Title Page

Titolo: Innesto adiposo arricchito e lipostruttura tradizionele: metodiche a confronto in 27 casi di ricostruzione mammaria post oncologica.

Autore: Dr. Marcelli Stefano, Prof. Dr. Parodi Pier Camillo, Prof. Dr. Vaienti Luca.

Sede di svolgimento del lavoro: Dipartimento di Chirurgia Plastica dell' Ospedale "S.Michele", Gemona del Friuli. Direttore Prof. Pier Camillo Parodi

Abstract

L'innesto di tessuto adiposo è stato, nell'ultimo ventennio tra le innovazioni più studiate e sviluppate nell'ambito della Chirurgia Plastica. L'importante scoperta delle cellule staminali adipose (ASCs) e della loro capacità rigenerativa ha inoltre stimolato l'interesse di molti ricercatori e clinici internazionali appartenenti a varie aree mediche. In Chirurgia Plastica un'attuale applicazione delle ASCs a scopo rigenerativo è il loro utilizzo nel tentativo di migliorare l'attecchimento degli innesti di tessuto adiposo; tuttavia tale metodica necessita ancora di significative indagini prima di poter essere applicata in modo standardizzato nella pratica clinica.

L'obbiettivo principale del nostro studio è stato quello di indagare e valutare l'attecchimento del tessuto adiposo nella ricostruzione mammaria post-oncologica ottenuto distintamente tramite lipostruttura tradizionale ed innesto adiposo arricchito di ASCs con l'ausilio di metodiche enzimatiche (Cytori®/Medikhan™).

Le 27 pazienti incluse nello studio sono state divise in 2 gruppi di 15 e 12 unità omogenei per età, BMI e trattamenti post-oncologici subiti. Indagini ecografiche standardizzate preoperatorie e post operatorie a 6 mesi sono state impiegate per stabilire il grado di attecchimento dell'innesto adiposo. Teorizzando una divisione in 9 quadranti della mammella, i quadranti mammari trattati in tutte le pazienti e ritenuti validi per lo studio sono stati il supero mediale (QSM) ed il medio-mediale (QMM).
A 6 mesi dall'intervento i risultati statistici hanno evidenziato una differenza di spessore statisticamente significativa (p-*value*< 0,05) a favore dell'innesto

adiposo arricchito con p-*value*= 0,0176 per il QSM e p-*value*=0,0195 per il QMM.

Appare altresì come dato confortante per la sicurezza oncologica nell'impiego mammario delle cellule staminali e del tessuto adiposo, l'assenza di recidive di malattia nel periodo di studio indagato.

I risultati fino ad ora ottenuti sono indubbiamente incoraggianti; un ulteriore ampliamento della casistica ed una valutazione di tipo costo beneficio a trattamento terminato appaiono comunque indispensabili per confermare la validità degli studi finora condotti e stabilire in modo standardizzato il ruolo alla ricostruzione mammaria post oncologica con tessuto adiposo autologo.

INTRODUZIONE ALLO STUDIO

La patologia oncologica mammaria costituisce la più frequente forma di carcinoma invasivo nella popolazione femminile mondiale. Ogni anno 46.000 nuovi casi vengono diagnosticati in Italia e 1 donna su 8 ne è affetta nella arco della vita.[1] Nonostante un progressivo aumento dell'incidenza, i decessi legati alla patologia hanno subito una graduale discesa nel corso degli ultimi anni. La precoce individuazione di tumori in fase non avanzata costituisce la chiave di questo prezioso successo, con il raggiungimento nel 2012 di una sopravvivenza dell'87% a 5 anni.[1] Contestualmente alla diffusione dei programmi di screening e diagnosi precoce di malattia, un ruolo sempre più attivo è stato ricoperto dalla chirurgia demolitiva e ricostruttiva.

In particolare, proprio la fase ricostruttiva costituisce, in questo caso, un importante e delicato aspetto che "tocca" la paziente nel profondo della sua identità di Donna.

In questo contesto, lo sviluppo poliedrico della chirurgia ricostruttiva, ha permesso di ottenere una discreta scelta di alternative terapeutiche, ognuna con i propri vantaggi e svantaggi. Oltre alla più conosciuta ricostruzione con dispositivi protesici, un campo particolarmente interessante e prolifico è rappresentato dalla ricostruzione mammaria con tessuti autologhi: chirurgia oncoplastica, uso di lembi cutaneo/muscolari e innesto di tessuto adiposo (lipoflling o lipostuttura).

Proprio quest'ultimo, è stato negli ultimi 2 decenni l'innovazione più studiata e sviluppata nell'ambito della Chirurgia Plastica. In particolare, è stato sul finire degli anni 90', con gli studi pubblicati da Sidney Coleman, che un sempre maggior interesse si è focalizzato su una metodica che mostrava grandi potenzialità (facilità della tecnica chirurgica, minima aggressività sul sito donatore, trascurabili esiti post-chirurgici e proprietà rigenerative).

Le molteplici applicazioni della lipostruttura e i primi risultati incoraggianti, hanno spinto l'interesse scientifico verso un progressivo perfezionamento, culminato con l'identificazione istologica e lo studio delle cellule staminali adipose (ASCs).[2] L'immediata applicazione, è stato il loro utilizzo nell'arricchimento del tessuto adiposo innestato.

Inoltre, come emerge da diversi studi con lunghi follow-up oncologici, gli iniziali timori riguardo al trasferimento di un tessuto con capacità rigenerative in sede mammaria, sono stati quasi definitivamente scongiurati.[3-6]

In virtù di questa esperienza positiva e della carenza di confronti clinici diretti, è nata l'ipotesi di questo studio sperimentale nel quale è stato indagato l'effettivo vantaggio offerto dalle più recenti metodiche di arricchimento del tessuto adiposo nella ricostruzione mammaria.

Lo studio ha previsto, pertanto, il reclutamento di 2 gruppi di pazienti. Per ottenere un confronto ed una stima diretta dei possibili vantaggi delle nuove metodiche, alle pazienti trattate con innesto adiposo arricchito è stato affiancato un gruppo di controllo, trattato seguendo la tecnica tradizionale di Coleman.

Le proprietà rigenerative delle cellule staminali adipose stanno attirando attenzioni sempre maggiori da ambiti medici diversi tra loro; l'ortopedia la cardiologia e la neurologia ne sono esempio.

Appare chiaro che è solo promuovendo una continua ricerca multidisciplinare che si possano individuare i reali limiti del tessuto adiposo, momentaneamente ancora sconosciuti.

MATERIALI E METODI

Grazie alla collaborazione tra la Clinica di Chirurgia Plastica Ricostruttiva dell'Università degli Studi di Udine e la Cattedra di Chirurgia Plastica Ricostruttiva dell'Università degli studi di Milano (U.O. IRCCS "Policlinoco S.Donato"), è stato condotto uno studio, di tipo sperimentale prospettico di coorte, su una popolazione di 27 pazienti di sesso femminile, sottoposte, tra Dicembre 2011 e Marzo 2013, ad intervento di ricostruzione mammaria post-oncologica con tessuto adiposo autologo.

DESCRIZIONE CAMPIONE PAZIENTI

Ventisette pazienti di sesso femminile sono state considerate idonee all'arruolamento, come illustrato in tabella (Tab. 5.1):

- Del totale**, 25 pazienti** presentavano gli esiti di una ricostruzione mammaria protesica **post-mastectomia** (identificate dal valore "1" in colonna "mastectomia"), con riduzione dello spessore del tessuto sottocutaneo e assottigliamento del tessuto espanso. L'indagine sulla terapia adiuvante ha rivelato che 2 delle 25 pazienti sono state sottoposte a radioterapia (identificate dal valore "1" in colonna "RT/CHT"), 10 a chemioterapia (identificate dal valore "2" in colonna "RT/CHT"), 2 a radioterapia+chemioterapia (identificate dal valore "3" in colonna "RT/CHT") e le restanti 11 non hanno ricevuto nessun trattamento radio/chemioterapico (identificate dal valore "0" in colonna "RT/CHT").

- **2 pazienti** presentavano difetti di volume localizzati nel quadrante della mammella sottoposta a **chirurgia mammaria conservativa** monolaterale (identificate dal valore "1" in colonna "QUART"); entrambe le pazienti sono state sottoposte a terapia adiuvante con radioterapia associata a chemioterapia (identificate dal valore "3" in colonna "RT/CHT" della tabella).

L'età media del gruppo in studio è di 50 anni (con un range variabile da un minimo di 40 anni ad un massimo di 71 anni) con BMI medio di 23,2 (da un massimo 30 ad un minimo di 19,4). Tutte le pazienti affette da esiti di chirurgia conservativa presentavano un intervallo libero da recidiva loco-regionale o nuova malattia, di almeno 3 anni, inoltre

nessuna presentava malattie autoimmunitarie, segni di infezioni sistemiche o loco-regionali da microorganismi patogeni, diabete scompensato (HbA1>7 mg/dl), allergie all'anestetico locale ed alterazioni del profilo coagulativo.

Paziente	Età	BMI	RT o CHT	Mastectomia	QUART
B.S.	43	21,3	0	1	0
C.L.	41	21	3	0	1
D.D.	47	20,7	0	1	0
G.U.	70	23,4	0	1	0
K.G.	43	23,1	3	1	0
M.D.	45	30	2	1	0
R.V.	59	21	0	1	0
T.M.	49	20,58	0	1	0
C.G.	41	20	2	1	0
D.P.	52	30	0	1	0
F.M.	55	22,19	1	1	0
P.M.	43	20,93	2	1	0
C.A.	50	25	3	0	1
Z.M.	42	19,36	2	1	0
S.B.	44	20,4	2	1	0
Z.M.	40	22,9	1	1	0
S.W.	45	30	2	1	0
M.L.	47	23,05	0	1	0
R.L.	48	19,4	2	1	0
B.P.	49	27,8	3	1	0
P.A.	53	30,05	0	1	0
R.C.	55	22,1	2	1	0
R.M.	62	24,8	0	1	0
P.L.	67	21,7	2	1	0
C.LU.	71	20,83	0	1	0
B.F.	50	22,6	0	1	0
G.E.	50	20,2	2	1	0

Tabella 5.1- Campione di pazienti. In evidenza i principali dati presi in considerazione al momento dell'arruolamento.

Le pazienti sono state divise in 2 gruppi, rispettivamente di 12 e 15 pazienti, omogenei per età, BMI e pregresso trattamento oncologico (Tab. 5.2).

Le pazienti appartenenti al primo gruppo, costituenti la popolazione "caso" dello studio sono state sottoposte ad innesto adiposo arricchito; 8 di queste con l'utilizzo del sistema Cytori Celution® e 4 con l'utilizzo del sistema Lipokit™ Medikan.

Il secondo gruppo, composto da 15 pazienti costituisce il gruppo “controllo” dello studio, trattato con una variante della metodica tradizionale della lipostruttura descritta da Coleman nel 1995.

