



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DELLA SALUTE DELLA DONNA E DEL BAMBINO

Corso di Dottorato di Ricerca: MEDICINA DELLO SVILUPPO E SCIENZE DELLA PROGRAMMAZIONE SANITARIA

Curricolo: EMATO-ONCOLOGIA, GENETICA, MALATTIE RARE E MEDICINA PREDITTIVA

CICLO: XXIX°

***Short bowel syndrome in età pediatrica:
dall'eziopatogenesi al trattamento***

Tesi redatta con il contributo finanziario dell'Associazione Puzzle Onlus

Coordinatore: Ch.mo Prof. CARLO GIAQUINTO

Supervisore: Ch.mo Prof. PIERGIORGIO GAMBA

Dottorando : Dr.ssa FRANCESCA GRANDI

INDICE

ABBREVIAZIONI.....	pag. 1
RIASSUNTO	pag. 5
ABSTRACT.....	pag. 9
INTRODUZIONE.....	pag. 13
1. La sindrome dell'intestino corto (<i>Short Bowel Syndrome</i>)	pag. 13
1.1 Fisiopatologia.....	pag. 13
1.2 Eziologia	pag. 15
1.3 Epidemiologia	pag. 15
1.4 Adattamento	pag. 16
2. Gestione multidisciplinare ed opzioni terapeutiche nel paziente affetto da SBS.....	pag. 18
2.1 Nuove prospettive terapeutiche: l'ingegneria tissutale.....	pag. 20
2.1.1 Gli strumenti dell'ingegneria tissutale.....	pag.20
a) <i>Cellule</i>	pag. 21
b) <i>Fattori di crescita</i>	pag. 24
c) <i>Scaffold</i>	pag. 25
2.1.2 Un esempio di ingegneria tissutale per il trattamento della SBS: il modello TESI	pag. 29
SCOPO DELLA TESI.....	pag. 31
MATERIALI E METODI.....	pag. 35
1. Progetto di Ricerca Clinica	pag. 35
1.1 La sottopopolazione campione: criteri di inclusione	pag. 35
1.2 Lo studio clinico.....	pag. 35
1.3 Analisi statistica	pag. 37
2. Progetto di Ricerca Sperimentale.....	pag. 37
2.1 Preparazione e caratterizzazione degli <i>scaffold</i> in PVA	pag. 37
2.1.1 Allestimento della soluzione di PVA nativo.....	pag. 37
2.1.2 Allestimento delle soluzioni di PVA ossidato	pag. 38
2.2 Realizzazione degli <i>scaffold</i> mediante <i>cross-linking</i> fisico	pag. 39
2.3 Caratterizzazione degli idrogeli mediante uno studio <i>in vitro</i>	pag. 40
2.3.1 Valutazione morfologica mediante SEM	pag. 40
2.3.2 Test di trazione (<i>Stress-strain</i> test)	pag. 40
2.3.3 Valutazione dell'indice di rigonfiamento	pag. 41

2.4. Caratterizzazione degli idrogeli mediante uno studio <i>in vivo</i>	pag. 42
2.4.1 Impianto degli idrogeli	pag. 42
2.4.2 Analisi istologica ed immunoistochimica degli espianti	pag. 42
2.4.3 Analisi ultrastrutturale degli espianti	pag. 43
3. Ottenimento della matrice intestinale acellulare	pag. 44
3.1 Espianto dell'intestino	pag. 44
3.2 Decellularizzazione dell'intestino.....	pag. 44
3.2.1 Valutazione dell'efficacia del processo di decellularizzazione	pag. 45
3.2.2 Caratterizzazione morfologica della matrice acellulare.....	pag. 45
4. Lo scaffold composito	pag. 46
4.1 Preparazione della matrice acellulare intera	pag. 46
4.2 Preparazione della matrice acellulare liofilizzata	pag. 46
4.3 Allestimento degli <i>scaffold</i> compositi.....	pag. 47
5. Valutazione dell'interazione tra scaffold composito e cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo.....	pag. 47
5.1 Colture cellulari.....	pag. 47
5.2 Valutazione delle colture cellulari al microscopio ottico.....	pag. 48
5.3 Semina di Ad-MSc su <i>scaffold</i> compositi	pag. 48
5.4 Valutazione di adesione proliferazione cellulare sugli <i>scaffold</i> compositi	pag. 48
6. Impianto di scaffold compositi in omento di ratto	pag. 49
6.1 Valutazione istologica ed immunoistochimica degli espianti	pag. 50
7. Analisi statistica	pag. 50
RISULTATI E DISCUSSIONE.....	pag. 53
1. Progetto di ricerca clinica	pag. 53
1.1 La casistica del nostro Centro	pag. 53
1.2 La sottopopolazione campione.....	pag. 54
1.3 Dosaggio della citrullina sierica e analisi statistica.....	pag. 55
2. Progetto di ricerca sperimentale.....	pag. 58
2.1 Caratterizzazione degli <i>scaffold</i> in PVA nativo ed ossidato	pag. 58
2.1.1 Proprietà meccaniche	pag. 58
2.1.2 Valutazione dell'indice di rigonfiamento	pag. 60
2.1.3 Biodegradazione <i>in vivo</i>	pag. 62
2.2 Ottenimento della ECM acellulare da intestino tenue di ratto	pag. 67
2.2.1 Prelievo di intestino tenue di ratto	pag. 67
2.2.2 Caratterizzazione della ECM	pag. 68
2.3 Allestimento e caratterizzazione del <i>bioscaffold</i> composito	pag. 69
2.3.1 Interazione tra <i>scaffold</i> composito e colture cellulari Ad-MSc	pag. 71
2.4 Studio del comportamento in vivo del <i>bioscaffold</i> composito.....	pag. 73

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE pag. 85

BIBLIOGRAFIA pag. 87

ABBREVIAZIONI

Ad-MSC	<i>Adipose tissue - Mesenchymal Stem Cells</i> - Cellule Staminali Mesenchimali da tessuto adiposo
ASC	<i>Adult Stem Cells</i> - Cellule Staminali Adulte
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i> - Fattore di Crescita basico dei Fibroblasti
BM-MSC	<i>Bone Marrow - Mesenchymal Stem Cells</i> - Cellule Staminali Mesenchimali da Midollo Osseo
BMP	<i>Bone Morfogenetic Protein</i> - Proteina Morfogenetica dell'Osso
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> - Gruppo [di elementi molecolari] di Differenziazione
CFU-F	<i>Colony Forming Unit-Fibroblast</i> - Unità Formante Colonie di Fibroblasti
CMM	Complesso Motorio Migrante
CS	Condroitina solfato
DAB	3,3'-diamminobenzidina
DAPI	4',6-diammidin-2-fenilindolo
dH₂O	Acqua deionizzata
ECM	<i>Extracellular Matrix</i> - Matrice Extracellulare
ESC	<i>Embryonic Stem Cells</i> - Cellule Staminali Embrionali
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GF	<i>Growth Factor</i> - Fattore di Crescita
GMA	Glicil-metacrilato
H/E	<i>Hematoxylin/Eosin</i> - Ematossilina/Eosina
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> - Antigene Leucocitario Umano

HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> - Cromatografia liquida ad alta prestazione
ICM	<i>Internal Cellular Mass</i> - Massa cellulare interna
IF	<i>Intestinal Failure</i> - Insufficienza intestinale
LILT	<i>Longitudinal Intestinal Lengthening and Tailoring</i> - Allungamento intestinale longitudinale su misura
MALT	<i>Mucosa associated lymphatic tissue</i> - Tessuto Linfatico Associato alla Mucosa
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cells</i> - Cellule Staminali Mesenchimali
MTT	bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NEC	<i>Necrotizing Enterocolitis</i> - Enterocolite Necrotizzante
NPT	Nutrizione Parenterale Totale
ON	<i>Over Night</i> - durante la notte
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> - Tampone fosfato salino
PCA	<i>poly(ϵ-caprolactone)</i> - poli- ϵ -caprolattone
PGA	<i>polyglycolic acid</i> - Acido Poliglicolico
PVA	Polivinil alcool
PVA Ox 1%	Polivinil alcool ossidato all'1%
PVA Ox 2%	Polivinil alcool ossidato al 2%
RT	<i>Room Temperature</i> - Temperatura Ambiente
SBS	<i>Short Bowel Syndrome</i> - Sindrome da Intestino Corto
SD	<i>Standard Deviation</i> - Deviazione standard
SEM	<i>Scanning Electron Microscope</i> - Microscopia a Scansione Elettronica
SI	<i>Swelling Index</i> - Indice di Rigonfiamento
STEP	<i>Serial Transverse Enteroplasty Procedure</i> - Procedura di Enteroplastica Trasversale Seriata

TAC	<i>Transient Amplifying Cell</i> - Cellula transitoriamente Amplificantesi
TE	<i>Tissue engineering</i> - Ingegneria Tissutale
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-β</i> - Fattore di Crescita Trasformante β
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> - Fattore di Crescita Vascolare Endoteliale

RIASSUNTO

La sindrome dell'intestino corto o *Short Bowel Syndrome* (SBS) in età pediatrica è una condizione di malassorbimento e dismotilità intestinali, conseguenza di rare malformazioni congenite o patologie acquisite, che comportino resezioni chirurgiche più o meno estese dell'intestino sino, nei casi più gravi, ad insufficienza intestinale.

Allo stato attuale, la gestione dei pazienti affetti da SBS è multidisciplinare; varie le possibili strategie terapeutiche: la nutrizione parenterale totale, la chirurgia di "allungamento intestinale" e, nelle fasi più avanzate della patologia, il trapianto di intestino. L'obiettivo primario di tutti questi approcci è quello di promuovere l'assorbimento intestinale, tuttavia nessuno di essi è scevro da complicanze capaci di inficiare la qualità della vita dei pazienti.

Sulla base delle precedenti considerazioni, questo Progetto di Ricerca si propone di identificare nuovi approcci per il *management* ed il trattamento della SBS. A tal fine, la ricerca si è sviluppata su due versanti: uno clinico e l'altro sperimentale.

Come noto, la gestione della SBS necessita di un attento *follow-up* dei pazienti da parte di un'equipe multispecialistica che sia in grado di monitorare, nel breve e nel lungo termine, le possibili complicanze nonché la svezzabilità del paziente dal supporto parenterale. In tale senso, nella parte di ricerca clinica è stata studiata e valutata l'attendibilità della citrullina come *marker* sierico della funzionalità intestinale residua; l'obiettivo è di proporre un impiego routinario esattamente come avviene per la creatinina nell'insufficienza renale e per le transaminasi nell'insufficienza epatica.

A tale scopo, all'interno del nostro campione di pazienti affetti da SBS e seguiti in *follow-up*, è stata individuata una sottopopolazione campionaria costituita da 10 pazienti inseriti in un programma di nutrizione parenterale ed enterale domiciliare, con età ≤ 5 anni e lunghezza intestinale residua (dopo chirurgia) ≤ 100 cm, che sono stati sottoposti a dosaggio della citrullinemia ad almeno 6 settimane di distanza dalla chirurgia.

I valori della citrullinemia sierica sono risultati essere correlati in maniera statisticamente significativa ($p < 0,01$) sia con la lunghezza intestinale residua di tali pazienti, che con la durata della loro dipendenza dal supporto parenterale.

In parallelo, la Ricerca Sperimentale ha rivolto l'attenzione verso una nuova disciplina medica: l'Ingegneria Tissutale. Quest'ultima è una scienza multidisciplinare che si propone di realizzare in laboratorio sostituti tissutali funzionalmente attivi attraverso l'impiego di *scaffold*, cellule e fattori di crescita. In particolare, in questa seconda parte del progetto di ricerca è stata investigata la possibilità di sviluppare uno *scaffold* bio-sintetico per applicazioni di ingegneria tissutale intestinale. Brevemente, sono stati realizzati, secondo un protocollo brevettato dal nostro gruppo di ricerca, dei nuovi idrogeli a base di polivinil alcol con un grado di ossidazione dell'1% e del 2%. L'obiettivo dell'ossidazione chimica è stato quello di conferire al biomateriale caratteristiche di biodegradabilità in confronto alla sua forma non ossidata. Dopo *cross-linking* fisico mediante *freezing-thawing*, idrogeli in PVA nativo e PVA ossidato sono stati caratterizzati per le loro proprietà morfo-meccaniche e biologiche, tramite analisi ultrastrutturali di microscopia elettronica a scansione, test di trazione, valutazione dell'indice di rigonfiamento e studio di biodegradazione *in vivo*. Queste indagini hanno dimostrato che la resistenza meccanica e la rigidità del polimero vengono modulate dalla modifica chimica, diminuendo all'aumentare del grado di ossidazione. Diversamente, l'indice di rigonfiamento e il tasso di biodegradazione sono tanto più elevati quanto più aumenta la percentuale dei gruppi carbonilici derivati dall'ossidazione. I risultati ottenuti hanno consentito di identificare nel PVA ossidato all'1% il polimero con caratteristiche morfo-meccaniche e di biodegradazione congeniali ai nostri scopi. Sulla base di questo, è stato allestito uno *scaffold* composito, costituito da PVA ossidato all'1% *cross-linkato* con matrice extracellulare intestinale decellularizzata (intera e omogenizzata): la combinazione del polimero (avente proprietà meccaniche e di biocompatibilità/biodegradazione ottimali) con la matrice bioattiva ha consentito di ottenere un supporto capace di favorire la crescita e la proliferazione cellulare. Brevemente, la realizzazione dello *scaffold* composito ha previsto l'espanto di intestino tenue da ratto adulto e la

successiva decellularizzazione del tessuto con metodo detergente-enzimatico secondo Meezan. Dopo aver valutato l'efficacia della procedura di decellularizzazione (marcatura con DAPI) la matrice acellulare è stata caratterizzata tramite colorazione con ematossilina/eosina. A seguito del *cross-linking* della matrice extracellulare (intera e liofilizzata) con l'idrogel in PVA ossidato all'1%, la capacità dello *scaffold* composito nel sostenere l'adesione e la proliferazione cellulare è stata indagata utilizzando cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo umano. A 7 gg dalla semina è stato possibile riscontrare una crescita cellulare significativa sugli *scaffold* compositi in confronto al solo supporto polimerico. Infine, sulla scorta del modello TESI (*Tissue Engineering Small Intestine*), tali *scaffold* sono stati impiantati in omento di ratti adulti, dimostrando, ad un *end-point* di 4 settimane, la capacità di generare uno pseudoepitelio composito con caratteristiche di tipo intestinale.

ABSTRACT

Short Bowel Syndrome (SBS) in children is a condition of intestinal malabsorption and dysmotility, caused by rare congenital malformations or acquired diseases, requiring extensive bowel surgical resection which in severe cases can lead to irreversible intestinal failure.

Nowadays, the management of pediatric patients affected by SBS is multidisciplinary, involving different possible strategies of treatment: total parenteral nutrition, surgical intestinal lengthening up to intestinal transplantation. The main aim of all these approaches is to promote bowel absorption, but none of them is free from complications that may impair children quality of life.

Based on these considerations, this Research Project aims to identify new options to manage and treat SBS. Hence, two aspects were considered: a clinical and an experimental one.

As known, the management of SBS patients requires a careful follow-up by a multispecialistic team, able to survey their possible short- and long-term complications and their progressive weaning from parenteral support. Considered this, the clinical part of this Research Project focused on the evaluation of citrulline as a reliable serum marker of residual bowel function. The goal was to verify the possibility of suggesting it for routine dosage in case of intestinal failure, similarly to creatinine in renal impairment and for transaminases in hepatic failure.

Briefly, we identified a sample population consisting of 10 SBS patients, age ≤ 5 years and residual bowel length (after surgery) ≤ 100 cm. Patients followed-up with parenteral and enteral nutrition programs and were subjected to citrulline dosages at least 6 weeks after surgery.

At the end of the clinical evaluation, we highlighted that serum values of citrulline are strongly related with both the residual intestinal length and the duration of their dependence on parenteral support ($p < 0.01$).

Likewise, the experimental research turned its attention to Tissue Engineering that is a new medical science which aims to achieve functionally active tissue substitutes by scaffolds, cells and growth factors.

The second part of the Research Project focused on the possibility to develop a bio-synthetic scaffold for tissue engineering applications in SBS. We manufactured, according to a protocol we patented, new hydrogels based on polyvinyl alcohol with a degree of oxidation of 1% and 2% respectively. The purpose of the chemical oxidation was to confer to the derived biomaterial a certain biodegradation rate. Hence, oxidized hydrogels obtained via physical cross-linking (freezing-thawing) were compared to native PVA hydrogels for their morpho-mechanical and biological properties by means of ultrastructural analysis with scanning electron microscopy, tensile tests, swelling index analysis, and *in vivo* biodegradation studies. These investigations showed that the strength and the stiffness of the polymer are significantly related to the chemical modification as they decrease along with the oxidation degree; conversely, the swelling and the biodegradation rate increase along with it.

The obtained results led us to identify in scaffolds prepared by using 1% Oxidized PVA the supports with the most adequate morpho-mechanical and biodegradation properties to our purposes. Hereafter, it was set up a composite scaffold in 1% Oxidized PVA cross-linked with decellularized intestinal extracellular matrix (ECM). The combination of the polymer with the bioactive matrix allowed us to obtain a support with good mechanical properties and able to promote cell growth and proliferation.

Briefly, the small intestine of adult rats was removed and decellularized according to the detergent-enzymatic protocol by Meezan. After having assessed the effectiveness of the procedure (DAPI staining) the acellular matrix was characterized by histological staining (hemotoxylin/eosin). Thereafter, the extracellular matrix (intact and homogenized) was crosslinked with 1% Oxidized PVA and the ability of the composite scaffold to support cell adhesion and proliferation was investigated using a primary culture of adipose mesenchymal stem cells. After 7 days from seeding, a significant cell growth on the composite scaffolds was observed in comparison with the nude polymeric support. Finally, based on of the TESI (*Small Intestine Tissue Engineering*) model, the scaffold was implanted in the omentum of adult rats; after 4-weeks, composite scaffolds

demonstrated their ability to induce the formation of a composite pseudoepithelial tissue with intestinal-like features.

INTRODUZIONE

1. La sindrome dell'intestino corto (*Short Bowel Syndrome*)

La *Short Bowel Syndrome (SBS)* è una condizione di malassorbimento intestinale quasi sempre conseguente a malformazioni congenite e/o a estese resezioni intestinali. Ne discende una diminuzione della lunghezza intestinale, la quale, se al di sotto di una certa soglia critica, determina una compromissione del corretto assorbimento di nutrienti utili all'accrescimento ed al mantenimento dell'omeostasi corporea¹.

Si ritiene critica una lunghezza intestinale residua inferiore al 25% di quella attesa per età gestazionale, ovvero la necessità di un supporto mediante nutrizione parenterale totale per un periodo > 6 settimane². La SBS può infatti portare ad insufficienza intestinale (*Intestinal Failure o IF*) dell'intestino residuo, una condizione clinica dovuta ad una varietà di patologie congenite o acquisite dell'intestino stesso, tra cui la resezione chirurgica, caratterizzata da una severa riduzione delle capacità digestive e di assorbimento oltre che dalla riduzione del trasporto transepiteliale di fluidi ed elettroliti³.

1.1 Fisiopatologia

La SBS comporta, come difetto primario, una ridotta superficie di assorbimento dovuta alla perdita di lunghezza intestinale. L'area superficiale della mucosa intestinale risulta quindi insufficiente a consentire un adeguato assorbimento di nutrienti, acqua, elettroliti ed oligoelementi, il che determina una progressiva riduzione delle idrolasi a livello dell'orletto a spazzola responsabili della digestione e dell'assorbimento dei carboidrati, un aumento dell'acidità e della secrezione gastrica secondaria a ipergastrinemia, ma anche fenomeni di malassorbimento dei grassi, ipersecrezione acida gastrica, perdita di elettroliti, insufficienza pancreatica, iperossaluria, litiasi biliare, epatopatia e osteopatia^{4,5} (Figura 1).

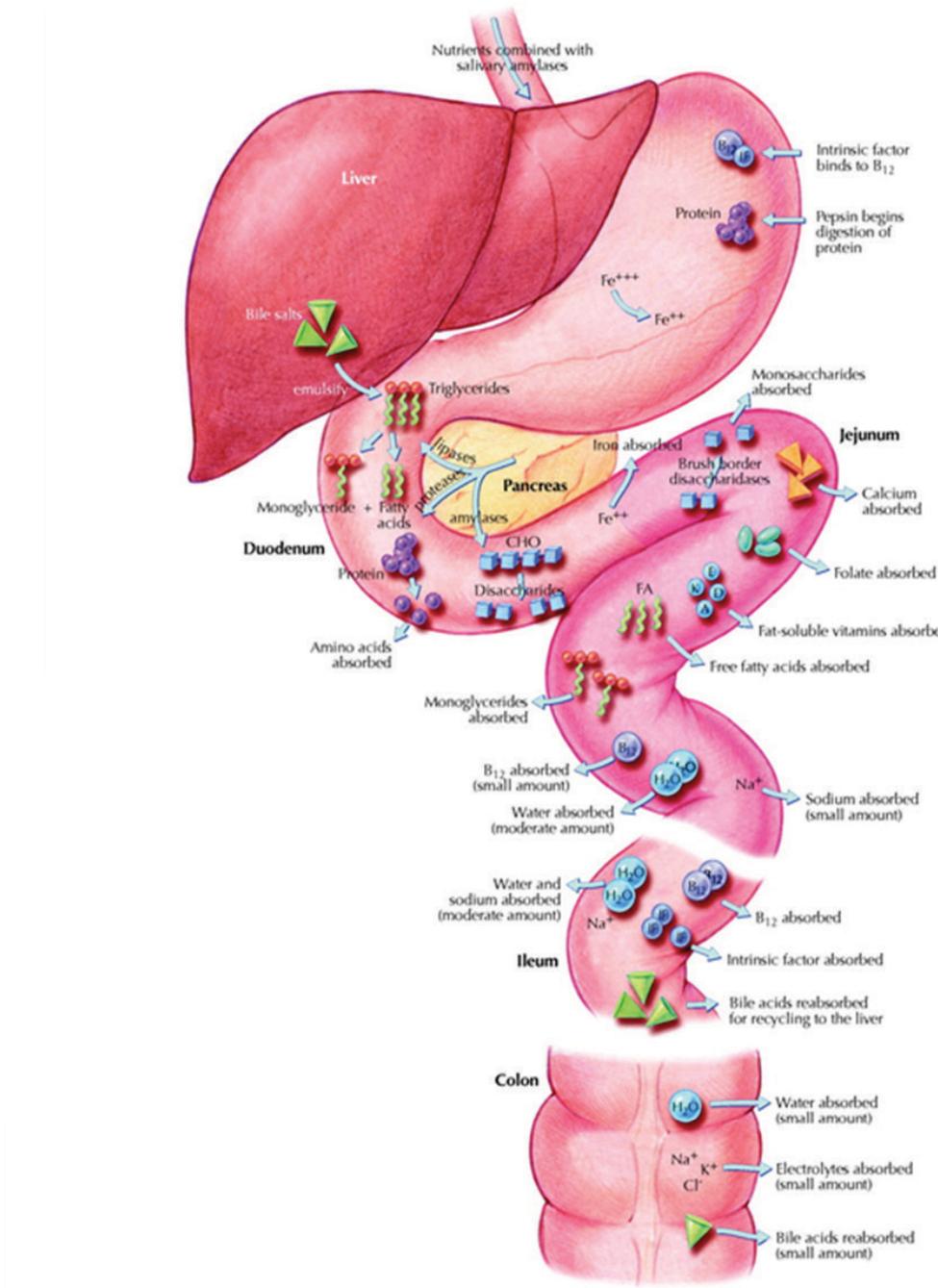


Figura 1. Le funzioni di assorbimento di ioni, micro- e macro-nutrienti dei vari tratti intestinali.

Questo quadro patologico viene aggravato inoltre dalle turbe della motilità intestinale le quali sono una diretta conseguenza della resezione chirurgica e delle aderenze intestinali che si possono sviluppare nel corso del tempo⁶.

La dismotilità può portare sia ad un transito intestinale accelerato, responsabile di una riduzione del tempo di digestione ed assorbimento, sia ad un transito rallentato, dovuto alla progressiva dilatazione dell'intestino residuo e alla mancanza della valvola ileo-cecale che si può tradurre in

frequenti contaminazioni da parte dei batteri, il che peggiora le funzioni digestive e causa lattico-acidosi⁷.

1.2 Eziologia

Spesso le cause di sindrome da intestino corto, in età pediatrica - a differenza di quanto accade in età adulta - sono da attribuirsi a malformazioni congenite (i.e. atresia intestinale, difetti della parete addominale come gastroschisi ed onfalocele, malrotazione e volvolo intestinale, aganglia intestinale congenita, nota come morbo di Hirschsprung) o a patologie acquisite (i.e. enterocolite necrotico-emorragica del prematuro o NEC, infarto mesenterico, enterite da radiazioni, neoplasie e traumi) che richiedano interventi chirurgici resettivi^{8,9}.

Una discriminante di notevole importanza per la definizione del quadro clinico del paziente è da riscontrarsi nella conservazione, o nell'assenza legata a necessità di resezione chirurgica, della valvola ileo-cecale. Qualora sia necessario sacrificare l'ultima ansa ileale e la valvola ileocecale, viene a mancare la funzione barriera di quest'ultima. Conseguentemente, i batteri intestinali possono colonizzare in maniera retrograda il piccolo intestino con produzione di gas, dilatazione del piccolo intestino stesso e diminuzione della peristalsi. L'*overgrowth* batterico può inoltre comportare seri effetti negativi quali la competizione per i micronutrienti, l'infiammazione cronica, il sanguinamento gastrointestinale, la traslocazione batterica, l'endotossitemia, il danno epatico e l'acidosi da acido D-lattico^{10,11}.

1.3 Epidemiologia

A livello epidemiologico, l'esatta prevalenza nella popolazione pediatrica di SBS non è facilmente determinabile; essa è tuttavia stimabile sulla base del numero dei pazienti che presentano necessità di un programma di nutrizione parenterale domiciliare: di questi si calcola che circa 1/3 sia affetto da SBS¹⁰. L'incidenza globale della sindrome da intestino corto è 24.5/100.000 nati vivi con il 30% di mortalità entro i 5 anni per quei pazienti che richiedono NPT¹²⁻¹⁴. Per quanto concerne l'ambito

pediatrico, il tasso di sopravvivenza oscilla tra il 73% e l'89%, rendendo tale sindrome una delle condizioni con maggior mortalità nel paziente pediatrico¹⁵. In Italia l'incidenza di SBS nei nati vivi è 26.34/100.000⁵.

