveva pubblicato indicazioni del tutto simili a quelle sopra riportate.[274]

In base alla loro esperienza, alla revisione di studi clinici (con livello di evidenza IV), all'analisi di grandi serie di casi retrospettivi, opinioni di esperti e le controversie di studi clinici di base ben condotti, Krumboeck et al. hanno proposto un nuovo approccio preliminare suddiviso in base al tipo di intervento (estetico o ricostruttivo) e alle individuali categorie di rischio.[275] Le principali differenze con le indicazioni 2012 della SOFCPRE sono:

- **nella ricostruzione post mastectomia completa**, l'aggiunta di verifica istologica (in sede demolitiva) per la radicale asportazione di tutto il tessuto mammario in vista dell'eventuale innesto adiposo;
- **nella chirurgia conservativa**, un follow-up pre-innesto adiposo di 5 invece che 3 anni. Essendo l'innesto finalizzato "solamente" ad un miglioramento della simmetria o correzione delle cicatrici l'attesa di 5 anni sarebbe giustificata da un significativo minor rischio di recidive;
- **nella chirurgia estetica** in pazienti senza fattori di rischio, si consiglia l'intervento in ambito di protocollo di studio e viene inoltre posta l'indicazione a controlli radiologici post-operatori a 1,5 e 10 anni (oltre al normale programma di screening per cancro al seno).

Per quanto concerne l'innesto adiposo arricchito con cellule staminali adipose (CAL), il delicato argomento è ancora molto discusso dalla comunità scientifica: se da un lato, infatti, è vero che maggiore è il numero di ASCs all'interno dell'innesto e migliore sarà il risultato, dall'altro ciò potrebbe determinare un aumento del rischio oncologico. Nessuno studio ha fino ad ora determinato se esista, o quale sia, la quantità limite di cellule staminali innestabili 'in sicurezza'. Gli studi sinora condotti si sono dimostrati contrastanti e inconcludenti.

Nonostante le conoscenze attuali sembrano presentare dati rassicuranti, i *follow-up* a troppo breve termine e la mancanza di una quantità di dati adeguata frena l'uso del CAL a livello mammario come pratica routinaria. I risultati del sistematico *follow-up* dei pazienti inseriti negli studi già avviati e nei nuovi studi clinici prospettici a lungo termine saranno quindi fondamentali per delineare in via definitiva i limiti di questa interessante strategia ricostruttiva e rigenerativa.[274, ,276 , 276, 273, 272, 263]

In questo ambito, riportiamo la nostra esperienza: il gruppo senologico multidisciplinare della Clinica Chirurgica e di Chirurgia Plastica dell'Università degli Studi di Udine, ha stabilito un protocollo diagnostico-terapeutico specifico per tutte le pazienti sottoposte a chirurgia oncologica della mammella e candidate a lipostruttura.

Dopo acquisizione di consenso informato, le pazienti candidate a lipostruttura con intervallo libero da malattia di almeno 2 anni, vengono inserite in uno studio osservazionale con *follow up* e rilievo di immagini ecografiche a 2, a 6 e a 12 mesi dall'intervento di innesto adiposo e in seguito annualmente.

Da un punto di vista oncologico, il gruppo di Udine non ha riscontrato differenze di riprese di malattia tra le pazienti trattate e non trattate con innesto di tessuto adiposo (secondo protocollo) e ritiene che ogni paziente candidata a chirurgia oncologica della mammella vada sottoposta a studio RMN mammario pre-operatorio, per ridurre il rischio legato al mancato riconoscimento di lesioni satellite alla principale (Ca in situ).[276]

4. ASPETTI LEGALI E CRITICITA'

4.1 INTRODUZIONE

I continui e rapidi progressi della ricerca clinica e scientifica, soprattutto in ambito biotecnologico, hanno portato in brevissimo tempo allo sviluppo di nuovi prodotti/medicinali a base di cellule e con un grande potenziale nel trattamento di numerose malattie. Le innovazioni non sempre vengono affiancate tempestivamente con un quadro legislativo (sia a livello nazionale che europeo) adeguato a regolarle.

Nell'ambito dei prodotti cellulari, pur esistendo una normativa generale manca una legge che regoli in modo specifico e completo l'uso delle cellule staminali. Al momento attuale, non senza difficoltà, queste lacune sono colmabili tramite desunzioni frutto dell'analisi e confronto delle norme (spesso sovrapponibili e aspecifiche) oggi disponibili.

In questo capitolo verrà fornito un quadro generale sui principali aspetti regolatori nell'uso attuale delle cellule staminali e delle terapie avanzate.

4.2 TERAPIE AVANZATE

Il Regolamento (CE) n. 1394/2007 all'art 2 (Definizioni), paragrafo 1, lettera a) stabilisce alcuni concetti importanti che permettono di fare delle prime distinzioni tra le diverse tipologie di cellule impiegate a scopo terapeutico nell'uomo.

Con il termine "**Terapie Avanzate"** (TA) si intende uno qualsiasi dei seguenti medicinali ad uso umano:

- medicinali di terapia genica;
- medicinali di terapia cellulare somatica;
- prodotti di ingegneria tessutale.

4.2.1 PRODOTTO DI INGEGNERIA TISSUTALE

La definizione di "prodotto di ingegneria tessutale" compare per la prima volta nella legislazione, nel Regolamento (CE) n. 1394/2007[277] all'art 2 (Definizioni):

- contiene o consiste di cellule o tessuti prodotti dall'ingegneria cellulare o tessutale,
- è presentato come avente proprietà atte a rigenerare, riparare o sostituire un tessuto umano oppure viene utilizzato o somministrato ad esseri umani a tal fine.

Un prodotto di ingegneria tessutale può contenere cellule o tessuti di origine umana o animale, o entrambe. Le cellule o i tessuti possono essere vitali o non vitali. Il prodotto può anche contenere sostanze supplementari, quali prodotti cellulari, biomolecole, biomateriali, sostanze chimiche, supporti o matrici.

Sono esclusi i "prodotti che contengono o consistono esclusivamente di cellule e/o tessuti umani o animali non vitali, che non contengono cellule o tessuti vitali e che non agiscono principalmente con azione farmacologica, immunologica, o metabolica".

Inoltre "cellule o tessuti sono considerati di ingegneria tessutale se soddisfano almeno una delle seguenti condizioni":

- le cellule o i tessuti sono stati sottoposti ad una rilevante manipolazione così da ottenere caratteristiche biologiche, funzioni fisiologiche e proprietà strutturali pertinenti alle finalità di rigenerazione, riparazione o sostituzione.
- le cellule o i tessuti non sono destinati ad essere utilizzati per la stessa/le stesse funzioni essenziali nel beneficiario e nel donatore.

La Direttiva della Commissione 2009/120/CE del 14 settembre 2009, modifica invece l'allegato alla Direttiva 2001/83/CE adeguando le definizioni e i requisiti scientifici e tecnici per i prodotti medicinali per terapia genica e terapia cellulare somatica; le definizioni dei prodotti di ingegneria tissutale restano invece quelle stabilite dal Regolamento n. 1394/2007.

4.2.2 PRODOTTO DI TERAPIA GENICA

Per prodotto di terapia genica si intende un medicinale di origine biologica con le seguenti caratteristiche:

a) contiene una sostanza attiva che contiene a sua volta o consiste di un acido nucleico ricombinante usato sugli esseri umani o ad essi somministrato al fine di regolare, riparare, sostituire, aggiungere o eliminare una sequenza genetica;

b) il suo effetto terapeutico, profilattico o diagnostico è direttamente collegato alla sequenza di acido nucleico ricombinante in esso contenuta o al prodotto dell'espressione genetica di tale sequenza.

I medicinali di terapia genica non comprendono i vaccini contro le malattie infettive.

4.2.3 PRODOTTO PER TERAPIA CELLULARE SOMATICA

Per prodotto per terapia cellulare somatica si intende un medicinale di origine biologica con le seguenti caratteristiche:

a) contiene o consiste di cellule o tessuti che sono stati sottoposti a una rilevante manipolazione così da alterare le caratteristiche biologiche, le funzioni fisiologiche o le proprietà strutturali in riferimento all'uso clinico proposto, oppure contiene o consiste di cellule o tessuti che non sono destinati a essere usati per le stesse funzioni essenziali nel ricevente e nel donatore;

b) è presentato come atto a trattare, prevenire o diagnosticare una malattia mediante l'azione farmacologica, immunologica o metabolica delle sue cellule o dei suoi tessuti, oppure è usato sugli esseri umani o è loro somministrato a tal fine.

Tutti i prodotti di TA sono dal punto di vista giuridico dei **prodotti medicinali** e il regolamento che li disciplina è l'emendamento 1394/2007 del Parlamento Europeo, entrato in vigore in Italia dal Dicembre 2008.

I medicinali per TA non vanno confusi con altri prodotti a base di cellule come quelli impiegati per la trasfusione di sangue, per il trapianto di midollo e l'utilizzo di staminali isolate dal cordone ombelicale o da tessuti ed organi, la cui somministrazione presso ospedali pubblici, centri trasfusionali e unità oncologiche è ormai consolidata. Questi infatti sono classificati come **prodotti del sangue** (Legge 21.10.2005 n. 219) [278] o **trapianti di cellule umane** (Direttiva 2004/23/CE)[279] ed hanno un comune processo di lavorazione, che consiste delle seguenti fasi principali:

- Prelievo dal donatore.
- Eventuale conservazione in centri trasfusionali o in banche di tessuti ed organi.
- Trapianto nel ricevente al momento della richiesta.

4.3 IL CONCETTO DI "MANIPOLAZIONE"

Le cellule per terapia avanzata (TA), prima di essere somministrate al ricevente, vengono sottoposte ad un processo di "manipolazione" eseguita generalmente in laboratorio, con lo scopo di modificare le cellule del donatore ed ottenere un cambiamento che sia mirato ed utile alla cura del ricevente.

Una prima distinzione tra i prodotti cellulari è il grado di manipolazione.

Tessuto o cellula non manipolata

Si definisce non manipolata un tessuto o cellula di origine umana, sia autologa sia allogenica, prelevata e stoccata nello stesso stato in cui si trova al momento del prelievi ed utilizzata clinicamente senza alcuna manipolazione. Trattandosi di un tessuto o cellula (se l'uso non è autologo ed immediato), deve essere stoccato, validato e distribuito da una banca a ciò autorizzata dalla Regione ed accreditata dalla Regione tramite il Centro Nazionale Trapianti.

Risponde alle normative europee 2004/23/EC, 2006/86/EC,[280] 2006/17/EC,[281] D.L. 191 6/11/2007 e D.L. 16 25/01/2010.

Tessuto o cellula minimamente manipolata

La definizione delle procedure classificate "minime manipolazioni" è contenuta nell'allegato 1 del Regolamento 1394/2007 del Parlamento Europeo (Tab. 4.1). Dal punto di vista legislativo i tessuti o cellule minimamente manipolati sottostanno alle stesse normative viste per tessuti o cellule che non subiscono alcuna manipolazione.

Tessuto o cellula estensivamente manipolata

Per "manipolazione estensiva" di cellule e tessuti si intendono tutte quelle manipolazioni che possono portare ad un'attivazione delle cellule e/o ad una stimolazione della proliferazione cellulare. Vengono infatti considerate "estensivamente manipolate" tutte le cellule che abbiano subito una manipolazione del loro patrimonio genetico o che risultino sostanzialmente mutate sotto un profilo fisiologico o biologico.

Le cellule o tessuti estensivamente manipolati sono a tutti gli effetti da considerarsi terapia avanzata (TA).

4.4 SCOPO TERAPEUTICO DEL PRODOTTO CELLULARE IN BASE ALLA SUA FUNZIONE E LOCALIZZAZIONE PRIMARIA

Lo scopo terapeutico e l'origine del prodotto cellulare costituiscono le basi per un altro criterio giuridicamente vincolante, ovvero la distinzione tra uso:

- omologo
- non omologo

4.4.1 USO OMOLOGO

Il prodotto cellulare viene utilizzato in modo omologo quando lo scopo terapeutico delle cellule utilizzate rispecchia la funzione che le stesse cellule svolgono nell'organismo.

Esempi di uso omologo sono la trasfusione di sangue, trapianto di midollo ed innesti epidermici/dermo-epidermici.

La regolamentazione varia a seconda della natura, e impiego del singolo prodotto, rimanendo comunque svincolata rispetto a quella delle TA (a meno che non vi sia stata alcuna manipolazione estensiva).

4.4.2 USO NON OMOLOGO.

Il prodotto cellulare viene utilizzato in modo *non* omologo quando lo scopo terapeutico delle cellule utilizzate non rispecchia la funzione che le stesse cellule svolgono nell'organismo.

Ad esempio, la somministrazione di cellule staminali isolate dal midollo osseo e trasferite nel cuore di un paziente cardiopatico nell'immediato periodo post-infarto con lo scopo di riparare il tessuto danneggiato e ripristinare la funzione cardiaca compromessa dall'infarto. Allo stesso modo, viene considerato non omologo il trasferimento di prodotti cellulari in una sede corporea non naturalmente occupata da quella tipologia di cellula.

L'uso non omologo, anche se autologo, è considerato terapia avanzata (TA).

Sia il Regolamento sia le molteplici linee guida elaborate dall'Agenzia Europea del Farmaco (EMA) riguardo alle TA, focalizzano l'attenzione sugli aspetti produttivi e della sicurezza di questi nuovi prodotti.

4.5 APPLICAZIONE DELLE BUONE PRATICHE MANUFATTURIERE (GMP)

La complessità biologica delle TA, difficilmente paragonabile ai farmaci classici, riduce la significatività e predittività dei tradizionali trials preclinici per il successivo impiego nell'uomo. Si è reso dunque indispensabile definire accuratamente l'intero processo di produzione e di manipolazione delle cellule sia validando l'utilizzo delle sostanze e delle condizioni di coltivazione sia effettuando costanti e ripetuti controlli sui prodotti intermedi.

Il Ministero della Salute, in accordo con la vigente legislazione e la corrente pratica internazionale, ha deliberato che i prodotti medicinali per sperimentazione clinica devono essere soggetti agli stessi standard qualitativi richiesti per la messa in commercio.[282]

Una comunicazione del Ministero della Salute pubblicata nella Gazzetta Ufficiale n°46 del 23/2/2002 richiede che il produttore di materiale destinato alla sperimentazione comunichi al Ministero della Salute tale intenzione prima di iniziare la produzione. Il Ministero della Salute certifica dopo ispezione che la produzione avviene nel rispetto delle vigenti regole (*Good Manufacturing Practices*).

Tali regole sono riassunte nel Decreto Legislativo n.178.

4.6 AVVIO DI STUDI CLINICI

Analogamente a quanto avviene per i farmaci, anche per la sperimentazione con medicinali per TA la normativa italiana prevede che si chieda l'approvazione da parte della Commissione per l'accertamento dei Requisiti dei Prodotti Farmaceutici di Nuova Istituzione presso l'Istituto Superiore della Sanità per gli studi clinici di fase I, inviando un dossier con le informazioni relative alla produzione, con i dati preclinici e clinici, ove disponibili, mentre l'autorizzazione per le fasi successive viene rilasciata dall'AIFA (Ufficio Ricerca e Sperimentazione Clinica). I prodotti di terapia avanzata devono essere preparati in un laboratorio (*Cell-Factory*) autorizzata dall'AIFA *(Figura 4.1).*

La responsabilità del trattamento del paziente con le terapie avanzate è divisa tra il laboratorio ed il medico che somministra, oltre che con le autorità sanitarie competenti (l'Istituto Superiore di Sanità, l'AIFA ed i Comitati Etici) che devono giudicare l'innocuità e la sicurezza dei prodotti.

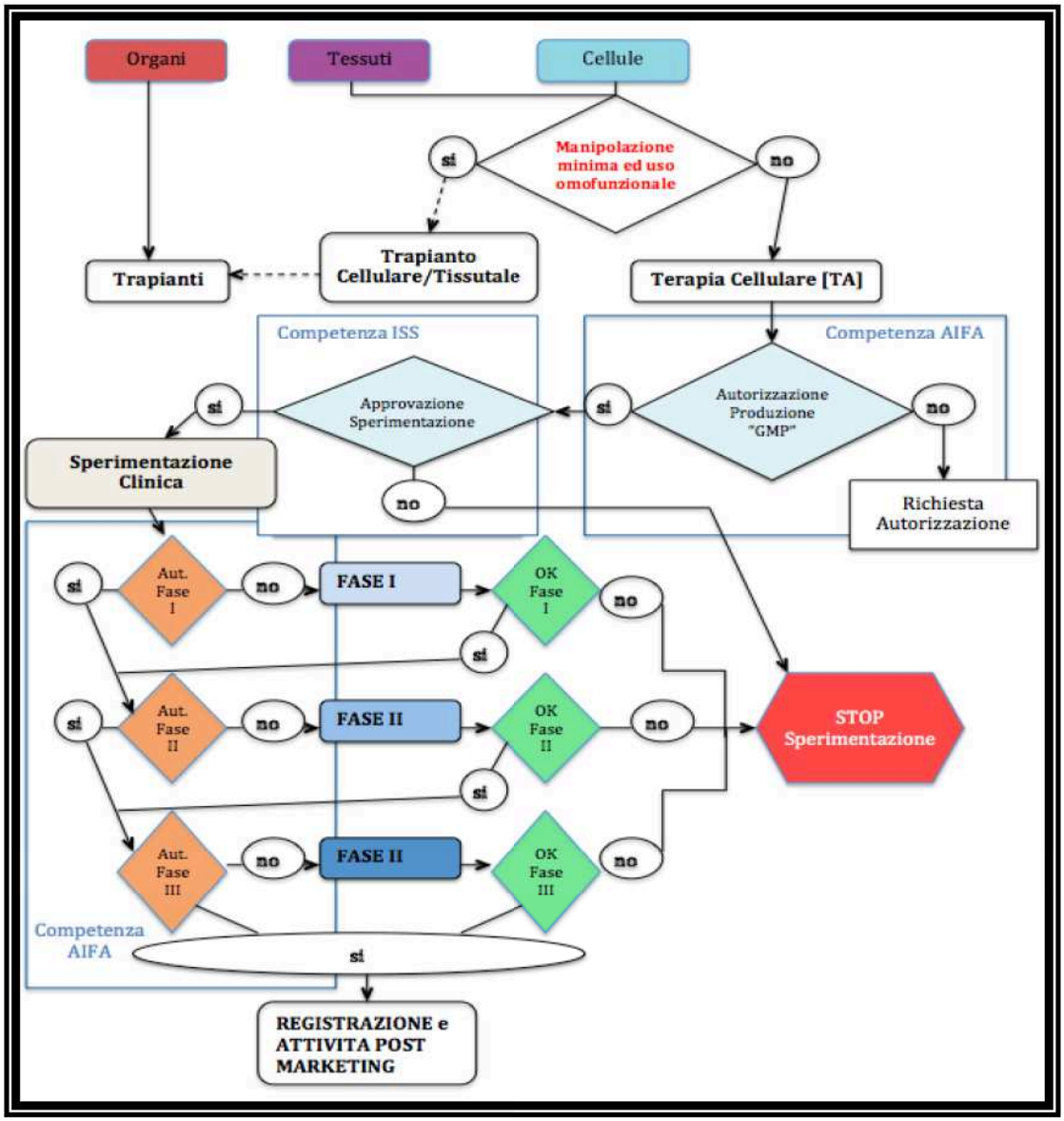


Figura 4.1 Algoritmo riassuntivo della differenziazione tra attività di trapianto e di TA; annesso iter di autorizzazione per la produzione in laboratorio, approvazione della sperimentazione e sperimentazione clinica in tutte le sue fasi delle TA.

4.7 INNESTO DI TESSUTO ADIPOSO: IL PUNTO DI VISTA GIURIDICO

l trasferimento di tessuto adiposo con tecnica standard è ormai considerato una pratica consolidata. Il suo utilizzo è:

- autologo
- intraoperatorio
- omofunzionale
- soggetto a minima manipolazione
- manipolato attraverso sistemi asettici
- volto al trasferimento di tessuto

L'uso autologo intraoperatorio svincola la pratica dalla necessità di usufruire di banche dei tessuti, ed in genere dalle norme previste dalla Direttiva 2004/23/CE.

Nello stesso contesto, la manipolazione non estensiva abbinata al trasferimento di tessuto con funzione omologa esclude la pratica dalla definizione di terapia avanzata o di prodotto per terapia cellulare; il regolamento 1394/2007 con relative indicazioni di GMP in *cell-factory* autorizzate non deve dunque essere rispettato.

Dal punto di vista giuridico quindi, il lipofilling (o lipostruttura o lipotransfer) è considerato un innesto tissutale, quindi sotto responsabilità diretta del medico, svincolato dalle norme sopra citate.

4.8 CELLULE STAMINALI DEL TESSUTO ADIPOSO: PUNTO DI VISTA GIURIDICO

Come precedentemente accennato, l'utilizzo delle cellule staminali mesenchimali è dal punto di vista giuridico-normativo piuttosto carente. Il grande vantaggio di questa popolazione cellulare è costituito dall'essere "cellule adulte" ovvero non estratte da embrione o cordone, ciò esula il loro utilizzo dai divieti normativi (Legge 40/2004) e dai problemi di tipo bioetico.

Dall'esame comparato delle leggi 219/2005 art.2 e 107/90 emerge che '*il prelievo delle staminali mesenchimali non costituisce attività trasfusionale dal punto di vista pratico, essendo in ambito non trasfusionale e non essendovi norme "ad hoc" è possibile usare tali cellule per tutto ciò che non sia esplicitamente proibito'.*

Con i dispositivi a circuito chiuso attualmente presenti sul mercato (vedi Citory-Celution; Lipokit Medikane etc), è possibile rispettare il così detto "One Step" chirurgico anche per l'estrazione ed uso intraoperatorio autologo delle staminali mesenchimali contenute nella FVS del tessuto adiposo.

Rispettando i principi di omofunzionalità, minima manipolazione, associazione delle cellule ad almeno una piccola frazione di tessuto adiposo e manipolazione in sistemi asettici è quindi possibile utilizzare le staminali mesenchimali nella stessa seduta operatoria in cui vengono estratte dal paziente. Tali procedure dovranno avvenire in una sala operatoria o in strutture qualificate come "ambulatorio" sotto un profilo igienico-sanitario.

Il tessuto adiposo costituisce attualmente l'unica fonte in grado di fornire un numero tale di cellule staminali da non dover ricorrere all'espansione in laboratorio.[283,284]

4.9 CRITICITA'

Permangono tuttavia alcuni aspetti non perfettamente chiariti, sia sulla effettiva omofunzionalità delle cellule staminali nel sito ricevente sia sulla effettiva "minima manipolazione" cellulare durante il processo di separazione:[285]

- Nei sistemi di separazione enzimatici con collagenasi si stanno studiando gli effetti dell'enzima sulle componenti cellulari (in particolare sulla degradazione del glicocalice cellulare) e possibili conseguenze che ciò comporterebbe.
- Riguardo all'omofunzionalità è stato messo in discussione il ruolo effettivo delle staminali nella sede di innesto per quanto riguarda la loro funzione "rigenerativa". La domanda, lecita sia in ambito di sicurezza oncologica che giuridico, è se siano le cellule staminali trasferite a rigenerarsi o semplicemente stimolino insieme ad altri componenti della VSF la rigenerazione del tessuto in cui si trovano.

4.10 PROSPETTIVE FUTURE: LE BANCHE DEL TESSUTO ADIPOSO

Nonostante non sia considerato un intervento "salvavita", il trapianto di tessuti costituisce un settore della medicina in rapida espansione e con notevoli possibilità terapeutiche nel miglioramento della vita dei pazienti.

Come precedentemente illustrato, la normativa che definisce i parametri di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, l'analisi, la lavorazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule d'origine umana è la direttiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio. I tessuti vengono dunque conservati all'interno delle "Banche dei Tessuti", definite "*come ogni struttura sanitaria pubblica o accreditata, senza attività di lucro, individuata dalla Regione di competenza, che ha il compito di conservare e distribuire i tessuti e le cellule prelevate, certificandone la tracciabilità, l'idoneità e la sicurezza, come definito nell'Accordo Stato-Regioni del 23 settembre 2004, in attuazione dell'articolo 15, comma 1, della Legge 91/99 e che opera in conformità alle presenti linee guida e alla normativa europea vigente. L'utilizzo di tessuti umani per trapianto è consentito solo previa valutazione della loro idoneità e sicurezza da parte delle strutture definite nel precedente paragrafo o da struttura estera riportata negli elenchi predisposti dal Centro Nazionale Trapianti. Non è consentito il trapianto di tessuti non provvisti della documentazione rilasciata da una Banca, che certifichi la sicurezza e la qualità del tessuto fornito.*" [286]

I materiali attualmente stoccati nelle banche dei tessuti italiane sono prelevati da:

- tessuto oculare (cornea)
- ossa lunghe (es. femore "in toto" o testa di femore)
- struttura muscolo-scheletrica (cartilagini, tendini,menischi)
- cute
- placenta (membrana amniotica)
- sistema cardiovascolare (arterie, vasi, valvole cardiache)

Analogamente ai tessuti è possibile conservare presso le 18 banche dedicate in Italia anche il sangue da cordone ombelicale, a condizione che la donazione avvenga a scopo solidaristico eterologo non autologo.