Pazienti Cytori Cellution®	Età	BMI	RT o CHT	Mastectomia	QUART
B.S.	43	21,3	0	1	0
C.L.	41	21	3	0	1
D.D.	47	20,7	0	1	0
G.U.	70	23,4	0	1	0
K.G.	43	23,1	3	1	0
M.D.	45	30	2	1	0
R.V.	59	21	0	1	0
T.M.	49	20,58	0	1	0
Pazienti Medikan Lipokit™	Età	BMI	RT o CHT	Mastectomia	QUART
C.G.	41	20	2	1	0
D.P.	52	30	0	1	0
F.M.	55	22,19	1	1	0
P.M.	43	20,93	2	1	0

Pazienti Lipostruttura Tradizionale	Età	BMI	RT o CHT	Mastectomia	QUART
C.A.	50	25	3	0	1
Z.M.	42	19,36	2	1	0
S.B.	44	20,4	2	1	0
Z.M.	40	22,9	1	1	0
S.W.	45	30	2	1	0
M.L.	47	23,05	0	1	0
R.L.	48	19,4	2	1	0
B.P.	49	27,8	3	1	0
P.A.	53	30	0	1	0
R.C.	55	22,1	2	1	0
R.M.	62	24,8	0	1	0
P.L.	67	21,7	2	1	0
C.LU.	71	20,83	0	1	0
B.F.	50	22,6	0	1	0
G.E.	50	20,2	2	1	0

Tabella 5.2- Divisione in gruppi del campione di pazienti arruolato sulla base delle metodiche di trattamento impiegate, caratteristiche delle popolazioni a confronto.

MATERIALI

SISTEMA CELUTION® 800/CRS

Il 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 nel 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 Celase™ 835/CRS un composto di collagenasi altamente purificate.

La procedura di arricchimento con questa metodica prevede che metà del lipoaspirato sia utilizzata per l'estrazione della frazione vascolo-stromale (contenete le ASCs) attraverso l'azione enzimatica 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 (Fig.5.1). Il prodotto finale del processo è costituito da una soluzione liquida di 5ml ad alto contenuto di cellule staminali, questa quantità è indipendente dal volume di tessuto adiposo processato. Al contrario la concentrazione delle ASCs nei 5ml è maggiore all'aumentare del volume di lipoaspirato utilizzato.

Figura 5.1 -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.

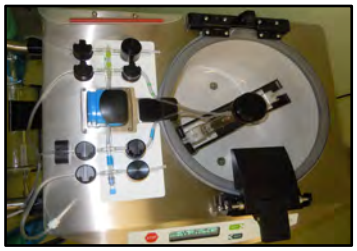
Componenti fondamentali del sitema di arricchimento con Cytori Celution®:

- Dispositivo Celution® 800/CRS.(a)

(a)

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

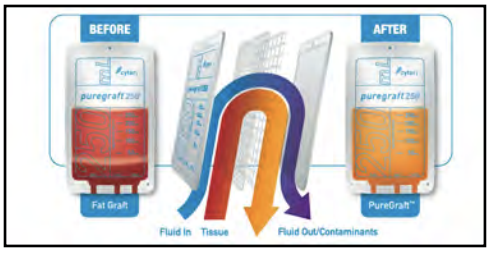
- Contenitore di trattamento
- Cannule
- Sacca dei rifiuti
- Contenitore di raccolta del tessuto

(b) 

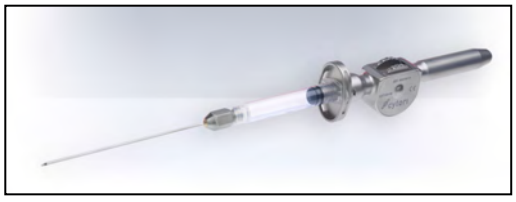
- Celase™ 835/CRS (preparato enzimatico liofilizzato, da ricostituire con soluzione fisiologica secondo istruzioni) (c).

(c)

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

(d) 

- Dispositivo di innesto Celbrush™ (e).

(e) 

SISTEMA MEDIKAN INTERNATIONAL©

Il dispositivo Celltibator™ è stato progettato da Medikan International, Inc.© per incubare ed isolare la frazione vascolo-stromale (contenente ASCs) derivante dal tessuto adiposo aspirato tramite liposuzione. Il tessuto adiposo e l'enzima (collagenasi) 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 38°C per 30 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.

Il sistema Lipokit™, è una tecnologia medica con marchio CE approvato dalla FDA. Consiste di un sistema di purificazione del lipoaspirato completamente chiuso che permette di aspirare, purificare ed eventualmente inoculare il tessuto adiposo. Ciò è possibile grazie ad un dispositivo dotato di una pompa in grado di generare pressioni sia negative che positive collegate alla particolare siringa TP-101 FPU.

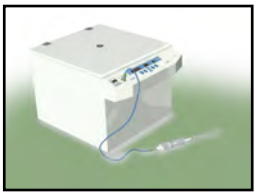
Metà del tessuto adiposo aspirato viene processato per ottenere una frazione concentrata di ASCs e l'altra metà subisce un processo di purificazione (tramite particolare centrifugazione). Alla fine della procedura, la componente staminale viene miscelata alla componente adiposa a costituire un innesto adiposo arricchito.

Componenti fondamentali del sistema di arricchimento con Medikan Lipokit™:

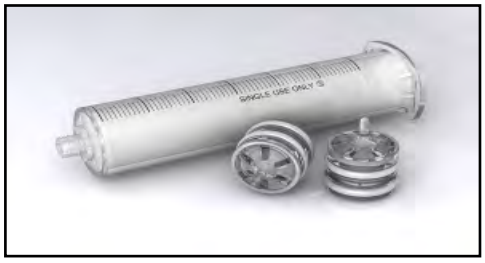
- Dispositivo Celltibator™ MSM100 (f)

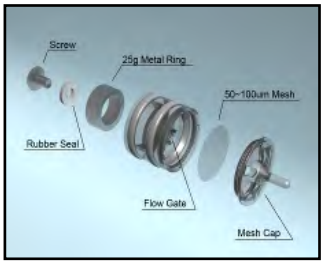
(f)

- Siringa TP-102 FPU
- Collagenasi
- Dispositivo Lipokit™ (g)

(g) 

- Siringa TP-101 FPU (h)

(h) 



SISTEMA TRADIZIONALE SECONDO S.COLEMAN (modificata)

La tecnica utilizzata e definita come "tradizionale" è una variante della nota lipostruttura secondo Coleman. Questa metodica permette il prelievo, la raccolta e la processazione del tessuto adiposo aspirato, senza l'utilizzo di particolari macchinari (al di fuori di una normale centrifuga e di siringhe e cannule di aspirazione a bassa pressione). La procedura è standard e facilmente ripetibile (vedi paragrafo 2.3), e consiste, dopo iniezione nell'area di prelievo di una soluzione anestetica, nella lipoaspirazione eseguita con cannula con diametro inferiore ai 3 mm, collegata ad una siringa o al contenitore 'redon' da drenaggio in circuito sterile, con un sistema di aspirazione a bassa pressione (0.4 bar). Il tessuto adiposo ottenuto viene centrifugato a 1000g per 1 minuto e trasferito in cannule da 2,5 o 1 ml. per il suo innesto.

La totalità del lipoaspirato subisce lo stesso trattamento e viene innestata a livello del sito ricevente, una volta purificato e condensato, senza alcun arricchimento.

VALUTAZIONE PREOPERATORIA

Valutazione Clinica

Tutte le pazienti sono state sottoposte preliminarmente ad una visita di screening V0, nel corso della quale è stata effettuata un'accurata valutazione anamnestica ed obiettiva. All'esame obiettivo sono stati valutati colorito, integrità, temperatura ed elasticità cutanea in generale e nelle aree cicatriziali; particolare attenzione è stata posta nella valutazione di eventuali complicanze della ricostruzione primaria: contrattura capsulare, *rippling* protesico, aree di depressione e dolore. Si è, inoltre, presa visione degli esami ematici (emocromo, glicemia, elettroliti, coagulazione, funzione epatica e renale, elettroforesi siero-proteica, indici di flogosi), effettuati entro 30 giorni dalla visita V0, al fine di escludere la presenza di eventuali criteri di esclusione e/o controindicazioni alla procedura. E' stata visionata la documentazione relativa alla patologia oncologica mammaria esaminando in particolare il tipo di intervento subito, eventuali sedute di chemioterapia o radioterapia e tempo di follow-up libero da recidive o nuova malattia.

Sono state scattate delle fotografie dell'area mammaria secondo le proiezioni standard in posizione ortostatica (laterale destra, laterale sinistra, frontale, trequarti sinistra e trequarti destra)(Fig.5.2).

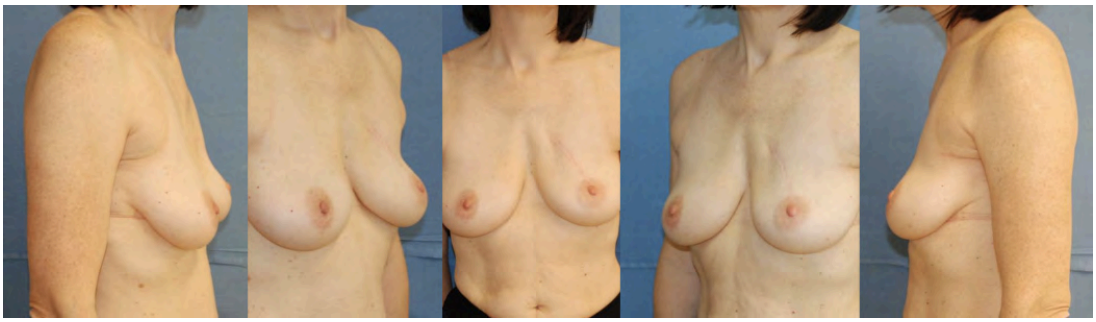


Figura 5.2 - Fotografie preoperatorie secondo proiezioni standard della regione mammaria.
Fotografie preoperatorie (V0) in paziente sottoposta a QUART a livello supero-interno della mammella sinistra; paziente candidata a ricostruzione con lipostruttura arricchita (metodica Cytori).

Valutazione Ultrasonografica

Tutti le pazienti risultate adatte per lo studio in V0, sono state quindi sottoposte, presso gli ambulatori di Chirurgia Plastica dell'Ospedale Civile di Gemona del Friuli, ad ecografia preoperatoria (T0) con sonda lineare a frequenza 7,5/13,5MHz. L'indagine ha previsto la valutazione della mammella secondo una particolare divisione della stessa in 9 quadranti (supero-esterno, supero-mediale, supero-interno, medio-esterno, medio-mediale, medio-interno, infero-esterno, infero-mediale, infero-interno (Fig.5.3). Tale divisione garantisce, rispetto a quella in classica in 4 quadranti, un più accurato studio settoriale dell'organo.