Nel 1955 i lattanti non sopravvivevano a resezioni del piccolo intestino superiori al 15% della lunghezza totale. Al contrario, oggi più del 70% dei pazienti pediatrici affetti da SBS risulta libero da nutrizione parenterale entro 3 anni e solo il 23% resta dipendente da NPT. Grazie alle cure mediche intensive, alle nuove tecniche chirurgiche ed ai recenti cambiamenti nella composizione della nutrizione parenterale totale, la mortalità inizialmente molto elevata di questi pazienti, si è ridotta al 15-25%^{13,14}.

1.4 Adattamento

Con il termine adattamento si intende la capacità dell'intestino, a seguito di resezione chirurgica, di aumentare le proprie capacità di assorbimento, onde supplire alla perdita di lunghezza. L'adattamento intestinale è dato da un insieme di processi che mirano a compensare i deficit delle funzioni intestinali primarie (digestione ed assorbimento dei nutrienti) quali:

A. ipertrofia muscolare:

- aumento del diametro delle anse intestinali
- aumento dello spessore della parete intestinale
- iperplasia mucosa del piccolo intestino:

B. incremento della proliferazione degli enterociti

- diminuita apoptosi
- aumento dell'altezza dei villi e della profondità delle cripte intestinali
- incremento del trasporto transmembrana di ioni, peptidi, glutamina

Si tratta di un'evoluzione continua e graduale, che inizia precocemente dopo la resezione chirurgica (già 24-48 h dopo), ma può richiedere anni per completarsi¹⁷. È tale processo ad essere il vero responsabile dell'acquisizione dell'indipendenza dalla NPT, nei pazienti affetti da SBS.

I fattori anatomici che influiscono sulla capacità di adattamento sono la lunghezza dell'intestino residuo, il tipo di segmento digestivo rimasto, la presenza della valvola ileo-cecale e la resezione colica associata. La presenza di duodeno intatto, del colon e della valvola ileo-cecale sono ottimi fattori predittivi dell'*outcome* dei pazienti, così come l'ileo presenta potenzialità adattative superiori al digiuno, pertanto la conservazione di estesi tratti di ileo è associata ad una prognosi migliore¹⁷ (Figura 2).

La crescita longitudinale dell'intestino avviene in proporzione alla crescita somatica del paziente e il fenomeno adattativo solitamente porta alla dilatazione dell'intestino residuo al fine di aumentare la superficie di assorbimento; pertanto, si può affermare che l'intestino subisca i processi di dilatazione, allungamento ed ispessimento. Tuttavia, l'aumento del diametro intestinale a lungo andare può risultare dannoso in quanto favorisce disturbi della motilità. La dilatazione e la dismotilità intestinali inoltre promuovono la stasi, la quale porta a proliferazione batterica che può contribuire a malassorbimento, traslocazione batterica, infezione sistemica ed insufficienza epatica associata a malattia intestinale. Questi effetti negativi possono ostacolare un'ulteriore fase di adattamento e rallentare, se non compromettere, la capacità di diventare indipendenti dalla NPT.

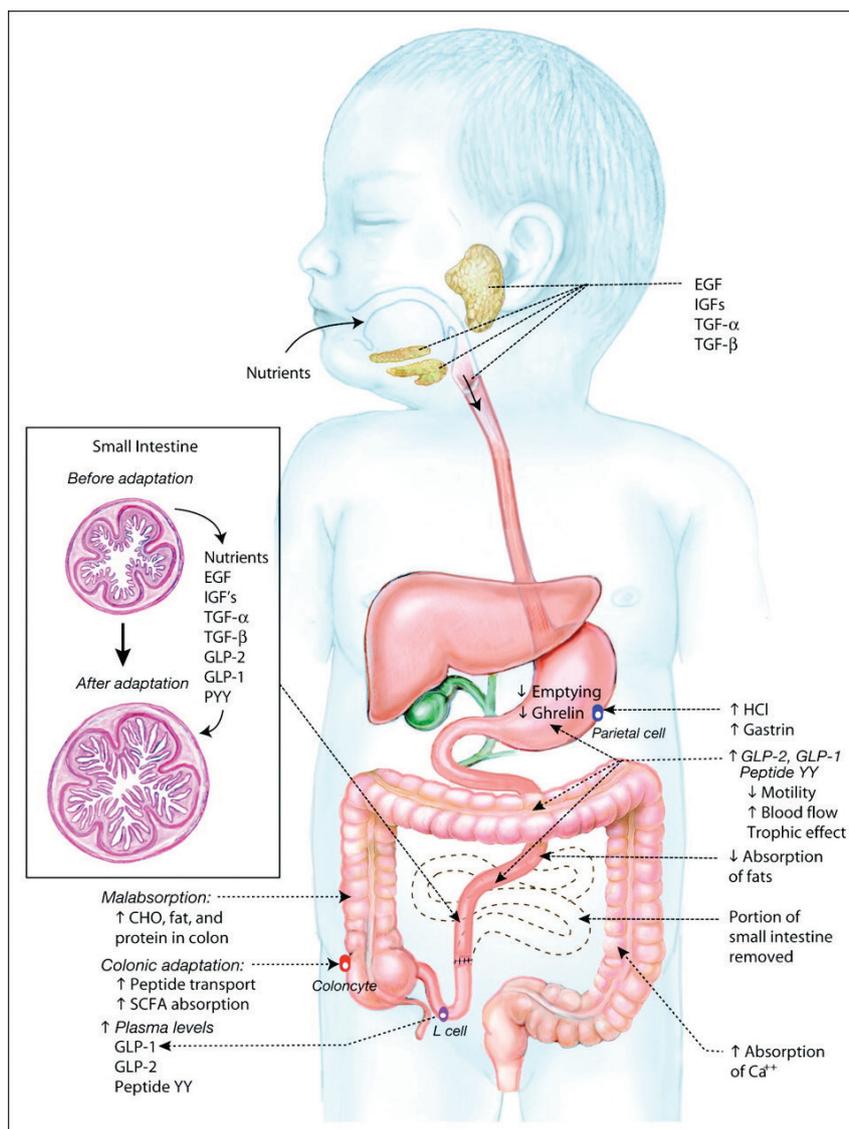


Figura 2. Il processo di adattamento intestinale: fattori regolatori e citochine coinvolte

2. Gestione multidisciplinare ed opzioni terapeutiche nel paziente affetto da SBS

Il monitoraggio ed il *follow-up* dei pazienti pediatrici in NPT dovrebbe essere coordinato da un team multidisciplinare, composto da varie figure che possano collaborare nel *management* del paziente affetto da SBS: il chirurgo pediatra, il neonatologo, il nutrizionista, il dietista, l'infermiere specialista della gestione dei presidi terapeutici, il farmacista ospedaliero.

Allo stato attuale, infatti, la SBS viene principalmente trattata con la nutrizione parenterale totale, con la chirurgia di "allungamento intestinale" e, quando queste due strategie terapeutiche non siano più sufficienti da sole, o quando sopraggiunga l'insufficienza intestinale e/o epatica terminale, con il trapianto di intestino.

L'obiettivo primario di tutte queste strategie è univoco: la promozione dell'assorbimento intestinale. In tale ottica, la citrullina rappresenterebbe secondo vari autori¹⁸⁻²⁰, il marker sierico ideale per monitorare l'insufficienza intestinale e quindi per avere costantemente una stima della capacità funzionale dell'intestino residuo.

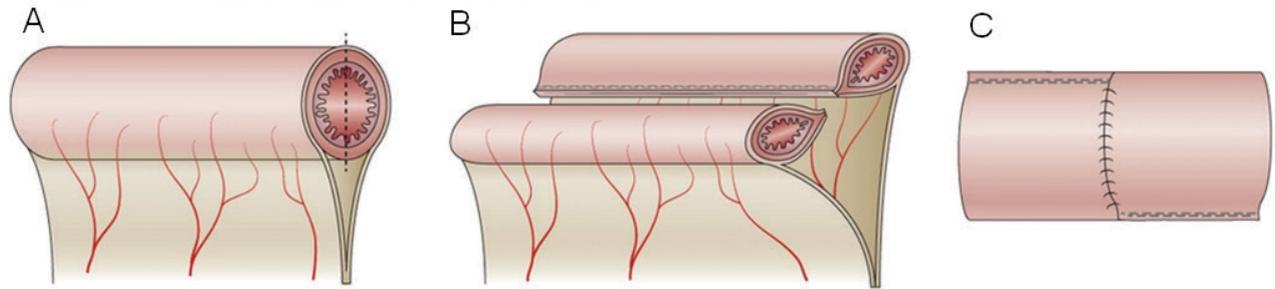
Per tale motivo, il ruolo della citrullina per l'intestino è stato assimilato a quello della creatinina per l'insufficienza renale e alle transaminasi per l'insufficienza epatica: si tratta di un amminoacido non essenziale, sintetizzato nell'uomo esclusivamente dall'enterocita a partire da glutammina e prolina, i cui livelli plasmatici sono direttamente dipendenti dalla quantità di enterociti funzionali e quindi dalla lunghezza intestinale residua.

La citrullina è ad oggi il marker dotato di maggior sensibilità (89%) e specificità (78%), tra tutti quelli che sono stati proposti^{21,22}.

La gestione del paziente, prevede - oltre all'attento monitoraggio clinico - tutta una serie di opzioni chirurgiche, dalla LILT, *Longitudinal Intestinal Lengthening and Tailoring*²³ (Figura 3 A, B, C) alla STEP, *Serial Transverse Enteroplasty Procedure*²⁴ (Figura 3 D, E) ed infine alla più recente SILT, *Spiral Intestinal Lengthening and Tailoring*²⁵.

Tali tecniche chirurgiche di allungamento intestinale sono in ogni caso volte solo ad aumentare il tempo di transito intestinale o la superficie funzionale all'assorbimento. Purtroppo, ad oggi, nessuna delle opzioni chirurgiche utilizzate è del tutto scevra da criticità, sia nel breve che nel lungo termine, e da complicanze, capaci di influire anche molto negativamente sulla qualità di vita dei pazienti. Qualora sopraggiungano quadri di *Intestinal Failure*, tali tecniche dovranno cedere il passo all'opzione terapeutica terminale: il trapianto isolato o combinato di intestino. Tuttavia, nuove strategie emergenti possono ricercarsi nell'applicazione di studi di ingegneria tissutale capaci di identificare, nel connubio tra biomateriali ed elementi cellulari, costrutti idonei ad essere impiegati come *graft* intestinali, con lo scopo finale di fungere da sostituti di un tratto intestinale compromesso dalla resezione.

Longitudinal lengthening (Bianchi procedure)



Serial transverse enteroplasty (STEP)

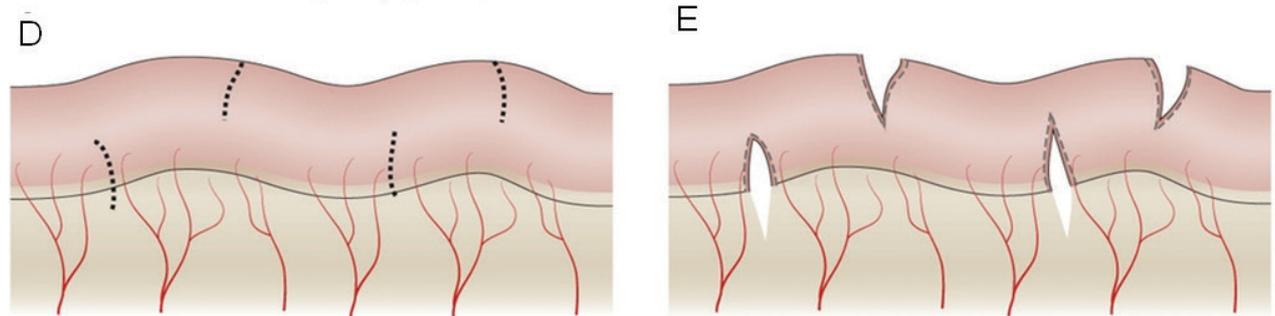


Figura 3. (A-C) LILT (Allungamento Intestinale Longitudinale sec. Bianchi); (D-E) STEP (Enteroplastiche Seriali Trasversali).

2.1 Nuove prospettive terapeutiche: l'ingegneria tissutale

2.1.1 Gli strumenti dell'ingegneria tissutale

Nuove strategie terapeutiche emergenti per il trattamento della SBS, in età pediatrica, possono ricercarsi nell'applicazione di studi di ingegneria tissutale, basati sull'utilizzo di cellule staminali autologhe, fattori di crescita e di biomateriali (*scaffold*) (Figura 4).

Ciascuno di questi elementi può essere funzionale al ripristino della funzionalità di un organo contribuendo, direttamente o indirettamente, alla formazione di neotessuto: le cellule mediante secrezione di specifica matrice extracellulare (ECM), i fattori di crescita modulando la risposta cellulare e lo *scaffold* garantendo un adeguato sostegno strutturale²⁶.

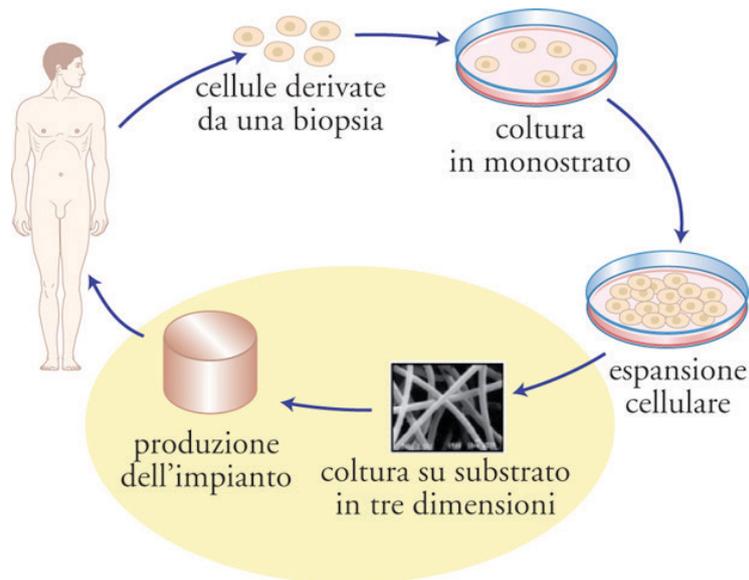


Figura 4. Gli elementi dell'ingegneria tissutale

Cellule

Il potenziale terapeutico del sostituto tissutale ingegnerizzato è fortemente dipendente dall'origine e dal grado di staminalità delle cellule impiegate. Per quanto riguarda l'origine, le cellule destinate ad avere un ruolo nella medicina rigenerativa possono essere:

- *autologhe*, se si tratta di cellule derivanti dal paziente stesso;
- *allogeniche*, se provenienti da un altro individuo all'interno della stessa specie;
- *xenogeniche*, quando estratte da un'altra specie animale.

Il secondo parametro da considerare è il grado di staminalità: le cellule staminali sono cellule primitive non specializzate, capaci di autorinnovamento (*self-renewal*) e di differenziamento in altri tipi cellulari. In funzione del diverso grado di potenzialità differenziativa esse possono essere classificate in 4 diverse tipologie²⁷:

- *totipotenti*: danno origine a tutti i tessuti e agli annessi embrionali (i.e. lo zigote e i primi blastomeri dell'embrione);
- *pluripotenti*: danno origine ai tre foglietti embrionali: ectoderma, mesoderma ed endoderma (i.e. le cellule staminali embrionali della massa interna della blastocisti);

- *multipotenti*: danno origine a tessuti derivanti da un solo foglietto embrionale (i.e. le cellule staminali mesenchimali);
- *unipotenti*, ovvero cellule *tissue-committed*: danno origine ad un'unica linea cellulare (i.e. cellule staminali ematopoietiche, epidermiche, epatiche e neurali).

Inoltre, in base alla loro origine, le cellule staminali si distinguono in embrionali e adulte:

- *embrionali (Embryonic Stem Cells, ESC)*: derivano da un embrione allo stadio di blastocisti; sono cellule pluripotenti, capaci quindi di generare tutti i differenti tipi cellulari presenti nell'organismo. Per la loro enorme potenzialità proliferativa e differenziativa, le ESC sono oggetto di studio per l'eventuale applicazione in medicina rigenerativa, sebbene il loro utilizzo terapeutico sollevi problemi di ordine etico correlati alla loro origine embrionale^{28,29};
- *adulte (Adult Stem Cells, ASC)* sono cellule indifferenziate con caratteristiche di *self-renewal* che risiedono in specifici distretti tissutali di età post-natale³⁰. Nicchie staminali sono state identificate in diversi tessuti, quali la pelle, il fegato, il muscolo scheletrico, il sangue, il pancreas, l'occhio, il cervello, il tessuto adiposo, il midollo osseo, il sangue e il tratto gastro-intestinale³¹⁻³⁴.

Comunemente, l'ingegneria tissutale, si avvale di cellule staminali unipotenti o cellule staminali multipotenti; le prime, tuttavia, contribuiscono in modo limitato al processo di rigenerazione *ex vivo* a causa del loro basso potenziale proliferativo e differenziativo rispetto alle cellule staminali multipotenti. Pertanto negli ultimi anni la ricerca scientifica sta promuovendo programmi terapeutici basati sull'impiego di popolazioni ad elevato grado di staminalità^{35,36}.

In particolare, una categoria di cellule staminali con caratteristiche di multipotenza sta destando un crescente interesse per le numerose possibili applicazioni nel campo della medicina rigenerativa: le cellule staminali mesenchimali (MSC)³⁷: si tratta di cellule non specializzate e principalmente di derivazione dal mesoderma, il foglietto embrionale intermedio che si differenzia intorno al terzo

mese di gestazione e da cui originano i tessuti connettivi di tutto l'organismo. Esse rappresentano un'eccezione alla tessuto-specificità delle ASC, essendo in grado di differenziare in diverse linee.

In coltura *ex vivo* hanno capacità di aderire al supporto e formare piccole colonie di cellule fibroblastoidi (*Colony Forming Unit-Fibroblast*, CFU-F). Le MSC si caratterizzano inoltre per un immunofenotipo specifico, definito dall'alta espressione (> 95%) dei *clusters* di marcatori di membrana CD105, CD73, CD90 e dalla bassa espressione (< 2%) degli antigeni CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19 e HLA-DR³⁸. In aggiunta, un interessante aspetto della multipotenza delle MSC è la loro capacità di differenziare non solo in tessuti di origine mesenchimale (stroma midollare, tessuto adiposo, osseo, cartilagineo, tendineo e muscolare scheletrico, mesoderma viscerale e cellule endoteliali), ma anche di trans-differenziare in cellule di origine non-mesodermica quali neuroni, cellule epiteliali di cute e tubo digerente³³.

È noto che le proprietà e la funzionalità delle MSC dipendono dalle caratteristiche della nicchia staminale da cui hanno origine, all'interno della quale preservano il loro stato indifferenziato^{39,40}. Fin dalla prima identificazione di una popolazione di cellule staminali adulte multipotenti da parte di Friedenstein e collaboratori⁴¹, le MSC più studiate in termini di immunofenotipo, plasticità e strategie di impianto sono quelle isolate dalla nicchia del midollo osseo^{42,43} ossia le BM-MS (Bone Marrow-derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells). Nella coltura *in vitro* si presentano come popolazioni di cellule aderenti, clonogeniche, non fagocitiche e di morfologia fibroblastoide⁴² che risultano eterogenee per quanto riguarda la dimensione delle colonie, la capacità proliferativa, l'immunofenotipo e il potenziale differenziativo⁴³. Le cellule mesenchimali da midollo osseo sono dotate di elevata capacità proliferativa, sono in grado di esprimere geni di origine embrionale, di secernere citochine, di sintetizzare molecole di contatto cellula-cellula e componenti della matrice extracellulare come il collagene e la fibronectina⁴⁴. Per anni il midollo osseo ha rappresentato l'esclusiva fonte di MSC multipotenti; nell'ultimo decennio sono state oggetto di studio fonti alternative, quali il cordone ombelicale⁴⁵, il tessuto adiposo⁴⁶, la placenta⁴⁷ e il sangue periferico⁴⁸.

In particolare, il tessuto adiposo sembra essere una valida fonte alternativa di isolamento di cellule staminali, soprattutto in virtù dell'aumento dell'incidenza dell'obesità nelle popolazioni occidentali, che rende il tessuto abbondante e facilmente accessibile. Esso può essere, quindi, raccolto in grandi quantità con basso rischio di morbidità del sito donatore, durante un intervento del tutto sicuro di liposuzione⁴⁹. Inoltre, l'elevato contenuto di Ad-MSC nel tessuto adiposo esclude la necessità di coltura *in vitro* a lungo termine, riducendo il rischio di insorgenza di anomalie cromosomiche⁵⁰. In aggiunta, diversi studi comparativi hanno dimostrato che tali cellule sono simili alle MSC derivate dal midollo osseo per quanto riguarda l'immunofenotipo, il potenziale differenziativo e l'efficacia terapeutica⁵¹. Tali proprietà rendono le Ad-MSC uno strumento interessante in applicazione clinica per scopi di rigenerazione dei tessuti, anche nell'ambito dell'ingegneria tissutale intestinale.

Fattori di crescita

I fattori di crescita sono proteine che svolgono un ruolo chiave nei processi di proliferazione e differenziamento cellulare; tali fattori possono essere ottenuti per purificazione dai tessuti o prodotti mediante tecniche di ingegneria genetica.

L'interesse che suscitano è legato alle loro potenzialità di impiego nel processo di produzione ottimale di un sostituto tissutale. Essi infatti vengono selezionati in base alle caratteristiche della tipologia di tessuto che si intende ottenere, cercando di mimare l'ambiente fisiologico nel quale il costrutto troverebbe il suo impiego⁵² (Tabella 1).

FATTORE DI CRESCITA	MEMBRI DELLA FAMIGLIA	PRINCIPALI FUNZIONI
EGF	TGF- α	Stimola la proliferazione di molti tipi di cellule; segnale induttivo nello sviluppo
FGF	Numerosi sottotipi	Stimola la proliferazione in molti tipi di cellule; segnale induttivo nello sviluppo; regola il differenziamento di varie cellule staminali
IGF-I	IGF-II, insulina	Promuove la sopravvivenza cellulare; stimola il metabolismo cellulare; promuove la proliferazione cellulare
PDGF	3 sottotipi	Stimola la proliferazione cellulare durante la guarigione delle ferite, stimola la proliferazione di alcune cellule neurogliali
TGF-β	Attivine, Proteina morfogenetica dell'osso (BMP)	Potenzia o inibisce le risposte della maggior parte delle cellule ad altri fattori; regola il differenziamento di alcuni tipi di cellule; agisce da segnale induttivo nello sviluppo embrionale
IL-2		Stimola la proliferazione dei linfociti T attivati
IL-3	Fattori che stimolano le colonie ematopoietiche (CSF)	Stimola la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule ematiche
NGF	Fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4 (NT-4)	Promuove la sopravvivenza e la crescita dei processi nervosi di specifiche classi di neuroni
Eritropoietina		Promuove la proliferazione, il differenziamento e la sopravvivenza dei precursori dei globuli rossi

Tabella 1. Fattori di crescita e differenti specificità di azione.

Scaffold

Gli *scaffold* sono delle strutture-impalcatura tridimensionali la cui funzione è quella di fornire alle cellule un temporaneo sostegno meccanico-strutturale⁵³ mimando le caratteristiche del sito di destinazione. Oltre a ciò, è necessario che esso sia biocompatibile e biodegradabile, ovvero che non dia origine a reazioni di intolleranza o rigetto post-impianto⁵⁴⁻⁵⁶.

I materiali polimerici utilizzati nell'ingegneria tissutale possono essere suddivisi in due grandi categorie: naturali e sintetici (Tabella 2).

I materiali naturali (i.e. collagene, chitosano, acido ialuronico), essendo tipicamente presenti nella matrice extracellulare tissutale, posseggono siti specifici per l'interazione cellulare. Tuttavia, le principali problematiche ad essi connesse riguardano la scarsa disponibilità, la limitata versatilità e l'elevato costo⁵⁷. L'impiego di *scaffold* sintetici in forma di biopolimeri e idrogeli ha avuto invece

un forte sviluppo nell'ultimo decennio⁵⁸. Tali materiali (i.e. silicone, acido polilattico, policaprolattone, polivinil alcool) mostrano notevoli vantaggi rispetto ai naturali, risultando più disponibili e facilmente manipolabili da un punto di vista chimico, con proprietà meccaniche e di biodegradazione modulabili.

POLIMERI SINTETICI	POLIMERI NATURALI
Acido poli-L-lattico (PLLA)	Collagene
Acido poli-glicolico (PGA)	Gelatina
Poly-ε-caprolattone (PCA)	Fibrina
Copoli -LL-GA	Cellulosa
Copoli -LL-CA	Acido ialuronico
Copoli-LLA-glicoletilenico (EG)	Alginato
Copoli-fumarato-glicoletilenico	Chitosano, chitina

Tabella 2. Polimeri biodegradabili sintetici e naturali usati per l'ingegneria tissutale.

Un'ulteriore possibilità risiede nella combinazione *scaffold* naturali e sintetici: quando il polimero naturale è privo delle proprietà meccaniche necessarie a favorire un eventuale impianto, diventa fondamentale associarlo a materiali sintetici. Questo è il razionale alla base della progettazione di *scaffolds* compositi, i quali racchiudano contemporaneamente i vantaggi del biomateriale naturale e del polimero sintetico.

Poiché questo lavoro di tesi considera lo sviluppo di uno *scaffold* composito in polivinil alcool modificato, ne verranno di seguito considerate le caratteristiche salienti.

Il PVA è un polimero sintetico idrosolubile con eccellenti proprietà adesive, emulsionanti e di *film forming*. Venne preparato per la prima volta nel 1924 da Hermann e Haehnel idrolizzando acetato di polivinile in etanolo con idrossido di potassio. Oggi è prodotto industrialmente con un processo continuo ed è reperibile in qualità di polvere bianca (Figura 5).