Il tessuto adiposo non è ancora oggetto di "banking" su territorio italiano, altri paesi come San Marino, Svizzera, e Belgio hanno già avviato questo tipo di attività.

Il tessuto adiposo presenta ancora una notevole incompatibilità immunologica tale da rendere non sicuro il suo innesto a scopo eterologo. Da ciò deriva un'inevitabile ostacolo all'avvio di banche dedicate nel nostro paese; le interessanti prospettive terapeutiche multidisciplinari fornite dalle ASCs costituiscono, altresì, un evidente incentivo per l'avvio di tale pratica.

5. LO STUDIO SCIENTIFICO

5.1 INTRODUZIONE DELLO STUDIO

L'interesse sullo studio delle caratteristiche e delle applicazioni della lipostruttura e delle cellule staminali mesenchimali ottenute dal tessuto adiposo (ASC) ha avuto una rapida crescita e diffusione nella comunità scientifica internazionale. La possibilità di utilizzare il grasso come *filler* autologo e, nello stesso tempo, come fonte di cellule staminali è alla base del concetto di 'terapia rigenerativa'.

Alcune criticità rimangono ancora dibattute in una procedura che è oggi ampiamente utilizzata non solo nel settore della chirurgia plastica ricostruttiva ed estetica, ma in tutti gli ambiti della medicina; tra queste: 1. la variabilità dell'attecchimento del tessuto adiposo con conseguente risultato clinico instabile e imprevedibile, 2. il rapporto "cellule staminali-recidiva di malattia" in pazienti oncologici, e, non ultima, 3. una regolamentazione legislativa in Italia ancora poco specifica e non esaustiva.

La Letteratura riporta valori di riassorbimento del tessuto adiposo innestato variabili dal 20 al 90%.[185]

Diversi studi hanno proposto delle modifiche alla metodica di *lipotransfer* al fine di ottimizzare la stabilità dei risultati clinici a distanza; in quest'ambito si è ipotizzato che l'arricchimento del tessuto adiposo con le cellule staminali ottenute dallo stesso lipoaspirato possa svolgere un ruolo determinante nell'aumentare l'attecchimento dell'innesto adiposo, grazie alle proprietà pro-angiogenetiche, antinfiammatorie e differenziative delle ASCs.

Secondo la teoria riportata da Yoshimura,[154,156,155] dopo pochi mesi dall'innesto quasi tutte le cellule innestate in corso di lipofilling vanno incontro a morte e vengono rimpiazzate dalla proliferazione e differenzazione della frazione vascolo-stromale presente all'interno del tessuto adiposo trapiantato.

Coerentemente, sono stati messi in commercio negli ultimi anni numerosi presidi per l'ottimizzazione di una metodica atraumatica, sicura, ripetibile, e applicabile dal punto di vista giuridico, per l'aspirazione del tessuto adiposo e l'ottenimento della frazione vascolo-stromale contenente le cellule staminali mesenchimali. Di questi presidi, alcuni sfruttano, per l'isolamento delle cellule staminali, metodiche di separazione meccanica, altri enzimatica.

La Clinica di Chirurgia Plastica e Ricostruttiva dell'Università di Udine, in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Mediche e Biologiche dell'Università di Udine, ha messo a confronto le caratteristiche cellulari ottenute da alcune delle più utilizzate apparecchiature di arricchimento e analizzato i risultati clinici emersi con le relative procedure in pazienti sottoposte a lipostruttura in esiti di ricostruzione mammaria.

A tal fine, sono state analizzate le cellule staminali mesenchimali ottenute con la metodica di lipostruttura non arricchita, definita nel testo come 'tradizionale' in quanto modifica della procedura proposta originariamente da Sidney Coleman, e le ASCs estratte dal lipoaspirato arricchito ottenuto con tre diversi sistemi di arricchimento (Cytori Celution System - Lipokit Medikhan System – FaStem Corios System). Le ASCs sono state studiate in termini di resa, immunofenotipo, espressione di markers di staminalità, cinetica di espansione, clonogenicità e capacità differenziative.

Dal punto di vista clinico, le pazienti trattate con lipostruttura in esiti di chirurgia mammaria post-oncologica sono state introdotte in uno studio multicentrico con l'obiettivo di monitorare nel tempo la stabilità del risultato ottenuto, attraverso la misurazione ecografica dello spessore del tessuto sottocutaneo dell'area trattata e mediante il confronto delle immagini pre e post operatorie eseguite. I risultati clinici presentati sono preliminari, in quanto il follow-up delle pazienti trattate è ancora oggetto di studio.

5.2.1 PAZIENTI ARRUOLATI PER LO STUDIO

Nello studio sono state arruolate n=33 pazienti sottoposte a lipostruttura in esiti di ricostruzione mammaria tramite differenti tecniche di processazione del tessuto adiposo presso la Clinica di Chirurgia Plastica dell'Università degli Studi di Udine nel periodo compreso tra gennaio 2010 e gennaio 2012. Le analisi cellulari sono state eseguite dall'equipe del Dipartimento di scienze Mediche e Biologiche della Clinica di Anatomia Patologica dell'Università degli Studi di Udine.

Della popolazione arruolata, 16 pazienti sono state trattate tramite tecnica 'standard', eseguita secondo una modifica alla procedura di Coleman, mentre nelle restanti 17 pazienti la lipostruttura è stata eseguita usando tessuto adiposo autologo arricchito in ASCs utilizzando tre differenti macchinari: Cytori Celution System (n=8), Lipokit Medikhan System (n=4) e FaStem Corios System (n=6). La seguente tabella riassume le caratteristiche cliniche delle pazienti arruolate (*Tabella 5.1*).

		Lipoaspirati Arricchiti		
Caratteristiche cliniche	**Lipoaspirati Non Arricchiti**	**Totale**	**Divisione per metodo**	
N (%)	16 (48,5%)	17 (51,5%)	8 (24,24%)	Cytori
			4 (12,12%)	Lipokit
			5 (15,15%)	FaStem
Quantità iniettata	95cc.	150cc.	176,5 (75-230)	Cytori
median	(54-160)	(60-230)	135 (60-175)	Lipokit
(range)			80 (75-165)	FaStem
Comorbidità	0 (0,00%)	2 (11,76%)	1 (12,5%)	Cytori
			1 (25%)	Lipokit
			0 (0%)	FaStem
Terapie Adiuvanti	10 (62,5%)	8 (47,06%)	3 (37,5%)	Cytori
			3 (75%)	Lipokit
			2 (40%)	FaStem
Terapie	7 (43,75%)	9 (52,94%)	5 (62,5%)	Cytori
Ormonali			2 (50%)	Lipokit
			2 (40%)	FaStem
Età	49,5 (21-71)	49 (19-74)	46 (41-70)	Cytori
Media (range)			47,5 (41-55)	Lipokit
			52 (19-74)	FaStem
BMI kg/m² median (range)	22,35	21,3	21,15 (20,6-30,5)	Cytori
	(19,36-30,3)	(19,8-31,2)	21,56 (20-31,2)	Lipokit
			22,4 (19,8-24,4)	FaStem

Tabella 5.1: Caratteristiche della popolazione arruolata trattata con procedura standard o con metodiche di arricchimento.

5.2.2 VALUTAZIONE CLINICA E ECOGRAFICA

Per l'analisi clinica, abbiamo sottoposto le pazienti trattate con lipostruttura con le diverse metodiche a misurazione ecografica dello spessore del tessuto sottocutaneo delle aree innestate e a fotografie cliniche nelle proiezioni 'standard' (antero-posteriore, latero-laterale, a tre-quarti lateralmente a destra e sinistra) (Figura 5.1) pre-operatoriamente e post-operatoriamente a 6-12-24 mesi.

Figura 5.1: Fotografie post-operatorie secondo proiezioni standard della regione mammaria. Fotografie postoperatorie (VI) in paziente sottoposta a Quart a livello della mammella sinistra e ricostruzione con lipostruttura arricchita (stessa paziente mostrata precedentemente).

L'ecografia mammaria per la determinazione degli spessori è stata eseguita da un 'team dedicato', con sonda lineare a frequenza 7,5/13,5MHz, seguendo uno schema di divisione della mammella in 9 quadranti (supero-esterno, supero-mediale, supero-interno, medio-esterno, medio-mediale, medio-interno, infero-esterno, infero-mediale, infero-interno (Figura 5.2).

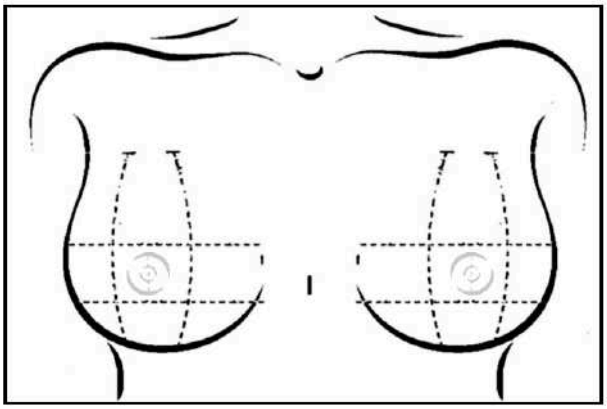


Figura 5.2: La mammella è stato divisa in 9 quadranti centrati sul complesso areola capezzolo, si noti come i quadranti non abbiano tutti uguali dimensioni e siano delimitati da un reticolo a linee orizzontali parallele e linee verticali a "meridiano"; questa particolare divisione permette di settorializzare al meglio un organo ad anatomia curvilinea cupoliforme, quale è la mammella.

L'esame ecografico preoperatorio ha preso in considerazione tutti e 9 i quadranti della mammella sottoposta a procedura; in ognuno è stato indagando lo spessore dello strato sottocutaneo (dalla fascia muscolare superficiale del muscolo Gran-Pettorale allo strato profondo del derma). Ad ogni quadrante è stato attribuito un valore dello spessore in millimetri, frutto della media tra valore minimo e massimo riscontrato all'interno del quadrante stesso. Gli esami ecografici di ogni paziente sono stati eseguiti dallo stesso operatore.

Il confronto tra gruppi si è limitato all'analisi del quadrante supero-mediale (QSM) e di quello medio-mediale o centrale (QMM – QC). Il quadrante centrale è quello che comunemente presenta un minore spessore sottocutaneo in pazienti sottoposte a mastectomia e ricostruzione protesica, in quanto si trova ad essere una delle aree maggiormente sottoposte alle forze espansive dell'impianto protesico.

A causa della natura osservazionale dello studio e dell'impossibilità da parte di alcuni pazienti di sottoporsi all'ecografia pre-operatoria o alla prima ecografia post-operatoria, vi è stata la perdita di alcuni dati riguardo al guadagno di spessore sottocutaneo post-lipostruttura in esiti di quadrantectomia (n=7 pazienti).

5.3.1 TECNICA STANDARD

La tecnica standard segue le linee guida dettate da Coleman, con alcune modifiche, che vengono di seguito specificate.

Una volta selezionata l'area donatrice, solitamente in base all'habitus del paziente, tra addome superiore e/o inferiore, fianchi, cosce o regione interna delle ginocchia, viene eseguita l'infiltrazione con una soluzione anestetica - vasocostrittrice (tumescenza) (1gr. di adrenalina + 600mg. di mepivacaina in 1L di soluzione salina).

Il grasso viene aspirato con un sistema a bassa pressione (0,4 bar), attraverso una cannula smussa del diametro di 3mm che viene connessa al barattolo di raccoglimento per i liquidi di un drenaggio (redon).

Il lipoaspirato così raccolto viene poi distribuito in siringhe da 10mL e centrifugato a 1000g per un minuto, andando a suddividersi nelle tre fasi di separazione: la porzione oleosa più apicale e quella liquida depositatasi sul fondo della siringa vengono eliminate.

Il tessuto adiposo purificato viene quindi trasferito in siringhe da 2,5mL, connesse a cannule di Coleman smusse. L'innesto viene posizionato nell'area ricevente iniettando il tessuto adiposo nella fase di retrazione della cannula, secondo direzioni e strati multipli, fino a riempire il difetto tissutale con un volume maggiore del desiderato di circa il 10-20% (*Figura 5.3*).

Figura 5.3 Tecnica standard modificata (adattato da[172]).

5.3.2 TECNICA A SEPARAZIONE ENZIMATICA

Queste tecniche consentono, attraverso l'utilizzo di macchinari a circuito chiuso, di ottenere innesti arricchiti in cellule staminali. Tale arricchimento è ottenuto grazie allo alla separazione delle cellule staminali del tessuto adiposo tramite l'utilizzo di enzimi, quali la collagenasi. La procedura rientra nel concetto di 'manipolazione minima' e di utilizzo omologo e omofunzionale delle cellule estratte.

CYTORI CELUTION SYSTEM®[287]

ll dispositivo Celution® 800/CRS, sviluppato da Cytori Therapeutics Inc., è una tecnologia medica con marchio *"CE"* che permette, attraverso un processo automatizzato e standardizzato, l'estrazione, il lavaggio e la concentrazione delle cellule staminali mesenchimali (ASCs) contenute nella frazione vascolo-stromale (FVS) del lipoaspirato. Tale procedura si svolge interamente in sala operatoria, durante una singola seduta di innesto adiposo.

Il sistema è composto da un'unità indipendente e dal set sterile monouso Celution® 805/CRS. L'estrazione delle cellule staminali viene effettuata per via enzimatica attraverso il reagente Celase™ 835/CRS, una miscela di enzimi (collagenasi e proteasi neutra) altamente purificati, formulati per una dissociazione efficiente, delicata e riproducibile di cellule nucleate dalla rispettiva matrice tissutale circostante.

La procedura di arricchimento con Citory-Celution prevede che metà del lipoaspirato sia utilizzata per l'estrazione enzimatica della frazione vascolo-stromale contenente le ASCs e che l'altra metà sia lavata e filtrata per gravità attraverso il filtro specifico PureGraft™ 250 System. Alla fine del processo il tessuto adiposo purificato per lavaggio e filtrazione viene arricchito con le ASCs ed innestato nella regione corporea desiderata. Il sistema Celution® 800/CRS è in grado di processare da un minimo di 120mL. ad un massimo di 360mL. di lipoaspirato con una durata del processo proporzionale al volume introdotto *(Figura 5.4).* Il prodotto finale del processo è costituito da una soluzione liquida di 5mL ad alto contenuto di cellule staminali *(Figura 5.5*); questa quantità è indipendente dal volume di tessuto adiposo processato. Pertanto, la concentrazione delle ASCs nei 5mL è maggiore all'aumentare del volume di lipoaspirato utilizzato. Il tempo speso nella procedura aumenta anch'esso in base al lipoaspirato, nella nostra esperienza ogni trattamento dura in media circa 2 ore. Secondo i dati forniti dall'azienda fabbricante (Cytori), si possono ottenere 25-40 milioni di cellule ogni 100mL di tessuto adiposo, con una variabilità legata al paziente e- alla regione donatrice. La figura 5.6 mostra un riassunto esplicativo della procedura *(Figura 5.6).*

Figura 5.4: Tempo di processamento stimato. Tempo necessario per processare il lipoaspirato prelevato e preparare l'innesto arricchito con cellule da reintrodurre nel paziente. Si noti che i tempi indicati sono valori stimati basati sui tempi medi dei cicli e calcolati dal momento in cui il lipoaspirato viene aggiunto al contenitore Celution® 800/CRS. Possono quindi variare in base all'esperienza dell'operatore e alla quantità di globuli rossi presenti nel lipoaspirato.

CELL TYPE	FREQUENCY
Endothelial cell	7%
Smooth muscle cell	9%
Blood cell	22%
Tissue Macrophage	23%
CD34+/CD31-/CD45-	38%
Stem Cells (CFU-F)	1-5%

Figura 5.5: Componenti cellulari della frazione vascolo-stromale dopo estrazione con presidio CytoriCelution.

Il sitema di arricchimento con Cytori Celution® è composto da un'unità indipendente e da un numero variabile di set aggiuntivi. I Componenti fondamentali sono:

- Dispositivo Celution® 800/CRS. (a)

(a)

- Set monouso Celution® 805/CRS (b), comprendente:

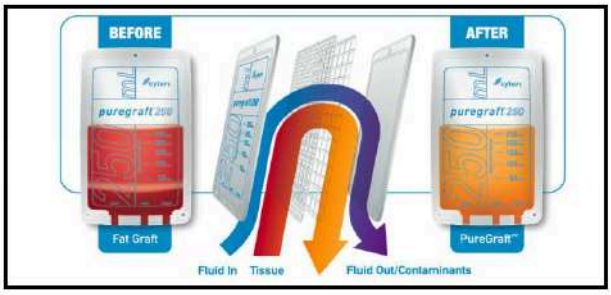
- Contenitore di trattamento
- Cannule
- Sacca dei rifiuti
- Contenitore di raccolta del tessuto

(b)

- Celase™ 835/CRS (preparato enzimatico liofilizzato, da ricostituire con soluzione fisiologica) (c).

(c)

- Sistema di filtraggio PureGraft™ 250 System (d).



(d)

- Dispositivo di innesto Celbrush™(e).

(e)

Figura 5.6: Riassunto della procedura per l'ottenimento della frazione vascolo-stromale e l'arricchimento del tessuto adiposo (Cell-Assisted-Lipotransfer) con presidio CytoriCelution.

SISTEMA LIPOKIT - MEDIKAN INTERNATIONAL©[288]

Il sistema Lipokit™, è una tecnologia medica con marchio CE approvato dalla Food and Drug Administration (FDA). Consiste di un sistema di purificazione del lipoaspirato completamente chiuso che permette di aspirare, purificare ed eventualmente inoculare il tessuto adiposo, previo suo arricchimento con cellule staminali da esso ottenute. E' definita come un macchinario *all-in-one*, perché è costituito da un sistema generante il vuoto dotato di una pompa in grado di generare pressioni sia negative che positive collegate alla particolare siringa (TP-101 FPU), usata con funzioni di infiltrazione, suzione o iniezione. Il macchinario è basato sul principio che un adeguato grado di centrifugazione permette la rimozione del sopranatante e delle impurità del sangue, aumentando quindi la sopravvivenza del grasso trapiantato. La siringa FPU è disegnata con un pistone dotato di filtro a maglia per avere un effetto "squeeze" sul lipoaspirato durante la centrifugazione a 1200g per 3 minuti.

Il processo di spremitura dovrebbe consentire la condensazione delle cellule adipose più giovani e salutari all'interno della frazione vasculo-stromale contenente anche i fattori di crescita, sacrificando le cellule più anziane e fragili.

Metà del lipoaspirato viene processato immediatamente con centrifugazione e l'altra metà è trattato con il Celltibator™.

Il dispositivo Celltibator™ è stato progettato da Medikan International Inc.© per isolare enzimaticamente la frazione vascolo-stromale (contenente ASCs) derivante dal tessuto adiposo aspirato tramite liposuzione. Il tessuto adiposo e l'enzima (Roche Laboratories collagenase solution -Liberase-0,075%) in dotazione vengono miscelati all'interno della siringa TP-102 FPU, appositamente progettata, al fine di isolare le cellule mesenchimali con un processo di incubazione a 37,8°C per 40 minuti.

La siringa viene posizionata nell'incubatore all'interno di un cestello rotante a 360°. Per l'isolamento della frazione vascolo-stromale si utilizza tessuto adiposo condensato prelevato con lo strumento correlato Lipokit™ (Medikan International, Inc. ©) e mediante l'apposita siringa brevettata TP-101 FPU da 50 mL. (*Figure 5.7 e 5.8*).

Figura5.7, Figura5.8 Il macchinario Lipokit e la sua siringa Il materiale aspirato viene processato direttamente all'interno della siringa Fat Processing Unit (FPU). Il grasso presente nella siringa FPU, pari a una quantità di 50mL, sta all'interno di questa durante tutto il processo di infiltrazione, suzione, isolamento, centrifugazione, raccolta e iniezione.

Dopo che il Celltibator ha terminato l'incubazione, il lipoaspirato deve passare tre fasi di centrifugazione e lavaggio prima di poter utilizzare le ASCs.

Alla fine del processo le due componenti così ottenute sono miscelate per ottenere il graft arricchito in cellule staminali. La figura 5.9 descrive la procedura di arricchimento del tessuto adiposo mediante presidio Lipokit-Medikane™

Il sistema di arricchimento con Lipokit-Medikane™ è composto da una serie di componenti:

- Dispositivo Celltibator™ MSM100 (f)

(f)

- Collagenasi

- Dispositivo Lipokit™(g)

(g)

• Siringa TP-101 FPU(h)

(h)

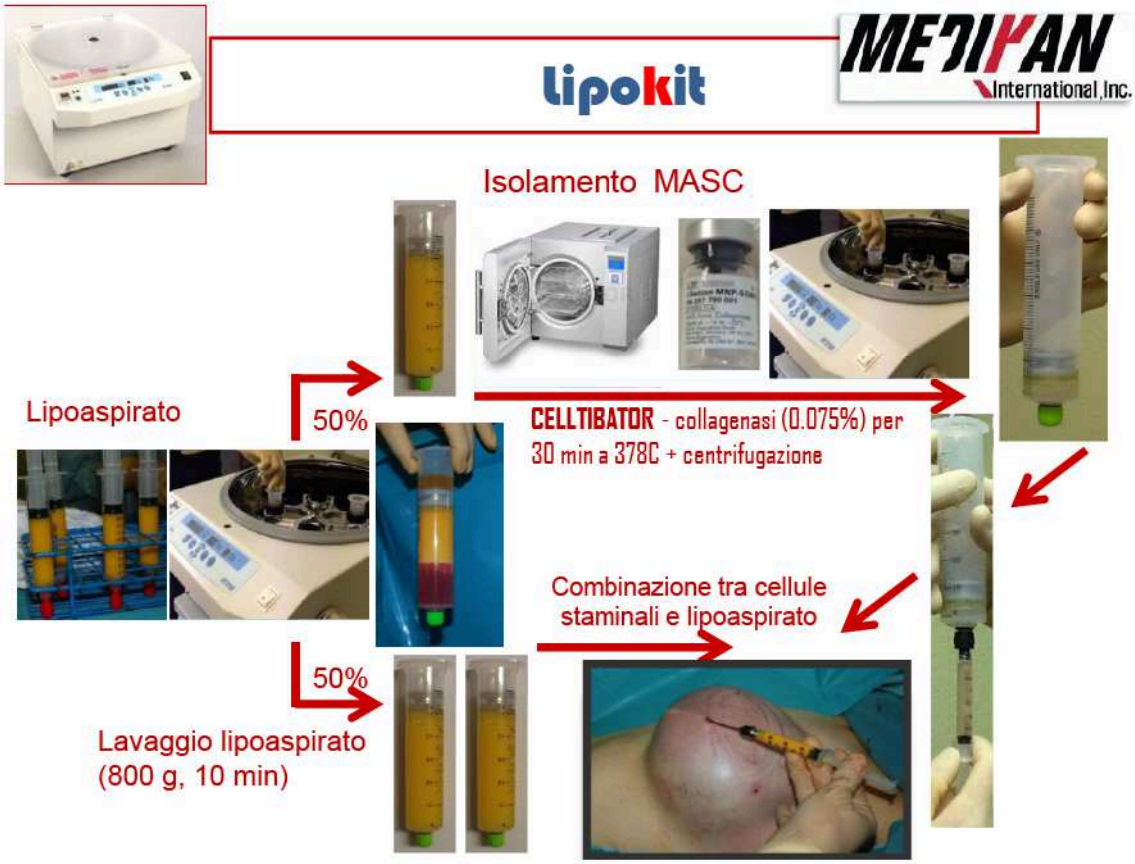


Figura 5.9: Riassunto della procedura per l'ottenimento della frazione vascolo-stromale e l'arricchimento del tessuto adiposo (Cell-Assisted-Lipotransfer) con presidio Lipokit-Medikane.

5.3.3 TECNICA A SEPARAZIONE MECCANICA

Questa tecnica consente l'ottenimento di innesti adiposi arricchiti dalle cellule della frazione vascolo-stromale, ottenuta tramite sistemi di filtraggio multipli.

