



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze del Farmaco

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE
CICLO XXVI

RICOSTRUZIONE DELLA PARETE ADDOMINALE CON SCAFFOLD DECELLULARIZZATI
STUDIO SPERIMENTALE

Direttore della Scuola: Chiar.ma Prof.ssa Maria Teresa Conconi

Supervisore: Chiar. mo Prof. Franco Bassetto

Dottoranda: Dott.ssa Chiara Gelati

INDICE

RIASSUNTO	1
Presupposti dello studio.....	1
Scopo dello studio	2
Materiali e metodi	2
Risultati	3
Conclusioni.....	3
ABSTRACT	4
Background	4
Aim of the study	4
Material and methods	4
Results	5
Conclusion	5
1. INTRODUZIONE	6
1.1 Bioingegneria tissutale	6
1.2 la bioingegneria tissutale e la chirurgia plastica.....	7
1.3 Principi di bioingegneria tissutale	9
1.3.1 Cellule e fattori di crescita.....	9
1.3.2 Generalita' sugli scaffolds.....	12
1.3.3 Il concetto di scaffold ideale	15
1.3.4 Gli scaffolds decellularizzati	17
1.4 La matrice extracellulare	20
2. LA PARETE ADDOMINALE	23
2.1 Cenni di anatomia.....	23
2.2. Vascolarizzazione ed innervazione	25
2.3 Fisiopatologia	27
2.3.1 Ernie addominali	28
2.3.2 laparoceli ed eviscerazione.....	28

2.4 Chirurgia della parete addominale	29
2.4.1 Chirurgia riparativa	30
2.4.2 Chirurgia ricostruttiva	30
2.4.3 Chirurgia rigenerativa.....	32
2.4.4 Il trapianto di parete addominale	34
3. SCOPO DELLA TESI	36
4. MATERIALI E METODI	39
4.1 Prelievo microchirurgico del lembo	44
4.2 Protocolli di decellularizzazione	46
4.2.1 Decellularizzazione muscolare	46
4.2.2 Decellularizzazione vascolare	48
5. RISULTATI	50
5.1 Istologia	50
5.1.1 Muscolo decellularizzato	50
5.1.2 Muscolo post trasferimento.....	55
5.2 Ecografia	59
6. DISCUSSIONE	63
7. CONCLUSIONI	70
8. BIBLIOGRAFIA	72
Ringraziamenti:	89

RIASSUNTO

PRESUPPOSTI DELLO STUDIO

La ricerca per ottenere un tessuto o un intero organo bioingegnerizzato è attualmente la più intensa e foriera di speranze nel campo della trapiantologia e della traumatologia, che devono fronteggiare la scarsa disponibilità di organi e tessuti omologhi, le problematiche legate al rigetto e l'inevitabile comorbidità qualora si ricorra al prelievo di tessuti autologhi. La bioingegneria dei tessuti è quella branca nata dalla fusione di diverse esperienze in campo biomolecolare, immunologico, anatomico e di chirurgia sperimentale volto ad ottenere la possibilità di utilizzare nell'uomo organi e tessuti ottenuti in laboratorio a partenza da materiale biologico. Ad oggi una delle maggiori limitazioni al raggiungimento di tale scopo è rappresentata dalla difficoltà di ottenere un costrutto con un'adeguata architettura vascolare al suo interno, tale da permetterne la sopravvivenza una volta impiantato in vivo. Per superare tale limitazione si è cercato di ottenere in laboratorio delle strutture che fungessero da impalcature, i cosiddetti "scaffold", in grado di favorire la crescita cellulare ordinata, ottenendo un tessuto bioingegnerizzato. Le prime osservazioni vennero fatte mediante l'impiego di costrutti costituiti da materiali di sintesi ma successivamente i risultati più incoraggianti si sono verificati grazie all'impiego di scaffold biologici ottenuti attraverso il procedimento noto come "decellularizzazione". Tale procedura, con aspetti tecnici diversificati per tipologia di tessuto, permette di eliminare le cellule, fonte di incompatibilità nei trapianti, mantenendo la citoarchitettura nativa ove è possibile promuovere e guidare un processo di neoangiogenesi e susseguente rivascolarizzazione una volta impiantati in vivo. Alternativamente si è studiata la possibilità di sviluppare scaffold con una rete vascolare preformata al loro interno, ma nessun tentativo è stato fatto di provvedere una rivascolarizzazione diretta nell'impianto in vivo.

SCOPO DELLO STUDIO

Questo studio pone le sue basi nella ricostruzione della parete addominale ottenuta mediante trapianto da cadavere nei casi di trapianto multiviscerale. Si è cercato di valutare la realizzabilità nel modello animale di ottenere un simile lembo microchirurgico miofasciale che potesse essere decellularizzato e trasferito su di un ricevente sia in questa forma che dopo averlo colonizzato con cellule staminali derivate dal tessuto adiposo del ricevente medesimo per aumentare l'immunocompatibilità (lembo omo-autologo) . Inoltre è stata studiata la ricostruzione della parete addominale mediante impianto di un patch muscolare decellularizzato.

MATERIALI E METODI

Sono stati prelevati mediante ingradimento al microscopio operatorio lembi del muscolo retto dell'addome dalla parete addominale di coniglio assieme al loro asse vascolare artero-venoso sino alle iliache e ,dopo il sacrificio dell'animale, sono stati sottoposti ad un protocollo di decellularizzazione della durata di 7 giorni, sviluppato adattandone uno per il tessuto muscolare pubblicato in letteratura. Identici campioni privi di asse vascolare sono stati prelevati e sottoposti alla medesima procedura mentre campioni di assi vascolari sono stati separatamente sottoposti a trattamento mediante protocollo per decellularizzazione dei vasi. Sia prima che durante le fasi del processo sono stati eseguiti prelievi dei campioni tissutali ed eseguite multiple colorazioni istologiche al fine di verificare l'efficacia del procedimento. Sono stati altresì eseguiti prelievo di tessuto adiposo ed omento al fine di verificarne la cellularità e la possibilità di estrazione di cellule staminali derivate dal tessuto adiposo (ADSC). Un patch di tessuto muscolare decellularizzato è stato impiantato a riparo di una perdita di sostanza muscolare addominale a tutto spessore in un animale ricevente che, a distanza di 3 settimane, è stato sottoposto a controllo ecografico e a prelievo dell'impianto , che veniva sottoposto ad analisi istologica a tre colorazioni.

RISULTATI

Il tessuto muscolare dopo decellularizzazione dimostra una mancanza di nuclei e di fibre muscolari mantenendo integra la matrice extracellulare e la struttura dei canali vascolari, di cui rimangono apprezzabili i diversi strati delle pareti, compresi gli strati di fibre elastiche. L'analisi della decellularizzazione dei vasi maggiori è tuttora in corso. L'impianto muscolare eseguito ha dimostrato all'ecografia stabilità, assenza di fenomeni di rigetto e ricostituzione della contenzione dei visceri addominali con assenza di erniazione. L'esame istologico presenta un ricco pattern vascolare con presenza non diffusa da parte di cellule infiammatorie (reazione granulomatosa) mantenendo l'architettura originale delle fibre muscolari occupate per la maggior parte da processo fibrotico.

CONCLUSIONI

La decellularizzazione del tessuto muscolare ed il suo impianto in vivo hanno permesso di identificare una struttura biologica in grado di offrire una valida alternativa ai materiali attualmente impiegati per la riparazione delle erniazioni addominali. Ulteriori valutazioni andranno fatte sulla possibilità di aumentarne le chance di biointegrazione mediante inserimento di cellule staminali del ricevente e fattori di crescita . Parimenti i processi di decellularizzazione del lembo e del suo asse vascolare, con e senza impianto staminale, sono tutt'ora in corso per poterne verificare la fattibilità ed i risultati di un trasferimento microchirurgico.

ABSTRACT

BACKGROUND

Research efforts are been directed in the last few years on tissue- engineering and the possibility of tissue creation by laboratory device. In fact biochemistry, immunology and experimental surgery has been provided new solutions for organs transplant or anatomical structure replacement. Variously method were described to obtain decellularized matrix from organ or part of them, and how that bioengineered scaffolds can be integrated into recipient organism. The aim of the studies is to provide a source, from animal or cadaver, of engineered organs or tissue flaps available from transplant or reconstructive surgery, free from infective disease, completely functional and without rejection phenomenon.

AIM OF THE STUDY

The aim of this study is to investigate the bio integration potential of a tissue engineered abdominal wall obtained from a donor, even after a protocol of decellularization than after recellularization with stem cell of recipient, obtained from adipose tissue, in vitro and microsurgical transfer in vivo, in order to create a biocompatible free flap without rejection phenomenon (omo-autologous flap). Similarly a sample of decellularized muscle are transferred to a recipient and histological and sonographic result were evaluated.

MATERIAL AND METHODS

Samples of the abdominal wall were collected with iliac arterial and vein pedicle as a free flap from rabbits, before sacrifice (donor). At the same time a sample of adipose tissue was collected from a different rabbit (recipient). The abdominal wall samples underwent a 7 days decellularization protocol. Small samples of the tissues were collected before and after that procedure for histological evaluation of the process. The adipose

tissue sample of the recipient were treated to obtain a full rich stem cells tissue. Similar sample of muscle without vessel are collected and underwent a decellularization protocol and so on for major vessel sample with a specific one for vascular tissue. A decellularized muscle patch are implanted in vivo and rejection phenomenon, survival of the patch and herniation presence were observed after three weeks even by sonography than by histological evaluation after sacrifice.

RESULTS

The histological evaluations shown a progressive degeneration and loss of cellular content of the rabbit abdominal wall samples. In parallel, the general ECM structure maintain their staining properties. Particularly relevant is the preservation of vascular channels. Muscle decellularized sample implanted in vivo demonstrated good biointegration at sonography exam and no herniation was observed; histologic evaluation demonstrated presence of limited granulomatosis reaction, numerous vessels and conservation of original muscle architecture, substituted by fibrosis, without evident rejection. Histological and moreover evaluation of free flap transplant, stem cells seeding and vessel decellularization are in process.

CONCLUSION

Decellularized muscle patch provide the evidence of a new bioengineered tissue that could be useful for abdominal wall repair or reconstruction. Biointegration could be improve by use of stem cells and growth factor seeding. Similarly the demonstration of the preservation of the vascular network and extra cellular matrix of abdominal wall sample provide the possibilities of being bio integrated after vascular anastomoses that is the aim of the studies actually on going.

1. INTRODUZIONE

1.1 BIOINGEGNERIA TISSUTALE

La bioingegneria tissutale è un campo di ricerca che trova oramai uno spazio importante nella letteratura scientifica, nata dalla fusione delle conoscenze e dei progressi in campo biologico molecolare, immunologico, genetico e fisiopatologico.

Lo scopo principale che questa innovativa branca biomedica si prefigge è quello di trovare soluzioni per la guarigione delle malattie sin dalla loro origine genetico-molecolare nonché il tentativo di potenziare le limitate capacità riparative proprie del corpo umano, dando vita a quell'ambito scientifico oramai noto come medicina rigenerativa. La maggior parte degli sforzi si sono finora concentrati nella realizzazione in laboratorio di sostituti di tessuti od interi organi, costruiti in vitro in primis a partire da cellule staminali. La conoscenza dei meccanismi molecolari alla base della riprogrammazione cellulare, tali da ottenere cellule totipotenti è noto da tempo ed è valso ai suoi scopritori il premio Nobel per la Medicina e Fisiologia (Gurdon-Yamanaka,2012). Tuttavia il cammino dalla singola cellula alle complesse strutture degli organi risulta ancora lungo. La creazione di un tessuto biologico o di un intero organo potrebbe permettere il superamento di quegli ostacoli che a tutt'oggi sussistono nei campi della trapiantologia e della chirurgia ricostruttiva, malgrado i continui miglioramenti tecnici e strumentali, ovvero la carenza di organi e la necessità di terapia immunosoppressiva per quanto riguarda i trapianti e la morbilità secondaria a carico di altre sedi per la chirurgia ricostruttiva con tessuti autologhi.

Numerosi progressi sono stati effettuati negli ultimi anni, ma la strada da percorrere per disporre di una vasta gamma di tessuti bioingegnerizzati nella pratica clinica sembra ancora lunga e i problemi tuttora irrisolti sono innumerevoli.

Gli elementi che negli anni sono emersi come fondamentali nello sviluppo di sostituti di laboratorio per i tessuti biologici sono stati, nell'ordine, le cellule, i fattori di crescita, e gli scaffold. Se inizialmente la ricerca si è concentrata sull'identificazione dei tipi cellulari

e lo studio di metodi per poter coltivare ed espandere cellule in vitro, e , successivamente, sui fattori di crescita necessari a guidarne la differenziazione, la complessità e la limitata comprensione dei fenomeni di interazione cellula-cellula e dei segnali molecolari, assieme alla comprensione del fatto che il principale limite nel costruire strutture complesse sia la necessità di garantirgli adeguata nutrizione, ha più recentemente spostato l'attenzione sugli scaffold. Dagli scaffold costituiti da materiali sintetici si è passati a quelli ricavati da materiali biologici, dimostrando che , ad oggi, la Natura risulta essere ancora il migliore architetto da cui prendere esempio.