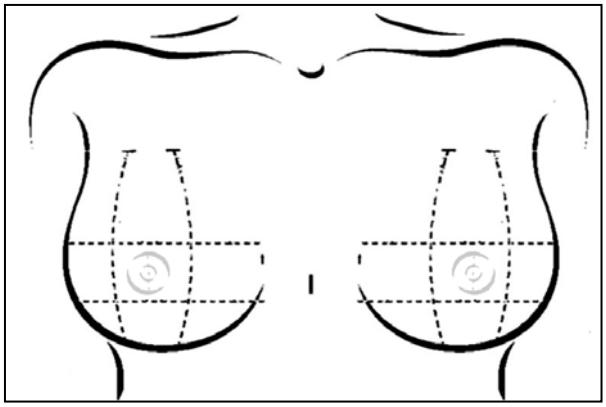


Figura 5.3 - Divisione della mammella in 9 quadranti. La mammella è stato divisa in 9 quadranti centrati sul complesso areola capezzolo, si noti come i quadranti non abbiano tutti uguali dimensioni e siano delimitati da una reticolo a linee orizzontali parallele e linee verticali a "meridiano"; questa 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)(Fig.5.4). Ad ogni quadrante è stato attribuito un valore dello spessore in mm, frutto della media tra valore minimo e massimo riscontrato all’interno del quadrante stesso. Tutti gli esami ecografici sono stati eseguiti dallo stesso operatore limitando così i possibili fattori di confondimento legati all’operatore-dipendenza.

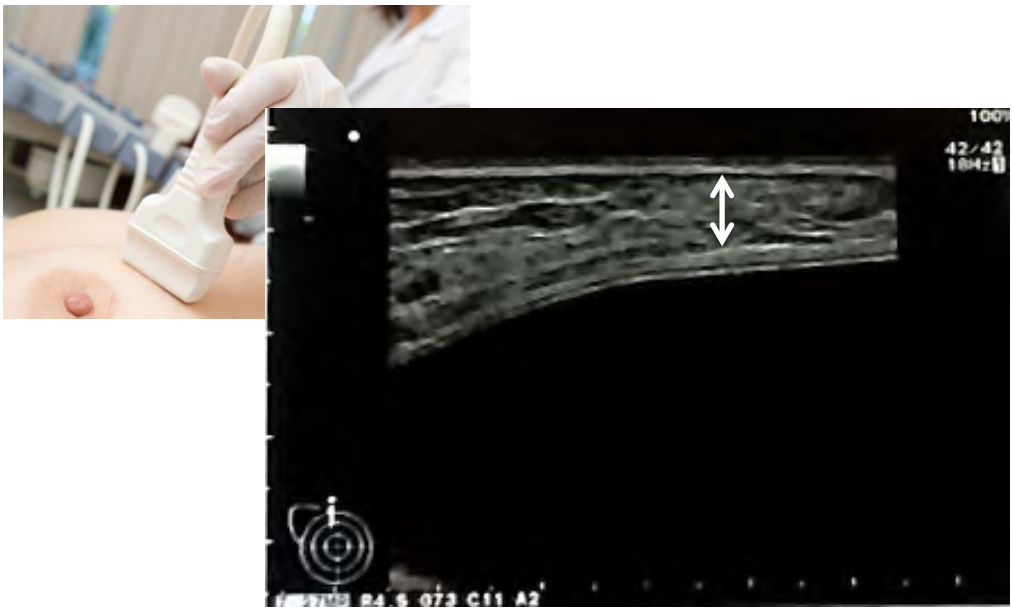


Figura 5.3 - Immagine ultrasonografica di tessuto mammario con riferimento allo spessore sottocutaneo. Spessore tra derma e fascia superficiale del Gran pettorale (freccia a doppia punta bianca) in mammella ricostruita con protesi in silicone.

FASE OPERATORIA

Preparazione all'Intervento

Indipendentemente dalla metodica ricostruttiva adottata, l'accesso delle pazienti in sala operatoria è stato preceduto dall'esecuzione, da parte del chirurgo, del disegno preoperatorio con inchiostro dermografico. Le aree evidenziate sono quelle della sede di prelievo e della successiva sede di innesto (Fig. 5.5) Le prime possono variare a seconda della costituzione e della distribuzione adiposa della paziente (le regioni normalmente utilizzate sono quella addominale, dei fianchi, peri-trocanterica, genuale mediale e dei polpacci); le seconde, vengono identificate e marcate in base alla valutazione del chirurgo con l'ausilio della documentazione relativa alla visita preo-peratoria (V0).

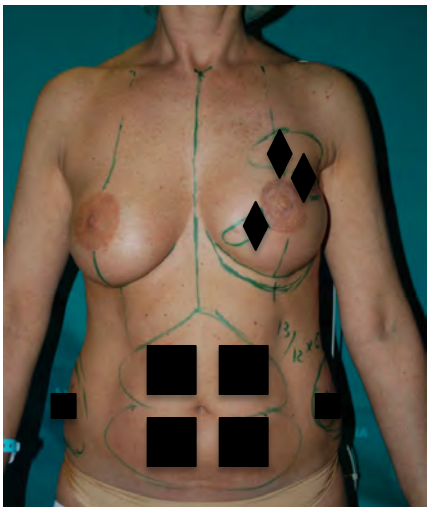


Figura 5.4 - Disegno pre-operatorio in paziente con esiti di ricostruzione mammaria sinistra con protesi, post mastectomia. In evidenza l'area di prelievo addominale e in regione dei fianchi (quadrati) e l'area di innesto a livello della mammella (rombi).

La paziente entra così in sala operatoria e si dispone sul letto chirurgico in posizione supina, con l'arto superiore omolaterale alla mammella affetta, disteso e abdotto di 90 gradi. Dopo l'induzione dell'anestesia generale, si procede all'allestimento del campo operatorio con disinfezione della cute tramite iodopovidone (soluzione al 10%) e posizionamento di teli sterili, prestando particolare attenzione a non coprire le aree marcate.

Contemporaneamente a questa fase si prepara una soluzione tumescente (sulla base di quella proposta da Klein) composta da:

• 1L di Ringer lattato

• 40ml di lidocaina al 1%

• 1ml adrenalina 1:1000

Questa, verrà successivamente impiegata per infiltrare l'area del tessuto adiposo dove verrà praticata la liposuzione. Tale accorgimento fornisce al paziente una moderata anestesia post-operatoria, riduce la perdita di sangue (via vasocostrizione) e sviluppa un piano chirurgico nel tessuto adiposo, facilitandone pertanto la suzione. Il rapporto consigliato tra la soluzione tumescente e il volume di tessuto che si intende raccogliere è di 1:1.

Intervento Chirurgico

L' esecuzione dell'intervento chirurgico si è svolta con procedimento diverso per le 3 diverse metodiche impiegate nello studio:

Lipostruttura Arricchita con Cytori Celution®

Otto pazienti sono state sottoposte ad intervento di lipostruttura arricchita mediante il sistema Cytori Celution®, 7 di queste erano affette da esiti di ricostruzione mammaria con protesi/espansore, 1 da esiti di chirurgia conservativa (QUART). La quantità media di grasso innestato è stata di 148± 43ml ed in tutte le pazienti sono stati trattati, tra gli altri, i quadranti medio-mediale e supero-mediale.

- Con paziente in anestesia generale, si praticano, con una lama 11, delle piccole incisioni cutanee (2/3mm) lungo il perimetro dell'area di prelievo, per permettere l'infiltrazione della soluzione tumescente in rapporto 1:1 con la quantità di tessuto adiposo che si desidera prelevare. Una volta infiltrata la soluzione in maniera uniforme e su più piani nel pannicolo sottocutaneo, si attendono alcuni minuti affinché l'adrenalina eserciti l'effetto vasocostrittore; si procede dunque alla liposuzione utilizzando una cannula standard da liposuzione di 3mm con punta Mercedes e una siringa Toomey da 60ml per la lipoaspirazione manuale. Si colloca la punta della cannula da aspirazione dentro le incisioni utilizzate per iniettare la soluzione tumescente e si retrae lo stantuffo della siringa Toomey fino alla tacca dei

60ml fermandola o con un apposito sistema di bloccaggio o tramite l'apposizione di una pinza Klemmer; questa procedura permette di mantenere una pressione negativa (intorno ai -0.4bar) senza sforzi da parte dell'operatore. Una volta ottenuta la pressione negativa all'interno della siringa si procede alla suzione del tessuto adiposo facendo attenzione a rimanere nel tessuto sottocutaneo profondo della paziente mantenendo la cannula parallela alla superficie cutanea (per evitare di lesionare la cute o strutture profonde). Una volta riempita completamente, la siringa viene privata della cannula, sigillata e depositata in un arcella sterile (Fig.5.5). Questo processo viene ripetuto fino all'ottenimento della quantità desiderata di tessuto. Una volta terminata la liposuzione, nell'area di prelievo viene praticata una medicazione compressiva (previa applicazione di strip sterili e garze asciutte sulle incisioni) al fine di limitare l'edema ed ecchimosi post-operatoria.

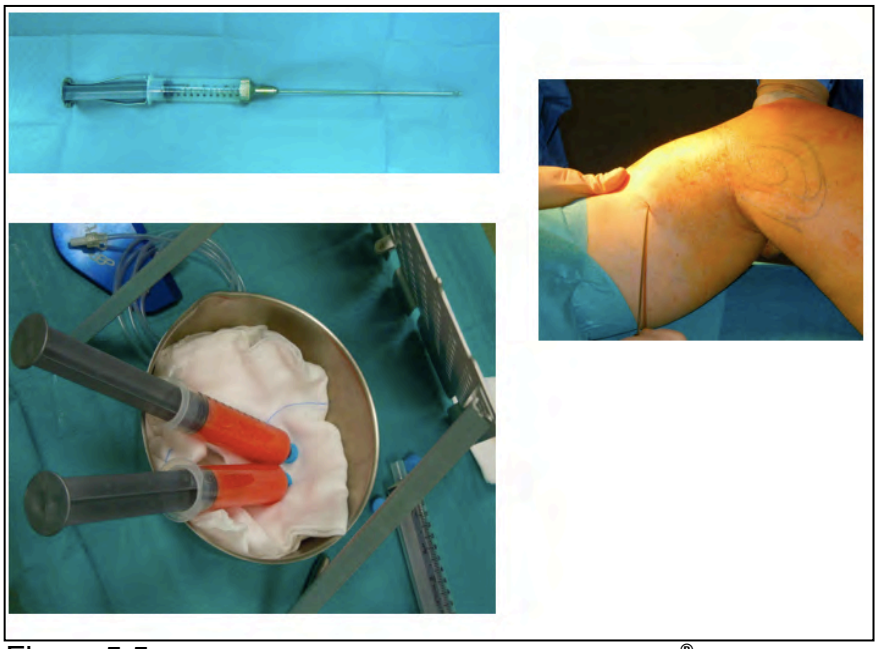


Figura 5.5 - Fotografie intraoperatorie procedura Cytori®. Siringa Toomey con sistema di autobloccaggio (in alto a sinistra), liposuzione faccia mediale della gamba (a destra), siringhe piene di lipoaspirato in attesa di purificazione/estrazione ASCs (in basso a sinistra).