FASTEM/CORIOS

Il sistema FaStem (Fat Fast Stem Cells) è un concentratore di cellule staminali mesenchimali e rigenerative (SVF) del tessuto adiposo. Questo *device* non è un macchinario di per sé, quanto piuttosto un sistema di filtrazione in serie in grado di ottenere un lipoconcentrato rapidamente e velocemente.

Il *device*, sterile e latex-free, è composto da quattro involucri separati, ognuno dedicato a una fase distinta della procedura: lipoaspirazione, pre-trattamento del lipoaspirato, separazione e arricchimento del lipoaspirato.

La componente principale del 'kit' è un sacchetto del volume di 250mL con filtri da 120 micron e inserti cilindrici in teflon, associato a un sacchetto con un connettore a tre vie e prolungamenti pre-assemblati.

Vengono fornite la cannula per la liposuzione e le siringhe da 10 e 20mL. La liposuzione viene quindi svolta con una pressione negativa bassa controllata manualmente. Dopo la liposuzione, metà del lipoaspirato è trattato con la tecnica standard utilizzata per lo studio e descritta precedentemente, mentre l'altra metà viene destinata alla procedura di concentrazione.

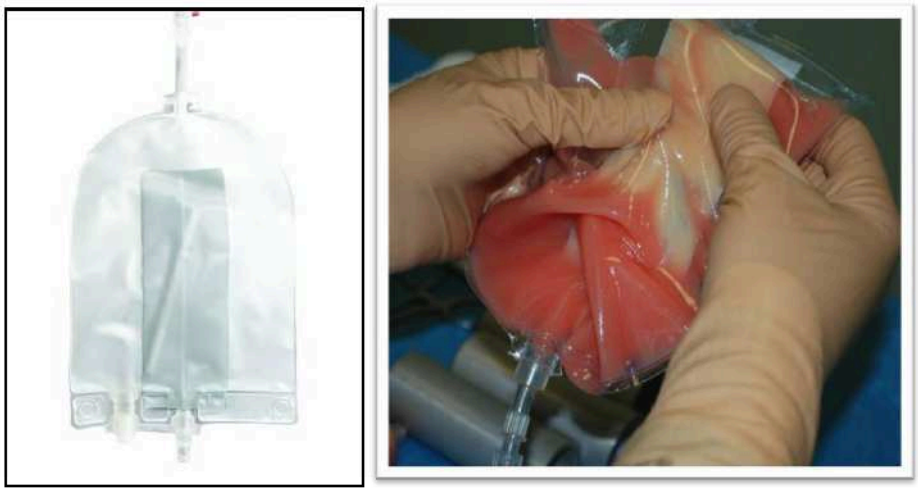


Figura 5.10: Componenti del sistema di arricchimento meccanico Fastem-Corios.

La siringa con il lipoaspirato è connessa direttamente al primo sacchetto di filtrazione (pre-trattamento). Il sacco deve essere spremuto e compresso fino a quando il lipoaspirato raggiunge il fondo del sacchetto attraverso il filtro (Figura 5.10). Da 6 a 20 siringhe da 20mL sono poi riempite con questo tessuto filtrato e centrifugate a 400rpm per 10 minuti. A questo punto il lipoaspirato è pronto per essere separato dal connettore a tre vie.

La porzione inferiore del lipoaspirato è separata dall'olio del sopranatante e raccolta nella siringa da 10mL (procedura ripetuta per tutte le siringhe da 20mL). Alla fine, la siringa da 10mL, ricca di FVS, con le cellule staminali e rigenerative concentrate, è aggiunta al lipoaspirato trattato normalmente, per ottenere un graft arricchito (Figura 5.11).

Non sono stati pubblicati ad oggi studi clinici in Letteratura che valutino questa procedura.

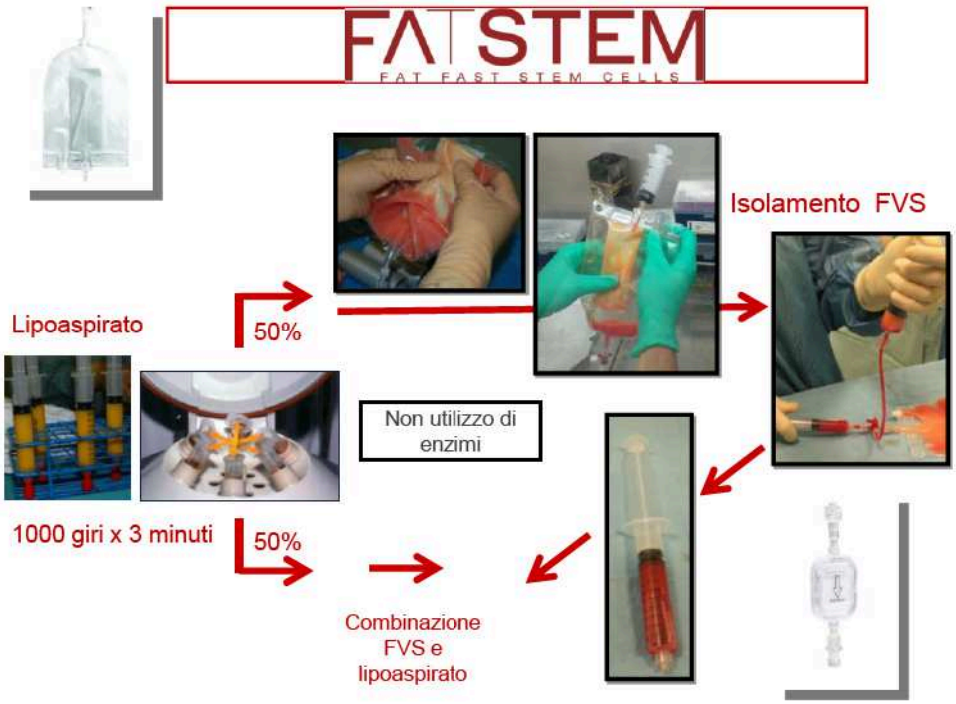


Figura 5.11: Riassunto della procedura per l'ottenimento della frazione vascolo-stromale e l'arricchimento del tessuto adiposo (Cell-Assisted-Lipotransfer) con presidio Fastem-Corios.

5.3.4 ISOLAMENTO E COLTURA DELLE CELLULE STAMINALI

In figura 5.12 è riassunto il disegno dello studio.

Le ASCs sono state isolate da aliquote del lipoaspirato utilizzato per la ricostruzione mammaria. Nei casi delle pazienti sottoposte a lipostruttura tramite campioni arricchiti in cellule staminali, l'isolamento è stato effettuato da aliquote prelevate sia dalla porzione non arricchita sia dalla porzione arricchita con ASCs.

Le cellule ottenute dal lipoaspirato sono state isolate e coltivate applicando, con minime modifiche, un protocollo ottimizzato nei laboratori del Prof. Beltrami per la coltura delle cellule staminali multipotenti dell'adulto.

Brevemente, i lipoaspirati sono stati dissociati in una soluzione di 0,025% collagenasi di tipoII (Worthington, Lakewood, NJ) e le cellule minori di 40μm di diametro sono state coltivate in un mezzo selettivo per la proliferazione di cellule staminali multipotenti. Nello specifico, le cellule isolate (1,5x10^6) sono state seminate su piastre di 100mm (Corning, BV life sciences, Corning, NY) ricoperte di fibronectina umana (Sigma-Aldrich) in un mezzo così composto: 60% DMEM a basso contenuto di glucosio (Invitrogen, Carlsbad, CA), 40% MCDB-201, 1 mg/mL acido linoleico–BSA, 10^-9 M desametasone, 10^-4 M acido ascorbico-2 fosfato, 1 X insulina-transferrina-sodio selenite

(tutti da Sigma-Aldrich), 2% siero bovino fetale (Invitrogen o StemCell Technologies), 10 ng/mL hPDGF-BB, 10 ng/mL hEGF (entrambi da Peprotech EC, Londra, Regno Unito).

Il mezzo è stato sostituito ogni 3-4 giorni. Quando le cellule hanno raggiunto il 70-80% della confluenza sono state distaccate con TrypLE Express (Invitrogen) e ri-seminate alla densità di 1-2x10^3/cm2. Per determinare la resa post-isolamento, sono state contate le cellule ottenute dopo dissociazione meccano enzimatica e filtrazione ed il recupero è stato espresso come 10^6 cellule/mL di lipoaspirato.

Oltre alla resa, delle cellule isolate si è andati a studiare l'immunofenotipo di superficie (*Figura 5.12*).

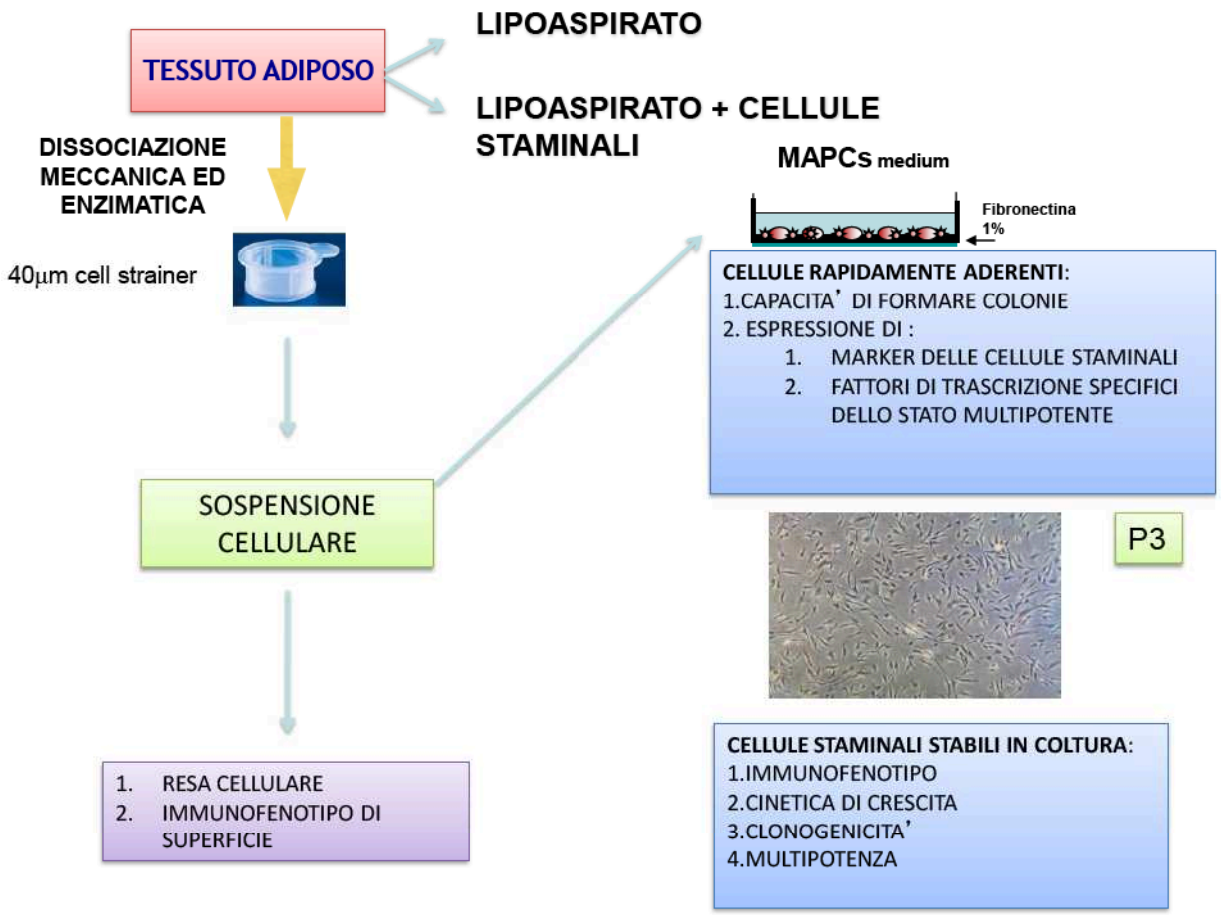


Figura 5.12 Disegno dello studio: Dal lipoaspirato e dal lipoaspirato arricchito si ottiene una sospensione cellulare (cellule più piccole di 40um in diametro). Delle cellule isolate si è analizzata la resa cellulare e l'immunofenotipo di superficie. Le cellule sono state quindi fatte crescere su piastra e delle cellule adese rapidamente (2 giorni) si è studiata la capacità di formare colonie, l'espressione di marcatori di staminalità e di fattori di trascrizione dello stato multi potente. Infine, delle cellule al terzo passaggio di espansione in vitro (P3)si è andati a stabilire l'immunofenotipo, la cinetica di crescita, la clonogenicità e la multipotenza.

5.3.5 SAGGI CELLULARI

Sono state valutate l'efficienza nel formare colonie, la cinetica di crescita, la colonogenicità e la capacità di differenziazione multilinea (multipotenza).

Efficienza nel formare colonie in coltura primaria

Le *Colony Forming Units* (CFU/unità formanti colonie) sono state determinate seminando cellule fresche isolate alla concentrazione di 1500 cellule/cm2 in piastre da 96 pozzetti per poi successivamente contare il numero di colonie neoformate tramite microscopia a contrasto di fase dopo 7 giorni di incubazione a 37°C/5% CO2. La valutazione è stata eseguita in triplicato da due osservatori indipendenti.

Cinetica di crescita

La *cell population doubling time* (PDT, ovvero il tempo di raddoppiamento della popolazione cellulare) è stata calcolata tramite la semina di ASCs al terzo passaggio alla densità di 2x10^3 cellule/cm2 nel medium di espansione. Le cellule sono quindi state contate nei giorni 1, 2, 3, 5 e 7 e il tempo di raddoppiamento è stato calcolato durante la fase di crescita logaritmica della popolazione cellulare.

Clonogenicità

Per generare i cloni derivati da una cellula singola, è stato utilizzato un separatore cellulare (FACSAria, BD Bioscience) (*Figura 4.6*) per depositare automaticamente ASC singole su pozzi ricoperti di fibronectina in piastre di Terasaki a 96 pozzetti(n=300 pozzetti/linea cellulare); queste cellule sono state poi coltivate in mezzo di espansione con un'aggiunta di 10% di FBS.

Figura 5.13 Il *cell sorter*FACSAria: i sistemi FACS associano la capacità analitica di identificazione cellulare fornita dalla citometria a flusso con la possibilità di isolare e raccogliere in modo selettivo le cellule purificate.

I pozzetti sono stati esaminati una volta a settimana. Quando i cloni hanno raggiunto la confluenza, le cellule sono state staccate dalla piastra usando TrypLE (Invitrogen) e ri-seminate su nuove piastre ricoperte di fibronectina alla densità di 1,5x10^3cellule/cm2 e coltivate nel mezzo di espansione sopradescritto.

Differenziazione multi linea

Le ASC al terzo passaggio in coltura sono state coltivate in mezzi specifici per il differenziamento lungo linee mature di tutti e tre i foglietti germinali.

Il *differenziamento epatocitario* è stata indotto facendo crescere le cellule per due settimane ad alta densità (2x10^4/cm2) su vetrini coprioggetto ricoperti di fibronectina in un mezzo contenente 0.5% FBS, 10 ng/mL FGF-4 e 20 ng/mL HGF (entrambe da Peprotech).

Il differenziamento muscolare ed endoteliale è stato ottenuto seminando da 0,5 a 1x10^4/cm2 cellule in un mezzo di espansione contenente siero fetale bovino al 5% (Sigma-Aldrich), 10 ng/mL bFGF, 10 ng/mL VEGF, e 10 ng/mL IGF-1 (tutti da Peprotech EC).

Il differenziamento adipocitario è stata indotto usando un mezzo colturale supplementare con 0,5 mM di isobutilmetilxantina, 50 μM di indometacina e 0.5 μM di desametasone. Le cellule sono state lasciate confluire e coltivate fino a 2 settimane con cambio del medium ogni 4 giorni.

Per il *differenziamento neurale*, 3x10^3 cellule/cm2 sono state seminate in DMEM ad alto glucosio (Invitrogen, Carlsbad) con 10% FBS (Sigma-Aldrich). Dopo 24 ore il medium è stato rimpiazzato con DMDM ad alto glucosio, 10% FBS,B27 (Invitrogen), 10ng/mL EGF e 10ng/mL dFGF (entrambi da Peprotech EC). Dopo 5 giorni, le cellule sono state lavate e incubate per 5-10 giorni con DMEM contenente 5mg/mL di insulina, 200mM di indometacina e 0.5mM IBMX (tutti da Sigma-Aldrich), in assenza di FBS.

Alla fine di ogni trattamento, le cellule sono state fissate con paraformaldeide tamponata al 4% e studiate per l'espressione dei marcatori specifici di linea.

Il differenziamento è stato valutato tramite immunofluorescenza verificando la frazione di cellule positive per il marcatore adipogenico PPARγ (Santa Cruz, 1:100), il marcatore endoteliale CD31 (Dako, 1:50) e i marcatori miocitari actina muscolo liscio (SMA) (Dako, 1:50) e actina sarcomerica alpha (ASA) (Sigma, 1:100). L'accumulo di gocciole lipidiche indicanti il differenziamento adipogenico è stato rilevato colorando le cellule in una soluzione allo 0,5% di Oil Red-O (Sigma-Aldrich).

5.3.6 CITOMETRIA A FLUSSO

Le cellule fresche isolate o le ASC al terzo passaggio in coltura sono state staccate dalle piastre mediante Tryple-Express e sono state incubate con i seguenti anticorpi opportunamente marcati: CD10, CD13, CD29, CD49a, CD49b, CD49d, CD90, CD73, CD44, CD59, CD45, HLA-DR, CD117, CD34, (BD Biosciences), CD105, CD66e (Serotec), CD271, CD133 (Miltenyi Biotec), KDR, ABCG-2 (R&D System). Come controllo negativo sono stati utilizzati anticorpi isotipici opportunamente marcati. L'analisi è stata effettuata tramite FACS-Calibur o FACS-Canto (BD Bioscience). Per ciascun marcatore è stata definita la frazione di cellule positive.

5.3.7 IMMUNOFLUORESCENZA

La colorazione e l'acquisizione delle immagini è stata condotta come in 2,3,6. Brevemente, le cellule fissate in paraformaldeide sono state permeabilizzate mediante incubazione con 0.01% Triton X-100 per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo saturazione dei siti di legame aspecifici mediante incubazione per 30 minuti a temperatura ambiente con 10% di siero *donkey*, le cellule sono state cimentate con i seguenti anticorpi primari:Oct-4 (Abcam, 1:150); Sox-2 (Chemicon, 1:150); Nanog (Abcam, 1:150); Nestina (Millipore, 1:100) e vimentina (Dako, 1:100).Il rilevamento degli anticorpi primari è stato effettuato utilizzando anticorpi secondari sviluppati in *donkey* e coniugati con Alexa 555 o Alexa 488 (Invitrogen).

5.3.8 ANALISI STATISTICA

Per lo studio delle ASCs, le caratteristiche della popolazione sono state descritte usando la media ± deviazione standard, la mediana, l'intervallo per le variabili continue e le percentuali per le variabili categoriali. La normalità dei dati acquisiti è stata testata tramite il Kolmogorov-Smirnov test.

Per comparare le variabili continue tra due gruppi sono stati usati Paired T-test o Mann-Whitney test; per le comparazioni tra più di due gruppi si sono usati i test One-way Anova seguito da Bonferroni post-test o Kruskal Wallis seguito da Dunn's test, in base a quanto ritenuto più appropriato.

Valori di *p*minori di 0,05 sono stati considerati significativi (Prism, versione 4,0c).

5.4 RISULTATI

Come riportato in tabella 5.2 (*Tabella 5.2*), la procedura chirurgica demolitiva alla quale le pazienti erano state in precedenza sottoposte è stata la mastectomia con ricostruzione protesica nella maggior parte dei casi, quadrantectomia con rimodellamento in 3 casi e trattamento di malformazioni congenite in 2 casi (sindrome di Poland).

Le pazienti trattate con il metodo 'standard' non mostrano differenze statisticamente significative rispetto al gruppo trattato con la metodica arricchita in termini di età, BMI (body mass index), co-morbidità, sedi scelte come donatrici e terapie associate (Tabella 5.1)

Procedura Demolitiva	Procedura standard	Procedura Arricchita	Cytori	Lipokit	FaStem
Mastectomia	14 (87,5%)	14 (82,35%)	7 (87,5%)	4 (100%)	3 (60%)
Quadrantectomia	1 (6,25%)	2 (11,76%)	1 (12,5%)	0 (0,00%)	1 (20%)
Nessuna (malformazione congenita)	1 (6,25%)	1 (5,89%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	1 (20%)
totale	16 (100%)	17 (100%)	8 (100%)	4 (100%)	5 (100%)

Tabella 5.2 Precedenti procedure chirurgiche svolte sulle pazienti.

La tabella 5.3 (Tabella 5.3), mette in evidenza le aree donatrici prescelte.

Area Donatrice	Procedura standard	Procedura Arricchita	pop Cytori	pop Lipokit	pop FaStem
ADDOME	5 (31,25%)	1 (5,89%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	1 (20%)
FIANCHI	7 (43,75%)	7 (41,18%)	2 (25%)	3 (75%)	1 (20%)
TROCANTERI	2 (12,5%)	2 (11,76)	1 (12,5%)	0 (0,00%)	1 (20%)
ADDOME E FIANCHI	2 (12,5%)	3 (17,65%)	1 (12,5%)	1 (25%)	1 (20%)
FIANCHI E TROCANTERI	0 (0,00%)	2 (11,76)	2 (25%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
ADDOME, FIANCHI E TROCANTERI	0 (0,00%)	2 (11,76)	1 (12,5%)	0 (0,00%)	1 (20%)
TOT	16 (100%)	17 (100%)	8 (100%)	4 (100%)	5 (100%)

Tabella 5.3 Area donatrice prescelta.

5.4.1 RESA CELLULARE E CAPACITA' DI FORMARE COLONIE

Per stabilire se le procedure di arricchimento potessero interferire con la capacità di isolare cellule primitive dai lipoaspirati, abbiamo applicato il metodo precedentemente ottimizzato per l'isolamento delle cellule staminali multi potenti dell'adulto dai tessuti normali[2-5] e neoplastici[6], a 56 lipoaspirati ottenuti dalle 33 pazienti arruolate. Delle pazienti trattate con la procedura di arricchimento, abbiamo isolato le cellule staminali sia dai campioni di lipoaspirato non-arricchito che da quelli arricchiti in cellule staminali, in modo da avere la possibilità di eseguire un confronto diretto degli effetti della procedura di arricchimento.

Per resa cellulare intendiamo il numero di cellule presenti per mL di lipoaspirato, e quindi la capacità di concentrazione cellulare delle metodiche di arricchimento.

Dopo la dissociazione enzimatica seguita da filtrazione, il numero di cellule <40µm in diametro erano simili nei lipoaspirati ottenuti con la metodica tradizionale e in quelli prima selezionati dalle procedure di arricchimento. La resa è stata invece 1,7 volte maggiore nei lipoaspirati arricchiti dai sistemi ad arricchimento enzimatico (Cytori e Lipokit), mentre il sistema ad arricchimento meccanico Fastem) non ha prodotto un incremento della resa significativo *(Grafico 5.1).*

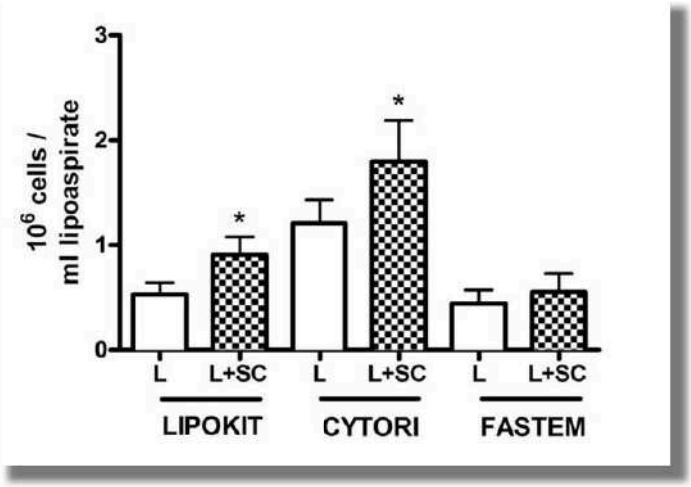


Grafico 5.1 Resa cellulare.

La capacità di formare colonie nel mezzo selettivo per la crescita di cellule staminali multipotenti è una determinazione indiretta del numero di cellule staminali all'interno della sospensione cellulare ottenuta dopo le procedure di isolamento delle ASC.