1.2 LA BIOINGEGNERIA TISSUTALE E LA CHIRURGIA PLASTICA

Le ricadute cliniche dei progressi della bioingegneria tissutale riguardano potenzialmente tutte le specialità biomediche. L'interesse della Chirurgia Plastica è focalizzato soprattutto sulle potenzialità che questa disciplina può offrire per la chirurgia riparativa e ricostruttiva dei tessuti molli, come ad esempio il trattamento di ampie perdite di sostanza di origine traumatica o in seguito a chirurgia demolitiva. Il riparo di tali condizioni è la base della chirurgia ricostruttiva, basata essenzialmente sull'utilizzo di tessuti autologhi. Tuttavia, la comorbidità ,legata al danno controllato che si viene a creare nell'area donatrice , costituisce una grossa limitazione per le dimensioni e per la disponibilità del tessuto mobilizzabile, considerando altresì che i pazienti potrebbero non disporre di un'adeguata risorsa di tessuto autologo, per caratteristiche fenotipiche, o in seguito a patologie. Ne sono classici esempi riparazioni di perdite di sostanze con esposizione ossea o la ricostruzione mammaria ove l'impiego di protesi sia scadente come risultato morfologico, utilizzando a seconda delle diverse condizioni lembi microchirurgici o pedunculati fasciocutanei o miocutanei (1,2). Tali soluzioni sono state studiate negli anni per il riparo di perdite di sostanza a carico di praticamente tutti i distretti corporei, ma tutte implicano una perdita di sostanza secondaria a carico dell'area donatrice, nonostante gli sforzi fatti per minimizzare il danno o diminuire il loro ricorso mediante ausilio di diverse tecnologie biomedicali (3).

L'ingegneria tissutale offre una alternativa totalmente innovativa all'impiego di tessuti autologhi anche al campo della trapiantologia che utilizza tessuti omologhi in quanto non possibile, nella maggior parte dei casi, la sostituzione mediante procedure di prelievo dal medesimo paziente. Notevoli progressi sono stati compiuti proprio nel campo della trapiantologia assieme alle procedure ricostruttive canoniche che hanno permesso di raggiungere obiettivi ambiziosi, come il trapianto da cadavere di un volto o di un arto (4,5). Questi risultati eclatanti sono dipesi da un lato dal miglioramento delle tecniche e procedure dall'altro dall'affinamento di migliori protocolli in grado di gestire il problema del rigetto, il quale permane tuttavia come il più grande ostacolo per l'impiego di trapianti tissutali di ogni tipo o in caso di deficit di ridotte dimensioni. Gli sviluppi della bioingegneria applicati a questi campi potrebbero fornire una soluzione alternativa a queste difficoltà, essenzialmente mediante costrutti cellulari complessi per il trattamento di perdite di sostanza fino a quelle di funzione d'organo.

Tra le varie possibilità oggi disponibili possiamo ricordare in particolare la possibilità di utilizzare dei biomateriali che una volta impiantati siano utilizzati dall'organismo ricevente come impalcature (scaffold) per la ricrescita tissutale ove si possa verificare una progressiva colonizzazione da parte di cellule proprie fino a ricostituire il tessuto mancante. Ad oggi nella pratica clinica della chirurgia plastica si possono ricordare ad esempio quei materiali classificati come sostituti dermici impiegati per il riparo anche di complesse perdite di sostanza cutanea, ove numerose pubblicazioni hanno oramai dimostrato un largo ed efficace impiego laddove un tempo era necessario un più ampio impiego di tessuti autologhi, aprendo la discussione sulla cosiddetta chirurgia rigenerativa. Esistono oggi in commercio diversi tipi di sostituti cutanei che si sono dimostrati equivalenti sia sul piano dell'efficacia che della sicurezza: Biobrane® (un reticolo di fibre di nylon legato ad un sottile strato di silicone e legato a polipeptidi di origine porcina), TransCyte® (membrana semipermeabile di silicone e fibroblasti umani), Dermagraft® (rete in poliglactina riassorbibile ingegnerizzata con fibroblasti neonatali allogenici), Integra® (sostituto dermico composto da due strati: il primo formato da fibre di collagene bovino, il secondo da silicone che si rimuove durante il processo di guarigione della ferita). (6,7). Solitamente si tratta di biomateriali che fungono da guida per la ricellularizzazione da parte dell'organismo ricevente e al tempo stesso vengono degradati e sostituiti da matrice extracellulare neoformata con il

progredire del processo di colonizzazione. Un limite di questi biomateriali è il loro ancora scarso potenziale angiogenetico che ne limita l'impiego ove necessario un sostituto tissutale a spessore elevato. Si è peraltro ipotizzato di incorporare all'interno dei biomateriali cellule progenitrici per superare questa limitazione (8).

Ulteriore esempio di biomateriale utilizzato quale scaffold di largo impiego clinico è l'idrossiapatite, impiegata per la ricostruzione del tessuto osseo. In questo caso la sua struttura, simile a quella basilare del contesto minerale ed amorfo della base ossea consente la migrazione e la differenziazione degli osteoblasti; la sua struttura porosa diviene il punto chiave per promuovere questi processi e al tempo stesso assicurare un adeguato trasporto di sostanze nutritive: il risultato finale deve essere la colonizzazione dell'idrossiapatite da parte degli osteoblasti dell'organismo ricevente e la conseguente formazione di un tessuto osseo neofornato in grado di produrre autonomamente matrice ossea mineralizzata, con parallelo riassorbimento della protesi (9). L'idrossiapatite rappresenta il paradigma di come dovrebbe comportarsi uno scaffold efficace, tuttavia il tessuto osseo è un campo di applicazione relativamente più semplice rispetto ad altri tessuti connotati da maggiore differenziazione cellulare e più complessa vascolarizzazione.

1.3 PRINCIPI DI BIOINGEGNERIA TISSUTALE

1.3.1 CELLULE E FATTORI DI CRESCITA

Riguardo le cellule, le potenziali fonti di cellule staminali e le procedure descritte in letteratura per ottenerle sono innumerevoli e solamente a titolo esemplificativo possiamo citare le cellule della blastocisti o della morula per le cellule staminali embrionali (10)(11), midollo osseo per cellule staminali ematopoietiche, mesenchimali e progenitori endoteliali (12), sangue fetale (13) tessuto adiposo (14,15), lipoaspirato (16) e vena ombelicale (17). La scelta della fonte di cellule staminali non è agevole in quanto attualmente si dispone di diverse fonti cellulari, sia embrionali che adulte, ciascuna con le proprie caratteristiche di disponibilità e potenziali differenziativi, ove le cellule a

potenziale multipotente sono nei vari laboratori le maggiormente utilizzate (**Fig. 1**). Ogni linea cellulare nota attualmente possiede precisi aspetti di vantaggi e svantaggi (18).

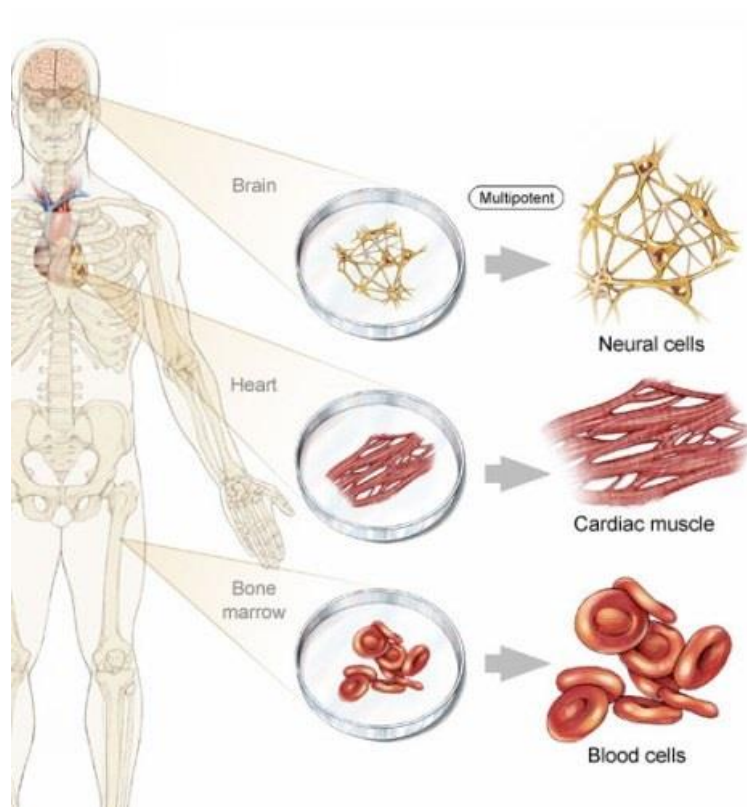


Fig 1 : Cellule staminali multipotenti

Un parametro molto importante da considerare nella scelta delle cellule staminali è la loro capacità differenziativa residua; infatti più le cellule sono andate incontro ad un processo differenziativo e più il loro potenziale di differenziazione sarà limitato. Le cellule staminali adulte pertanto sono in grado di evolvere in un numero di fenotipi cellulari minore rispetto alla cellule staminali embrionali che presentano un potenziale differenziativo molto più vasto (19).

Gli studi sulle cellule staminali embrionali, vere totipotenti, sono stati progressivamente abbandonati per motivazioni tecniche ed etiche, incentrandosi maggiormente su quelle derivate dalle cellule adulte. Le scoperte compiute sulle singole cellule hanno costituito le basi per progettare e realizzare interi tessuti in laboratorio. I problemi più rilevanti alla realizzazione di questo fine sono costituiti da :

- Difficoltà di realizzare una co-coltura in vitro. I tessuti sono composti da più tipi di cellule che si differenziano per embriogenesi, morfologia e funzioni ; in vitro è complesso realizzare la crescita contemporanea e ordinata di più tipi cellulari differenti
- Necessità di garantire un adeguato supporto nutritivo. I tessuti hanno esigenze nutrizionali più complesse delle singole colture cellulari.
- Necessità di fornire adeguati fattori di crescita per lo sviluppo del tessuto; i medesimi fattori sono altresì regolati da precisi meccanismi e segnali di interazione fattore-cellula.

I maggiori sforzi della ricerca si sono incentrati sulla ricerca e la somministrazione regolata secondo dosi e tempi adeguati di quei fattori di crescita specifici per ogni tipo di coltura cellulare e per le diverse fasi di sviluppo delle cellule. A tale proposito sono esempi ampiamente noti in letteratura quelli del FGF (Fibroblast growth factor) per la differenziazione delle cellule staminali embrionali (20) e il VEGF (Vascular endothelial growth factor) per le cellule staminali adipose (21). È bene precisare che sia il FGF, sia il VEGF sono fattori di crescita che presentano molteplici funzioni e sono implicati in numerosi processi di crescita tissutale (fibroblasti, cellule endoteliali ed epiteliali). Inizialmente per ottenere una co-coltura cellulare sono stati sperimentati sistemi che prevedevano la semplice deposizione casuale di due o più tipi cellulari differenti su di uno stesso supporto (scaffold); la limitazione è costituita dal fatto che non è possibile ordinare e programmare la densità di un determinato tipo cellulare in una particolare zona dello scaffold. Per superare quest'ostacolo sono state pertanto messe a punto tecniche che consentano di ottimizzare la disposizione spaziale dei vari tipi cellulari, come ad esempio l'utilizzo di molecole di adesione depositate sulla superficie di coltura o l'utilizzo di substrati in grado di modificare le proprie caratteristiche se esposti ad agenti fisici come luce, calore e differenze di potenziale elettrico. (22) Esempi di co-coltura con due tipi cellulari sono stati : epatociti e fibroblasti (23,24) e fibroblasti con cellule endoteliali (25). L'ulteriore passo con più tipi cellulari è stata una struttura tridimensionale simil vascolare composta da fibroblasti umani di derivazione polmonare, cellule muscolari lisce ed endoteliali di vena ombelicale umana (26).

1.3.2 GENERALITA' SUGLI SCAFFOLDS

La base stessa per l'ottenimento in laboratorio da parte della bioingegneria di un tessuto funzionale a partenza dalle cellule è quella di disporre di un adeguato supporto ovvero scaffold nella terminologia anglosassone. Il concetto è riassumibile in quello di una "impalcatura" che permetta la crescita ordinata delle cellule. La corretta scelta del supporto per la coltura non si è rivelato semplice e ha necessitato numerose sperimentazioni in diversi centri, dal momento che lo scaffold va adattato alle caratteristiche della coltura cellulare che si vuole ottenere e deve soddisfare precisi requisiti di biocompatibilità, proprietà biomeccaniche ed ultrastrutturali permettendo nel contempo una favorevole crescita e differenziazione cellulare. Attualmente le vie intraprese per il loro ottenimento permette di classificarli principalmente, a seconda della loro origine o sintesi, in scaffold di derivazione sintetica (27), semisintetica (28) o biologica (29), recentemente sono state descritte strutture tridimensionali ottenute elaborando l'assemblaggio delle singole fibre mediante appositi software (30).

La comprensione dell'importante ruolo svolto dall'interazione con la matrice extracellulare e dai fenomeni molecolari e meccanici che questa svolge, ha permesso negli ultimi anni di ipotizzare che la sostituzione di interi tessuti complessi possa essere ottenuta non dalla costruzione ex-novo in laboratorio con successivo trasferimento in vivo, bensì fornendo all'organismo degli scaffold "rigenerativi" che lo inducano ad agire da camera di coltura ricostruendo su questa impalcatura le parti mancanti. La base di partenza diviene il tessuto stesso che, mediante il processo definito di "decellularizzazione" diviene scaffold ideale per la sua stessa rigenerazione in un organismo ricevente.