- Il tessuto destinato all'estrazione delle staminali e fattori di crescita viene iniettato all'interno del contenitore per lipoaspirato del dispositivo Celution® 800/CRS (Fig. 5.6). A questo punto il tempo per l'estrazione varierà a seconda della quantità di lipoaspirato da processare, l'operatore si atterrà alle istruzioni che compaiono sul display del dispositivo fino a fine processo.

Figura 5.6 - Lipoaspirato trasferito nell'apposito contenitore.

- Contemporaneamente il grasso destinato all'innesto viene purificato per lavaggio e drenaggio attraverso il dispositivo PureGraft™ 250 System.

- I 5ml contenenti le cellule staminali vengono quindi prelevati dalle 2 camere di raccolta e trasferiti all'interno della sacca PureGraft™, a costituire tessuto adiposo arricchito (Fig.5.7)

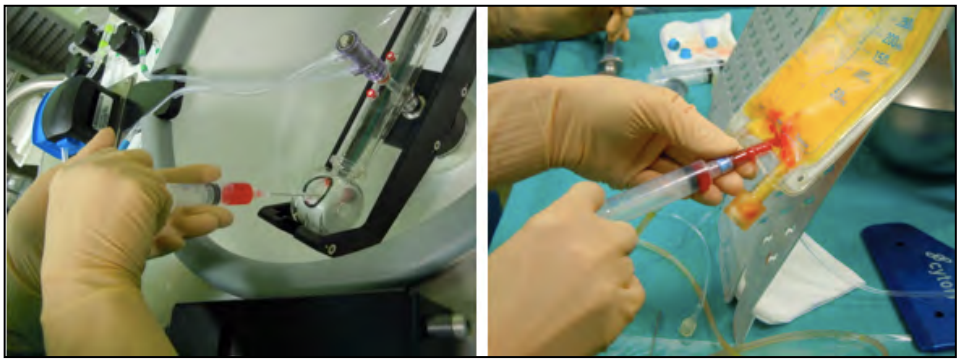


Figura 5.7 - Prelievo cellule staminali ed arricchimento dell'innesto purificato.
Prelievo staminali da camere di raccolta (sinistra), unione delle staminali all'innesto adiposo purificato con PureGraft™ (destra).

- Il tessuto adiposo arricchito viene inoculato previe incisione cutanee (analoghe a quelle praticate per la suzione) con cannule a punta smussa da 16 Gauge (2mm) di diametro e 9cm di lunghezza, attraverso siringa Celbrush™ (Fig. 5.8) Prima di iniettare l'innesto può essere necessario utilizzare una cannula da iniezione come corpo contundente per allentare la cicatrice nell'area del difetto. L'obiettivo principale durante l'iniezione dell'innesto è di collocare piccole gocce di materiale a diversi livelli di profondità sia verticalmente che orizzontalmente. La deposizione dell'innesto deve sempre avvenire durante la fase di ritiro della cannula. Una volta apportata la correzione di volume, la paziente viene posta in posizione seduta per una più accurata valutazione del risultato ed eventuale aggiunta di innesto. Una volta ottenuto il risultato desiderato si chiudono le incisioni con sutura da cute 5/0-6/0 o con soli cerotti sterili.

Figura 5.8 - Inoculo del tessuto adiposo arricchito nell'area mammaria affetta.
L'inoculo avviene attraverso una speciale siringa CelbrushTM che permette di rilasciare circa 0,1ml di materiale ad ogni rotazione completa della rotella di scorrimento che si trova sull'impugnatura.

- Si applica infine una medicazione moderatamente compressiva per immobilizzare l'innesto (senza causarne ischemia) e favorirne l'attecchimento.

Lipostruttura Arrichita con Medikan Lipokit™

Quattro pazienti sono state sottoposte ad intervento di lipostruttura arricchita mediante il sistema Medikan Lipokit™. Tutte le pazienti erano affette da esiti di ricostruzione mammaria con protesi/espansore. La quantità media di grasso innestato è stata di 113± 46ml ed in tutte le pazienti sono stati trattati, tra gli altri, i quadranti medio-mediale e supero-mediale.

- Con paziente in anestesia generale, si praticano, con una lama 11, delle piccole incisioni cutanee (2/3mm) lungo il perimetro dell'area di prelievo, per permettere l'infiltrazione della soluzione tumescente in rapporto 1:1 con la quantità di tessuto adiposo che si desidera prelevare. Una volta infiltrata la soluzione in maniera uniforme si attendono alcuni minuti affinché l'adrenalina faccia effetto; si procede dunque al prelievo adiposo utilizzando la particolare siringa (TP-101 FPU) da 50ml dotata di cannula standard da liposuzione (sezione 3mm con punta Mercedes). La siringa è direttamente collegata al dispositivo Lipokit™ tramite un tubo in aspirazione (pressione negativa costante di -0,4 bar), il procedimento di suzione è analogo a quello sopraindicato per l'altra metodica. Una volta riempita completamente, la siringa viene privata della cannula, sigillata e depositata in un arcella sterile (Fig.5.9). Questo processo viene ripetuto fino all'ottenimento della quantità desiderata di tessuto. Una volta terminata la liposuzione, nell'area di prelievo viene praticata una medicazione compressiva (previa applicazione di strip sterili e garze asciutte sulle incisioni) al fine di limitare l'edema ed ecchimosi post-operatoria.

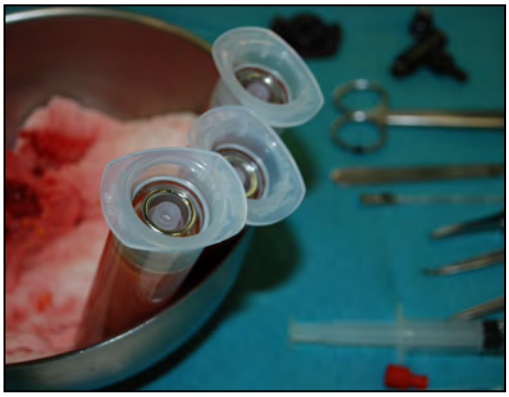


Figura 5.9 - Siringhe TP-101 FPU contenenti lipoaspirato all'interno della arcella sterile.

- Il tessuto destinato all'estrazione delle staminali e fattori di crescita (ovvero la metà del totale) viene trasferito in una siringa (TP-102 FPU) da 50 ml insieme ad una collagenasi e inserito all'interno del dispositivo Celltibator™ MSM100, per l'estrazione della frazione vascolo-stromale (SVF). Il tempo totale per l'estrazione è di circa 30 min(Fig. 5.10).

Figura 5.10 – Dispositivo Celltibator™ MSM100 durante la fase di incubazione del liposapirato.

- Contemporaneamente il tessuto adiposo destinato alla purificazione viene posizionato (restando sempre all'interno della siringa di suzione) negli appositi alloggiamenti della centrifuga del dispositivo Lipokit™; la concentrazione del tessuto avviene grazie ad un ciclo di centrifugazione a 3500rpm (forza centrifuga all'interno della siringa 1200g) per 5 minuti.

- Le staminali vengono quindi miscelate al grasso purificato e l'innesto arricchito inoculato nelle aree da trattare con le stesse cannule a punta smussa da 16 Gauge

(2mm) di diametro e 9cm di lunghezza viste per la metodica precedente. Analoga è anche la procedura di inoculo previe incisioni cutanee. Il tessuto adiposo arricchito può essere iniettato usando direttamente le siringhe da 50ml all'interno delle quali si è trovato per tutto il tempo operatorio, oppure trasferito con siringhe più piccole. Apportata la correzione di volume, la paziente viene posta in posizione seduta per una più accurata valutazione del risultato ed eventuale aggiunta di innesto. Una volta ottenuto il risultato desiderato si chiudono le incisioni con sutura da cute 5/0-6/0 o con soli cerotti sterili.

- Si applica infine una medicazione moderatamente compressiva per immobilizzare l'innesto e favorirne l'attecchimento.

Lipostruttura Classica secondo Coleman

Le 15 pazienti, facenti parte del gruppo di controllo dello studio, sono state sottoposte ad intervento di lipostruttura non arricchita. Quattordici di queste erano affette da esiti di ricostruzione mammaria con protesi/espansore, 1 da esiti di chirurgia conservativa (QUART). La quantità media di grasso innestato è stata di 105 ± 31ml ed in tutte le pazienti sono stati trattati i quadranti medio-mediale e supero-mediale.

- Con paziente in anestesia generale, si praticano, con una lama 11, delle piccole incisioni cutanee (2/3mm) lungo il perimetro dell'area di prelievo, per permettere l'infiltrazione della soluzione tumescente in rapporto 1:1 con la quantità di tessuto adiposo che si desidera prelevare. Una volta infiltrata la soluzione in maniera uniforme si attendono alcuni minuti affinché l'adrenalina faccia effetto; si procede dunque al prelievo adiposo utilizzando siringhe da 10ml tipo Luer-Lock con cannula da 3mm a punta Mercedes. Il vuoto viene creato manualmente all'interno della siringa bloccando lo stantuffo con l'ausilio di una pinza tipo Klemmer. Una volta riempita completamente, la siringa viene privata della cannula, sigillata e depositata in un arcella sterile. Questo processo viene ripetuto fino all'ottenimento della quantità desiderata di tessuto. Terminata la liposuzione, nell'area di prelievo viene praticata una medicazione compressiva (previa applicazione di strip sterili e garze asciutte sulle incisioni) al fine di limitare l'edema ed ecchimosi post-operatoria.

- Tutte le siringhe contenenti il lipoaspirato vengono sottoposte alla sola centrifugazione. Il protocollo utilizzato nello studio prevede una velocita di per minuti. A processo terminato vengono drenate la porzione liquida inferiore e tamponata la porzione oleosa superiore, isolando così la frazione adiposa purificata(vedi anche Capitolo II).

- Il grasso purificato viene innestato nell'area da trattare come descritto per l'altro gruppo di pazienti, con cannule a punta smussa da 16 Gauge (2mm) di diametro e 9cm di lunghezza. Le siringhe utilizzate per l'iniezione sono dello stesso tipo di quelle utilizzate per la suzione (10ml Luer-Lock). Apportata la correzione di volume, la paziente viene posta in posizione seduta per una più accurata valutazione del risultato ed eventuale aggiunta di innesto. Una volta ottenuto il risultato desiderato si chiudono le incisioni con sutura da cute 5/0-6/0 o con soli cerotti sterili

- Si applica infine una medicazione moderatamente compressiva per immobilizzare l'innesto e favorirne l'attecchimento.

VALUTAZIONE POSTOPERATORIA

Valutazione Clinica ed Ecografica

Tutte le pazienti sono state sottoposte ad una serie di visite post-operatorie di controllo, nella prima visita a 3/5 giorni sono stati rimossi i punti di sutura (ove presenti) e valutate le condizioni cliniche post operatorie, nessuna paziente ha riportato gravi complicanze; alle pazienti è stata inoltre data indicazione di indossare un reggiseno contenitivo per 30 giorni. Le successive visite a 10 e 15 giorni hanno riportato una completata guarigione delle ferite e regressione di edema ed ecchimosi in tutte le pazienti.

