



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**Scaffold per la rigenerazione dei tessuti mammari:
il futuro delle protesi negli interventi di mastoplastica
additiva e mastectomia**

Relatore: Prof. ssa Alice Berardo

Laureanda: Gabriela Sartor

ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023

17/07/2023

ABSTRACT

Nel corso degli ultimi decenni gli interventi di ricostruzione ed aumento del volume del seno sono diventati sempre più frequenti. Per risolvere i rischi delle protesi mammarie utilizzate in queste operazioni, l'ingegneria tissutale ha proposto diverse possibili soluzioni tramite l'utilizzo di strutture di supporto per la rigenerazione dei tessuti nativi del seno. Tra queste, è possibile individuarne principalmente due: gli scaffold realizzati come superfici di rivestimento dei dispositivi protesici tradizionali e quelli tridimensionali realizzati come intera protesi.

In entrambi i casi si stanno effettuando numerose ricerche al fine di comprendere al meglio quali siano i biomateriali e le conformazioni più adeguate per la realizzazione di tali strutture. Quest'ultime, una volta impiantate, devono infatti essere in grado di favorire una propria integrazione con il tessuto nativo circostante e, per gli scaffold tridimensionali in particolare, devono anche indurre la differenziazione adipogenica delle cellule staminali coltivate sulle stesse.

Nonostante siano stati ottenuti diversi risultati favorevoli, anche per gli esperimenti condotti *in vivo* sugli animali, non sono ancora stati effettuati studi clinici che permettano di garantire la sicurezza dell'ingegneria tissutale in questo ambito; pertanto, sono necessari ancora numerosi studi per verificarne la reale efficacia.

INDICE

INTRODUZIONE	1
CAPITOLO I - PROTESI MAMMARIE e SCAFFOLD	3
1.1 – CARATTERISTICHE DELLE PROTESI MAMMARIE	3
1.2 – RISCHI DELLE PROTESI MAMMARIE	7
1.3 – BIOMATERIALI E SCAFFOLD.....	10
1.3.1 – Scaffold biologici.....	12
1.3.2 – Scaffold sintetici	13
CAPITOLO II - SCAFFOLD SUPERFICIALI DI RIVESTIMENTO	16
2.1 – INTRODUZIONE.....	16
2.2 – TOPOGRAFIE E CONTROLLO DELLE FUNZIONI CELLULARI	16
2.3 – SUPERFICIE IN FIBROINA DI SETA ELETTROFILATA	20
2.4 – SUPERFICIE BIOMIMETICA DERIVATA DA TESSUTO MAMMARIO UMANO.....	25
CAPITOLO III - SCAFFOLD PER L'INTERA PROTESI	31
3.1 – INTRODUZIONE.....	31
3.2 – RIGENERAZIONE ADIPOSA.....	31
3.3 – SCAFFOLD 3D IN POLIURETANO CON DESIGN A RETICOLO CRISTALLINO	35
3.4 – SCAFFOLD IN IDROGEL.....	43
CONCLUSIONI	50
BIBLIOGRAFIA	53

INTRODUZIONE

Insieme all'incremento degli interventi chirurgici di ricostruzione e aumento del volume del seno negli ultimi anni, è sempre maggiore anche il numero di donne che ogni anno sono soggette ai diversi rischi legati alle protesi mammarie, le quali rappresentano i dispositivi più utilizzati in queste operazioni. Tra i principali effetti indesiderati che si possono sviluppare in seguito all'innesto delle protesi mammarie di notevole importanza è la contrattura capsulare, che riguarda circa il 20% delle donne che si sottopongono alle operazioni di chirurgia estetica e ricostruttiva [1]. Lo sviluppo di tale complicanza è causato da un'eccessiva reazione fibrotica ad un materiale estraneo inserito nel corpo. Per questi motivi, di recente sono state proposte sempre più tecniche di ingegneria tissutale volte a ottimizzare l'integrazione del dispositivo protesico favorendo la rigenerazione dei tessuti mammari nativi. Lo scopo dell'ingegneria dei tessuti è quello di comprendere e applicare le relazioni strutturali e funzionali dei tessuti umani, sia in condizioni fisiologiche che patologiche, attraverso delle strutture di supporto (scaffold) realizzate con biomateriali. Grazie a particolari conformazioni e alla coltura di cellule su di esse, tali impalcature hanno la capacità di promuovere la crescita di nuovi tessuti e garantire loro un'integrità strutturale adeguata. In particolare, nell'applicazione di questa disciplina alla ricostruzione mammaria è possibile distinguere due design di realizzazione delle strutture di supporto: gli scaffold ideati come rivestimenti superficiali delle protesi e gli scaffold progettati come intera protesi mammaria.

In questo lavoro viene riportata inizialmente una descrizione generale delle protesi mammarie e dei principali rischi associati, introducendo come soluzione a tali problemi gli scaffold per la rigenerazione tissutale ed i biomateriali impiegati per realizzarli.

In seguito vengono analizzate nello specifico le due tipologie di progettazione citate: mentre gli scaffold superficiali si basano sulle topografie e sul loro controllo delle diverse funzioni cellulari, alla base dell'ideazione delle strutture tridimensionali vi è la rigenerazione adiposa a partire dalle cellule staminali. Per i primi vengono descritti due studi condotti rispettivamente per la realizzazione di una superficie in seta elettrofilata e di una in silicone derivata dal tessuto mammario nativo; per i secondi infine, viene dapprima riportata una ricerca riguardo scaffold in poliuretano con design a reticolo cristallino ed in seguito si descrive la creazione di scaffold in idrogel, i quali possono essere costituiti da diversi materiali biocompatibili e biodegradabili.

Lo scopo di questo lavoro dunque è presentare le nuove tecniche dell'ingegneria tissutale volte a migliorare il futuro delle protesi mammarie negli interventi di ricostruzione, confrontando in particolare gli scaffold superficiali per le protesi tradizionali e gli scaffold tridimensionali fondamentali per la rigenerazione del tessuto adiposo, costituente principale del seno.

CAPITOLO I

PROTESI MAMMARIE e SCAFFOLD

1.1 – Caratteristiche delle protesi mammarie

Le protesi al seno sono dispositivi impiantabili utilizzati nella chirurgia estetica, per aumentarne le dimensioni o modificarne la forma, e nella chirurgia della mammella per permetterne la ricostruzione post – oncologica o malformativa a seguito di un intervento di mastectomia [2].

Nell'ambito estetico si definisce mastoplastica additiva l'intervento volto a migliorare le dimensioni e l'aspetto del seno per far sì che questo sia in armonia con la struttura fisica della paziente, rispettando le proporzioni del corpo e conferendo un risultato naturale al tatto e alla vista.

Con il termine mastectomia si indica un'operazione chirurgica che prevede l'asportazione della ghiandola mammaria, in seguito alla quale è possibile procedere con la ricostruzione del seno, in contemporanea all'intervento di rimozione (concomitante) o a distanza di mesi o anni (differita) [3].

In particolare, la chirurgia ricostruttiva ha come fine principale quello di ripristinare la funzione dell'organo o del tessuto interessato.

Attualmente le procedure chirurgiche di ricostruzione o aumento del seno possono essere proposte con diverse modalità: si possono utilizzare protesi definitive o provvisorie oppure tessuti muscolari e/o cutanei della paziente.

Le protesi mammarie sono caratterizzate da tre aspetti fondamentali: involucro esterno, materiale di riempimento e forma [2].

Poiché sono destinati ad essere inseriti nel corpo a lungo termine i materiali costituenti l'impianto devono soddisfare specifici requisiti: considerate tutte le possibili interazioni con i tessuti umani, il materiale ottimale deve essere chimicamente inerte, resistente agli stress meccanici, non allergenico, realizzabile nelle forme desiderate e sterilizzabile una volta prodotto l'impianto.

Il materiale che più soddisfa tali specifiche è il **silicone**; ad oggi risultano infatti disponibili protesi tutte caratterizzate da un involucro esterno di silicone [4].

Le protesi possono essere differenziate in base alla **forma** a loro conferita, la quale deve essere il più naturale possibile ed in grado di garantire dimensioni e volumi diversi a seconda dell'uso e della paziente. Ad oggi risultano disponibili più di 500 tipi di forme e volumi ma, in base alla forma, si possono evidenziare tre categorie principali di protesi [2], di cui l'ultima derivata dalle prime due:

- *tonde*: sono autoadattanti e quindi in posizione eretta si ha la parte inferiore della protesi che si gonfia e la parte superiore che si sgonfia, questo avviene perché vi è uno spostamento del materiale contenuto al suo interno;
- *anatomiche*, o “a goccia”, sono preformate per conferire la forma di un seno più naturale;
- *ergonomiche*: sono protesi tonde ma che, grazie alle particolari proprietà reologiche del gel in silicone all’interno di esse, permettono con il passaggio della posizione da clinostatica (paziente sdraiata) ad ortostatica (paziente in piedi) di avere rispettivamente forma rotonda e anatomica.

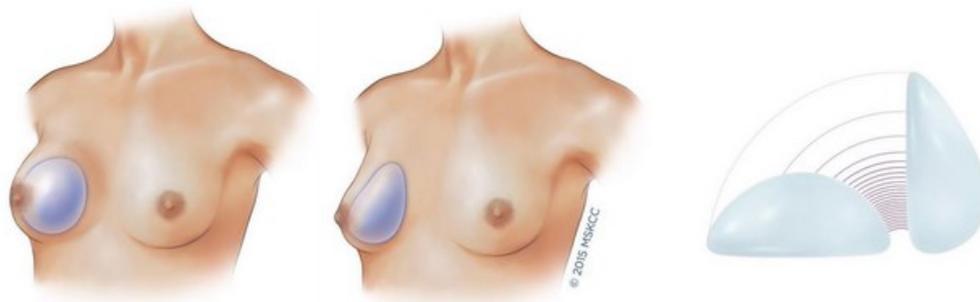


Figura 1.1 – Protesi tonda, anatomica ed ergonomica

Per quanto riguarda le dimensioni dell’impianto, la scelta dipende dalle preferenze della paziente soltanto in parte: devono infatti essere rispettate le dimensioni toraciche e quindi l’equilibrio armonico. Ciascun tipo di protesi infatti, a parità di altezza e di larghezza della sua base di appoggio, può avere una proiezione (cioè un profilo) variabile, tale da conferire alle nuove mammelle una sporgenza anteriore più o meno accentuata.

Come affermato precedentemente, l’**involucro esterno** è composto da gomma di silicone e a seconda del tipo di superficie si distinguono [2]:

- *protesi lisce*, hanno il vantaggio di poter diminuire la lunghezza delle incisioni cutanee necessarie alla loro introduzione e di ottenere una consistenza più morbida e naturale;
- *protesi testurizzate*, presentano superfici più o meno ruvide per favorire la stabilizzazione dell’impianto e perciò si ipotizza inoltre un ruolo positivo nella riduzione della contrattura capsulare;
- *protesi poliuretatiche*, dove la schiuma di poliuretano, una matrice 3D a pori aperti, riveste l’involucro di silicone rendendo più complesso il loro inserimento e la loro iniziale rimovibilità.

Ogni protesi, secondo le caratteristiche della sua superficie, presenta vantaggi e svantaggi sulla base di una diversa interazione con i tessuti del corpo nel quale viene introdotta; ciò rende complicata sia

l'informazione da dare alle pazienti candidate agli interventi di ricostruzione e mastoplastica additiva, sia la scelta della protesi.

Per quanto concerne il **materiale interno** utilizzato questo deve possedere caratteristiche di elasticità, mantenimento della forma, morbidezza, ma deve anche essere stabile nel tempo e con la variazione di temperatura e infine deve risultare atossico in caso di rottura dell'involucro. Sulla base di queste considerazioni il materiale ottimale per la realizzazione del contenuto protesico è risultato essere ancora una volta il silicone; oltre a questo, vengono impiegati anche idrogel, ovvero gel viscoelastici e biodegradabili, e soluzioni fisiologiche saline [4].

Le protesi di ultima generazione, in particolare, contengono un *gel di silicone* a cui corrispondono diversi gradi di coesività [2], la quale rappresenta un elemento di maggior sicurezza in quanto, in caso di rottura del guscio di rivestimento, il gel non si spande all'esterno. Dopo l'inserimento del dispositivo impiantabile la consistenza della mammella dipenderà dalla consistenza del gel di silicone e dalla quantità e dalla consistenza dei tessuti mammari della paziente. Questa tipologia di protesi è utilizzata nel 90% circa degli interventi ed è certamente quella in grado di offrire la maggior naturalezza del risultato, oltre a quella più controllata scientificamente ed evoluta tecnologicamente.



Figura 1.2 – Protesi in gel di silicone coesivo

Le protesi contenenti *soluzione fisiologica* – acqua e sale – hanno lo svantaggio di possedere una consistenza meno naturale di quella propria delle protesi di silicone [4], di provocare, in taluni casi, il rumore dovuto ai movimenti del liquido in esse contenuto e di avere tendenza a perdere liquido e di conseguenza volume col passare del tempo.

Infine, le protesi realizzate con *idrogel* per ora sono le meno impiegate e, in alcuni casi, hanno dimostrato delle variazioni di volume nel tempo.

Un ulteriore aspetto fondamentale da valutare è la sede di posizionamento delle protesi: in ogni mammella al di sotto della cute si trova la ghiandola mammaria, una componente variabile di tessuto adiposo, ed il piano muscolare della parete toracica. I dispositivi possono essere impiantati direttamente al di sotto della ghiandola mammaria oppure, più profondamente, al di sotto del muscolo gran pettorale [5]. Nel primo caso l'operazione chirurgica di ricostruzione prevede la separazione della ghiandola dal piano muscolare creando la cosiddetta "tasca protesica" per poter alloggiare la protesi. Nel caso in cui invece si opera in posizione sottomuscolare, il chirurgo effettua la dissezione al di sotto del muscolo grande pettorale per collocare la protesi più in profondità rispetto alla situazione precedentemente descritta. A sua volta, il posizionamento sottomuscolare, può essere totale o parziale (*dual plane*), ovvero quando la protesi si trova sotto il muscolo nella porzione superiore della mammella – dove la cute è più sensibile ed il rischio di palpabilità della protesi più alto – ed in posizione sottoghiandolare nella parte inferiore.

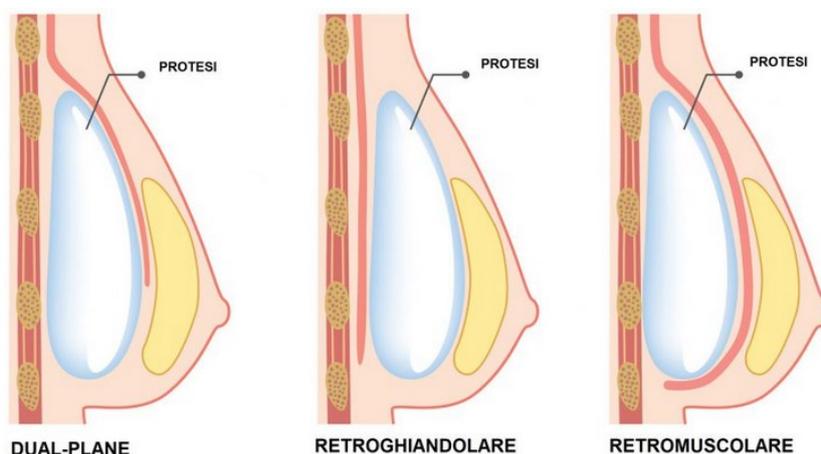


Figura 1.3 – Posizionamenti della protesi

Dati i molteplici siti di impianto esistenti [5] risulta subito intuibile che non esiste un posizionamento ideale indicato per tutte le pazienti; è quindi importante valutare la tecnica più adatta alle specifiche necessità della singola paziente, illustrandone adeguatamente vantaggi e svantaggi.

Infatti, ad esempio, mentre il posizionamento sottoghiandolare presenta la possibilità di un maggior controllo della forma e posizione del dispositivo, un intervento e un decorso post-operatorio più rapido rispetto all'altra tipologia di posizionamento, è però caratterizzato anche da un maggior rischio di visibilità della protesi e della contrattura capsulare se questa dovesse insorgere.

1.2 – Rischi delle protesi mammarie

In entrambi i casi di chirurgia ricostruttiva e chirurgia estetica, in seguito all’impianto nel corpo di un materiale estraneo, possono sorgere diversi effetti indesiderati e complicazioni; i rischi principali riguardano:

- la contrattura capsulare;
- il linfoma anaplastico a grandi cellule (ALCL);
- la rottura/usura della protesi e la trasudazione.

La **contrattura capsulare** è una delle complicanze più comuni dovuta all’impianto di protesi mammarie e una delle ragioni più frequenti per la sottoposizione a una nuova operazione chirurgica [3].

Una volta impiantata la protesi, attorno ad essa si forma una capsula di tessuto fibroso pluristratificato, composta da cellule e matrice extracellulare, denominata capsula periprotetica.

Il meccanismo di formazione della contrattura capsulare è un processo fibroso multifattoriale, causato da un’eccessiva reazione fibrotica a un corpo estraneo, che determina un ispessimento della capsula attraverso la produzione di collagene [4]. Questa, in condizioni normali, ha lo scopo di proteggere sia la protesi sia l’organismo ricevente, ma anche di favorire una stabilizzazione della protesi nel sito di impianto. Pertanto, nel caso di tale reazione infiammatoria, la mammella risulterà più rigida e dura in quanto viene ristretta la base della protesi determinando una forma un po’ troppo rotonda e a volte troppo alta e portando così a seni eccessivamente sodi e dolorosi. È stato osservato che l’incidenza dello sviluppo di contratture è inferiore con l’utilizzo di impianti testurizzati e rivestiti da schiume poliuretatiche e con la scelta di adottare il posizionamento sottomuscolare. Tuttavia, la contrattura capsulare presenta ancora una percentuale di rischio non trascurabile: riguarda, in particolare, dal 5% al 19% delle donne che si sottopongono a mastoplastica additiva e il 20% - 25% di coloro che subiscono un intervento di ricostruzione del seno [1].