Integrando i progressi ottenuti sulle cellule staminali con la bioingegneria dei materiali, si sono così ottenuti in vitro dei tessuti bioingegnerizzati successivamente trasferiti in vivo su animali o sull'uomo (31). Ne sono esempi significativi l'impianto nel 2006 di una vescica bioingegnerizzata ottenuta da cellule uroteliali e muscolari lisce autologhe coltivate su un supporto di collagene e acido poliglicolico per trattare 7 pazienti affetti da mielomeningocele. Tale metodica ha permesso di risparmiare l'utilizzo di segmenti gastrointestinali che vengono abitualmente impiegati nella ricostruzione vescicale (32). Il passo successivo è stato quello di potenziare la biocompatibilità dello scaffold mediante

suo arricchimento con cellule del ricevente in fase pre-trasferimento, aprendo l'era dei tessuti omo-autologhi. Questa intuizione ha portato nel 2008 ad ottenere una trachea bioingegnerizzata decellularizzando una porzione di trachea da donatore omologo e ricellularizzandola con cellule epiteliali e mesenchimali staminali del ricevente. Il graft omo-autologo è stato poi impiantato con successo in un paziente affetto da ostruzione bronchiale severa.(33) Nell'ambito della medicina rigenerativa grande interesse è stato suscitato dalla rigenerazione del tessuto miocardico colpito da necrosi ischemica mediante cellule staminali (34).

Il concetto stesso di tessuto bioingegnerizzato metteva i ricercatori di fronte a due strade principali ovvero offrire una semplice impalcatura ove le cellule staminali circolanti dell'organismo ricevente avrebbero potuto riconoscere precisi segnali contenuti nella matrice extra-cellulare e differenziarsi per ripopolare e ricostituire il tessuto come in origine oppure fornire una struttura dove le cellule staminali trasferite ed indirizzate verso specifici fenotipi facilitassero ulteriormente questo processo. Tale seconda ipotesi era tanto più verosimile quanto più il tessuto da trasferire fosse strutturalmente complesso. Per tale motivo i costrutti omo-autologhi hanno ricevuto maggiore attenzione ma si è reso evidente che per poter procedere ad un impianto in vivo del tessuto bioingegnerizzato era necessario aver ottenuto una buona integrazione delle cellule staminali all'interno dello scaffold ed essere stati in grado, appunto, di differenziarle verso il fenotipo desiderato. Quand'anche questo non sempre agevole aspetto fosse stato raggiunto grazie alla meticolosità tecnica e procedurale l'ulteriore importante ostacolo alla sopravvivenza e funzionalità del tessuto era la necessità di garantirgli una adeguata vascolarizzazione, evitando gli effetti irreversibili dell'ischemia che conducono alla necrosi o all'apoptosi in pochi minuti o qualche ora, a seconda del tipo cellulare. Da qui l'assoluta importanza di garantire un'efficiente rete vascolare che si distribuisca uniformemente all'interno del tessuto ottenuto in vitro per assicurare un'adeguata distanza tra vasi capillari e cellule in modo da soddisfare le esigenze metaboliche di quest'ultime. Tale distanza può essere estremamente esigua e difficile da ottenere in uno scaffold bioingegnerizzato, basti pensare che per il tessuto cardiaco la distanza massima tra cellule e capillari per assicurare un'efficace diffusione di ossigeno e nutrienti è di appena 100 μm . (35).

Attualmente la mancanza di una rete vascolare efficiente costituisce il maggior ostacolo alla realizzazione di un tessuto bioingegnerizzato tridimensionale di notevoli dimensioni.

Si è tentato di risolvere il problema ipotizzando di poter promuovere un processo di angiogenesi post-impianto ad opera dell'organismo ricevente, ad esempio utilizzando degli scaffold che contengono al loro interno fattori pro-angiogenetici o che li rilasciano in maniera programmata ma presentano l'inconveniente di una lenta colonizzazione del costruito da parte dei vasi neoformati. Maggiormente funzionale apparirebbe il concetto di trasferire lo scaffold con un peduncolo vascolare ma ad oggi la realizzabilità di una adeguata decellularizzazione dei vasi che ne consenta al tempo stesso di essere immunologicamente inerti e funzionali ad un trasferimento microchirurgico appare complessa. Più semplice sembra la possibilità di realizzare uno scaffold con una struttura microvascolare preformata in grado di anastomizzarsi spontaneamente con l'apparato vascolare del ricevente una volta avvenuto l'impianto in vivo, risentendo tuttavia anche in questo caso del fattore tempo. Per generare un sistema micro vascolare in vitro è necessario che vengano utilizzate cellule che costituiscono la struttura dei vasi sanguigni come ad esempio cellule endoteliali, fibroblasti, periciti o cellule staminali che vengano indirizzati a differenziarsi verso questi tipi di cellule. Con questo approccio si è recentemente riusciti ad ottenere un network microvascolare seminando cellule endoteliali umane su idrogel a base di fibrina (36).

Tra i diversi tessuti da cui ottenere materiale biologico per la produzione di scaffold biologici ricordiamo valvole cardiache (37,38), derma (39), sottomucosa intestinale (40), muscolo scheletrico (41), fegato (42), tendine (43).

In alternativa agli scaffold di derivazione biologica sono stati compiuti degli sforzi per progettare e realizzare scaffold di origine sintetica che essendo stati prodotti artificialmente consentono un miglior controllo delle proprietà meccaniche e fisiche, inoltre possono essere facilmente manipolati chimicamente ad esempio incorporando fattori di crescita, recettori e proteine ligando per stimolare l'adesione, la crescita e la differenziazione cellulare (44,45).

Un ulteriore tentativo è stato compiuto con l'assemblaggio di scaffold ibridi combinando materiali sintetici e matrice extracellulare allo scopo di sfruttare al meglio e integrare i vantaggi che offrono entrambi i materiali, al tempo stesso però emergono anche gli svantaggi dovuti a reazioni infiammatorie e da corpo estraneo per i materiali sintetici e uno scarso controllo e un'elevata variabilità delle proprietà biochimiche per la matrice extracellulare di derivazione biologica. Esempio di scaffold ibrido è rappresentato

dall'unione di acido lattico-co-glicolico con sottomucosa del piccolo intestino di derivazione porcina per la produzione di tessuto osseo bioingegnerizzato (46).

1.3.3 IL CONCETTO DI SCAFFOLD IDEALE

Lo scaffold che rappresenti un ideale supporto per la coltura delle cellule deve essere in grado di soddisfare peculiari caratteristiche e proprietà, le quali teoricamente sono al contempo tutte necessarie e difficili da ordinare secondo una scala di importanza.

Innanzitutto deve consentire una crescita cellulare rapida e uniforme. Per soddisfare tale requisito è preferibile che lo scaffold presenti una struttura porosa che permetta alle cellule in crescita di colonizzare efficacemente tutto il volume disponibile all'interno del supporto, e al tempo stesso garantire un adeguato trasporto di ossigeno e nutrienti. Inoltre, dal momento che in molti costrutti bioingegnerizzati vengono impiantate cellule staminali la cui differenziazione deve essere indirizzata verso un determinato fenotipo, è stato proposto di incorporare all'interno dello scaffold citochine o fattori di crescita a rilascio programmato. In questo senso è stato sperimentato l'utilizzo di scaffold contenenti EGF (epidermal growth factor)(47), TGF (transforming growth factor)(48) e b-FGF (basic fibroblast growth factor)(49).

Lo scaffold deve riprodurre il più possibile l'ultrastruttura della matrice extracellulare del tessuto desiderato, infatti da tempo è stato dimostrato che le interconnessioni tra le cellule e le componenti della matrice sono fondamentali non soltanto in termini di supporto meccanico ma anche per esercitare un'influenza diretta sull'attività delle cellule, regolandone la crescita (50), l'adesione (51), la corretta differenziazione (52) e addirittura controllando i meccanismi di apoptosi. (53) Il costrutto deve inoltre presentare una bassa immunogenicità. È noto da tempo infatti che l'organismo può reagire all'impianto di un qualsiasi materiale esogeno con manifestazioni diverse: infiammazione acuta, infiammazione cronica e reazione da corpo estraneo granulomatosa (54). Tali fenomeni potrebbero causare una riduzione della biocompatibilità, che è definita come la capacità di un biomateriale di interfacciarsi in maniera appropriata con il sistema immunitario dell'organismo ricevente. Lo scaffold ideale dovrebbe inoltre, nella fase successiva all'impianto, conservare nel tempo le sue caratteristiche biomeccaniche e strutturali. Parimenti sono stati studiati scaffold sintetici costituiti da materiali assorbibili, ove si

verifica una progressiva sostituzione da parte del tessuto ospite che in tal caso ricorda il più possibile le caratteristiche e le proprietà originarie del tessuto da ricostruire. La fase di degradazione iniziale può condurre ad un indebolimento strutturale, limite talvolta di questi scaffold, che successivamente viene generalmente però compensato da un rimodellamento tissutale grazie alla colonizzazione con cellule del ricevente, come ad esempio gli scaffold ottenuti da matrice extracellulare di sottomucosa intestinale (55). Il risultato finale desiderabile in questo caso sarà pertanto la sostituzione dello scaffold con un tessuto di derivazione autologa (56,57). Tutti questi esempi sono basati su strutture tissutali relativamente semplici che non abbiano bisogno di un elevato apporto vascolare, il quale, come detto, è ancora il grande limite dei tessuti bioingegnerizzati in particolare per quanto concerne forma dimensioni e caratteristiche funzionali. Il mancato superamento di questo limite ha fatto sì che i costrutti o gli scaffold bioingegnerizzati commercializzati finora siano necessariamente di spessore limitato, tale che possa sopravvivere attraverso i soli fenomeni di imbibizione dal letto ricevente fin quando non ne avviene una efficace integrazione con il letto vascolare dell'ospite, parimenti ai semplici innesti della chirurgia ricostruttiva. Un passo ulteriore per lo scaffold ideale è la soluzione della rete vascolare preformata attraverso l'inserimento di fattori di crescita pro-angiogenetici al suo interno, in grado di guidare e facilitare la connessione vascolare con il ricevente (59,60). Più complesso ma al tempo stesso di maggiore efficacia la possibilità di eseguire anastomosi con i vasi del letto del ricevente al momento dell'impianto, analogamente a quanto oggi avviene per i lembi microvascolari.

1.3.4 GLI SCAFFOLDS DECELLULARIZZATI

Scaffold biologici derivati da tessuti decellularizzati sono già stati ampiamente sperimentati in studi pre-clinici su animali e clinici sull'uomo. Tra questi ricordiamo il consolidato utilizzo dell'AlloDerm®, uno scaffold derivato da derma umano decellularizzato, nel campo della chirurgia plastica ricostruttiva, per il trattamento ad esempio di perdite di sostanza con esposizione della teca cranica o nelle ricostruzioni mammarie (60,61).

Vi sono inoltre scaffold di derivazione xenologa attualmente già impiegati nella pratica clinica, come ad esempio lo Strattice®, prodotto derivato da derma porcino sottoposto a decellularizzazione e impiegato in riparazioni chirurgiche dei tessuti molli e difetti di parete tra i quali ricostruzioni della parete toracica, ricostruzioni mammarie, ernioplastiche (62,63).

Il processo di decellularizzazione dal quale si ottengono questi tipi di scaffold consistono nella rimozione delle cellule e dei loro componenti, al contempo senza danneggiare eccessivamente la matrice extracellulare (ECM), sede della attività biologica e delle proprietà biomeccaniche del tessuto, di modo che, una volta seminata con cellule staminali, possa garantire un microambiente ideale per la crescita cellulare.

La specie di origine, il tipo cellulare prevalente e la quantità di tessuto prelevato influenzano la scelta del protocollo di decellularizzazione utilizzato, inoltre ciascuna variabile dei possibili metodi impiegati nella decellularizzazione influirà sull'ultrastruttura della matrice extracellulare al termine del processo. Numerosi metodi di decellularizzazione sono stati descritti e convalidati in letteratura scientifica e a tutt'oggi non ne esistono di univoci o totalmente ideali e la ricerca prosegue attivamente anche in tale ambito. Solitamente consistono in una combinazione di trattamenti fisici, chimici e enzimatici: durante le prime fasi si cerca di ottenere la rottura delle membrane cellulari in modo da poter successivamente liberare i componenti intracellulari, che verranno poi separati, disgregati, e allontanati dalla matrice mediante detergenti e soluzioni enzimatiche; le ultime fasi sono invece rivolte all'eliminazione dei detriti cellulari rimasti all'interno della matrice e ai residui dei reagenti impiegati nel processo di decellularizzazione che potrebbero interferire con la successiva ricellularizzazione dello scaffold o causare reazioni avverse nell'organismo ricevente (64).

Un esempio di trattamento fisico impiegato con successo nelle procedure di decellularizzazione sono i cicli congelamento/scongelo rapidi che inducono rottura delle membrane cellulari, e sono stati applicati ad esempio nella decellularizzazione del tessuto tendineo (65) e del tessuto nervoso (66). Alternativamente si può ricorrere all'applicazione di forze meccaniche (67) oppure all'agitazione del materiale da decellularizzare in combinazione con detergenti chimici in modo da rimuovere efficacemente i detriti cellulari prodotti dalla lisi delle membrane (68).

Per quanto riguarda i trattamenti chimici si ricorda invece l'utilizzo di soluzioni acide o alcaline che vengono impiegate per decellularizzare sottili strati di campioni tissutali come la sottomucosa vescicale(64). Questo tipo di trattamento è efficace nel rimuovere i detriti cellulari e al tempo stesso presenta un'azione nociva verso microrganismi che potrebbero contaminare il campione tissutale (69,70) ma è stato riportato anche che potrebbe intaccare la struttura della matrice provocando il distacco dei GAG dalle fibre collagene (64). Altra categoria di agenti chimici solitamente impiegati sono i detergenti ionici, dotati di efficacia nel rimuovere i frammenti citoplasmatici e nucleari ma tendono anche a denaturare le proteine della matrice, influenzando negativamente le interazioni proteina-proteina. In alternativa è possibile far ricorso a detergenti non ionici che hanno un'azione meno aggressiva sulla matrice extracellulare e sulle interazioni tra proteine, ma dall'altro lato alcuni studi hanno riportato una efficacia non sufficiente nel rimuovere il materiale cellulare (71). Sempre nell'ambito dei trattamenti chimici annoverano l'utilizzo di soluzioni fortemente ipotoniche o ipertoniche in grado di lisare le membrane cellulari (72).