La capacità di formare colonie è risultata essere simile per i campioni non arricchiti di tutte le procedure utilizzate (pNA e pA). Viceversa, i lipoaspirati arricchiti mediante le metodiche di arricchimento enzimatico Lipokit e Cytori si caratterizzavano per un aumento statisticamente significativo del numero di cellule formanti colonie *(Grafico 5.2).*

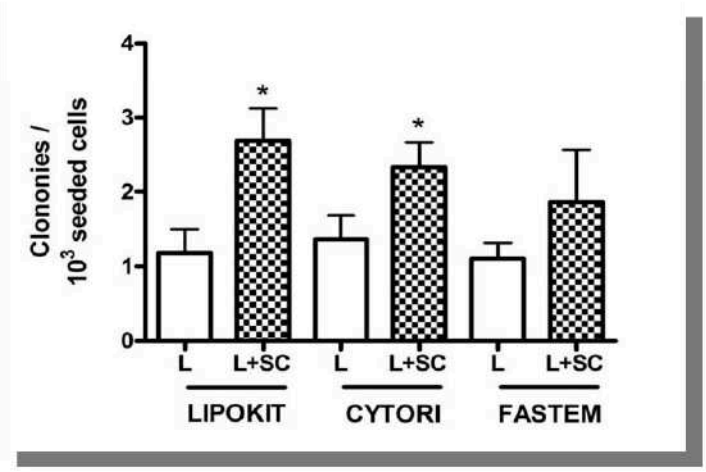


Grafico 5.2 Capacità di formare colonie o conta vitale.

Nonostante le condizioni stringenti di coltura, 5-7 giorni dopo la cultura primaria, linee di cellule proliferanti si sono ottenute in tutti i campioni, a dimostrazione dell'alta efficienza del metodo ottimizzato.

Già dopo una settimana dalla semina, le cellule proliferanti erano altamente positive per l'espressione dei fattori di trascrizione caratteristici dello stato pluripotente Oct-4, Nanog, Sox-2 (Figura 5.14), escludendo quindi che la crescita di cellule staminali fosse la conseguenza di una coltura estensiva. L'espressione di c-Kit (stem cell antigen receptor) era presente nel 10% della popolazione, senza significativa differenza tra i campioni indagati. In analogia alle cellule precedentemente isolate con lo stesso protocollo da altri tessuti umani, abbiamo deciso di denominare le linee cellulari ottenute dal tessuto adiposo come 'human adipose tissue-derived multipotent adult stem cells' (hAT-MASC).

Considerati nel loro insieme, questi risultati indicano come i campioni ottenuti dai sistemi di arricchimento enzimatico (Lypokit-Medikane e Cytori-Celution) sono caratterizzati, rispetto alle controparti non arricchite, da un incremento del numero di cellule cellule per mL di lipoaspirato e del numero di CFU. Invece il sistema meccanico (FaStem- Corios) sembra non influenzare questi parametri.

Per stabilire se le procedure di arricchimento modificano la composizione delle cellule isolate, abbiamo eseguito un'analisi mediante FACS per determinare la frazione di cellule ematopoietiche CD45+ e, tra le cellule CD45 negative, abbiamo valutato l'espressione di marcatori di cellule staminali mesenchimali (CD90, CD73) ed endoteliali (CD34). Le procedure di arricchimento Cytori-Celution e Fastem-Corios, mostrano un incremento significativo della frazione di cellule ematopoietiche. Mentre non abbiamo ottenuto dati conclusivi dall'analisi delle altre popolazioni.

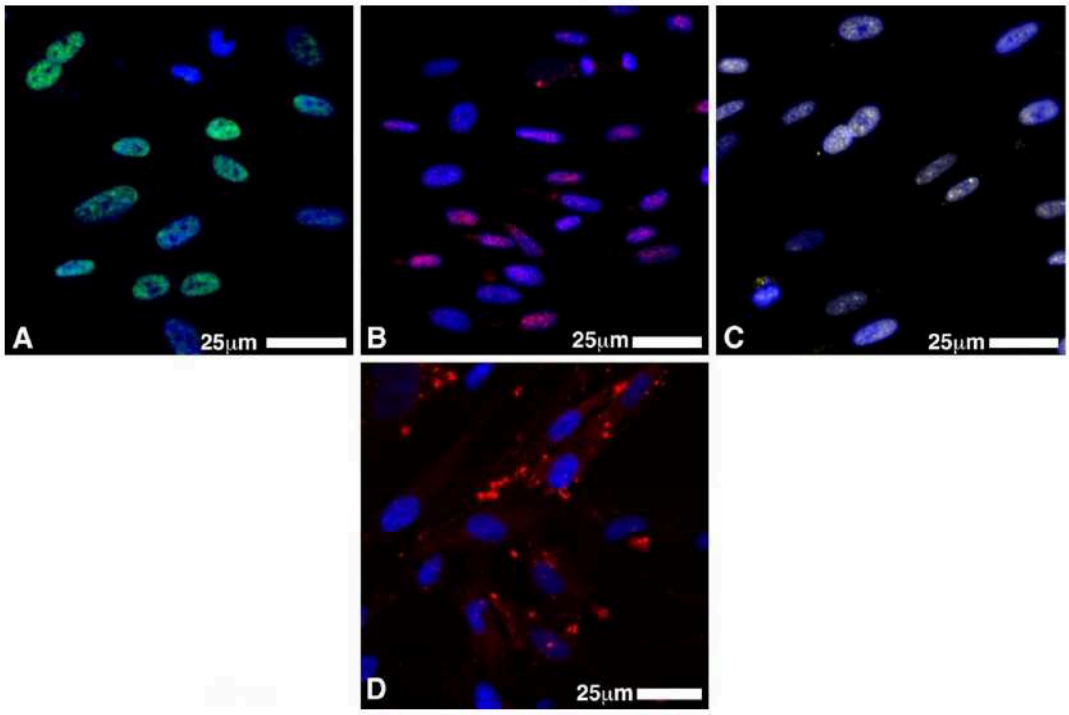


Figura 5.14: Espressione dei marker dello stato pluripotente e del marcatore fondamentale delle cellule staminali. A: OCT-4, B: NANOG, C: SOX2, D: c-Kit.

5.4.2 VALUTAZIONE DELL'ARRICCHIMENTO IN CELLULE STAMINALI DOPO COLTURA ESTENSIVA.

Per stabilire se l'arricchimento in cellule primitive persistesse ad una coltura estensiva con i passaggi in coltura, abbiamo analizzato le linee cellulari ottenute adottando le 3 differenti tecniche e le abbiamo confrontate con quelle isolate dai rispettivi campioni non arricchiti.

Come mostrato in *Figura 4.8* le cellule proliferanti al terzo passaggio in coltura (corrispondenti a circa 24 raddoppiamenti) hanno continuato ad esprimere Oct-4 e Nanog (Figure 2 A-F), fattori di

trascrizione considerati cruciali, insieme a Klf-4 e c-Myc, per il mantenimento di uno stato primitivo. (*Figura 5.15)*.

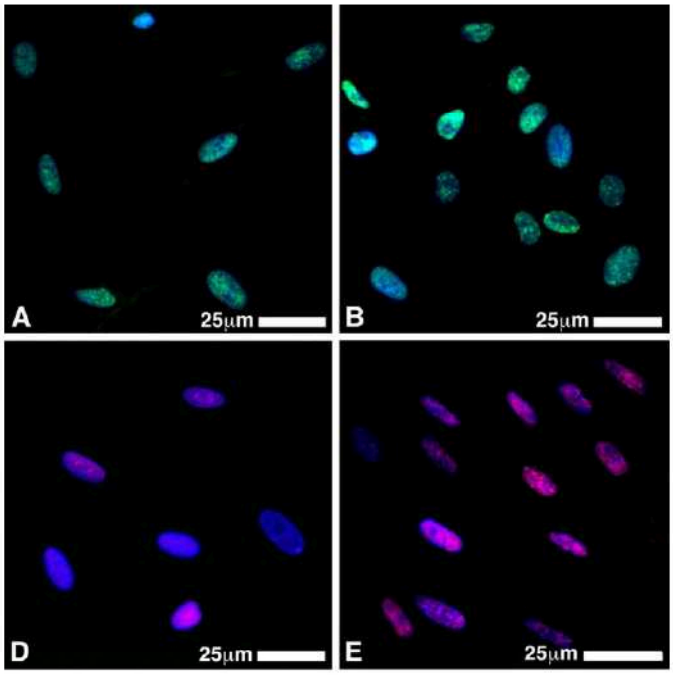


Figura 5.15 Fattori di trascrizione a P3; A-B: OCT-4; D-E: NANOG.

Tuttavia, solo i campioni arricchiti tramite Cytori-Celution erano caratterizzati, rispetto alle controparti non arricchite, da un incremento significativo nell'espressione sia di Oct-4 sia di Nanog (Grafico 5.3 e Grafico 5.4).

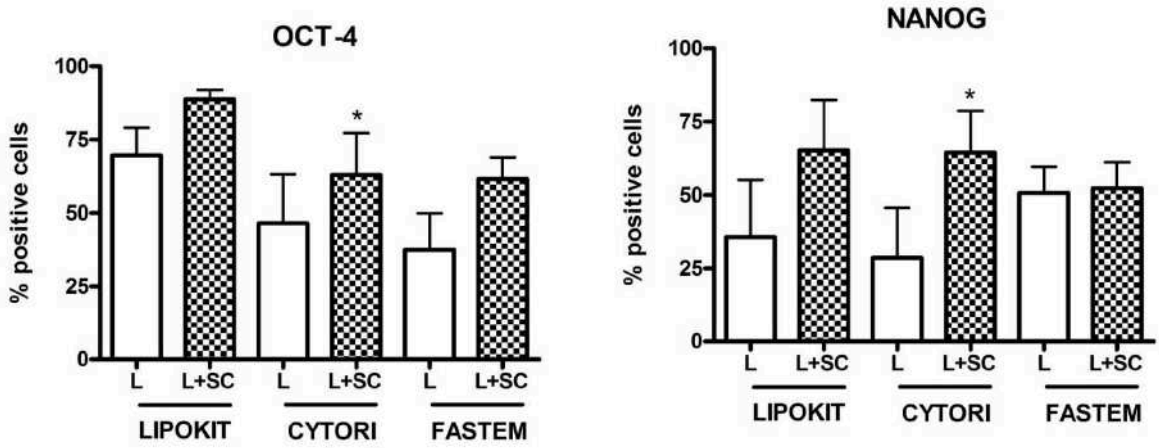


Grafico 5.3, Grafico 4.4. Fattori di trascrizione a P3, valutazione percentuale delle cellule positive, statisticamente significative per Citory-Celution.

Considerando c-kit (CD117), le linee ottenute dai campioni arricchiti mediante Lipokit e Cytori erano caratterizzate da un aumento di questo marcatore, ma l'incremento raggiungeva solo per Cytori una significatività statistica (*Grafico 5.5*).

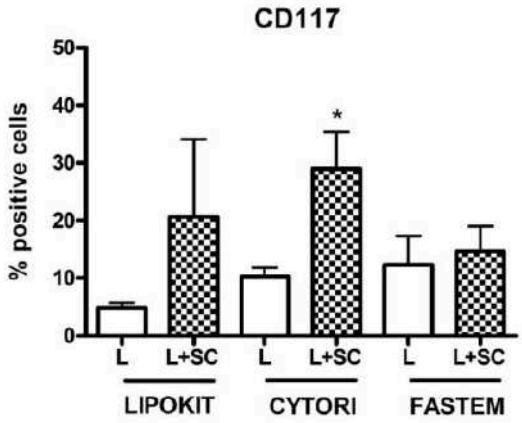


Grafico 5.5 Frazione di cellule esprimenti c-Kit.

Riguardo all'immunofenotipo di superficie, come valutato dalla citometria a flusso, tutte le linee cellulari, indipendentemente dalle procedure di arricchimento, hanno dimostrato un simile fenotipo mesenchimale caratterizzato dall'espressione di molecole di superficie quali CD90, CD105, CD44 e CD73 in assenza di marcatori ematopoietici quali CD45 (*Figura 4.9*).

Con l'eccezione di c-Kit, non si son trovate altre differenze significative confrontando le linee cellulari ottenute dai lipoaspirati non arricchiti ed arricchiti.

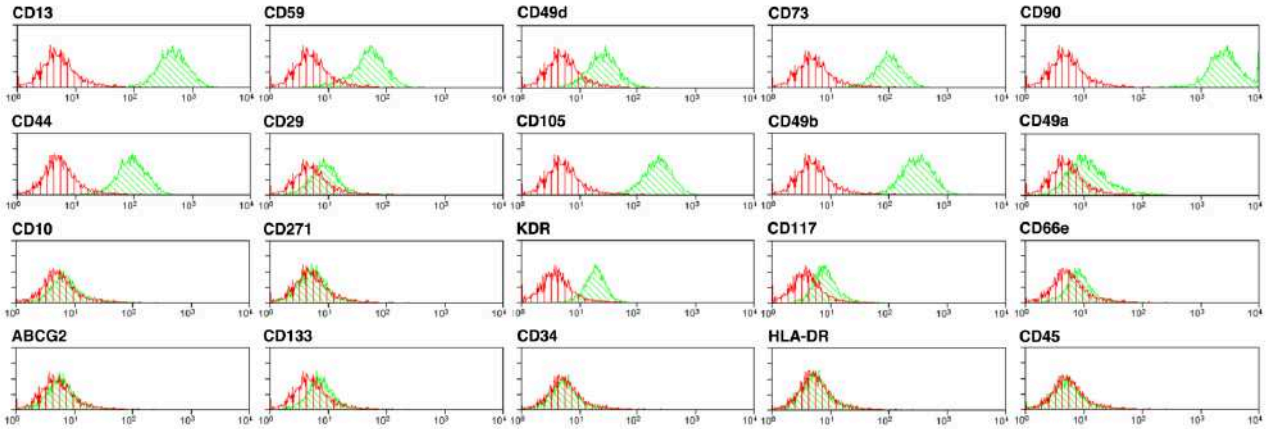


Figura 5.16 Espressione dei marker di superficie di tipo mesenchimale all'immunofluorescenza.

Analizzando la cinetica di crescita, solo le cellule ottenute dai campioni arricchiti tramite Lipokit hanno dimostrato una riduzione statisticamente significativa del tempo di raddoppiamento mentre nelle popolazioni arricchite con Cytori-Celution e Fastem-Corios si è evidenziato solo untrend all'aumento della velocità di crescita che non ha però raggiunto significatività statistica (*Grafico 5.6)*.

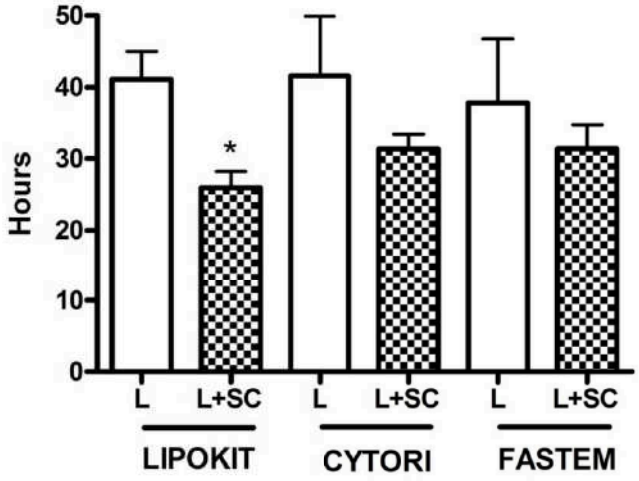


Grafico 5.6 Tempo di raddoppiamento dei campioni arricchiti.

Infine, per testare se le procedure di arricchimento influenzassero la clonogenicità, considerata una proprietà essenziale *in vitro* delle cellule staminali, è stata effettuata una clonazione a cellula singola mirata alla comparazione dei campioni non arricchiti con i rispettivi campioni arricchiti.

Anche se è stato possibile isolare da tutte le linee cloni con alta capacità proliferativa, il numero di cloni appare significativamente aumentato nelle popolazioni hAT-MASC arricchite in ASCs ottenute da Cytori e Lipokit. Più specificatamente, le hAT-MASC arricchite da Lipokit-Medikane erano 2.8±0.6 volte più clonogeniche delle popolazioni non arricchite, mentre l'arricchimento con Cytori-Celution ha determinato un incremento della clonogenicità cellulare di 2.5±2.1 volte. L'arricchimento tramite Fastem non ha aumentato questa caratteristica cellulare (*Grafico 5.7*).

Le cellule clonali mantenevano un fenotipo indifferenziato stabile, caratterizzato dall'espressione di fattori dello stato pluripotente, vimentina, nestina e c-Kit (Figure 3 C-H).

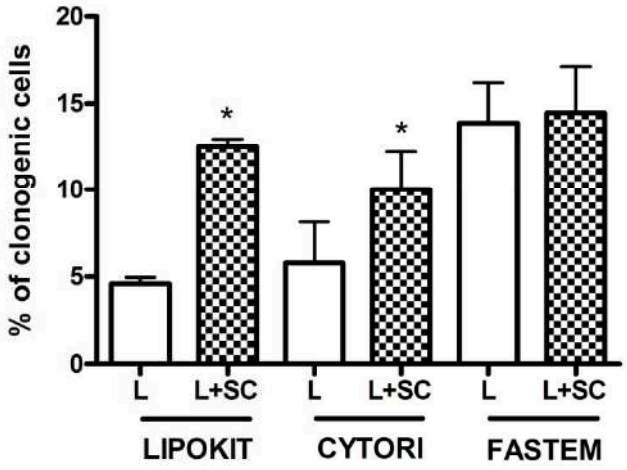


Grafico 5.7 Clonogenicità a P3.

5.4.3 VALUTAZIONE DELLA DIFFERENZAZIONE DELLE ASC

E' stato ipotizzato da numerosi studi che l'arricchimento di tessuto adiposo con cellule staminali possa stimolare la formazione di neovasi e mantenere lo spessore dell'innesto.

Per stabilire se le procedure analizzate potessero arricchire i campioni utilizzati per l'innesto in cellule staminali multipotenti abili a formare neovasi e cellule adipose mature, abbiamo esposto le hAT-MASC a stimolazione adipogenica *(Figura 5.17 A-B-C-D)*, miogenica *(Figura 5.18)* e endoteliale (Figura 5.19 A-B).

Le cellule esposte al mezzo di differenziazione adipocitaria hanno dimostrato un'accumulazione di vacuoli lipidici positivi all'Oil Red-O (*Figura 5.17 A-B*) e un incremento della frazione di nuclei esprimenti PPARγ (*Figura 5.17 D-E*).

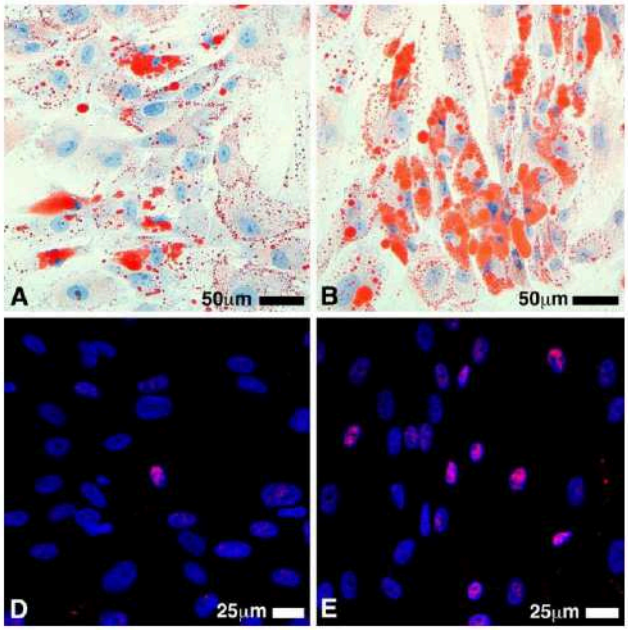


Figura 5.17. Valutazione della capacità di differenziamento adipogenico; A-B: Oil Red-O, D-E: PPARg di cellule ottenute da lipoaspirati non arricchiti (A, D) e i rispettivi lipoaspirati arricchiti mediante Lipokit(B, E).

Anche in questo caso, le cellule ottenute dai sistemi Lipokit e Cytori hanno dimostrato un incremento significativo della capacità di differenziazione in senso adipocitario (*Grafico 5.8*).

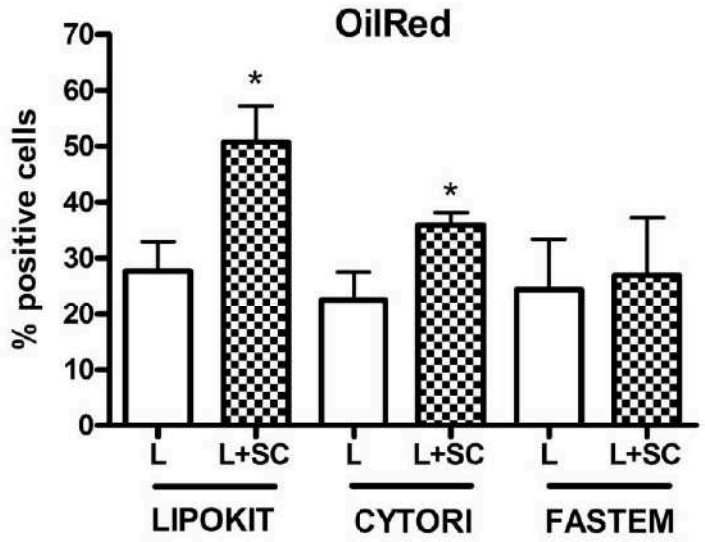


Grafico 5.8 Frazione di cellule positive alla colorazione con Oil Red-O nelle popolazioni ottenute dai lipoaspirati arricchiti (L+SC) o meno (L) con cellule staminali.

Considerando invece l'abilità di differenziare verso cellule endoteliali CD31 positive, tutte le linee cellulari hanno dimostrato una certa plasticità, ma solo l'arricchimento mediante Cytori ha incrementato significativamente la capacità di differenziazione endoteliale delle linee cellulari isolate (*Grafico 5.9*).

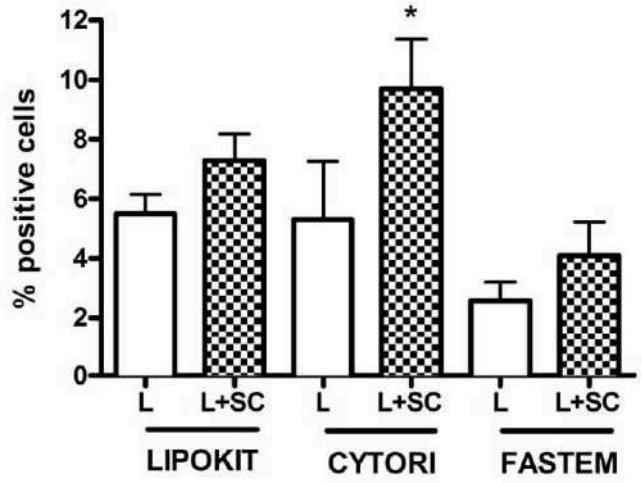


Grafico 5.9 Frazione di cellule positive per il marcatore endoteliale CD31 nelle popolazioni ottenute dai lipoaspirati arricchiti (L+SC) o meno (L) con cellule staminali.

Similmente, solo le linee cellulari ottenute dai campioni arricchiti da Cytori appaiono caratterizzate da un incremento dell'abilità differenziativa in senso miogenico. Le linee cellulari arricchite dai campioni di Lipokit hanno mostrato solo un trend all'aumento dell'abilità differenziativa, mentre le hAT-MASC ottenute da Fastem non differivano da quelle ottenute dai campioni non arricchiti.

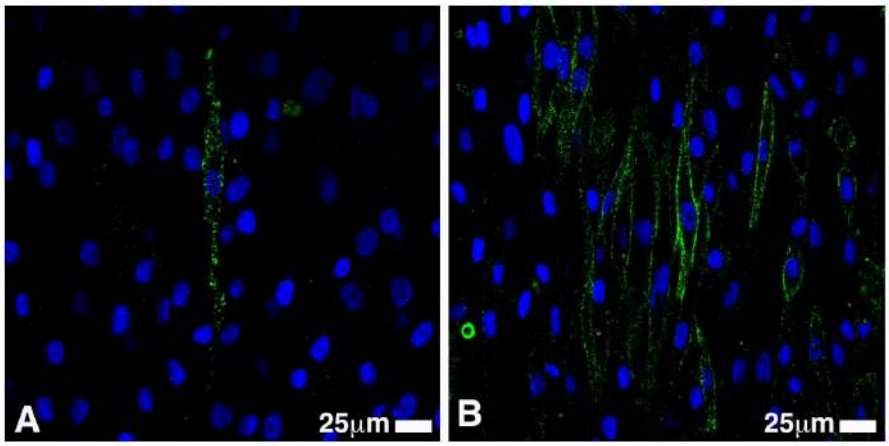


Figura 5.18 A,B Aumento dell'espressione del marcatore muscolare scheletrico (ASA, fluorescenza verde) nelle linee ottenute da lipoaspirati arricchiti (B) rispetto alle linee ottenute dai rispettivi lipoaspirati non arricchiti (A).