Un ulteriore problema legato all’impianto di dispositivi al seno riguarda il possibile sviluppo del linfoma anaplastico a grandi cellule associato a protesi mammarie (*Breast Implant – Associated Anaplastic Large – Cell Lymphoma*, **BIA – ALCL**). Si tratta di un raro tipo di linfoma che interessa specifiche cellule del sistema immunitario, i linfociti T, e che in questo caso, essendo correlato all’utilizzo di protesi al seno, si manifesta in corrispondenza del tessuto mammario periprotetico. Dal 2011 in poi sono stati rilevati un numero anomalo di casi di BIA – ALCL in pazienti portatrici di tali dispositivi e negli anni a seguire è stata posta sempre più attenzione nello studio di questa emergente forma di linfoma. Ancora oggi risulta difficile stabilire quali sono i meccanismi che

portano al suo sviluppo ma numerosi studi hanno verificato il fatto che non tutte le tipologie di protesi al seno sono associate al rischio di contrarre tale tumore. In particolare, infatti, si è osservato che l'incidenza di questa malattia rara è principalmente associata all'utilizzo di dispositivi caratterizzati da superfici macro – testurizzate. Tuttavia, i meccanismi fisiologici e patologici non sono ancora stati completamente chiariti: si ipotizza che alla base del processo di formazione del BIA – ALCL vi sia una reazione infiammatoria dovuta a diversi fattori rilevanti quali la predisposizione genetica, la contaminazione batterica, le infiammazioni croniche, il distacco di particelle dalla superficie della protesi e le proprietà di quest'ultima, che possono causare infiammazioni per attrito [6].

Nella maggior parte dei casi riportati in letteratura, il BIA – ALCL si trova usualmente vicino alla protesi mammaria; in particolare è stato identificato o nel fluido che circonda l'impianto (sieroma) o all'interno della capsula fibrotica, ma non nel tessuto mammario stesso.

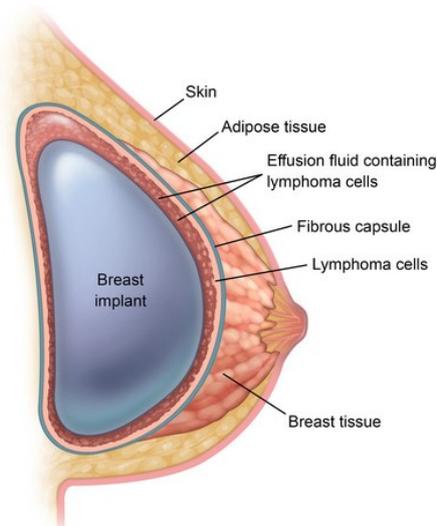


Figura 1.4 – Cellule di BIA – ALCL nel sieroma

Solitamente, l'intervallo di tempo che intercorre tra l'impianto e la conseguente diagnosi di tale linfoma varia tra i 2 e i 30 anni ed è stato rilevato che il sintomo più frequente associato al BIA – ALCL risulta essere il versamento o la presenza di un sieroma persistente attorno alla protesi [6]. Una volta effettuata la valutazione medica, se in condizioni di fase precoce, il trattamento standard per ogni paziente prevede la rimozione chirurgica completa del dispositivo della mammella colpita e della capsula formatasi attorno ad esso.

Nonostante il numero di casi di BIA – ALCL resti estremamente basso (se ne contano circa 800 nel mondo a fronte di oltre 10-35 milioni di pazienti con impianti protesici) è fondamentale richiamare l'attenzione su possibili alternative alle protesi mammarie e indirizzare la ricerca scientifica verso lo studio di materiali alternativi che permettano di eliminare definitivamente questo rischio.

Come tutti i dispositivi impiantabili anche quelli utilizzati nella ricostruzione del seno sono spesso soggetti a **usura** e pertanto è necessario ricorrere alla loro sostituzione; questa avviene in media dopo 12/15 anni dall'operazione [3]. È importante considerare inoltre l'invecchiamento e la variazione di conformazione della mammella la quale, con il passare del tempo, potrebbe non essere più adatta alla protesi mammaria in seguito a cambiamenti delle condizioni fisiche delle pazienti o a cambiamenti ormonali.

È fondamentale valutare anche il rischio di **rottura** dell'impianto che può essere determinato da un particolare trauma o dall'usura del dispositivo, indipendentemente dalla quantità di tempo trascorsa dall'operazione di ricostruzione. Risulta difficile da diagnosticare in quanto l'evento non è evidente o visibile dall'esterno ma può ugualmente causare prurito, bruciore e senso di fastidio e può essere accertato tramite un'ecografia o una risonanza magnetica. Come affermato precedentemente, in caso di rottura le proprietà del gel di silicone permettono di evitare la fuoriuscita del materiale interno della protesi ma si deve comunque affrontare in breve tempo l'intervento chirurgico di rimozione del vecchio dispositivo ed eventualmente di inserimento di quello nuovo.

La rottura dell'impianto può essere ricondotta anche ad un'errata progettazione, ad esempio determinata dall'utilizzo di un rivestimento troppo sottile e di un silicone più fluido scelto per ottenere una maggior naturalezza al tatto.

Vi è poi il rischio di trasudazione della protesi (più frequente per quelle di vecchia generazione) strettamente legato alla natura dell'involucro adottato: la presenza di particelle più piccole con numero inferiore di legami tra le catene permettono una diffusione delle microparticelle attraverso la membrana di rivestimento verso la capsula periprotetica. In questo modo si ha quindi il passaggio di una piccola quantità di silicone all'esterno del materiale di rivestimento dell'impianto pur in assenza di una sua rottura o usura.

Dalla raccolta dei dati statistici mondiali si può affermare che in ambito estetico la mastoplastica additiva rappresenta il 16% circa delle procedure inerenti alla chirurgia plastica – sono state più di 1.600.000 le operazioni effettuate in tutto il mondo solo nel 2020 – mentre, per quanto riguarda quella ricostruttiva, le protesi mammarie sono utilizzate nell'80% degli interventi con lo scopo di ripristinare forma e funzionalità delle mammelle trattate per ragioni oncologiche [7].

Ad oggi sono stati istituiti molteplici registri di protesi mammarie a livello internazionale e ciò rende complicata un'analisi volta a conferire valore scientifico ai dati raccolti per la difficoltà di raggiungere un'adeguata copertura del territorio.

Tuttavia, a livello nazionale, nel periodo dal 25 marzo 2019 al 31 agosto 2021 è stata svolta la “*fase pilota*” del *Registro nazionale degli impianti protesici mammari*, entrato in vigore ufficialmente il 2

febbraio 2023 e alimentato con i dati provenienti dai registri nazionali. Nel periodo citato sono state registrate più di 7.700 procedure per un totale di 7.456 protesi impiantate e 1.966 dispositivi rimossi [7]. Tra queste il 25% riguarda interventi di sostituzione o rimozione dell'impianto; inoltre, si può distinguere tra il totale delle procedure il 60,2% relativo a finalità ricostruttive e il 39,8% associato invece alla chirurgia estetica.

Dall'analisi di tali dati in combinazione ai potenziali rischi sopraelencati, risulta quindi chiara la necessità di concentrare la ricerca scientifica sullo studio di nuove strutture protesiche e di materiali alternativi al fine di permettere un miglioramento dell'aspetto estetico, una riduzione dei casi di rottura, usura e trasudazione ed una notevole diminuzione dell'incidenza di contrattura capsulare. Negli ultimi anni sono sempre di più gli studi rivolti all'**ingegneria del tessuto mammario**, in particolare per quanto riguarda lo sviluppo di involucri tridimensionali per assorbire i microtraumatismi favorendo l'innesto del dispositivo e di scaffold tridimensionali biorisorbibili con l'obiettivo di rivoluzionare la chirurgia di ricostruzione del seno.

1.3 – Biomateriali e scaffold

I biomateriali sono materiali sintetici o di derivazione biologica progettati per un uso prolungato a contatto con mezzi biologici e con lo scopo di minimizzare le eventuali reazioni avverse da parte dell'organismo; infatti, il requisito fondamentale per la possibilità reale di un loro utilizzo pratico è la *biocompatibilità*.

È importante includere nella definizione di biomateriali non soltanto quelli legati alla realizzazione di impianti e dispositivi biomedicali, ma anche quelli relativi alla medicina rigenerativa e all'ingegneria tissutale. In questi ambiti sono state studiate tecniche che permettono la coltura in laboratorio, o talvolta anche a livello industriale, di linee cellulari e tessuti che possiedono le stesse caratteristiche del ricevente: in questo modo, le cellule e i tessuti *in vitro* vengono impiantati nel paziente per ripristinare le funzionalità compromesse senza dover utilizzare materiali biologici provenienti da donatori estranei e diminuendo quindi il rischio di rigetto. Durante queste procedure vengono spesso utilizzate composizioni di elementi cellulari e tissutali associate a biomateriali.

Pertanto, in generale, a causa della complessità delle reazioni cellulari in seguito all'impianto nel corpo di materiali estranei, nella realizzazione del biomateriale risultano fondamentali la progettazione, la sintesi, la selezione e la fabbricazione al fine di garantire l'imitazione dei tessuti viventi [8]. L'obiettivo è quello di ottenere un materiale *biomimetico*, ovvero in grado di riprodurre le funzioni dei tessuti biologici integrandosi al meglio con essi poiché nessun materiale è del tutto

inerte in ambiente biologico. L'interazione tra organismo e biomateriale è infatti un processo biunivoco, ciò significa che ogni materiale impiantato provoca una reazione da parte del corpo del paziente e allo stesso tempo viene attaccato da questo.

Nel caso di protesi mammarie lo scopo dei diversi biomateriali utilizzati è di sostituire ed aumentare il fine naturale del seno, attraverso un'interazione favorevole con il sistema biologico della paziente, ma anche di ridurre le reazioni infiammatorie avverse dell'organismo permettendo l'adesione cellulare e un'integrazione ottimale del dispositivo protesico nel corpo.

Per la realizzazione di tali obiettivi l'ingegneria dei tessuti si occupa di studiare le relazioni fondamentali tra struttura e funzione sia nei tessuti sani che nei tessuti malati dell'uomo per poter sviluppare sostituti biologici in grado di ripristinare, mantenere o migliorarne le funzioni.

Così come i tessuti funzionali del corpo umano possiedono specifiche proprietà meccaniche e strutturali, anche i costrutti ingegnerizzati prevedono l'utilizzo di sistemi di supporto artificiale per realizzare funzioni biochimiche uniche per lo scopo per il quale vengono ideati; tra questi il sistema più importante è lo **scaffold cellulare** [8]. Si tratta di una struttura artificiale o di derivazione da una sostanza naturale che funge da supporto alle cellule selezionate per essere impiantate nel corpo e sostituire così quelle con funzionalità compromessa.

Lo scaffold, arricchito con determinati segnali biochimici, deve fungere da matrice e permettere la crescita di tessuto biologico; per questo motivo, nella sua realizzazione, è necessario combinare i requisiti di biodegradabilità, bassa immunogenicità, struttura porosa e allo stesso tempo integrità strutturale [9]. In molteplici casi è necessario infatti che, una volta entrato in contatto con l'ambiente biologico, lo scaffold si degradi per il nuovo tessuto che si sta formando; oltre a ciò, altro requisito fondamentale da soddisfare per la maggior parte dei tessuti ingegnerizzati è lo stimolo all'adesione, alla proliferazione e al differenziamento cellulare in modo tale da garantire la rigenerazione tissutale e in seguito la sua integrazione.

I materiali compositi dello scaffold possono essere generalmente classificati in *biologici* e *sintetici* [9]: mentre i primi sono caratterizzati dal vantaggio di possedere già le sequenze segnale e i fattori di adesione e crescita tipici della matrice, i secondi permettono una maggiore riproducibilità nella produzione della struttura base. In ogni caso, entrambe le tipologie devono soddisfare un requisito fondamentale: il materiale deve essere facilmente lavorabile e deve permettere la sua sterilizzazione senza perdere le proprietà specifiche.

Una volta favorita la crescita di nuovo tessuto, per far sì che questo venga mantenuto, risulta di primaria importanza l'elevata porosità della struttura dello scaffold in modo da consentire la crescita

vascolare: i pori favoriscono l'interconnessione tra le cellule, che aderiscono così l'una all'altra, e lo scambio di sostanze di nutrimento e di scarto.

In sintesi, il vantaggio principale del design dello scaffold è di consentire la produzione di tessuto con caratteristiche fisiche e chimiche del tutto simili e biocompatibili con le proprietà del tessuto che si sta sostituendo: nel caso delle protesi mammarie si tratta del tessuto adiposo, il principale tra quelli costituenti il seno.

Si possono utilizzare molteplici materiali per la produzione di scaffold nelle applicazioni dell'ingegneria tissutale: tra quelli di origine naturale rivestono particolare importanza il collagene e l'acido ialuronico (componenti della matrice extracellulare), alcuni polisaccaridi (un esempio è il chitosano), diverse proteine, tra cui la fibroina della seta; tra quelli sintetici invece sono rilevanti alcuni poliesteri alifatici (acido polilattico e poliglicolico, policaprolattone), diversi idrogel e vari materiali ceramici (idrossiapatite).

1.3.1 – Scaffold biologici

Per quanto riguarda le protesi mammarie si osservano due esempi principali di possibilità di realizzazione di scaffold biologici, entrambi biodegradabili.

Nel primo caso si tratta di una struttura basata sul collagene: nel 2001 è stato pubblicato uno studio inerente alla rigenerazione del tessuto mammario autologo umano su una matrice biologica tridimensionale [8]. In particolare, sono state coltivate *in vitro* su un gel di collagene 22 cellule epiteliali mammarie umane con tessuto adiposo. Le cellule richiedono un materiale di tipo adesivo per sopravvivere ed è stato rilevato che il collagene di tipo I possiede un'eccellente struttura porosa e può così garantire la migrazione e la proliferazione cellulare. Negli esperimenti svolti è stata utilizzata come impalcatura una "gabbia" in polipropilene, impiantata nei cuscinetti adiposi bilaterali di coniglio, all'interno della quale è stata iniettata una piccola quantità di collagene di tipo I con spugna e soluzione fisiologica. Dopo 12 mesi lo studio ha riportato un significativo risultato consistente nella generazione di un notevole volume di tessuto adiposo da parte del tessuto circostante e nella comparsa di fattori di crescita essenziali per l'adipogenesi e l'angiogenesi – rispettivamente un processo di differenziazione cellulare e lo sviluppo di nuove cellule del sangue.

Tuttavia lo svantaggio di tale studio è rappresentato dal fatto che la struttura in polipropilene utilizzata è troppo rigida per il seno e soprattutto non è biorisorbibile; sono quindi necessari ulteriori approfondimenti per la creazione di uno scaffold ottimale.

Il secondo esempio di scaffold di derivazione biologica riguarda il tessuto decellularizzato: l'idea è di utilizzare una soluzione al fine di rimuovere completamente i componenti cellulari del tessuto adiposo trattato, lasciando soltanto la matrice extracellulare come struttura base dello scaffold.

Per favorire l'infiltrazione e la proliferazione degli adipociti (cellule del tessuto adiposo) in esso, e in generale la struttura complessiva del seno ricostruito, è fondamentale che l'impalcatura abbia proprietà biomeccaniche e di deformabilità simili a quelle del tessuto mammario nativo. È stato dimostrato che gli scaffold di tessuto adiposo decellularizzato – *DAT scaffolds* – provenienti da diverse aree del corpo di pazienti donne (mammella, regione addominale sottocutanea, deposito pericardico o residuo timico) sono caratterizzati tutti da proprietà lineari elastiche e iperelastiche simili e sono consistenti con il modulo di Young del tessuto adiposo del seno, il cui valor medio è pari a 3250 ± 910 Pa [9]. Ciò costituisce un notevole vantaggio in quanto significa che è possibile prelevare i *DAT scaffolds* da una qualsiasi delle aree sopracitate per poterli ottenere con simile rigidità e deformabilità in confronto a un seno naturale sotto carico gravitazionale dal corpo.

Ciononostante gli scaffold di natura biologica presentano importanti limiti che determinano la perdita di proprietà rilevanti del materiale: una degradazione enzimatica e idrolitica rapida e una forte risposta immunogenica *in vivo*. Per quanto siano state proposte varie tecniche per sopperire a tali svantaggi, i materiali biologici finora studiati non sono in grado di fornire il supporto meccanico necessario durante la rigenerazione e perciò la ricerca scientifica ha iniziato a concentrarsi anche sullo studio di materiali sintetici.

1.3.2 – Scaffold sintetici

Tra gli scaffold di natura sintetica studiati per poter essere utilizzati nella realizzazione di protesi al seno la maggior parte derivano dalla sintetizzazione di polimeri termoplastici e pertanto si possono suddividere a seconda delle loro strutture, costituite da idrogel o da un supporto solido.

Gli idrogel sono colloidali costituiti da catene polimeriche di molecole disperse in un'elevata quantità d'acqua; si tratta di composti tridimensionali che possono essere formati da elementi naturali ma anche artificiali come i siliconi e la poliacrilammide. Vengono ampiamente utilizzati come supporto per la crescita di cellule nell'ingegneria tissutale a causa della loro caratteristica fondamentale di biocompatibilità con i tessuti umani.

Analogamente alle impalcature biologiche, anche le molteplici proprietà degli scaffold sintetici permettono la proliferazione e la migrazione degli adipociti; in particolare, da uno studio riguardante

la rigidità del gel di poliacrilammide, è risultato che le matrici più favorevoli per gli scaffold sono quelle con rigidità simile al tessuto adiposo e possono quindi essere utilizzate nella sostituzione del tessuto mammario.

Inoltre, si è scoperto che gli idrogel hanno la capacità di svolgere un ruolo rilevante anche come sistema di trasporto dei farmaci. Ad esempio, sono stati sintetizzati idrogel derivati dalla curcumina in grado di rilasciare localmente curcumina attiva (CUR) in corrispondenza della degradazione dell'idrogel: la composizione più efficace al momento è risultata essere CUR₅₀PEG₅₀ (glicole polietilenico – PEG) in quanto garantisce un rilascio stabile di curcumina e un modulo di compressione simile a quello proprio del tessuto mammario. Infatti, dall'analisi *in vitro*, è emerso che CUR₅₀PEG₅₀ è caratterizzata da una citotossicità selettiva contro le cellule del cancro al seno, mentre non è stata mostrata alcuna citotossicità verso le cellule epiteliali umane primarie non cancerose (fibroblasti dermici) [9].