Nei protocolli di decellularizzazione vengono utilizzati anche agenti chelanti come l'EDTA, in grado di legare ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} . Si è visto infatti che questi ioni mediano il legame tra cellule e componenti della matrice come collagene e fibronectina, il loro sequestro pertanto facilita la rimozione del materiale cellulare (73,74,75). L'utilizzo di soluzioni enzimatiche è una pratica consolidata nei processi di decellularizzazione. Tra gli enzimi maggiormente impiegati si ricorda la tripsina, la quale svolge una funzione specifica nel clivare i legami proteici ed esercita la sua massima attività ad una temperatura di 37 °C e pH 8. Oltre alla tripsina si utilizzano spesso anche le endonucleasi e le ribonucleasi che catalizzano l'idrolisi dei legami covalenti presenti nelle catene degli acidi nucleici (76,77). È tuttavia raccomandato non eccedere con l'esposizione dei campioni tissutali all'azione delle soluzioni enzimatiche in quanto sono state riportate

alterazioni nella struttura della matrice extracellulare per esposizioni troppo prolungate (78). Trovano largo impiego in tutti i processi di decellularizzazione gli antibiotici e gli antimicotici, non per il processo di decellularizzazione in sé, ma per prevenire una contaminazione da parte di agenti batterici o fungini; vengono inoltre impiegati inibitori delle proteasi come il fenilmetilsulfonilfluoride (PMSF), il cui utilizzo è dovuto alla necessità di neutralizzare l'azione delle proteasi liberate durante la lisi cellulare, le quali potrebbero alterare l'ultrastruttura della matrice extracellulare (79).

Il razionale alla base dell'utilizzo dei processi di decellularizzazione risiede nel fatto che tessuti xenogenici e allogenici sono immunogeni per definizione, e questa capacità di attivazione del sistema immunitario del ricevente è scatenata soprattutto dalle componenti antigeniche cellulari come recettori di superficie, proteine citoplasmatiche e acidi nucleici.

Al contrario i componenti della matrice extracellulare sono ampiamente conservati tra individui della stessa specie e addirittura tra individui di specie diverse, e pertanto essendo meno immunogeni non innescano una violenta reazione immunitaria di rigetto. Tuttavia alcuni studi hanno dimostrato la presenza, almeno a livello istologico, di una reazione da parte del ricevente di bassa intensità(80). A rimarcare ulteriormente questa problematica si ricorda che sono stati segnalati casi di importanti reazioni di rigetto successivamente all'impianto di protesi valvolari di derivazione porcina, ed in particolare alle fibre collagene in esse contenute, in pazienti pediatriche (81) e che pertanto sarà utile anche in futuro indagare più approfonditamente i meccanismi coinvolti nell'immunogenicità dei tessuti bioingegnerizzati. L'aspetto fondamentale che ha portato alla rivalutazione dell'uso dei tessuti decellularizzati come scaffold, è basato sulla capacità del microambiente extracellulare di indurre e indirizzare il processo differenziativo e replicativo delle cellule staminali garantendo in tal modo la colonizzazione dello scaffold. La matrice extracellulare non va inquadrata semplicemente come una struttura in grado di fornire solo supporto meccanico e sostegno per organi e tessuti ma deve essere considerata come una componente attiva che contribuisce al mantenimento dell'omeostasi tissutale. Il comportamento biologico delle cellule può infatti essere influenzato sia da interazioni dirette cellula-matrice che da macromolecole e proteine immagazzinate all'interno della matrice, in primis citochine e fattori di crescita.

Partendo da tale concetto si può comprendere come esista una sostanziale differenza tra scaffold biosintetici composti da singolo componente, come ad esempio scaffold a base di collagene (82), e scaffold composti da matrice extracellulare intatta (83). Questi ultimi, comprendendo tutte le molecole strutturali e funzionali prodotte dalle cellule originarie, dovrebbero riprodurre con maggior fedeltà il microambiente strutturale e biochimico e dovrebbero pertanto esplicare con maggiore efficacia le funzioni proprie della matrice extracellulare nel supportare la crescita cellulare e indirizzare la differenziazione in senso voluto.

La decellularizzazione si è pertanto rivelata un aspetto chiave nella complessa ricerca dello scaffold ideale e della bioingegneria dei tessuti, divenendo il principale campo di studi e conducendo anche a complessi tentativi sperimentali come quello di decellularizzare un organo intero. Infatti, attraverso la perfusione coronarica e l'immersione diretta in particolari detergenti, è stato ottenuto un cuore di ratto decellularizzato e successivamente ricellularizzato con cellule cardiache neonatali della stessa specie (84).

1.4LA MATRICE EXTRACELLULARE

La base che permette allo scaffold decellularizzato di assolvere alle sue funzioni di impalcatura ideale per la rigenerazione tissutale è costituita dalla preservazione della matrice extracellulare (ECM). Con tale termine si è soliti indicare i componenti extracellulari che circondano le cellule dei tessuti connettivi e di sostegno. È generalmente costituito in proporzione variabile a seconda della sede da fibre strutturali insolubili, in prevalenza collagene e fibre elastiche, da una componente amorfa idrofilica e da glicoproteine adesive che mediano il contatto tra cellule e matrice. Le fibre collagene appresentano una componente molto abbondante nella matrice extracellulare e costituiscono la proteina maggiormente rappresentata nei mammiferi. Le molecole di collagene sono dotate di una forte resistenza alla trazione (punto di rottura circa 40kg/mm²) mentre sono scarsamente estensibili per cui saranno presenti in maggior quantità in tessuti sottoposti a violente sollecitazioni meccaniche come tendini e ligamenti.

L'unità di base delle fibre collagene è la molecola di tropocollagene, a sua volta formata da tre catene polipeptidiche elementari avvolte a tripla elica ricche in residui di prolina, glicina e idrossiprolina.

Oltre a conferire resistenza meccanica ai tessuti le fibre collagene sono anche coinvolte nella complessa rete di interazioni tra cellula e matrice extracellulare. In particolare è stato dimostrato che il collagene presenta delle sequenze aminoacidiche che si legano con elevata affinità a particolari tipi di integrine mediando l'adesione e la migrazione cellulare, così come hanno dimostrato un'elevata affinità di legame con il collagene anche le glicoproteine di derivazione piastrinica. Per questi motivi, oltre che per la sua presenza all'interno degli scaffold decellularizzati, il collagene è stato ampiamente utilizzato in bioingegneria tissutale, da solo, per la preparazione di scaffold biologici (85) grazie alla sua capacità di conferire resistenza meccanica al costrutto bioingegnerizzato e di mediare funzioni biologiche della cellula quali adesione, proliferazione e differenziazione (86). Per tali applicazioni il collagene può essere facilmente isolato da diverse specie, tra le quali il più comune è il collagene bovino (87), alternativamente è disponibile collagene porcino (88) e collagene umano ricombinante (89).

Le fibre elastiche sono invece fortemente estensibili (fino a 1,5 volte la loro lunghezza) e chimicamente le fibre di elastina risultano essere ricche di prolina, glicina e aminoacidi idrofobici da cui deriva la loro elevata insolubilità (90). Queste proprietà unite ad una elevata stabilità della molecola e alla capacità di auto assemblaggio in condizioni fisiologiche (91) hanno portato a considerare l'elastina come un possibile biomateriale per l'ingegneria tissutale, anche se uno dei maggiori inconvenienti si è rivelato essere una sua facile tendenza alla calcificazione (92).

La funzione principale della matrice extracellulare è quella di fornire sostegno meccanico ai tessuti e di costituire una sorta di filtro per macromolecole strutturali, ioni e sostanze nutritive esercitando in tal modo anche una funzione trofica.

Pertanto si è rivelato più vantaggioso utilizzare come scaffold la stessa ECM di un determinato tessuto piuttosto che singole componenti quali collagene o fibre elastiche. L'ECM infatti è in grado di mediare processi complessi quali l'adesione, la proliferazione e la differenziazione cellulare comportandosi ora da recettore, ora da ligando nella complicata rete di interazioni cellula-matrice che si traduce in specifiche trasduzioni di segnali intracellulari. Questa funzione è nota da tempo ed è stata confermata da numerosi

studi presenti in letteratura che hanno evidenziato come l'interazione cellula-matrice intervenga in molti processi atti a regolare l'omeostasi dei tessuti (93).

Al fine di dimostrare e comprendere il rapporto che lega cellule e matrice extracellulare sono state analizzate in dettaglio alcune di queste complesse interazioni.

Le integrine sono la famiglia di proteine transmembrana maggiormente studiate nei processi di interazione con la matrice. È stato dimostrato che le integrine sono in grado di trasdurre segnali all'interno della cellula dopo aver interagito con il proprio ligando extracellulare regolando in questo modo il comportamento cellulare in dipendenza dell'ambiente extracellulare (94,95). Ad esempio si è scoperto che un particolare tipo di integrina, la $\alpha 1\beta 1$, tendenzialmente legata alle fibre collagene è in grado di influenzare la proliferazione dei fibroblasti in vitro (96). Un'altra dimostrazione del ruolo svolto dalle integrine nelle interazioni cellula-matrice proviene da uno studio in cui il legame dell'integrina $\alpha 6\beta 4$ e la laminina-332 inibisce la differenziazione dei cheratinociti (97).

Esistono anche altre molecole in grado di mediare le interazioni cellula-matrice tra le quali le più note sono i sindecani (98) e un recettore transmembrana denominato CD44 (99).

Un altro meccanismo tramite il quale la matrice è in grado di influenzare il comportamento biologico delle cellule circostanti è la regolazione dell'attività biologica e della concentrazione localizzata di citochine e fattori di crescita attraverso il loro sequestro e rilascio programmato oppure proteggendoli da una precoce degradazione da parte di enzimi proteolitici (100,101). In alcuni casi addirittura il legame di alcuni componenti della matrice con le cellule è in grado di influenzare la sintesi da parte di questi ultimi di mediatori cellulari e citochine, ne è un esempio la capacità di incrementare la produzione di TNF α da parte dei neutrofili in seguito al legame con la fibronectina (102).

2. LA PARETE ADDOMINALE

2.1 CENNI DI ANATOMIA

La parete addominale è costituita da tre strati, uno peritoneale interno, uno muscolare intermedio ed uno cutaneo esterno. Nella sua porzione laterale i muscoli che contribuiscono, con la loro sovrapposizione, a rinforzarla sono tre. Nella zona mediana invece il muscolo è unico, robusto, ricoperto della propria aponeurosi e posteriormente dalla fascia trasversale (**Fig.2**) :

Muscolo obliquo esterno. È quello più superficiale. Inserito sul margine delle ultime otto coste si allarga a ventaglio, verso il basso. La sua aponeurosi si incrocia medialmente con quella dell'omonimo muscolo dell'altro lato contribuendo a formare, dopo aver circondato il muscolo retto, la linea alba; inferiormente termina sul pube e sull'arcata femorale.

Muscolo obliquo interno. Parte dalla cresta iliaca e allargandosi a ventaglio verso l'alto si inserisce sulle ultime coste e medialmente sulla linea alba.

Muscolo trasverso dell'addome. È quello posto più internamente. Le sue fibre con un decorso orizzontale partono dalle ultime sei coste e vanno a terminare con una larga aponevrosi (che contribuisce alla formazione della linea alba) sul muscolo retto.

Muscolo retto dell'addome. Nasce dal processo ensiforme dello sterno e dalla cartilagine costale V-VII andando a inserirsi alla cresta pubica. Le sue fibre hanno un decorso verticale. Il ventre muscolare presenta quattro iscrizioni tendinee trasversali.

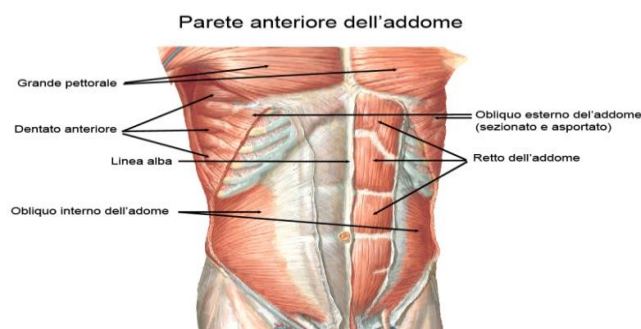


Fig.2 Muscoli anterolaterali

I muscoli delle pareti anterolaterali dell'addome si presentano sotto forma di lamine avvolte da fasce superficiali e profonde che ne costituiscono gli organi accessori:

- Fascia sopra il muscolo obliquo esterno;
- Fascia tra il muscolo obliquo esterno e il muscolo obliquo interno; Fascia tra muscolo obliquo interno e muscolo trasverso;
- Fascia trasversale
- Guaina dei muscoli retti

Le prime due non hanno consistenza di rilievo, le più importanti dal punto di vista anatomico-fisiopatologico sono la fascia trasversale e la guaina dei retti.