Le caratteristiche fisiche ed i suoi specifici utilizzi dipendono dal grado di polimerizzazione e dal grado di idrolisi. In particolare è impiegato in medicina come costituente di tubi di drenaggio e sondini, in contattologia quale agente lubrificante per lenti a contatto e nell'industria tessile per l'incollaggio di fibre naturali.

Gli idrogeli di PVA sono stati ampiamente studiati e ne sono state confermate le eccellenti proprietà meccaniche e di biocompatibilità.



Figura 5. (A) PVA fornito dalla ditta Sigma-Aldrich. (B) Aspetto del PVA in forma solida.

È resistente ad oli, grassi e solventi; non è permeabile ai gas. Inoltre, è inodore ed atossico, ha alta resistenza alla trazione e flessibilità ed è pressoché incompressibile. Queste proprietà dipendono dal grado di umidità: più alta è l'umidità, più elevata è la quantità di acqua assorbita. L'acqua, che agisce come plastificante, può ridurre la sua resistenza alla trazione. Ha un punto di fusione a circa 230°C, ma tende a decomporsi rapidamente oltre i 200°C; presenta inoltre zone di elevata cristallinità, essendo i gruppi ossidrilici abbastanza piccoli da trovare posto nel reticolo.

In letteratura sono reperibili varie modifiche chimiche del PVA, tra cui:

- *Modifica del PVA con glicil-metacrilato (GMA):* il composto di PVA-GMA così ottenuto è stato poi trattato con diversi contenuti di condroitina solfato (CS), formando il complesso PVA-GMA/CS. Questo composto finale ha dimostrato di possedere resistenza ai fluidi gastrici ed intestinali e buone proprietà meccaniche⁵⁹.

- *Degradazione del PVA attraverso il processo Fenton e degradazione biologica in ambiente anaerobico.* L'esperimento è stato svolto con differenti quantità di perossido di idrogeno e Fe (II), con l'aggiunta di una soluzione acquosa di PVA. La valutazione della biodegradazione è stata effettuata in fase gassosa ossidante. Si è constatato che l'ossidazione parziale di PVA migliora la biodegradabilità in ambiente anaerobico, sebbene sia più opportuno l'ambiente aerobico⁶⁰.
- *Modifica del PVA tramite glicosilazione dei gruppi idrossilici con ossazolina triacetilato* dando dei valori finali di solubilità e proprietà termiche diverse rispetto al PVA non modificato⁶¹.

Il PVA è stato studiato anche nella forma parzialmente ossidata. Esistono vari metodi di ossidazione del PVA:

- Ossidazione del PVA tramite reazione con O₃/UV per poter avere un PVA più biodegradabile, che possa essere così utilizzato in ambito biologico. Lo studio evidenzia che la modifica è influenzata dal tempo di reazione, dal valore di pH, dalle concentrazioni iniziali di PVA e dal flusso di O₃. I risultati danno un aumento della degradazione del PVA dopo trattamento con ozono e UV e una migliore degradabilità in un ambiente acido (pH 5)⁶².
- Ossidazione del PVA con perossido di idrogeno in presenza o in assenza di un trattamento ultrasonico. Questa modifica non produce particelle solide ma prettamente acido acetico, formico e ossalico; questi, in presenza di un neutralizzatore come l'idrossido di sodio, si trasformano nei corrispettivi sali. La migliore ossidazione di PVA (5%) si ha ancora con la presenza di luce ultravioletta a 302 nm con un continuo trattamento ultrasonico.
- Ossidazione del PVA con KMnO₄ per formare unità di vinil-chetone lungo la catena polimerica, attraverso la reazione con *9,10-dihydro-9-oxa-10-phosphaphenanthrene-10-oxide*. Il gruppo fosforico di quest'ultimo è stato legato al gruppo carbonilico del PVA

ossidato. Il composto presenta una migliore stabilità termica, organo-solubilità e ritardo di fiamma⁶³.

Essendo un polimero versatile, il PVA si è dimostrato adatto a molteplici applicazioni nell'ambito della medicina rigenerativa.

Recentemente, il Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università degli Studi di Padova, in collaborazione con la Fondazione Onlus T.E.S., ha ideato e sviluppato un biomateriale per dispositivi medici, in particolare protesi, che costituisce un Brevetto nazionale dell'Università degli Studi di Padova (registrato VI2013A000019). Si tratta di un nuovo idrogel, a base di alcool polivinilico, con caratteristiche di biodegradabilità modulabili, *gold standard* in questo tipo di dispositivi. Il materiale è stato studiato per la riparazione di danni cartilaginei focali⁶⁴, per la formazione di *graft* tubulari di varia dimensione e diverso calibro finalizzati sia alla rigenerazione vasale che di nervi periferici.

2.1.2 Un esempio di ingegneria tissutale per il trattamento della SBS: il modello TESI

Le problematiche ed i limiti connessi alle attuali pratiche chirurgiche nel trattamento della SBS hanno fatto nascere un forte interesse verso studi sperimentali orientati alla rigenerazione intestinale mediante tecniche mutuata dall'ingegneria tissutale. Tra queste, il modello TESI (*Tissue Engineered Small Intestine*), recentemente descritto da vari autori⁶⁵⁻⁷⁰, sembrerebbe poter aspirare ad un futuro impiego per ripristinare la funzionalità intestinale, dopo massive resezioni chirurgiche.

Brevemente, unità organellari costituite da *clusters* multicellulari di epitelio e tessuto mesenchimale (*organoid units*) ottenute a partire da prelievi biotipici di intestino^{65,66} sono state combinate a *scaffolds* in materiali polimerici biodegradabili naturali o sintetici (i.e. acido poli-lattico⁶⁷, acido poli-glicolico⁶⁹, poli- ϵ -caprolattone⁷⁰). Tali costrutti sono quindi stati impiantati nell'omento di animali ospiti (topi NOD/SCID irradiati, ratti Lewis) poiché sembra che tale sito anatomico, anche grazie al rilascio di specifici fattori di crescita (VEGF, PDGF)⁶⁷, abbia le caratteristiche ideali per supportare e sostenere la neoangiogenesi dell'impianto. A distanza di 4 settimane dalla chirurgia,

l'aspetto morfologico del costrutto TESI era quello di una sferula, con dimensioni di circa il doppio rispetto a quelle iniziali, completamente inglobante il polimero di supporto⁶⁹.

L'analisi istologica del costrutto TESI ha confermato le similitudini con l'intestino nativo mostrando una spiccata proliferazione cellulare al suo interno (circa 3 volte il numero iniziale)⁶⁹.

Esso è risultato contenere epitelio differenziato, mesenchima, vasi sanguigni, tessuto muscolare e nervoso oltre ad un potenziale differenziativo verso tutti i tratti dell'apparato gastro-intestinale, dall'esofago, al piccolo intestino, al colon^{66,67}. Più specificatamente, Levin⁶⁵ ha descritto una rigenerazione completa di intestino umano, con tutti gli strati propri, compreso il *brush border* di enterociti, dotati di villi, cripte, cellule di Paneth e positività per proteine muscolari come la desmina, l' α -SMA e nervose come la S-100.

Attualmente si sta sperimentando l'utilizzo del TESI anche in modelli di grandi animali come il cane⁷¹ ed il maiale⁷², sia prima che dopo massiva resezione intestinale.

SCOPO DELLA TESI

Nel paziente pediatrico, l'attuale *management* della sindrome dell'intestino corto si concretizza dal punto di vista medico, nella nutrizione parenterale totale, mentre dal punto di vista chirurgico, nell'insieme di procedure di allungamento intestinale volte ad aumentare il tempo di transito o la superficie funzionale all'assorbimento; nei casi di insufficienza intestinale terminale, invece, il trattamento elettivo è rappresentato solo dal trapianto di intestino. Tuttavia questi approcci presentano alcuni importanti limiti per una gestione ottimale della patologia e per la qualità di vita dei pazienti.

Per quanto riguarda la terapia mediante nutrizione parenterale, la dipendenza nel lungo termine da questo tipo di alimentazione è una conseguenza potenzialmente pericolosa per la vita dei pazienti pediatrici affetti da SBS. Sarebbe, dunque, di notevole beneficio la capacità di prevedere in modo attendibile la possibilità di svezzare con successo il paziente da nutrizione parenterale. Nella pratica clinica corrente, lo svezzamento per la promozione della dieta orale si basa sulla valutazione di parametri quali esami ematochimici, escrezione di elettroliti e metaboliti urinari e fecali e monitoraggio delle variazioni del peso corporeo.

Anche se la lunghezza intestinale residua è un indicatore predittivo di tolleranza all'alimentazione per via enterale, la sua valutazione è spesso complicata dalla presenza di fenomeni infiammatori, aderenze e stenosi intestinali. Oltre alla difficoltà tecnica di ottenere delle misurazioni accurate, le variazioni della superficie intestinale, che si verificano nel corso dell'adattamento, limitano potenzialmente l'uso della lunghezza intestinale come *biomarker* esclusivo di tolleranza enterale. Recentemente, dunque, la ricerca si sta focalizzando sulla definizione di *marker* clinici sensibili ed affidabili per prevedere e monitorare l'adattamento intestinale. Idealmente, un tale biomarcatore permetterebbe di riconoscere i pazienti che necessitano di nutrizione parenterale a lungo termine, consentirebbe una valutazione del potenziale di riabilitazione intestinale e faciliterebbe l'identificazione precoce dei bambini che possono, in ultima analisi, beneficiare della sospensione

definitiva della nutrizione parenterale. Indagini preliminari sui livelli plasmatici di citrullina nei pazienti affetti da SBS suggeriscono che tale amminoacido potrebbe avere caratteristiche tali da poter essere usato a tale scopo.

Considerando, invece, le attuali procedure chirurgiche per l'allungamento dell'intestino, le tecniche di intervento sono state perfezionate nel corso degli ultimi decenni, e comprendono, tra le altre, LILT e STEP. Tali tecniche di chirurgia ricostruttiva si sono dimostrate efficaci nel promuovere il passaggio alla nutrizione enterale nel 67% dei pazienti sottoposti a LILT e nel 34% dei soggetti andati incontro a STEP.

I pazienti con scarsa lunghezza intestinale residua o intestino non candidabile a ulteriori allungamenti chirurgici o insufficienza epatica e/o intestinale terminale, richiedono invece il ricorso al trapianto d'organo. Essendo il più grande organo immunitario del corpo, l'intestino è altamente immunogenico, il che non favorisce l'attecchimento dell'impianto, anche con una terapia immunosoppressiva a lungo termine. Nonostante i miglioramenti nella gestione medica e chirurgica del trapianto di intestino, il tasso di mortalità a 5 anni per i pazienti con SBS è del 30% e sale al 45% per i pazienti pediatrici che richiedono il trapianto. Altra importante limitazione riguarda il basso numero di donatori di organi disponibili, in particolare nella popolazione pediatrica. Pertanto, soluzioni alternative al trattamento chirurgico della SBS sono attualmente oggetto di indagine.

In particolare, un interesse sempre maggiore si sta rivolgendo verso le nuove strategie di ingegneria tissutale, capaci di identificare, nel connubio tra biomateriali ed elementi cellulari, costrutti idonei ad essere impiegati come *graft* tubulari per l'allungamento del tratto intestinale compromesso dalla resezione.

Sulla base delle precedenti considerazioni, questo progetto di ricerca si propone di indagare il possibile miglioramento del *management* e della terapia della SBS tramite lo sviluppo di due filoni di ricerca paralleli: uno clinico e l'altro sperimentale.

➤ *Ricerca clinica*

Nella prima parte del lavoro, la citrullina è stata indagata quale nuovo marcatore bioumorale dotato di idoneo valore predittivo positivo, sensibilità e specificità, ai fini di valutare la tolleranza all'alimentazione enterale dei pazienti affetti da SBS e la loro svezzabilità dal supporto nutritivo mediante parenterale totale o parziale.

L'attività di ricerca clinica è stata così sviluppata:

1. Arruolamento dei pazienti dopo firma del consenso informato per il prelievo dei campioni biologici.
2. Analisi dei prelievi sierici tramite HPLC per il dosaggio della citrullinemia.
3. Analisi statistica mediante t test al fine di indagare la possibile correlazione dei livelli di citrullina plasmatica con la lunghezza intestinale residua dei pazienti e la durata della loro dipendenza dal supporto parenterale.

➤ *Ricerca sperimentale*

La seconda parte del lavoro si è focalizzata sull'allestimento e la caratterizzazione biologica/ funzionale di uno *scaffold* composito ottenuto combinando un idrogelo sintetico derivato dal polivinil alcool con la matrice extracellulare intestinale decellularizzata. Il supporto ingegnerizzato deve garantire proprietà morfo-meccaniche adeguate, oltre che sostenere l'adesione e la proliferazione cellulare.

Lo schema sperimentale ha previsto:

1. Allestimento del PVA nelle sue tre varianti: nativo, ossidato all'1% (PVA Ox 1%) e ossidato al 2% (PVA Ox 2%).
2. Caratterizzazione delle proprietà del PVA nativo ed ossidato, in forma di idrogel, tramite:
 - ✓ analisi ultrastrutturale di microscopia elettronica a scansione (SEM);
 - ✓ test di trazione per il calcolo del modulo elastico;
 - ✓ valutazione dell'indice di rigonfiamento;

- ✓ test di biodegradazione *in vivo* dopo impianto sottocutaneo in topi *Balb/c*.
3. Ottenimento di matrice intestinale decellularizzata (ECM) da intestino di ratto adulto *Sprague-Dawley* mediante metodo detergente-enzimatico e sua caratterizzazione attraverso:
- ✓ marcatura con DAPI;
 - ✓ colorazione istologica (H/E).
4. Allestimento di un *bioscaffold* composito ottenuto mediante *cross-linking* del PVA Ox 1% con matrice extracellulare (ECM), realizzata in una variante integra (ECMi) ed in una variante liofilizzata e percolata (ECMI).
6. Caratterizzazione morfologica e ultrastrutturale del *bioscaffold* composito e prove di coltura cellulare attraverso la semina di cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo umano.
7. Impianto in omento di ratto *Sprague Dawley* di 3 tipi di *bioscaffold*, il primo costituito unicamente da PVA Ox 1%, e gli altri due compositi (PVA Ox 1%/ECMi e PVA Ox 1%/ECMI) e successiva valutazione della loro capacità di acquisire, in vivo, caratteristiche di tessuto pseudo-intestinale.

MATERIALI E METODI

1. Progetto di Ricerca Clinica

1.1 La sottopopolazione campione: criteri di inclusione

La sottopopolazione campione è stata individuata all'interno di una popolazione di pazienti affetti da SBS seguiti per esiti a breve e a lungo termine presso la Chirurgia Pediatrica del Dipartimento della Salute della Donna e del Bambino dell'Università degli Studi di Padova. In particolare, sono stati inclusi tutti i nuovi casi e i pazienti già operati, con età ≤ 5 anni e lunghezza intestinale residua (dopo chirurgia) ≤ 100 cm.

Per tutti i pazienti affetti da SBS, dopo la dimissione ospedaliera, è stato attivato un programma personalizzato di nutrizione parenterale ed enterale domiciliare, coinvolgente anche il Pediatra di Libera Scelta, che veniva contattato dal chirurgo pediatra alla dimissione del paziente, ai fini di illustrare nello specifico il tipo di supporto nutrizionale mediante parenterale in atto e la necessità di stretti controlli auxologici.

1.2 Lo studio clinico

La sottopopolazione considerata è stata studiata periodicamente in regime di *follow-up* da un'*equipe* multidisciplinare dedicata composta da un chirurgo pediatra, un neonatologo esperto di nutrizione pediatrica e una dietista.

Le valutazioni in *follow-up* avvenivano mediante accesso dei pazienti ad un ambulatorio multidisciplinare, ove venivano eseguite post-dimissione ogni 15 giorni inizialmente, poi mensilmente, le seguenti valutazioni:

- visita chirurgica pediatrica
- visita pediatrica nutrizionistica
- valutazione dietistica
- controlli auxologici

I pazienti inoltre eseguivano, dapprima settimanalmente, poi ogni 15 giorni, i seguenti esami ematochimici seriati:

-emocromo con formula, dosaggio di sodio, potassio, cloro, calcio, magnesio, fosforo, zinco, coagulazione, emogasanalisi, dosaggio di sideremia, transferrina, ferritina, indici di funzionalità epatica, renale, pancreatica, colesterolo e trigliceridi, *citrullina*

Ogni mese:

-ionuria e creatininuria

-esame chimico-fisico e colturale delle feci, calprotectina fecale, dosaggio degli eosinofili fecali, sangue occulto fecale.

Ogni 6 mesi:

-dosaggio delle vitamine liposolubili (A, D, E)

-ecografia epatica per monitoraggio della steatosi epatica e dell'epatopatia da parenterale (PNALD)

Ogni 12 mesi (o prima se vi erano segni di malfunzionamento del dispositivo terapeutico):

-Rx torace per controllo della posizione della punta del CVC

I campioni ematici per lo studio della citrullinemia dei pazienti in nutrizione parenterale, sono stati prelevati in maniera seriata nei pazienti, ad almeno 6 settimane di distanza dalla chirurgia.

I valori normali di citrullinemia sono compresi nel range tra 15 e 40 $\mu\text{mol/L}$. La recente letteratura ha dimostrato che con valori di citrullinemia inferiori a 12 $\mu\text{mol/L}$ nessun paziente è svezzabile dalla NPT, mentre con valori superiori a 15 $\mu\text{mol/L}$ il paziente è candidabile alla ciclizzazione della NPT, data la maggior tolleranza all'alimentazione enterale.

Tutti i pazienti sottoposti a tale studio erano in programma di nutrizione parenterale domiciliare e nutrizione enterale parziale e non presentavano al momento del prelievo infezioni in atto o episodi di malassorbimento o subocclusione/occlusione intestinale.

Inoltre tutti i pazienti al momento del prelievo si trovavano a digiuno da almeno 4 ore.

I prelievi ematici sono stati posti in microprovetta eparinata (volume pari a 500 μL), successivamente sono stati centrifugati con centrifuga Thermo Scientific™ Heraeus Labofuge 400 and 400 R (per 10 minuti a 3800 rpm); infine i campioni sierici sono stati congelati ed inviati presso la Medicina di Laboratorio del nostro Centro in attesa della successiva analisi dei livelli di citrullina (che è stata effettuata dal Laboratorio di Spettrometria di Massa del Dipartimento della Salute della Donna e del Bambino, in un unico momento, a raccolta campioni completa).

La determinazione plasmatica della citrullinemia si è servita della cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC).

1.3 Analisi statistica

I dati inerenti ai valori della citrullinemia, alla lunghezza intestinale residua e alla durata della dipendenza da nutrizione parenterale sono stati analizzati mediante coefficiente di correlazione lineare r di Pearson, t test e p -value (con un livello di significatività pari a 0,01).

2. Progetto di Ricerca Sperimentale

2.1 Preparazione e caratterizzazione degli scaffold in PVA

2.1.1 Allestimento della soluzione di PVA nativo

È stata predisposta una soluzione di PVA (PM_{PVA} : 146,000-186,000 Da, 99% idrolizzato) al 16% in acqua deionizzata. Si procede pesando l'opportuna quantità di polvere di PVA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in bilancia analitica e aggiungendo l'acqua deionizzata (dH_2O) necessaria in contenitore di vetro Pyrex. La miscela viene portata a 100°C in stufa e di tanto in tanto agitata per favorire la solubilizzazione; si mantiene alla medesima temperatura per circa 72 h. In tal modo, si ottiene una soluzione omogenea del polimero.

2.1.2 Allestimento delle soluzioni di PVA ossidato

Il PVA è un polimero sintetico idrosolubile considerato, dopo *cross-linking*, resistente alla degradazione *in vivo*. Allo scopo di renderlo biodegradabile, sono stati introdotti siti più labili, attaccabili chimicamente, trasformando alcuni gruppi alcolici secondari in gruppi chetonici mediante ossidazione chimica selettiva.

La procedura di ossidazione del PVA (Figura 6) prevede 5 fasi di seguito descritte.

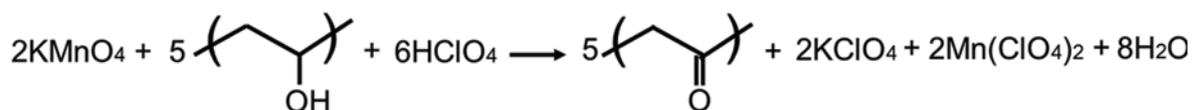


Figura 6. Reazione di ossidazione del PVA con permanganato di potassio in ambiente acido per acido perclorico.

1) *Dissoluzione del PVA in acqua deionizzata.* Il polimero (PM_{PVA} : 146,000-186,000 Da, 99% idrolizzato), sotto forma di polvere granulare bianca, viene pesato e sospeso in dH₂O in una bottiglia di vetro Pyrex a collo largo con tappo, al fine di ottenere una soluzione al 16%. Il contenitore è posto in stufa alla temperatura di 95-100 °C, agitando di tanto in tanto per circa 2 h, così da ottenere una dissoluzione completa ed omogenea raggiuntala quale il flacone viene lasciato raffreddare a temperatura ambiente (RT).

2) *Preparazione della soluzione di ossidante.* La quantità richiesta di permanganato di potassio (KMnO₄), in ragione di 10 mg di sale per ogni ml d'acqua, viene pesata e sciolta accuratamente in dH₂O, agitando per alcuni minuti. L'ambiente è acidificato per aggiunta di acido perclorico (HClO₄) al 70%.

3) *Ossidazione del PVA.* La soluzione ossidante, dopo l'allestimento, viene versata rapidamente e quantitativamente nel flacone contenente la soluzione di PVA. Il tappo viene chiuso immediatamente e si procede ad una energica agitazione. La soluzione viene quindi lasciata reagire fino a completa decolorazione in un bagno termostato a 30 °C. Il tempo richiesto è di circa 60 min.

Sono state allestite soluzioni di PVA con un grado di ossidazione rispettivamente dell'1% e del 2% (PVA Ox 1%; PVA Ox 2%).

4) *Dialisi contro acqua deionizzata.*

La soluzione, a seguito dell'ossidazione, viene posta in un tubo da dialisi con membrana avente *cut-off* di 8000 Dalton e dializzata contro dH₂O mantenuta sotto costante agitazione.

5) *Liofilizzazione del PVA ossidato.*

Completata la dialisi, la soluzione polimerica nella membrana viene versata su piastre Petri per coltura cellulare P100. Dopo congelamento della soluzione polimerica a – 20 °C per 24 h, si procede alla liofilizzazione in evaporatore (Speed Vac Concentrator Savant, Instruments Inc., Farmingdale, NJ). Generalmente la liofilizzazione si completa nell'arco di 24 h e si ottiene un materiale bianco di aspetto fibroso e satinato.

Per l'allestimento degli *scaffold* con soluzioni in PVA ossidato all'1% ed al 2% è possibile procedere a partire dalla soluzione ottenuta operando come descritto fino al punto 4. In alternativa, si opera riportando in soluzione il PVA ossidato liofilizzato, ottenuto al termine della fase 5 sopra descritta, avendo cura di assicurare, anche in questo caso, una completa dissoluzione del materiale.

2.2 Realizzazione degli *scaffolds* mediante *cross-linking* fisico

Soluzioni di PVA nativo ed ossidato, allestite come descritto in precedenza, sono state colate alla temperatura di 40 °C, tra due lastre di vetro usate come stampo e distanziate tra loro da separatori metallici spessi 2 mm. Le soluzioni polimeriche sono state quindi esposte ad un trattamento di *cross-linking* fisico (*freeze-thawing*), il quale prevede la successione di 5 cicli di congelamento/scongelamento rispettivamente alle temperature di -20 °C e -2,5 °C. Al termine della procedura si ottengono gli idrogeli.

2.3. Caratterizzazione degli idrogeli mediante uno studio *in vitro*

2.3.1 Valutazione morfologica mediante microscopia elettronica a scansione (SEM)

La struttura dei supporti in PVA è stata analizzata morfologicamente tramite SEM.

Il SEM è un tipo di microscopio elettronico che sfrutta un fascio di elettroni primari focalizzati, che colpiscono il campione. A seguito dell'interazione tra il fascio primario e gli atomi costituenti il campione, vengono emesse numerose particelle, inclusi gli elettroni secondari. Questi ultimi sono catturati da un rivelatore e convertiti in impulsi elettrici inviati in tempo reale ad un *monitor*, dove viene eseguita una scansione analogica. Si ottiene così un'immagine in bianco e nero ad elevata risoluzione e grande profondità di campo, immediatamente intellegibile.

Campioni discoidali di idrogeli in PVA, PVA Ox 1% e PVA Ox 2%, allestiti come descritto in precedenza, sono stati disidratati mediante passaggi di 1 h ciascuno a RT in una serie ascendente di alcoli (40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%) ed infine posti in alcool al 95% *over night* (O.N.) a +4 °C. Dopo un passaggio in etanolo assoluto, i campioni sono stati sottoposti a *Critical Point* e metallizzati con oro (*sputtering*) prima di essere osservati con microscopio elettronico a scansione (modello JSM Jeol 6490) in dotazione presso il CUGAS - Centro Interdipartimentale di Servizi dell'Università di Padova.

2.3.2 Test di trazione (*Stress-strain test*)

Campioni rettangolari (5 mm x 25 mm) di idrogeli in PVA nativo, PVA Ox 1% e PVA Ox 2% sono stati valutati per le caratteristiche di resistenza alla trazione.

Per il test è stato utilizzato il sistema Bose (Electroforce, Eden Prairie, MN, USA) presso il Dipartimento di Ingegneria Industriale dell'Università degli Studi di Padova. Si tratta di uno strumento costituito da due motori lineari a magnete permanente, posizionati un su banco di prova, e da due *grip* in titanio, molto leggere, tra le quali si inserisce il campione da testare. Per rilevare e misurare la resistenza alla trazione ad intervalli di tempo costanti vengono utilizzati dei trasduttori o celle di carico (Figura 7) costruite in acciaio inossidabile.

È stata impiegata una cella con una sensibilità pari a 22N. L'elaborazione dei dati è stata effettuata mediante il software *WinTest*.