Ulteriori studi sono stati condotti anche su scaffold di schiuma morbida a base di poliuretano (PUF), le cui caratteristiche di resistenza alla fatica e di proprietà meccaniche regolabili, attraverso il rapporto tra PEG e segmenti di poliestere (PE), conferiscono ad essi la possibilità di essere utilizzati come riempitivi di idrogel per aumentare il volume del seno. Nel dettaglio, il rapporto ottimale si è verificato essere PUF 3/10 (PEG/PE) in quanto ha migliorato l'aspetto idrofilo degli scaffold favorendo un'efficace diffusione dei fluidi corporei.

Nel corso degli ultimi anni sono state create e analizzate diverse strutture solide di supporto; queste si basano sul fatto che un ambiente stabile dal punto di vista meccanico è un requisito fondamentale per il mantenimento del volume del tessuto ingegnerizzato.

Ad esempio, si è studiato che un'impalcatura in polimero polilattico creata con una stampante 3D ha reso possibile la personalizzazione non solo della forma e delle dimensioni del seno ingegnerizzato, ma anche della morfologia interna, come la porosità e la dimensione dei pori per i singoli pazienti. Inoltre, è stato osservato *in vivo* per un ratto che tale scaffold è stato in grado di resistere alle forze di contrazione, senza alcuna perdita di massa, e di favorire la crescita di tessuto adiposo.

Tuttavia, lo svantaggio principale degli scaffold sintetici rispetto a quelli biologici è il processo di coltura dell'impalcatura stessa con cellule e componenti tissutali; come soluzione a questo problema è stata realizzata un'impalcatura ibrida combinando determinate funzioni caratteristiche di un polimero sintetico con quelle di matrici biologiche, ma si tratta di una procedura costosa per produrre un biomateriale altamente complesso.

Dagli esempi riportati e da numerose altre ricerche condotte di recente si può facilmente osservare come si stanno studiando sempre più scaffold prodotti con materiali biocompatibili e spesso anche biodegradabili per permettere alle pazienti di avere un seno più naturale possibile senza effetti collaterali.

È però importante distinguere non solo i materiali utilizzati nelle diverse possibili impalcature ma anche le due tipologie principali di **design di realizzazione** dello scaffold: questi possono essere infatti creati o come pattern superficiali di rivestimento della protesi (costituita al suo interno da materiali tradizionali già citati) o come intero impianto protesico. Mentre la prima modalità consente di migliorare la superficie del dispositivo al fine di avere una migliore integrazione con il tessuto nativo circostante, la seconda presenta un ruolo fondamentale nella rigenerazione autologa di tessuto adiposo mammario.

Ognuna di queste due tipologie presenta determinate caratteristiche e differenti vantaggi o svantaggi a seconda del processo di realizzazione, dei materiali utilizzati e del conseguente utilizzo in chirurgia estetica o ricostruttiva.

CAPITOLO II

SCAFFOLD SUPERFICIALI DI RIVESTIMENTO

2.1 – Introduzione

L'idea della realizzazione di scaffold superficiali di rivestimento per le protesi si basa sulle ipotesi verificate sperimentalmente secondo cui le superfici fabbricate in modo da imitare l'ambiente extracellulare fisiologico consentono una diminuzione della reazione infiammatoria al corpo estraneo modulando così la risposta immunitaria e permettendone una migliore da parte del corpo del paziente [10]. Nello specifico è stato osservato che, tramite la costruzione di un substrato con determinate caratteristiche fisiche, chimiche e strutturali, è possibile controllare specifiche e importanti funzioni cellulari.

Questi risultati possono essere quindi implementati ad esempio nella realizzazione di superfici di rivestimento delle protesi al seno, con il fine di favorire l'inserimento del dispositivo e ridurre al minimo le complicanze possibili quali la contrattura capsulare e la rottura dell'impianto.

Sono stati studiati diversi materiali biocompatibili che, opportunamente modificati, possono essere utilizzati con successo come rivestimenti delle protesi mammarie.

Nel seguito vengono poi riportati due esempi di possibili superfici, da studi di letteratura, che hanno mostrato risultati *in vitro* favorevoli.

2.2 – Topografie e controllo delle funzioni cellulari

Le cellule *in vivo* sono poste in un microambiente caratterizzato da molteplici complessi di segnali che rivestono particolare importanza in diversi processi cellulari. Le cellule, infatti, sono in grado di percepire e rispondere ad una grande quantità di segnali sia biochimici che biofisici, la maggior parte dei quali derivano dalla matrice extracellulare (o ECM). Quest'ultima costituisce il primo componente extracellulare dei tessuti e, tramite la sua struttura molecolare, presenta numerosi segnali fisici geometricamente definiti e tridimensionali su micro- e nanoscala noti come **topografie** [11].

L'ECM è una struttura complessa composta da proteine e polisaccaridi come ad esempio collagene, che contribuisce alla rigidità meccanica del tessuto, proteoglicani, glicoproteine e glicosamminoglicani; sono inoltre presenti elastina e fibronectina che permettono ai tessuti di subire deformazioni reversibili. Le proprietà fisiche, morfologiche e funzionali della matrice extracellulare svolgono un ruolo determinante nel comportamento cellulare: le cellule presentano sulla propria membrana dei recettori che trasducono le informazioni dirette provenienti dall'ambiente esterno in

segnali intracellulari per la variazione delle condizioni di proliferazione, migrazione, differenziazione e apoptosi [12]. Si tratta quindi di un processo di meccanotrasduzione che avviene tramite i meccanocettori posti sulla superficie cellulare. I segnali propri dell'ECM sono determinati da diversi fattori quali le proprietà chimiche, la rigidità e la topografia del microambiente esterno alla cellula; ognuno di questi segnali viene trasmesso su un'ampia gamma di scale di lunghezza.

Si possono quindi distinguere gli ordini di grandezza delle topografie in quanto si tratta di un aspetto che, in combinazione alle proprietà chimico – fisiche del substrato, differenzia la risposta cellulare:

- *scala nanometrica*: poiché presentano dimensioni analoghe, le caratteristiche topografiche influenzano l'organizzazione della singola cellula, dei suoi recettori e delle molecole di adesione;
- *scala micrometrica*: le topografie svolgono un ruolo determinante nella migrazione cellulare e nell'organizzazione dei tessuti.

Nonostante esistano diverse modalità di **interazione tra cellule e strutture topografiche** native, anche a seconda delle dimensioni e delle caratteristiche geometriche delle cellule, si può affermare che la più comune risulta essere un fenomeno noto con il nome di *contatto guida*: questo è in grado di influenzare tutti i comportamenti cellulari descritti in precedenza.

A partire dallo studio delle possibili relazioni tra cellule e microambiente fisico esterno sono state studiate varie tecniche di fabbricazione di substrati bidimensionali dotati di determinate proprietà in grado di controllare le funzioni cellulari. Si è verificato infatti che anche la topografia sinteticamente nano- e microfabbricata con caratteristiche simili a quella nativa può influenzare la morfologia cellulare, l'allineamento, l'adesione, la migrazione, la proliferazione e l'organizzazione del citoscheletro [13].

Le *tecniche di realizzazione* di micro- e nanotopografie sono molteplici: per generare quelle strutturate in modo casuale si utilizzano metodi classici quali ad esempio la sabbiatura, l'abrasione e la lavorazione meccanica; la microfabbricazione viene invece impiegata per ottenere topografie con struttura ordinata costituita da scanalature, pilastri e pozzi.

Un'altra importante modalità di fabbricazione è rappresentata dalla fotolitografia: il substrato da modificare viene ricoperto da un materiale fotosensibile che varia le sue proprietà con l'esposizione alla luce (solitamente di banda UV) e gli vengono quindi impresse opportune geometrie. Tuttavia si tratta di una tecnica costosa che richiede molto tempo e l'utilizzo di macchinari complessi.

Pertanto, si può notare come l'integrazione di segnali topografici nella progettazione e nella realizzazione degli scaffold rappresenti un importante attuale campo di ricerca.

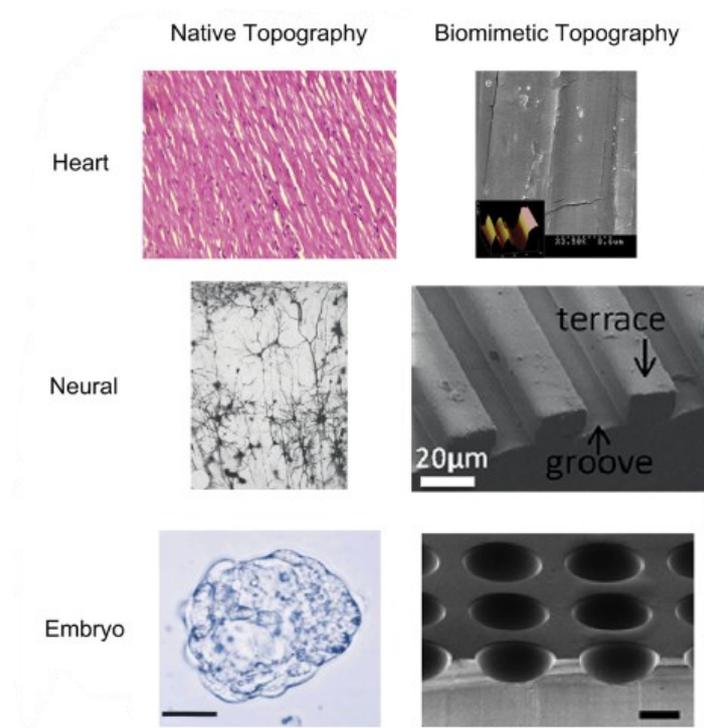


Figura 2.1 – Confronto tra microtopografie native e fabbricate di tessuti cardiaci (in alto), neuroni (al centro) ed embrioni (in basso)

L'effetto più osservabile della nanotopografia riguarda la geometria della *disposizione cellulare*: in risposta alla presenza di un reticolo in scala nanometrica numerosi tipi di cellule si allineano e si allungano simultaneamente nella direzione dell'asse del reticolo oppure, in taluni casi, anche ortogonalmente ad esso.

Nonostante sia ancora da chiarire con precisione la dipendenza della nanotopografia dall'*adesione* differenziale, si può affermare che il design della struttura sintetica può essere realizzato con l'obiettivo di imitare le proteine dell'ECM incluse il collagene, importante per l'adesione delle cellule di mammifero, le integrine e le caderine, rispettivamente coinvolte nel contatto cellula – ECM e cellula – cellula. L'adesione riveste un ruolo fondamentale per la sopravvivenza delle cellule; la maggior parte di esse infatti dipende dall'ancoraggio e richiede l'aderenza all'ECM o ad altre cellule per funzionare in modo fisiologico [11].

La *migrazione cellulare* è strettamente correlata alla presenza di segnali fisici e chimici nel microambiente esterno: in particolare, è regolata da un segnale che attiva il meccanismo e uno che guida la direzione del movimento. Le topografie dell'ECM rappresentano un fattore notevole nell'influenza di tale comportamento poiché si ipotizza che, a causa delle sue strutture fisiche e geometriche, vengano limitati i siti di adesione e diretto il fenomeno di contatto guida. Nelle cellule

coltivate su nanoreticoli, ad esempio, è stata osservata una migrazione distorta nella direzione dell'asse del reticolo e nel complesso una maggior velocità di tale fenomeno [11], [13].

Il controllo di questa funzione cellulare può risultare molto utile nel caso di dispositivi medici impiantati, in quanto uno dei principali motivi del loro fallimento è rappresentato dalla migrazione delle cellule infiammatorie ed endoteliali su di esso: l'obiettivo potrebbe dunque essere quello di modificare la superficie delle protesi per impedire tale fenomeno.

Le interazioni cellule – nanotopografia possono influenzare anche funzioni complesse quale l'*alterazione dell'espressione genica* di diversi tipi cellulari. Sono stati osservati in particolare gli effetti dell'utilizzo di strutture nanotopografiche per la coltura di fibroblasti: questi presentano livelli maggiori di mRNA di fibronectina con una stabilità più elevata ed inoltre mostrano una regolazione diffusa di diversi geni associati a iniziazione apoptotica, riparazione del DNA e regolazione della trascrizione [13].

Se si osserva questo importante effetto topografico in concomitanza all'impatto della topografia sulle funzioni cellulari è possibile verificare, ad esempio attraverso esperimenti condotti sulle cellule staminali mesenchimali umane, che la nanotopografia può essere impiegata come mezzo di segnalazione per dirigere la differenziazione.

Un ulteriore esempio di controllo di funzioni cellulari complesse riguarda la formazione di strutture multicellulari che dipende dall'interazione cellula – cellula la quale a sua volta può essere fortemente influenzata dalla modulazione del rapporto tra cellula e nanotopografia.

Nonostante i progressi nella progettazione delle micro- e nanotopografie per un'ampia gamma di materiali, i polimeri organici come acido polilattico (PLA), acido poliglicolico (PGA) e acido polilattico-co-glicolico (PLGA), molto utilizzati nelle applicazioni biomediche, presentano ancora importanti svantaggi come una rapida degradazione e un'elevata rigidità meccanica [13].

È chiaro dunque che risulta sempre più rilevante la ricerca di nuovi materiali, sia sintetici che naturali, per le interazioni cellula – nanotopografia in quanto queste svolgono ruoli determinanti nelle applicazioni dell'ingegneria tissutale.

Si può quindi affermare che le cellule interagiscono con le topografie tramite uno strato di ECM e capire come le proteine della loro superficie si adsorbono su tali substrati permette di comprendere le risposte cellulari [12].

Tuttavia è importante osservare, anche dagli esempi di controllo di funzioni cellulari riportati, come non siano ancora noti con precisione tali meccanismi di interazione poiché dipendono da numerosi

fattori quali il tipo di cellule, le composizioni di biomateriali e la disposizione delle caratteristiche topografiche coinvolte. Proprio per questo motivo, per studiare i comportamenti descritti e poterli in seguito applicare nella fabbricazione di substrati appropriati, si utilizza un *approccio* di tipo *fenomenologico* a seconda delle diverse situazioni considerate e dei materiali impiegati.

2.3 – Superficie in fibroina di seta elettrofilata

Recentemente, sempre più studi condotti sulla seta hanno dimostrato che si tratta di un eccellente biomateriale da poter utilizzare negli scaffold dell'ingegneria tissutale per superare le limitazioni dei materiali già esistenti. La seta si compone principalmente di due elementi, la fibroina e la sericina, entrambe proteine fibrose. In particolare, la **fibroina della seta**, estratta dalla seta del baco da seta, è una proteina naturale che presenta notevoli proprietà, tra cui biocompatibilità, minima immunogenicità, adattabilità a differenti formati (3D scaffold, hydrogel, film, nanofibre, ...) ed elevata resistenza meccanica [14]. È importante inoltre sottolineare che, oltre ad essere un materiale di facile accessibilità ed economico, può essere trattato con tecniche di lavorazione rispettose dell'ambiente.

È anche possibile combinare la fibroina con altri polimeri per ottenere scaffold composti di diverse tipologie e opportunamente lavorati al fine di promuovere le funzioni cellulari in precedenza descritte.

La seta più utilizzata nelle applicazioni biomediche è quella che origina dal baco da seta della specie *Bombyx mori*; la fibroina di seta che ne deriva presenta determinate caratteristiche fisico-chimiche e strutturali differenti da quelle della stessa proteina della seta di altre specie e insetti.

Dal punto di vista molecolare questa fibroina è costituita da una catena leggera (di peso molecolare $M_w \sim 26$ kDa) e una catena pesante ($M_w \sim 390$ kDa) legate da un ponte disolfuro. Tali catene polipeptidiche si trovano in conformazione β con disposizione antiparallela: la sequenza primaria è caratterizzata da un'elevata quantità di alanina e glicina e ciò permette di avere un foglietto β molto compatto, il quale contribuisce alle caratteristiche di rigidità e resistenza della struttura. Quest'ultima presenta infatti alta deformazione alla rottura, resistenza alla trazione e tenacità [14]. Tutte queste proprietà rendono la fibroina un materiale altamente biocompatibile: se utilizzata come rivestimento, permette l'adesione e la proliferazione cellulare sulla superficie dell'impianto protesico e causa riposte immunitarie nulle o trascurabili a seguito dell'inserimento del dispositivo.

Un ulteriore aspetto importante da valutare riguarda la biodegradabilità affinché gli scaffold vengano gradualmente sostituiti con le cellule e l'ECM native del paziente nel corso del recupero. Il processo

di degradazione della fibroina di seta è fortemente influenzato dal contenuto di strutture insolubili in acqua; in particolare si può verificare che il tempo di degradazione aumenta con l'aumentare delle strutture secondarie a foglietti β presenti [14]. Essendo una proteina, la fibroina risulta soggetta a degradazione proteolitica da parte di diversi enzimi e si è osservato positivamente come i frammenti che ne derivano non mostrino risposta immunogenica o reazione infiammatoria.

Sulla base di tutte queste considerazioni, è stato condotto uno studio sulla realizzazione di uno scaffold superficiale costituito da fibroina di seta elettrofilata che ha dimostrato ottimi risultati nel suo utilizzo come rivestimento di protesi al seno [15]. L'obiettivo alla base di tale progettazione consiste nella riduzione delle complicanze tramite un approccio multidisciplinare incentrato sulle proprietà meccaniche e sulla creazione di superfici biocompatibili. Si è visto infatti come, nonostante il silicone utilizzato come materiale esterno della protesi sia considerato inerte, gli effetti biologici conseguenti all'impianto possono spesso risultare molto evidenti; da qui deriva la necessità di valutare una superficie con nuova composizione chimica e strutturale. La fibroina della seta isolata dai bachi *Bombyx mori* risulta particolarmente adatta per tale applicazione a causa delle sue notevoli proprietà precedentemente descritte. Questa proteina combina **alta resistenza** ed **estensibilità** al fine di proteggere la protesi mammaria da danni meccanici e di permetterne una manipolazione piuttosto facile durante l'intervento chirurgico.