La fascia trasversale si trova profondamente al muscolo trasverso e ha forma quadrangolare, una superficie esterna, una interna e quattro margini. E' sottile al di sopra dell'ombelico e si ispessisce via via che discende. Il margine inferiore si fissa al tubercolo pubico, alla cresta pettinea, al margine posteriore del legamento inguinale, alla fascia iliaca, alla spina iliaca anteriore superiore ed al labbro interno della cresta iliaca.

Il tratto di fascia trasversale che si attacca alla cresta pettinea chiude dorsalmente quella parte della lacuna dei vasi che è compresa tra il legamento lacunare e la vena femorale prendendo il nome di setto femorale.

La superficie esterna è in rapporto con la faccia profonda del m. trasverso, la superficie interna è in rapporto con lo strato sottoperitoneale e inferiormente delimita in avanti lo spazio prevescicale.

La guaina dei retti è formata dalle aponeurosi dei muscoli obliquo esterno, obliquo interno e trasverso. Si distinguono nella guaina un foglietto anteriore, un foglietto posteriore. L'aponeurosi del muscolo obliquo esterno passa davanti al muscolo retto, dal processo xifoideo al pube e raggiunge così la linea mediana dove i suoi fasci si incrociano con quelli controlaterali nella linea alba; essa contribuisce dunque a formare il foglietto anteriore della guaina. L'aponeurosi del muscolo obliquo interno si divide, a livello del margine laterale del muscolo retto, in due lamine. Una passa davanti al muscolo e si unisce all'aponeurosi del muscolo obliquo esterno, formando con essa il foglietto anteriore della guaina; l'altra decorre dietro al muscolo entrando nella costituzione del foglietto posteriore della guaina. Tale dispositivo bilaminare dell'aponeurosi del muscolo

obliquo interno si osserva solo nei 3/5 superiori del muscolo retto; nella parte inferiore tutta l'aponeurosi si pone davanti al muscolo. L'aponeurosi del muscolo trasverso passa, nei 3/5 superiori, dietro al muscolo retto e si unisce alla lamina posteriore dell'aponeurosi del muscolo obliquo interno formando il foglietto posteriore della guaina; nei 2/5 inferiori del muscolo essa passa, invece, davanti al muscolo retto e si unisce all'aponeurosi dei muscoli obliquo interno e obliquo esterno come parte del foglietto anteriore della guaina.

2.2. VASCOLARIZZAZIONE ED INNERVAZIONE

La parete dell'addome risulta riccamente vascolarizzata e a seconda del muscolo interessato possiamo riassumere l'apporto ematico secondo il seguente schema :

- Retto dell'addome: è irrorato principalmente dalle arterie epigastriche superiori ed inferiori. L'a. epigastrica inferiore tende ad avere un calibro maggiore. Piccoli rami terminali delle ultime tre arterie lombari posteriori e l'arteria circonflessa profonda possono fornire un certo contributo soprattutto per i margini laterali e per le inserzioni situate più in basso, fornendo piccole anastomosi con i rami laterali delle epigastriche.
- Muscolo obliquo esterno: è irrorato da rami delle ultime arterie intercostali posteriori, dall'arteria sottocostale, dalle arterie epigastriche superiore e inferiore, dalle arterie circonflesse superficiali e profonde, nonché dalle arterie lombari posteriori.
- Muscolo obliquo interno: è irrorato dai rami delle ultime arterie intercostali posteriori, dall'arteria sottocostale, dalle arterie epigastriche superiore e inferiore, dalle arterie circonflesse superficiale e profonde e dalle arterie lombari posteriori.
- Muscolo trasverso: è irrorato da rami delle arterie lombari, dalla arteria circonflessa e da rami dell'iliaca e della mammaria interna

L'apporto ematico della parete addominale può essere altresì compreso nella sua costituzione mediante una classificazione che distingue un asse vascolare mediano ed un asse laterale.

- L'asse vascolare mediano si forma per anastomosi fra l'a. epigastrica superiore e inferiore. L'epigastrica superiore deriva dalla mammaria interna, attraversa la guaina del m. retto passando dietro la settima cartilagine costale e si divide in un ramo superficiale e profondo. L'epigastrica inferiore origina dall'a. iliaca esterna, nel punto medio della regione inguinale e si dirige in alto decorrendo lungo il margine del m. retto, si divide anch'essa in un ramo superficiale e un ramo profondo.
- L'asse vascolare laterale è formato dall'anastomosi dell'A muscolo-frenica che deriva dalla a. mammaria interna e l'a. circonflessa profonda che deriva dall'a. iliaca esterna.
L'addome inferiore nella sua parte superficiale è irrorato è irrorato dall'art. epigastrica inferiore e dalla pudenda esterna che è un ramo collaterale della iliaca interna

Il drenaggio venoso della parete addominale è costituito da una serie di vasi tra loro riccamente anastomizzati che decorrono , a livello sottocutaneo, fin dalla sottile fascia addominale superficiale ove di particolare rilievo sono le vene paraombelicali che circondano l'ombelico e si anastomizzano con le vene epigastriche superficiali e toracoepigastriche. La vena epigastrica superficiale accompagna l'omonimo vaso arterioso e raggiunge , attraverso lo iato safeno, la vena femorale. La vena toracoepigastrica si dirige dall'ombelico in alto e lateralmente verso la vena ascellare. Nella guaina dei retti decorrono le vene epigastriche inferiori che , al di sopra dell'ombelico, si anastomizzano con le epigastriche superiori (**Fig. 3a**).

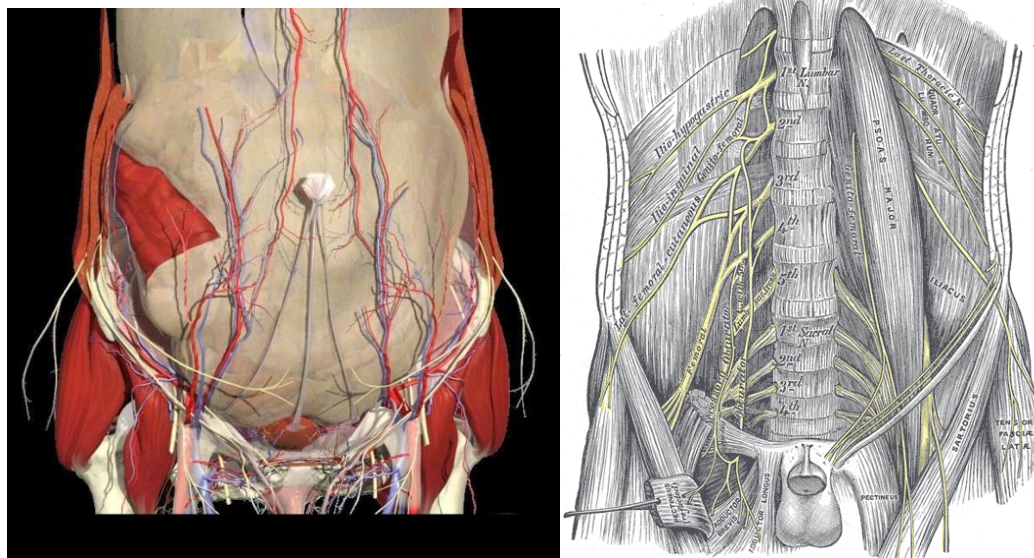
Alla innervazione della parete addominale, piuttosto complessa, contribuiscono numerosi nervi intercostali, rami dei nervi ileo ipogastrico ed ileo inguinale e di alcuni nervi genitali (**Fig. 3b**). Il percorso è in genere parallelo alle fibre muscolari. In particolare l'innervazione dei principali gruppi muscolari della parete addominale è così suddivisibile :

Muscolo obliquo esterno : nervi intercostali (T5-T12)

Muscolo obliquo interno : nervi intercostali (T10-T12)

Muscolo Trasverso dell'addome : nervi intercostali (T7-T12) e L1

Muscolo Retto dell'addome : nervi intercostali (T5-T12)



a

b

Fig 3 : a) Vascolarizzazione ed b) innervazione della parete addominale (da : “ Atlas of 3D images e Gray’s Anatomy).

2.3 FISIOPATOLOGIA

Il ruolo fisiologico svolto dalle strutture della parete addominale, è innanzitutto costituito dal contenimento e protezione degli organi addominali, altresì interviene nel mantenimento dell'equilibrio cardiorespiratorio e in quello della postura, collegando funzionalmente il torace con il bacino. La sua integrità e il suo corretto funzionamento consentono di mantenere la funzione di sostegno della colonna vertebrale, di prevenire la patologia dolorosa dorsale, di esercitare un'attività respiratoria distribuita tra cassa toracica e diaframma e mantenere in sede gli organi intestinali garantendone al tempo stesso protezione e corretto funzionamento.

La patologia a carico di questo distretto corporeo può essere suddivisa in :

- Ptosì cutanea e dermo-adiposa;
- Ernie delle parete;

- Laparoceli

Frequentemente le due ultime forme possono presentarsi come associate.

2.3.1 ERNIE ADDOMINALI

L'ernia è la fuoriuscita di un viscere o di una parte di esso dalla cavità naturale che normalmente lo contiene, attraverso un'area anatomica di minore resistenza che prende il nome di porta erniaria; può insorgere in vari distretti. Si possono distinguere ernie congenite o acquisite; le prime sono determinate da fattori costituzionali quali la ritardata chiusura dell'anello ombelicale o una sua abnorme lassità. L'ernia ha in genere dimensioni ridotte e si associa quasi sempre a diastasi dei muscoli retti. L'ernia ombelicale acquisita si trova al terzo posto come frequenza, dopo quella inguinale e crurale, tra le ernie dell'adulto. Può avere dimensioni variabili ed il suo contenuto è costituito soprattutto da epiploon ed anse del tenue. Si riscontra soprattutto tra le pluripare, negli obesi o in seguito a versamento di imponenti quantità di liquido in cavità addominale come nel caso dell'ascite. La patogenesi della forma acquisita ha, in comune con la forma congenita, la lassità fisiologica dell'anello ombelicale, la diastasi dei muscoli retti e l'incontinenza della linea alba.

2.3.2 LAPAROCELI ED EVISCERAZIONE

Il laparocelo è la protrusione di un viscere o di una parte di esso attraverso un orificio acquisito che si forma nelle strutture di sostegno della parete addominale. Può avere dimensioni variabili da piccolo a molto grande. Possiamo distinguere laparoceli di origine iatrogena o traumatica. I primi sono sempre conseguenza di un intervento chirurgico in sede addominale (laparotomie) e sono indipendenti dal tipo e dalla sede di incisione. La maggiore frequenza di interventi chirurgici nell'arco di età compresa tra i 30 ed i 60 anni, fa sì che in tale fascia sia maggiore l'incidenza di laparoceli così come i più frequenti interventi addominali nel sesso femminile come i tagli cesarei e le isterectomie determinano una maggiore esposizione di questo sesso a tale evenienza patologica. Sono altresì fattori che concorrono, all'interno degli esiti chirurgici, alla formazione di un laparocelo: l'infezione della ferita operatoria, l'obesità e la concomitanza di malattie

sistemiche o altri fattori esogeni che determinino una alterazione dei processi di cicatrizzazione.

Per quanto riguarda i laparoceli traumatici, essi possono presentarsi come semplici, con contusione addominale, rottura sottocutanea della parete con integrità della cute (come accade negli incidenti stradali con arrotamento) oppure complessi, con effrazione della parete in tutto il suo spessore e possibile perdita di sostanza (eviscerazione). Eviscerazione viene pertanto considerata l'esteriorizzazione di uno o più visceri attraverso la ferita sino a quadri comprendenti l'intero intestino, il fegato, la milza. Si tratta di quadri emergenti con elevato rischio per la vita del paziente. L'algoritmo di trattamento di queste condizioni, infatti, deve tenere conto in prima istanza della stabilizzazione del paziente in termini di parametri vitali e riparazione delle lesioni di maggior rilievo, ai fini di salvaguardarne la sopravvivenza rimandando ad un secondo tempo eventuale iter ricostruttivo.

2.4 CHIRURGIA DELLA PARETE ADDOMINALE

La chirurgia che interessa le patologie congenite o acquisite della parete addominale è diversificata a seconda della patologia stessa e delle sue caratteristiche. Negli anni sono state proposte tipologie di intervento svariate, con utilizzo anche di materiali di sintesi, biologici o bioingegneristici sino alla proposizione del trapianto di parete addominale. Possiamo pertanto distinguere sulle basi di queste considerazioni tra una chirurgia di tipo riparativo ed una di tipo ricostruttivo, che rappresentano i due gruppi tradizionali, ai quali si sono sommati negli ultimi anni la cosiddetta chirurgia rigenerativa e la trapiantologia.

2.4.1 CHIRURGIA RIPARATIVA

Per chirurgia riparativa si intendono quelle manovre atte a ripristinare la continuità e la funzionalità della parete addominale mediante riparazione diretta o con uso di materiali delle lesioni accertate. Nel caso della terapia delle ernie ombelicali il trattamento consiste nell'exeresi dell'area peri-ombelicale in eccesso, nella asportazione del sacco erniario , dopo riduzione del suo contenuto, nella conseguente legatura della porta erniaria e nella riparazione della parete. Quest'ultima potrà avvenire mediante raffia della fascia e dei muscoli (plicatura) o , in caso di eccessiva tensione o indebolimento degli stessi, con impiego di innesti o impianti che possano supplire all'assenza di continuità della parete. Come innesti si possono ricordare quelli di fascia lata o di derma; come impianti si impiegano reti sufficientemente rigide ma flessibili , dalle più tradizionali in materiale alloplastico (nylon, silicone, teflon, polipropilene) a quelle di più recente introduzione in materiali bioingegnerizzati (es. derma porcino decellularizzato). La chirurgia riparativa può costituire altresì l'approccio necessario in urgenza ai fini di limitare perdite ematiche, elettrolitiche o di contenuto enterale, creando la necessaria contenzione endoaddominale deferendo a fasi successive la necessaria ricostruzione.