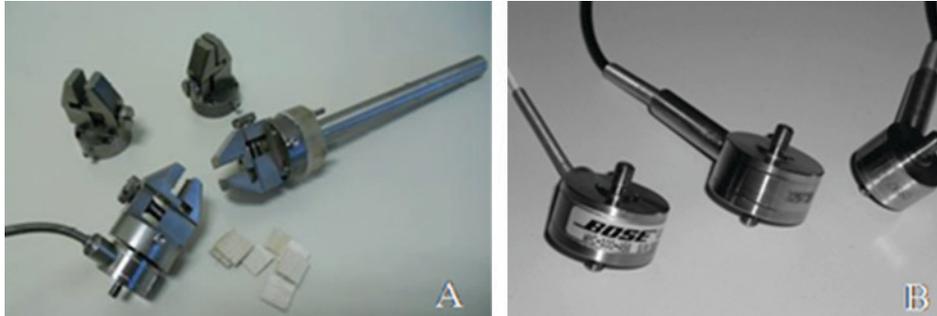


Figura 7. (A) *Grips* e legni di balsa. (B) Celle di carico.

2.3.3 Valutazione dell'indice di rigonfiamento

L'indice di rigonfiamento di idrogeli in PVA nativo, ossidato 1% e 2%, ottenuti come descritto nel Paragrafo 2.2 è stato valutato mediante *Test di Swelling*. Cinque campioni rettangolari (5 mm x 25 mm x 2 mm) di ciascuna tipologia sono stati introdotti, singolarmente, in tubi da 15 ml (Cornig-Falcon®) contenenti ognuno 5 ml di tampone fosfato salino (PBS). Quotidianamente, dopo aver rimosso l'eccesso di soluzione salina, i campioni sono stati pesati su bilancia analitica per evidenziarne il comportamento in soluzione. L'indice di rigonfiamento *Swelling Index*, (SI) è stato rilevato attraverso la formula:

$$\% \text{ Swelling} = [(W_s - W_d)/W_d] * 100$$

W_s = Peso dell'idrogelo rigonfiato

W_d = Peso dell'idrogelo asciutto

2.4 Caratterizzazione degli idrogeli mediante uno studio *in vivo*

2.4.1 Impianto degli idrogeli

Al fine di identificare quale polimero possedesse le caratteristiche più confacenti ai nostri scopi, è stato indagato il comportamento dopo impianto *in vivo* di idrogeli in PVA nativo, PVA Ox 1%, PVA Ox 2% utilizzando come modello animale il topo (Balb-c).

Dopo anestesia con Isoflurano/Ossigeno e rasatura del pelo, l'impianto ha previsto un'incisione lombotomica a livello dorsale destro, in sede paravertebrale, dove è stata creata una tasca sottocutanea; lo *scaffold* è stato allocato sulla fascia muscolare del muscolo gran dorsale e quindi suturato con un punto transfisso in monofilamento (Tycron 4/0). Si è poi provveduto alla ricostruzione della parete a strati, mediante punti staccati in filamento riassorbibile (Novosyn 4/0 e Monosyn 4/0 e 5/0).

Nell'immediato postoperatorio i topi sono stati mantenuti in profilassi antibiotica con Baytril (5mg/kg) ed antinfiammatoria con Rimadil (0,5 mg/kg) per i primi 5 giorni postoperatori.

L'espianto è avvenuto a 12 settimane di distanza.

I topi sono stati sottoposti ad eutanasia mediante overdose di CO₂ gassosa. Si è quindi proceduto previa rasatura del pelo, alla riapertura della pregressa incisione ed all'individuazione del costrutto.

Questo è stato espantato, misurato con doppio decimetro e sottoposto ad analisi morfologica, istologica e immunoistochimica.

2.4.2 Analisi istologica ed immunoistochimica degli espianti

Al fine di valutare le caratteristiche dei biomateriali dopo impianto e il loro stato di biodegradazione, i campioni espantati sono stati inclusi in OCT e tagliati in sezioni di 10 µm di spessore. Successivamente le suddette sezioni sono state colorate con ematossilina/eosina (H/E) e montate con Eukitt (Bio-Optica, Milano, Italia).

In parallelo, la caratterizzazione immunologica delle cellule identificate in contiguità con gli idrogeli è stata condotta su espianti fissati in formalina al 10% ed inclusi in paraffina. Sezioni di

spessore pari a 5µm sono state sparaffinate e reidratate secondo un protocollo di routine. La caratterizzazione immunologica è stata effettuata con Dako AutoStainer/AutoStainer Plus (Dako, Milano, Italia) con i seguenti anticorpi diluiti in PBS: anti-CD3 (polyclonal rabbit anti-human CD3, A 0452; Dako, Milano, Italia) diluizione 1:500; anti-F4/80 (sc-26643-R; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) diluizione 1:800. Al fine di rimuovere l'attività delle perossidasi endogene e migliorare la penetrazione degli anticorpi, le sezioni sono state incubate in una soluzione all'1% di perossido di idrogeno in dH₂O, e quindi lavate in PBS 0,01 M. Per entrambi i protocolli, lo smascheramento antigenico è stato effettuato con tampone citrato di sodio 10 mM (pH 6.0, 90 ° C per 10 min). Le sezioni sono poi state incubate per 30 min in *blocking-serum* [0,04% di sieroalbumina bovina (BSA, A2153, Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e 0,5% di siero di capra normale (X0907, Dako, Carpinteria, CA, USA)] per eliminare siti di *binding* aspecifici, e successivamente per 1 h a RT con gli anticorpi primari di cui sopra. Il legame dell'anticorpo primario è stato rivelato mediante incubazione per 30 min a RT con siero anti-*rabbit/mouse* diluito 1:100 in *blocking serum* (Dako®EnVision + TM perossidasi, coniglio/mouse; Dako, Glostrup, Danimarca) e sviluppato con 3,3'-diamminobenzidina (DAB) per 3 min a RT. Infine, le sezioni sono state contrastate con ematossilina. Come controllo negativo, le sezioni sono state incubate senza anticorpi primari.

2.4.3 Analisi ultrastrutturale degli espanti

L'ultrastruttura degli espanti è stata indagata mediante SEM. Gli espanti sono stati fissati in una soluzione di glutaraldeide al 3% in tampone cacodilato 0,1 M pH 7,2 e disidratati mediante passaggi di 1 h ciascuno a RT in una serie ascendente di alcoli (40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%) ed infine posti in alcool al 95% O.N. a + 4 °C. Dopo un passaggio in etanolo assoluto, i campioni sono stati sottoposti a *Critical Point* e metallizzati con oro (*sputtering*). I preparati ottenuti sono stati quindi osservati con microscopio elettronico a scansione

3. Ottenimento della matrice intestinale acellulare

3.1 Espianto dell'intestino

Ratti adulti Sprague-Dawley, del peso approssimativo di 250-350 g, sono stati sottoposti ad eutanasia con *overdose* di CO₂ gassosa, secondo quanto raccomandato dalle linee guida del benessere animale. Dopo rasatura del pelo a livello ventrale, si è proceduto ad eseguire un'incisione xifo-ombelico-pubica mediana: all'ingresso in peritoneo il piccolo intestino è stato eviscerato e le aderenze con il grosso intestino lisate; sono stati quindi apposti due punti di sutura in Novosyn 4/0 a monte (ovvero a livello duodenale), e a valle in corrispondenza dell'ultima ansa ileale. Il tratto di intestino tenue intermedio che va dal ligamento del Treitz al cieco è stato prelevato e lavato con PBS addizionato ad una soluzione al 2% di penicillina e streptomina, per rimuovere feci, muco e altri detriti cellulari.

3.2 Decellularizzazione dell'intestino

Dopo espanto dell'intestino tenue, secondo le modalità descritte sopra, tratti della lunghezza di circa 10 cm sono stati accuratamente lavati in PBS addizionato in soluzione antibiotica al 2% e quindi sottoposti a cicli di decellularizzazione secondo il protocollo di Meezan⁷³. Ogni ciclo prevede le seguenti fasi:

- a) trattamento osmotico in acqua MilliQ sterile per 72 h a 4 °C con ricambi ogni 2 h;
- b) trattamento detergente con soluzione sterile di Sodio Deossicolato (Sigma-Aldrich) al 4% in dH₂O per 4 h a RT (in agitazione su bascula);
- c) trattamento enzimatico con DNAsi (Sigma-Aldrich) in NaCl sterile per 2 h a RT. (in agitazione su bascula).

Il ciclo si conclude con l'eliminazione della soluzione di DNAsi ed accurato risciacquo del tessuto con acqua MilliQ sterile.

La procedura viene ripetuta per il numero di cicli congeniali alla completa decellularizzazione del tessuto.

3.2.1 Valutazione dell'efficacia del processo di decellularizzazione

Per verificare l'efficacia della procedura di decellularizzazione, la matrice extracellulare intestinale è stata valutata dopo ogni ciclo mediante colorazione istologica con 4',6-diammidin-2-fenilindolo (DAPI).

Il DAPI è un colorante organico fluorescente che legandosi fortemente a regioni del DNA ricche in sequenze Adenina-Timina consente di rivelare la presenza di cellule o residui del genoma cellulare. L'assenza di elementi fluorescenti è da correlare alla completa decellularizzazione del tessuto.

Brevemente, campioni di intestino prelevati dal tratto sottoposto alla procedura di decellularizzazione sono stati immersi in isopentano freddo (Sigma-Aldrich), congelati ai vapori d'azoto e conservati a -80 °C per almeno 24 h al fine di garantirne un congelamento ottimale. Successivamente sono stati quindi inclusi in ghiaccio e criostatati con criostato CM 1850 UV (Leica) ottenendo sezioni di spessore pari a 7 µm. I preparati sono stati poi montati con montante acquoso DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) e osservati al microscopio ottico provvisto di lampada a fluorescenza e filtro adeguato. Campioni di intestino di ratto nativo sono stati sottoposti alla stessa procedura ed usati come controllo.

3.2.2 Caratterizzazione morfologica della matrice acellulare

Per indagare la struttura dell'intestino nativo e decellularizzato, campioni di entrambi sono stati analizzati mediante colorazione istologica con ematossilina/eosina. Brevemente, i tessuti (intestino nativo e acellulare) sono stati fissati con formalina al 10%, inclusi in paraffina e tagliati al microtomo ottenendo sezioni di spessore pari a 5 µm. Dopo rimozione della paraffina e reidratazione secondo il protocollo di routine, le sezioni sono state colorate con ematossilina/eosina, e montate con Eukitt.

4. Lo scaffold composito

Sono state allestite due tipologie di *scaffold* composito: a) PVA Ox 1% cross-linkato con matrice intestinale acellulare intera (PVA Ox 1%/ECMi); b) PVA Ox 1% cross-linkato con matrice intestinale acellulare liofilizzata (PVA Ox 1%/ECMI).

4.1 Preparazione della matrice acellulare intera

Dopo decellularizzazione, l'intestino è stato spiegato e, utilizzando una lama monouso da microtomo, è stato tagliato longitudinalmente. Si è ottenuto quindi un foglietto di matrice intestinale acellulare in cui la membrana mucosa risultava essere esposta verso l'alto. Le matrici intere possono essere conservate a -20 °C fino al momento dell'allestimento degli *scaffold* compositi

4.2 Preparazione della matrice acellulare liofilizzata

La matrice intestinale acellulare è stata introdotta in un tubo da 50 ml a cui sono stati poi aggiunti 15 ml di soluzione fredda di acido acetico al 10% in acqua MilliQ. Lavorando in bagno di ghiaccio, il tessuto è stato omogenato mediante *Ultraturrax* (Janke&Kunkel, GmbH, Staufen, Germania) effettuando 8 tritrazioni/20 secondi ciascuna intervallate da 6 minuti di pausa. Al termine della procedura, la sospensione è stata quindi centrifugata (1500 rpm/5 min) e risospesa adeguatamente prima di essere colata in una piastra per coltura cellulare P60 (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) usata come stampo. In ogni piastra sono stati trasferiti 3.5 ml di matrice acellulare che dopo congelamento a -20 °C sono stati liofilizzati O.N. in evaporatore. Le matrici liofilizzate possono essere conservate a -20 °C fino al momento dell'allestimento degli *scaffold* compositi.

4.3 Allestimento degli *scaffolds* compositi

Per l'allestimento degli *scaffold* compositi: a) PVA Ox 1%/ECMi; b) PVA Ox 1%/ECMI, soluzioni polimeriche di PVA Ox 1% sono state colate in volume di 3.5 ml in piastre per coltura cellulare P60 (BD Falcon) usate come stampo. Una volta che le soluzioni sono state distribuite omogeneamente, vi sono state quindi adagiate: a) matrice intestinale acellulare intera (preparata come descritto al Paragrafo 4.1); b) matrice intestinale liofilizzata (preparata come descritto al Paragrafo 4.2). I sistemi così predisposti sono stati sottoposti a *cross-linking* fisico come descritto nel Paragrafo 2.2. Esso, oltre alla formazione dell'idrogel, consente la creazione di un sistema composito stabile PVA/matrice acellulare.

Campioni discoidali con diametro pari a 0.7 mm sono stati poi ottenuti da ciascuna membrana polimero/matrice mediante l'utilizzo di un punch.

5. Valutazione dell'interazione tra *scaffold* composito e cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo

5.1 Colture cellulari

Una linea primaria di Cellule Staminali Mesenchimali da tessuto adiposo (Ad-MSc) di origine umana è stata acquistata da Tebu-Bio sas (Francia, Europa); le cellule sono quindi state scongelate ed espanse secondo le indicazioni fornite dalla ditta.

Per l'espansione, le cellule sono state coltivate in piastre Petri, diametro di 60 mm, a 37 °C in atmosfera al 5% di CO₂ umidificata. Il terreno proliferativo completo è costituito da: α MEM (*alpha-modified eagle medium without nucleosides*), 15% siero fetale bovino (FBS), 1% soluzione antibiotica (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

5.2 Valutazione delle colture cellulari al microscopio ottico

Le colture cellulari sono state osservate giornalmente tramite Microscopio ottico DM/IL (Leica). Le immagini sono state scattate con la camera Nikon Digital Sight Ds-SMCC (Nikon Corporation) ad una sub-confluenza del 70-80%.

5.3 Semina di Ad-MSC su *scaffold* compositi

Gli *scaffolds* compositi a) PVA Ox 1%/ECMI; b) PVA Ox 1%/ECMI, sono stati sottoposti a disinfezione mediante 4 lavaggi/2 h ciascuno in PBS addizionato per il 2% di soluzione antibiotica e, prima della semina, incubati O.N. a 37°C in *medium* basale. In parallelo, le cellule Ad-MSC, dopo espansione, sono state staccate dalla piastra di coltura mediante trattamento con tripsina/EDTA, centrifugate a 1500 rpm per 5 min e risospese in terreno proliferativo completo.

Su ogni supporto sono state seminate 20.000 cellule/cm² in terreno proliferativo completo. In parallelo, la semina è stata effettuata anche su *scaffold* in solo PVA Ox 1% e su pozzetto di piastra *multiwell* da 48 pozzetti come controllo positivo.

5.4 Valutazione di adesione e proliferazione cellulare sugli *scaffold* compositi

L'adesione e la proliferazione di cellule Ad-MSC sugli *scaffold* compositi in confronto a *scaffold* in PVA Ox 1% è stata valutata a 7 giorni dalla semina mediante saggio MTT.

Il saggio MTT è un test colorimetrico che consente di misurare la vitalità cellulare e la proliferazione mediante l'analisi dell'attività mitocondriale. Il saggio sfrutta l'abilità dell'enzima succinato deidrogenasi mitocondriale di convertire il bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (di colore giallo) in formazano (di colore blu/violaceo).

Per eseguire il test, allo scadere dell'*end-point* di semina (7 gg) le cellule sono state trattate con MTT (0,5 mg/ml) per 4 h, alla temperatura di 37°C con il 5% di CO₂ in atmosfera umidificata. Al termine del periodo di incubazione, il terreno è stato rimosso, avendo cura di non aspirare i cristalli

di formazano formatisi. Il precipitato presente nei pozzetti è stato trattato con 2-propanolo acido (0,04 M HCl in 2-propanolo).

A solubilizzazione avvenuta, l'assorbanza è stata misurata su *Microplateautoreader EL 13* ad una lunghezza d'onda di 570 nm. La quantità di sale formatasi, e quindi l'assorbanza misurata, è direttamente proporzionale al numero di cellule attive.

6. Impianto di *scaffold* compositi in omento di ratto

Al fine di studiare il comportamento dopo impianto *in vivo* degli *scaffold* compositi (in assenza di Ad-MSC [(-)Ad-MSC]; o in presenza di Ad-MSC [(+)Ad-MSC]), i supporti sono stati impiantati in addome di ratti Sprague Dawley.

Dopo anestesia gassosa con Isoflurano/Ossigeno e rasatura del pelo, è stata effettuata un'incisione laparotomica xifo-pubica: aperta la cavità peritoneale, è stato individuato l'omento, a partire dalla grande curva gastrica e lo *scaffold* è stato allocato e ad esso suturato con un punto transfisso in monofilamento (PDS 4/0). Si è poi provveduto alla sintesi della parete addominale per strati, mediante punti staccati in filamento riassorbibile (Novosyn 4/0 e Monosyn 4/0 e 5/0).

Nell'immediato postoperatorio i ratti sono stati mantenuti in profilassi antibiotica con Baytril (5 mg/kg) ed antinfiammatoria con Rimadil (0,5 mg/kg) per i primi 2 giorni postoperatori. L'espianto è avvenuto a 4 settimane di distanza.

I ratti sono stati sottoposti ad eutanasia mediante overdose di CO₂ gassosa. Si è quindi proceduto previa rasatura del pelo, alla riapertura della pregressa laparotomia ed all'individuazione del costruito, in sede omentale.

Questo è stato espantato, misurato con doppio decimetro e sottoposto ad analisi istologica e immunoistochimica.

6.1 Valutazione istologica ed immunohistochimica degli espianti

I campioni espiantati sono stati fissati in formalina al 10%, e dopo inclusione in paraffina sono state ottenute delle sezioni di spessore pari a 5 µm che successivamente, prima della colorazione, sono state sparaffinate e reidratate secondo il protocollo di routine. Successivamente le sezioni sono state colorate con H/E e montate con Eukitt.

La caratterizzazione immunologica è stata effettuata con Dako AutoStainer/AutoStainer Plus (Dako) con i seguenti anticorpi diluiti in EnVision™ FLEX: *Rabbit Anti-Human CD3* (1:1000) (Dako), *Rabbit Anti-Mouse F4/80* (1:800) (Santa Cruz), *Rabbit Anti-Human Ki-67* (1:200) (Spring Bioscience, UCS Diagnostic, Roma, Italia), *Rabbit Anti-Desmina* (1:400) (AnaSpec, San Jose, California, USA), *Mouse Monoclonal Anti-αSMA* (1:500) (Sigma, Missouri, USA), *Mouse Anti-Human MNF116* (1:200) (Dako). Dopo smascheramento degli epitopi, le sezioni vengono incubate per 5 min con Peroxidase-blocking Serum (EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent; Dako) al fine di rimuovere i legami aspecifici e per 30 min con l'anticorpo primario. Le sezioni trattate con Anti-αSMA, Anti-Desmina, Anti-Ki-67 e Anti-MNF116 sono state quindi incubate con i corrispettivi anticorpi secondari per 15 min (EnVision™ FLEX Mouse-Linker ed EnVision™ FLEX Rabbit-Linker; Dako). Per tutti i protocolli è stato utilizzato il polimero EnVision™ FLEX/HRP per 20 min e 3,3'-diaminobenzidina (EnVision™ FLEX Substrate Buffer, + DAB + Chromogen; Dako) al fine di mettere in evidenza la positività della reazione.

Tutte le sezioni sono state infine contro-colorate con ematossina (EnVision™ FLEX Hematoxylin, Dako) per 5 min al fine di marcare i nuclei cellulari, de-idratate con una scala discendente di alcoli, xylene e montati. Tutti gli step sono stati effettuati a RT.

7. Analisi statistica

I risultati sono espressi come media ± Deviazione Standard (SD). I dati sono stati elaborati utilizzando SPSS v. 19,0 software (SPSS Inc., USA). L'analisi statistica per valutare le differenze tra i gruppi è stata effettuata in due fasi: prima, i dati sono stati confrontati con il test non-

parametrico di Kruskal-Wallis; se sono state trovate differenze significative, i gruppi sono stati confrontati individualmente utilizzando il test U di Mann-Whitney; $p < 0,05$ è stato considerato significativo.

RISULTATI E DISCUSSIONE

1. Progetto di ricerca clinica

1.1 La casistica del nostro Centro

Il progetto di ricerca è partito dall'analisi retrospettiva condotta presso la Chirurgia Pediatrica (Dipartimento della Salute della Donna e del Bambino, Università di Padova), nella popolazione pediatrica affetta da *short bowel syndrome* con diagnosi avvenuta nel periodo 1981-2016, ovvero negli ultimi 35 anni. Per tale patologia è stata osservata un'incidenza media pari a 1,05 nuovi casi/anno, in linea con i dati riportati dalla letteratura⁷⁻⁹. La popolazione di interesse è risultata essere costituita, in tale periodo, da 37 pazienti, 19 maschi e 18 femmine, con un'età gestazionale media di 34 settimane. Il 21,6% di tali pazienti proveniva da altri Centri e, nell'ambito di questa percentuale, una quota pari al 37,5% aveva già subito un trattamento chirurgico resettivo iniziale presso il Centro di provenienza.

Le cause di SBS osservate nella nostra popolazione (Atresia Intestinale, Enterocolite Necrotico Emorragica, Gastroschisi-Onfalocele, Volvolo intestinale su malrotazione, Morbo di Hirschsprung, o altra causa) sono espresse in percentuale, in ordine decrescente, come illustrato nella Figura 8.

Il tempo medio di *follow-up* per questi pazienti è stato di 9 anni. La durata media di ricovero è stata pari a 131 ± 59 giorni, il numero medio di ricoveri/paziente è stato pari a $3,8 \pm 7$, la durata media della nutrizione parenterale (NP) è stata di $566,7 \pm 195$ giorni. Il peso medio dei pazienti all'ingresso è stato pari a $2.476,7 \pm 1.200,6$ g, il peso alla dimissione è stato pari a $4.235,1 \pm 1.085,5$ g.

Cinque su 37 (13,5%) bambini presentavano una lunghezza intestinale molto critica, ossia inferiore ai 40 cm, in assenza di valvola ileo-cecale: tali pazienti sono andati incontro a vari tipi di intervento chirurgico di allungamento intestinale (i.e. *tapering* intestinale, STEP), che ha consentito di ottenere per ciascuno, un allungamento intestinale medio di 33,8 cm.

Il tasso di mortalità complessiva è risultato pari all'8,1%, mentre la quota di pazienti adulti andati incontro a trapianto d'intestino è stata di 4/37 (10,8%).

Attualmente solo 4 pazienti (10,8%) (con età inferiore ai 5 anni) sono ancora dipendenti da un supporto mediante nutrizione parenterale domiciliare e, di questi, 3 sono candidati ad un futuro intervento chirurgico di allungamento intestinale.

Fino ad oggi quindi, la gestione multidisciplinare di questi pazienti, presso il nostro Centro, in collaborazione con il neonatologo, il pediatra e il nutrizionista, ci ha consentito di trattare in maniera adeguata e soddisfacente quasi il 92% dei casi di SBS.

Tali percentuali risultano essere in linea con quelle di molti Centri italiani ed europei che si occupano della gestione medica e chirurgica di tale patologia^{1,5}.

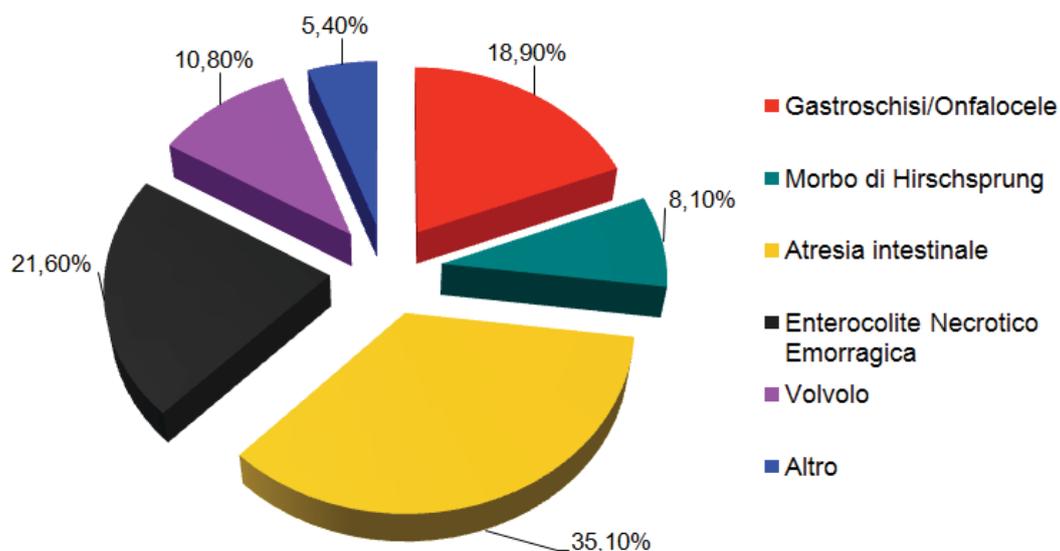


Figura 8. Cause di SBS osservate nella nostra popolazione di pazienti.

1.2 La sottopopolazione campione

Per lo studio clinico di valutazione della citrullina plasmatica come *marker* predittivo dell'insufficienza intestinale, negli ultimi 3 anni sono stati arruolati, in corso di *follow-up* clinico, 10 pazienti affetti da SBS, di cui 5 maschi e 5 femmine, con un'età media di 1,4 anni. Quattro di loro erano già seguiti da tempo per SBS presso il nostro Centro, mentre i restanti erano nuovi casi

diagnosticati o giunti all'attenzione del Centro nel periodo 2013-2016.

L'eziopatogenesi della SBS in tali pazienti era legata ad enterocolite necrotico-emorragica del prematuro (NEC) nel 50% dei casi, ad atresia intestinale (AI) nel 30% dei casi ed a difetti della parete addominale, quali gastroschisi ed onfalocele, nel restante 20% dei casi.