Per consentire un'integrazione positiva della protesi con il tessuto nativo circostante è necessario innanzitutto conoscere la composizione della capsula fibrotica che si forma attorno al dispositivo una volta impiantato: è costituita da tre strati principali ed il primo in particolare, prossimo alla superficie della protesi, presenta un'elevata quantità di fibroblasti e di macrofagi [16]. Al fine di interrompere la formazione della capsula e favorire la formazione di nuovo tessuto connettivo, devono essere apportate opportune modifiche alla composizione della superficie protesica. È necessario quindi ricreare su di essa l'ambiente naturale che permette la proliferazione dei fibroblasti, considerando che il diametro tipico delle fibre proteiche nella matrice extracellulare nativa varia da diverse decine a 300 nm; proprio per questo motivo è stata impiegata la tecnica dell'elettrofilatura.

Si osservano ora i materiali e le procedure utilizzate per la realizzazione di tale esperimento riportato nel lavoro di Valencia-Lazcano et al., *Enhancing surface properties of breast implants by using electrospun silk fibroin*, 2017, pubblicato in *Society for biomaterials* e in seguito i risultati ottenuti.

Materiali e metodi

Per questa ricerca è stata utilizzata una delle tipologie di dispositivi mammari protesici attualmente in commercio ed utilizzati in ambito clinico, ovvero un impianto di forma tonda riempito con gel di silicone coesivo e dal profilo di dimensioni intermedie.

Gli impianti mammari analizzati presentano superfici testurizzate realizzate in polidimetilsilossano (PDMS), un polimero della classe dei siliconi, e da ognuna di queste sono stati prelevati i campioni per i diversi test eseguiti. Questi sono poi stati sottoposti a sonicazione in acqua con detergente per 10 minuti e in seguito sciacquati in acqua distillata; tale procedura è stata ripetuta utilizzando acetone e poi etanolo. Infine i campioni sono stati asciugati all'aria e conservati in piatti di Petri fino al loro utilizzo.

A seguire è stata prelevata della seta del baco da seta di specie *Bombyx mori* e, attraverso un processo di *degumming* (letteralmente “eliminazione delle gomme”), è stato rimosso lo strato di sericina che riveste le fibre della seta. Queste sono state opportunamente trattate in una soluzione LiBr e, per avere una viscosità adeguata al processo di elettrofilatura, è stato aggiunto ad esse il 2.5% in peso di ossido di polietilene (PEO) ottenendo una soluzione finale di pH pari a 8 - 8.5 contenente il 2% di fibroina e il 98% di PEO [15].

L'**elettrofilatura** (o *electrospinning*) è un processo che, tramite l'applicazione di un campo elettrico ad alto potenziale, permette di ottenere fibre di piccolo diametro del polimero in soluzione considerato, in questo caso quindi il complesso fibroina/PEO. Il vantaggio principale di questa tecnica è dato dal fatto che consente di produrre fibre polimeriche estremamente sottili con diametri variabili tra alcuni nanometri e micrometri: queste nanofibre, rispetto alle fibre di maggiori dimensioni, presentano prestazioni meccaniche superiori e flessibilità nella funzionalità della superficie e pertanto possono essere usate come rinforzi in materiali compositi per numerose applicazioni biomediche [17]. Nello studio considerato è stato applicato alla soluzione fibroina/PEO un campo elettrico di 10 kV: la seta elettrofilata ottenuta è stata raccolta su una piastra di alluminio con la protesi mammaria attaccata ad essa [15]. Per la realizzazione di questa nuova superficie l'elettrofilatura rappresenta la tecnica più adatta in quanto consente di produrre una rete di fibre dello stesso ordine di grandezza di quelle dell'ECM nativa, imitando così il microambiente extracellulare naturale dei fibroblasti con grande biocompatibilità.

Una volta ottenuti gli scaffold del materiale desiderato si procede con la loro caratterizzazione morfologica, chimica e strutturale.

Per quanto concerne la prima, tramite microscopia elettronica a scansione ed alta risoluzione (SEM), sono stati misurati i diametri di 600 fibre su immagini con ingrandimento $\times 3000$ per ottenere il diametro medio e la dimensione dei pori superficiali [15].

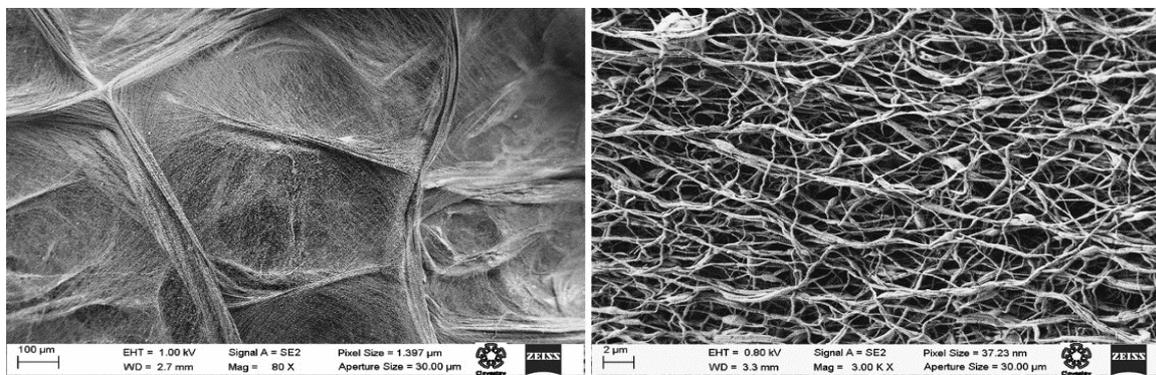


Figura 2.2 – Immagini SEM di fibroina/PEO su protesi al seno con ingrandimento $\times 80$ a sinistra e $\times 3000$ a destra

Nell'analisi chimica degli scaffold si è utilizzata la spettroscopia infrarossa in riflettanza totale attenuata (ATR - FTIR) per valutare la presenza dei gruppi funzionali di PEO e fibroina integrati.

È stato fondamentale esaminare lo sviluppo del rivestimento di fibroina/PEO dal punto di vista meccanico: questo è avvenuto attraverso prove di trazione imitando la manipolazione a cui le protesi sono sottoposte durante la procedura chirurgica di impianto. In particolare, sono state eseguite più prove di confronto tra impianti rivestiti e non per verificare effettivamente le eccellenti proprietà meccaniche della seta osservando se al nuovo impianto realizzato veniva conferita una maggior resistenza alla perforazione. È stato impiegato un *Texture Analyser* con celle di carico da 25 kg e campioni circolari, di diametro pari a 38 mm, montati orizzontalmente sul supporto: durante ogni prova una sonda piatta cilindrica è penetrata nel campione a una velocità costante di 1 mm s^{-1} e si sono registrati i diversi dati di forza per calcolare i parametri meccanici.

Un ulteriore parametro di notevole importanza modificato dalla fibroina di seta elettrofilata è la rugosità della superficie, la quale è stata misurata prima e dopo l'applicazione del rivestimento attraverso due parametri, la rugosità aritmetica (R_a) e il rapporto di aspetto della trama (Str), entrambi selezionati per valutare la topografia della superficie.

I fibroblasti impiegati, derivati dal seno, sono stati posti in coltura prima di essere seminati sulle superfici delle protesi; in seguito, i campioni delle protesi mammarie, sia rivestite che non, sono stati posizionati sui pozzetti di **coltura dei fibroblasti**. Dopo che la piastra contenente i pozzetti è stata sottoposta a determinate caratteristiche chimiche ed ambientali, si è misurata la vitalità dei fibroblasti

tramite test MTT, il quale consiste in un'analisi colorimetrica indicatrice della proliferazione cellulare e della citotossicità.

Risultati e discussioni del caso studio

Le osservazioni SEM sono state condotte per identificare la struttura delle fibre elettrofilate di fibroina/PEO: dalle immagini ricavate si osserva che, con uno strato di fibroina/PEO uniformemente distribuito sulla protesi, si ottiene una maglia fibrosa 3D che funge da rete su cui i fibroblasti possono muoversi e interagire tra loro e con l'impalcatura di fibroina (figura 2.2, lato sinistro). Osservando la stessa superficie ma con un maggior ingrandimento (figura 2.2, lato destro) si possono notare fibre continue aderite alla protesi mammaria che forniscono resistenza meccanica e elasticità al rivestimento. Il diametro medio risultante dalla misurazione casuale di 600 fibre è di $0,25 \pm 0,06$ mm mentre il diametro medio dei pori superficiali risulta essere di $0,76 \pm 0,34$ mm. Questa morfologia così descritta, dimostrata in seguito dai test meccanici, è responsabile di importanti proprietà strutturali come un elevato modulo di Young e il comportamento elastico della protesi [15].

Gli spettri di assorbimento infrarossi osservati hanno riportato bande tipiche sia dei gruppi amminici corrispondenti alla fibroina sia del PEO chiaramente distinguibili: ciò dimostra una riuscita integrazione di tali gruppi funzionali negli scaffold realizzati.

Dalla caratterizzazione meccanica si è ottenuto che il modulo elastico, quantificato come la tangente delle curve sforzo-deformazione e calcolato al 2% e al 6% delle deformazioni, è aumentato nel caso di impianti protesici rivestiti da fibroina/PEO. Ad esempio, al 2% di deformazione si è osservato, per le protesi rivestite, un considerevole **aumento del modulo di Young** da $0,392 \pm 0,02$ a $0,560 \pm 0,03$ MPa rispetto agli impianti non rivestiti [15].

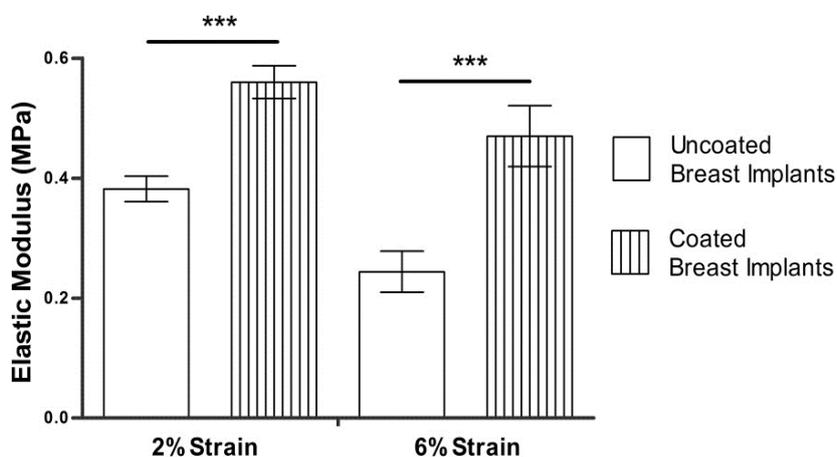


Figura 2.3 – Confronto del modulo elastico per impianti rivestiti di fibroina/PEO e non al 2% e al 6% di deformazione

Inoltre, è importante sottolineare che le protesi mammarie rivestite di fibroina/PEO presentano un maggior comportamento elastico – lineare rispetto a quelle non rivestite.

Per quanto riguarda la valutazione della rugosità superficiale, i risultati ottenuti suggeriscono che l'aggiunta di fibroina/PEO diminuisce la rugosità della protesi mammaria rispetto a quella texturizzata di partenza e crea una trama organizzata in modo casuale. Infatti, i parametri dell'elettrofilatura sono stati opportunamente controllati con lo scopo di ottenere fibre orientate in modo casuale le quali rimangono adese alla protesi durante il test di trazione; è stato dimostrato inoltre che questa disposizione migliora la vitalità cellulare [15].

Infine, dopo 24 ore di semina dei fibroblasti mammari su impianti rivestiti con fibroina/PEO e non, è stata esaminata l'attività di riduzione del Metil Tiazolile Tetrazolio (test MTT) che costituisce una misura di vitalità cellulare: in particolare è stata osservata una **maggiore proliferazione di fibroblasti** negli impianti che presentano la nuova superficie di rivestimento[15]. Questa può essere attribuita alle interazioni tra fibroblasti e fibroina, le quali forniscono un microambiente più favorevole rispetto al silicone. Si tratta di un risultato notevole in quanto si può affermare che il rivestimento di fibroina elettrofilata non ha influenzato la biocompatibilità delle protesi mammarie.

Nonostante l'adesione cellulare debba essere testata ulteriormente, è possibile concludere che il rivestimento di protesi con scaffold fibrosi di fibroina/PEO porta a un notevole miglioramento delle proprietà meccaniche e di biocompatibilità rispetto a quelle tradizionali caratterizzate dal guscio in silicone. Con l'utilizzo di questa nuova superficie esterna è possibile inoltre favorire la proliferazione e la vitalità dei fibroblasti su di essa, per permettere quindi la formazione di tessuto connettivo di supporto e una migliore integrazione della protesi nel corpo.

2.4 – Superficie biomimetica derivata da tessuto mammario umano

Per prevenire la contrattura capsulare e il rigetto del dispositivo estraneo inserito, una delle idee più sviluppate è appunto quella di funzionalizzare la superficie dell'impianto attraverso delle trame biocompatibili e specifiche per i tessuti mammari. Al fine di migliorare le prestazioni *in vivo* e produrre protesi al seno con elevata biocompatibilità, nel seguente caso riportato è stata modificata la superficie degli impianti tradizionali sulla base delle forme native presenti nel tessuto mammario. Lo studio da letteratura analizzato prevede infatti la realizzazione di una nuova superficie

biomimetica derivata dal tessuto mammario umano con l'obiettivo fondamentale di ridurre la reazione negativa delle cellule delle pazienti a queste superfici [10].

Si è visto che uno degli aspetti principali che influenzano lo sviluppo della contrattura capsulare risulta essere la struttura della superficie dell'impianto; sulla base di questa considerazione e sull'idea dell'ispirazione biologica è stato condotto questo studio per la creazione di un nuovo rivestimento.

Nel corso dell'evoluzione le superfici biologiche si sono sviluppate per produrre nano- e microtopografie altamente organizzate: l'imitazione di queste strutture naturali, definita con il termine **biomimetica**, è stata teorizzata per minimizzare la reazione al corpo estraneo e modulare la risposta immunitaria.

A tale scopo in questo studio è stato isolato del tessuto adiposo dall'interfaccia posizionata tra la ghiandola mammaria e il muscolo gran pettorale, per generare una nuova superficie di rivestimento delle protesi al seno. Dall'analisi di quest'ultima è emerso che il tessuto mammario è caratterizzato da una struttura superficiale intrinseca e misurabile la quale è poi stata modellata e generata per produrre una superficie secondaria finale, la **superficie adiposa modellata** [10].

L'idea alla base di questa ricerca è quella di verificare la promozione di adeguate risposte cellulari all'inserimento di un corpo estraneo tramite l'utilizzo di superfici con topografie specifiche di dimensioni tissutali maggiori, in grado di integrarsi con il tessuto mammario e di ridurre la disposizione planare dei fibroblasti, fattore che si ipotizza aumenti la contrattura capsulare. Queste macro – trame sono più grandi delle cellule che determinano la reazione da corpo estraneo ma sono relativamente lisce su micro- e nanoscala, ovvero al livello dove avviene il riconoscimento cellulare. Considerando l'importanza di entrambi questi livelli dimensionali, lo studio analizzato descrive il design di un impianto biomimetico caratterizzato da una trama primaria e una secondaria, entrambe ingegnerizzate al fine di indurre una risposta positiva all'inserimento di questo dispositivo.

Per valutare tale capacità, *in vitro*, sulle nuove superfici realizzate a partire da quelle prelevate sono stati coltivati macrofagi umani (macrofagi THP-1), in quanto si tratta delle cellule con l'effetto più potente sui processi di riparazione e rimodellamento [18]; in seguito, sono state eseguite le misure di morfologia, alterazione dell'espressione genica e citochine secrete per valutare gli effetti dei nuovi rivestimenti provenienti dal seno. Le citochine infatti, prodotte a causa dell'attivazione dei macrofagi da parte dell'organismo, sono proteine di collegamento tra i diversi tipi di cellule coinvolte nei processi infiammatori e immunitari.

Si descrivono ora i campioni e le tecniche utilizzate nella creazione dei nuovi rivestimenti riportati nel lavoro di Barr et al., *Development, fabrication and evaluation of a novel biomimetic human breast tissue derived breast implant surface*, 2017, pubblicato in *Acta Biomaterialia* e in seguito si discutono i risultati ottenuti.

Materiali e metodi

Il tessuto mammario di partenza è stato prelevato da tre pazienti e opportunamente integrato con amminoacidi e siero bovino fetale; i campioni finali sono stati ottenuti dopo accurate trattazioni chimiche e processi di lavaggio e fissazione.

Per la creazione della prima nuova superficie si è utilizzato un microscopio elettronico a scansione (SEM) dove i campioni sono stati montati e scannerizzati per determinare la loro caratterizzazione. Per quanto concerne la superficie adiposa modellata, questa è stata definita a partire dalla misurazione e dalla riproduzione delle caratteristiche statistiche della superficie adiposa originaria. In seguito, attraverso l'uso di diversi software e di un microscopio a forza atomica, si è caratterizzata la micro- e nanostruttura superficiale degli adipociti poiché, come si è visto, svolge un ruolo fondamentale nella regolazione dei comportamenti cellulari.

I dati raccolti da entrambe le caratterizzazioni sono stati trasferiti sul PDMS attraverso i processi combinati di **attacco ionico e fotolitografia**, la quale consiste nella riproduzione di determinate geometrie su un substrato, in questo caso il silicone, a cui viene sovrapposta una lamina fotosensibile poi illuminata per permettere il trasferimento delle trame desiderate. La lamina utilizzata è stata creata con opportune trattazioni chimiche e fisiche al fine di ottenere dapprima una trama primaria da poter applicare ad entrambe le superfici, e in seguito una secondaria per imprimere ad una delle due anche un livello di rugosità con proprietà simili rispetto a quelle del tessuto nativo.

Una volta ottenute le nuove superfici implantari in silicone si è proceduto con la loro caratterizzazione mediante microscopio a forza atomica (AFM), microscopio laser confocale e microscopio elettronico a scansione (SEM).