2.4.2 CHIRURGIA RICOSTRUTTIVA

Lesioni complesse con perdite a tutto spessore della parete addominale, spesso estese, come nel caso di eviscerazioni traumatiche, ampie asportazioni neoplastiche o ampi laparoceli necessitano di approcci ricostruttivi. Nei casi in cui vi sia perdita di sostanza o il tessuto presente non sia più in grado di adempiere al suo compito di sostegno del contenuto addominale, la ricostruzione può essere attuata o con lembi muscolo-aponeurotici di scorrimento o di trasposizione o con impianti o innesti, entrambe le tecniche sono sovrapponibili. Qualora vi sia anche una perdita cutanea tale da impedire l'accostamento dei margini si ricorre a lembi cutanei o mio-cutanei.

In particolare i principali problemi clinici che richiedono la ricostruzione della parete addominale sono :

- Resezione di tumori
- Infezioni – Fascite necrotizzante

- Traumi
- Ernie ricorrenti
- Difetti congeniti (Gastroschisi e onfalocele)

I principi fondamentali della ricostruzione della parete addominale includono :

- 1- Protezione e copertura dei visceri intraddominali
- 2- Riparazione e prevenzione della formazione di ernia con un supporto fasciale forte
- 3- Il raggiungimento di un' accettabile superficie di contorno.

La chiusura primaria , che consiste nel riavvicinamento della linea alba senza tensione, è l'obiettivo ideale, tuttavia questo non accade nelle lesioni maggiori per anatomia sovvertita, pregressi interventi e importante perdita tissutale. L'algoritmo ricostruttivo varia dall'impiego di reti o innesti sino al trasferimento di lembi liberi e viene deciso in base alla situazione clinica locale e generale del paziente e sulle necessità ricostruttive. Nel trattamento in acuto di una deiscenza della parete addominale che non può essere chiusa, può essere applicato un innesto cutaneo a tutto spessore posto direttamente sui visceri esposti o sopra una rete sintetica o assorbibile. Questo metodo viene utilizzato solo in emergenza e determina una grossa ernia ventrale che richiederà una ricostruzione futura. In alternativa sono state proposte in urgenza procedure con impiego di sistemi a pressione negativa in grado di gestire l'edema, favorire la granulazione sopra i visceri e diminuire la tensione in prospettiva anche di una chiusura primaria (103).

I metodi di ricostruzione di ernie della parete addominale che fanno affidamento sui tessuti locali, includono la separazione dei componenti, il rilascio con incisione fasciale e l'espansione dei tessuti. Il metodo di separazione dei componenti consiste nella mobilizzazione e nell'avanzamento di strati separati di muscolatura della parete addominale per chiudere l'addome sulla linea mediana. Specificatamente, il muscolo retto addominale è avanzato medialmente, con l'obliquo dell'addome interno e trasverso al margine laterale della guaina del retto, lasciando l'obliquo esterno indebolito nella sua posizione originale. La quantità di avanzamento mediale di questi strati, dopo la dissezione unilaterale, è stimata in 3-5 cm, nell'epigastrio, 7-10 cm, all'ombelico e 1-3 cm nella regione sovrapubica. L'espansione della parete addominale richiede il posizionamento di espansori tissutali nel piano tra i muscoli addominali obliquo interno e trasverso per l'espansione della parete addominale. Questa tecnica non è stata molto usata; tuttavia i vantaggi teorici consistono nella creazione di un muscolo autonomo ed

innervato e di tessuto molle per la chiusura dei difetti della parete addominale anteriore. Gli svantaggi dell'espansione tissutale sono il tempo lungo del trattamento, il rischio di infezione e il rischio di denervazione del muscolo retto addominale dovuto alla dissezione della parte laterale della guaina del retto addominale. Le tecniche che si basano sulla separazione del muscolo e su strati fasciali della parete addominale, inclusa l'espansione tissutale, non sono applicabili quando vi siano state multiple procedure precedenti che coinvolgevano stomie e siti di drenaggio che distorcono e distruggono i piani anatomici. Lembi muscolari e lembi liberi sono usati per la ricostruzione della parete addominale quando è controindicata la rete sintetica e quando il residuo di parete addominale è inadatto alla separazione fasciale ed all'avanzamento mediale. I lembi di rotazione muscolari e muscolocutanei più frequentemente impiegati sono il tensore della fascia lata e il retto femorale, che hanno entrambi un sicuro peduncolo vascolare dall'arteria laterale femorale circonflessa. I lembi muscolari del gracile e del vasto laterale sono la seconda scelta per la parete addominale anteriore. Al tensore della fascia lata, a lungo considerato il lembo più versatile, si è sostituito negli ultimi anni il lembo anterolaterale di coscia (ALT) peduncolato (104). Per i grossi difetti e in assenza di valide alternative peduncolate possono essere allestiti lembi liberi per la ricostruzione addominale (105)

2.4.3 CHIRURGIA RIGENERATIVA

Il termine chirurgia rigenerativa è stato coniato per descrivere quelle procedure, anche in più fasi, che facciano ricorso a supporti tecnologici, biologici o bioingegneristici con lo scopo di determinare la guarigione di una lesione mediante stimolo e cooperazione con le residue capacità rigenerative del nostro organismo. Lo scopo è quello di pilotare una guarigione quanto più ordinata e fisiologica possibile limitando al tempo stesso il ricorso a tessuti autologhi con il susseguente danno secondario, tanto più in quei casi ove non sia possibile farlo per le condizioni generali del paziente o per l'indisponibilità dei distretti solitamente deputati a queste ricostruzioni.

A titolo esemplificativo possiamo citare come considerate metodiche di chirurgia rigenerativa l'uso di :

- Tessuti biologici omologhi o xenologhi (fascia lata, pericardio) : capacità immunogene minime, possono venire integrate nel tessuto di granulazione

fornendo al tempo stesso una protezione dei visceri assimilabile alle reti sintetiche (Fig.4)

- Tessuti bioingegnerizzati : di derivazione xenologa sono strutture quali il derma decellularizzato (Alloderm[®], Strattice[®]) che fungono da scaffold per guidare una neovascolarizzazione ordinata divenendo biointegrati e con capacità di mediare una adeguata risposta alle infezioni a differenza dei mesh sintetici.
- Sostituti dermici : capacità di formare un neoderma previa vascolarizzazione dai margini su cui è possibile applicare un innesto cutaneo. Ne sono esempi quelli costituiti da collagene bovino e condroitin 6-solfato ricoperti di una lamina siliconica (Integra[®]).
- Dispositivi a pressione negativa : applicati quando non è possibile, soprattutto in urgenza, una chiusura diretta o una ricostruzione ed è necessario contenere i visceri, le perdite idroelettriche bilanciare le forze addominali, rimuovere essudati o materiali estranei in ferite molto contaminate, offrendo al contempo la possibilità di indurre un tessuto di granulazione deterso e vitale su cui attuare le successive scelte ricostruttive.

In letteratura viene riportata la possibilità di ricostruire , in fasi multiple, una grave lesione addominale da arma da fuoco in un paziente anziano mediante l'impiego di tutte queste metodiche (106) . Qualora , infatti, non vi siano possibilità per una ricostruzione classica a causa di fattori quali l'età e le condizioni generali del paziente, una possibilità terapeutica alternativa può essere rappresentata da queste tecniche rigenerative. (**Fig 5**)



Fig 4 : Ricostruzione della parete mediante pericardio omologo



Fig 5 : Grave lesione da arma di fuoco in paziente anziano. Ricostruzione raggiunta in fasi multiple con uso di fascia lata omologa, pressione negativa, sostituti dermici ed innesti.

2.4.4 IL TRAPIANTO DI PARETE ADDOMINALE

L'ultima frontiera riportata da diversi autori nell'ambito della ricostruzione della parete addominale è rappresentata dal trapianto stesso di parete (107,108). Negli ultimi decenni la trapiantologia ha fatto enormi progressi tecnici e nelle terapie immunosoppressive e pertanto sono stati proposti interventi di trapianto sempre più complessi e particolari, da

quelli di arti, al volto, alla parete addominale stessa. Ad oggi questa tecnica viene riservata solo come complemento ai trapianti multiviscerali ove è necessario ausilio per ridurre la contenzione alla cavità addominale, in particolar modo laddove i tessuti non siano sufficienti (**Fig. 6**). In questi pazienti la necessaria terapia immunosoppressiva per il trapianto d'organo sarà al contempo in grado di evitare il rigetto anche della parete addominale. Il trasferimento avviene mediante prelievo in blocco della parete addominale in tutte le sue componenti basate sui peduncoli epigastrici da donatore e trasferimento microchirurgico sui medesimi vasi del ricevente. I limiti di questa procedura pionieristica sono rappresentati soprattutto dall'assenza di innervazione del trapianto per cui la muscolatura andrà incontro a processi di atrofia e perdita del proprio tono e pertanto del sostegno fisiologico agli organi intraddominali dei quali diverrà solo una barriera biologica protettiva e, inoltre, dal precario stato di questi pazienti e dalle difficoltà e possibili complicazioni insiti in un trapianto multiviscerale. La sopravvivenza di questi pazienti è, infatti, ancora oggi molto limitata e questo pone interrogativi sul trapianto di parete. Nondimeno la ricerca nel campo dei lembi decellularizzati potrebbe offrire una nuova via a questa procedura.



Fig 6 : Trapianto di parete addominale da cadavere

3. SCOPO DELLA TESI

L'organismo umano presenta limitate capacità rigenerative e nel caso in cui i suoi tessuti vengano danneggiati esso mette in atto dei processi riparativi, attraverso i quali non è però in grado di rigenerare il tessuto danneggiato. La capacità rigenerativa propria di specie minori, come la salamandra, è stata infatti persa durante il processo evolutivo, ed il tentativo di riparazione esiterà inevitabilmente in un processo cicatriziale, con una possibile perdita funzionale del distretto corporeo colpito e con eventuali ulteriori ripercussioni a livello estetico, psicologico e sociale.

La bioingegneria tissutale si pone come obiettivo quello di bypassare questo limite fisiologico intrinseco della natura umana offrendo soluzioni alternative per potenziare e favorire le limitate capacità rigenerative, stimolando l'organismo a condurre il processo riparativo verso una *restituito ad integrum* piuttosto che un esito cicatriziale. Queste soluzioni, secondo gli indirizzi più recenti dell'ingegneria tissutale, comprendono la possibilità di fornire in vivo un'impalcatura precostituita su cui è possibile una ricrescita cellulare in vivo: è questo il caso ad esempio dei sostituti dermici o delle reti decellularizzate, meglio se adjuvati con fattori di crescita tissutali. L'alternativa, più complessa, è quella di allestire in laboratorio dei tessuti bioingegnerizzati o addirittura organi interi che possano andare a sostituire quelli danneggiati. Il limite maggiore incontrato nella ricerca di tali sostituti è stata la necessità di garantire immediato supporto vascolare in vivo al tessuto bioingegnerizzato per permetterne la sopravvivenza fino all'integrazione, fattore che ha ostacolato la produzione di un costrutto tridimensionale di notevoli dimensioni. Attualmente il nutrimento dei tessuti impiantati in vivo è assicurato efficacemente soltanto attraverso l'imbibizione da parte del letto vascolare dell'organismo ricevente.

Per risolvere questo problema è possibile cercare di stimolare un processo angiogenetico da parte dell'organismo ricevente. Questo approccio non risolve però l'inconveniente di richiedere tempi prolungati. In alternativa vi è la possibilità di progettare un tessuto bioingegnerizzato con una struttura microvascolare già preformata: in altre parole fornire uno scaffold alle cellule, in vitro o in vivo contenente al suo interno dei canali vascolari

già presenti che permettano l'instaurarsi immediato di una microcircolazione efficace ad assicurare il nutrimento delle cellule.

Tra i vari tipi di scaffold descritti in letteratura, ampio spazio è stato dedicato a quelli composti da matrice extracellulare intatta ottenuta attraverso un processo di decellularizzazione di tessuti omologhi o xenologhi tra i quali ad esempio derma, valvole cardiache e tendine. Rispetto agli scaffold sintetici, di composizione più semplice, hanno come razionale la capacità della matrice extracellulare integra di influenzare il comportamento biologico cellulare, in particolare crescita e differenziamento attraverso una complessa rete di interazioni cellula-matrice, limitando la necessità di intervento esterno con fattori di crescita.

Lo scopo di questo studio è stato inizialmente valutare la possibilità di produrre uno scaffold di matrice extracellulare integra con rete vascolare preformata basato su di un lembo di parete addominale prelevato da un animale donatore e trasferito microchirurgicamente su di un ricevente, dopo averne aumentato la capacità di biointegrazione con cellule staminali del ricevente. Il lavoro ha poi condotto sin'ora alla decellularizzazione della parete muscolare e suo trasferimento in vivo ad un ricevente. Alla base dell'idea di utilizzare la parete addominale come modello di lembo vi è l'esperienza basata sul trapianto della stessa nei casi di ricostruzione di parete addominale in concomitanza con trapianto multiviscerale. Ad oggi infatti questa tecnica è possibile solo in questi casi ove è già necessaria una copertura immunosoppressiva. La possibilità di avere un lembo decellularizzato in grado di integrarsi nel ricevente come tessuto autologo da un lato aprirebbe alla possibilità del suo impiego in tutti gli ambiti di ricostruzioni addominali complesse e , nel contempo, la metodica consentirebbe di ottenere molteplici lembi liberi omo-autologhi da impiegare nei più disparati ambiti della chirurgia plastica.