Al momento del dosaggio della citrullinemia, la lunghezza intestinale media di tali pazienti era pari a 70,7 cm (*range*: 16-100 cm) e solo nel 50% di essi era stata conservata, all'intervento chirurgico, la valvola ileo-cecale.

Uno dei pazienti, seguito presso altro Centro, è stato sottoposto (prima del dosaggio della citrullinemia) ad intervento di allungamento intestinale mediante *Serial transverse enteroplasty procedure* (STEP), con un conseguente allungamento intestinale di 54 cm.

Altri 3 di questi pazienti (30%) sono tuttora dipendenti da un supporto di nutrizione parenterale ciclizzata domiciliare e sono strettamente seguiti da un'*equipe* multidisciplinare con controlli clinici di *follow-up*, esami ematochimici seriati e seguono un piano di nutrizione, strettamente controllato dalle dietiste del Servizio di Nutrizione Clinica del Dipartimento della Salute della Donna e del Bambino.

Il dosaggio è stato eseguito in assenza di altra patologia intercorrente (es. sepsi, stato occlusivo) e non prima che fossero trascorse almeno 6 settimane dall'intervento chirurgico.

1.3 Dosaggio della citrullina sierica e analisi statistica

Diversi studi suggeriscono che la citrullina plasmatica nei pazienti affetti da SBS possa essere un indicatore affidabile della massa residua di enterociti funzionali, della progressione dell'insufficienza intestinale, e della possibilità di svezzamento da nutrizione parenterale. Pertanto, la citrullina potrebbe aiutare a selezionare i pazienti con necessità di nutrizione parenterale a lungo termine e a stabilire la strategia di riabilitazione intestinale⁷⁴. Questo amminoacido viene assunto solo in piccole quantità nella dieta, e viene prodotto quasi esclusivamente dagli enterociti⁷⁵. Poiché la citrullina non viene incorporata nelle proteine endogene o esogene, non è né rilasciata attraverso

proteolisi né secreta dal fegato¹⁹. La citrullina viene convertita in arginina nel rene; di conseguenza, la compromissione della funzione renale può modificare la concentrazione di citrullina plasmatica²¹. In presenza, invece, di una funzione renale normale, solo l'insufficienza intestinale può influenzare i livelli plasmatici di citrullina. Di conseguenza, la citrullina diventa un *marker* utile a determinare la funzione intestinale residua di assorbimento nei pazienti con SBS¹⁹.

In questo studio, quindi, è stato indagato il rapporto tra il valore clinico della citrullina plasmatica e la lunghezza intestinale residua o la durata della dipendenza da NP nei pazienti arruolati.

I risultati del dosaggio sierico del valore della citrullinemia sono stati riassunti nella Tabella 3 e analizzati sia in relazione con la lunghezza intestinale sia con la durata della nutrizione parenterale (Figura 9).

In 3 pazienti (30%), i dosaggi sono stati ripetuti in maniera seriatà nel tempo, parallelamente a variazioni dell'apporto di nutrizione parenterale (aumento o diminuzione del numero di ore di apporto parenterale/die, aumento o diminuzione del volume della nutrizione parenterale o della sua concentrazione).

Come si evince dalla tabella, in accordo con l'esperienza di molti altri Centri italiani ed europei¹⁸⁻²² che si occupano di SBS, i valori della citrullinemia sierica nei pazienti in corso di un programma di nutrizione enterale e di nutrizione parenterale ciclizzata, sono risultati strettamente correlati ai parametri di insufficienza intestinali considerati (Figura 8).

In particolare, la concentrazione di citrullina nel plasma è risultata essere direttamente proporzionale alla *lunghezza intestinale residua* ($r = 0,4$) e inversamente proporzionale alla *durata* della dipendenza dall'apporto *parenterale* ($r = -0,7$), in entrambi i casi con un'elevata significatività statistica, pari a $p < 0,01$.

<i>Citrullina</i> ($\mu\text{mol/l}$)	<i>Lunghezza intestinale</i> (<i>cm</i>)	<i>Durata della NP</i> (<i>gg</i>)
7,56	25	310,00
8,93	100	209,00
8,98	55	1042,00
9,08	100	120,00
10,85	55	1042,00
11,60	39	324,00
14,25	16	1390,00
15,06	82	370,00
18,12	100	120,00
19,20	55	1042,00
22,26	96	190,00
26,46	96	190,00
27,02	96	190,00
30,67	75	246,00
<i>p</i>	0,00000005	0,0004554
<i>r</i>	0,3942542806	-0,6927493516

Tabella 3. Dosaggi della citrullinemia, in rapporto con la lunghezza intestinale residua e la durata della nutrizione parenterale, *p value* e indice di correlazione *r*.

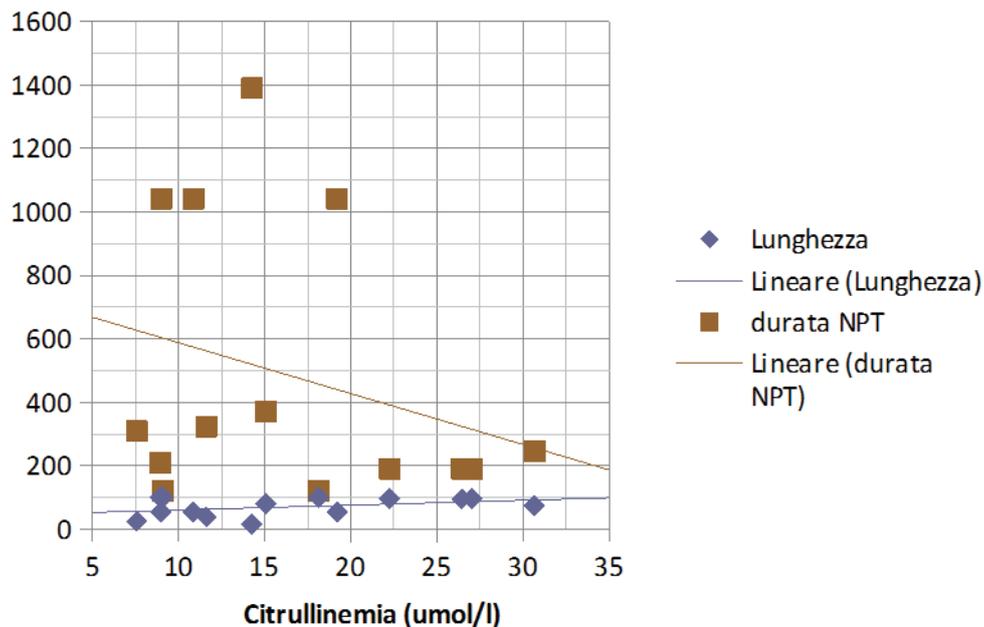


Figura 9. Correlazione statistica tra livelli di citrullinemia sierica dei pazienti e lunghezza intestinale residua o durata della dipendenza da nutrizione parenterale.

La correlazione osservata tra i livelli di citrullina plasmatica e la lunghezza intestinale residua è in linea con quanto riportato in letteratura⁷⁴. L'ulteriore correlazione con la durata della dipendenza da nutrizione parenterale è stata, invece, dimostrata per la prima volta dallo studio clinico svolto nel nostro Centro. Sulla base dei risultati ottenuti, il presente studio supporta l'ipotesi che la citrullina sia un valido biomarcatore della funzionalità intestinale nei pazienti con SBS.

2. Progetto di ricerca sperimentale

2.1 Caratterizzazione degli *scaffold* in PVA nativo e ossidato

Nella prospettiva di realizzare lo *scaffold* composito in PVA/ECM, è stata innanzitutto studiata la componente del biomateriale sintetico. L'obiettivo è stato quello di ottenere un polimero dotato di caratteristiche che fossero il più possibile performanti per l'utilizzo in ingegneria tissutale, in termini di proprietà morfo-meccaniche, biocompatibilità e biodegradabilità. A tale scopo, è stata studiata la sintesi chimica di nuovi idrogeli a base di PVA: l'1% o il 2% dei gruppi ossidrilici presenti sul *backbone* della molecola sono stati convertiti tramite un processo ossidativo controllato in gruppi carbonilici. Tale modifica di ossidazione chimica è finalizzata a conferire un certo grado di biodegradabilità al polimero dopo *cross-linking*, ottimizzandone le possibilità di utilizzo come sostituto tissutale nelle applicazioni di rigenerazione intestinale.

Il PVA ossidato è stato, quindi, caratterizzato in confronto alla sua forma nativa per quanto riguarda l'ultrastruttura specifica, le proprietà di elasticità e resistenza meccanica, il comportamento a rigonfiamento e il grado di biodegradabilità.

2.1.1 Proprietà meccaniche

Per esaminare la possibilità di utilizzare il PVA ossidato come supporto strutturale per la rigenerazione dell'intestino, sono state valutate le proprietà meccaniche dell'idrogel modificato chimicamente (PVA Ox 1% e PVA Ox 2%) in confronto al polimero nativo. Inoltre, per simulare l'esposizione ai fluidi fisiologici, i tre tipi di PVA sono stati testati subito dopo l'allestimento e

dopo immersione in soluzione salina per 24 h. I risultati delle prove di trazione uniassiale sono rappresentati dalle curve sforzo-deformazione dei campioni (Figura 10), mentre le caratteristiche meccaniche sono riassunte in Tabella 4.

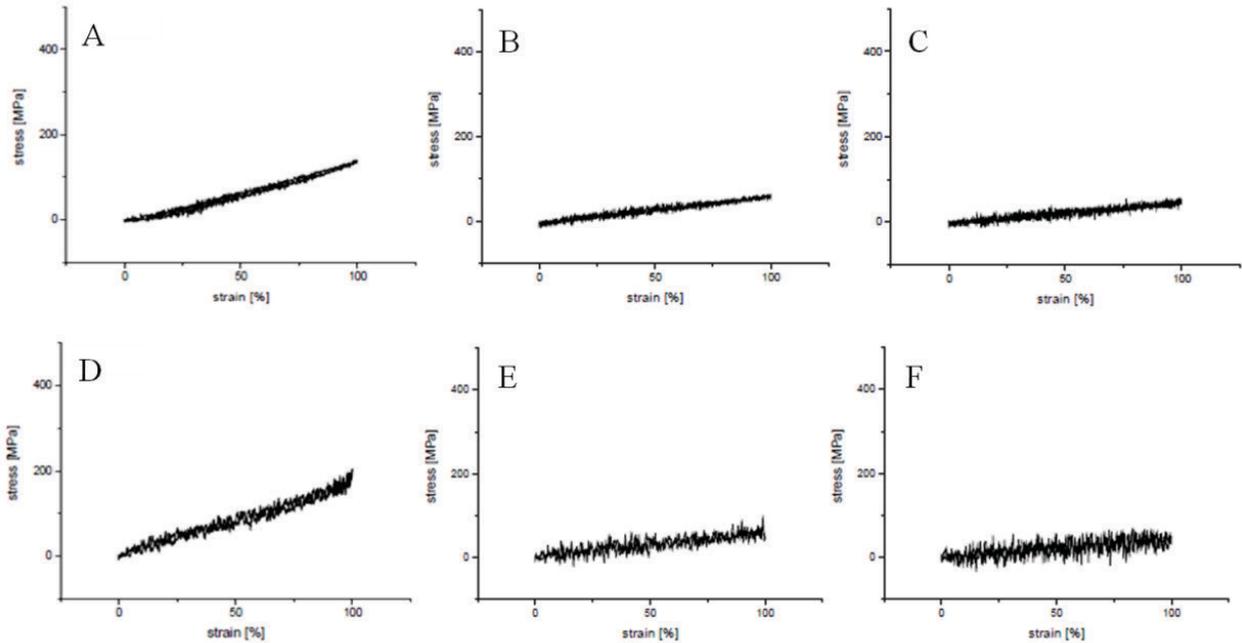


Figura 10. Curve sforzo-deformazione di campioni di PVA nativo (A, D), Ox 1% (B, E) e Ox 2% (C, F) analizzati subito dopo l'allestimento (A, B, C) o dopo immersione in soluzione salina (D, E, F).

Nelle curve sforzo-deformazione, i dati registrati dallo strumento sono espressi in N/mm. Risulta però più utile convertire il dato di forza applicata in MPa, dividendo la forza applicata per l'area resistente di ciascun campione ed esprimendo la deformazione in %. Si ottiene così un grafico sforzo-deformazione nel quale la pendenza della curva esprime, in campo elastico, il modulo di elasticità del materiale (modulo di *Young*). La pendenza della curva è stata determinata mediante interpolazione lineare (Figura 10).

	PVA nativo		PVA Ox 1%		PVA Ox 2%	
		in PBS		in PBS		in PBS
	1,735	1,574	0,510	0,764	0,298	0,359
	1,392	1,646	0,628	0,538	0,309	0,227
	1,678	1,824	0,608	0,671	0,309	0,324
	1,453	1,589	0,520	0,57	0,33	0,488
	1,579	1,631	0,463	0,57	0,355	0,6
Media	1,567	1,653	0,546	0,622	0,320	0,399
mediana	1,579	1,631	0,520	0,570	0,309	0,359
SD	0,145	0,100	0,069	0,093	0,023	0,146

Tabella 4. Valori del modulo elastico (MPa) relativi ai campioni di PVA.

Dall'analisi dei dati ottenuti, si possono evincere due risultati importanti:

- all'aumentare del grado di ossidazione del polimero diminuisce il valore del modulo elastico;
- per ciascuna tipologia di PVA, nei valori del modulo elastico non si rilevano differenze significative ($p < 0,05$) tra i campioni testati subito dopo la preparazione e i campioni mantenuti in PBS per 24 h.

Complessivamente, il test di trazione ha dimostrato che la risposta meccanica è chiaramente influenzata dal trattamento di ossidazione, evidenziando che il PVA nativo possiede una migliore resistenza e rigidità rispetto alle sue varianti ossidate. Questo è probabilmente dovuto al numero di gruppi idrossili disponibili per i legami a idrogeno intra- ed intermolecolari⁷⁶: modificandone il numero è dunque possibile modulare le caratteristiche meccaniche dell'idrogel. Sulla base di questo, è ragionevole pianificare una strategia di ingegneria tissutale intestinale basata sulla regolazione della risposta meccanica del PVA per l'ottenimento di uno *scaffold* idoneo a mimare le caratteristiche biostrutturali dell'intestino.

2.1.2 Valutazione dell'indice di rigonfiamento

Oltre che per le loro promettenti caratteristiche di biocompatibilità, gli idrogeli in PVA sono particolarmente interessanti per applicazioni in campo biomedico in virtù della loro responsività all'ambiente fisiologico o biologico in cui vengono utilizzati. Recentemente la ricerca scientifica si

è concentrata sullo sviluppo e l'analisi di idrogeli che dimostrino di essere reattivi alle condizioni ambientali circostanti, esibendo una certa capacità di rigonfiamento in seguito a modificazioni delle loro proprietà intrinseche o delle condizioni esterne⁷⁷.

Essendo dei *network* polimerici tridimensionali idrofilici, gli idrogeli in PVA sono capaci di adsorbire grosse quantità di acqua o di fluidi biologici. Essi infatti, a causa della presenza di reticolazioni chimiche o fisiche nel *network* polimerico, non possono disciogliersi in acqua ma possono assorbirla, aumentando così il proprio volume. Tale assorbimento di acqua, dovuto alla forza di diluizione, causa il rigonfiamento del *network*. Allo stesso tempo le catene polimeriche, tra le giunzioni del *network*, dovranno assumere una configurazione allungata con conseguente generazione di una forza elastica. Più il rigonfiamento procede, più questa forza elastica aumenta e la forza di diluizione diminuisce. Alla fine verrà raggiunto uno stato di equilibrio di rigonfiamento, nel quale queste due forze saranno eguagliate. La capacità di rigonfiamento (o *swelling*) così descritta rende gli idrogeli in PVA estremamente idonei per la formulazione di sistemi per il rilascio controllato di principi attivi, sensibili a variazioni di temperatura, pH e particolari soluti.

Gli idrogeli di PVA nativo ed ossidato, ottenuti dopo 5 cicli di *cross-linking* fisico, sono stati osservati e valutati a diversi *end-point* dopo immersione in soluzione salina. Il PVA ha evidenziato un picco assoluto di rigonfiamento nelle prime 24 h, visibile anche a livello macroscopico, per poi proseguire sostanzialmente con un lento rilascio nel corso delle successive ore di analisi (Figura 11). Questi dati evidenziano il comportamento osmotico del polimero. Risultano particolarmente rilevanti le differenze riscontrate tra il PVA nativo e ossidato: nel primo caso l'indice di rigonfiamento riferito alle 24 h è 17,31%, mentre nel PVA Ox 1% risulta pari a 66,09%, fino a mostrare, nella forma ossidata al 2%, uno SI di 111,14%.

Gli indici di rigonfiamento rilevati in seguito si sono gradualmente abbassati: a monte ore raggiunto, è rilevabile una diminuzione rispettivamente del 41%, del 36% e del 35%, prendendo come riferimento il picco a 24h.

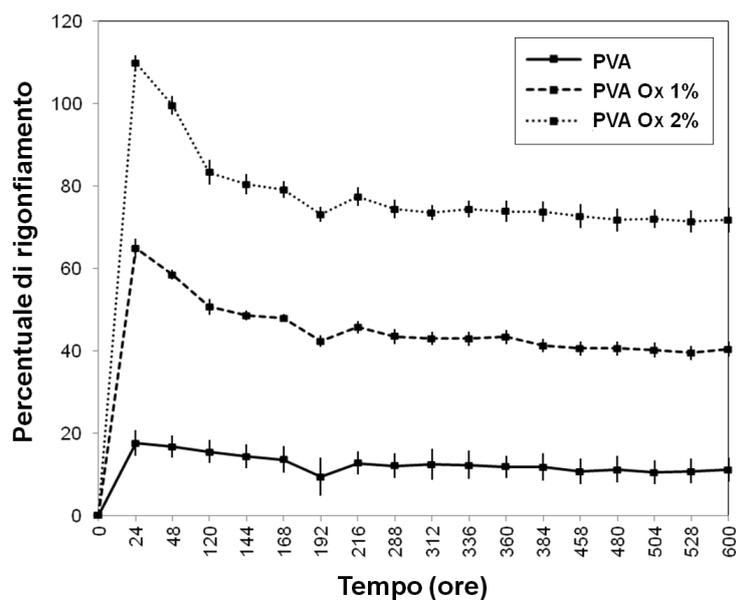


Figura 11. Cinetica di *swelling* di idrogeli in PVA, PVA ox 1% e ox 2%.

Simulando il contatto con i fluidi fisiologici, la valutazione del comportamento nel tempo di idrogeli in PVA nativo e ossidato in soluzione salina fornisce indicazioni sul probabile comportamento degli *scaffold* dopo impianto *in vivo*, oltre che informazioni interessanti sul metodo di conservazione degli stessi nella prospettiva di un possibile impiego come dispositivi.

2.1.3 Biodegradazione *in vivo*

La modifica di ossidazione chimica del PVA ha come scopo ultimo quello di conferire all'idrogel un certo grado di biodegradazione: il trattamento di ossidazione, infatti, è un passo fondamentale per la promozione della biodegradabilità polimerica⁷⁸. La maggior parte dei polimeri biodegradabili soffrono di una breve emivita, dovuta al rapido tasso di degradazione dopo l'impianto, all'elevata rigidità e alla limitata possibilità di funzionalizzare la loro superficie con sostanze chimiche⁷⁹. La combinazione tra la chimica del materiale e la tecnologia di preparazione può favorire la modulazione del tasso di degradazione polimerica. L'obiettivo è quello di equiparare il tasso di crescita del tessuto biologico, in modo che, mentre questo si rigenera, possa progressivamente sostituire lo *scaffold*.

Prima dell'impianto *in vivo*, sono state ottenute delle micrografie al SEM per caratterizzare la morfologia superficiale degli idrogeli, indagando le eventuali differenze dovute all'ossidazione. In base a questa analisi, gli *scaffold* in PVA hanno mostrato una superficie liscia e regolare (Figura 12 A). Viceversa, i supporti in PVA ossidato hanno una morfologia diversa, caratterizzata da una superficie ruvida (Figura 12 B, C).

In seguito alle procedure chirurgiche per l'impianto sottocute dei biomateriali, nessuno degli animali operati è stato sottoposto ad eutanasia o è deceduto prematuramente a causa di complicazioni connesse all'impianto degli *scaffold*; anche il sito d'impianto non ha sviluppato processi infiammatori od infettivi, il che fa verosimilmente presupporre una biocompatibilità dei supporti.

All' *end-point* considerato (12 settimane) i campioni sono stati espantati previa rasatura del pelo e riapertura della precedente incisione lombotomica. Nonostante l'utilizzo di fili di sutura non riassorbibili per ancorare gli *scaffold* al muscolo, l'identificazione dei supporti in PVA ossidato è risultata più difficoltosa in confronto ai supporti in PVA nativo. Già durante la fase chirurgica di espanto, la dimensione e l'integrità degli *scaffold* ossidati è risultata visibilmente compromessa in confronto alla morfologia pre-impianto; diversamente, i supporti in PVA nativo non hanno mostrato alcuna degradazione apprezzabile (Figura 12 D-N).

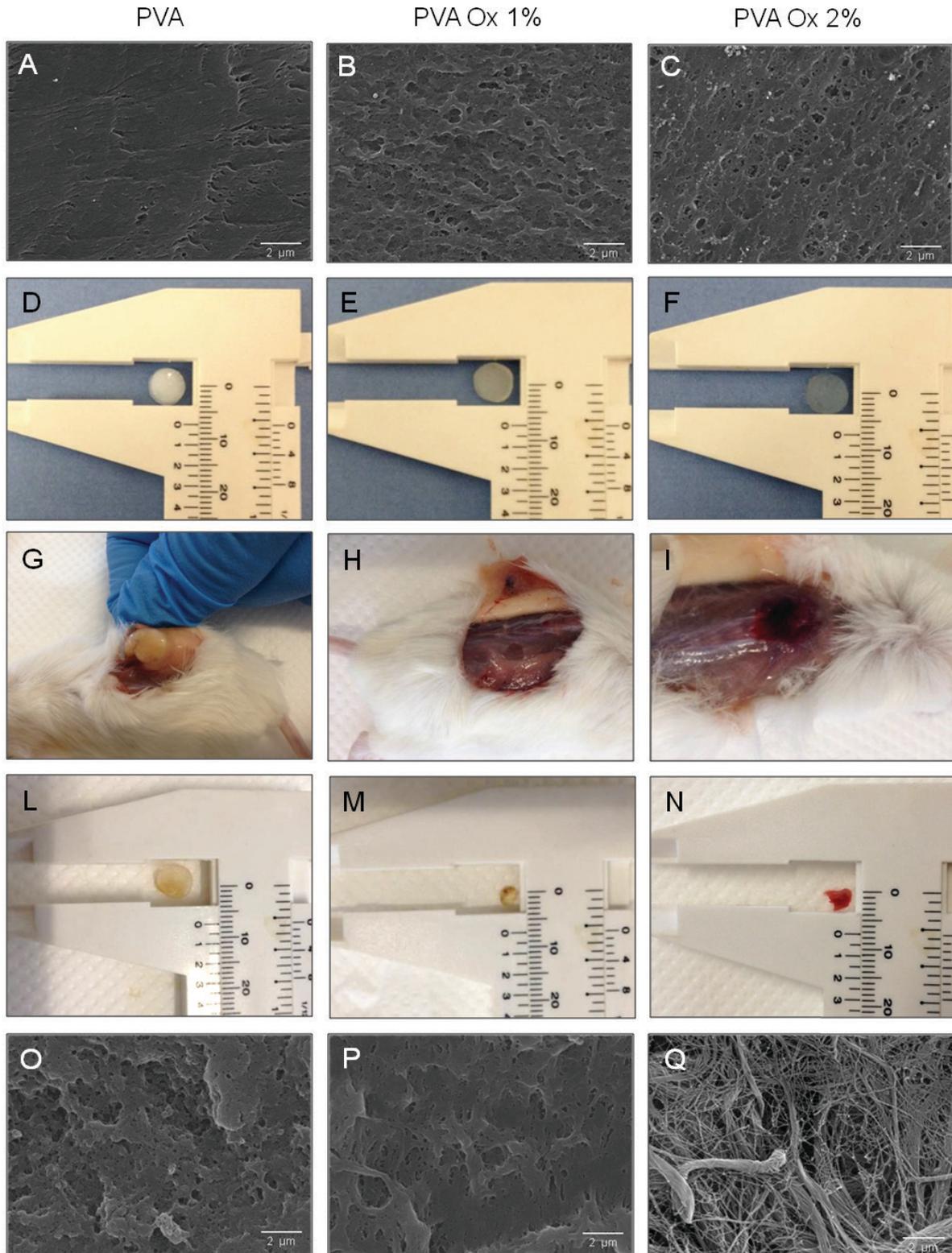


Figura 12. Aspetto macroscopico (D-N) e ultrastrutturale (A-C; O-Q) degli *scaffold* in PVA nativo e ossidato prima (A-F) e dopo (L-Q) 12 settimane di impianto in topi *Balb/c*. Le figure G, H, I mostrano gli *scaffold* ancora nella sede di impianto. *Scale bar*: 2 μ m.

In parallelo, l'osservazione al microscopio elettronico ha consentito di evidenziare differenze superficiali tra i diversi campioni, in particolare un aspetto singolare è stato riscontrato sui supporti

ossidati al 2% (Figura 12 O-Q). Gli *scaffold* in PVA e PVA Ox 1%, pur mostrando entrambi una superficie deteriorata e meno compatta rispetto al pre-impianto, presentano ancora una struttura polimerica ben identificabile; per quanto riguarda, invece, il PVA Ox 2%, l'indagine al SEM ha rivelato la presenza di fibre collagene disorganizzate, che può essere attribuita al riassorbimento dello *scaffold* e alla sua sostituzione con tessuto connettivo. La formazione di una cavità nel sito di innesto è infatti contrastata dalla naturale contrazione della lesione: la deposizione di fibre collagene disorganizzate è associata al processo di rimodellamento tipico della guarigione delle ferite cutanee.

L'analisi istologica dopo colorazione con ematossilina/eosina (H/E) ha confermato che la biodegradabilità del materiale è direttamente proporzionale al suo tasso di ossidazione (Figura 13).