Le superfici di **coltura** per valutare la crescita dei **macrofagi** THP-1 sono state realizzate a partire dalle superfici fabbricate tramite diversi processi chimici e di lavaggio: le cellule monocitarie sono state coltivate in una soluzione apposita e poi trattate per facilitarne la differenziazione in macrofagi. Le **analisi** dell'espressione genica e della **citochina secreta** sono state eseguite dopo 12 e 24 ore, mentre l'immunocitochimica – ovvero l'identificazione della presenza di antigeni, in questo caso eseguita su fibroblasti e macrofagi – e l'osservazione al SEM dopo 24 ore.

Risultati e discussioni del lavoro analizzato

Dall'analisi ai diversi microscopi si è osservato che la superficie del tessuto adiposo mammario presenta piccole semisfere fitte e una rete di fibre di ECM che scorre sulla loro superficie (figura 2.4).

Questa morfologia strutturale è determinata dagli adipociti, che hanno mantenuto la loro natura sferica durante la fissazione e hanno così definito entrambe le superfici fabbricate. Le fibre di matrice extracellulare sono allineate in modo casuale per favorire l'integrazione degli impianti con il tessuto del seno [10].

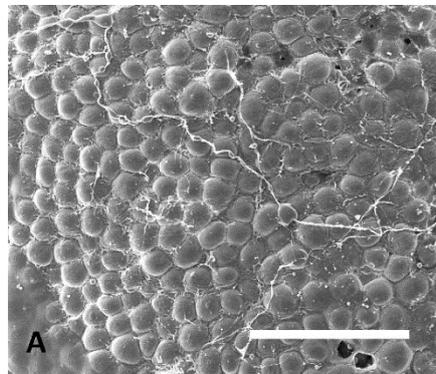


Figura 2.4 – Immagine SEM del tessuto adiposo nativo

Per replicare statisticamente la trama secondaria sulla nuova superficie sono stati misurati, con scansioni AFM, i profili di altezza degli adipociti, che, nonostante si presentassero variabili tra l'uno e l'altro, hanno permesso l'ottimizzazione dell'incisione della superficie adiposa modellata. In seguito, grazie alla misurazione confocale laser, si è dimostrato il trasferimento riuscito di tale superficie sul substrato di silicone.

Un ulteriore importante risultato che si è potuto notare è dato dalla **crescita di fibroblasti e macrofagi** di derivazione umana sulle nuove superfici in silicone: ciò significa che vi è stato un riconoscimento della macrostruttura superficiale e una conseguente adesione cellulare [10]. I fibroblasti vengono utilizzati per valutare la reazione *in vitro* delle protesi mammarie in quanto generano ECM ma soprattutto si differenziano in miofibroblasti, le cellule muscolari lisce contrattili che contribuiscono alla contrattura capsulare. Inoltre i fibroblasti sono impiegati come indicatori dell'allineamento cellulare, poiché questo, in combinazione alle superfici lisce, sembra svolgere un ruolo determinante nello sviluppo della capsula periprotetica. In questo studio i fibroblasti, reclutati dopo circa 24 – 48 ore dalla fine della fase infiammatoria, hanno aderito con la classica forma di fuso, come è visibile dalla figura 2.5, ma si osserva una differenza del loro posizionamento nelle due diverse superfici. In particolare, i segnali topografici di quella primaria li hanno spinti a disporsi a valle tra le forme emisferiche degli adipociti, rompendo così l'allineamento osservabile negli impianti a superficie liscia; ciò invece non vale per quella secondaria probabilmente in quanto viene mascherata la trama emisferica sottostante.

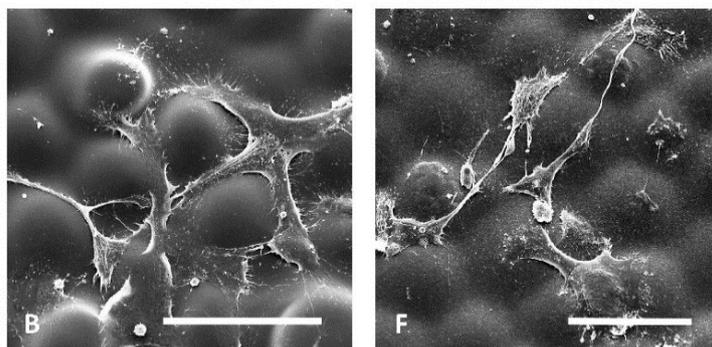


Figura 2.5 – Immagini SEM di fibroblasti a valle degli adipociti nella superficie primaria (a sinistra) e con disposizione casuale nella superficie adiposa modellata (a destra)

Per quanto riguarda i macrofagi, si osserva che la loro adesione non è vincolata alla topografia primaria sottostante mentre risulta influenzata da quella secondaria: queste cellule coltivate sulla superficie adiposa modellata presentano una minore diffusione rispetto a quelli presenti sulla trama primaria (figura 2.6).

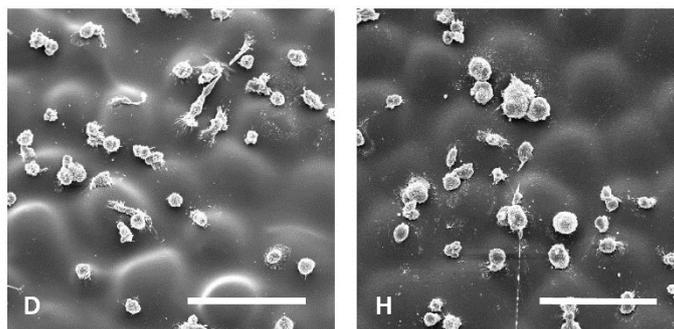


Figura 2.6 – Immagini SEM di macrofagi distribuiti diversamente sulla superficie adiposa primaria (a sinistra) e sulla superficie secondaria (a destra)

Si può osservare una differenza tra le due superfici anche a livello di **alterazione dell'espressione genica dei macrofagi** e dei profili delle citochine prodotte. In generale i macrofagi hanno fenotipi e funzioni diversi ma si possono classificare in due sottoinsiemi distinti: quelli attivati classicamente (M1) e quelli attivati in alternativa (M2), che producono citochine antinfiammatorie. È stato dimostrato che i macrofagi con un fenotipo M2/M1 più elevato riducono la reazione fibrotica all'impianto e perciò si sono osservati i geni e le citochine per valutare gli effetti che queste superfici hanno sull'influenza del fenotipo cellulare. Dall'analisi svolta e tramite un marker del fenotipo M2, è emerso che la superficie secondaria ha provocato una polarizzazione pro-M2 nei macrofagi THP-1 e un'espressione relativa maggiore del fenotipo M2 rispetto a quella presente nella superficie primaria [10]. Si può affermare dunque che la struttura della superficie modellata riduce la risposta

infiammatoria dei macrofagi poiché induce l'attivazione di un loro determinato fenotipo come risposta *in vitro* al biomateriale.

Più in generale i risultati ottenuti, seppur il loro vero effetto sia da valutare *in vivo*, permettono di sostenere che i due tipi cellulari analizzati sono influenzati dalla topografia della superficie e che la modulazione di questa risposta è possibile alterando la configurazione strutturale delle superfici dei biomateriali utilizzati per le protesi al seno indipendentemente dalle loro caratteristiche chimiche. Tramite il miglioramento delle trame dei materiali di rivestimento di questi dispositivi ed in particolare la realizzazione di superfici biomimetiche è quindi potenzialmente possibile mitigare la reazione infiammatoria del corpo in seguito all'impianto di materiali estranei.

CAPITOLO III

SCAFFOLD PER L'INTERA PROTESI

3.1 – Introduzione

Attualmente la principale alternativa all'utilizzo delle protesi per la ricostruzione o l'aumento del seno risulta essere la ricostruzione autologa, la quale consiste nell'impiego di tessuti propri della paziente (generalmente composti da cute e sottocute, o anche tessuto muscolare) che vengono prelevati da altre parti del corpo per poi trasferirli alla regione mammaria [19]. Questa tecnica consente di costruire una “mammella dinamica”, ossia soggetta a variazioni di forma e volume nel corso del tempo, analogamente a quanto accade per una mammella sana. Tuttavia presenta anche importanti svantaggi quali la cicatrice che permane dopo l'intervento, il lungo decorso operatorio e la necessità di un team microchirurgico esperto per interventi tecnicamente complessi.

Per questi motivi la ricerca sta studiando sempre più soluzioni autologhe nel campo dell'ingegneria tissutale: in particolare, vi è un crescente interesse nell'utilizzo del tessuto adiposo come materiale di riempimento autologo in quanto si tratta del principale componente del seno. A questo scopo però, si rende necessaria la progettazione di uno scaffold di supporto in grado di creare una struttura stabile e fornire sostegno alle cellule del tessuto adiposo durante il loro processo di rigenerazione.

È stata così sviluppata una nuova idea di protesi basata sull'impiego di uno scaffold per consentire la coltura cellulare e la rigenerazione dei tessuti molli, a partire dall'uso di innesti di grasso o di biomateriali naturali e sintetici.

Si analizzano nel seguito degli esempi di possibili scaffold, di materiali differenti, realizzabili come intera protesi che hanno mostrato buoni risultati nella rigenerazione adiposa mammaria.

3.2 – Rigenerazione adiposa

Il crescente interesse nell'utilizzo del tessuto adiposo autologo per un'efficace ricostruzione o aumento del seno è determinato dalle notevoli caratteristiche che esso presenta, quali la biocompatibilità, la versatilità, la non immunogenicità e le proprietà meccaniche simili a quelle del tessuto mammario [20]. Per rendere effettivamente possibile la rigenerazione del tessuto adiposo sono necessarie cellule staminali in grado di differenziarsi in adipociti maturi.

Le **cellule staminali** sono cellule non specializzate che hanno la capacità di trasformarsi in altri tipi di cellule, proprie dei diversi organi e tessuti, attraverso un processo noto come differenziamento

cellulare. Queste si trovano in quasi tutti i tessuti adulti ed anche in quello adiposo sono state identificate significative popolazioni di cellule staminali, le *adipose derived stem cells* (ADSC): in particolare, si è osservato che esse sono contenute all'interno della frazione stromale vascolare (SVF) [20]. Si tratta di cellule staminali mesenchimali, ovvero multipotenti e non ematopoietiche, che presentano caratteristiche simili a quelle che si possono trovare nel midollo osseo; a differenza di quest'ultime però, le ADSC sono più facili da isolare, attraverso tecniche meno invasive perché molto più accessibili, sono prodotte dal corpo in maggiore quantità e offrono una maggiore flessibilità nell'ambiente di laboratorio [19].

Le ADSC sono particolarmente adatte per la rigenerazione adiposa in quanto presentano le capacità di proliferazione e di differenziamento cellulare in adipociti maturi e garantiscono così la possibilità di ripristinare o aumentare il volume del seno. È stato dimostrato infatti che secernono importanti fattori di crescita per l'angiogenesi e l'adipogenesi [21], e proprio per questo è facile comprendere la loro importanza nel mantenimento del volume del tessuto trapiantato e rigenerato. Il processo di differenziazione delle ADSC prevede due fasi differenti: si ha una prima trasformazione in preadipociti e una successiva finale in adipociti maturi, i quali sono caratterizzati dall'accumulo di una gocciolina lipidica all'interno della cellula [20].

Per poter essere impiegate nell'ingegneria del tessuto adiposo, queste cellule staminali vengono tipicamente isolate dai lipoaspirati, ottenuti tramite le procedure di liposuzione: tali risultati vengono trattati con collagenasi, centrifugati e filtrati al fine di ricavare le ADSC. Ciò che si ricava infatti è la SVF, che contiene le cellule stromali comprese quelle staminali di interesse.

Come tutte le cellule, anche le ADSC necessitano di aderire all'ECM o ad altre cellule per la loro sopravvivenza. Tutti gli attuali approcci alla rigenerazione dei tessuti prevedono infatti l'utilizzo di scaffold di supporto bi- o tridimensionali al fine di consentire la coltura cellulare. Lo scopo principale è quello di realizzare tali strutture con biomateriali caratterizzati da **bassa immunogenicità** ed elevata tendenza alla **degradazione** o all'incorporazione nel tessuto ricevente: un'impalcatura ideale dovrebbe infatti rimanere intatta per un tempo sufficiente a garantire la formazione di nuovo tessuto, ma anche degradarsi a una velocità tale da rendere possibile la generazione di nuova ECM. Inoltre, è importante progettare questi scaffold in modo tale da permettere la crescita di tessuto con struttura fisiologica e biochimica equivalente a quella nativa; perciò, essi devono presentare minima deviazione strutturale e funzionale, oltre che a una flessibilità in grado di garantire sia l'integrità strutturale sia la crescita interna di nuovo tessuto e la manipolazione durante l'inserimento chirurgico [19]. Un ulteriore parametro fondamentale da valutare nella fabbricazione degli scaffold riguarda la **porosità**: si tratta di un aspetto estremamente necessario per la crescita vascolare e la differenziazione

se si considera che, durante questo processo, le ADSC subiscono delle alterazioni morfologiche che includono anche un notevole aumento del diametro cellulare.

Per quanto riguarda la differenziazione delle cellule staminali sui diversi supporti si può affermare che questa è determinata da complesse interazioni con il microambiente extracellulare. Come osservato in precedenza, i biomateriali degli scaffold sono in grado di guidare e controllare queste funzioni cellulari grazie alle loro proprietà meccaniche, chimiche e fisiche, svolgendo così lo stesso ruolo dell'ECM nell'interazione della cellula con l'ambiente circostante. Si può quindi comprendere come funzionalizzando le strutture di supporto, analogamente a quanto visto prima riguardo alle modifiche superficiali delle protesi, sia possibile regolare in questo caso la differenziazione cellulare e la determinazione del fenotipo finale.

In genere questi scaffold vengono realizzati sotto forma di spugne, idrogel, costrutti 3D o strutture elettrofilate [20].

Negli ultimi anni sono stati studiati sempre più materiali naturali e biologici da utilizzare per il supporto dell'adipogenesi a causa della loro principale caratteristica di biocompatibilità.

Ad esempio, la seta, grazie a tutte le notevoli proprietà descritte in precedenza, ha dimostrato risultati favorevoli sia *in vitro* che *in vivo*, con una degradazione lenta e controllata, ma anche con il mantenimento di adeguate proprietà meccaniche per la rigenerazione del tessuto adiposo [21]. In particolare, questi scaffold di fibroina di seta hanno consentito la proliferazione e l'infiltrazione di cellule staminali e hanno anche permesso un loro rimodellamento dopo essere stati impiantati.

Altri materiali che sono stati analizzati al fine di garantire alle pazienti procedure minimamente invasive sono il collagene e l'alginato (polimero di origine naturale) che, realizzati come microsferi seminate con ADSC, hanno supportato la formazione di nuovo tessuto adiposo in breve tempo [19].

Notevole importanza rivestono anche gli scaffold biologici realizzati con ECM decellularizzata, in quanto conservano il modello e le strutture naturali e determinano una minima risposta infiammatoria *in vivo*. Inoltre, tramite la semina di ADSC sul tessuto adiposo decellularizzato, è stato dimostrato che anche questi scaffold tridimensionali di derivazione biologica supportano la differenziazione adipogenica e i suoi principali regolatori senza il bisogno di ricorrere a fattori di crescita esogeni [20].

Tuttavia, vi sono diversi svantaggi che derivano dall'utilizzo di scaffold naturali: questi riguardano principalmente la rapida degradazione, la limitata resistenza meccanica e la necessità di modificare il materiale impiegato o di usarlo in combinazione ad altri. Per quanto riguarda quelli biologici invece la limitazione maggiore è data dal processo di decellularizzazione e da un conseguente rischio di immunogenicità se questo non è avvenuto correttamente.

Oltre ai materiali naturali citati, sono stati valutati anche numerosi polimeri sintetici per la rigenerazione dei tessuti molli, quali l'acido poliglicolico, il glicole polietilenico, il policaprolattone (PCL) e l'acido polilattico, a causa della possibilità di modificare facilmente la loro resistenza meccanica e rigidità. In particolare questi sono stati utilizzati per la progettazione di scaffold fibrosi dai quali si è osservato che, come accennato in precedenza, si tratta di strutture promettenti in quanto sono in grado sia di imitare l'ambiente ECM nativo sia di guidare la formazione del nuovo tessuto attraverso la differenziazione adipogenica delle ADSC [19]. Analogamente agli scaffold naturali, anche in questo caso le limitazioni principali sono rappresentate dal rapido tempo di degradazione e dalle modifiche da apportare ai polimeri per migliorarne le proprietà meccaniche e di crescita cellulare.

Gli scaffold attualmente in commercio, che sono stati valutati per una loro possibilità di utilizzo nell'ingegneria del tessuto adiposo, sono le spugne di collagene di tipo I e i gel di PLGA e di acido ialuronico [19]. I primi sono risultati essere i più adatti poiché hanno favorito la formazione di nuovo tessuto dopo essere stati modificati con le ADSC e il fattore di crescita dei fibroblasti.

Oltre all'adipogenesi, però, è di fondamentale importanza anche la valutazione degli effetti a livello cellulare delle strutture di supporto: attraverso modifiche nella composizione degli scaffold è infatti possibile osservare un loro impatto significativo sulla qualità del tessuto rigenerato.

Infine, è necessario che l'innesto impiegato per la rigenerazione del tessuto mammario mantenga forma, dimensioni e volume nel tempo dopo essere stato impiantato. A questo scopo, la **vascolarizzazione** rappresenta l'aspetto più rilevante, oltre che una delle principali sfide dell'ingegneria tissutale. È stato dimostrato che questa fornisce supporto a tutti gli scaffold e può essere favorita da due aspetti: il primo è dato dalla porosità e dalla rigidità dell'impalcatura stessa, il secondo è rappresentato dalla proprietà delle ADSC di promuovere la formazione di nuovi vasi sanguigni [20].

Nonostante siano sempre più numerosi gli studi in atto al fine di perfezionare il significativo potenziale rigenerativo delle ADSC, vi sono ancora diversi problemi che devono essere affrontati affinché l'ingegneria del tessuto adiposo possa essere utilizzata nella ricostruzione mammaria.