Si suppone che sottoponendo il tessuto muscolare ad un appropriato processo di decellularizzazione, eliminando così la componente cellulare e conservando il più possibile l'ultrastruttura della matrice, sia possibile ottenere uno scaffold tridimensionale che conservi una fitta rete di canali vascolari. Assieme al suo asse vascolare potrebbe venire rivascolarizzato in vivo consentendone la completa sopravvivenza; più semplicemente il tessuto muscolare decellularizzato potrebbe egualmente integrarsi e riparare perdite di sostanza della parete. In entrambi i casi il potenziale di biointegrazione

sarebbe favorito seminandovi in vitro cellule staminali autologhe del ricevente ottenute da lipoaspirato (ADSC). Tali cellule , in vivo, potrebbero da un lato svilupparsi su linee cellulari in grado di favorire la miogenesi e l'angiogenesi e , nel contempo, accelerare l'homing di simili cellule circolanti.

4. MATERIALI E METODI

Il presente studio è stato approvato dal Comitato Etico della nostra Università, dal Ministero della Salute, conformemente alla legislazione in vigore (D.Lgs.116/1992) e secondo i principi della Dichiarazione di Helsinki sugli studi riguardanti gli animali. Tutte le procedure sperimentali su animale sono state condotte presso il nostro centro accreditato di Chirurgia Sperimentale.

Gli animali sottoposti alla presente fase sperimentale sono stati complessivamente 12, all'interno di un protocollo approvato complessivamente per 60 individui. La specie che è stata da noi prescelta è il coniglio adulto (*Oryctolagus cuniculus*) ceppo "New Zealand White", di sesso maschile e peso medio compreso tra 2200 e 3300 grammi (**Fig. 7**). Gli animali sono stati sistemati nello stabulario del centro di Chirurgia Sperimentale, in gabbie adeguate secondo normativa, con sufficiente cibo, idratazione e toilette da parte del personale e controlli veterinari settimanali. Gli animali sono stati divisi in due gruppi randomizzati di 6 e il lavoro ha contemplato diverse fasi dovute alla necessità di ottimizzare il modello della ricerca e le procedure di decellularizzazione.

Dapprima si è provveduto al prelievo, sotto microscopio operatorio, di lembi di parete addominale con il proprio asse vascolare inviati per protocollo di decellularizzazione (**Fig. 8**); successivamente si è provveduto al prelievo di un lembo semplicemente muscolare (**Fig. 9**), di vasi iliaci (**Fig.10**), per eseguirne separatamente il processo di decellularizzazione e prelievi di omento per conoscerne la cellularità e poterne desumere il potenziale di cellule staminali derivate dal tessuto adiposo (ADSC) (**Fig. 11**).

Tutte le fasi sperimentali sono state supportate da valutazioni istologiche mediante tre diverse colorazioni (ematossilina-eosina, Azan Mallory e van Gieson) e valutate mediante microscopio elettronico a diversi ingrandimenti (5x,10x,40x), allo scopo di valutare in modo qualitativo strutture tissutali differenti, come si precisa nei risultati. Relativamente ai campioni sopra descritti il lavoro è proseguito con l'impianto in vivo del lembo di parete muscolare decellularizzato e privato di connessioni vascolari dopo averne accertato istologicamente la buona riuscita della fase di decellularizzazione (**Fig.12**).

Per quanto riguarda l'esperimento di impianto in vivo sono state eseguite :

- Valutazione ecografica in vivo e sotto anestesia mediante sonda ecografica 8 Mhz portatile (Modello M-Turbo, SonoSite Inc. – USA) (**Fig.13**)
- Prelievo dell'impianto e di tessuto limitrofo dopo sacrificio ed invio per esame istologico (**Fig. 14**)

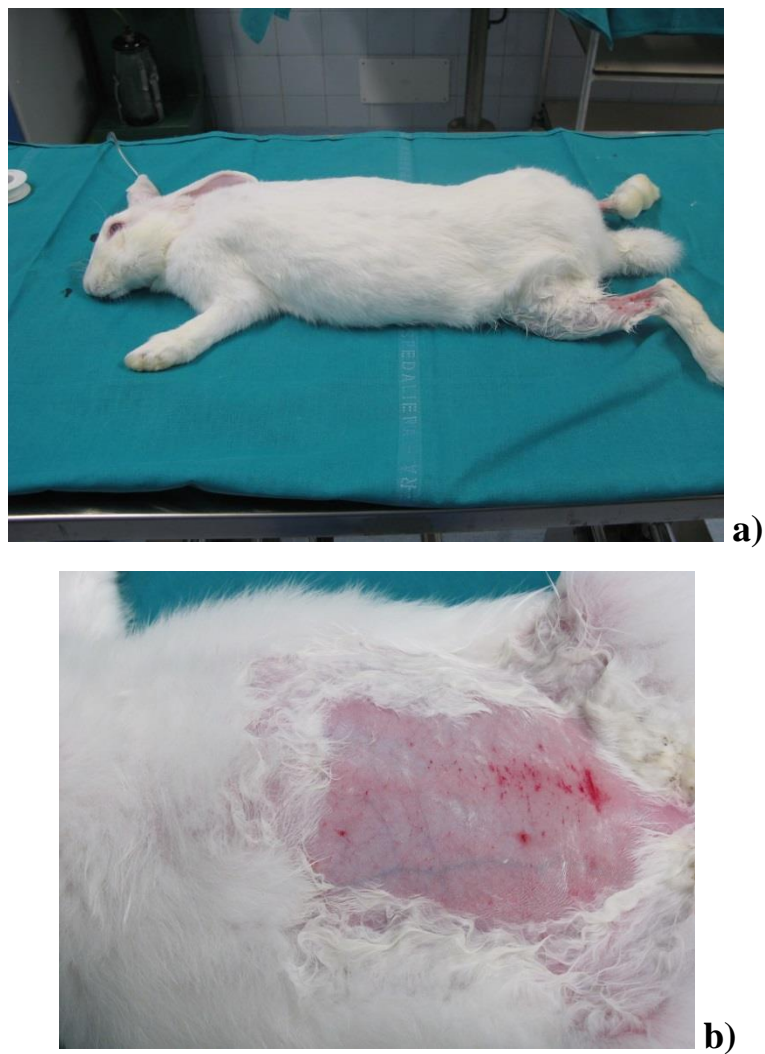
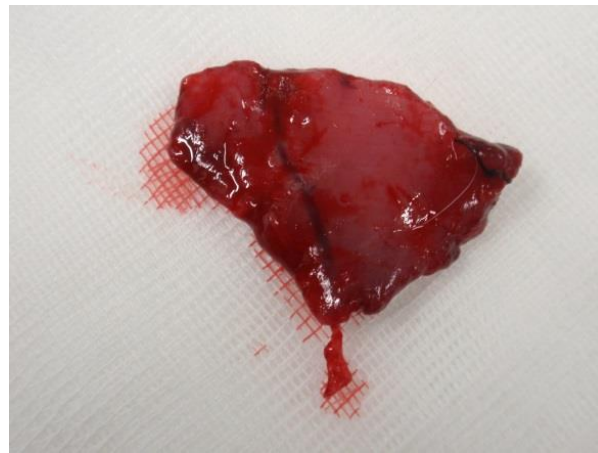


Fig. 7 : Animale dopo anestesia iniettiva nella fase pre-operatoria a) e preparazione del sito chirurgico b)



a)



b)

Fig. 8 : Lembi muscolari di parete con asse vascolare. a) lembo muscolare con asse basato sui vasi epigastrici superficiali e parte dei femorali b) lembo più grande basato sugli epigastrici inferiori e parte degli iliaci esterni. Prelievi *ex vivo*.



Fig. 9 : Lembo muscolare senza asse vascolare (presenti vasi intramuscolari).
 Prelievo *post exitus*.



Fig. 10: Singoli prelievi di strutture vascolari : vena iliaca esterna (V), arteria iliaca esterna (A), peduncolo femorale (AV-F). Conservazione in sol fisiologica in sterilità.

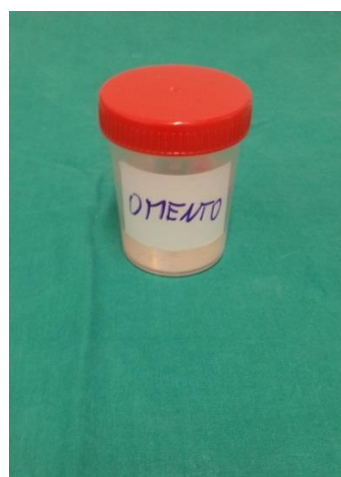


Fig. 11: Prelievo di omento Conservazione in sol fisiologica in sterilità

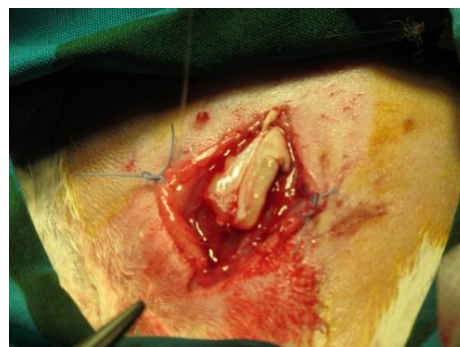


Fig. 12: Breccia addominale con erniazione dei visceri. Riparo

mediante lembo muscolare decellularizzato e suturato alla parete circostante, in tensione.



Fig. 13: Esecuzione esame ecografico della parete addominale sotto anestesia nell'animale ricevente l'impianto muscolare decellularizzato a 3 settimane..

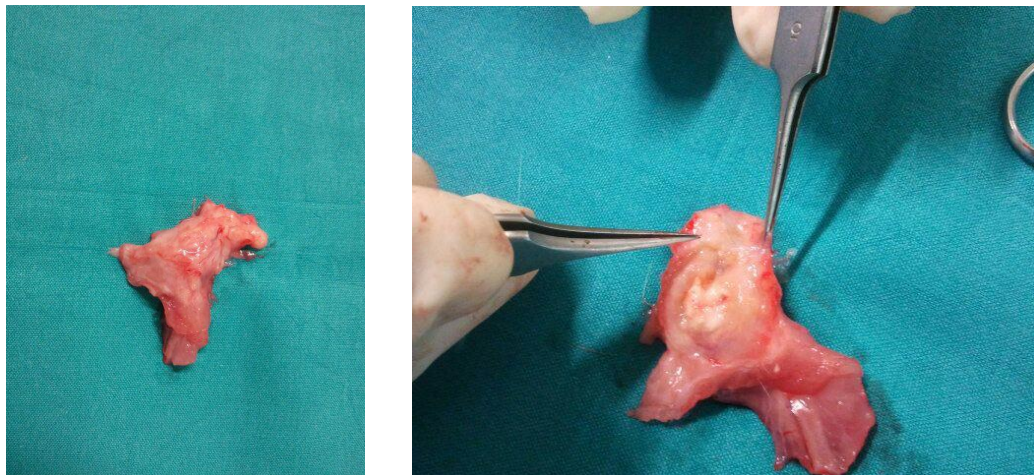


Fig. 14: Prelievo dell'impianto addominale , dopo sacrificio, a 3 settimane. Visione fronte e retro; successivo invio per congelamento ed analisi istologiche.

4.1 PRELIEVO MICROCHIRURGICO DEL LEMBO

L'animale veniva sottoposto ad una anestesia intramuscolare mediante 0,6 ml/kg di tiletamina cloridrato e zolazepam a livello dorso-lombare; reperito accesso venoso ove veniva somministrata soluzione fisiologica, l'anestesia generale veniva mantenuta durante l'intervento mediante inalazione in maschera di isoflurano (**Fig.15**). I parametri e lo stato di anestesia erano monitorati dal personale mediante controllo delle escursioni respiratorie, risposta agli stimoli dolorosi e riflessi corneali. Si procedeva altresì ad anestesia loco-regionale mediante lidocaina al 1% sottocutanea, al sito di incisione. Negli animali che dovevano sopravvivere all'esperimento veniva somministrata a scopo di profilassi antibiotica la dose di 5 mg/kg di enrofloxacin al momento dell'induzione anestetologica, mantenuta successivamente per ulteriori 7 giorni. A questi animali veniva successivamente somministrato, al termine della procedura chirurgica, la dose di 5 mg/kg di tramadolo, a scopo antalgico, ripetuto due volte nelle successive 48 ore. Il lembo veniva disegnato prima della preparazione del campo operatori, dopo tricotomia dell'area chirurgica (**Fig. 16**). Una volta che l'anestesia era ritenuta soddisfacente, si eseguiva la procedura chirurgica in campo sterile ove entrambi gli inguini e la regione addominale erano stati lavati con soluzione di clorexidina e disinfettati con betadine alcolico (**Fig. 17**). Un'incisione obliqua di 5 cm veniva praticata a livello inguino-femorale e successivamente estesa prossimalmente, comprendendo i limiti del lembo addominale. Visualizzato il pannicolo adiposo sottocutaneo nella regione femorale si procedeva alla dissezione del lembo con l'ausilio di microscopio operatorio (Carl Zeiss Inc., OPM1) e di strumentazione microchirurgica. In alcune dissezioni si isolavano accuratamente i vasi femorali per quasi tutta la loro lunghezza, si isolava e si disseca il peduncolo epigastrico che veniva seguito sino all'area di vascolarizzazione, che veniva asportata nella sua porzione muscolare, assieme al peduncolo vascolare comprendente i vasi femorali dopo legatura delle branche collaterali. Una variante, che ha permesso il prelievo di lembi di maggiori dimensioni, era basata sulla dissezione oltre il ligamento inguinale, isolando il peduncolo iliaco esterno ed i rami epigastrici inferiori con asportazione di ampie porzioni di retto femorale basato su questo asse. Infine si sono prelevate porzioni di retto privandolo del peduncolo vascolare principale.