I criteri ecografici indagati nella valutazione T0 sono stati nuovamente rivalutati a 6 mesi (valutazione T1); contestualmente ad un accurato esame obiettivo (V1), in cui sono stati riconsiderati gli stessi parametri clinici della visita precedente (V0).

Oltre al dato ultrasonografico relativo allo spessore sottocutaneo post-operatorio, sono stati riportati il giudizio delle pazienti e del chirurgo, sul grado di soddisfazione relativa alla

riuscita dell'intervento (scala soddisfazione paziente: soddisfatta/insoddisfatta; scala soddisfazione chirurgo: insufficiente/sufficiente/buono/ottimo).

Le pazienti sono state inoltre fotografate secondo proiezioni standard analoghe a quelle in V0 (Fig.5.11).

Figura 5.11 - 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).

5.6 STATISTICA

I dati ottenuti sono stati analizzati statisticamente con il test di Wilcoxon-Mann-Whitney o T-test a seconda delle dimensioni del campione, un p-*value* <0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

RISULTATI

In seguito alla visita V0 le 27 pazienti risultate idonee per lo studio sono state sottoposte ad intervento chirurgico di innesto adiposo arricchito o lipostruttura tradizionale, secondo la divisione in due gruppi rispettivamente di 12 e 15 pazienti; i gruppi sono risultati omogenei per età e BMI.

Risultati Clinici

In tutte le pazienti, la procedura chirurgica, così come il decorso post-operatorio si sono svolti in assenza di complicanze rilevanti, con guarigione delle ferite, regressione dell'edema, dell'ecchimosi e del dolore entro 15 giorni dall'intervento, sia a livello del sito donatore, che del sito ricevente.

Valutazione del chirurgo

La valutazione del chirurgo a 6 mesi dall'intervento (V1) si è rivelata complessivamente positiva (in base ad una scala di 5 valori: insufficiente/sufficiente/buono/ottimo) nell' 89% delle pazienti (considerando come "positive" le valutazioni da sufficiente a ottimo); con un miglioramento della qualità cutanea, della simmetria mammaria e del trofismo delle aree cicatriziali e/o sottoposte a radioterapia (Fig.6.1).

Come riportato nel Grafico 6.1 il risultato è stato considerato:

- ***insufficiente*** nell'11% dei casi (17% di quelli trattati con innesto adiposo arricchito e 7% di quelli trattati con lipostruttura tradizionale),
- ***sufficiente*** nel 19%(17% di quelli trattati con innesto adiposo arricchito e 20% di quelli trattati con lipostruttura tradizionale),
- ***buono*** nel 59% (58% di quelli trattati con innesto adiposo arricchito e 60% di quelli trattati con lipostruttura tradizionale),
- ***ottimo*** nell'11% (8% di quelli trattati con innesto adiposo arricchito e 13% di quelli trattati con lipostruttura tradizionale).

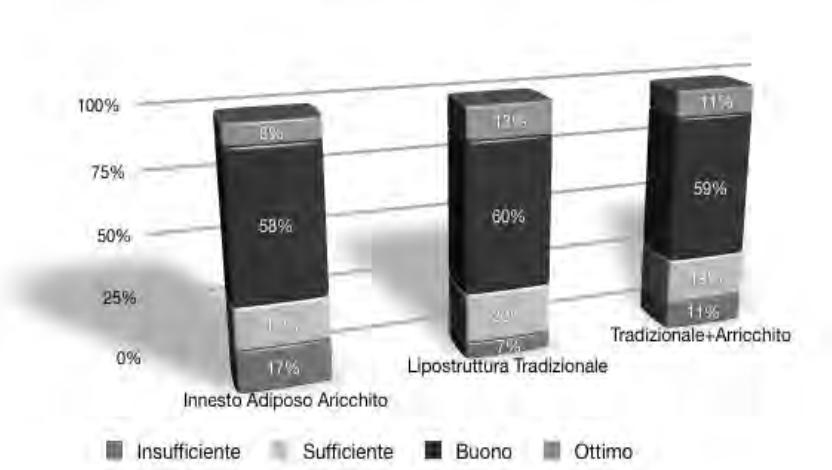


Grafico 6.1 - Valutazione dopo 6 mesi dal trattamento da parte del chirurgo.
Le prime due barre del grafico partendo da sinistra si riferiscono alla valutazione delle pazienti in base alla tecnica utilizzata (innesto adiposo arricchito o lipostruttura tradizionale), l'ultima barra si riferisce all'insieme delle pazienti trattate (tradizionale+arricchito).

Valutazione del paziente

Il grado di soddisfazione delle pazienti sul risultato del trattamento, è stato valutato analogamente alla valutazione del chirurgo, a 6 mesi dall'intervento (V1).

In base a 2 possibili risposte (*soddisfatto*/*insoddisfatto*) è emerso, che nel complesso, si reputavano soddisfatte più dell'80% delle pazienti:

- il 75% delle pazienti trattate con innesto adiposo arricchito,
- e l'87% delle pazienti trattate con lipostruttura tradizionale.

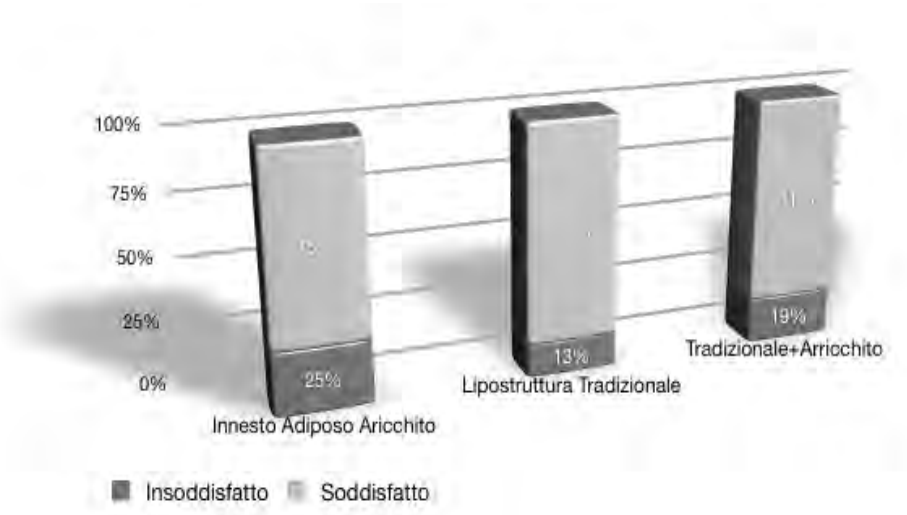


Grafico 6.1 - Valutazione dopo 6 mesi dal trattamento da parte del paziente.
Le prime due barre del grafico si riferiscono alla valutazione del risultato dell'intervento, da parte delle pazienti, secondo i 2 gruppi di trattamento (innesto adiposo arricchito o lipostruttura tradizionale), l'ultima barra riassume la valutazione di tutte le pazienti, indipendentemente dal gruppo di trattamento (tradizionale+arricchito).

Documentazione fotografica

Caso 1

Donna di 42 anni (BMI 19,4) affetta da esiti di mestectomia destra e ricostruzione con protesi, sottoposta ad intervento di lipostruttura tradizionale con 140ml di tessuto adiposo e ricostruzione del complesso areola-capezzolo (cac). L'immagine preoperatoria evidenzia difetti di volume localizzati nei quadranti inferiori e centrali della mammella destra; l'immagine post-operatoria mostra un sensibile miglioramento del difetto volumetrico e ricostruzione del cac. [Fig. 4.1a]

Caso 2

Donna di 45 anni (BMI 30,5) affetta da esiti di mastectomia sinistra e posizionamento di espansore, sottoposta ad intervento di lipostruttura con 170ml di tessuto adiposo arricchito (metodica Cytori Celution®) ed impianto di protesi definitiva. L'immagine pre-operatoria ritrae un profilo mammario sinistro non naturale e asimmetrico rispetto al controlaterale, il tessuto sottocutaneo risulta inoltre essere piuttosto sottile e la cute depressa in

corrispondenza dell'area cicatriziale (caratteristiche difficilmente deducibili dalla sola illustrazione). L'immagine post-operatoria mostra un miglioramento della simmetria, del profilo mammario e miglioramento della depressione cicatriziale [Fig. 4.1b].

Caso 3

Donna di 41 anni (BMI 20) affetta da esiti di mastectomia sinistra e posizionamento di espansore, sottoposta ad intervento di lipostruttura con 175ml di tessuto adiposo arricchito (metodica Medikan Lipokit™) e simmetrizzazione con impianto di protesi controlaterale. L'immagine pre-operatoria mostra analogamente al caso precedente un profilo mammario sinistro non naturale ed evidente asimmetria rispetto alla mammella controlaterale; anche in questo caso il tessuto sottocutaneo risulta essere particolarmente sottile e la cute, anelastica. Nell'immagine post-operatoria si osserva un miglioramento della simmetria e del profilo mammario, permangono, tuttavia alcune aree di depressione nei quadranti inferiori [Fig. 4.1c].

Figura 4.1- Fotografie pre-operatorie e post-operatorie di 3 distinte pazienti.
- Le immagini “a” mostrano una paziente affetta da esiti di mestectomia destra e ricostruzione con protesi, sottoposta ad intervento di lipostruttura tradizionale e ricostruzione del complesso areola-capezzolo (cac). Immagine pre-operatoria “a1”, immagine post-operatoria “a2”.
- Le immagini “b” mostrano una paziente affetta da esiti di mestectomia sinistra e posizionamento di espansore, sottoposta ad intervento di lipostruttura con tessuto adiposo arricchito (metodica Cytori Celution®) ed impianto di protesi definitiva. Immagine pre-operatoria “b1”, immagine post-operatoria “b2”.
- Le foto “c” mostrano una paziente affetta da esiti di mastectomia sinistra e posizionamento di espansore, sottoposta ad intervento di lipostruttura con tessuto adiposo arricchito (metodica Medikan Lipokit™) e simmetrizzazione con impianto di protesi controlaterale. Immagine pre-operatoria “c1”, immagine post-operatoria “c2”.

In tutte le pazienti, la limitata estensione delle incisioni e la loro accurata localizzazione in aree poco visibili (pieghe cutanee, solco mammario, area peri/intra-areolare e su cicatrici preesistenti), è esitata in una minima morbilità sia del sito donatore che del sito ricevente. Due pazienti, che presentavano in V0 una sintomatologia di tipo algico persistente in sede di mastectomia, hanno riportato in V1 una risoluzione totale del problema. Una di queste apparteneva al gruppo trattato con lipostruttura tradizionale, l’altra al gruppo trattato con innesto adiposo arricchito.