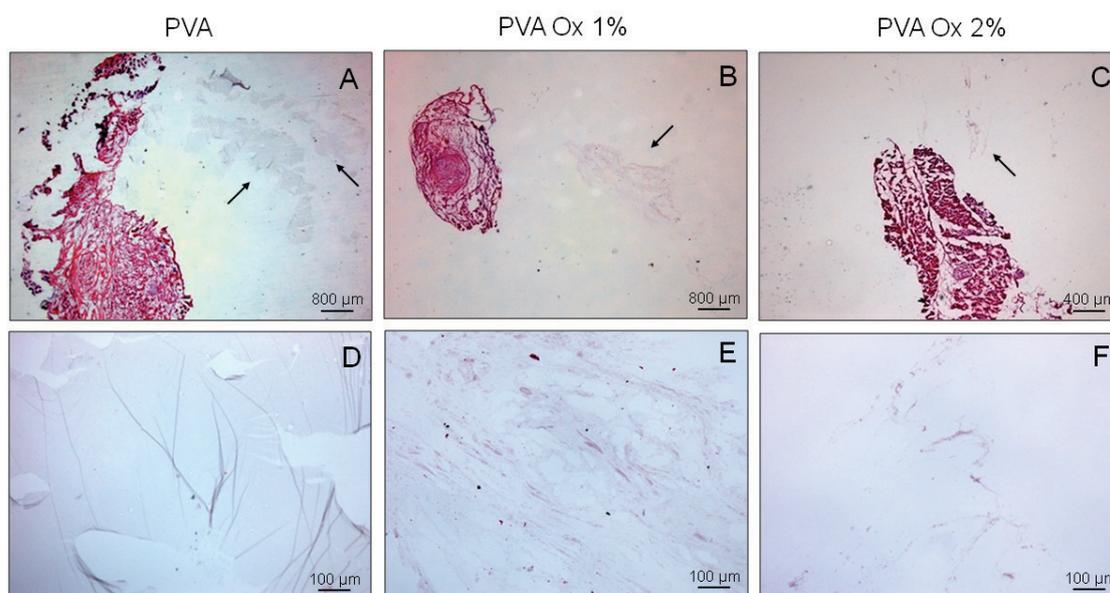


Figura 13. Analisi istologica mediante colorazione con ematossilina/eosina degli espianti di PVA nativo (A, D), ossidato all'1% (B, E) e ossidato al 2% (C, F), espiantati dopo 12 settimane di impianto nella regione sottocutanea dorsale di topi *Balb/c*. Scale bar: (A-C) 800 µm; (D-F) 100 µm.

Fatta eccezione per le modifiche artefattuali osservate durante il sezionamento degli espianti, la *texture* del PVA nativo si presenta intatta (Figura 13 A, D), senza zone di degradazione e di riassorbimento. Al contrario, il PVA Ox 1% mostra segni di parziale degradazione (Figura 13 B, E) e il PVA Ox 2% non è quasi più riconoscibile a causa di una degradazione significativa, nonostante

l'esauritivo sezionamento seriale dei campioni (Figura 13 C, F). Nessuna adesione cellulare è stata osservata sulla superficie dei biomateriali. Inoltre, mentre la superficie del PVA nativo è rimasta liscia e trasparente, le sezioni di PVA ossidato si presentano amorfe e opache.

I tessuti peri-impianto sono stati indagati tramite analisi immunohistochimica per cellule CD3⁺ e F4/80⁺, al fine di valutare la presenza di un infiltrato linfo-monocitario (Figura 14).

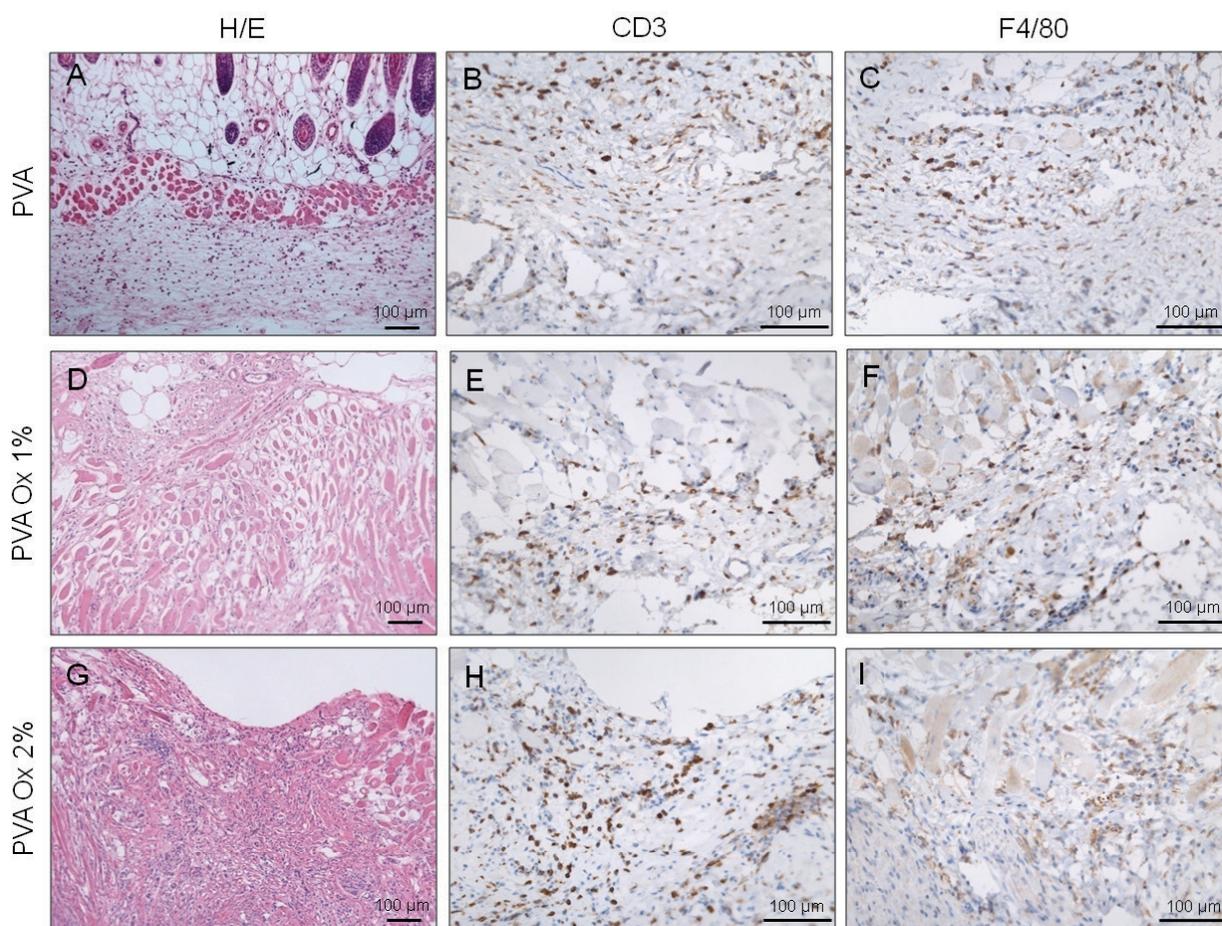


Figura 14. Valutazione dell'infiltrato infiammatorio sugli *scaffold* in PVA nativo e ossidato. (A, D, G) Colorazione con ematossilina/eosina dei tessuti biologici circondanti gli *scaffold* dopo 12 settimane di impianto sottocutaneo; (B, C, E, F, H, I) indagine immunohistochimica per la localizzazione di cellule CD3⁺ e F4/80⁺ sui campioni. *Scale bar*: 100 µm.

In tutti i campioni, sia di PVA nativo che ossidato, non sono state osservate reazioni infiammatorie gravi, a parte una lieve infiltrazione del tessuto connettivo che circonda il materiale impiantato. In particolare, gli impianti di PVA Ox 2% sembravano causare un livello leggermente più alto di infiltrato infiammatorio dei tessuti connettivi circostanti. In seguito alla caratterizzazione

immunologica, la maggior parte delle cellule infiltranti sono risultate positive per CD3 o F4/80, suggerendo un possibile ruolo delle cellule linfo-monocitarie nel riassorbimento dell'impianto. Infatti, il PVA Ox 2% non risulta quasi più identificabile come disco di idrogel, indicando una sua considerevole sostituzione con tessuto connettivo, come dimostrato anche dai risultati dell'indagine al SEM.

2.2 Ottenimento della ECM acellulare da intestino tenue di ratto

2.2.1 Prelievo di intestino tenue di ratto

Per la produzione dello *scaffold* composito, la matrice acellulare è stata ottenuta da espianti di intestino tenue di ratto adulto, prelevato dal ligamento di Treitz alla valvola ileocecale (Figura 15).

Dopo accurato lavaggio mediante soluzione fisiologica del tratto intestinale, sono state osservate una progressiva perdita di meccanicità e una tendenza del lume intestinale a collassare, che rendevano difficile il maneggiamento del tessuto.

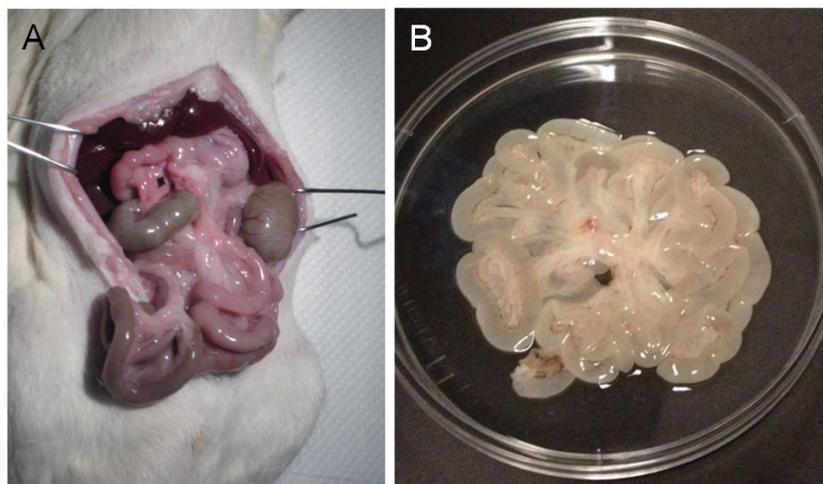


Figura 15. Intestino tenue di ratto al momento dell'espianto (A) e dopo prelievo e pulizia con soluzione salina (B).

L'analisi morfologica mediante istologia (colorazione con ematossilina/eosina) prima del processo di decellularizzazione ha permesso di caratterizzare il tessuto intestinale, distinguendo la tipica

tonaca sierosa e l'annesso mesenterico sul versante esterno e le caratteristiche estroflessioni della mucosa in corrispondenza della superficie luminale interna (Figura 16).

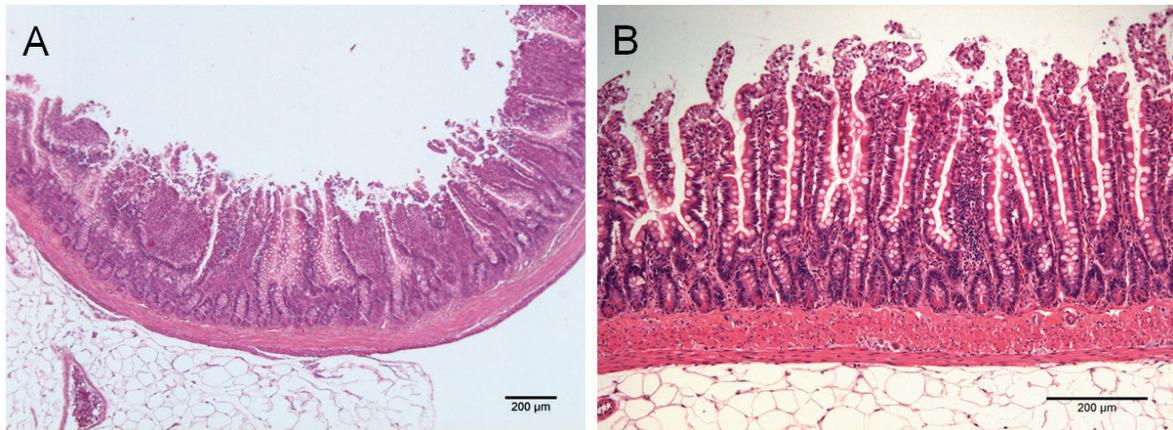


Figura 16. Analisi morfologica tramite colorazione istologica (ematosilina/eosina) del tessuto intestinale nativo. *Scale bar:* 200 µm.

2.2.2 Caratterizzazione della matrice intestinale acellulare

Antigeni cellulari allogenici e xenogenici sono, per definizione, riconosciuti come estranei dall'organismo ospite, con il conseguente rischio di insorgenza di una risposta infiammatoria e di una reazione immunitaria di rigetto. Tuttavia, i componenti della ECM sono generalmente conservati tra le specie e sono ben tollerati anche in caso di trapianto xenogenico. L'obiettivo del processo di decellularizzazione è quello di rimuovere efficacemente tutto il materiale cellulare e nucleare, conservando inalterate la composizione, l'attività biologica e l'integrità meccanica della matrice extracellulare risultante⁸⁰⁻⁸².

Per la preparazione della matrice intestinale acellulare, la decellularizzazione è stata condotta con 2 cicli successivi di trattamento detergente-enzimatico, al termine dei quali la componente cellulare immunogenica appariva completamente rimossa.

La marcatura dei nuclei con DAPI sul tessuto intestinale nativo e decellularizzato (Figura 17 A, B) ha dimostrato l'efficacia del trattamento di decellularizzazione; dopo tale trattamento, infatti, la matrice è risultata totalmente priva di elementi cellulari. Tale dato è stato confermato anche

dall'analisi morfologica tramite istologia (H/E), effettuata sul tessuto prima e dopo il processo di decellularizzazione (Figura 17 C, D).

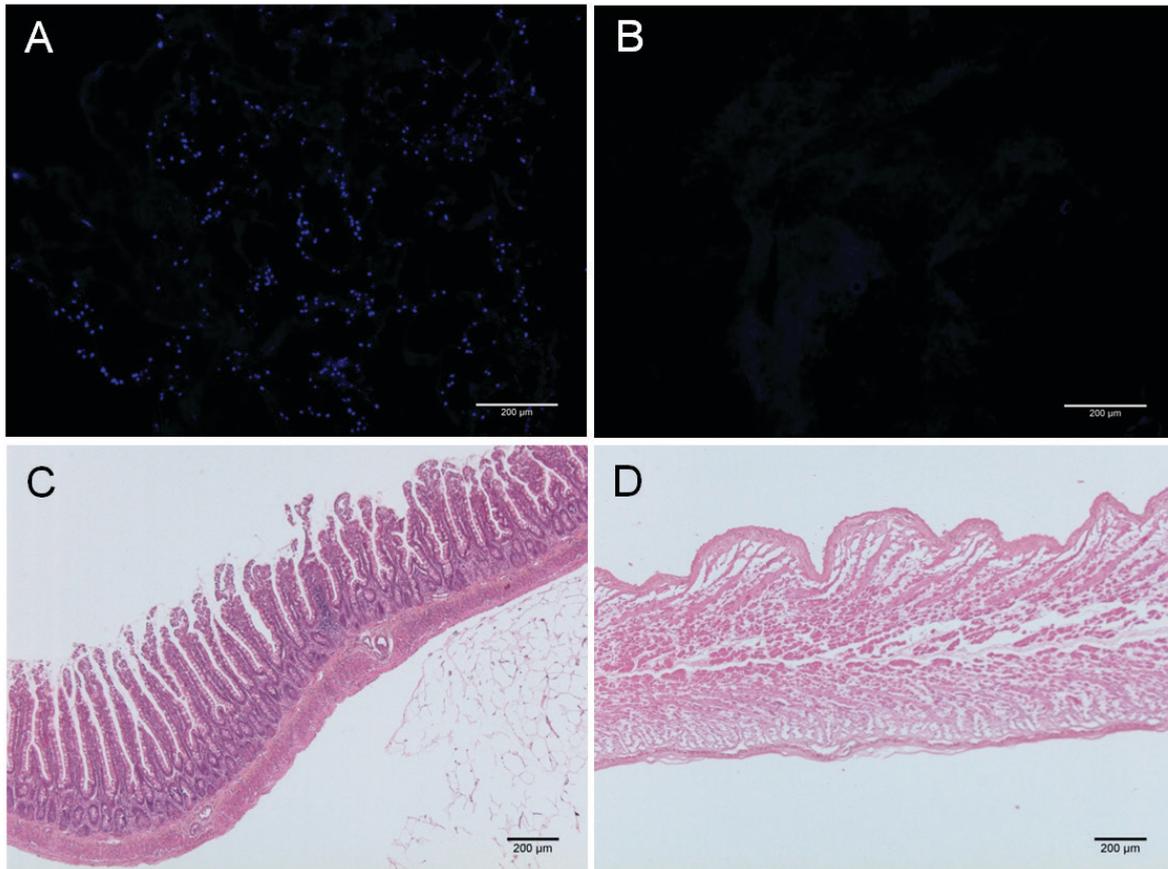


Figura 17. Marcatura nucleare con DAPI (A, B) e colorazione con ematossilina/eosina (C, D) della matrice intestinale dopo 2 cicli di trattamento detergente-enzimatico (B, D) in confronto al tessuto non decellularizzato (A, C). *Scale bar:* 200 μm .

2.3 Allestimento e caratterizzazione del *bioscaffold* composito

In seguito alla produzione e alla caratterizzazione del PVA ossidato e della matrice extracellulare intestinale decellularizzata, si è proceduto con l'allestimento del *bioscaffold* composito.

Oltre alle proprietà fisico-meccaniche, le cellule sono probabilmente responsive alle caratteristiche biologiche dei materiali che vengono impiegati come *scaffold*, i quali sono in grado di regolarne il comportamento. È noto, infatti, che l'uso di *coating* biomimetici sui sostituti tissutali ingegnerizzati permette di modulare la proliferazione e la funzionalità delle cellule seminate su di essi⁸³. Per questo motivo, lo *scaffold* composito è stato costituito considerando due componenti: una sintetica,

dotata delle proprietà meccaniche e di biodegradabilità idonee a mimare il tessuto intestinale, l'altra biologica, capace di sostenere l'adesione e la proliferazione cellulare. In particolare, come componente sintetica si è scelto di impiegare il PVA Ox 1%, in quanto dotato delle caratteristiche più idonee ai nostri scopi; la componente biologica è rappresentata dalla ECM intestinale decellularizzata, considerata in due varianti: intera o liofilizzata. In questo modo è stato possibile usufruire della sola composizione proteica della matrice (ECMI), oppure anche della sua caratteristica isto-architettura strutturale (ECMi). Tramite *cross-linking* fisico è stata favorita la combinazione delle due componenti, ottenendo gli *scaffold* compositi rappresentati in Figura 18 B, C.

Tali *scaffold* sono stati, quindi, caratterizzati per la loro morfologia specifica. La colorazione istologica con ematossilina/eosina ha messo in evidenza come nel supporto composito PVA Ox 1%/ECMi sia stata conservata la componente strutturale del tessuto intestinale, che nello *scaffold* PVA Ox 1%/ECMI è stato mantenuto in forma di uno strato proteico sottile adagiato sul PVA ossidato (Figura 18 E, F). In parallelo, l'analisi ultrastrutturale al SEM ha confermato che la superficie del supporto PVA Ox 1%/ECMi è caratterizzata da estroflessioni villari, mentre la superficie dello *scaffold* PVA Ox 1%/ECMI ha un aspetto amorfo e spugnoso (Figura 18 H, I).

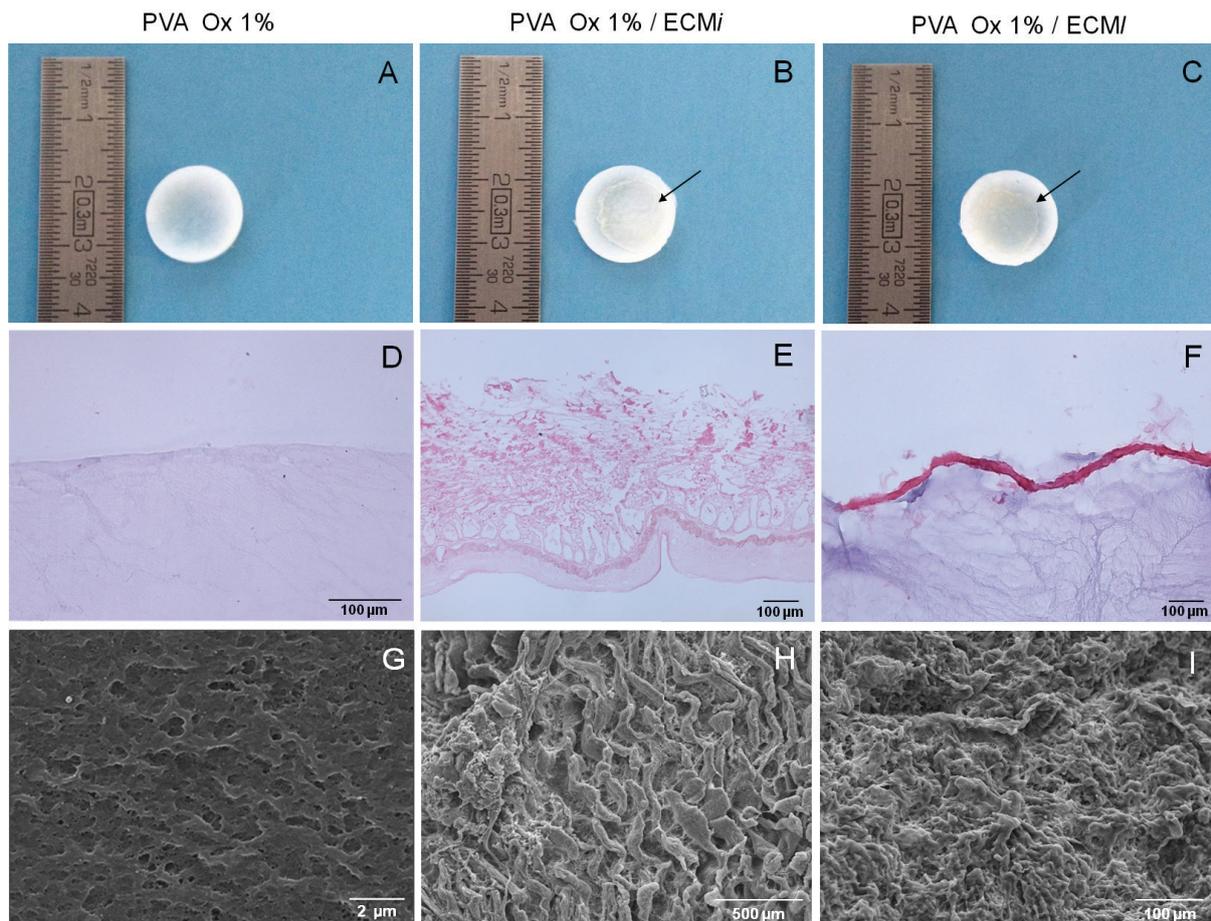


Figura 18. Aspetto macroscopico (A-C) degli *scaffold* compositi in PVA Ox 1%/ECMi (B) e PVA Ox 1%/ECMI (C) in confronto al supporto in PVA Ox 1% (A). Colorazione con ematossilina/eosina (D-F) e analisi ultrastrutturale al SEM (G-I) dei tre tipi di *scaffold*. Scale bar: (D-F, I) 100 μm; (G) 2 μm; (H) 500 μm.

2.3.1 Interazione tra *scaffold* composito e colture cellulari Ad-MSC

La funzionalità biologica dei due tipi di *scaffold* compositi è stata indagata tramite prove di coltura cellulare con popolazioni staminali mesenchimali. Le cellule MSC sono attualmente le più studiate per scopi di ingegneria tissutale, grazie al loro elevato potere rigenerativo. Esse, infatti, sono in grado di auto-replicarsi per molti passaggi in coltura e, quindi, possono potenzialmente essere espanse fino ad ottenerne un numero sufficiente per la rigenerazione di tessuti e organi. Inoltre, le MSC sono in grado di differenziarsi in molteplici linee cellulari (osteoblasti, condrociti, mioblasti, adipociti, fibroblasti, cellule epiteliali, enterociti e cellule simil-neuronali), rendendo estremamente vasto il loro campo di applicazione. Per queste ragioni, le cellule MSC sono state largamente utilizzate per la semina su *scaffold* polimerici al fine di creare sostituti tissutali ingegnerizzati⁸⁴. In particolare, poi, si è scelto di testare popolazioni MSC derivate da tessuto adiposo in quanto si tratta

di una fonte cellulare abbondante ed estremamente accessibile.

Le cellule Ad-MSC, coltivate in terreno proliferativo completo, presentano a 5 giorni dalla semina uno stato di subconfluenza dell'80-90%; le cellule in adesione appaiono di aspetto tipicamente fusato o fibroblastoide (Figura 19 A).

La capacità degli *scaffold* compositi PVA Ox 1%/ECM nel sostenere l'adesione e la proliferazione cellulare è stata, quindi, valutata mediante saggio colorimetrico MTT. A 7 gg dalla semina è stato possibile osservare come il numero di cellule in proliferazione su entrambi i tipi di *scaffold* compositi sia significativamente più elevato ($p < 0,01$) in confronto al supporto privo di matrice (Figura 19 B). Inoltre, il saggio di proliferazione evidenzia che, sebbene la sola componente macromolecolare della ECM sia risultata sufficiente a sostenere l'adesione e la proliferazione cellulare, la matrice intera sembra promuovere in modo significativamente maggiore ($p < 0,01$) la crescita delle cellule su di essa seminate. Questo è probabilmente dovuto al fatto che l'istoc architettura della ECMi costituisce uno stimolo ulteriore, oltre a quello della componente proteica specifica, per ricreare un microambiente idoneo alla vitalità e alla proliferazione delle cellule Ad- MSC. Diversamente, il solo *scaffold* polimerico non è funzionale alla colonizzazione: ciò potrebbe essere riconducibile ad una idrofilia eccessiva del supporto, oltre che ad una porosità inadeguata a favorire l'attecchimento cellulare. Considerando, dunque, il comportamento proliferativo delle cellule Ad- MSC e gli effetti dell'utilizzo della matrice intestinale in combinazione con il PVA Ox 1%, il modello *in vitro* analizzato sembra rappresentare un promettente sostituto intestinale ingegnerizzato.