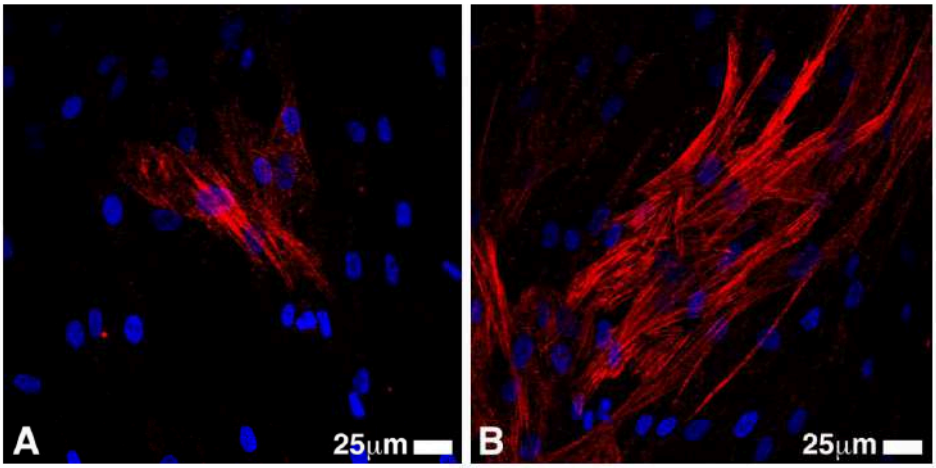


Figura 5.19 A,B Aumento dell'espressione del marcatore muscolare liscio (SMA, fluorescenza rossa) nelle linee ottenute da lipoaspirati arricchiti (B) rispetto alle linee ottenute dai rispettivi lipoaspirati non arricchiti (A).

Concludendo, le evidenze sperimentali hanno dimostrato che le cellule ottenute dal sistema Cytori e Lipokit sono caratterizzate da un incremento dell'abilità differenziativa in vitro in senso endoteliale, miocitario e adipocitario

5.4.4 VALUTAZIONE CLINICO/ECOGRAFICA

Per stabilire se l'innesto arricchito, rispetto alla tecnica tradizionale, favorisca l'attecchimento del tessuto adiposo trasferito e determinando, quindi, un miglioramento della stabilizzazione dello spessore sottocutaneo ottenuto nel tempo, abbiamo messo a confronto gli spessori mammari misurati pre-operatoriamente e post-operatoriamente. I risultati preliminari riportati sono parziali e si riferiscono ai controlli ecografici a 6 mesi, espressi in millimetri.

L'analisi calcola il rapporto tra valori pre e post-operatori per andare ad ottenere la misura del guadagno di spessore sottocutaneo ottenuto.

Rispetto alla tecnica standard, l'arricchimento mostra un risultato più valido in termini di guadagno di spessore sia a livello del quadrante supero-mediale SMQ *(Grafico 5.10)* (+0mm [da -11.2mm a +4.5mm] nella procedura standard rispetto a +3.1mm [da -4.7mm a +8.5mm] nel gruppo trattato con innesto arricchito - p=0.002) che nel quadrante medio-mediale MMQ *(Grafico 5.11)* (+0.5mm [da -16.6mm a +6.3mm] nel trattamento standard rispetto a +4.5mm [da -0.20mm a +8.2mm] nel gruppo trattato con innesto arricchito - p=0.028).

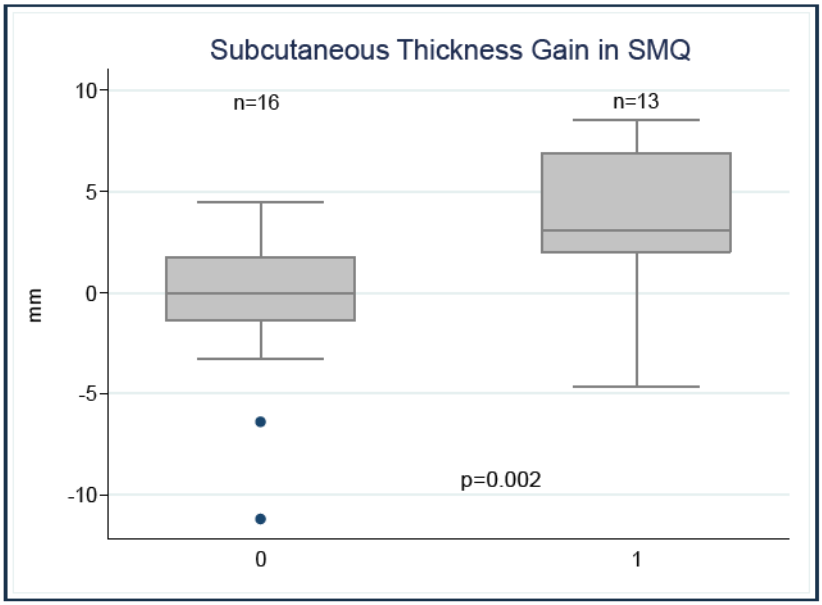


Grafico 5.10: guadagno in tessuto sottocutaneo nel quadrante supero-mediale SMQ maggiore nel gruppo trattato con metodica arricchita rispetto al gruppo trattato con tecnica standard

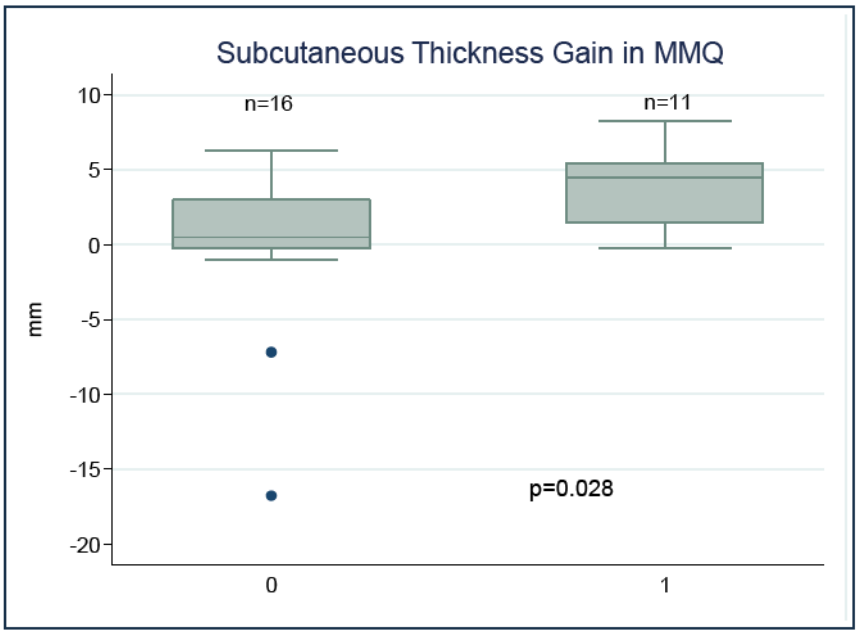
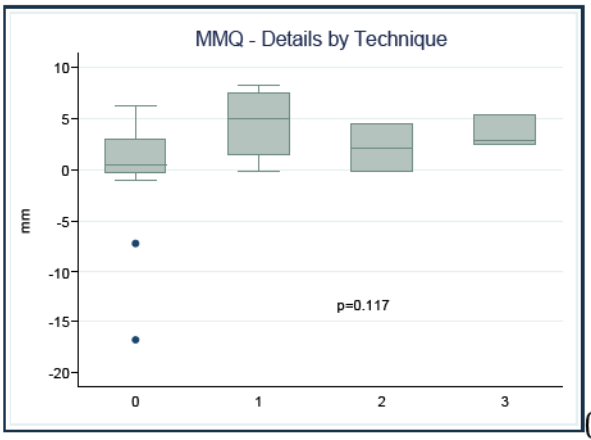
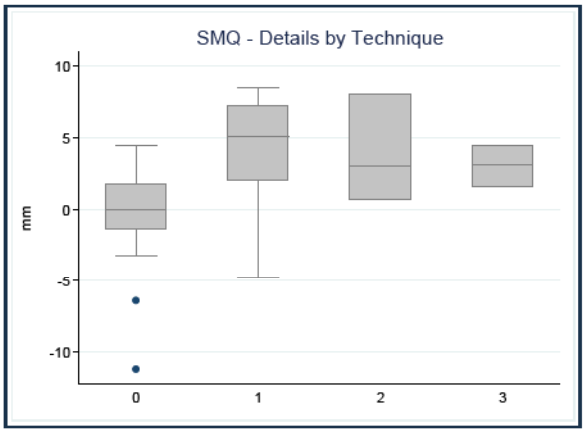


Grafico 5.11: guadagno in tessuto sottocutaneo nel quadrante medio -mediale SMQ maggiore nel gruppo trattato con metodica arricchita rispetto al gruppo trattato con tecnica standard

Ponendo l'attenzione su ogni singola apparecchiatura, una differenza di guadagno in spessore si evidenzia solo nel SMQ *(Grafico 5.12)* (p=0.026 nel SMQ e p=0.117 nel MMQ), ma i risultati dell'analisi dei sottogruppi non si mantiene dopo correzione di Bonferroni, a causa della bassa numerosità della popolazione in analisi.



(a)



(b)

Grafico 5.12: guadagno in tessuto sottocutaneo per singola metodica. Dove 0=standard , 1=Celution , 2= Lipokit ,3=Fastem.

I risultati ecografici riportati sono preliminari. Sono necessarie le analisi delle misurazioni a tempi di follow-up maggiori per ottenere dei risultati più significativi.

La valutazione clinica si è effettuata anche con l'acquisizione di fotografie pre e post-operatorie, di cui si porteranno alcuni esempi iconografici, che dimostrano l'effetto 'riempitivo' del tessuto innestato e, generalmente, un miglioramento del profilo mammario.

5.5 DISCUSSIONE

I chirurghi plastici utilizzano il grasso come materiale autologo per il riempimento di aree di deficit volumetrico da più di un secolo; il tessuto adiposo è, infatti,considerato un *filler* ideale per la facile disponibilità, l'assenza di allogenicità e il suo ottenimento con una procedura ripetibile gravata da scarsa morbilità nel sito donatore. [157, 158, 289]

Negli ultimi decenni, le conoscenze sulle caratteristiche del tessuto adiposo e le tecniche di lipostruttura sono migliorate, diventate d'uso comune nell'ambito della Chirurgia Plastica Ricostruttiva ed Estetica e diffuse in ambiti differenti, dall'ortopedia alla medicina rigenerativa. L'introduzione del concetto di cellule staminali di origine adiposa[98] ha aperto poi la strada a nuove applicazioni di questo tessuto, diventato oggetto di numerosi studi clinico-laboratoristici nei settori più svariati. [107,101,112,114]

Dall'introduzione da parte di Coleman della tecnica di lipostruttura nel 1995,[147] la procedura, seppur mantenendo inalterati i suoi fondamenti, ha subito numerosi avanzamenti.

Tuttavia, nonostante le migliorie apportate alla metodica, è rimasto irrisolto negli anni il problema della prevedibilità e stabilità del risultato dopo innesto adiposo.

Aperto è anche il dibattito riguardo alla sicurezza oncologica della metodica, che sembra però destare, manmano che i tempi di follow-up si fanno più lunghi, sempre meno preoccupazione. Infatti, parallelamente al crescere dell'interesse sulle proprietà rigenerative delle cellule staminali del tessuto adiposo e dei componenti del microambiente trasferito assieme agli adipociti nell'innesto adiposo (progenitori endoteliali, cellule del sistema immunitario, fattori di crescita, etc…), molti studi sono stati condotti indagando la sicurezza oncologica del trasferimento di questo tessuto complesso. La comunità scientifica non è ancora concorde sul ruolo che il trasferimento di un tessuto capace di promuovere la neoangiogenesi e la differenzazione cellulare possa avere nei confronti di un tessuto neoplastico. Sebbene un elevato numero di lavori condotti *in vitro* supportino un ruolo di promozione e progressione della cancerogenesi da parte delle cellule staminali, studi recenti descrivono una correlazione positiva fra cellule staminali mesenchimali e tumore della mammella solo in presenza di cellule neoplastiche in stato attivo.[258,259,260,261,262,263,264,265,266,268,290]

Risultati contraddittori emergono dalle analisi condotte sugli studi *in vivo*: affianco a lavori che supportano un ruolo di stimolo alla proliferazione cellulare tumorale da parte delle cellule staminali mesenchimali, in Letteratura ne emergono altri che descrivono le potenziali proprietà

protettive delle ASCs, che sarebbero in grado di ridurre la progressione tumorale nei tessuti in cui vengono trasferite.[291, 292,293,294,295]

Da un punto di vista clinico, la maggioranza degli studi finora condotti sottolineano, accanto ai continui rinforzi sugli effetti benefici in termini di trofismo, spessore, e vitalità dei tessuti trattati con la lipostruttura, l'assenza di recidive nei controlli dei pazienti trattati. I limiti di questi studi rimane una popolazione arruolata insufficiente e un *follow-up* ancora troppo breve per poter considerare il lipofilling sicuro in termini oncologici.[251, 272, 296,297]

In un recente lavoro multicentrico, Petit e coll.[298] riportano una percentuale di recidive del 5,6% in pazienti sottoposte a *lipofilling* in esiti di ricostruzione mammaria post-oncologica.

La nostra posizione a riguardo, rispettando le raccomandazioni proposte dalla SOFCPRE, è quella di sottoporre a lipostruttura le pazienti portatrici di difetti in esito di chirurgia oncologica della mammella che, previo inserimento in un protocollo di studio, abbiano un intervallo libero da malattia di almeno due anni, e siano state sottoposte prima dell'intervento demolitivo ad un inquadramento diagnostico accurato.[276, 263, 255] Da un punto di vista oncologico, il gruppo di Udine non ha riscontrato differenze di riprese di malattia tra le pazienti trattate e non trattate con innesto di tessuto adiposo e ritiene che ogni paziente candidata a chirurgia oncologica della mammella vada sottoposta a studio RMN mammario pre-operatorio per ridurre il rischio legato al mancato riconoscimento di lesioni satellite alla principale (es. siti di carcinoma in situ).[276]

L'imprevedibilità della percentuale di riassorbimento dell'innesto adiposo è un altro importante e altrettanto discusso elemento della lipostruttura.

In Letteratura, tre teorie principali sono state proposte per spiegare il fenomeno dell'attecchimento del tessuto adiposo innestato: la "teoria del rimpiazzo delle cellule ospiti" di Neuhof del 1923 [177], la "teoria della sopravvivenza cellulare" di Peer del 1956 [178] e la "teoria alternativa sulle cellule staminali" di Yoshimura del 2009 [156]. Il ruolo delle cellule staminali nel processo di attecchimento del tessuto adiposo innestato è riconosciuto da gran parte degli studiosi che si occupano di questa disciplina.

L'arricchimento di ASCs al tessuto adiposo che viene trapiantato sembra permettere infatti non solo risultati a lungo termine maggiormente prevedibili, ma pare vada a migliorare le caratteristiche generali del *graft*, sia da un punto di vista quantitativo (aumentando la permanenza del volume iniettato in un singolo trattamento) che qualitativo (apportando fattori di crescita, neoangiogenetici e rigenerativi).

Le caratteristiche della componente vascolo-stromale del tessuto adiposo contenente ASCs, dovute alla multipotenzialità di queste cellule e alla loro capacità di produrre fattori pro-angiogenetici e immunomodulatori, favoriscono infatti la 'maturazione' del tessuto adiposo verso quel sistema funzionale complesso capace di garantire non solo copertura e protezione meccanica agli organi, ma anche funzione termoregolatrice, endocrino-metabolica ed energetica.

Il rilascio di fattori di crescita pro-angiogenetici e anti-apoptotici da parte delle ASCs in sede di innesto faciliterebbe inoltre un reclutamento dei progenitori delle cellule endoteliali dell'ospite, favorendo ulteriormente la formazione di neovasi indispensabili per l'ossigenazione e la sopravvivenza cellulare, e in ultima analisi la stabilità dei trapianti di tessuto adiposo.[99,192]

Oltre alla facile accessibilità, le cellule staminali multipotenti si presentano nel tessuto adiposo in una quantità superiore rispetto alle cellule staminali mesenchimali ottenute a partire dal midollo osseo o da altre fonti, nonostante mantengano le stesse caratteristiche fenotipiche. [85]

Queste considerazioni, unite alle minime limitazioni e controindicazioni alla tecnica di liposuzione e all'esperienza chirurgica maturata nell'ultimo secolo, possono portare a considerare il tessuto adiposo come la principale fonte di cellule staminali multipotenti dell'adulto, e quindi sostenere l'utilizzo dello stesso come principale presidio per il futuro della terapia rigenerativa e cellulare, allargando il suo utilizzo ad ambiti anche molto diversi dalla Chirurgia Plastica e Ricostruttiva tradizionale.

Numerosi sono gli studi che sono stati effettuati per analizzare le variabili coinvolte nella sopravvivenza del tessuto adiposo (sito donatore prescelto, calibro delle cannule, forza di centrifugazione, sistemi a circuito chiuso usati, etc.) e per ottenere una metodica che sottoponesse il tessuto adiposo al minimo danno cellulare possibile, minimizzando trauma meccanico, esposizione all'aria, alterazioni metaboliche cellulari. [166, 169, 208, 207]

Gli studi effettuati da Yoshimura sull'arricchimento del grasso processato con le cellule staminali mesenchimali ottenute dallo stesso lipoaspirato, supporta il ruolo delle ASCs non solo negli effetti benefici ottenuti sui tessuti danneggiati ma anche sulla stabilità e prevedibilità del risultato volumetrico ottenuto.[155,156] Altri Autori hanno quindi supportato il ruolo delle ASCs sugli effetti benefici dell'innesto di tessuto adiposo. **Errore. Il segnalibro non è definito.**,[249]

Differenti tecniche e macchinari sono stati sviluppati per poter migliorare la tecnica di estrazione e isolamento delle ASCs dal tessuto adiposo, la concentrazione di ASC e il loro mescolamento con lo 'scaffold' adiposo da innestare, e la metodica di innesto a circuito chiuso, puntando sull'ottimizzazione della procedura in termini di qualità cellulare, tempi, costi e applicabilità clinica.

Contrastanti sono le opinioni riguardo al reale beneficio apportato da metodiche che oggettivamente aumentano costi e tempi operatori di ogni singola seduta, senza un reale riscontro clinico a distanza e una valutazione costo/beneficio a lungo termine . [255]

In questo studio sono state comparate la tecnica 'standard', nella modalità effettuata dall'equipe della Clinica di Chirurgia Plastica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Udine (una modifica alla tecnica non-arricchita proposta da Coleman) e tre differenti 'device' adibiti all'arricchimento del tessuto adiposo con cellule staminali autologhe ottenute da parte del tessuto adiposo stesso (Cytori Celution System – Lipokit Medikane – Fastem Corios).

Cytori-Celution and Lipokit-Medikane sono entrambi sistemi chiusi che per l'estrazione delle cellule staminali utilizzano una collagenasi; il metodo Fastem-Corios è invece un sistema di filtrazione meccanica che, senza l'utilizzo di enzimi, porta all'isolamento della frazione vascolo-stromale.

Questo lavoro rappresenta il primo tentativo di comparare i tre differenti metodi di arricchimento, due su base enzimatica ed uno su base meccanica, valutando la loro abilità di arricchire i campioni di tessuto adiposo in ASCs, oltre alle caratteristiche specifiche delle cellule stesse. L'analisi effettuata sulle cellule ottenute con i diversi presidi e la comparazione delle caratteristiche delle stesse si è poi associata a uno studio clinico-ecografico dei risultati ottenuti con le diverse metodiche.

A conferma dei dati presenti in Letteratura riguardo alla capacità differenziativa multilinea delle cellule staminali mesenchimali,[74,Errore. Il segnalibro non è definito.,82,87,88] tutte le ASCs dei nostri campioni hanno mostrato buona clonogenicità e multipotenza, essendo state capaci di differenziare verso mesoderma, endoderma ed ectoderma.

I device a separazione enzimatica (Cytori Celution system e Lipokit Medikan) mostrano delle caratteristiche migliori in termini di resa in ASC e in potenziale proliferativo, clonogenicità e multipotenza delle stesse, anche se non sempre i risultati hanno raggiunto significatività statistica. Specificatamente, Cytori-Celution sembra in generale superiore rispetto a Lipokit-Medikane. Viceversa, il metodo di separazione meccanica (FaStem-Corios), per quanto mostri caratteristiche cellulari più elevate in termini di resa in cellule clonogeniche confrontato con la tecnica tradizionale, risulta inferiore rispetto agli altri presidi, anche se la bassa numerosità del campione potrebbe aver inficiato i risultati finali.

La controparte clinica dello studio, ancora in fase di svolgimento, è, con la determinazione dei volumi e delle variazioni testurali e trofiche dei tessuti, la fase del nostro lavoro che può concretamente valorizzare i risultati ottenuti dal laboratorio.

Il mantenimento a lungo termine del volume del trapianto è evidentemente valutabile nel tempo mediante l'osservazione clinica, che non è però facilmente oggettivabile.

La risonanza magnetica nucleare (MRI) viene considerate l'esame ideale per determinare l'esatta entità di attecchimento dell'innesto, attraverso una valutazione del volume mammario accurata e riproducibile. Missana et al. hanno, a tale proposito, proposto il monitoraggio della vitalità dell'tessuto adiposo innestato mediante RMN, usando il fenomeno cistosteatonecrotico come indice prognostico negativo.[252, 253, 254] L'utilizzo della RMN come esame di follow-up per lo studio della stabilità dell'innesto a lungo termine è però difficilmente attuabile per lo svantaggioso rapporto costo/beneficio che comporta.[169] I costi della procedura non hanno, anche nel nostro caso, permesso di usare questo esame diagnostico per il monitoraggio della nostra popolazione. Ciò nonostante, riteniamo che l'ecografia, se eseguita accuratamente, possa essere considerato una valida ed efficace alternativa, perché è un esame semplice, poco costoso e appropriato per lo studio di variazioni millimetriche del tessuto sottocutaneo.[299,300]

L'analisi ecografica, permette di associare un controllo volumetrico al controllo clinico delle pazienti, senza incidere drasticamente sui costi della procedura. Per ridurre il riconosciuto limite dell'esame ultrasonografico legato all'operatore-dipendenza della procedura, l'acquisizione dei valori è stata eseguita con la stessa modalità e da due operatori diversi nel corso dello stesso controllo. I risultati del guadagno di spessore dopo innesto nei quadranti analizzati ha mostrato, con dati preliminari, una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi messi a confronto (procedura Arricchita-pA versus procedura Non Arricchita-pNA), con spessori che mostrano un trend più elevato a 6 mesi nei pazienti trattati con Cytori Celution e Lipokit Medikane System, sebbene i dati per singola apparecchiatura non siano significativi. I dati clinici correlano con i risultati degli spessori analizzati negli innesti arricchiti.

Il nostro lavoro si somma, con risultati ad oggi incoraggianti, ai numerosi studi presenti in Letteratura, a conferma che l'innesto arricchito favorisce la stabilità dello spessore sottocutaneo nel tempo. L'utilizzo di device a circuito chiuso può apportare vantaggi qualitativi alla procedura di arricchimento, in quanto: 1. le cellule isolate dai lipoaspirati arricchiti mostrano proprietà proliferative, differenziative e clonogeniche elevate, 2. Le metodiche analizzate si sono dimostrate sicure e standardizzate e richiedono una minima manipolazione, 3. Le metodiche, inoltre, permettono un trasferimento intraoperatorio immediato di cellule immature sempre più selezionate, rispettando le linee guida giuridiche attualmente imposte.

L'innesto di tessuto adiposo arricchito, e propriamente l'infiltrazione e iniezione di FVS e ASCs, attraverso i dispositivi descritti con procedure ben definite e studiate, potrebbero diventare un

presidio d'uso comune nella tecnica di lipostruttura, aumentandone esponenzialmente le possibilità terapeutiche anche verso ambiti che esulano dall'utilizzo attuale.

L'ottenimento di una numerosità adeguata di esami ecografici effettuati in 'doppio ceco' ci permetterà inoltre di validare, o contestare, l'esame ecografico valutandone l'accuratezza e la riproducibilità.