In nessuna delle 27 pazienti è stata riscontrata una recidiva di malattia loco regionale a 6 mesi dall’intervento. In 5 donne, è stato inoltre possibile eseguire un follow-up a 12 mesi, senza evidenze di ripresa della malattia: 3 di queste appartenevano al gruppo trattato con innesto adiposo arricchito (2 in esiti di mastectomia, 1 in esiti di chirurgia conservativa); 2 appartenevano al gruppo trattato con lipostruttura tradizionale (1 in esiti di mastectomia, 1

in esiti di chirurgia conservativa). Microcalcificazioni sono state riscontrate rispettivamente in 1 caso per gruppo di studio; inoltre una piccola cisti oleosa è stata individuata in 1 caso trattato con lipostruttura tradizionale.

Risultati sperimentali

Tutte le pazienti hanno subito, sebbene in misura variabile, alterazioni dello spessore sottocutaneo dalla rilevazione ecografica preoperatoria T0, al follow-up a 6 mesi T1. Nonostante le misurazioni ecografiche siano state rilevate per tutti e nove i quadranti (precedentemente descritti), solo 2 di questi sono stati considerati rappresentativi per lo studio; le aree di innesto seguono infatti la peculiare necessità ricostruttiva del singolo paziente. Abbiamo quindi considerato come confrontabili gli unici quadranti costantemente innestati: il medio-mediale (QMM) e il supero-mediale (QSM), (Tabella 6.1).

	Valutazioni preoperatorie (T0)									Valutazioni post-operatorie a 6 mesi (T1)								
Pazienti Innesto Adiposo Arricchito	**QSI**	**QSM**	**QSE**	**QMI**	**QMM**	**QME**	**QII**	**QIM**	**QIE**	**QSI**	**QSM**	**QSE**	**QMI**	**QMM**	**QME**	**QII**	**QIM**	**QIE**
B.S.	3,9	2,9	2,8	3,5	2,9	3,3	3,2	3,8	3,6	11,3	9,8	6,7	11,2	7,4	7,7	8,6	6,8	8,1
C.L.	2,4	1,6	1,3	2,6	3,4	1,3	3,2	3,6	2,6	6,5	6,3	4,7	4	6,6	2	3,2	4	3,2
D.D.	0,9	3	1	1	4	1	1,8	0,9	0,9	4,5	5	4	4	5,5	4	4	3,5	3
G.U.	0,68	0,2	0,6	1,6	1,3	1,2	1,9	1,5	1,3	1,35	1,6	1,3	1,4	1,3	1,37	1,8	1,6	1,3
K.G.	5,5	4,8	5	9	6,8	9,8	13	13	9,7	11	12	13	15	15	12	12	14	13
M.D.	7	2,5	2,5	9	2,5	2,5	7	2,5	2,5	8	11	8	8	10	7	10	11	8
R.V.	7,4	10,9	4,6	7,1	7,1	3,8	5	3,9	7,2	10,5	16	16,4	8,5	7	6,1	8,2	9,4	7,8
T.M.	7	10	8	10	4	8	9.2	8	9.2	12,6	13	12,4	11,4	9,4	6,7	13,8	11,6	7,5
C.G	9	4	5	3,5	2,5	4	3,5	3,5	6	6,5	7	6	10	7	7,5	10,5	9,5	8,5
D.P.	1,5	1,5	1,5	1,3	1,4	1,5	1,4	1,4	1,4	1,5	2,3	2,4	1,4	1,9	1,9	1,3	0,8	1,2
F.M.	25	21	20	21,5	19,6	22,7	19	18,2	21,3	24.5	22,6	21,2	21,4	20,8	23,4	18.2	20,5	22
P.M.	6,9	5,9	6,9	7,3	5	3,5	7,4	5,4	5,1	6,9	6,6	5,4	5,8	4,8	5,5	5,9	4,2	4
Pazienti Lipostruttura Tradizionale	**QSI**	**QSM**	**QSE**	**QMI**	**QMM**	**QME**	**QII**	**QIM**	**QIE**	**QSI**	**QSM**	**QSE**	**QMI**	**QMM**	**QME**	**QII**	**QIM**	**QIE**
C.A.	12	10	13	10	10	9	11	8	10	22	13	13	23	12	7	23	12	12
Z.M.	3,5	3,1	6,2	1,7	1	0,8	4,9	5	5,1	5,8	7,1	9,3	5,5	3,5	6,2	8,3	8,6	6,2
S.B.	7	6,1	5,8	3,8	6,2	6,6	6,8	5,4	5,2	5,3	4,4	5,6	4	6	6,7	8,4	6,4	5,8
Z.M.	5,5	5,5	5,5	5,5	5	5,5	5,5	5,5	5,5	7	7	7	6	5	6	6	3	5
S.W.	6,3	7	4,6	3,8	2,5	3,4	4,6	4,8	4,2	5,1	3,8	2	4,8	2,4	5,9	4,2	4,2	4,9
M.L.	7	7	7	6.5	7	6,7	8	6,5	6,2	6	6	5	7	6	7	8	9	5
R.L.	5	6	6	4	3	3	7	6	4	5	6	4	7	4	3	8	7	3
B.P.	9	10	3,8	15,3	5,1	5,8	13,7	15,4	13	10	10	6,3	15	10	8	14	14	12
P.A.	15	13	9	16	10	8	17	16	13	15	12	10	16	11	8	18	16	13
R.C.	5	5	5	3	4,8	3.7	5,3	5,3	5,3	4,1	4,5	5	4,6	4,5		3,7	3,7	3,7
R.M.	14	14	14	3	0,8	2,2	3	5	6	11,8	7,6	4,6	9,3	3,9	7,6	7,7	6,2	7,1
P.L.	4,6	2	4,9	4,9	2,1	7,9	8,8	8,2	9,1	5,7	4	8,1	8,8	5	10,5	12	10,4	12,2
C.LU.	10	11	10	9,6	11,2	9,5	13,6	11,6	15	8	11	4	7	4	6	10	11	7
B.F.	20	20	16	22	24	16	20	15	19	10,4	8,8	9,6	12,2	7,2	6	14,5	11,5	11,8
G.E.	7,1	9,8	9,2	5,5	11,7	5,1	4,3	5,9	4,7	8	11	12	7	18	14	7	10	7

Tabella 6.1- Rilevamenti ecografici nei due gruppi di studio, acquisiti in T0 e T1 secondo divisione mammaria in 9 quadranti. I valori riportati nella tabella si riferiscono alla distanza in mm dalla fascia del muscolo gran pettorale al derma cutaneo. In rosso sono evidenziati i valori pre e post-operatori relativi al QSM(quadrante supero-mediale) e QMM (quadrante medio-mediale)

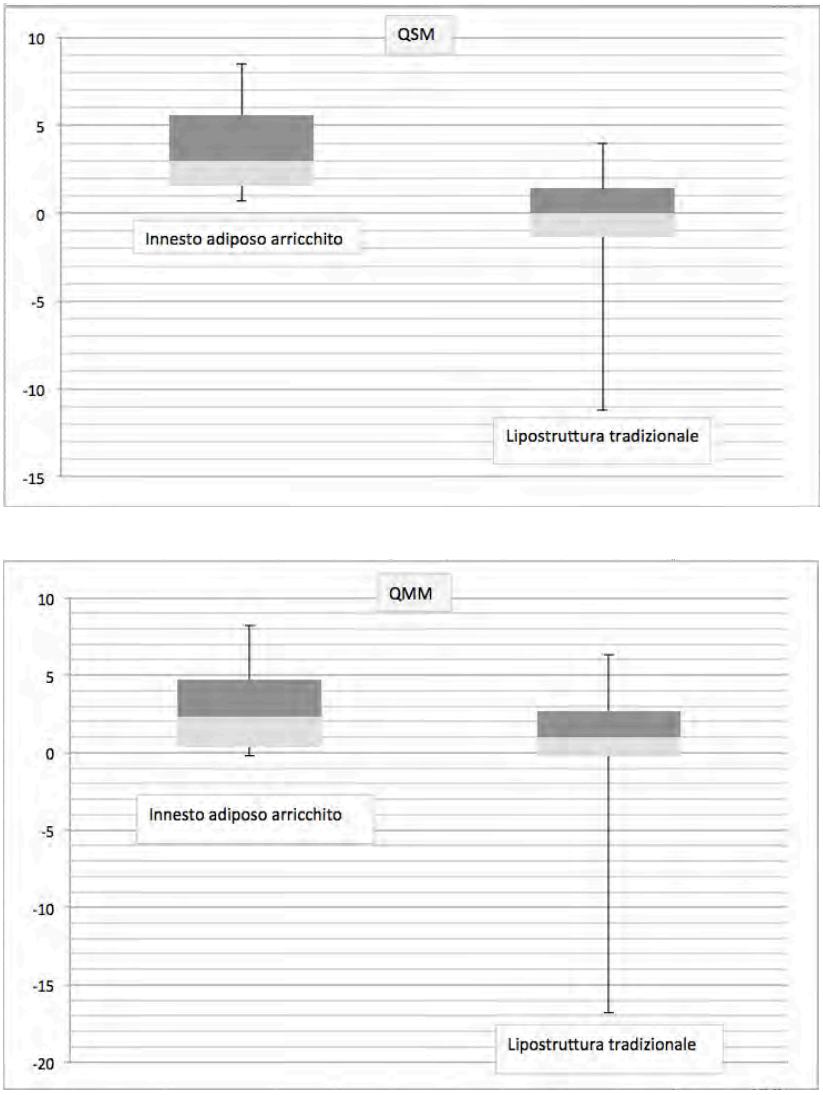
I risultati statistici hanno evidenziato una differenza significativa tra l'incremento di spessore a 6 mesi ottenuto con l'innesto adiposo arricchito (IAA) rispetto alla lipostruttura

tradizionale (LT). In particolare, per il QSM, p-*value*= 0,0176 e per il QMM, p-*value*= 0,0195.

L'incremento medio di spessore a livello del QSM è stato di 3,7mm +/- 2,68mm (media +/- deviazione standard) nel gruppo delle pazienti trattate con IAA; di -0,8mm +/- 3,8mm nel gruppo trattato con LT.

A livello del QMM l'incremento medio è stato di 3mm +/- 2,9mm nelle pazienti trattate con IAA; di -0,12mm +/- 5,5mm per il gruppo sottoposto a LT.

La distribuzione dei dati ottenuti è rappresentata nei Grafici 6.2



Grafici 6.2 - Rappresentazione secondo grafico "Box-plot" delle differenze di spessore sottocutaneo, ottenute a 6mesi, nel QSM e QMM tramite IAA e LT.
Il grafico di sinistra rappresenta la distribuzione delle variazioni ottenute nel QSM, il grafico di destra la distribuzione delle variazioni del QMM; i dati rappresentati sono: valore minimo (baffo inferiore del grafico), valore massimo (baffo superiore del grafico), mediana (linea interna alla scatola), primo e terzo quartile (linee estreme, superiore ed inferiore della scatola).