Innanzitutto, si è osservato che le tecniche di isolamento di queste cellule staminali richiedono un'ottimizzazione della sopravvivenza e della vitalità cellulare, poiché questi aspetti possono subire alterazioni dopo i processi di centrifugazione e lavaggio; in seguito, è importante stabilire quale sia il deposito ottimale di ADSC al fine di ottenere una resa cellulare maggiore e anche sicura dal punto di vista oncologico [20]. È stato osservato infatti che le ADSC possono potenzialmente contribuire al

supporto stromale per le cellule tumorali e rilasciare localmente dei fattori di crescita o delle citochine infiammatorie, facilitando così la crescita e la progressione del tumore. Questo problema deriva dalle stesse caratteristiche che rendono fondamentali le ADSC per la rigenerazione del tessuto adiposo e rappresenta quindi un'importante limitazione nella ricostruzione mammaria post-oncologica.

Tuttavia, vi sono studi contrastanti che descrivono differenti modi di influenza del comportamento del cancro al seno da parte di queste cellule staminali. Da alcuni studi condotti *in vitro* è stato ipotizzato che le ADSC possano soltanto promuovere lo sviluppo del carcinoma mammario già attivo e non innescare anche le rispettive cellule dormienti; da altre ricerche ancora si è dimostrata invece la capacità delle ADSC di inibire la crescita di cellule tumorali *in vitro* [21]. Nel futuro sarà pertanto necessario comprendere al meglio la complessità delle interazioni tra il tumore e l'ambiente circostante per poter valutare effettivamente la relazione tra le ADSC e il microambiente tumorale, e quindi la **sicurezza oncologica** di queste terapie di ingegneria tissutale.

Nonostante la necessità di dirigere la ricerca scientifica verso lo sviluppo di soluzioni di ingegneria tissutale sostenibili ma soprattutto sicure ed efficaci, è possibile quindi affermare il potenziale rigenerativo delle ADSC per la formazione di nuovo tessuto adiposo da utilizzare anche negli interventi di ricostruzione o aumento del volume del seno. Proprio per questo motivo di recente sono stati condotti sempre più studi sui diversi materiali che si possono impiegare nella realizzazione delle strutture di supporto per le cellule staminali. Questi possono avere importanti implicazioni anche nella ricostruzione mammaria, al fine di consentire la rigenerazione adiposa autologa e diminuire così il rischio di complicanze dovute all'impianto di materiali estranei.

3.3 – Scaffold 3D in poliuretano con design a reticolo cristallino

Una delle complessità principali proprie dell'ingegneria del tessuto mammario riguarda la mancanza di tecniche di fabbricazione di scaffold in grado di imitare al meglio la forma nativa del seno e le sue proprietà meccaniche uniche. Poiché le prestazioni biologiche degli scaffold e la conseguente modulazione dei diversi comportamenti cellulari dipendono dalle loro proprietà meccaniche, è possibile modellare la rigidità di queste strutture al fine di garantirne l'adattamento con il tessuto ricostruito e di mantenere la forma del seno desiderata. Per questi motivi risulta molto importante sia la selezione di materiali adeguati sia la scelta tra le diverse architetture possibili, le quali determinano notevoli differenze nelle proprietà meccaniche.

È noto che il modulo elastico di molti polimeri biocompatibili come PCL, PLA o poliuretano (PU) risulta essere elevato rispetto a quello della ghiandola mammaria e dei tessuti adiposi, mentre, per quanto riguarda i materiali naturali come l'alginato e le gelatine, questi sono troppo deboli e fragili per la progettazione di scaffold per il seno [22]. Nonostante queste proprietà possano essere modulate tramite una variazione del design delle strutture, sono necessari numerosi studi, anche *in vivo*, per comprendere effettivamente la relazione che intercorre tra l'architettura degli scaffold e le loro caratteristiche meccaniche.

A questo scopo è stato condotto uno studio per la realizzazione di uno scaffold per l'ingegneria tissutale costituito da una serie di celle unitarie simili a microstrutture cristalline isometriche. Questi sistemi sono caratterizzati da unità elementari di forma cubica, un elevato grado di simmetria e proprietà isotropiche, grazie alle quali è consentita la fabbricazione di scaffold di grandi dimensioni. L'idea di base di tale ricerca deriva dal fatto che le **architetture dei reticoli** influenzano in modo significativo le proprietà dei materiali cristallini e di conseguenza anche quelle delle impalcature che ne derivano: sulla base di queste considerazioni si può quindi affermare che è possibile modulare le strutture microcristalline per ottimizzare la loro applicazione nelle protesi al seno [22]. In particolare, in questo caso sono state studiate le **proprietà meccaniche** di tali tipologie di scaffold realizzati in poliuretano e come queste possano essere controllate a partire da modifiche applicate ai sistemi di microstrutture cristalline. L'obiettivo dello studio analizzato consiste nel comprendere al meglio le influenze di tali variazioni nelle prestazioni *in vivo* delle impalcature e nella loro ottimizzazione per ottenere strutture in grado di imitare meccanicamente il tessuto nativo mammario.

Si descrivono ora i materiali e le tecniche utilizzate nella fabbricazione di questi scaffold per l'intera protesi al seno riportati nel lavoro di Zhou et al., *Tuning the mechanics of 3D-printed scaffolds by crystal lattice-like structural design for breast tissue engineering*, 2019, pubblicato in *Biofabrication* e in seguito si osservano i risultati ottenuti.

Materiali e metodi

La realizzazione del **design cristallino** è stata eseguita con un software di modellazione 3D: le celle unitarie sono state progettate simulando le microstrutture cubiche a corpo centrato (BCC) e cubiche a facce centrate (FCC) a partire da studi svolti sui reticoli cristallini di diamante (BCC), tungsteno (BCC), cloruro di sodio (FCC) e rame (FCC). Le dimensioni di ognuna di queste celle sono state in seguito adattate per fare in modo che gli scaffold avessero tutti la stessa porosità.

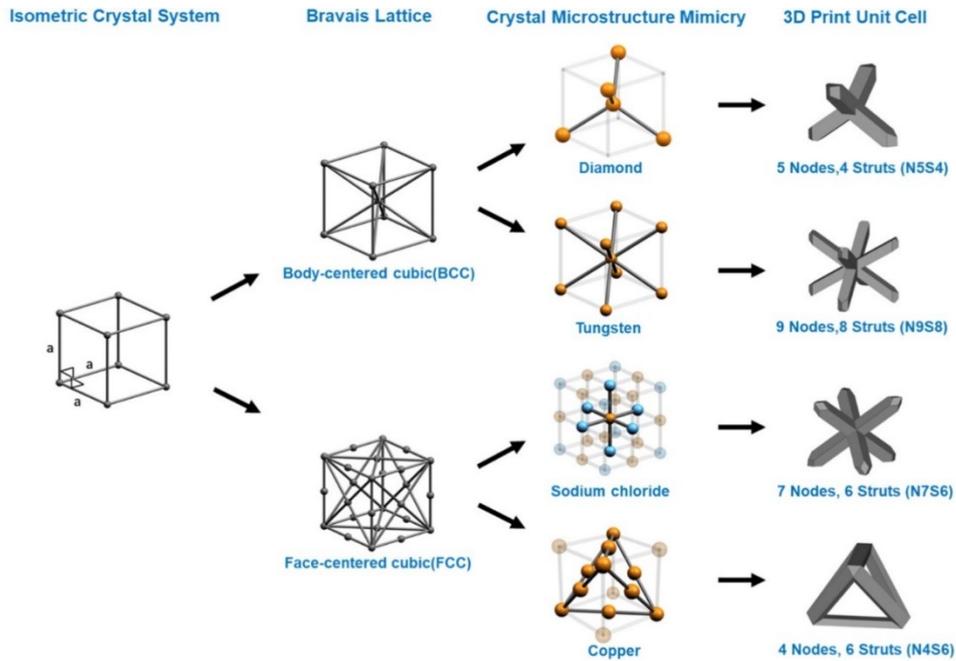


Figura 3.1 – Celle unitarie delle microstrutture cristalline

Una volta ottenute le unità elementari di base, sono state progettate le architetture delle intere impalcature: le celle sono state assemblate in diverse matrici di dimensione $10 \times 10 \times 10$ ed è poi stata modificata la forma di tali strutture utilizzando un modello di contorno a cupola per simulare così l'aspetto complessivo delle protesi mammarie commerciali.

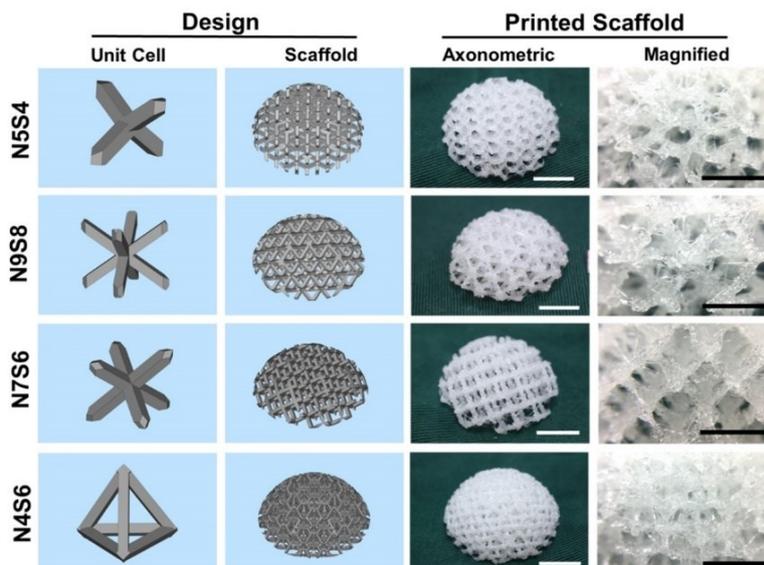


Figura 3.2 – Modelli di scaffold per il seno costituiti dalle celle unitarie impilate

A partire da questi modelli strutturali sono state impiegate delle procedure per la stampa 3D in linea con lo standard di gestione della qualità dei dispositivi medici, al fine di assicurare la possibilità di

utilizzo delle impalcature in ambito clinico. Queste tecniche sono state applicate a **filamenti termoplastici di poliuretano** precedentemente caratterizzati tramite la spettroscopia a infrarossi in trasformata di Fourier (FTIR). In seguito, gli scaffold assemblati utilizzando differenti tipi di celle elementari sono stati valutati attraverso la microtomografia a raggi X (microCT), una forma miniaturizzata della tomografia assiale computerizzata utile per creare mappe 3D di piccoli campioni con una risoluzione nell'ordine dei micron.

Per la caratterizzazione meccanica sono stati progettati e assemblati campioni cilindrici a partire dalle diverse celle unitarie: sono stati eseguiti test per la misura dei **moduli di compressione** e di compressione ciclica attraverso uno strumento di test dinamico completamente elettrico. Per quanto riguarda le prime prove, i campioni sono stati posizionati al centro di una piattaforma e poi compressi a velocità costante fino al 70% della loro altezza iniziale; si sono ottenute così le curve sforzo – deformazione dalla cui regione lineare è stato calcolato il modulo di compressione di ciascuno scaffold. I test di compressione ciclica invece sono stati eseguiti al fine di valutare le capacità di recupero della forma per ogni campione: inizialmente i cilindri sono stati compressi fino al 50% della loro altezza iniziale; in seguito il carico è stato rilasciato a una velocità costante fino alla completa assenza di forze. Sono stati svolti 10 cicli e le percentuali di recupero dell'altezza di ogni campione sono state misurate dalle curve di compressione ciclica ottenute.

Per questo studio sono stati condotti anche esperimenti *in vivo*: gli scaffold con modulo di compressione più alto (113.10 ± 2.49 kPa) e più basso (31.74 ± 3.38 kPa) sono stati infatti impiantati in esemplari femminili di ratto nudo atimico. Si tratta di topi da laboratorio caratterizzati dalla mancanza di un timo normale e di linfociti T funzionalmente maturi; per questo motivo sono spesso utilizzati nella ricerca poiché possiedono la capacità di ricevere diversi tipi di impianti di tessuti senza attivare il meccanismo di rigetto [23].

Prima dell'innesto le varie impalcature hanno subito un processo di sterilizzazione e in seguito sono state impiantate nelle tasche create appositamente; dopo un periodo di due settimane di prevascolarizzazione, in ciascuno scaffold sono stati iniettati 1,6 ml di tessuto adiposo umano, il quale è stato raccolto da pazienti sottoposte a liposuzione. Inoltre, per osservare un'eventuale sopravvivenza del grasso innestato in assenza di una struttura di supporto, in uno dei ratti è stata iniettata per via sottocutanea la stessa quantità di tessuto adiposo.

Tre mesi dopo l'**innesto di grasso**, per analizzare la rigenerazione del tessuto adiposo all'interno degli scaffold, è stato utilizzato l'imaging a risonanza magnetica (MRI) per ogni ratto. Immediatamente dopo è stata misurata anche la vascolarizzazione della mammella tissutale attraverso

la micro-angiografia computerizzata, la quale utilizza un mezzo di contrasto per studiare la circolazione sanguigna e in questo caso quindi l'irrorazione del seno.

Una volta ottenute le nuove mammelle dei topi realizzate con l'ingegneria tissutale, esse sono state raccolte e sottoposte ad analisi microCT e test di compressione. Questi ultimi sono stati eseguiti per valutare le proprietà meccaniche del seno realizzato: è stata acquisita la curva sforzo – deformazione, senza danneggiare i campioni di tessuto, e in seguito il modulo di compressione di ogni impalcatura. Inoltre si sono utilizzati degli scaffold che non erano mai stati impiantati *in vivo* come modelli di controllo e confronto.

Terminati i test di compressione, si è proceduto con l'analisi istologica dei campioni raccolti: è stata eseguita la colorazione con ematossilina eosina (EE), molto utilizzata nello studio microscopico dei tessuti animali, per la valutazione della forma e della percentuale sia del tessuto adiposo che del tessuto fibrotico.

Un'ulteriore analisi svolta è stata l'immunofluorescenza, al fine di osservare non solo la crescita della neovascolarizzazione e del tessuto adiposo, ma anche la distribuzione delle cellule infiammatorie. I campioni sono stati colorati con diversi anticorpi primari e in seguito sono state acquisite immagini ad alto ingrandimento tramite un microscopio.

Infine è stato eseguito uno studio di **simulazione agli elementi finiti** (*Finite Element Analysis* – FEA) con l'obiettivo di definire la relazione tra le varie impalcature e le proprietà meccaniche che ne derivano e di simulare la biomeccanica degli scaffold una volta impiantati *in vivo*. Si tratta di una tecnica di simulazione virtuale, ampiamente utilizzata nelle analisi ingegneristiche, che consente di valutare il comportamento strutturale dell'oggetto considerato tramite l'utilizzo di modelli che rappresentano il caso reale. In questo caso studio, per quanto riguarda i modelli di cella elementare, le simulazioni sono state realizzate sulle due unità utilizzate per la fabbricazione degli scaffold impiantati, al fine di misurare la loro risposta all'applicazione di un carico esterno. La compressione è stata applicata sulla faccia superiore di ciascuna cella e sono state così registrate la rispettiva tensione di Von-Mises e la deformazione totale, per poter confrontare la rigidità e la conformità di ogni unità elementare. È stata poi seguita una procedura analoga per valutare gli interi scaffold derivati da queste due celle; in particolare, sono state analizzate le prestazioni delle strutture quando impiantate per via sottocutanea e leggermente compresse dalla pelle circostante, ma anche nel caso di esposizione ad un'elevata forza esterna.

Risultati e discussioni del caso studio

I diversi scaffold sono stati realizzati con strutture identiche ai modelli progettati (figura 3.2) e la regolarità della porosità di ognuno di essi è stata verificata attraverso la ricostruzione microCT. Per questi motivi è possibile comparare le proprietà meccaniche dei diversi scaffold in poliuretano con quelle dei corrispondenti modelli virtuali.

Gli scaffold sono stati progettati con una porosità dell'86% poiché, per prima cosa, si tratta di un valore adatto per le applicazioni di ingegneria tissutale e, in secondo luogo, fornisce uno spazio sufficiente per l'innesto di grasso.

Una volta eseguita la caratterizzazione meccanica di tutti gli scaffold, per l'analisi *in vivo* ne sono stati selezionati due modelli, i quali presentano un notevole divario tra i moduli di compressione per poter ottenere così maggiori differenze nei risultati [22]. In particolare, è stato osservato che il modulo di compressione minore (degli scaffold più morbidi) è paragonabile a quello del tessuto mammario nativo e delle protesi in gel di silicone; tramite le prove cicliche di compressione si è verificato invece che tutte le strutture stampate in PU dimostrano una capacità di recupero della forma relativamente forte.

Dopo dodici settimane è stato dimostrato che tutti i ratti avevano tollerato al meglio gli scaffold impiantati, senza mostrare alcuna infezione postoperatoria o reazione da corpo estraneo, e che i contorni dei nuovi seni erano rimasti intatti.

Tramite MRI sono stati rilevati con segnale elevato i tessuti adiposi in tutti i piani osservati e in entrambe le mammelle, mentre le varie strutture di supporto non hanno mostrato alcun segnale. Nello specifico si è notato che, a differenza del seno realizzato con lo scaffold di modulo di compressione più basso, dove il tessuto adiposo è sopravvissuto bene, in quello con modulo di compressione più elevato era presente una maggiore quantità di cavità piuttosto che di grasso nella regione sottocutanea, come risulta visibile dalla figura 3.3.

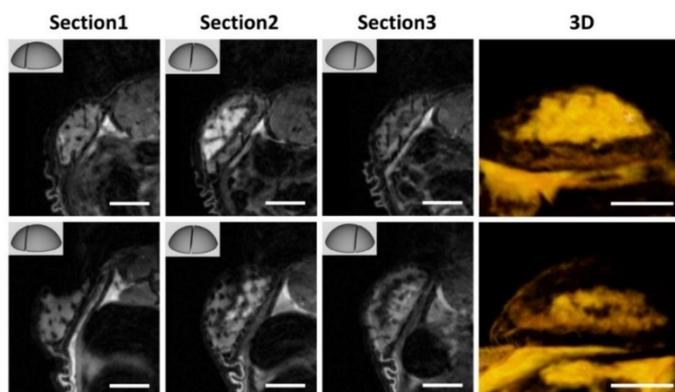


Figura 3.3 – Differenza tra le quantità di tessuto adiposo contenute nei due scaffold

Le due nuove tipologie di seno presentano quindi una notevole differenza nel tasso di ritenzione del volume di grasso innestato, che corrisponde a $73.1 \pm 25.5\%$ per il primo e a $45.6 \pm 14.0\%$ per il secondo [22]. Da questi risultati ottenuti è possibile affermare che lo scaffold con **modulo di compressione inferiore** favorisce in modo significativo la **ritenzione del volume di tessuto adiposo** innestato e permette così di ottenere un rapporto di volume del seno rispetto al corpo pari allo 0,98%, paragonabile allo 0,63% delle donne sane.