Un numero più elevato di pazienti arruolate e tempi di follow-up maggiori sono, inoltre, necessari per dare significatività agli attuali risultati clinici rilevati e permetteranno di eseguire una valutazione dei costi in relazione ai benefici ottenuti confrontando tecnica standard e *cell-assisted lipotransfer*, per determinare in ultimo se l'innesto arricchito con presidi a circuito chiuso porti un reale vantaggio alla procedura standard di innesto adiposo.

5.6 CONCLUSIONI

Analizzando i risultati presentati in questo studio, appare evidente come l'innesto di tessuto adiposo arricchito con le cellule staminali mesenchimali in esso stesso contenute, abbia concretamente modificato le caratteristiche cellulari del lipofilling e come il metodo di separazione enzimatica possa diventare un presidio essenziale non solo per il futuro della tecnica di lipostruttura, ma anche per la medicina rigenerativa più in generale.

L'aumento in ASCs, con valide caratteristiche di staminalità, con cui viene arricchito il lipofilling potrebbe portare una soluzione al reale problema di instabilità dell'innesto adiposo, diminuendo il numero di interventi richiesti per la lipostruttura, limitando i costi a lungo termine, e allargandone ulteriormente le indicazioni.

I risultati clinici sinora ottenuti sono solo parziali e un follow-up più lungo è necessario per approfondire la correlazione tra i dati laboratoristici rilevati e i concreti benefici a lungo termine e per poter fare un bilancio sui costi di procedure che, viste singolarmente possono apparire estremamente onerose, ma che, se fornissero un risultato concretamente stabile nel tempo, riducendo il numero di interventi necessari, potrebbero, in ultima analisi, risultare vantaggiose, non solo in termini di minor disagio percepito dal paziente, ma anche sul lato economico.

Nonostante queste 'valide premesse', le criticità rimangono numerose, sia per quanto riguarda l'identificazione di una procedura ideale, sicura ed affidabile, per favorire l'attecchimento del

tessuto adiposo, che nel campo della sicurezza oncologica della procedura, che nei confronti di un sistema legislativo ancora inadeguato.

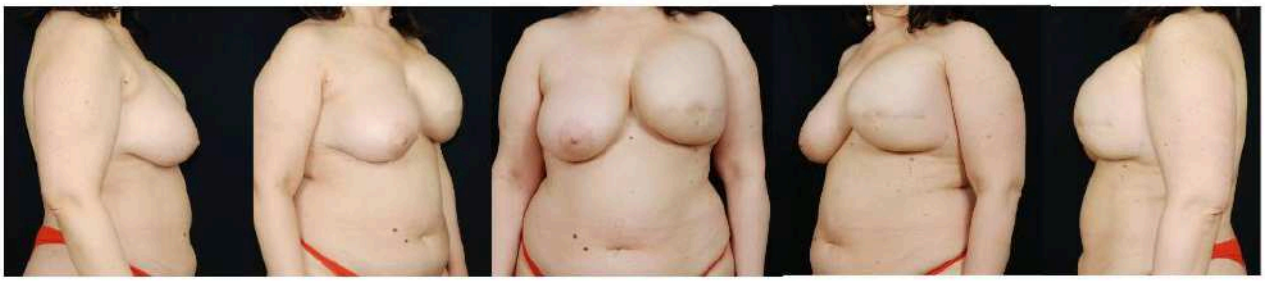
I dati presentati in questo studio, fanno parte di un progetto di ricerca che nel corso degli ultimi tre anni si è progressivamente allargato, grazie all'applicazione di queste procedure ad ambiti clinici differenti, come la chirurgia vascolare, l'ortopedia, l'oculistica e la rigenerazione nervosa.

Verranno riportati, in breve, tra i casi clinici alcuni esempi di tali applicazioni (Caso Clinico 6 e Caso Clinico 7)

6. CASI CLINICI

6.1 CASO CLINICO 1

A



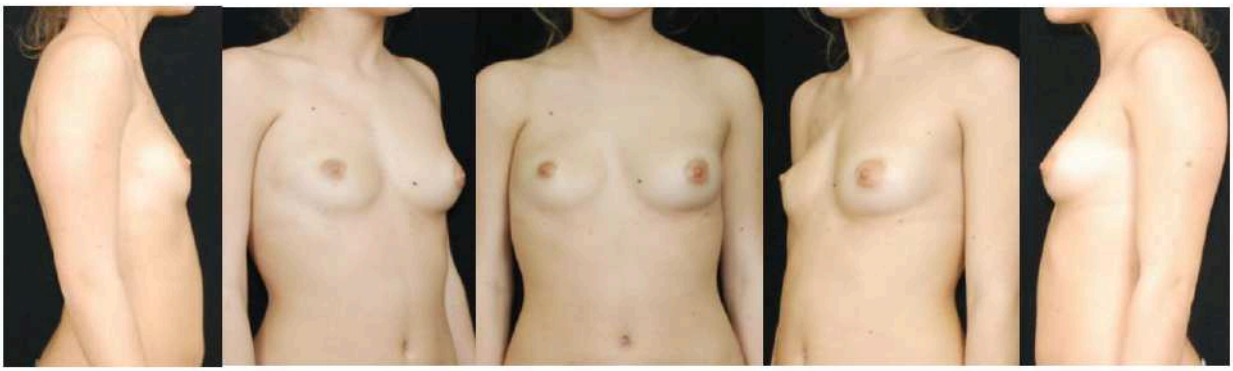
B

Figura 6.1. Caso Clinico 1, immagini nelle diverse proiezioni pre-operatorie (A) e post-operatorie (B) a 6 mesi.

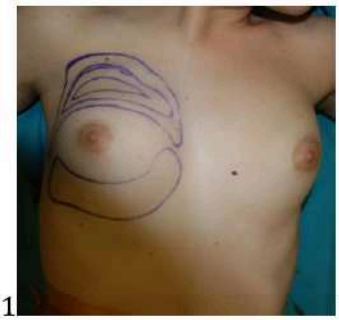
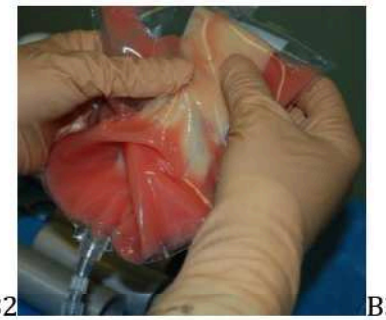
Caso clinico 1: Paziente sottoposta a mastectomia *skin sparing* sinistra e ricostruzione immediata mediante inserimento di espansore mammario (A). Sottoposta a lipostruttura 'CAL' mediante sistema di arricchimento enzimatico Cytori-Celution per modellamento del contorno mammario in corso di intervento di sostituzione di espansore con protesi definitiva, associato a capsulotomie (B).

Buono il risultato ottenuto in termini di forma e volume. Spessore medio del tessuto sottocutaneo della mammella ricostruita con protesi mammaria di 1,2 mm. In attesa di ricostruzione del CAC.

A



B

B1  B2  B3

C

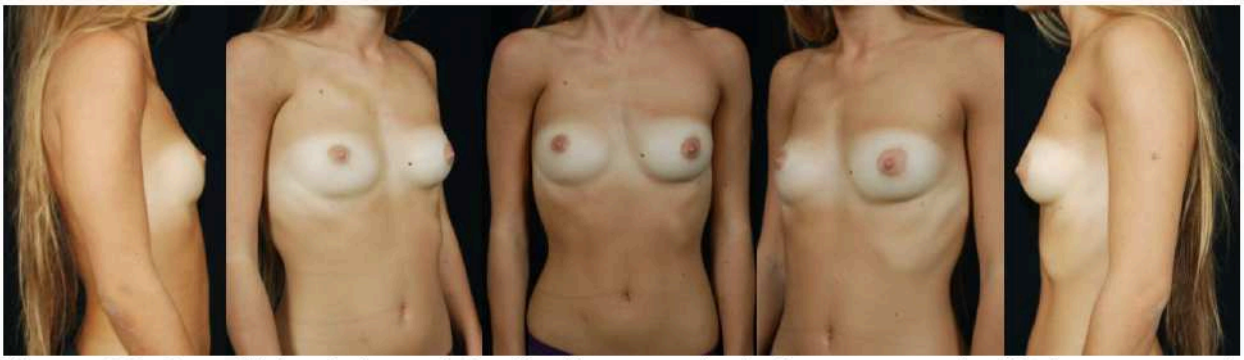


Figura 6.2. Caso Clinico 2, immagini nelle diverse proiezioni pre-operatorie (A), intraoperatorie: B1: disegno pre-operatorio; B2 Sacca per il filtraggio meccanico della FVS mediante Sistema Fastem-Corios, B3: Sistema di separazione 'a tre vie'(B) e post-operatorie a 1 anno e mezzo (C).

Caso clinico 2: Paziente portatrice di Sdr. di Poland, sottoposta a due interventi di lipostruttura con presidio Fastem-Corios. Innestati a livello della mammella destra un totale di 280cc di tessuto adiposo prelevato dai fianchi. Buono il risultato ottenuto in termini di forma e volume dopo un trattamento.

A

B

C

Figura 6.3. Caso Clinico 3, immagini nelle diverse proiezioni pre-operatorie (A) e post-operatorie a 1 anno (B).

Caso clinico 3: Paziente sottoposta a mastectomia sinistra ed inserimento di espansore tissutale. Sottoposta quindi a sostituzione dell'espansore con protesi definitiva sinistra, riposizionamento del solco sottomammario, capsulotomie multiple, mastoplastica additiva controlaterale e lipostruttura con procedura di arricchimento enzimatico Citory-Celution contestuale. In attesa di ricostruzione del CAC.

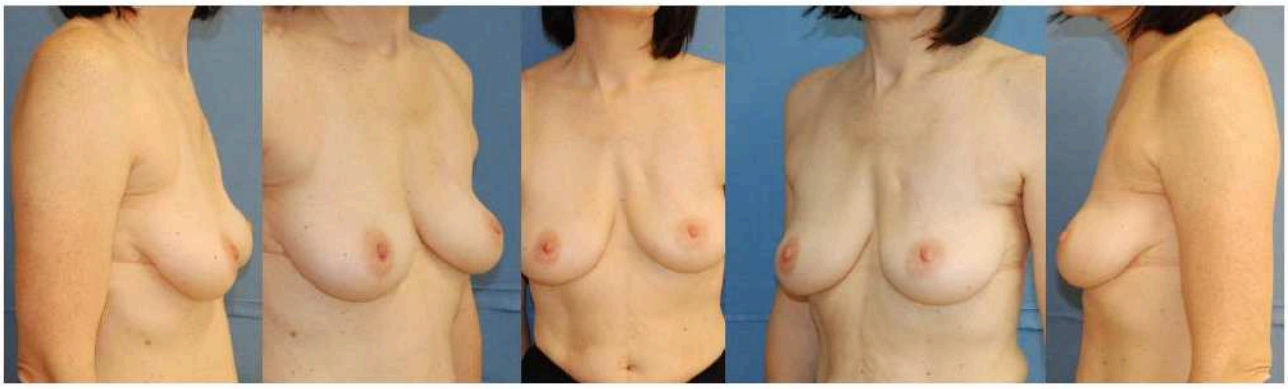
A

B

Figura 6.4. Caso Clinico 3, immagini nelle diverse proiezioni pre-operatorie (A) e post-operatorie a 1 anno (B).

Caso clinico 4: Paziente sottoposta a ricostruzione mammaria protesica in esiti di mastectomia sinistra mediante inserimento immediato di espansore tissutale. Contestualmente alla sostituzione dell'espansore mammario con protesi definitiva, la paziente ha beneficiato di lipostruttura sinistra con tessuto adiposo arricchito, mediante sistema di arricchimento Lipokit-Medikane, e di una mastoplastica additiva controlaterale.

A



B

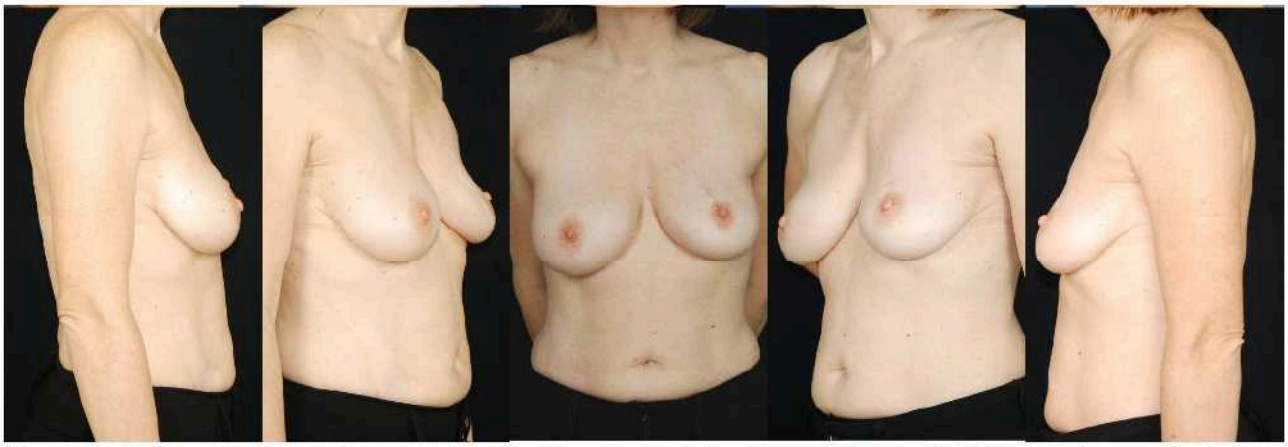


Figura 6.5. Caso Clinico 5, immagini nelle diverse proiezioni pre-operatorie (A) e post-operatorie a 1 anno (B).

Caso clinico 5: Paziente sottoposta a due sedute di innesto di tessuto adiposo processato mediante metodica non arricchita 'standard', per la correzione dell'area di 'minus' in esiti di quadrantectomia del quadrante supero-interno della mammella sinistra.

6.6 CASI 'SPECIALI': CASO CLINICO 6 E CASO CLINICO 7

Vengono di seguito riportati due casi clinici riguardanti l'innesto di tessuto adiposo arricchito con cellule staminali in sede diversa da quella mammaria, per il trattamento di lesioni ulcerate gravi di difficile trattamento.

CLINICO 6

Figura 6.6. Caso Clinico 6, (A): quadro pre-operatorio, ulcera con esposizione del tendine d'Achille; (B): quadro post-operatorio a 6 settimane dalla trasposizione del lembo; (C): quadro post-operatorio a 2 mesi; (D): quadro post-operatorio a 9 mesi.

Caso clinico 6: Paziente vasculopatico grave, portatore di ulcera con esposizione di tendine d'Achille, trattato con toilette, autonomizzazione di lembo fasciocutaneo locale arricchito con cellule staminali mediante sistema Cytori-Celution a due settimane dall'intervento di rivascolarizzazione. Il lembo è stato quindi trasposto, dopo 21 giorni, a copertura della perdita di sostanza.

CLINICO 7

Figura 6.7. Caso Clinico 7, (A): quadro pre-operatorio (B): quadro intra-operatorio; (C): quadro post-operatorio a 2 settimane; (D): quadro post-operatorio a 3 mesi.

Caso clinico 6: Paziente sottoposta a innesto adiposo arricchito in cellule staminali ASC con sistema Cytori-Celution in esiti di ustione chimica (sostanza non nota) del dorso della mano e del polso.

7. BIBLIOGRAFIA

[1]TANZI M.C., FARÈ S. *"Adipose tissue engineering: state of the art, recent advances and innovative approaches."* Expert Rev Med Devices Sep;6(5):533-51, (2009).

[2]ALBRIGHT, A.L. AND STERN, J.S. *"Adipose tissue."* In Encyclopedia of Sports Medicine and Science, T.D.Fahey, (1998).

[3]CINTI S. *"The Adipose Organ."* In Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease, Nutrition and Health pp 3-19 (2007).

[4]RONDINONE M.C. *"Adipocyte-Derived Hormones, Cytokines, and Mediators."* Endocrine, vol. 29, no. 1, 81–90, (February 2006).

[5]CINTI S. *"Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ."* Am J Physiol Endocrinol Metab, (2009).

[6]CINTI S. *"The adipose organ at a glance."* Disease Models & Mechanisms 5, 588-594, (2012).

[7]KERSHAW E.E., FLIER J.S. *"Adipose Tissue as an Endocrine Organ."* The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 89(6):2548–2556, (2004).

[8]FRUHBECK G., GOMEZ-AMBROSI J., MURUZABAL F.J., BURRELL M.A. *"The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation."* Am J Physiol Endocrinol Metab 280:E827-E847, (2001).

[9]ROSATI P., COLOMBO R. *"Istologia."* Quarta Edizione, Edi-Ermes (2004).

[10]CINTI S. *"The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues."* Proceedings of the Nutrition Society, 60, 319.328, (2001).

[11]SAELY C.H., GEIGER K., DREXEL H. *"Brown versus White Adipose Tissue: A Mini-Review."* Gerontology 58:15–23, (2012).

[12]BARBATELLI G., MURANO I., MADSEN L., HAO Q., JIMENEZ M., KRISTIANSEN K., GIACOBINO J.P., DE MATTEIS R., CINTI S. *"The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation."* Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.298, E1244–E1253, (2010).

[13]VOTRUBA S.B., JENSEN M.D. *"Regional fat deposition as a factor in FFA metabolism."* Annu Rev Nutr 27:149-63, (2007).

[14]WEHRLI N.E., BURAL G., HOUSENI M., ALKHAWALDEH K., ALAVI A., TORIGIAN D.A. *"Determination of age-related changes in structure and function of skin, adipose tissue, and skeletal muscle with computed tomography, magnetic resonance imaging, and positron emission tomography"* Semin Nucl Med 37:

195–205, (2007).

[15]LEE M.J., WU Y., FRIED S.K. *"Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications"* Molecular Aspects of Medicine 34 1–11, (2013).

[16]POND, C.M. *"Adipose tissue and the immune system."* Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 73, 17–30, (2005).

[17]DARIMONT C., AVANTI O., BLANCHER F., WAGNIERE S., MANSOURIAN R., ZBINDEN I., LEONE-VAUTRAVERS P., FUERHOLZ A., GIUSTI V., MACE K. *"Contribution of mesothelial cells in the expression of inflammatory-related factors in omental adipose tissue of obese subjects."* Int. J. Obes., (2007).

[18]FEVÈ B., *"Adipogenesis: cellular and molecular aspects."* Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism Vol. 19, No. 4, pp. 483–499, (2005).

[19]HAGER A, SJOSTROM L, ARVIDSSON B, ET AL. *"Body fat and adipose tissue cellularity in infants: A longitudinal study."* Metabolism 26:607–614, (1977).

[20]FAUST IM, MILLER WH, SCLAFANNI A ET AL. *"Diet-dependent hypeplastic growth of adipose tissue in hypothalamic obese rats."* Am J Physiol 247: R1038–R1046, (1984).

[21]MILLER WH, FAUST IM & HIRSCH J. *"Demonstration of de novo production of adipocytes in adult rats by biochemical and radioautographic techniques."* J Lipid Res 25: 336–347, (1984).

[22]ALI AT, HOCHFELD WE, MYBURGH R, PEPPER MS. *"Adipocyte and adipogenesis."* Eur J Cell Biol. 2013;

[23]BASTARD J.P., FÈVE B. *"Physiology and Physiopathology of Adipose Tissue"* (2012).

[24]TCHKONIA T. ET AL. *"Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns."* Am. J. Physiol. 292:E298–E307, (2007).

[25]ZUK P.A. ET AL. *"Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells"* Mol Biol Cell. 13(12): 4279–4295, (December 2002)

[26]PARK K.W., HALPERIN D.S., TONTONOZ P. *"Before They Were Fat: Adipocyte Progenitors."* Cell Metabolism 8, December 3, (2008).

[27]NIEMELÄ S., MIETTINEN S., KONTTINEN Y ET AL. *"Fat tissue: Views on Reconstruction and Exploitation. The journal of Craniofacial Surgery"* 18(2): 325-335, (2007).

[28]FARMER S.R. *"Transcriptional control of adipocyte formation."* Cell Metab. 4(4): 263–273, (October 2006).

[29]GESTA S, TSENG YH, KAHN CR. *"Developmental origin of fat: tracking obesity to its source."* Cell. 19;131(2):242-56, (Oct 2007).

[30]CANNON B., NEDERGAARD J. *"Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance"* Physiol Rev 84: 277–359, (2004)

[31]FREEDMAN DS, JACOBSEN SJ, BARBORIAK JJ, ET AL. *Body fat distribution and male/female differences in lipids and lipoproteins. Circulation.* 1990;81(5):1498-506.

[32]TRAYHURN P., BEATTIE J.H. *"Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ."* Proceedings of the Nutrition Society 60, 329.339, (2001).

[33]FRÜHBECK G. *Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders*. Methods Mol Biol. 2008;456:1-22.

[34]STRAWFORD A, ANTELO F, CHRISTIANSEN M, HELLERSTEIN MK. *Adipose tissue triglyceride turnover, de novo lipogenesis, and cell proliferation in humans measured with 2H2O*. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2004;286(4):E577-88.

[35]SPALDING KL, ARNER E, WESTERMARK PO, ET AL. *Dynamics of fat cell turnover in humans.* Nature. 2008;453(7196):783-7.

[36]NICHOLLS DG, BERNSON VS, HEATON GM. *The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation.* Experientia Suppl. 1978;32:89-93.

[37]FONSECA-ALANIZ M.H., TAKADA J., ALONSO-VALE M.I., LIMA F.B. *"Adipose tissue as an endocrine organ:from theory to practice."* J Pediatr (Rio J). Nov;83(5 Suppl):S192-203 (2007).

[38] SBARBATI A, ACCORSI D, BENATI D, ET AL. *Subcutaneous adipose tissue classification*. Eur J Histochem. 2010;54(4):e48.

[39]IBRAHIM M.M. ET AL., *"Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences."* International Association for the Study of Obesity. obesity reviews 11, 11–18, (2009).

[40]TCHKONIA, T., TCHOUKALOVA, Y.D., GIORGADZE, N., PIRTSKHALAVA, T., KARAGIANNIDES, I., FORSE, R.A., KOO, A., STEVENSON, M., CHINNAPPAN, D., CARTWRIGHT, A., JENSEN, M.D., KIRKLAND, J.L. *"Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots."* Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 288, E267–E27, (2005).

[41]LEE, M.J., FRIED, S.K. *"Adipose Tissue in Health and Disease (Chapter 15). Depot-Specific Biology of Adipose Tissues: Links to Fat Distribution and Metabolic Risk",* (2010).

[42]ZHANG Y., PROENCA R., MAFFEI M., BARONE M., LEOPOLD L., FRIEDMAN J.M. *"Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue."* Nature Dec 1;372(6505):425-32. (1994). Erratum in: Nature Mar 30;374(6521):479, (1995).

[43]TRAYHURN P. ET AL. *"Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue."* British Journal of Nutrition 92, 347–355, (2004).

[44]MARGETIC S., GAZZOLA C., PEGG G.G., HILL R.A. *"Leptin: a review of its peripheral actions and interactions."* Int J Obes Relat Metab Disord 26:1407–1433, (2002).

[45]VISNU LOHSIRIWAT ET AL., *"Autologous fat transplantation in patients with breast cancer: "silencing" or "fueling" cancer recurrence?"* The Breast Volume 20, Issue 4 , Pages 351-357, (August 2011).

[46]CHANDRAN M., PHILLIPS S.A., CIARALDI T., HENRY R.R. *"Adiponectin: more than just another fat cell hormone?"* Diabetes Care 26:2442–2450, (2003).

[47]DIEZ J.J., IGLESIAS P. *"The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease."* Eur J Endocrinol 148:293–300, (2003).

[48]RUAN H., LODISH H.F. *"Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor."* Cytokine Growth Factor Rev 14: 447–455, (2003).

[49]COPPACK S.W. *"Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue."* Proc Nutr Soc 60, 349–356, (2001).

[50]AHIMA R.S., FLIER J.S. *"Adipose tissue as an endocrine organ." Trends Endocrinol Metab 11:327–332, (200o).*

[51]AHIMA R.S., FLIER J.S. *"Adipose tissue as an endocrine organ." Trends Endocrinol Metab 11:327–332, (200o).*

[52]HEINRICH, P. C., CASTELL, J. V., AND ANDUS, T. *"Interleukin-6 and the acute phase response"* Biochem J. February 1; 265(3): 621–636, (1990).

[53]BJÖRNTORP P. *"Hormonal control of regional fat distribution."* Hum Reprod. Oct;12 Suppl 1:21-5, (1997).