DISCUSSIONE

E' più di un secolo che i chirurghi plastici utilizzano il tessuto adiposo per andare a colmare deficit del tessuto sottocutaneo. Ma è stato nel corso degli ultimi 15 anni che le maggiori modifiche sono state apportate nel campo della lipostruttura con l'obiettivo di sfruttare le proprietà rigenerative del tessuto innestato e migliorare la sopravvivenza e la stabilità del risultato.

Nello scenario attuale, se da una parte appare largamente accettata la metodica di inoculo tramite piccoli depositi [8-14], dall'altra, ancora grandi sforzi sono rivolti all'identificazione di una tecnica di prelievo e processazione del tessuto adiposo che garantisca risultati significativi in termini di prevedibilità rispetto a quelli ottenibili tramite l'ormai consolidata tecnica di Coleman (proposta sul finire degli anni 90').[15-19]

I progressi scientifici hanno portato ad un'evoluzione delle conoscenze sul processo di attecchimento del tessuto adiposo innestato e, per quanto la teoria di Neuhof "**del rimpiazzo delle cellule ospite"** (1923) e quella **della "sopravvivenza adipocitaria"** di Peer (1956) non abbiano perso la loro validità, il ruolo delle cellule staminali mesenchimali proposto da Yoshimura nel 2009 trova un numero di sostenitori sempre maggiore nella comunità scientifica. [20-21]

Numerosi studi sono stati eseguiti per valutare l'influenza delle diverse variabili coinvolte nella metodica di prelievo, processazione ed innesto del tessuto adiposo.[17-19,22,23]

Le riconosciute proprietà neoangiogenetiche e differenziative delle cellule staminali multipotenti del tessuto adiposo, hanno portato alla nascita del concetto di 'innesto arricchito in cellule staminali' e stimolato l'analisi del ruolo di queste cellule sulla stabilizzazione dell'attecchimento del grasso.

Il "CAL" (*Cell-Assisted-Lipotransfer*) è una metodica di ottimizzazione del lipoaspirato basata sulle potenzialità delle cellule progenitrici, staminali adipose e fattori di crescita presenti nella frazione vascolo-stromale (SVF) del lipoaspirato stesso. In particolare sfruttando la conversione di un tessuto relativamente povero di staminali e fattori di crescita (lipoaspirato) in un tessuto che ne diviene ricco (lipoaspiraro arricchito). [24-31]

La SVF contenente le ASC viene isolata da metà del lipoaspirato e ricombinata con l'altra metà dello stesso. Il tessuto adiposo organizzato funge di fatto da 'scaffold' su cui cellule staminali e progenitrici possono organizzarsi e differenziare.

Sono descritti in letteratura presidi con marchio CE adibiti alla filtrazione del lipoaspirato e all'isolamento delle cellule staminali dal tessuto adiposo che permettono, mediante un sistema a circuito chiuso, la creazione e l'immediato utilizzo intraoperatorio del tessuto adiposo arricchito con cellule staminali omologhe e non manipolate.

Diversi studi in vivo e in vitro hanno dimostrato le capacità di differenziazione pluripotente mesechimale delle ASCs e l'azione pro-angioenica, pro-adipogenica, antiapoptotica, antinfiammatoria, che esse svolgono insieme agli altri componenti della SVF; sulla base di queste evidenze, a partire dal 2006, Yoshimura ed altri autori hanno condotto diversi studi clinici sperimentando l'innesto adiposo arricchito in ambito estetico e ricostruttivo, riportando risultati complessivamente positivi. [24-32]

Nel campo della chirurgia mammaria, nonostante la lipostruttura sia ormai diventata una pratica di routine, studi prospettici comparativi tra la lipostruttura tradizionale secondo Coleman (o varianti senza arricchimento cellulare) ed innesto adiposo arricchito sono ancora deficitari. Esiste ad oggi un solo studio con simili propositi condotto su 18 pazienti sottoposte ad intervento di rimodellamento mammario estetico con tessuto adiposo autologo. I risultati in esso riportati non supportano, peraltro, l'utilizzo di sistemi di arricchimento cellulare a scopo estetico a livello mammario con il fine di migliorare la sopravvivenza dell'innesto adiposo. Le motivazioni riportate sono di tipo costo/beneficio.[137]

In questo studio prospettico abbiamo messo a confronto, l'innesto adiposo arricchito, ottenuto con due distinte procedure di arricchimento enzimatico, rispetto ad una variante della lipostruttura tradizionale secondo Coleman, nella ricostruzione mammaria post-oncologica.

L'obiettivo sperimentale che si è voluto dimostrare è stata la possibilità di ottenere una maggior sopravvivenza a lungo termine da parte dell'innesto adiposo arricchito rispetto all'innesto adiposo trattato secondo la metodica tradizionale, con conseguente diminuzione del numero di sedute di lipofilling necessarie per l'ottenimento di un risultato

ottimale stabile e conseguente riduzione del disagio percepito da parte della paziente e dei costi a lungo termine.

La pianificazione delle indagini cliniche ed ultrasonografiche pre-operatorie (V0,T0) e a 6 mesi dall'intervento (V1,T1) hanno permesso di valutare in modo significativo i risultati ottenuti. Il tempo limite di 6 mesi costituisce infatti il tempo di stabilizzazione dell'attecchimento dell'innesto adiposo, fondamentale per stabilire la necessità di un possibile reintervento. [9-25]

Come precedentemente descritto, la scelta di indagare solo 2 dei 9 quadranti di divisione della mammella, deriva dalla necessità di considerare come significativi dello studio i quadranti trattati in tutte le pazienti. L'apparente discordanza tra i volumi medi di tessuto innestati nei i 2 gruppi di pazienti: 150,6ml per il gruppo trattato con arricchimento cellulare e 104,8ml per il gruppo controllo; è in realtà viziata da una diversità nei contenuti di acqua, per cui, come già precedentemente descritto, il tessuto ottenuto tramite metodiche di arricchimento enzimatico contiene circa il 30% in più di acqua rispetto al tessuto ottenuto con metodica tradizionale. Ne risulta che il volume medio reale +/- deviazione standard per le 2 metodiche sia di 105,4 +/- 35ml (per il tessuto arricchito) e 104,8+/- 30,8ml (tessuto non arricchito); con una differenza quindi trascurabile tra i due gruppi (p-*value*= 0,49). La quantità di tessuto adiposo (arricchito e non) inoculata per singolo quadrante è stata tuttavia valutata in base alle necessità ricostruttive della singola area, quindi, non standardizzato, ma comunque comparabile considerando l'omogeneità dell'esigenza ricostruttiva dei 2 gruppi e del volume medio innestato per ciascun gruppo.

I risultati così ottenuti, confrontando ecograficamente lo spessore sottocutaneo, in T0 e T1 hanno confermato una differenza statisticamente significativa a favore dell'innesto adiposo arricchito per entrambi i quadranti analizzati. Tuttavia l'ampia variabilità attorno al valore atteso per l'incremento di spessore in T1 rimane un elemento non trascurabile in termini di predittività del risultato.

Un ostacolo oggettivo nella comparazione dei dati emersi dal nostro studio, rispetto a quelli presenti in letteratura è rappresentato dall'uso dell'ecografia come indagine strumentale di follow-up. La scelta, vincolata principalmente da motivi economici, pur permettendo un'accurata analisi degli spessori sottocutanei non permette un'analisi volumetrica oggettiva, paragonabile a quella della RMN utilizzata nella maggior parte degli

altri lavori;[33-36] di conseguenza risulta impossibile stabilire l'entità dell'attecchimento del tessuto adiposo secondo una percentuale volumetrica.

Tuttavia, il riscontro di una differenza di spessore a 6 mesi che nel gruppo di controllo (trattato con lipostruttura non arricchita) appare per entrambi i quadranti lievemente negativa (QSM= -0,8mm, QMM= -0,12mm) merita ulteriori approfondimenti innanzi a una percentuale media di attecchimento che, per la stessa tecnica, è riportata in letteratura del 65%.[37] Da tale riflessione emergerebbe infatti un riassorbimento medio del tessuto adiposo non arricchito di oltre il 100%, dato che oltre a non trovare riscontro in letteratura non è supportato nel caso specifico dall'evidenza clinica.

La spiegazione più logica e verosimile risiede nell'operatore dipendenza dell'esame ultrasonografico; a maggior ragione nel valutare strutture che risentono sensibilmente della variazione pressoria della sonda sulla cute.

Questa criticità non altera tuttavia la significatività del nostro studio nel dimostrare un maggior attecchimento a lungo termine dell'innesto adiposo arricchito poiché l'eventuale errore di valutazione sarebbe comunque distribuito su entrambi i campioni.

E' interessante infine evidenziare come nei primi 2 casi da noi trattati con innesto adiposo arricchito, a distanza di 1 anno, sia stato riportato un ulteriore incremento dello spessore sottocutaneo rispetto a T1 (non associato a variazioni di peso della paziente).

Il significativo ma tuttavia limitato numero di soggetti analizzati, associato al minimo periodo di follow-up, suggeriscono che il prosieguo dello studio attuale (con ampliamento della casistica e periodo di osservazione maggiore) associato a nuovi studi clinici, possano attribuire all'innesto adiposo arricchito un ruolo ben definito, tra gli standard ricostruttivi mammari post-oncologici.

Gli obiettivi clinici hanno perseguito l'indagine:

- della capacità rigenerativa del tessuto adiposo (e delle ASCs in esso contenute),
- della soddisfazione del paziente e del chirurgo rispetto alla procedura chirurgica,
- della sicurezza oncologica dell'innesto adiposo ed innesto adiposo arricchito.

Tenendo conto della soggettività del giudizio e del modesto numero di casi analizzati, le differenze cliniche presenti tra il gruppo trattato con lipostruttura tradizionale rispetto a quello trattato con innesto adiposo arricchito, sono difficilmente valutabili. E' verosimile che le elevate aspettative generate nel chirurgo e nelle pazienti dall'arricchimento cellulare ne abbiano influenzato negativamente la valutazione finale. Tale spiegazione giustificherebbe l'apparente maggior soddisfazione riscontrata nel gruppo di controllo nonostante un minor attecchimento a lungo termine e trasferimento di tessuto con un minor quantitativo di cellule staminali.

A tal proposito è necessario puntualizzare che i 2 metodi di arricchimento utilizzati non differiscono significativamente nel quantitativo di staminali estratte per ml di lipoaspirato (250.000-300.000 ASCs per 1 ml di lipoaspirato, pari a circa il 30% del totale delle cellule presenti in 1 ml di tessuto adiposo);[36] quindi potenzialmente valutabili come un unica metodica di arricchimento. Ulteriore elemento da considerare è la tempistica di acquisizione del giudizio, che per il tempo limitato di follow-up non è avvenuto al termine del trattamento ricostruttivo ma in itinere allo stesso: sul giudizio al termine del primo trattamento influisce il maggior impegno richiesto ad operatore e a paziente dall'utilizzo dei presidi adibiti all'arricchimento (maggiore durata dell'intervento chirurgico, maggior quantità di tessuto adiposo aspirato, maggior tempo di ricovero…), senza che vi fosse percezione dell'eventuale beneficio determinato dalla riduzione del numero di interventi necessari all'ottenimento del un risultato finale.