L'analisi quantitativa effettuata attraverso l'angiografia microCT ha permesso di affermare la presenza di vasi sanguigni intorno ai diversi scaffold, ma in entrambi non è stata raggiunta una densità vascolare significativa. Anche in questo caso la struttura a minore rigidità ha mostrato comunque una vascolarizzazione migliore: si è ipotizzato che quella a maggior rigidità generi più tensione e pressione sulla pelle e i muscoli adiacenti, compromettendo così l'afflusso di sangue locale nella nuova mammella.

Sia da un'analisi macroscopica, sia dalla colorazione con EE, è stato possibile osservare notevoli quantità di tessuto adiposo e di tessuto fibrotico in entrambe le impalcature: il primo si trova principalmente nella parte superiore e centrale, mentre il secondo circonda gli scaffold, com'è visibile dalla figura 3.4.

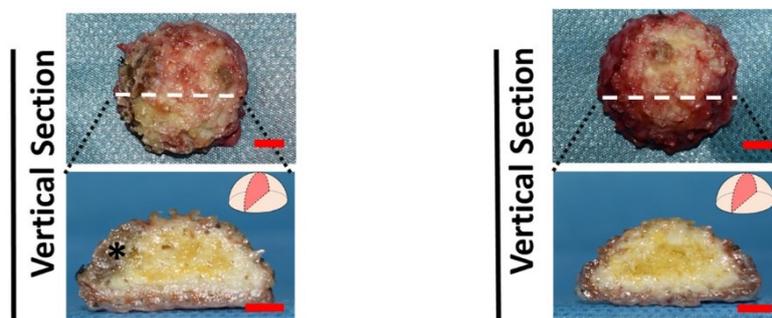


Figura 3.4 – Sezioni verticali delle nuove mammelle realizzate a partire dai due scaffold

Analizzando un'immagine ingrandita è stato verificato che lo scaffold con modulo di compressione più basso ha favorito una **maggior rigenerazione del tessuto adiposo**, con grandi quantità di adipociti dalla forma più regolare e di dimensioni superiori rispetto a quelli formati in presenza dell'altra impalcatura. Inoltre, si può notare che per la prima struttura il poliuretano si è integrato in maniera ottimale con il tessuto adiacente, mentre per la seconda è stata rilevata la presenza di massicce cellule infiammatorie attorno al PU.

Dagli esami istologici effettuati e dai risultati appena analizzati è stato possibile affermare perciò che la struttura con minor modulo di compressione favorisce la sopravvivenza degli adipociti e inibisce la formazione di tessuto fibrotico, ostacolando così lo sviluppo della contrattura capsulare.

Per quanto riguarda l'analisi del tessuto adiposo innestato senza scaffold di supporto, come si poteva prevedere, è risultato che questo non si è mantenuto nel tempo e non è stata favorita la sua rigenerazione a causa della mancanza della protezione data dall'impalcatura; inoltre, sono state osservate piccole macchie di tessuto fibrotico con infiltrazione di cellule infiammatorie.

L'analisi agli elementi finiti è stata svolta al fine di studiare con precisione se le differenze nelle proprietà meccaniche delle strutture fossero originate dalle diverse celle unitarie utilizzate; dai risultati ottenuti è stato possibile confermare quest'ipotesi. Attraverso la simulazione della risposta a un certo grado di spostamento o forza, si è potuto notare che l'unità elementare caratterizzata dal modulo di compressione più basso presenta una conformità al carico esterno superiore rispetto all'altra cella. Si possono ritrovare esiti analoghi anche dalla FEA eseguita sugli scaffold impiantati: è risultato che la struttura a maggior modulo di compressione possiede infatti una maggiore rigidità nell'assecondare le deformazioni imposte e, se sottoposto ad una forte sollecitazione esterna, presenta una maggior probabilità di rompersi, così come una capacità minore di recuperare la forma iniziale. Infine, sono state evidenziate ulteriori differenze tra le due strutture: lo scaffold più rigido presenta non solo una tendenza ad una deformazione globale rispetto a quella superficiale dell'impalcatura più morbida, ma anche una maggiore quantità di regioni ad alto stress, le quali probabilmente influiscono negativamente sulla rigenerazione del tessuto adiposo a partire dalle ADSC.

In conclusione è possibile quindi affermare che, a differenza della biomimetica, dove viene enfatizzata la simulazione delle strutture e delle funzioni biologiche, in questo studio il design del reticolo cristallino è stato utilizzato come modello di riferimento per la creazione delle impalcature. In particolare, nel caso analizzato, le numerose forme possibili del reticolo cristallino hanno permesso una progettazione diversificata delle celle unitarie stampate in 3D. Pertanto, mentre uno degli approcci dell'ingegneria tissutale volti a migliorare le proprietà meccaniche degli scaffold si concentra sullo sviluppo e sulla scelta di materiali adeguati, in questo caso è stata invece impiegata la strategia di modificare le architetture delle strutture per ottenere migliori prestazioni biologiche. È stata comunque verificata l'eccellente biocompatibilità del materiale sia *in vitro* che *in vivo*.

Nonostante l'esiguo numero di impalcature realizzate, i risultati ottenuti dalle analisi meccaniche e chimiche del lavoro riportato consentono di sostenere che gli scaffold a minor modulo di compressione, derivati dalla microstruttura reticolare del diamante, risultano particolarmente adatti per l'ingegneria del tessuto mammario ed hanno mostrato notevoli vantaggi nello studio sugli animali.

3.4 – Scaffold in idrogel

Dai numerosi studi svolti e dai lavori analizzati è quindi possibile affermare che per la rigenerazione dei tessuti, in questo caso quello adiposo, sono necessarie strutture di supporto in grado di fornire determinati segnali biochimici e biomeccanici. Negli ultimi anni sono state studiate sempre più strategie riguardo i diversi design e biomateriali possibili per gli scaffold: tra queste, una delle più importanti si basa sull'utilizzo degli **idrogel**. Essi rappresentano un gruppo di materiali caratterizzati da un reticolo polimerico tridimensionale idrofilo in grado di assorbire e trattenere elevate quantità d'acqua [24]: sono composti da catene polimeriche idrofile i cui legami incrociati (ionici o covalenti) determinano le loro caratteristiche strutturali. Sono considerati i materiali alternativi all'ECM naturale più promettenti grazie alla loro eccellente capacità di imitare al meglio quella dei tessuti nativi. Gli idrogel presentano una buona biocompatibilità, tassi di degradazione prevedibili ed ottime proprietà meccaniche; pertanto, risultano particolarmente adatti per la fabbricazione delle strutture di supporto dell'ingegneria tissutale. A questo scopo, dal punto di vista macroscopico gli idrogel devono fornire una sufficiente rigidità ed un'adeguata stabilità ai nuovi tessuti che si formano, mentre microscopicamente devono essere caratterizzati da particolari siti di attacco, segnali meccanici e fattori di crescita per consentire la crescita e la proliferazione cellulare [25].

È stato osservato come le proprietà meccaniche di uno scaffold possano influenzare non solo la differenziazione delle cellule staminali in determinati lignaggi cellulari, ma anche i diversi possibili comportamenti cellulari. Le caratteristiche meccaniche degli idrogel, come il comportamento viscoelastico, la resistenza alla trazione e la deformazione a rottura sono dettate principalmente dal grado di reticolazione del polimero. Diversi studi hanno analizzato l'effetto delle ADSC coltivate su idrogel composti da DAT che imita la rigidità del tessuto adiposo nativo: si è osservata la differenziazione di queste cellule staminali verso un fenotipo di adipociti maturi e verso marcatori adipogenici, senza la necessità di aggiungere fattori di crescita esogeni ai terreni di coltura [25].

Un aspetto fondamentale da valutare nell'utilizzo degli idrogel come materiali di realizzazione delle strutture di supporto è la degradazione: idealmente gli scaffold devono degradarsi alla stessa velocità di formazione del nuovo tessuto e di deposizione della nuova matrice extracellulare per mantenere costante la stabilità del tessuto durante la sua rigenerazione. Inoltre, i prodotti della degradazione devono essere non tossici e non devono attivare la risposta immunitaria, causando quindi un'inflammatione limitata.

Sono stati individuati tre **meccanismi di degradazione** dell'idrogel: idrolisi, scissione enzimatica e dissoluzione. Il primo consiste nella rottura dei legami chimici dovuta alla reazione con l'acqua;

perciò, si può notare come i tassi di degradazione di tali idrogel sintetici dipendano strettamente dalla loro composizione piuttosto che dall'ambiente circostante. La scissione enzimatica invece avviene tramite biomateriali naturali, ad esempio il collagene e l'acido ialuronico, e la sua velocità è influenzata dai siti di scissione interni agli idrogel e dalla presenza dei vari enzimi; infine, il processo di dissoluzione comprende lo sviluppo di diverse reazioni chimiche.

In generale il tasso di degradazione può essere modificato alterando la densità di reticolazione degli idrogel e caratterizzando la loro superficie con sequenze peptidiche sensibili ai determinati enzimi, i quali svolgono un ruolo fondamentale in questo processo.

Per utilizzare gli idrogel come materiali di composizione dello scaffold per l'intera protesi è necessario fare in modo che questi permettano l'inserimento di cellule vive all'interno della struttura. Tuttavia, è importante notare che i cambiamenti delle condizioni ambientali durante la formazione degli idrogel possono causare danni alle cellule prima del loro inserimento nello scaffold; perciò, si devono valutare i parametri di realizzazione degli idrogel per sviluppare una corretta strategia di **incapsulamento cellulare**. A tal fine, l'obiettivo è quello di modificare i polimeri reticolati imitando il più accuratamente possibile le biofunzioni dell'ECM attraverso l'aggiunta di molecole bioattive, come i peptidi adesivi, fondamentali per garantire l'adesione cellulare all'idrogel e quindi la sopravvivenza delle diverse cellule. Il peptide più impiegato per queste applicazioni è l'RGD, caratterizzato da una sequenza amminoacidica di arginina – glicina – acido aspartico che deriva dalle proteine dell'ECM e contiene i siti di attacco per le cellule incapsulate nello scaffold in idrogel.

Per permettere un'adeguata rigenerazione tissutale, è necessario inoltre che gli idrogel facilitino il trasporto di nutrienti e materiali di scarto all'interno e all'esterno della struttura tramite processi di diffusione [26]. Questa capacità è influenzata dalla porosità e dalla densità di reticolazione degli idrogel e risulta determinante per la vascolarizzazione dell'intero scaffold ed una conseguente longevità cellulare. Alcuni studi condotti in questo ambito hanno evidenziato la possibilità di modificare le proprietà meccaniche e aggiungere fattori di crescita alle strutture per permettere la formazione di una nuova rete di capillari [25].

Nel corso degli anni sono stati studiati sempre più tipologie di materiali da impiegare per la realizzazione degli idrogel. Essi possono essere distinti in base all'origine dei polimeri considerati in **naturali, sintetici e di derivazione biologica** ed ognuno di questi presenta particolari vantaggi e svantaggi.

Quelli naturali sono solitamente componenti dell'ECM nativo o hanno proprietà molecolari simili: tra i più importanti si individuano il collagene, l'acido ialuronico, l'alginato, la fibroina di seta e il

chitosano. Come si è visto in precedenza, i biomateriali naturali consentono di modificare le loro proprietà meccaniche e permettono un loro utilizzo in combinazione ad altri materiali per creare scaffold compositi con le caratteristiche desiderate; tuttavia, un'importante limitazione è rappresentata dalla rapida degradazione a contatto con il corpo umano e con i tessuti di coltura. Gli idrogel di derivazione naturale sono utilizzati per la rigenerazione del tessuto adiposo grazie all'elevata biocompatibilità, in quanto contengono la sequenza RGD, minime risposte infiammatorie e adeguate proprietà meccaniche [26].

Il **collagene** è un materiale altamente biocompatibile e biodegradabile, adatto soprattutto per la creazione di idrogel utilizzati per l'incapsulamento cellulare. Diverse ricerche hanno infatti dimostrato, come già citato precedentemente, la capacità delle microsfele di collagene e alginato di trattenere e poi rilasciare le ADSC per favorire la formazione di nuovo tessuto adiposo. In particolare però, è stato osservato che l'aggiunta di collagene di tipo VI agli idrogel risulta più vantaggiosa a causa di un maggior attaccamento degli adipociti e di un tasso di adipogenesi superiore rispetto a quella di collagene di tipo I [25].

L'**acido ialuronico** (HA) è un glicosamminoglicano naturalmente presente nell'ECM e svolge un ruolo fondamentale in numerosi processi biologici, come l'idratazione dei tessuti e la differenziazione cellulare. È importante sottolineare che, a causa di una sua rapida metabolizzazione *in vivo*, è necessario modificare l'HA al fine di favorire la crescita cellulare su di esso. Una possibile soluzione a questo è rappresentata dai derivati dell'HA reticolabili in modo covalente poiché essi dimostrano un'emivita biologica estesa e sono capaci di sopportare carichi meccanici elevati. Diversi studi riguardanti gli idrogel compositi di HA, con l'inclusione di biomateriali sintetici, hanno dimostrato variazioni del loro comportamento in funzione della temperatura. Ad esempio, una popolazione di ADSC è stata inserita all'interno di un idrogel HA – composito che garantisce la sopravvivenza di tali cellule e forma un gel opportunamente biodegradabile nelle condizioni fisiologiche presenti successivamente all'iniezione. Questo processo di gelificazione è avvenuto *in vivo* con l'aumento della temperatura al di sopra della temperatura critica della soluzione, scelta inferiore a quella fisiologica corporea [25]. Inoltre, è stato osservato che le cellule staminali hanno mostrato una buona sopravvivenza, oltre che una corretta morfologia per un breve periodo di tempo dopo l'impianto.

L'**alginato** è un ulteriore biomateriale utilizzato nell'ingegneria del tessuto adiposo tramite idrogel poiché ha una bassa tossicità ed è facilmente disponibile, ma, per interagire con le cellule umane, deve subire una modifica superficiale. Una volta che questa è avvenuta, gli idrogel di alginato *in vivo* sono in grado di trattenere e rilasciare ADSC, le quali vengono prima già differenziate in adipociti maturi, per la formazione di nuovo grasso.

Nonostante prima sia stato analizzato uno scaffold superficiale in **fibroina di seta** per protesi al seno, si può osservare come, proprio a causa delle sue notevoli proprietà, questa proteina possa essere utilizzata anche nella formazione di idrogel, in quanto garantisce stabilità e integrità strutturale a lungo termine. Infatti, è stato verificato che, creando un idrogel composito di fibroina di seta e DAT ed incapsulandovi cellule pre – endoteliali e preadipociti, la rigenerazione del tessuto adiposo è migliore in uno scaffold di idrogel contenente maggior fibroina piuttosto che DAT [25]. È possibile spiegare questo risultato con la teoria secondo cui risulta favorita la differenziazione adipogenica in un supporto che imita accuratamente il tessuto adiposo nativo.

Infine, il **chitosano** è stato ampiamente studiato nell'ingegneria del tessuto adiposo poiché è strutturalmente simile ai GAG naturali ed è degradabile dagli enzimi presenti nell'uomo. Gli idrogel che ne derivano sono particolarmente idratati e porosi e perciò possono facilitare il trasporto di nutrienti e rifiuti con lo scopo di favorire la vitalità cellulare a lungo termine. Inoltre, possono essere facilmente modificati per mimare meglio il tessuto nativo e per prevenire le irritazioni possibili causate dalla frizione che si può verificare dopo l'impianto.

I **polimeri sintetici** sono idrofili e generalmente inerti e, poiché non favoriscono né l'interazione proteica né le interazioni cellulari all'interno dell'idrogel, risultano ampiamente impiegati nella realizzazione di scaffold di idrogel per l'incapsulamento cellulare e il rilascio di fattori di crescita. Il principale svantaggio di questi polimeri è rappresentato dalla produzione di sostanze dannose a seguito della degradazione delle impalcature, con il conseguente rischio di sviluppo di risposte infiammatorie e complicazioni dopo l'impianto. Tuttavia, le loro proprietà chimiche e meccaniche facilmente modificabili li rendono particolarmente adatti nella rigenerazione adiposa: le caratteristiche di formazione degli idrogel e la loro densità di reticolazione infatti possono essere progettate tramite la modulazione dei polimeri sintetici per ottenere le proprietà desiderate. Per promuovere l'adesione e la proliferazione cellulare su tali strutture, la loro superficie viene solitamente caratterizzata utilizzando la sequenza RGD: è stato dimostrato che gli idrogel così realizzati non solo hanno supportato il differenziamento e lo sviluppo delle ADSC, ma hanno anche consentito un rimodellamento dello scaffold, aspetto molto importante che può contribuire ad una sua adeguata vascolarizzazione [25].

Tra gli idrogel di derivazione sintetica studiati per l'ingegneria del tessuto adiposo uno dei più importanti è quello a base di **PEG**, in quanto è caratterizzato da reti polimeriche idrofile in grado di assorbire grandi quantità di acqua e di permettere la diffusione illimitata di nutrienti e metaboliti a basso peso molecolare; inoltre, la loro somiglianza fisico – chimica con l'ECM nativa comporta una buona biocompatibilità.

Un ulteriore polimero sintetico studiato in questo campo è il **polietilenglicole diacrilato** (PEGDA), utilizzato per la realizzazione di idrogel di dimensioni e forma predefinite; una volta impiantati *in vivo* gli scaffold sintetici ottenuti hanno dimostrato la presenza di adipociti maturi sviluppatasi a partire da cellule staminali mesenchimali autologhe. Nonostante ciò, è stato osservato anche un importante aspetto negativo, il quale può influire sull'utilità del PEGDA come biomateriale per gli scaffold impiegati nella rigenerazione adiposa: questi polimeri risultano infatti più elastici del tessuto adiposo e la loro rigidità aumenta all'aumentare della deformazione [25].