[54]JAN WESTERINK, FRANK LJ VISSEREN. *"Pharmacological and non-pharmacological interventions to influence adipose tissue function."* Cardiovasc Diabetol. Jan 28;10(1):13, (2011).

[55] http://www.stemoworld.com

[56] http://stemcells.nih.gov/ U.S Department of Helath & Human Services.

[57]SELL, S. *"Stem cells."* Stem Cell Handbook ed. by Sell, S. 1-18, (2004).

[58]YOUNG H.E., BLACK A.C. JR., *"Adult Stem Cells, The Anatomical Record Part A"* 276A:75–102, (2004).

[59]SMITH A., *"A glossary for stem-cell biology."* Nature, 441(7097):1060-1060, (2006).

[60]A. VATS, N.S. TOLLEY, J.M. POLAK & L.D.K. BUTTERY. *"Stem cells: sources and applications."* Clin. Otolaryngol. 27, 227–232, (2002).

[61]THOMSON J.A., ITSKOVITZ-ELDOR J., SHAPIRO S.S., ET AL. *"Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts."* Science 282: 1145–47, (1998).

[62]ODORICO J.S., KAUFMAN D.S., THOMSON J.A. *"Multilineage differentiation from human embryonic stem cells."* Stem Cells 19: 193–204, (2001).

[63]ZHANG S.C., WERNIG M., DUNCAN I.D., BRUSTLE O., THOMSON J.A. *"In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells."* Nat Biotechnol 19: 1117–18, (2001).

[64]MUMMERY C, WARD D, VAN DEN BRINK CE, ET AL. *"Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells."* J Anat 200: 233–42, (2002).

[65]BIELBY R.C., BOCCACCINI A.R., POLAK J.M., BUTTERY L.D.K. *"In vitro differentiation and in vivo mineralization of osteogenic cells derived from human embryonic stem cells."* Tissue Eng 10: 1518–25, (2004).

[66]KAUFMAN D.S., HANSON E.T., LEWIS R.T., AUERBACH R., THOMSON J.A. *"Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells."* Proc Natl Acad Sci USA 98: 10716–21, (2001).

[67]PAVLOVIC M., BALINT B., *"Stem Cells and Tissue Engineering."* Springer, (2013).

[68]A. VATS, R.C. BIELBY, N.S. TOLLEY, R. NEREM, J.M. POLAK, *"Stem cells."* Lancet 366: 592–602, (2005).

[69]JONES, J.M. AND THOMSON, J.A. *"Human embryonic stem cell technology."* Semin. Reprod. Med. 18, 219–223, (2000).

[70]CAMPAGNOLI C., ROBERTS I.A., KUMAR S., BENNETT P.R., BELLANTUONO I., FISK N.M. *"Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow."* Blood 98: 2396–402, (2001).

[71]PRENTICE D.A. PH.D., *"Adult Stem Cells",* (2003/2004).

[72]WAGERS A.J., L. WEISSMAN I.L, *"Plasticity of Adult Stem Cells."* Cell Vol. 116, 639–648, March 5, (2004).

[73]JIANG Y., JAHAGIRDAR B.N., REINHARDT R.L. ET AL. *"Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow."* Nature 418:41–9, (2002).

[74]ANDERSON D.J., GAGE F.H., WEISSMAN I.L. *"Can stem cells cross lineage boundaries?"* Nat. Med. 7, 393–395 (2001).

[75]VIGNERY, A. *"Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism."* Int. J. Exp. Pathol. 81, 291–304, (2000).

[76]LAKSHMIPATHY U., VERFAILLIE C, *"Stem cell plasticity."* Blood Reviews, Volume 19, Issue 1, January Pages 29–38, (2005).

[77]HOCHEDLINGER K., PLATH K. *"Epigenetic reprogramming and induced pluripotency."* Development. Feb;136(4):509-23, (2009).

[78]BELTRAMI AP, CESSELLI D, BELTRAMI CA. *Pluripotency rush! Molecular cues for pluripotency, genetic reprogramming of adult stem cells, and widely multipotent adult cells.* Pharmacol Ther. 2009;124:23-30

[79]FRIEDENSTEIN A.J., PIATETZKY-SHAPIRO I.I., PETRAKOVA K.V., *"Osteogenesis in transplants of bone marrow cells,"* Journal of Embryology and Experimental Morphology, vol. 16, no. 3, pp. 381–390, (1966).

[80]FRIEDENSTEIN A.J., PETRAKOVA K.V., KUROLESOVA A.I., FROLOVA G.P., *"Heterotopic of bone marrow.*

Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues." Transplantation, vol. 6, no. 2, pp. 230–247, (1968).

[81]OWEN M., *"Marrow stromal stem cells"* Journal of Cell Science, vol. 10, supplement 10, pp. 63–76, (1988).

[82]CAPLAN A.I., *"Mesenchymal stem cells."* Journal of Orthopaedic Research, vol. 9, no. 5, pp. 641–650, (1991).

[83]ZOU Z., ZHANG Y., HAO L. ET AL. *"More insight into mesenchymal stem cells and their effects inside the body."* Expert Opinion on Biological Therapy, vol. 10, no. 2, pp. 215–230, (2010).

[84]DA SILVA MEIRELLES L., CHAGASTELLES P.C., NARDI N.B., *"Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues"* J Cell Sci 119:2204-2213, (2006).

[85]BAER P.C., GEIGER H. *"Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/StemCells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity."* Stem Cells Int., (2012).

[86]M. DOMINICI, K. LE BLANC, I. MUELLER ET AL., *"Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement."* Cytotherapy, vol. 8, no. 4, pp. 315–317, (2006).

[87]G. SIEGEL, R. SCHÄFER, AND F. DAZZI, *"The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells."* Transplantation, vol. 87, no. 9, pp. S45–49, (2009).

[88]BELTRAMI AP, CESSELLI D, BERGAMIN N, ET AL. *Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow).* Blood. 2007;110:3438-3446.

[89]SHIHUA WANG, XUEBIN QU AND ROBERT CHUNHUA ZHAO, *"Clinical applications of mesenchymal stem cells."* Journal of Hematology & Oncology 5:19, (2012).

[90]TROJAHN KØLLE SF, OLIVERI RS, GLOVINSKI PV, ELBERG JJ, FISCHER-NIELSEN A, DRZEWIECKI KT. *Importance of mesenchymal stem cells in autologous fat grafting: a systematic review of existing studies.* J Plast Surg Hand Surg. 2012 Apr;46(2):59-68.

[91]KARNOUB A.E., DASH A.B., VO A.P., SULLIVAN A., BROOKS M.W., BELL G.W., RICHARDSON A.L., POLYAK K., TUBO R., WEINBERG R.A.: *"Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis."* Nature 449:557–563, (2007).

[92]PROCKOP D.J., BRENNER M., FIBBE W.E., HORWITZ E., LE BLANC K., PHINNEY D.G., SIMMONS P.J., SENSEBE L., KEATING A. *"Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy."* Cytotherapy 12:576–578, (2010).

[93]SCHOFIELD R. *"The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell."* Blood Cells 4, 7–25 (1978).

[94]KOLF C.M., CHO E., TUAN R.S. *"Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation"* Arthritis Research & Therapy 9:204 (2007).

[95]CORSELLI M., CHEN C.W., CRISAN M., LAZZARI L, PÉAULT B. "*Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells,"* Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, vol. 30, no. 6, pp. 1104–1109, (2010).

[96]BLASHKI D., SHORT B., BERTONCELLO I., SIMMONS P.J., BROUARD N. *"Identification of stromal MSC candidates from multiple adult mouse tissues."* In Int Soc Stem Cell Res 4th Annual Meeting 206, (2006).

[97]SCADDEN D.T. *"The stem-cell niche as an entity of action."* Nature 441, 1075-1079,29 June, (2006).

[98]ZUK P.A., ZHU M., MIZUNO H., HUANG J., FUTRELL J.W., KATZ A.J., BENHAIM P., LORENZ H.P., HEDRICK M.H. *"Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies."* Tissue Engineering, vol. 7, no. 2, pp. 211–228, (2001).

[99]BROWN S.A. PH.D., BENJAMIN LEVI B. M.D., CHARLOTTE LEQUEX VICTOR WONG W. M.D., MOJALLAL A. M.D., LONGAKER M.T. M.D., M.B.A. *"Basic Science Review on Adipose Tissue for Clinicians"* Plast. Reconstr. Surg. 126: 1936, (2010).

[100]ZUK P.A., ZHU M., ASHJIAN P., DE UGARTE D.A., HUANG J.I., MIZUNO H., ALFONSO Z.C., FRASER J.K., BENHAIM P., HEDRICK M.H. *"Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells."* Molecular Biology of the Cell Vol. 13, 4279–4295, December, (2002).

[101]SAFFORD KM, HICOK KC, SAFFORD SD, ET AL. *"Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells."* Biochem Biophys Res Commun. 2002;294:371–379, (2002).

[102]TIMPER K, SEBOEK D, EBERHARDT M, ET AL. *"Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells."* Biochem Biophys Res Commun. 341:1135–1140, (2006).

[103]SEO MJ, SUH SY, BAE YC, JUNG JS. *"Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo."* Biochem Biophys Res Commun. 328:258–264, (2005).

[104]PLANAT-BENARD V, SILVESTRE JS, COUSIN B, ET AL. *"Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: Physiological and therapeutic perspectives."* Circulation 109: 656–663, (2004).

[105]STREM B.M., HICOK K.C., ZHU M., WULUR I., ALFONSO Z., SCHREIBER R.E., FRASER J.K., HEDRICK M.H. *"Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells."* Keio J Med 54 (3): 132–141, (2005)

[106]LIN G., GARCIA M., NING H., BANIE L., GUO Y.L., LUE T.F., LIN C.S. *"Defining stem and progenitor cells within adipose tissue."* Stem Cells and Development, vol. 17, no. 6, pp. 1053–1063, (2008).

[107]DE UGARTE D.A., MORIZONO K., ELBARBARY A., ALFONSO Z., ZUK P.A., ZHU M., DRAGOO J.L., ASHJIAN P., THOMAS B., BENHAIM P., CHEN I., FRASER J., HEDRICK M.H. *"Comparison of multi-lineage cells from human*

adipose tissue and bone marrow" Cells Tissues Organs, vol. 174, no. 3, pp. 101– 109, (2003)

[108]GUILAK F., LOTT K.E., AWAD H.A., CAO Q., HICOK K.C., FERMOR B., GIMBLE J.M. *"Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells"* Journal of Cellular Physiology, vol. 206, no. 1, pp. 229–237, (2006).

[109]GIMBLE J.M. *"Adipose tissue-derived therapeutics."* Expert Opin. Biol. Ther. 3(5):705-713, (2003).

[110]TREMOLADA C., PALMIERI G., RICORDI C. *"Adipocyte Transplantation and Stem Cells: Plastic Surgery Meets Regenerative Medicine."* Cell Transplantation, Vol. 19, pp. 1217–1223, (2010).

[111]GIR P., ONI G., BROWN S.A., MOJALLAL A., ROHRICH R.J. *"Human Adipose Stem Cells: Current Clinical Applications."* Plast. Reconstr. Surg. 129: 1277, (2012).

[112]CESSELLI D, BELTRAMI AP, D'AURIZIO F, ET AL. *Effects of age and heart failure on human cardiac stem cell function.* Am J Pathol. 2011;179:349-366.

[113]JEONG J.H., LEE J.H., JIN E.S., MIN J.K., JEON S.R., CHOI K.H., *"Regeneration of intervertebral discs in a rat disc degeneration model by implanted adipose-tissue-derived stromal cells."* Acta Neurochir Wien 152:1771–1777, (2010).

[114]ZEPPIERI M, SALVETAT ML, BELTRAMI AP, ET AL. *Human adipose-derived stem cells for the treatment of chemically burned rat cornea: preliminary results.* Curr Eye Res. 2013;38:451-463.

[115]SCHÄFFLER A., BÜCHLER C., *"Concise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells - Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies."*, STEMCELLS 25:818–827 (2007).

[116]COLEMAN SR, SABOEIRO AP. *Fat grafting to the breast revisited: safety and efficacy.* Plast Reconstr Surg. 2007 Mar;119(3):775-85; discussion 786-7.

[117]PINSOLLE V., CHICHERY A., GROLLEAU J-L., CHAVOIN J.P. *Autologous fat injection in Poland's Sindrome.* J Plast Reconstr AesthetSurg (2008) doi:10.1016/j.bjps.2007.11.033

[118]RIGOTTI G, MARCHI A, GALIE M, BARONI G, BENATI D, KRAMPERA M, PASINI A, SBARBATI A. *Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells.* Plast Reconstr Surg. 2007 Apr 15;119(5):1409-22

[119]NEUBER F., *"Fettransplantation."* Chir Kongr Verhandl Dsch Gesellsch Chir. 22:66, (1893).

[120]LEXER E. Freie Fettransplantation. Med Wochenschr 1910;3:640.

[121]BRUNING P., *"Contribution a l'etude def greffes adipeuses."* Bull Acad R Med Belgique 28:440, (1919).

[122]MILLAR C., .Cannula *Implants and Review of Implantation Techniques in Esthetic Surgery*.Chicago: The Oak Press, 1926

[123]MULLIKEN J.B. *"Biographical sketch of Charles Conrad Miller, "featural surgeon"."* Plast Reconstr Surg 59:175–184, (1977).

[124]PITANGUY I., *"Trochanteric lipodystrophy."* Plast Reconstr Surg 34:280-286, (1964).

[125]ELLENBOGEN, R. *Fat transfer: Current use in practice*. Clin. Plast. Surg. 27: 545, 2000.

[126]ELLENBOGEN, R., MOTYKIE, G., YOUN, A., ET AL. *Facial reshaping using less invasive methods.* Aesthetic Surg. J. 25: 144, 2005.

[127]COLEMAN, S. *R. Hand rejuvenation with structural fat grafting.* Plast. Reconstr. Surg. 110: 1731, 2002.

[128]COLEMAN, S. R. *Structural Fat Grafting*. St. Louis: Quality Medical, 2004.

[129]FISCHER A., FISCHER G., *"First surgical treatment for molding body's cellulite with three 5 mm incisions."* Bull Int Acad Cosmet Surg 3:35, (1976).

[130]FISCHER G., *"Liposculpture: the correct history of liposuction: part I."* J Dermatol Surg Oncol 16:1087–9, (1990).

[131]ILLOUZ YG. *The fat cell "graft": a new technique to fill depressions*. Plast Reconstr Surg. 1986 Jul;78(1):122-3.

[132]ILLOUZ YG. Present results of fat injection. Aesthetic Plast Surg. 1988 Aug;12(3):175-81.

[133]FOURNIER P. *Liposculpture/Ma technique.* 2e edition Paris: Arnette:1996.

[134]KUCERA IJ, LAMBERT TJ, KLEIN JA, WATKINS RG, HOOVER JM, KAYE AD. Liposuction: contemporary issues for the anesthesiologist. J Clin Anesth. 2006 Aug;18(5):379-87.

[135]JAYASHREE V, MYSORE V. *Microcannular tumescent liposuction.* Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2007 Nov-Dec;73(6):377-83.

[136]NARINS R., *"History and development of tumescent liposuction, chapter 1, pp 1-9."* New York, NY, Marcel Dekker Inc., (2003).

[137]*"History of liposuction."* Available at: http://www.Liposuction.com

[138]KLEIN J.A., *"The tumescent technique for liposuction surgery."* Amer J Cosm Surg: 4:263-267, (1987).

[139]OSTAD A., KAGEYAMA N., MOY R.L., ET AL, "Tumescent anesthesia with a dose of 55 mg/kg is safe for liposuction." Dermatol Surg 22:921-927, (1996).

[140]BUTTERWICK KJ, GOLDMAN MP, SRIPRACHYA-ANUNT S. *Lidocaine levels during the first two hours of infiltration of dilute anesthetic solution for tumescent liposuction: rapid versus slow delivery.* Dermatol Surg 1999;25:681- 5.

[141]KLEIN JA. *Tumescent technique for regional anesthesia permits lidocaine doses of 35 mg/kg for liposuction.* J Dermatol Surg Oncol. 1990 Mar;16(3):248-63

[142]KLEIN JA. *Anesthetic formulations of tumescent solutions.* Dermatol Clin 1999;17:751- 9.

[143]ERSEK, R. A. *Transplantation of purified autologous fat: A 3-year follow-up is disappointing.* Plast. Reconstr. Surg. 87: 219, 1991.

[144]CARRAWAY, J. H., MELLOW, C. G. *Syringe aspiration and fat concentration: A simple technique for autologous fat injection.* Ann. Plast. Surg. 24: 293, 1990.

[145]FOURNIER, P. F. *Liposculpture: The Syringe Technique*. Paris: Arnette-Blackwell, 1991.

[146]PINSKI, K.S., ROENIGK, H.H. *Autologous fat transplantation: Long-term follow-up.* J. Dermatol. Surg. Oncol. 18: 179, 1992.

[147]COLEMAN S.R., *"Facial recontouring with lipostructure."* Clin Plast Surg. Apr;24(2):347-67, (1997).

[148]ERSEK, R. A., CHANG, P., AND SALISBURY, M. A. *Lipo layering of autologous fat: An improved technique with promising results.* Plast Reconstr. Surg. 101: 820, 1998.

[149]GARCIA-OLMO D., GARCIA-ARRANZ M., HERREROS D., PASCUAL I., PEIRO C., RODRIGUEZ-MONTES J.A., *"A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation."* Dis Colon Rectum 48:1416–1423, (2005).

[150]MOSELEY T.A., ZHU M., HEDRICK M.H., *"Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery."* Plast Reconstr Surg 118(3 Suppl):121S–128S, (2006).

[151]RIGOTTI G., MARCHI A., GALIÈ M., SBARBATI A., *"Adipose-derived stem-cell therapy in radiation: side effects."* Presented at the Seventeenth annual meeting of the European Association of Plastic Surgeons (EURAPS), Instanbul, May (2006).

[152]KOTARO YOSHIMURA, KATSUJIRO SATO, DAISUKE MATSUMOTO, *"Cell-Assisted Lipotransfer for Breast Augmentation: Grafting of Progenitor-Enriched Fat Tissue"*, Autologous Fat Transfer pp 261-271 (2010).

[153]MATSUMOTO D., SATO K., GONDA K., TAKAKI Y., SHIGEURA T., SATO T., AIBA-KOJIMA E., IIZUKA F., INOUE K., SUGA H., YOSHIMURA K. *"Cell-Assisted Lipotransfer: Supportive Use of Human Adipose-Derived Cells for Soft Tissue Augmentation with Lipoinjection",* Tissue Engineering. December 12(12): 3375-3382 , (2006)

[154]YOSHIMURA K., SUGA H., ETO H., *"Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation."*, Regen Med Mar;4(2):265-73, (2009).

[155]YOSHIMURA K, SATO K, AOI N, KURITA M, INOUE K, SUGA H ET AL *"Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells."* Dermatol Surg 34: 1178–1185, (2008).

[156]YOSHIMURA K, ASANO Y, AOI N, ET AL. *Progenitor-enriched adipose tissue transplantation as rescue for breast implant complications.* Breast J. 2010;16:169–175.

[157]FLYNN T.C., COLEMAN W.P. II, FIELD L.M., KLEIN J.A, HANKE C.W. *"History of Liposuction"*, Dermatol Surg 26:515–520, (2000).

[158]AHERN R.W. M.D. M.P.H. *"The History of Liposuction"*, Volume 28, Issue 4, Pages 208–211, December, (2009).

[159]COLEMAN WP III, *"The history of liposuction and fat transplantation in America."* Dermatol Clin 17:723-727, (1999).

[160]SHIFFMAN M.A., *"Autologous Fat Transfer: Art, Science, and Clinical Practice."* Book, Springer, Jan 1, (2010).

[161]COLEMAN, S. R., *"Structural fat grafting: More than a permanent filler."* Plast. Reconstr. Surg. 118:108S–120S; (2006.)

[162] www.agapemedical.com

[163]SERRA-RENOM JM, MUÑOZ-OLMO JL, SERRA-MESTRE JM. *Fat grafting in postmastectomy breast reconstruction with expanders and prostheses in patients who have received radiotherapy: formation of new subcutaneous tissue.* Plast Reconstr Surg. 2010 Jan;125(1):12-8.

[164]KIM I.H., YANG J.D., LEE D.G., CHUNG H.Y., CHO B.C., LEE D.G., CHUNG H.Y. *"Evaluation of centrifugation technique and effect of epinephrine on fat cell viability in autologous fat injection."* Aesthet. Surg. J. 29, 35–39, (2009).

[165]SHOSHANI O., BERGER J., FODOR L., RAMON Y., SHUPAK A., KEHAT I., GILHAR A., ULLMANN Y., *"The effect of lidocaine and adrenaline on the viability of injected adipose tissue--an experimental study in nude mice."* J Drugs Dermatol. May-Jun;4(3):311-6, (2005).

[166]JEEVAN R., DHITAL SK. A novel technique for harvesting autologous fat prior to its transfer. J Plast Rec Aesthetic Surg 2012 Dec 65(12):e359-60.

[167]SASAKI GH. *Water-assisted liposuction for body contouring and lipoharvesting: safety and efficacy in 41 consecutive patients.* Aesthet Surg J. 2011 Jan;31(1):76-88

[168]ARACO A., GRAVANTE G., ARACO F., DELOGU D., CERVELLI V. *Comparison of power water--assisted and traditional liposuction: a prospective randomized trial of postoperative pain.* Aesthetic Plast Surg. 2007 May-Jun;31(3):259-65.

[169]HEROLD C., UTZ P., PFLAUM M. ET AL. *Negative pressure of manual liposuction with Coleman technique is highly dependent on the position of plunger of the syringe.*" J Plast Reconstr Aesthet Surg 2012 Jul; 65(7): 983-4.

[170]GALIÈ M., PIGNATTI M, SCAMBI I, SBARBATI A, RIGOTTI G. *Comparison of different centrifugation protocols for the best yield of adipose-derived stromal cells from lipoaspirates.* Plast Reconstr Surg. 2008 Dec;122(6):233e-234e.

[171]KURITA M., MATSUMOTO D., SHIGEURA T., SATO K., GONDA K., HARII K. ET AL *"Influences of centrifugation on cells and tissues in liposuction aspirates: optimized centrifugation for lipotransfer and cell isolation."* Plast Reconstr Surg 121:1033–1041 discussion 42–43, (2008).

[172]TABIT C.J., SLACK G.C., FAN K., WAN D.C., BRADLEY J.P. *"Fat Grafting Versus Adipose-Derived Stem Cell Therapy: Distinguishing Indications, Techniques, and Outcomes."* Aesth Plast Surg 36:704–713 (2012).

[173]SOMMER, B. SATTLER, G., *"Current concepts of fat graft survival: Histology of aspirated adipose tissue and review of the literature."* Dermatol. Surg. 26:1159–1166; (2000).

[174]MOSELEY TA, ZHU M, HEDRICK MH. *Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery.* Plast Reconstr Surg. 2006 Sep;118(3 Suppl):121S-128S.

[175]SMITH P, ADAMS WP JR, LIPSCHITZ AH, CHAU B, SOROKIN E, ROHRICH RJ, BROWN SA. *Autologous human fat grafting: effect of harvesting and preparation techniques on adipocyte graft survival.*Plast Reconstr Surg. 2006 May;117(6):1836-44.

[176]KARACALAR A., ORAK I., KAPLAN S., YILDIRIM S. *No-touch technique for autologous fat harvesting.* Aesth Plast Surg 28:158-164,2004.

[177]NEUHOF H. , HIRSHFELD S., *"The Transplantation of Tissues"*, (1923).

[178]PEER L. A. *"Cell survival theory versus replacement theory."* Plast. Reconstr. Surg. 16:161–168; (1955).

[179]PEER L. A. *Loss of weight and volume in human fat grafts.* Plast. Reconstr. Surg. 5: 217, 1950.

[180]PEER, L. A., WALKER, J. C. *The behavior of autogenous human tissue grafts: II.* Plast. Reconstr. Surg. 7: 73, 1951.

[181]HAR-SHAI, Y., LINDENBAUM, E. S., GAMLIEL-LAZAROVICH, A., BEACH, D., AND HIRSHOWITZ, B. *An integrated approach for increasing the survival of autologous fat grafts in the treatment of contour defects.* Plast. Reconstr. Surg. 104: 945, 1999.

[182]YAMAGUCHI, M., MATSUMOTO, F., BUJO, H., ET AL. *Revascularization determines volume retention and gene expression by fat grafts in mice.* Exp. Biol. Med. (Maywood) 230: 742, 2005.