Indipendentemente dal trattamento utilizzato, appare decisamente significativo, sebbene non quantificabile, il contributo rigenerativo dell'innesto adiposo. Un miglioramento pressoché costante è stato osservato a livello dei tessuti trattati in termini di elasticità, morbidezza, testura e trofismo della cute e delle cicatrici, nonché nel miglioramento della retrazione capsulare (ove presente). Queste considerazioni, insieme al riscontro di funzione antalgica in 2 pazienti che lamentavano dolore mammario preoperatorio sono state ampiamente descritte in letteratura a partire dai lavori di Rigotti e collaboratori sull'innesto adiposo su tessuti radiotrattati.[20,25,38-1,36-45]

Il riscontro di microcalcificazioni in 2 pazienti (una per gruppo di trattamento) e di una piccola cisti oleosa (< 5mm) in una paziente trattata con lipostruttura tradizionale possono

essere considerate le uniche complicanze, tuttavia come già esplicato precedentemente tali alterazioni sono, nelle mani di radiologi esperti, ben distinguibili da lesioni mammarie maligne recidivanti o di nuova insorgenza, e non costituiscono un pericolo per la salute delle pazienti.[46-49]

Nel prosieguo del normale iter di follow-up post-oncologico, in linea con i dati presenti in letteratura, in nessuna paziente è stata riscontrata una recidiva loco regionale di malattia entro i 6 mesi.

Il breve periodo di follow-up associato al ristretto numero dei casi studiati limita l'immediata validità scientifica dei risultati da noi ottenuti; tuttavia l'evoluzione del follow-up per la totalità delle pazienti a 5-10 anni potrà fornire informazioni di maggior rilievo sulla sicurezza oncologica dell'innesto adiposo/innesto adiposo arricchito a livello della mammella e sulla stabilità del risultato nel lungo periodo. Fino a quando la letteratura scientifica internazionale non sarà in grado di fornire evidenze adeguate, l'innesto in regione mammaria di adipe autologo come tessuto riempitivo-rigenerativo a scopo ricostruttivo o estetico, dovrà essere praticato con cautela, inserendo le pazienti in protocolli clinici standardizzati che permettano un meticoloso controllo di ogni caso trattato.

CONCLUSIONI

Lo studio da noi condotto, su 27 pazienti in esiti di chirurgia mammaria post-oncologica, ha permesso di evidenziare una significativa differenza nell'attecchimento a 6 mesi tra il gruppo di pazienti trattate con innesto adiposo arricchito (con metodiche di enzimatiche Cytori®/Medikhan™) e quello trattato con lipostruttura tradizionale. In particolare, i migliori risultati sono stati ottenuti nel primo gruppo, laddove, i risultati clinici trovano supporto nei dati cellulari che, come riscontrato in studi parallelamente condotti dalla Clinica di Anatomia Patologica dell'Università di Udine, mostrano come il tessuto adiposo arricchito

contenga cellule progenitrici, fattori di crescita e ASCs dotate di una maggior resa e una migliore caratterizzazione in termini di staminalità (nei parametri di clonogenicità, multipotenza, cinetica di crescita...).

Un analisi critica riguardo l'acquisizione seriata dei dati tramite ultrasonografia è stata suggerita dal confronto dei nostri risultati cosi ottenuti rispetto a quelli presentati dalla letteratura e non ultimo dal discordante riscontro clinico nelle nostre pazienti. Il potenziale punto critico così identificato nell'operatore dipendenza della metodica ha permesso di impostare un nuovo protocollo di acquisizione delle immagini per le future pazienti arruolate nello studio.

Dal punto di vista clinico i risultati sono stati positivi per entrambi i gruppi di trattamento, confermando la duplice funzione: riempitiva e rigenerativa dell'innesto adiposo. Particolare attenzione è stata rivolta alla sicurezza oncologica, con dati a 6 mesi decisamente confortanti.

Alla luce di tali considerazioni, l'innesto di tessuto adiposo autologo sta meritatamente acquisendo un sempre maggior spazio nella ricostruzione mammaria post-oncologica.

Valutazioni di tipo costo beneficio in questo momento dello studio, sarebbero sicuramente inaffidabili in quanto nonostante molte paziento abbiano raggiunto buoni risultati molte sono ancora lontane dal risultato ottimale. La valutazione definitiva tra innesto adiposo arricchito e metodica tradizionale sarà possibile a trattamento ricostruttivo terminato, ovvero quando il risultato ottimale ottenuto con un certo numero di trattamenti sarà stabile nel tempo.

Inoltre considerando l'importanza della *Evidence Based Medicine* e quindi della necessità di metodiche sempre più oggettive, e nel rispetto della *Good Clinical Practice*, sono necessari ulteriori approfondimenti che coinvolgano un maggior numero di pazienti per determinare in maniera ancora più ferma la validità delle tecniche da noi utilizzate.

1. Dati da: www.registri-tumori.it/ anno 2013
2. 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.
3. Missana MC, Laurent I, Barreau L, Balleyguier C. Autologous fat transfer in reconstructive breast surgery: indications, technique and results. Eur J Surg Oncol. 2007;33(6):685-90.
4. 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.
5. 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
6. SOFCPRE. Recomandations concernant le trasferts de graisse dans le sein. February 2012
7. 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.
8. Peer, L. A. Loss of weight and volume in human fat grafts. Plast. Reconstr. Surg. 5: 217, 1950.
9. Peer, L. A., and Walker, J. C. The behavior of autogenous human tissue grafts: II. Plast. Reconstr. Surg. 7: 73, 1951.
10. Sommer, B., and Sattler, G. Current concepts of fat graft survival: Histology of aspirated adipose tissue and review of the literature. Dermatol. Surg. 26: 1159, 2000.
11. 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.
12. Neuhof, H., and Hirshfeld, S. The Transplantation of Tissues. New York: D. Appleton, 1923. 1–297.
13. Peer, L. A. Cell survival theory versus replacement theory. Plast. Reconstr. Surg. 16: 161, 1955.
14. Yamaguchi, M., Matsumoto, F., Bujo, H., et al. Revascular- ization determines volume retention and gene expression by fat grafts in mice. Exp. Biol. Med. (Maywood) 230: 742, 2005
15. Herold C, Pflaum M, Utz P, Wilhelmi M, Rennekampff HO, Vogt PM. [Viability of autologous fat grafts harvested with the Coleman technique and the tissu trans system (shippert method): a comparative study]. Handchir Mikrochir Plast Chir. 2011;43(6):361-7.
16. Hoareau L, Bencharif K, Girard AC, et al. Effect of centrifugation and washing on adipose graft viability: a new method to improve graft efficiency. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2013;66(5):712-9.
17. 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;63(8):1375-81.
18. Smith P, Adams WP, Lipschitz AH, et al. Autologous human fat grafting: effect of harvesting and preparation techniques on adipocyte graft survival. Plast Reconstr Surg. 2006;117(6):1836-44.
19. Ferguson RE, Cui X, Fink BF, Vasconez HC, Pu LL. The viability of autologous fat grafts harvested with the LipiVage system: a comparative study. Ann Plast Surg. 2008;60(5):594-7.
20. Dixon-Shanies D, Rudick J, Knittle JL.Observatons on the growth and metabolic functions

of cultured cells derived from human adipose tissue.Proc Soc Exp Biol Med. 1975;149(2):541-5.
21. Van RL, Bayliss CE, Roncari DA. Cytological and enzymological characterization of adult human adipocyte precursors in culture. J Clin Invest. 1976;58(3):699-704.
22. Khater R, Atanassova P, Anastassov Y, Pellerin P, Martinot-duquennoy V. Clinical and experimental study of autologous fat grafting after processing by centrifugation and serum lavage. Aesthetic Plast Surg. 2009;33(1):37-43.
23. Pulsfort AK, Wolter TP, Pallua N. The effect of centrifugal forces on viability of adipocytes in centrifuged lipoaspirates. Ann Plast Surg. 2011;66(3):292-5.
24. 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. 2009;4(2):265-73.
25. Matsumoto D, Sato K, Gonda K, et al. Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. Tissue Eng. 2006;12(12):3375-82.
26. 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.
27. 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.
28. Kamakura T, Ito K. Autologous cell-enriched fat grafting for breast augmentation. Aesthetic Plast Surg. 2011;35(6):1022-30.
29. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. Aesthetic Plast Surg. 2008;32(1):48-55.
30. Castro-govea Y, De la garza-pineda O, Lara-arias J, et al. Cell-assisted lipotransfer for the treatment of parry-romberg syndrome. Arch Plast Surg. 2012;39(6):659-62.
31. Lo cicero V, Montelatici E, Cantarella G, et al. Do mesenchymal stem cells play a role in vocal fold fat graft survival?. Cell Prolif. 2008;41(3):460-73.
32. Kølle SF, Fischer-nielsen A, Mathiasen AB, et al. Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a randomised placebo-controlled trial. Lancet. 2013;382(9898):1113-20.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. Peltoniemi HH, Salmi A, Miettinen S, Mannerström B, Saariniemi K, Mikkonen R, Kuokkanen H, Herold C. 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 Nov;66(11):1494-1503.
37. Augmentation of the breast with structural fat. In: Coleman SR, Mazzola RF, editors. Fat injection from filling to regeneration quality. St Louis, MI: Medical Publishing Inc; 2009.
38. Coleman SR. Hand rejuvenation with structural fat grafting. Plast. Reconstr. Surg.

2002;110(7):1731-44
39. Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev.* 2011; 7:269–291.
40. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, et al. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: Efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatol Surg.* 2008;34:1178–1185.
41. Tiryaki T, Findikli N, Tiryaki D. Staged stem cell-enriched tissue (SET) injections for soft tissue augmentation in hostile recipient areas: a preliminary report. Aesthetic Plast Surg. 2011;35(6):965-71.
42. Bruno A, Delli santi G, Fasciani L, Cempanari M, Palombo M, Palombo P. Burn scar lipofilling: immunohistochemical and clinical outcomes. J Craniofac Surg. 2013;24(5):1806-14.
43. Klinger M, Caviggioli F, Klinger FM, et al. Autologous fat graft in scar treatment. J Craniofac Surg. 2013;24(5):1610-5.
44. Caviggioli F, Klinger FM, Vinci V, Cornegliani G, Klinger M. Treatment of chronic posttraumatic leg injury using autologous fat graft. Case Rep Med. 2012;2012:648683.
45. Baptista C, Iniesta A, Nguyen P, Legré R, Gay AM. [Autologous fat grafting in the surgical management of painful scar: Preliminary results.]. Chir Main. 2013;
46. SOFCPRE. Recomandations concernant le trasferts de graisse dans le sein. February 2012
47. 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.
48. 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.
49. Vallejo A, Urban C, Zucca-matthes G, Rietjens M. Is there enough evidence to use lipofilling in breast cancer reconstruction?. Plast Reconstr Surg. 2013;132(4):689e-91e.