Oltre ai materiali naturali e sintetici, nell'ingegneria del tessuto adiposo stanno diventando sempre più rilevanti anche gli scaffold costituiti da idrogel di derivazione biologica. Analogamente ai casi precedenti, anche questi biomateriali possiedono proprietà meccaniche modificabili per poter ottenere quelle di interesse.

In particolare, il **DAT** induce la proliferazione e la differenziazione adipogena delle ADSC umane ed è costituito principalmente da collagene di tipo I. Durante il processo di digestione, questo polimero può essere degradato in monomeri che, a determinate condizioni fisiche, possono polimerizzare creando così una rete idrogel. Il DAT è stato studiato sia come supporto all'interno degli idrogel per migliorare la sopravvivenza delle cellule fornendo loro una matrice adesiva, sia come sistema di idrogel senza cellule per la rigenerazione adiposa. In quest'ultimo studio è stato verificato che un supporto privo di cellule può attivamente reclutarle dai tessuti nativi grazie alla capacità del DAT di trattenere le proteine dell'ECM in seguito alla rimozione della componente cellulare dal tessuto. Inoltre, *in vivo* si è osservato che, in seguito al reclutamento, il DAT ha promosso la differenziazione delle cellule reclutate in adipociti maturi e quindi una significativa crescita del tessuto adiposo. Sebbene siano stati ottenuti numerosi risultati positivi dallo studio del DAT per queste applicazioni, sono nate importanti preoccupazioni, riguardanti il potenziale di immunogenicità e la presenza di agenti infetti, tali da concentrare la ricerca anche sull'ECM derivata da DAT con trattamenti fisici – chimici senza comprometterne morfologia e struttura. Questa ECM, contenente segnali biologici e chimici del tessuto nativo, una volta impiantata *in vivo* ha causato minime reazioni immunitarie dimostrandosi adatta per l'ingegneria dei tessuti adiposi autologa [25].

Verificata la capacità di tutti questi materiali di svolgere un ruolo importante nella creazione degli scaffold in idrogel per l'ingegneria del tessuto adiposo, è facile osservare come questi possano essere ulteriormente studiati al fine di esaminare i loro possibili vantaggi nella ricostruzione mammaria e poter individuare così quelli più adatti per tale applicazione.

Per quanto concerne le modalità di inserimento dello scaffold realizzato per l'ingegneria dei tessuti nel corpo umano, la procedura tradizionale presenta diverse limitazioni, quali l'impianto chirurgico,

un maggior rischio di infezione e la possibilità di avere un riempimento inadeguato del sito considerato. Per evitare dunque il fallimento dell'innesto, sono stati progettati gli **idrogel iniettabili**, i quali presentano notevoli vantaggi oltre che una maggior facilità di gestione. Questi, infatti, raggiungono profondità tessutali più elevate, vengono somministrati con un meccanismo minimamente invasivo e, una volta inseriti, si adattano efficacemente per riempire correttamente i margini del difetto e consentire così la vascolarizzazione del tessuto sano circostante. Inoltre, l'utilizzo di questi idrogel permette di ottenere una distribuzione più uniforme ed omogenea delle cellule interne a loro, garantendo una rigenerazione dei tessuti di qualità superiore.

In particolare, si distinguono tre tipologie di meccanismi di inserimento degli idrogel iniettabili: foto-reticolazione, sistemi a doppia siringa e idrogel termoreattivi. Nel primo caso, tramite l'ausilio di precursori e fotoiniziatori inseriti simultaneamente agli idrogel, attraverso la pelle viene applicata una luce ad alta intensità (visibile o ultravioletta) che avvia la reazione di reticolazione per formare l'idrogel. Con questo metodo, *in vivo* si sono osservati innesti efficaci con un mantenimento del volume inserito, ma anche lo sviluppo di reazioni infiammatorie attorno all'impianto. Per quanto riguarda i sistemi a doppia siringa, questi si basano sulla reticolazione mediata da enzimi e avvengono *in situ*; infine, i polimeri termoreattivi sono caratterizzati dalla capacità di formare gli idrogel a temperatura corporea (37°C) e di mantenere uno stato liquido a temperatura ambiente (25°C). Questi ultimi sono stati realizzati con diversi materiali e, tramite questi studi, è possibile dimostrare una buona biocompatibilità degli idrogel termoreattivi, in quanto è stata osservata un'elevata proliferazione e vitalità delle ADSC coltivate su di essi [25].

Un ulteriore notevole vantaggio proprio degli idrogel iniettabili, interessante anche nell'applicazione di questi meccanismi alla ricostruzione del seno, è la possibilità di somministrarli più volte nel sito di interesse in base alle necessità della singola paziente.

Poiché non sono ancora stati eseguiti tutti gli studi necessari per avere una rigenerazione completa del tessuto adiposo a partire dall'applicazione *in vivo* degli scaffold di idrogel, si osserva che l'utilizzo combinato degli idrogel iniettabili con la tecnica di trasferimento di grasso autologo risulta essere di notevole interesse. Con questa associazione è infatti possibile disporre di interventi (anche multipli) minimamente invasivi, protesi al seno di maggiore durata e un minore riassorbimento del tessuto adiposo rispetto a quanto riportato attualmente in letteratura per gli impianti mammari tradizionali. Inoltre, analogamente ai casi già visti, per poter prevenire l'insorgenza di contrattura capsulare a seguito dell'impianto degli scaffold, risulta di fondamentale importanza la scelta del biomateriale utilizzato per la formazione degli idrogel. Come tutti gli impianti oggi in commercio, anche questi nuovi scaffold possono generare nei tessuti un'infiammazione con un determinato pattern quando vengono iniettati. Tuttavia, nell'analisi delle soluzioni possibili a questo problema, è stato

studiato che utilizzando l'acido ialuronico come riempitivo delle strutture è stata rallentata la crescita di tessuto fibrotico attorno all'impianto e favorita invece l'adipogenesi [25].

In conclusione è quindi possibile affermare che gli idrogel offrono promettenti possibilità nell'ingegneria del tessuto adiposo, e conseguentemente nella ricostruzione mammaria, a causa dell'accurata imitazione dell'ECM e della capacità di formare strutture adatte all'incapsulamento cellulare. Nonostante si possano apportare diverse modifiche agli idrogel per ottenere architetture 3D che imitino al meglio il tessuto adiposo nativo, una delle limitazioni principali che permane è rappresentata dalla generazione di un adeguato volume di tale tessuto volto a migliorare notevolmente gli attuali metodi di ricostruzione o aumento del seno. Nel futuro perciò, per la realizzazione di tale obiettivo, sarà necessario poter combinare i principali vantaggi dei materiali naturali/biologici e sintetici, rispettivamente dati da un'ottima biocompatibilità e biomimetica e da una facile regolazione delle proprietà meccaniche dei polimeri che costituiscono gli idrogel.

CONCLUSIONI

Nel corso degli ultimi anni è aumentato significativamente il numero di interventi chirurgici volti a ricostruire il seno, in seguito ad una sua esportazione per ragioni oncologiche, o aumentarne il volume per motivazioni estetiche. Nonostante le protesi in silicone attualmente in commercio siano piuttosto adeguate per questa applicazione, l'ingegneria tissutale sta studiando nuove tecniche al fine di risolvere i comunque significativi problemi ed effetti indesiderati conseguenti all'impianto di questi dispositivi.

In questo lavoro sono stati riportati i due possibili design di realizzazione degli scaffold con dei relativi esempi di studi da letteratura.

Mentre la prima tipologia prevede la realizzazione di un rivestimento superficiale delle protesi tradizionali, per la seconda vengono fabbricate delle vere e proprie strutture di supporto alla formazione di nuovo tessuto adiposo. È possibile quindi innanzitutto osservare una notevole differenza tra i due design di scaffold: i primi si basano sull'idea di migliorare l'interazione e l'innesto delle protesi commerciali, tramite una loro caratterizzazione superficiale chimica e meccanica. Gli scaffold realizzati invece come intera protesi mammaria sono stati sviluppati al fine di sostituire completamente l'utilizzo dei dispositivi impiantabili con delle strutture in grado di favorire la crescita di tessuto autologo e di degradarsi senza causare danni al corpo. Proprio per questi motivi si può pensare che gli scaffold superficiali presentino una maggior facilità di realizzazione in quanto, sfruttando le protesi tradizionali, non è necessario occuparsi del mantenimento della forma e del volume nel tempo, ma esclusivamente di ottimizzare l'interazione tra il materiale di rivestimento esterno e il tessuto nativo circostante. Al contrario, nella fabbricazione degli scaffold come intera protesi, pur essendo più interessante poiché permette una rigenerazione adiposa completamente autologa consentendo così alla paziente di non avere materiali estranei nel corpo e di non doversi sottoporre a nuovi interventi nel futuro a causa dell'usura della protesi, è fondamentale affrontare il problema dell'innesto e della successiva generazione di un adeguato volume di grasso.

Per quanto riguarda invece i materiali impiegati per le due tipologie di scaffold, essi sono molto vari e in entrambi i casi possono essere di derivazione naturale, biologica e sintetica. Pertanto, la disponibilità, il costo del biomateriale utilizzato e delle procedure adoperate per la fabbricazione del relativo scaffold dipenderà dallo specifico caso studio esaminato. Ad esempio, la fibroina di seta, analizzata nel primo lavoro riportato, può essere ottenuta a partire da diversi organismi viventi e presenta facilità di fabbricazione e modificazione, così come anche un basso costo di produzione.

Se si considerano i due design di realizzazione applicati ai due ambiti del loro utilizzo, ovvero la chirurgia estetica e quella ricostruttiva post – oncologica, non si osservano differenze significative che portano ad effettuare la scelta di prediligere una tipologia di scaffold piuttosto che l'altra. In

entrambi i casi infatti la struttura superficiale di rivestimento ha l'obiettivo di favorire la crescita di tessuto connettivo e opporsi allo sviluppo della contrattura capsulare, mentre gli scaffold tridimensionali si occupano della creazione di microambienti adeguati e sufficientemente rigidi per la differenziazione adipogenica delle cellule staminali.

In conclusione si può affermare che, dai risultati ottenuti nei vari lavori riportati e dalle diverse considerazioni svolte, l'applicazione dell'ingegneria tissutale presenta ancora degli aspetti critici nonostante i molti effetti positivi dimostrati. Per numerosi studi, infatti, sono stati svolti esperimenti soltanto *in vitro* o comunque, per quelli condotti *in vivo*, non sono stati ottenuti sufficienti risultati tali da poter dichiarare una loro sicura efficacia. Nel futuro si renderà pertanto necessario applicare tali scoperte anche *in vivo* e non solo sugli animali, ad esempio con studi clinici a lungo termine, per poter comprendere al meglio le effettive interazioni tra gli scaffold e i tessuti nativi circostanti. Ciò sarà utile per poter valutare il costrutto ingegnerizzato prima dell'innesto e predire i suoi effetti, garantendo così la possibilità di determinare la soluzione migliore tra quelle possibili nel caso specifico della paziente considerata.

BIBLIOGRAFIA

- [1] L. Zhu, J. Zhu, Y. Qian, and H. Jiang, “Reduced capsular contracture with smooth and textured breast implants following submuscular mammoplasty: systematic literature review,” 2021, doi: 10.2217/fon-2021-0510.
- [2] F. S. di Pompeo, G. Paolini, G. Firmani, and M. Sorotos, “History of breast implants: Back to the future,” *JPRAS Open*, vol. 32. Elsevier Ltd, pp. 166–177, Jun. 01, 2022. doi: 10.1016/j.jptra.2022.02.004.
- [3] A. Kaderbhai, A. Broomfield, A. Cuss, K. Shaw, and A. K. Deva, “Breast implants - A guide for general practice,” 2021.
- [4] H. Headon, A. Kasem, and K. Mokbel, “Capsular contracture after breast augmentation: An update for clinical practice,” *Archives of Plastic Surgery*, vol. 42, no. 5. Korean Society of Plastic and Reconstructive Surgeons, pp. 532–543, Sep. 01, 2015. doi: 10.5999/aps.2015.42.5.532.
- [5] J. Y. Yang, C. W. Kim, J. W. Lee, S. K. Kim, S. A. Lee, and E. Hwang, “Considerations for patient selection: Prepectoral versus subpectoral implant-based breast reconstruction,” *Arch Plast Surg*, 2019.
- [6] Y. Wang *et al.*, “Current Progress in Breast Implant-Associated Anaplastic Large Cell Lymphoma,” *Frontiers in Oncology*, vol. 11. Frontiers Media S.A., Jan. 06, 2022. doi: 10.3389/fonc.2021.785887.
- [7] A. Campanale *et al.*, “Registro nazionale degli impianti protesici mammari – RNPM - Report ‘fase pilota’ 2019-202,” 2022.
- [8] M. Abdul-Al, A. Zaernia, and F. Sefat, “Biomaterials for breast reconstruction: Promises, advances, and challenges,” *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 14, no. 11. John Wiley and Sons Ltd, pp. 1549–1569, Nov. 01, 2020. doi: 10.1002/term.3121.
- [9] E. Donnelly, M. Griffin, and P. E. Butler, “Breast Reconstruction with a Tissue Engineering and Regenerative Medicine Approach (Systematic Review),” *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 48, no. 1. Springer, pp. 9–25, Jan. 01, 2020. doi: 10.1007/s10439-019-02373-3.
- [10] S. Barr, E. W. Hill, and A. Bayat, “Development, fabrication and evaluation of a novel biomimetic human breast tissue derived breast implant surface,” *Acta Biomater*, vol. 49, pp. 260–271, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.actbio.2016.11.052.
- [11] M. Nikkhah, F. Edalat, S. Manoucheri, and A. Khademhosseini, “Engineering microscale topographies to control the cell-substrate interface,” *Biomaterials*, vol. 33, no. 21. Elsevier Ltd, pp. 5230–5246, 2012. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.03.079.
- [12] J. Luo, M. Walker, Y. Xiao, H. Donnelly, M. J. Dalby, and M. Salmeron-Sanchez, “The influence of nanotopography on cell behaviour through interactions with the extracellular matrix – A review,” *Bioactive Materials*, vol. 15. KeAi Communications Co., pp. 145–159, Sep. 01, 2022. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.11.024.

- [13] C. J. Bettinger, R. Langer, and J. T. Borenstein, “Engineering substrate topography at the Micro- and nanoscale to control cell function,” *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 48, no. 30, pp. 5406–5415, Jul. 13, 2009. doi: 10.1002/anie.200805179.
- [14] B. Allardyce, Y. Nakazawa, G. Li, and S. Sun, “Silk Fibroin-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications,” 2022, doi: 10.3390/molecules27092757.
- [15] A. A. Valencia–Lazcano, R. Román–Doval, E. De La Cruz–Burelo, E. J. Millán–Casarrubias, and A. Rodríguez–Ortega, “Enhancing surface properties of breast implants by using electrospun silk fibroin,” *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, vol. 106, no. 5, pp. 1655–1661, Jul. 2018, doi: 10.1002/jbm.b.33973.
- [16] D. Wolfram, C. Rainer, H. Niederegger, H. Piza, and G. Wick, “Cellular and molecular composition of fibrous capsules formed around silicone breast implants with special focus on local immune reactions.,” *J Autoimmun*, vol. 23, no. 1, pp. 81–91, Aug. 2004, doi: 10.1016/j.jaut.2004.03.005.
- [17] V. Beachley and X. Wen, “Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length.,” *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, vol. 29, no. 3, pp. 663–668, Apr. 2009, doi: 10.1016/j.msec.2008.10.037.
- [18] W. K. Ward, “A Review of the Foreign-body Response to Subcutaneously-implanted Devices: The Role of Macrophages and Cytokines in Biofouling and Fibrosis.” [Online]. Available: www.journalofdst.org
- [19] E. J. Combella *et al.*, “Adipose regeneration and implications for breast reconstruction: Update and the future,” *Gland Surgery*, vol. 5, no. 2. AME Publishing Company, pp. 227–241, Apr. 01, 2016. doi: 10.3978/j.issn.2227-684X.2016.01.01.
- [20] N. O’Halloran, D. Courtney, M. J. Kerin, and A. J. Lowery, “Adipose-Derived Stem Cells in Novel Approaches to Breast Reconstruction: Their Suitability for Tissue Engineering and Oncological Safety,” *Breast Cancer (Auckl)*, vol. 11, p. 1178223417726777, Jan. 2017, doi: 10.1177/1178223417726777.
- [21] M. A. Banani *et al.*, “Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for breast tissue regeneration,” *Regenerative Med*, vol. 16, no. 1, pp. 47–70, Jan. 2021, doi: 10.2217/rme-2020-0045.
- [22] M. Zhou *et al.*, “Tuning the mechanics of 3D-printed scaffolds by crystal lattice-like structural design for breast tissue engineering,” *Biofabrication*, vol. 12, no. 1, 2020, doi: 10.1088/1758-5090/ab52ea.
- [23] B. Rolstad, “The athymic nude rat: an animal experimental model to reveal novel aspects of innate immune responses?,” *Immunol Rev*, vol. 184, pp. 136–44, Dec. 2001, doi: 10.1034/j.1600-065x.2001.1840113.x.
- [24] Q. Huang *et al.*, “Hydrogel scaffolds for differentiation of adipose-derived stem cells,” *Chem Soc Rev*, vol. 46, no. 20, pp. 6255–6275, 2017, doi: 10.1039/C6CS00052E.

- [25] N. A. O'Halloran, E. B. Dolan, M. J. Kerin, A. J. Lowery, and G. P. Duffy, "Hydrogels in adipose tissue engineering—Potential application in post-mastectomy breast regeneration," *J Tissue Eng Regen Med*, vol. 12, no. 12, pp. 2234–2247, Dec. 2018, doi: 10.1002/term.2753.
- [26] J. L. Drury and D. J. Mooney, "Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications," *Biomaterials*, vol. 24, no. 24, pp. 4337–4351, Nov. 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00340-5.