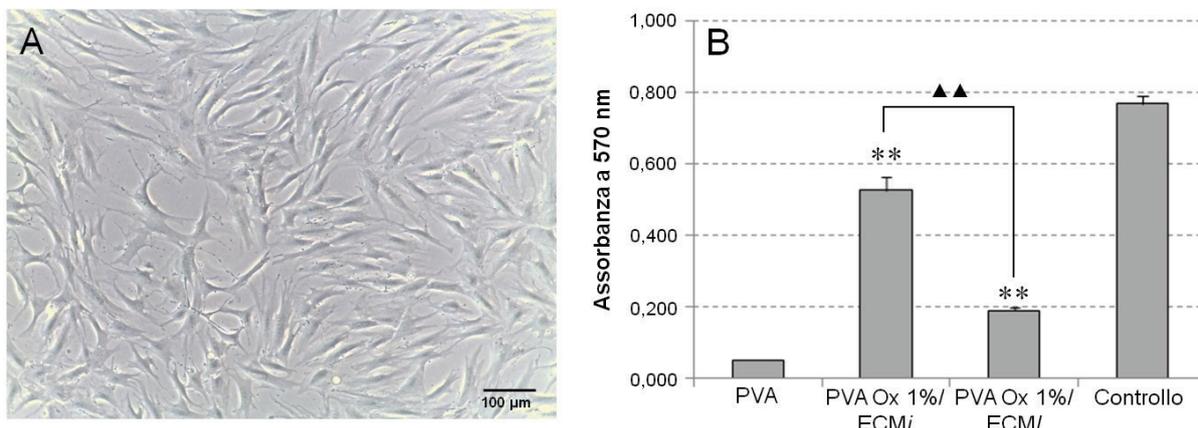


Figura 19. (A) Analisi morfologica al microscopio ottico di cellule AD-MSC umane. *Scale bar*: 100 μm. (B) Saggio MTT per la valutazione della proliferazione cellulare su *scaffold* in PVA Ox 1% e PVA Ox 1%/ECM a 7 gg dalla semina. (**: $p < 0,01$ PVA Ox 1%/ECM vs PVA; ▲▲: $p < 0,01$ PVA Ox 1%/ECMi vs PVA Ox 1%/ECMl).

2.4. Studio del comportamento *in vivo* del *bioscaffold* composito

Al fine di studiare l'idoneità dei *bioscaffold* compositi in PVA Ox 1%/ECMi e PVA Ox 1%/ECMl ad essere impiegati come sostituti intestinali, i due differenti supporti - seminati o meno con cellule Ad-MSC - sono stati impiantati nell'omento di ratti *Sprague Dawley* per 4 settimane (Figura 20). In parallelo, il supporto in PVA Ox 1% è stato analizzato come controllo. Dopo la procedura chirurgica, nessun animale è andato incontro ad infezione della ferita operatoria o ad eutanasia a causa di complicanze legate all'intervento chirurgico.



Figura 20. Impianto degli *scaffold* composti in PVA Ox 1%/ECMI e PVA Ox 1%/ECMI - seminati o meno con cellule Ad-MSC - nell'omento di ratti *Sprague Dawley* ed espianto dei supporti dopo 4 settimane. In parallelo, il supporto in PVA Ox 1% è stato analizzato come controllo.

Al momento dell'espianto, tutti gli *scaffold* erano ancora ben riconoscibili e non è stata osservata alcuna massiccia reazione infiammatoria in corrispondenza della sede di impianto (Figura 20).

La morfologia strutturale dei campioni espantati è stata valutata tramite colorazione con

ematossilina/eosina (Figura 21), mentre la valutazione della reazione infiammatoria suscitata dall'impianto è stata analizzata mediante marcatura immunostochimica delle cellule linfomonocitarie (Figura 22, 23). Lo stimolo induttivo degli *scaffold* impiantati sulla proliferazione cellulare è stato studiato tramite localizzazione immunostochimica dell'antigene nucleare Ki-67 (Figura 24). Infine, per indagare l'acquisizione di caratteristiche simil-intestinali da parte dei supporti impiantati, sono state eseguite colorazioni immunostochimiche specifiche per le componenti tissutali simil-muscolari (Figure 25, 26) e simil-epiteliali (Figura 27).

Nelle sezioni colorate con ematossilina/eosina si può innanzitutto notare la presenza del PVA ancora dopo 4 settimane dall'impianto, con parziali note di riassorbimento delle porzioni superficiali: gli aspetti di degradazione si rendono maggiormente evidenti nei casi di impianto costituito da PVA Ox 1%/ECMi (Figura 21).

L'analisi della proliferazione cellulare mediante immunostochimica anti-Ki-67 ha evidenziato elevata crescita cellulare a carico delle popolazioni linfocitarie-macrofagiche. Si apprezza altresì moderata proliferazione cellulare a carico degli elementi connettivali e miofibroblastici. A carico della componente epiteliale, la popolazione Ki-67⁺, seppur presente, è minoritaria (Figura 24).

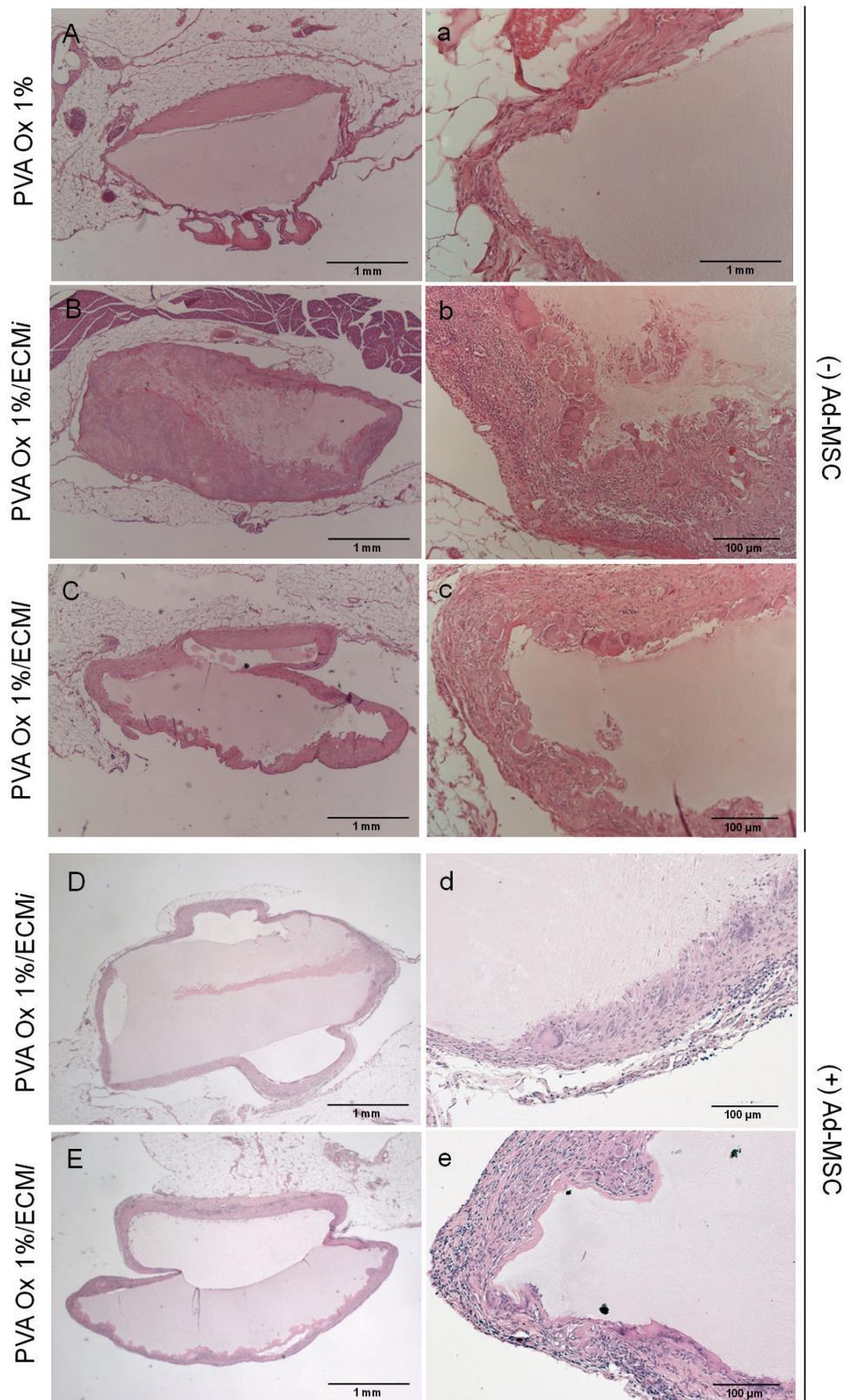


Figura 21. Colorazione con ematossilina/eosina degli *scaffold* compositi in PVA Ox 1%/ECM e PVA Ox 1%/ECM/Ad-MSC - seminati o meno con cellule Ad-MSC - espuntati dopo quattro settimane dall'impianto nell'omento di ratti *Sprague Dawley*. In parallelo, il supporto in PVA Ox 1% è stato analizzato come controllo. *Scale bar:* (A, a, B-E) 1 mm; (b-e) 100 μm.

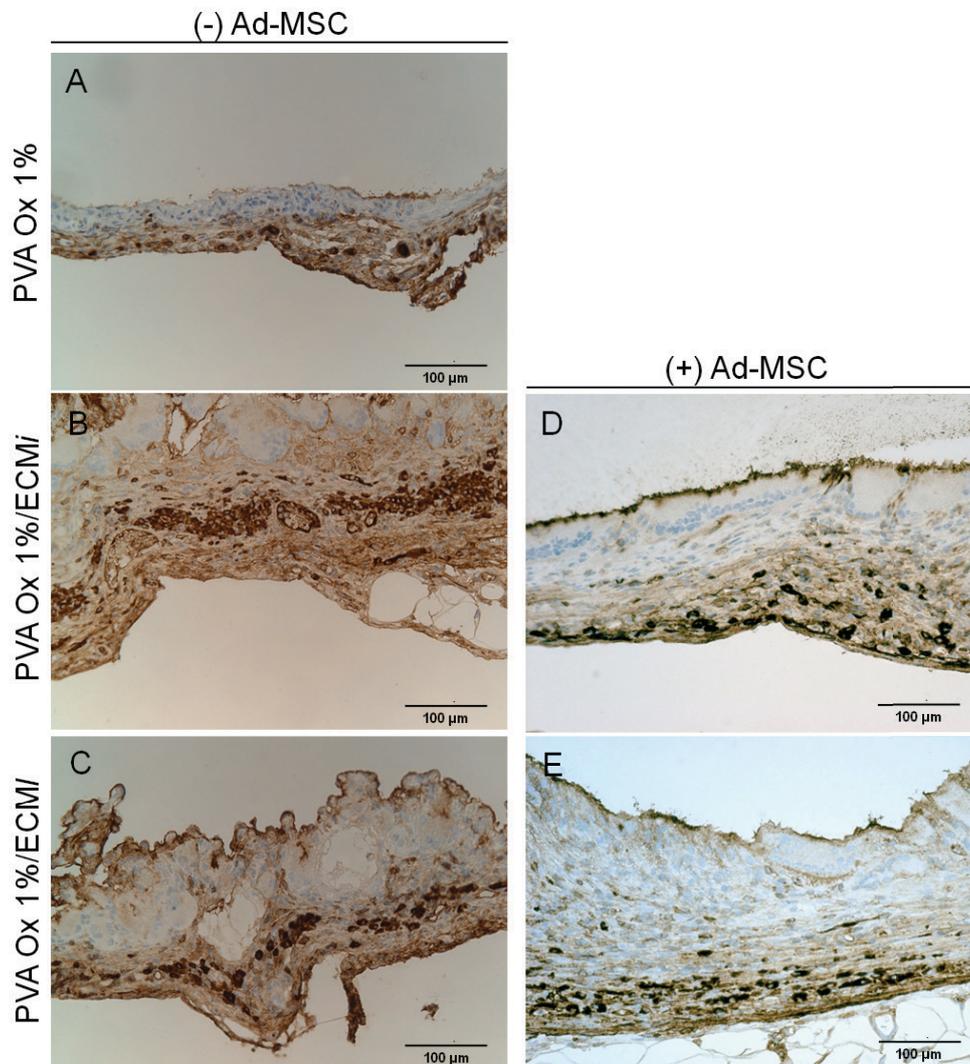


Figura 22. Analisi immunoistochimica per la localizzazione delle cellule $CD3^+$ negli *scaffold* compositi in PVA Ox 1%/ECMi e PVA Ox 1%/ECMi - seminati o meno con cellule Ad-MSC - espantati dopo quattro settimane dall'impianto nell'omento di ratti *Sprague Dawley*. In parallelo, il supporto in PVA Ox 1% è stato analizzato come controllo. *Scale bar:* 100 μm.

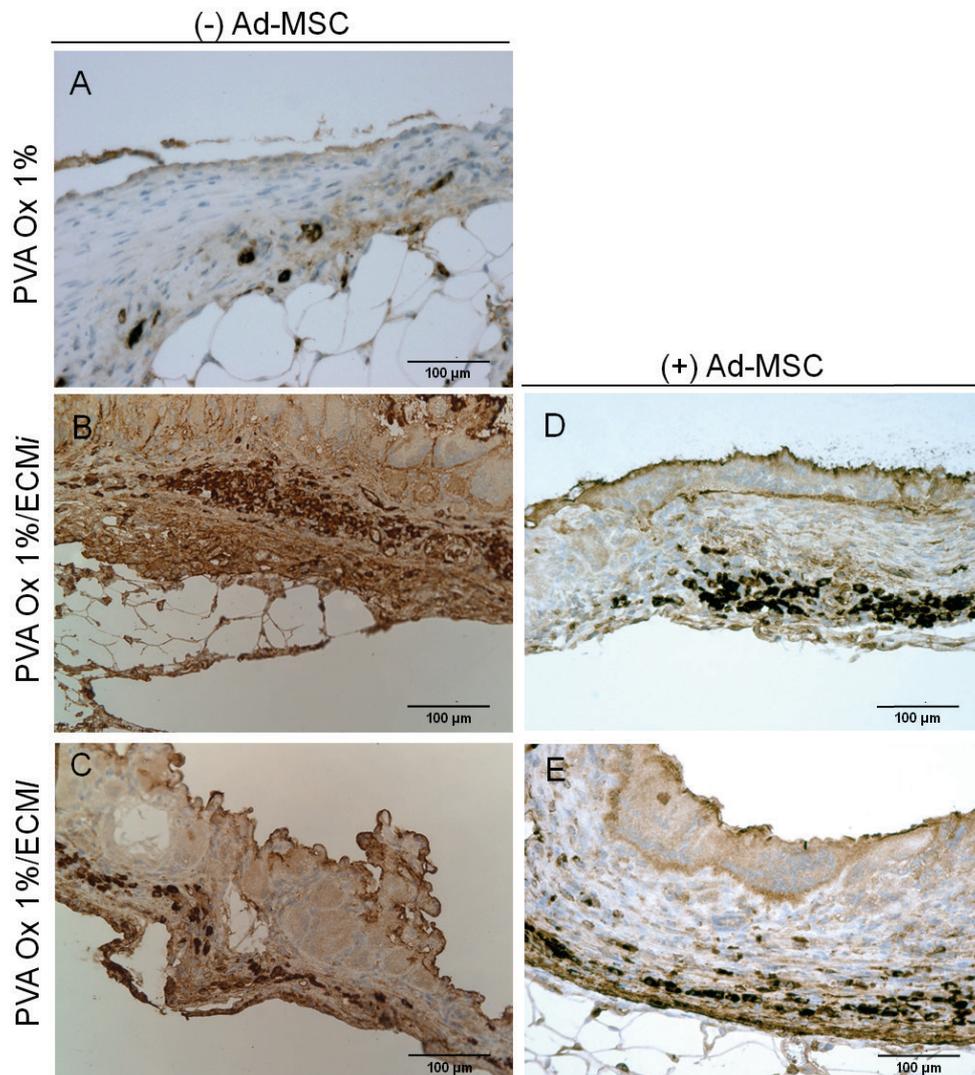


Figura 23. Analisi immunoistochimica per la localizzazione delle cellule F4/80⁺ negli *scaffold* composti in PVA Ox 1%/ECMI e PVA Ox 1%/ECMI - seminati o meno con cellule Ad-MSC - espantati dopo quattro settimane dall'impianto nell'omento di ratti *Sprague Dawley*. In parallelo, il supporto in PVA Ox 1% è stato analizzato come controllo. *Scale bar*: 100 μm.

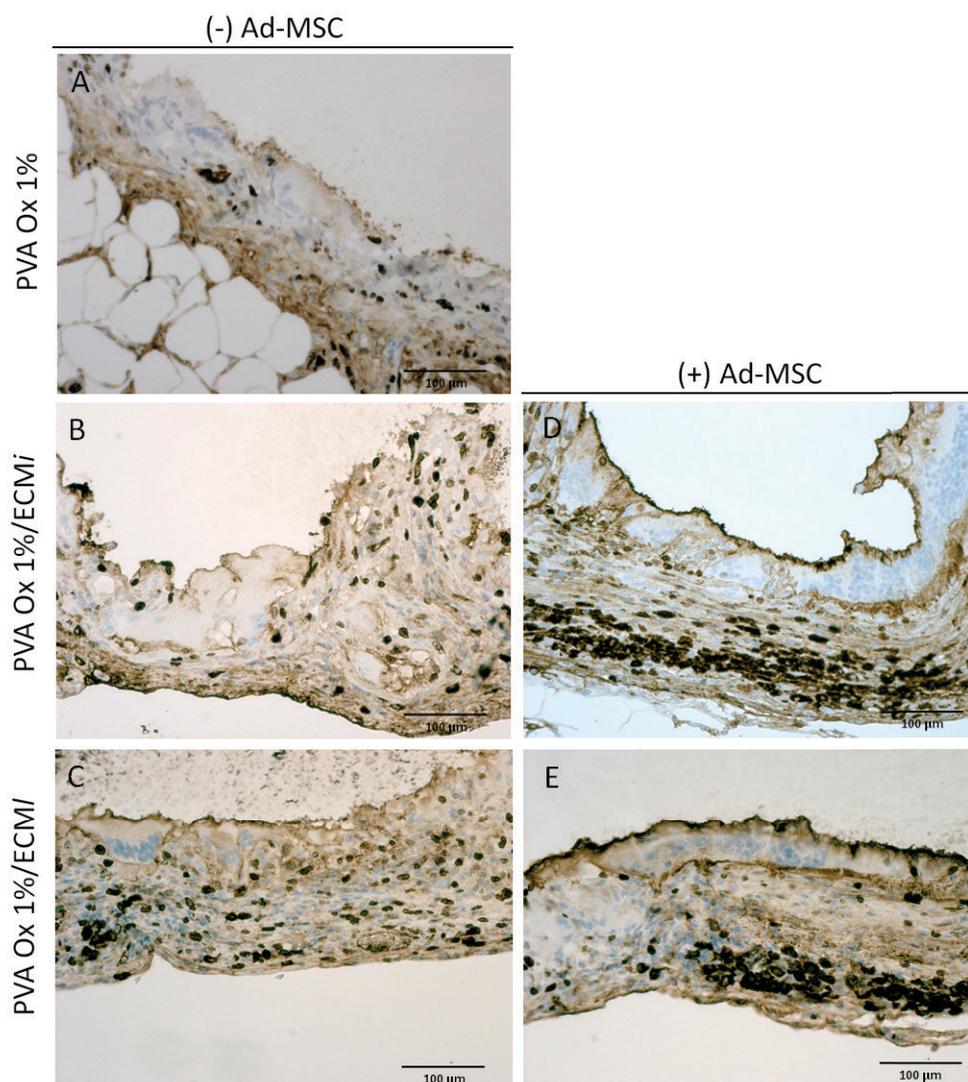


Figura 24. Analisi immunoistochimica per la localizzazione delle cellule Ki-67⁺ negli *scaffold* composti in PVA Ox 1%/ECMi e PVA Ox 1%/ECMi - seminati o meno con cellule Ad-MSC - espianati dopo quattro settimane dall'impianto nell'omero di ratti *Sprague Dawley*. In parallelo, il supporto in PVA Ox 1% è stato analizzato come controllo. *Scale bar*: 100 μm.

Attorno al PVA, si definisce una parete tissutale continua e relativamente organizzata. Lo strato più esterno della suddetta struttura presenta un aspetto connettivale e si caratterizza per una parziale positività dell'analisi immunoistochimica anti-Desmina e anti- α SMA, coerente con una differenziazione in senso miofibroblastico (ISEMF, *intestinal subepithelial myo-fibroblasts*)⁶⁵ e di cellule muscolari lisce (Figure 25, 26). Sul versante interno, rivolto verso il PVA, si rilevano, in alcune porzioni ed in maniera non uniforme, cellule di forma cuboidale o cilindrica, con nuclei disposti sul versante basale, riferibili a cellule epiteliali anche in ragione della reattività

immunoistochimica, negativa per anti-Desmina, anti-SMA, anti-CD3 ed antiF4/80 e parzialmente positiva per anti-citocheratine (MNF116) (Figura 27). Tali componenti epiteliali si approfondano in invaginazioni di profondità ed estensione variabili, acquisendo in alcune zone un aspetto *crypt-like*.

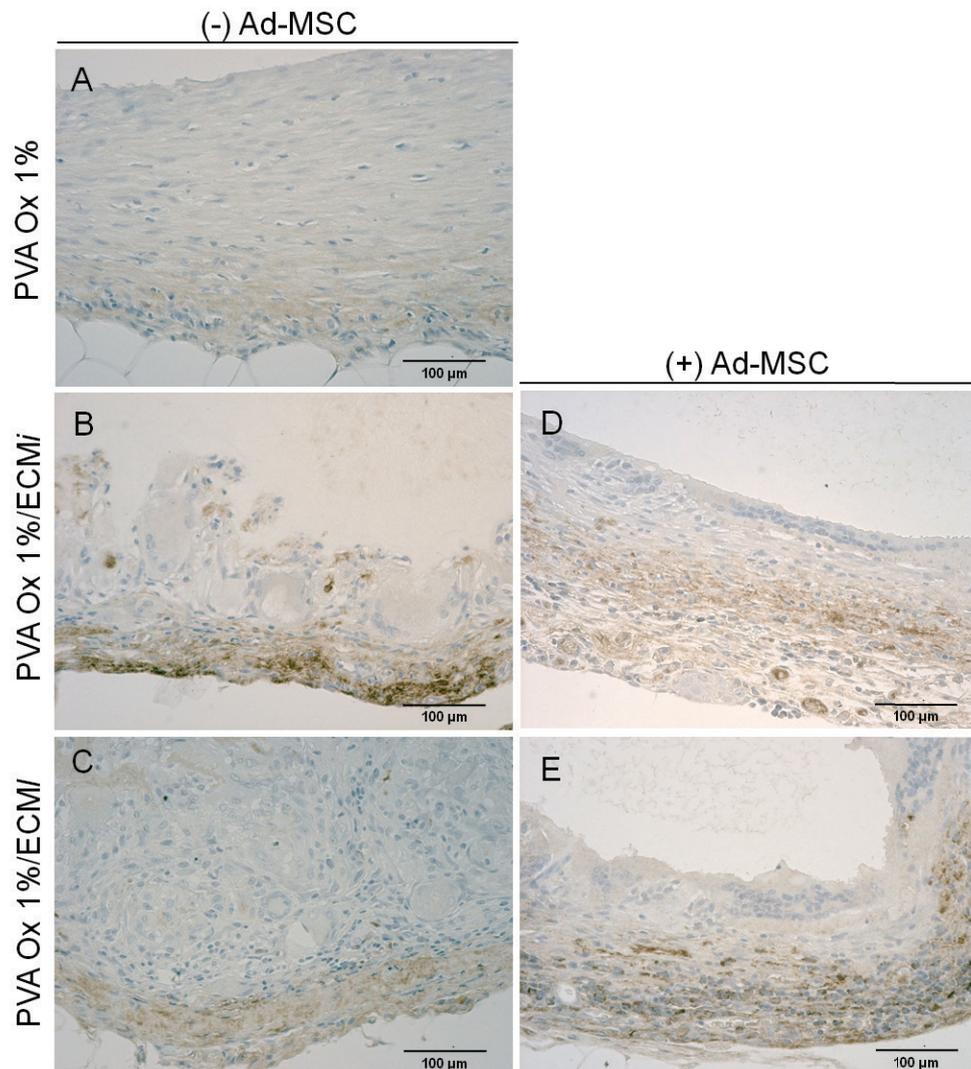


Figura 25. Analisi immunoistochimica per la localizzazione della Desmina negli *scaffold* composti in PVA Ox 1%/ECMI e PVA Ox 1%/ECMI - seminati o meno con cellule Ad-MSC - espantati dopo quattro settimane dall'impianto nell'omento di ratti *Sprague Dawley*. In parallelo, il supporto in PVA Ox 1% è stato analizzato come controllo. *Scale bar*: 100 μm.