[183]CARPANEDA, C. A., AND RIBEIRO, M. T. *Percentage of graft viability versus injected volume in adipose autotransplants.* Aesthetic Plast. Surg. 18: 17, 1994.

[184]DEL VECCHIO D, ROHRICH RJ. *A classification of clinical fat grafting: different problems, different solutions.* Plast Reconstr Surg. 2012;130(3):511-22.

[185]Chan CW, Mcculley SJ, Macmillan RD. Autologous fat transfer--a review of the literature with a focus on breast cancer surgery. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2008;61(12):1438-48.

[186]Eto H, Kato H, Suga H, et al. The fate of adipocytes after nonvascularized fat grafting: evidence of early death and replacement of adipocytes. Plast Reconstr surg. 2012;129(5):1081-92

[187]SMAHEL J., *"Experimental implantation of adipose tissue fragments."* Br. J. Plast. Surg. 42:207–211; (1989).

[188]COLEMAN S. R. *"Structural fat grafts"*. Clin. Plast. Surg. 28:111–119, (2001).

[189]STILLAERT F., FINDLAY M., PALMER J., IDRIZI R., CHEANY S., MESSINA A., ABBERTON K., MORRISON W., THOMPSON E. W., *"Host rather than graft origin of Matrigel-induced adipose tissue in the murine tissue-engineering chamber."* Tissue Eng. 13:2291–2300; (2007).

[190]SUGA H,ETO H,AOI N,ET AL. *Adipose tissue remodeling under ischemia: Death of adipocytes and activation of stem/progenitor cells.* Plast Reconstr Surg. 2010;126:1911–1923.

[191]VERSEIJDEN F., POSTHUMUS-VAN SLUIJS S.J., VAN NECK J.W., HOFER S.O., HOVIUS S.E., VAN OSCH G.J. *"Vascularization of prevascularized and non-prevascularized fibrin-based human adipose tissue constructs after implantation in nude mice."* Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine Volume 6, Issue 3, pages 169–178, March, (2012).

[192]ZHU M, ZHOU Z, CHEN Y, SCHREIBER R, RANSOM JT, FRASER JK ET AL.*"Supplementation of fat grafts with adipose-derived regenerative cells improves long-term graft retention."* Ann. Plast. Surg. 64, 222–228, (2010).

[193]ZHENG DN, LI QF, LEI H, ZHENG SW, XIE YZ, XU QH, YUN X, PU LL. *Autologous fat grafting to the breast for cosmetic enhancement: experience in 66 patients with long-term follow up.* J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2008 Jul;61(7):792-8.

[194]LAZZARO L, CALABRESE S, BELTRAMI A.P. ET AL. *"Mesenchymal adipose stem cell: evaluation of the influence of different techniques of liposuction and cell processing on stem cells yield and histological characteristics, and clinical results"* BBM 2013 Free paper session.

[195]STERODIMAS A., DE FARIA J., NICARETTA B., PAPADOPOULOS O., PAPALAMBROS E., ILLOUZ Y.G. *"Cell-assisted lipotransfer."* Aesthet. Surg. J. 30, 78–81,(2010).

[196]ROHRICH R., SOROKIN E., BROWN S., *"In search of improved fat transfer viability: a quantitative analysis of the role of centrifugation and harvest site."* Plast. Reconstr. Surg. 113, 392–395, (2004).

[197]JURGENS W., OEDAYRAJSINGH-VARMA M., HELDER M.N., ZANDIEHDOULABI B., SCHOUTEN T.E., KUIK D.J. ET AL. *"Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies."* Cell Tissue Res. 332, 415–426, (2008).

[198]SCHIPPER B.M., MARRA K.G., ZHANG W., ET AL. *"Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells."* Ann Plast Surg May;60:538e44, (2008).

[199]OEDAYRAJSINGH-VARMA M.J., VAN HAM S.M., KNIPPENBERG M., HELDER M.N., KLEIN-NULEND J., SCHOUTEN T.E. ET AL. *"Adipose tissue derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue harvesting procedure."* Cytotherapy 8, 166–177, (2006).

[200]A. WILSON, P. E. BUTLER AND A. M. SEIFALIAN, *"Adipose-derived stem cells for clinical applications: a review."* Cell Prolif., 44, 86–98. (2011).

[201]BRAYFIELD C, MARRA K, RUBIN JP. *Adipose stem cells for soft tissue regeneration.* Handchir Mikrochir Plast Chir. 2010;42:124–128.

[202]CHAJCHIR A, BENZAQUEN I, WEXLER E, ARELLANO A. *Fat injection.* Aesthetic Plast Surg. 1990;14:127–136.

[203]YOSHIMURA K, ASANO Y. FAT INJECTION TO THE BREASTS: *Cosmetic augmentation, implant replacement, inborn deformity, and reconstruction after mastectomy.* In: Hall-Findlay EJ, Evans GRD, eds. Aesthetic and Reconstructive Surgery of the Breast. Lon- don: Elsevier; 2008:405–420.

[204] CHOI M, SMALL K, LEVOVITZ C, ET AL. The *volumetric analysis of fat graft survival in breast reconstruction.* Plast Reconstr Surg 2013 Feb; 131(2) :185-91.

[205] CONDÉ-GREEN A, DE AMORIM NF, PITANGUY I. *Influence of decantation, washing and centrifugation on adipocyte and mesenchymal stem cell content of aspirated adipose tissue: a comparative study.* J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2010 Aug;63(8):1375-81

[206]RODRIGUEZ RL, CONDÈ-GREEN A *"Quantification of a negative pressures generated by syringes of different calibres used for liposuction."* Plast Reconstr Surg 2012; 130(2):383-4e.

[207]TAMBASCO D, ARENA V, GRUSSU F, CERVELLI D. *Adipocyte damage in relation to different pressures generated during manual lipoaspiration with a syringe.* Plast Reconstr Surg 2013; 131 (4):645e-6e

[208]NGUYEN, A., PASYK, K. A., BOUVIER, T. N., HASSETT, C. A., ARGENTA, L. C. *Comparative study of survival of autologous adipos tissue taken and transplanted by different techniques. Plast. Reconstr. Surg.* 85: 378, 1990.

[209]OREFFO, R. O., BORD, S., AND TRIFFITT, J. T. *Skeletal progenitor cells and ageing human populations.* Clin. Sci. (Lond.) 94: 549,1998.

[210]BIRCOLL M. *Cosmetic breast augmentation utilizing autologous fat and liposuction techniques.* Plast Reconstr Surg. 1987 Feb;79(2):267-71

[211]CRAFT RO, ROPHAEL J, MORRISON WA, VASHI AV, MITCHELL GM, PENINGTON AJ. *Effect of local, long-term delivery of platelet-derived growth factor (PDGF) on injected fat graft survival in severe combined immunodeficient (SCID) mice.* J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2009;62(2):235-43.

[212]WANG Y, ZHAO L, HANTASH BM. *Support of human adipose-derived mesenchymal stem cell multipotency by a poloxamer-octapeptide hybrid hydrogel.* Biomaterials. 2010;31(19):5122

[213]YI CG, XIA W, ZHANG LX, ZHEN Y, SHU MG, HAN Y, GUO SZ. *VEGF gene therapy for the survival of transplanted fat tissue inmnude mice.* J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2007;60(3):272-8.

[214]SHOSHANI O, LIVNE E, ARMONI M, SHUPAK A, BERGER J, RAMON Y, FODOR L, GILHAR A, PELED IJ, ULLMANN Y. *The effect of interleukin-8 on the viability of injected adipose tissue in nude mice.* Plast Reconstr Surg. 2005 Mar;115(3):853-9.

[215]KARAÇAL N, COBANOĞLU U, AMBARCIOĞLU O, KUTLU N. *The effect of fibrin glue on fat graft survival. J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2007;60(3):300-3.

[216]TAMURA E, FUKUDA H, TABATA Y. *Adipose tissue formation in response to basic fibroblast growth factor. Acta Otolaryngol.* 2007;127(12):1327-31.

[217]Oh DS, Cheon YW, Jeon YR, Lew DH. *Activated platelet-rich plasma improves fat graft survival in nude MICE: a pilot study.* Dermatol Surg. 2011;37(5):619-25.

[218]MENSCHIK Z. *Vitamin E and adipose tissue.* Edinburgh Med J 1944;51:486– 489.

[219]PIRES FRAGA MF, NISHIO RT, ISHIKAWA RS, PERIN LF, HELENE A, MALHEIROS CA. *Increased survival of free fat grafts with platelet-rich plasma in rabbits.* J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2010;63(12):e818-22.

[220]NAKAMURA S, ISHIHARA M, TAKIKAWA M, ET AL. *Platelet-rich plasma (PRP) promotes survival of fat-grafts in rats.* Ann Plast Surg. 2010;65(1):101-6.

[221]GENTILE P, DI PASQUALI C, BOCCHINI I, ET AL. *Breast reconstruction with autologous fat graft mixed with platelet-rich plasma.* Surg Innov. 2013;20(4):370-6

[222]SALGARELLO M., VISCONTI G., RUSCIANI A. *Breast fat grafting with platelet-rich plasma: a comparative clinical study and current state of the art.* Plast Reconstr Surg. 2011 Jun;127(6):2176-85.

[223]GIMBLE JM. *Adipose tissue-derived therapeutics.* Expert Opin Biol Ther. 2003;3:705-713.

[224]STREM BM. HICOK KC. ZHU M. WULUR I. ALFONSO Z. SCHREIBER RE. FRASER JK. HEDRICK MH. *Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells.* Keio J Med. 2005;54:132–41.

[225]PERONI D, SCAMBI I, PASINI A, LISI V, BIFARI F, KRAMPERA M, RIGOTTI G, SBARBATI A, GALIÈ M. *Stem molecular signature of adipose-derived stromal cells*. Exp Cell Res. 2008 Feb 1;314(3):603-15. Epub 2007 Oct 17

[226]PU LL, COLEMAN SR, CUI X, FERGUSON RE, VASCONEZ HC. *Autologous fat grafts harvested and refined by the Coleman technique: a comparative study.* Plast Reconstr Surg. 2008;122(3):932-7.

[227]STREM BM, HEDRICK MH. *The growing importance of fat in regenerative medicine.* Trends Biotechnol. 2005;23(2):64-6.

[228]RYU HH, LIM JH, BYEON YE, ET AL. *Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury.* J Vet Sci. 2009;10(4):273-84.

[229]CAI L, JOHNSTONE BH, COOK TG, ET AL. *IFATS collection: Human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function.* Stem Cells. 2009;27(1):230-7.

[230]REHMAN J, TRAKTUEV D, LI J, ET AL. *Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells.* Circulation. 2004;109(10):1292-8.

[231]SADAT S, GEHMERT S, SONG YH, ET AL. *The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF.* Biochem Biophys Res Commun. 2007;363(3):674-9.

[232]PELTONIEMI HH, SALMI A, MIETTINEN S, ET AL. *Stem cell enrichment does not warrant a higher graft survival in lipofilling of the breast: A prospective comparative study.* J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2013

[233]VON HEIMBURG, D., HEMMRICH, K., HAYDARLIOGLU, S., ET AL. *Comparison of viable cell yield from excised versus aspirated adipose tissue*. Cells Tissues Organs 178: 87, 2004.

[234]PERONI D, SCAMBI I, PASINI A, LISI V, BIFARI F, KRAMPERA M, RIGOTTI G, SBARBATI A, GALIÈ M. *Stem molecular signature of adipose-derived stromal cells.* Exp Cell Res. 2008 Feb 1;314(3):603-15. Epub 2007 Oct 17.

[235]PATRICK CW, ZHENG B, JOHNSTON C, REECE GP. *Long-term implantation of preadipocyte-seeded PLGA scaffolds.* Tissue Eng. 2002;8(2):283-93.

[236]PATRICK CW, CHAUVIN PB, HOBLEY J, REECE GP. *Preadipocyte seeded PLGA scaffolds for adipose tissue engineering.* Tissue Eng. 1999;5(2):139-51

[237]VON HEIMBURG D, ZACHARIAH S, LOW A, PALLUA N. *Influence of different biodegradable carriers on the in vivo behavior of human adipose precursor cells.* Plast Reconstr Surg. 2001;108(2):411-20

[238]HUSS, F. R., AND KRATZ, G. *Adipose tissue processed for lipoinjection shows increased cellular survival in vitro when tissue engineering principles are applied*. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg. 36: 166, 2002.

[239]MASUDA T, FURUE M, MATSUDA T. *Novel strategy for soft tissue augmentation based on transplantation of fragmented omentum and preadipocytes*. Tissue Eng 2004;10(11–12):1672–8

[240]BURG KJ, BOLAND T. *Minimally invasive tissue engineering composites and cell printing.* IEEE Eng Med Biol Mag 2003;22(5):84–91

[241]VON HEIMBURG D, SEROV G, OEPEN T, PALLUA N. *Fat tissue engineering.* In: Ashammakhi N, Ferretti P, editors. Topics in Tissue Engineering. 2003

[242]HALBLEIB M, SKURK T, DE LUCA C, VON HEIMBURG D, HAUNER H. *Tissue engineering of white adipose tissue using hyaluronic acidbased scaffolds*. I: in vitro differentiation of human adipocyte precursor cells on scaffolds. Biomaterials 2003;24(18):3125–32

[243]DOLDERER JH, MEDVED F, HAAS RM, SIEGEL-AXEL DI, SCHILLER SM, SCHALLER HE. *Angiogenesis and vascularisation in adipose tissue engineering.* Handchir Mikrochir Plast Chir. 2013;45(2):99-107.

[244]STERODIMAS A, DE FARIA J, NICARETTA B, PITANGUY I. *Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications.* J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2010;63(11):1886-92.

[245]BUTALA P, HAZEN A, SZPALSKI C, SULTAN SM, COLEMAN SR, WARREN SM. *Endogenous stem cell therapy enhances fat graft survival.* Plast Reconstr Surg. 2012;130(2):293-306.

[246]ALLEN RJ, CANIZARES O, SCHARF C, ET AL. *Spinning into control: Centrifugation creates an optimal density for fat grafting*. Plast Reconstr Surg. 2009;124:35S–36S.

[247]DEL VECCHIO DA. *Grading lipoaspirate: is there an optimal density for fat grafting?* Plast Reconstr Surg. 2013;131(4):637e-9e.

[248]YOSHIMURA K, SHIGEURA T, MATSUMOTO D, ET AL. *Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates.* J Cell Physiol. 2006;208(1):64-76.

[249]PÉREZ-CANO R, VRANCKX JJ, LASSO JM, ET AL. *Prospective trial of adipose-derived regenerative cell (ADRC)-enriched fat grafting for partial mastectomy defects: the RESTORE-2 trial.* Eur J Surg Oncol. 2012;38(5):382-9.

[250]AKITA S, AKINO K, HIRANO A, OHTSURU A, YAMASHITA S. *Noncultured autologous adipose-derived stem cells therapy for chronic radiation injury.* Stem Cells Int. 2010;2010:532704.

[251]MISSANA MC, LAURENT I, BARREAU L, BALLEYGUIER C. *Autologous fat transfer in reconstructive breast surgery : Indications, technique and results.* Eur J Surg Oncol Aug;33(6):685-90, 2007

[252]LALONDE L, DAVID J, TROP I. *Magnetic resonance imaging of the breast: current indications.* Can Assoc Radiol J. 2005 Dec;56(5):301-8.

[253]KURTZ B, ACHTEN C, AUDRETSCH W, REZAI M, ZOCHOLL G. *MR mammography of fatty tissue necrosis.* Rofo Fortschr Geb Rontgenstr Neuen Bildgeb Verfahr 165:359-63, 1996

[254]KRAMER S, SCHULZ-WENDTLAND R, HAGEDORN K, BAUTZ W, LANG N. *Magnetic Resonance imaging in the diagnosis of local recurrence in breast cancer.* Anticancer Res 18:2159-61, 1988

[255]KRUMBOECK A, GIOVANOLI P, PLOCK JA. *Fat grafting and stem cell enhanced fat grafting to the breast under oncological aspects - Recommendations for patient selection.* Breast. 2013;22(5):579-84

[256]PELTRONIEMOI HH. *"Stem cell enrichment does not warrant a higer graft serviva".* JPRAS 2013 66: 1494-1503

[257]SFdCPRe Estetique. FAQ - *recommandation concernant les injections de grasse dans le sein 2008*.

[258]KUCEROVA L, KOVACOVICOVA M, POLAK S, ET AL. *Interaction of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells with breast cancer cells.* Neoplasma. 2011;58(5):361-70.

[259]CHAMRAS H, BAGGA D, ELSTNER E, SETOODEH K, KOEFFLER HP, HEBER D. *Preadipocytes stimulate breast cancer cell growth.* Nutr Cancer. 1998;32(2):59-63.

[260]KANG H, WATKINS G, PARR C, DOUGLAS-JONES A, MANSEL RE, JIANG WG. *Stromal cell derived factor-1: its influence on invasiveness and migration of breast cancer cells in vitro, and its association with prognosis and survival in human breast cancer.* Breast Cancer Res. 2005;7(4):R402-10.

[261]YU JM, JUN ES, BAE YC, JUNG JS. *Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo.* Stem Cells Dev. 2008;17(3):463-73.

[262]MARTIN-PADURA I, GREGATO G, MARIGHETTI 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(1):325-34.

[263]ZIMMERLIN L, DONNENBERG AD, RUBIN JP, BASSE P, LANDRENEAU RJ, DONNENBERG VS. *Regenerative therapy and cancer: in vitro and in vivo studies of the interaction between adipose-derived stem cells and breast cancer cells from clinical isolates*. Tissue Eng Part A. 2011;17(1-2):93-106.

[264]QIAO L, XU Z, ZHAO T, ET AL. *Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model.* Cell Res. 2008;18(4):500-7.

[265]QIAO L, ZHAO TJ, WANG FZ, SHAN CL, YE LH, ZHANG XD. *NF-kappaB downregulation may be involved the depression of tumor cell proliferation mediated by human mesenchymal stem cells.* Acta Pharmacol Sin. 2008;29(3):333-40.

[266]COLEMAN SR, SABOEIRO AP. *Fat grafting to the breast revisited: safety and efficacy.* Plast Reconstr Surg. 2007;119:775-85.

[267]PULAGAM SR, POULTON T, MAMOUNAS EP. *Long-term clinical and radiologic results with autologous fat transplantation for breast augmentation: case reports and review of the literature.* Breast J. 2006;12(1):63-5.

[268]PEARL RA, LEEDHAM SJ, PACIFICO MD. *The safety of autologous fat transfer in breast cancer: lessons from stem cell biology.* J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2012;65(3):283-8.

[269]SAINT-CYR M, ROJAS K, COLOHAN S, BROWN S. *The role of fat grafting in reconstructive and cosmetic breast surgery: a review of the literature.* J Reconstr Microsurg. 2012;28(2):99-110.

[270]KHOURI R, DEL VECCHIO D. *Breast reconstruction and augmentation using pre-expansion and autologous fat transplantation*. Clin Plast Surg. 2009;36(2):269-80, viii.

[271]KHOURI RK, EISENMANN-KLEIN M, CARDOSO E, COOLEY BC, KACHER D, GOMBOS E, BAKER TJ. *Brava and autologous fat transfer is a safe and effective breast augmentation alternative: results of a 6-year, 81-patient, prospective multicenter study*. Plast Reconstr Surg. 2012 May;129(5):1173-87

[272]RIGOTTI G, MARCHI A, MICCIOLO R, BARONI G., *Autologous fat grafting in breast cancer patients*. Breast. 2012 Oct;21(5):690.

[273]RIGOTTI G, MARCHI A, STRINGHINI P, BARONI G, GALIÈ 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 Aug;34(4):475-80.

[274]GUTOWSKI KA. *Current applications and safety of autologous fat grafts: a report of the ASPS fat graft task force*. Plast Reconstr Surg. 2009;124:272-80.

[275]KRUMBOECK A, GIOVANOLI P, PLOCK JA. *Fat grafting and stem cell enhanced fat grafting to the breast under oncological aspects - Recommendations for patient selection.* Breast. 2013;22(5):579-84.

[276]SEMPRINI G, CATTIN F, LAZZARO L, CEDOLINI C, PARODI PC. *About locoregional recurrence risk after lipofilling in breast cancer patients.* Ann Oncol. 2012;23(3):802-3.

[277]Direttiva sui farmaci 2001/83/EC, implementata in Italia con il "Codice Comunitario del farmaco"

[278] Legge 21/10/2005 n. 219. Nuova disciplina delle attività trasfusionali e della produzione nazionale degli emoderivati.

[279]Direttiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 31.03.2004 sulla definizione di norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani, attuata col Decreto Legislativo n. 191 del 6/11/2007.

[280]Direttiva 2006/86/CE della Commissione, del 24/9/2006, che attua la direttiva 2004/23/CE del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le prescrizioni in tema di rintracciabilità, la notifica di reazioni ed eventi avversi gravi e determinate prescrizioni tecniche per la codifica, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani - Pubblicato nella Legge n. 294 del 25/10/2006.

[281]Direttiva 2006/17/CE della Commissione, del 8/2/2006, che attua la direttiva 2004/23/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, Legge n. 38 del 9/2/2006.

[282]Decreto legislativo 25/1/2010 , n. 16. Attuazione delle direttive 2006/17/CE e 2006/86/CE, in attuazione direttiva 2004/23/CE.

[283]ZUK PA, ZHU M, MIZUNO H, ET AL. *Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies.* Tissue Eng. 2001;7:211–228.

[284]ZUK PA, ZHU M, ASHJIAN P, ET AL. *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.* Mol Biol Cell. 2002;13:4279– 4295.

[285]Decreto legislativo n°211 del 24/6/2003, G.U. n°184 del 9/8/2003

[286]FIORENTINO S. Aspetti giuridici ed operativi sull'uso dei biomateriali in Chirurgia Plastica. "Innovazioni in Chirurgia Plastica. Nuovi lembi e chirurgia rigenerativa"; Senigallia 31/5/2013.

[287] http://www.cytori.com

[288] http://www.medikanint.com/lipokit

[289]RIGOTTI G, MARCHI A, SBARBATI A. *Adipose-derived mesenchymal stem cells: past, present, and future.* Aesthetic Plast Surg. 2009 May;33(3):271-3. doi: 10.1007/s00266-009-9339-7.

[290]MOLLOY AP, MARTIN FT, DWYER RM, GRIFFIN TP, MURPHY M, BARRY FP, O'BRIEN T, KERIN MJ. *Mesenchymal stem cell secretion of chemokines during differentiation into osteoblasts, and their*

potential role in mediating interactions with breast cancer cells. Int J Cancer. 2009 Jan 15;124(2):326-32.

[291]YU JM, JUN ES, BAE YC, JUNG JS. *Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo.* Stem Cells Dev. 2008 Jun;17(3):463-73.

[292]KARNOUB AE, DASH AB, VO AP, SULLIVAN A, BROOKS MW, BELL GW, RICHARDSON AL, POLYAK K, TUBO R, WEINBERG RA. *Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis.* Nature. 2007 Oct 4;449(7162):557-63.

[293]QIAO L, XU Z, ZHAO T, ZHAO Z, SHI M, ZHAO RC, YE L, ZHANG X. *Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model.* Cell Res. 2008 Apr;18(4):500-7

[294]BERGAMIN N, DARDIS A, BELTRAMI A, ET AL. *A human neuronal model of Niemann Pick C disease developed from stem cells isolated from patient's skin.* Orphanet J Rare Dis. 2013;8:34.

[295]OTSU K, DAS S, HOUSER SD, QUADRI SK, BHATTACHARYA S, BHATTACHARYA J. *Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells.* Blood. 2009 Apr 30;113(18):4197-205. doi: 10.1182/blood-2008-09-176198. Epub 2008 Nov 25.

[296]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 Sep-Oct;29(5):360-76.

[297]LILOUZ YG, STERODIMAS A. *Autologous fat transplantation to the breast: a personal technique with 25 years of experience.* Aesthetic Plast Surg. 2009 Sep;33(5):706-15.

[298]PETIT JY, LOHSIRIWAT V, CLOUGH KB, SARFATI I, IHRAI T, RIETJENS M, VERONESI P, ROSSETTO F, SCEVOLA A, DELAY E. *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 Reconstr Surg. 2011 Aug;128(2):341-6.

[299]WANG H, JIANG Y, MENG H ET AL. *"Sonographic assessment on breast augmentation after autologous fat graft"* Plas Rec Surg 2008;122 36e-38e

[300]COSTANTINI M, CIPRIANI A, BELLI P, BUFI E, FUBELLI R, VISCONTI G, SALGARELLOM, BONOMO L. *Radiological findings in mammary autologous fat injections: a multi-technique evaluation.* Clin Radiol. 2013 Jan;68(1):27-33.