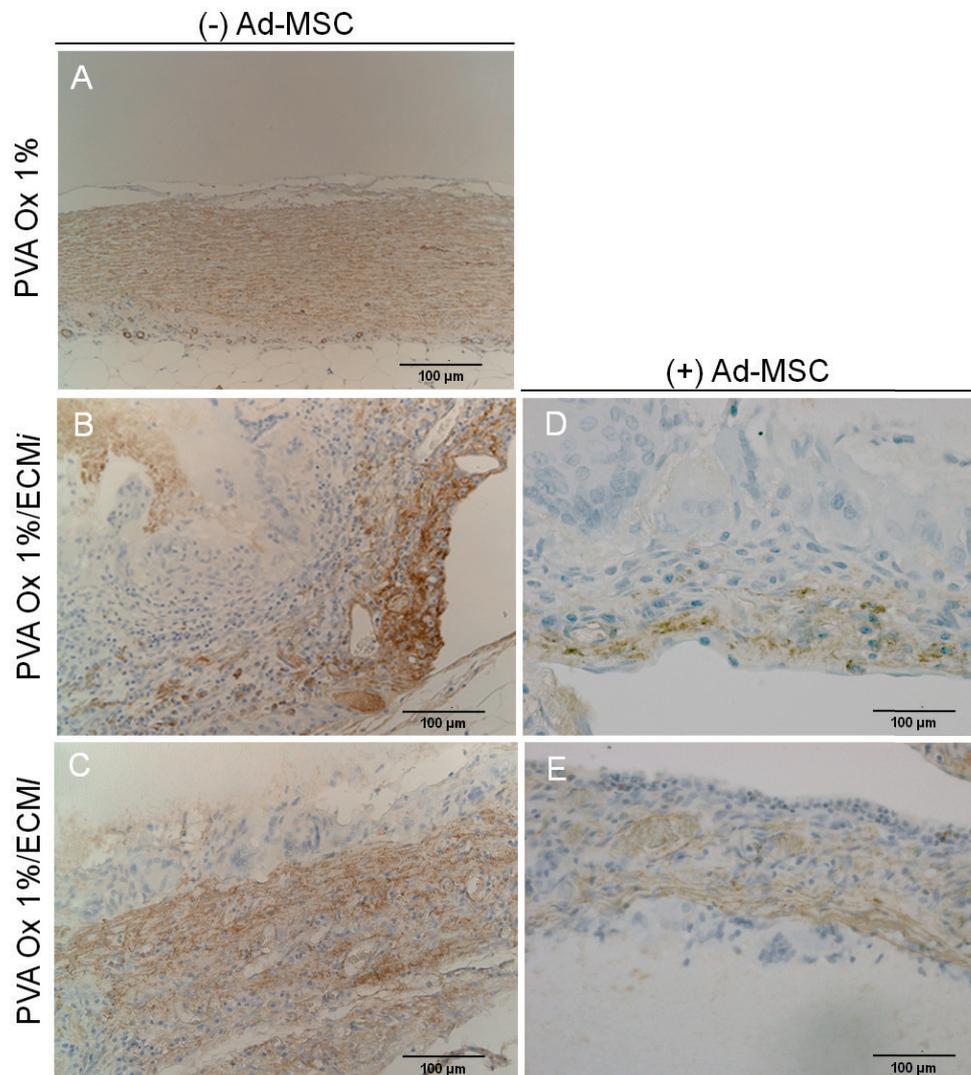


Figura 26. Analisi immunoistochimica per la localizzazione della proteina α SMA negli *scaffold* compositi in PVA Ox 1%/ECMi e PVA Ox 1%/ECMI - seminati o meno con cellule Ad-MSC - espantati dopo quattro settimane dall'impianto nell'omento di ratti *Sprague Dawley*. In parallelo, il supporto in PVA Ox 1% è stato analizzato come controllo. *Scale bar:* 100 μ m.

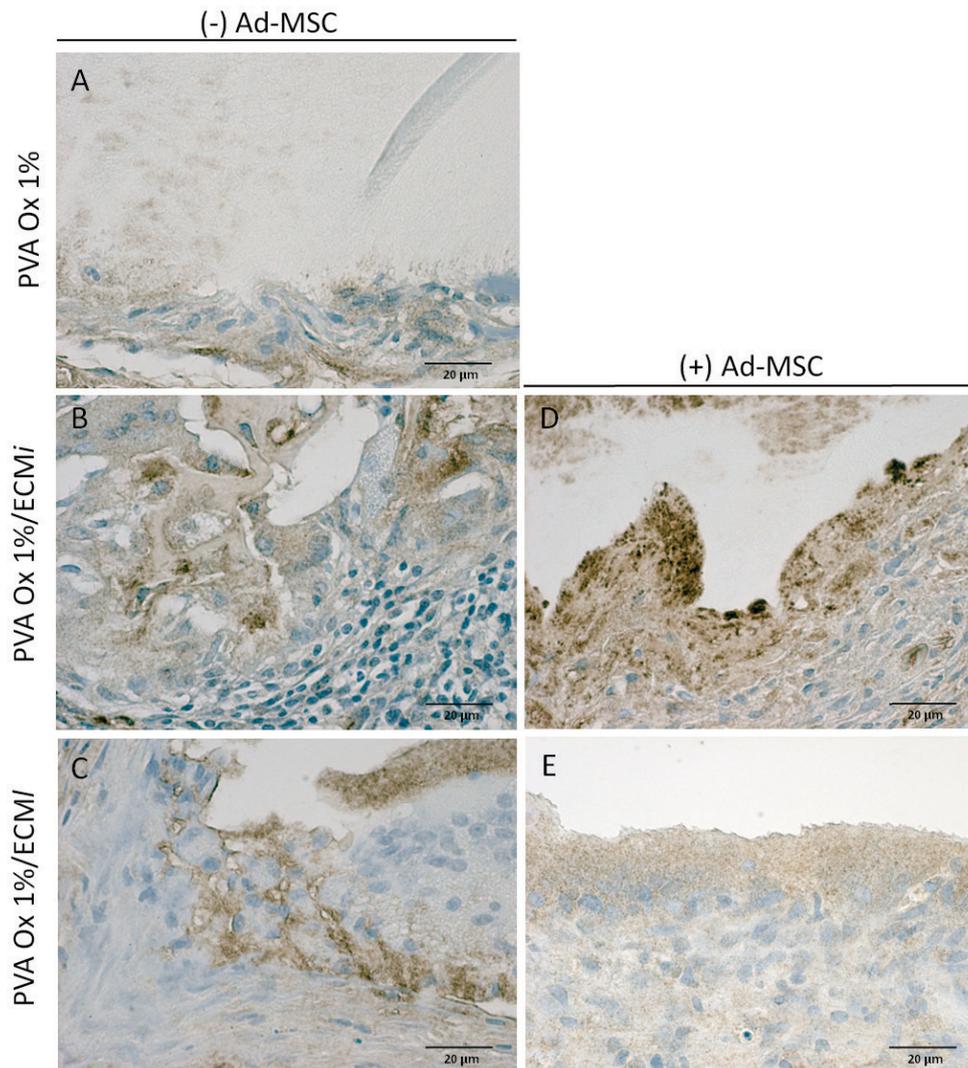


Figura 26. Analisi immunoistochimica per la localizzazione delle citocheratine (MNF116) negli *scaffold* compositi in PVA Ox 1%/ECMi e PVA Ox 1%/ECMI - seminati o meno con cellule Ad-MSC - espantati dopo quattro settimane dall'impianto nell'omento di ratti *Sprague Dawley*. In parallelo, il supporto in PVA Ox 1% è stato analizzato come controllo. *Scale bar*: 20 µm.

Le componenti epiteliali risultano maggiormente rappresentate, con particolare riferimento alle componenti *crypt-like*, nei campioni PVA Ox 1%/ECMi e PVA Ox 1%/ECMI. Non appaiono chiaramente rilevabili strutture *villous-like*. Nel contesto della parete si rilevano componenti linfocitarie (cellule CD3⁺) e macrofagiche (cellule F4/80⁺), con prevalente disposizione sui versanti esterni.

Nello spessore parietale si rilevano strutture vascolari dotate di endotelio organizzato, compatibili con neo-angiogenesi locale. Non sono ancora chiaramente apprezzabili cellule calciformi mucipare nelle sezioni analizzate con ematossilina/eosina. Al fondo delle strutture *crypt-like* non appaiono

ancora riconoscibili cellule di Paneth. Non sono state apprezzate differenze significative tra i campioni seminati (+)Ad-MS2 e non seminati (-)Ad-MS2.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

A termine di questo Progetto di Ricerca, i risultati ottenuti permettono di individuare interessanti punti di partenza per l'identificazione di nuovi approcci nel *management* della SBS.

Nell'ambito della Ricerca Clinica, nonostante la ridotta numerosità della sottopopolazione indagata dovuta alla rarità della patologia in oggetto, la citrullina si è rivelata un *marker* utile nel monitorare l'insufficienza intestinale. I dati raccolti mostrano infatti come la citrullinemia sia correlata in modo fortemente significativo sia con la lunghezza dell'intestino residuo del paziente, sia con la relativa durata del supporto nutrizionale parenterale. Pertanto, sulla base delle evidenze sperimentali raccolte e come già altri autori hanno proposto, sarebbe auspicabile che i Centri dedicati alla gestione multidisciplinare del paziente affetto da SBS, introducessero un dosaggio routinario della citrullinemia. Ciò potrebbe essere particolarmente utile nel monitoraggio dell'andamento della funzionalità intestinale nei pazienti che abbiano intrapreso da breve tempo un programma di ciclizzazione della nutrizione parenterale e di nutrizione enterale.

Nell'ambito della Ricerca Sperimentale, l'attenzione si è rivolta verso la realizzazione di tessuto intestinale utilizzando le tecniche dell'ingegneria *tissutale*.

Le analisi morfo-meccaniche, biologiche e di biodegradazione *in vivo* condotte sui diversi tipi di *scaffold* allestiti, hanno consentito di individuare nel PVA Ox 1% un polimero versatile e idoneo ai nostri scopi. In particolare, sebbene in questo lavoro di ricerca, alla stregua del modello TESI, siano stati impiegati strutture discoidali composite, è verosimile la possibilità di preparare *graft* tubulari a base di PVA Ox 1% per l'allungamento di tratti intestinali esposti a resezioni significative.

La componente biologica dello *scaffold*, costituita dalla matrice intestinale acellulare, si è dimostrata necessaria al fine di conferire al PVA Ox 1% la capacità di sostenere l'adesione e la proliferazione cellulare; l'idrogel in sé, probabilmente a causa dell'elevata idrofilia oltre che di una porosità inadeguata, non promuove, *in vitro*, la colonizzazione da parte di elementi cellulari. In particolare, i risultati ottenuti negli esperimenti di semina di Ad-MSi su PVA Ox 1%/ECM*i*

suggeriscono, in accordo con la letteratura, quanto sia importante preservare l'isto-architettura del tessuto per promuovere la proliferazione cellulare sul supporto. Contestualmente è stata indagata anche la bontà di *scaffold* composti con ECMI. Il *pool* proteico della matrice intestinale arrangiato a foglietto risulta idoneo, sebbene in maniera inferiore alla matrice integra, nel migliorare le caratteristiche biologiche del polimero sintetico. Ciò è particolarmente interessante se si considera come, inevitabilmente, il processo di decellularizzazione comprometta le caratteristiche meccaniche del tessuto naturale. Poter sfruttare la componente macromolecolare della matrice potrebbe costituire un interessante approccio alternativo nel suo utilizzo.

Lo studio *in vivo*, che ha previsto l'impianto degli *scaffold* composti in omento, ha mostrato la loro potenziale idoneità nell'indurre la formazione di uno pseudo-epitelio intestinale. Non sono state tuttavia riscontrate differenze apprezzabili tra gli *scaffold* seminati rispetto ai controlli non seminati. Ulteriori studi saranno volti ad individuare le condizioni ottimali per ottenere dei costrutti rigenerati più complessi ed organizzati; protrarre ad esempio il tempo di impianto potrebbe essere una strategia utile per consentire al tessuto neoformato un'ulteriore specializzazione in senso enterico.

BIBLIOGRAFIA

1. Goulet O, Ruemmele F, *Causes and management of intestinal failure in children*. Gastroenterology. 2006; 130(2 Suppl 1): 16-28.
2. Grant D, *Intestinal transplantation: 1997 report of the international registry*. Intestinal Transplant Registry. Transplantation. 1999; 67(7): 1061-1064.
3. Claire L, *Short bowel syndrome*. The Surgeon. 2010; 8: 270-279.
4. Sulkowski JP, Minneci PC: *Management of Short Bowel Syndrome*. Pathophysiology. 2014; 21: 111-118.
5. Salvia G, *Neonatal onset intestinal failure: an Italian Multicenter Study, Working Group on Neonatal Gastroenterology of the Italian Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*. J Pediatr. 2008; 153(5): 674-676.
6. Tappeneden KA, *Pathophysiology of Short Bowel Syndrome: Considerations of Resected and Residual Anatomy*. JPEN. 2014; 38(Suppl 1): 14S-22S.
7. Batra A, Beattie RM, *Management of short bowel syndrome in infancy*. Early Hum Dev. 2013; 89: 899-904.

8. Frongia G, Kessler M, Weih S, Nickkholgh A, Mehrabi A, Holland-Cunz S, *Comparison of LILT and STEP procedures in children with short bowel syndrome: a systematic review of the literature.* J Pediatr Surg. 2013; 48(8): 794-805.
9. Wales PW, Christison-Lagay ER, *Short bowel syndrome: epidemiology and etiology.* Semin Pediatr Surg. 2010; 19(1): 3-9.
10. Kaufmann SS, Loseke CA, Lupo JV, Young RJ, Murray ND, Pinch LW, Vanderhoof JA, *Influence of bacterial overgrowth and intestinal inflammation on duration of parenteral nutrition in children with short bowel syndrome.* J Pediatr 1997; 131(3): 356-361
11. Dibaise JK, Young RJ, Vanderhoof JA, *Enteric microbial flora, bacterial overgrowth, and short-bowel syndrome.* Clin Gastroenterol Hepatol. 2006; 4(1): 11-20.
12. Van Gossum A, Messing B, *Home parenteral nutrition in adults: new trends raise new questions.* Nutrition. 1997; 13(5): 479-480.
13. Pant C, Sferra TJ, Fischer RT, Olyae M, Gilroy R, *Epidemiology and Healthcare Resource Utilization Associated With Children With Short Bowel Syndrome in the United States.* J Parenter Enteral Nutr. 2015; pii: 0148607115616079.
14. Wales PW, Christison-Lagay ER, *Short bowel syndrome: epidemiology and etiology* 2010. Semin Pediatr Surg. 2010; 19(1): 3-9.
15. Schalamon J, Mayr JM, Höllwarth ME, *Mortality and economics in short bowel syndrome.* Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2003; 17(6): 931-942.

16. Duro D, Mitchell PD, Mehta NM, Bechard LJ, Yu YM, Jaksic T, Duggan C, *Variability of resting energy expenditure in infants and young children with intestinal failure-associated liver disease*. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2014; 58(5): 637-641.
17. Goulet O, *Short bowel syndrome in pediatric patients*. Nutrition. 1998; 14(10): 784-7.
18. Fitzgibbons S, Ching YA, Valim C, Zhou J, Iglesias J, Duggan C, Jaksic T, *Relationship between serum citrulline levels and progression to parenteral nutrition independence in children with short bowel syndrome*. J Pediatr Surg. 2009; 44(5): 928-932.
19. Diamanti A, Panetta F, Gandullia P, Morini F, Noto C, Torre G, Lezo A, Goffredo B, Daniele A, Gambarara M, *Plasma citrulline as marker of bowel adaptation in children with short bowel syndrome*. Langenbecks Arch Surg. 2011; 396(7): 1041-1046.
20. Vecino López R, Andrés Moreno AM, Ramos Boluda E, Martínez-Ojinaga Nodal E, Hernanz Macías A, Prieto Bozano G, Lopez Santamaria M, Tovar Larrucea JA, *Plasma citrulline concentration as a biomarker of intestinal function in short bowel syndrome and in intestinal transplant*. An Pediatr (Barc). 2013; 79(4): 218-23.
21. Crenn P, Messing B, Cynober L, *Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction*. Clin Nutr. 2008; 27(3): 328-39.
22. Batra A, Beattie RM, *Management of short bowel syndrome in infancy*. Early Hum Dev. 2013; 89(11): 899-904.

23. Bianchi A, *Longitudinal intestinal lengthening and tailoring: results in 20 children*. J R Soc Med 1997; 90(8): 429-432.
24. Javid PJ, Kim HB, *Serial Transverse enteroplasty is associated with successful short-term outcomes in infants with SBS*. J Ped Surg 2005; 40(6): 1019-1023.
25. Hommel MJ, van Baren R, Haveman JW. *Surgical management and autologous intestinal reconstruction in short bowel syndrome*. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2016; 30(2): 263-280.
26. Ikada Y, *Challenges in tissue engineering*. J R Soc Interface. 2006; 3(10): 589-601.
27. Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Wysoczynski M, Wan W, Ratajczak J, Wojakowski W, Kucia M, *Hunt for pluripotent stem cell: regenerative medicine search for almighty cell*. J Autoimmun. 2008; 30(3): 151-162.
28. Donovan PJ, Gearhart J, *The end of the beginning for pluripotent stem cells*. Nature. 2001; 414(6859): 92-7.
29. Prella K, Zink N, Wolf E, *Pluripotent stem cells--model of embryonic development, tool for gene targeting, and basis of cell therapy*. Anat Histol Embryol. 2002; 31(3): 169-186.

30. Kuçi S, Kuçi Z, Latifi-Pupovci H, Niethammer D, Handgretinger R, Schumm M, Bruchelt G, Bader P, Klingebiel T, *Adult stem cells as an alternative source of multipotential (pluripotential) cells in regenerative medicine*. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2009; 4(2): 107-117.
31. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T, *Stem cells find their niche*. *Nature*. 2001; 414: 98-104.
32. Presnell SC, Petersen B, Heidaran M, *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2002; 13: 369–376.
33. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR et al., *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow*. *Nature*. 2002; 418: 41-49.
34. Hipp J, Atala A, *Sources of Stem Cells for Regenerative Medicine*. *Stem Cell Rev*; 2008; 4: 3-11.
35. Wong VW, Rustad KC, Longaker MT, Gurtner GC, *Tissue engineering in plastic surgery: a review*. *Plast Reconstr Surg*. 2010; 126(3): 858-868.
36. Bianco P, Robey PG, *Stem cells in tissue engineering*. *Nature*. 2001; 414: 118–121.
37. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. *Science*. 1999; 284 (5411): 143-147.
38. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R,

- Keating A, Prockopj D, Horwitz E, *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells*. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-317.
39. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T, *Stem cells find their niche*. *Nature*. 2001; 1; 414(6859): 98-104.
40. Estes BT, Gimble JM, Guilak F, *Mechanical signals as regulators of stem cell fate*. *Curr Top Dev Biol*. 2004; 60: 91-126.
41. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP, *Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues*. *Transplantation*. 1968; 6:230-247.
42. He Q, Wan C, Li G, *Concise Review: Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in Blood*. *Stem Cells*. 2007; 25: 69–77.
43. Friedenstein AJ, *Marrow stromal fibroblasts*. *Calcif Tissue Int*. 1995; 56 (suppl 1): S17.
44. Bianco P, Gehron Robey P, *Marrow stromal stem cells*. *J Clin Invest*. 2000; 105(12):1663-1668.
45. Rubinstein P, Rosenfield RE, Adamson JW, Stevens CE, *Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution*. *Blood*. 1993; 81: 1679-1690.

46. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH, *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Mol Biol Cell. 2002; 13 (12): 4279-4295.
47. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K, *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue*. Stem Cells. 2006; 24: 1294-1301.
48. Seta N, Kuwana M, *Human circulating monocytes as multipotential progenitors*. Keio J Med. 2007; 56(2): 41-47.
49. Uzbas F, May ID, Parisi AM, Thompson SK, Kaya A, Perkins AD, Memili E, *Molecular physiognomies and applications of adipose-derived stem cells*. Stem Cell Rev. 2015; 11(2):298-308.
50. Baptista LS, Silva KR, Borojevic R, *Obesity and weight loss could alter the properties of adipose stem cells?* World J Stem Cells 2015; 7:165–173.
51. Dicker A, Le Blanc K, Astrom G, van Harmelen V, Götherström C, Blomqvist L, Arner P, Ryden M, *Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue*. Exp Cell Res 2005; 308: 283-290.
52. Tabata Y, *Tissue regeneration based on growth factor release*. Tissue Eng. 2003; 9 Suppl 1: S5-15.

53. Furth ME, Atala A, Van Dyke ME, *Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine*. Biomaterials. 2007; 28: 5068–5073.
54. Hollister SJ, *Porous scaffold design for tissue engineering*. Nat Mater. 2005 Jul; 4(7): 518-524.
55. Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG, *Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering*. J Bone Joint Surg Am. 2004; 86-A(7): 1541-1558.
56. Muschler GF, Midura RJ, *Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications*. Clin Orthop Relat Res. 2002; (395): 66-80.
57. Bellamkonda R, Ranieri JP, Bouche N, Aebischer P, *Hydrogel-based three-dimensional matrix for neural cells*. J Biomed Mater Res. 1995; 29(5): 663-71
58. Drury JL, Mooney DJ, *Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications*. Biomaterials. 2003; 24: 4337–4351.
59. Crispim EG, Piai JF, Fajardo R, Ramos ERF, Nakamura TU, Rubira AF, Muniz EC, *Hydrogels based on chemically modified poly(vinyl alcohol) (PVA-GMA) and PVA-GMA/chondroitin sulfate: preparation and characterization*. Express Polym Lett. 2001; Vol.6, N.5; 383-395.
60. Dvoracková M, Dung TK, *Degradation of polyvinyl alcohol (PVA) by Fenton process*. 13th International Research/Expert Conference "TRENDS IN THE DEVELOPMENT OF MACHINERY AND ASSOCIATED TECHNOLOGY" TMT 2009.

61. Akinori T, Terumi N, Hisashi I, Yoshihito I, Tadamichi H, *Chemical modification of Hydroxylgroups of poly(vinyl alcohol) by a glycosidation reaction*. Macromol. Rapid Commun. 2000; 21, 764-769.
62. Xin D, Xinyi X, Hongrui W, Yuanyuan G, *Advanced Oxidation of Polyvinil Alcohol Wastewater by O3/UV*. Environmental Science, 2011; 3 (8), 1807-1812.
63. Ying-Ling L, Yie-Chan C, *Novel Approach to the Chemical Modification of Poly(vynil alcohol): Phosphorylation*. J Polim Sci Part A, Polymer Chemistry 2003; 41 (8): 1107-1110.
64. Stocco E, Barbon S, Dalzoppo D, Lora S, Sartore L, Folin M, Parnigotto PP, Grandi C, *Tailored PVA/ECM Scaffolds for Cartilage Regeneration*. Biomed Res Int. 2014.
65. Levin DE, Barthel ER, Speer AL, Sala FG, Hou X, Torashima Y, Grikscheit TC, *Human tissue-engineered small intestine forms from postnatal progenitor cells*. J Pediatr Surg. 2013; 48(1): 129-137.
66. Evans G, Flint N, Somers AS, Eyden B, Potten CS, *The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures*. J Cell Sci 1992; 101 (Pt 1): 219-231.
67. Sala FG, Matthews JA, Speer AL, Torashima Y, Barthel ER, Grikscheit TC, *A multicellular approach forms a significant amount of tissue-engineered small intestine in the mouse*. Tissue Eng Part A. 2011; 17(13-14):1841-1850.

68. Orlando G, García-Arrarás JE, Soker T, Booth C, Sanders B, Ross CL, De Coppi P, Farney AC, Rogers J, Stratta RJ, *Regeneration and bioengineering of the gastrointestinal tract: current status and future perspectives*. Dig Liver Dis. 2012; 44(9): 714-720.
69. Spurrier RG, Grikscheit TC, *Tissue engineering the small intestine*. Clin Gastroenterol Hepatol. 2013; 11(4): 354-358.
70. De Mel A, Yap T, Cittadella G, Hale LR, Maghsoudlou P, De Coppi P et al., *A potential platform for developing 3D tubular scaffolds for pediatric organ development*, J Mater Sci Mater Med. 2015; 26 (3):141.
71. Chen MK, Badylak SF, *Small bowel tissue engineering using small intestinal submucosa as a scaffold*. J Surg Res. 2001; 99(2): 352-358.
72. Weih S, Nickkholgh A, Kessler M, Frongia G, Hafezi M, Golriz M, Fard N, Holland-Cunz S, Mehrabi A, *Models of short bowel syndrome in pigs: a technical review*. Eur Surg Res. 2013; 51(1-2): 66-78.
73. Meezan E, Hjelle JT, Brendel K, Carlson EC: *A simple, versatile, non disruptive method for the isolation of morphologically and chemically pure basement membranes from several tissues*. Life Sci. 1975; 1,17(11): 1721-1732.
74. Rhoads JM, Plunkett E, Galanko J, Lichtman S, Taylor L, Maynor A, Weiner T, Freeman K, Guarisco JL, Wu GY. *Serum citrulline levels correlate with enteral tolerance and bowel length in infants with short bowel syndrome*. J Pediatr. 2005; 146: 542-547.

75. Wakabayashi Y, Iwashima A, Yamada E, Yamada R. *Enzymological evidence for the indispensability of small intestine in the synthesis of arginine from glutamate. II. N-acetylglutamate synthase*. Arch Biochem Biophys. 1991; 291: 9-14.
76. Gupta S, Webster TJ, Sinha A, *Evolution of PVA gels prepared without crosslinking agents as a cell adhesive surface*. J Mater Sci Mater Med 2011; 22: 1763–1772.
77. Peppas NA, Huang Y, Torres-Lugo M, Ward JH, Zhang J., *Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology*. Annu Rev Biomed Eng 2000; 2: 9–29.
78. Hatanaka T, Hashimoto T, Kawahara T, Takami M, Asahi N, Wada R, *Biodegradability of oxidized poly(vinyl alcohol)*. Biosci Biotechnol Biochem 1996; 60: 1861–1863.
79. Wang J, Bettinger CJ, Langer RS, Borenstein JT, *Biodegradable microfluidic scaffolds for tissue engineering from amino alcoholbased poly(ester amide) elastomers*. Organogenesis 2010; 6: 212–216.
80. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. *Decellularization of tissues and organs*. Biomaterials. 2006; 27(19): 3675-3683.
81. Conconi MT, De Coppi P, Di Liddo R, Vigolo S, Zanon GF, Parnigotto PP, Nussdorfer GG. *Tracheal matrices, obtained by a detergent-enzymatic method, support in vitro the adhesion of chondrocytes and tracheal epithelial cells*. Transpl Int. 2005; 18(6): 727-734.
82. Maghsoudlou P, Eaton S, De Coppi P. *Tissue engineering of the esophagus*. Semin Pediatr Surg. 2014; 23(3): 127-134.

83. Prasad Chennazhy K, Krishnan LK, *Effect of passage number and matrix characteristics on differentiation of endothelial cells cultured for tissue engineering*. *Biomaterials* 2005; 26: 5658–5667.
84. Marion NW, Mao JJ, *Mesenchymal stem cells and tissue engineering*. *Methods Enzymol.* 2006; 420: 339-61.