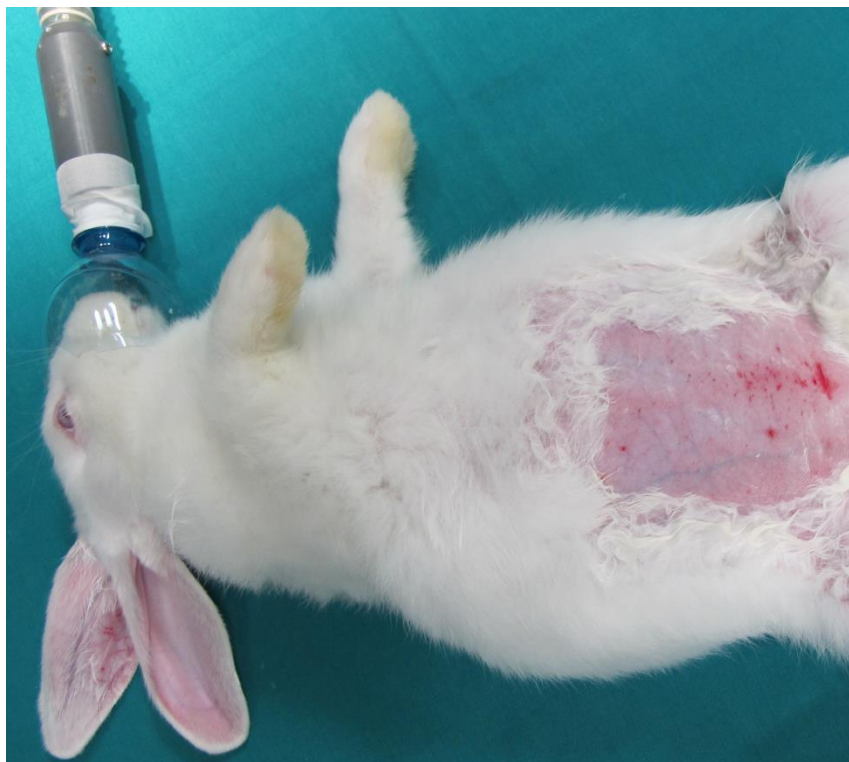


Fig. 15 : Anestesia generale mantenuta per inalazione di isoflurano



Fig. 16 : Disegno preoperatorio del lembo e degli assi vascolari



Fig. 17: Campo sterile ed esposizione dei retti dell'addome.

4.2 PROTOCOLLI DI DECELLULARIZZAZIONE

4.2.1 DECELLULARIZZAZIONE MUSCOLARE

I lembi muscolari, con o senza peduncolo vascolare venivano inviati immediatamente in soluzione fisiologica e in contenitori sterili, per iniziare la procedura di decellularizzazione.

I campioni venivano poi conservati in PBS (Buffer fosfato salino)/ BSA (albumina bovina) 20 mg/ml, filtrati sotto cappa con filtro da 0,20 μm di diametro per mantenere un pH costante, addizionato con una soluzione antibiotica ed antimicotica (ABAM) al 1% per evitare contaminazione batterica e fungina, assieme a PMSF 1% , sostanza che evita la degradazione della matrice extracellulare da parte delle proteasi (**Fig. 19**).

I campioni erano congelati a -80 C e sottoposti successivamente al taglio e alla decellularizzazione secondo il protocollo riportato nella **Tab.1**. Il seguente protocollo deriva ,ed è stato adattato, da quanto pubblicato in letteratura (109) . Rappresenta una

procedura di tipo chimico, enzimatico e meccanico di complessivi 7 giorni totalmente innovativa.

Al termine della procedura tutti i campioni venivano inclusi e poi sottoposti alle colorazioni : ematossilina-eosina, Azan – Mallory e Van Gieson.

Inizialmente i primi campioni che sono stati valutati erano stati ottenuti mediante metodiche pubblicate in letteratura scientifica, dimostrando tuttavia una eccessiva persistenza cellulare e , pertanto, previ test multipli , si è ottenuto il risultato giudicato istologicamente migliore. I lembi muscolari di maggiori dimensioni, assieme al loro asse vascolare, risultano a tutt'oggi congelati e sono in attesa di essere sottoposti a questa medesima procedura. Il lembo muscolare decellularizzato impiegato per l'impianto in vivo è stato mantenuto in PBS ed antibiotico a 4 C prima del suo trasferimento.

Procedimenti	Durata
<input type="checkbox"/> acqua distillata a 4°C	2 giorni
<input type="checkbox"/> tripsina+EDTA	1 ora
<input type="checkbox"/> DMEM	12 ore
<input type="checkbox"/> Triton X-100	5 giorni
<input type="checkbox"/> lavaggio in acqua	2 giorni
<input type="checkbox"/> lavaggio in PBS	1 giorno

Tab 1 : Nostro protocollo di decellularizzazione del tessuto addominale muscolare di coniglio.

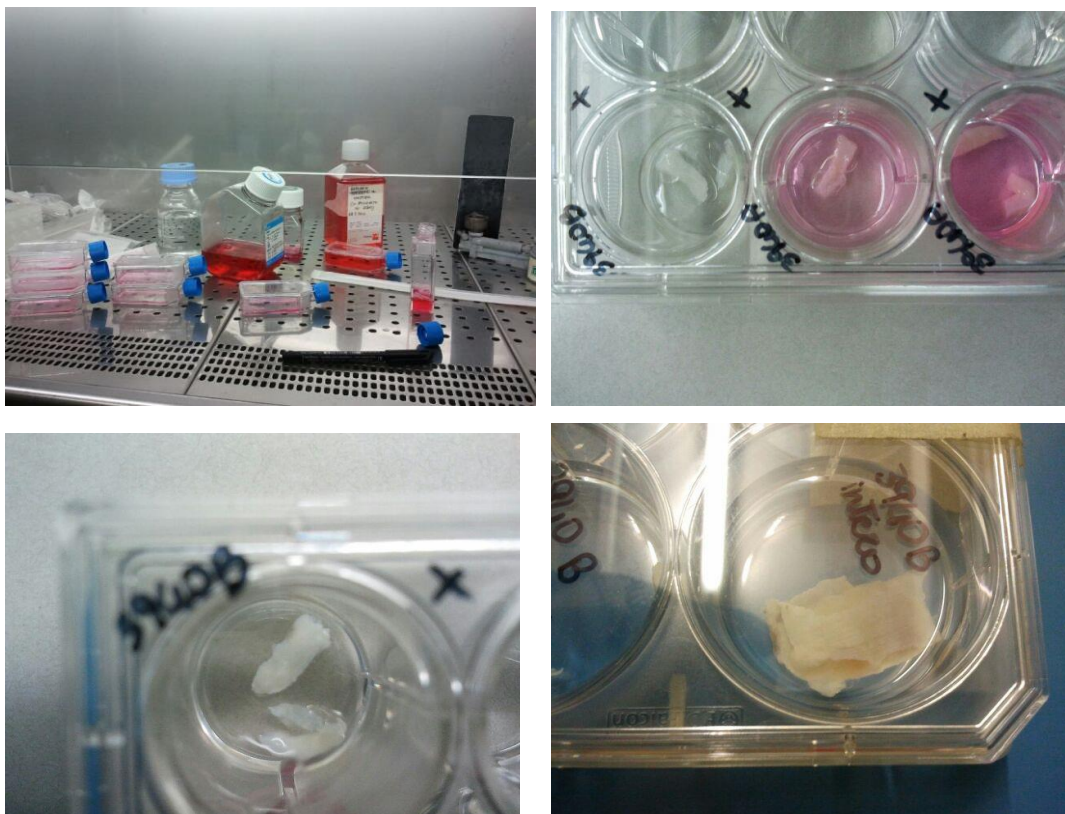


Fig. 19 : Fasi successive del processo di decellularizzazione. Allestimento sotto cappa sterile, inizio delle procedure, frammenti e campione intero decellularizzati.

4.2.2 DECELLULARIZZAZIONE VASCOLARE

L'ottenimento di uno scaffold e , ancor più, di un lembo perfettamente biocompatibile con il ricevente necessita di una adeguata struttura vascolare. La microstruttura vascolare, rappresentata dalla presenza e dall'aspetto conservato dei capillari muscolari , è istologicamente documentata. Tuttavia la possibilità di ottenere un lembo microchirurgicamente anastomizzabile rappresenta il punto chiave per la creazione di strutture omo-autologhe. Non è stato ancora stabilito a livello di laboratorio se la struttura dei macrovasi, una volta sottoposti a decellularizzazione, rimane soddisfacente per essere rianastomizzata e se tale procedura risulta equiparabile a quella che si esegue su un vaso normale. Nondimeno , dovendo sottoporre il vaso allo stesso tempo alla procedura impiegata per il muscolo , si deve valutare se questo risponda adeguatamente. In letteratura è stato recentemente riportato, infatti, un protocollo di decellularizzazione

creato appositamente per strutture vascolari Arterie e vene ombelicali umane), , ove si dimostra che la capacità tensile è proporzionale allo spessore del vaso e , nel complesso, rimane simile a quella del vaso nativo (110). Pertanto stiamo attualmente sperimentando , su singole strutture vascolari tale protocollo, considerandone l'efficacia, isolatamente, in considerazione della possibilità di ottenere uno scaffold vascolare tridimensionale dai notevoli risvolti di tipo chirurgico clinico (**Tab. 2**). Valuteremo la compatibilità con la decellularizzazione muscolare ponendosi per l'ottenimento di un complesso bitissutale .

Procedimenti	Momento e durata
○ Sodio dodecil solfato 1% in centrifuga a 100 rpm	1 giorno
○ Lavaggio in acqua distillata	1 giorno
○ Lavaggio in etanolo 75%	1 giorno
○ Lavaggio in acqua distillata	1 ora
○ Sterilizzazione con acido paracetico	2 ore
○ Lavaggio in PBS	1 giorno

Tab 2 : Protocollo di decellularizzazione del tessuto vascolare

5. RISULTATI

5.1 ISTOLOGIA

5.1.1 MUSCOLO DECELLULARIZZATO

Lo studio del processo di decellularizzazione è stato eseguito mediante osservazione microscopica di preparati istologici sottoposti a diverse colorazioni specifiche, sia nella fase immediatamente successiva all'espanto, durante le varie procedure del protocollo al fine di valutarne l'efficacia e successivamente alla procedura di impianto in vivo. In letteratura sono riportate altresì valutazioni quantitative del DNA per stimare la perdita di cellularità rispetto al tessuto nativo (111). Nel nostro studio sono stati allestiti preparati istologici mediante tre differenti colorazioni, osservati al microscopio operatorio a diversi ingrandimenti. L'ematossilina-eosina è stata usata come colorazione di base per dimostrare la presenza di una componente cellulare all'interno del campione, eventualmente distinguere morfologicamente i differenti tipi di cellule presenti, e valutarne la struttura istologica generale. La Azan-Mallory per evidenziare la matrice extracellulare: colora intensamente in blu le fibre collagene ed al tempo stesso distingue la matrice dalla componente cellulare nucleare (color rosso intenso) e citoplasmatica (color rosso pallido). Infine la colorazione di Van Gieson è stata impiegata per evidenziare selettivamente le fibre elastiche, la cui presenza e struttura è un indice qualitativo importante in merito al processo di decellularizzazione in quanto la massima preservazione è indice indiretto di una buona tollerabilità al processo e, pertanto, anche le fini e preziose ultrastutture di membrana della ECM, che fanno da guida nei processi di biointegrazione, possono essere considerate parimenti integre e funzionali.

Il muscolo retto addominale dei lembi prelevati è stato, pertanto, valutato dapprima con colorazioni in ematossilina-eosina (**Fig. 20**) che mostrano la presenza di nuclei cellulari, vasi sanguigni e l'ordinata distribuzione delle fibre muscolari. e mediante colorazioni Azan-Mallory (**Fig. 21**) che evidenziano la ricca e ramificata ECM, zone di intensa

presenza nucleare e le aree citoplasmatiche , organizzate nella distribuzione classica della struttura muscolare.

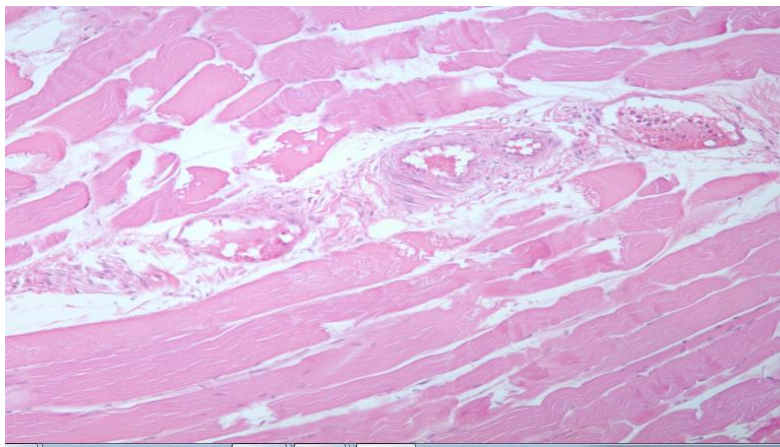


Fig 20 : Colorazione in ematossilina-eosina di parte di lembo addominale, si nota la presenza di nuclei cellulari, vasi e l'ordinata distribuzione longitudinale delle fibre muscolari. Ingrandimento 10X.

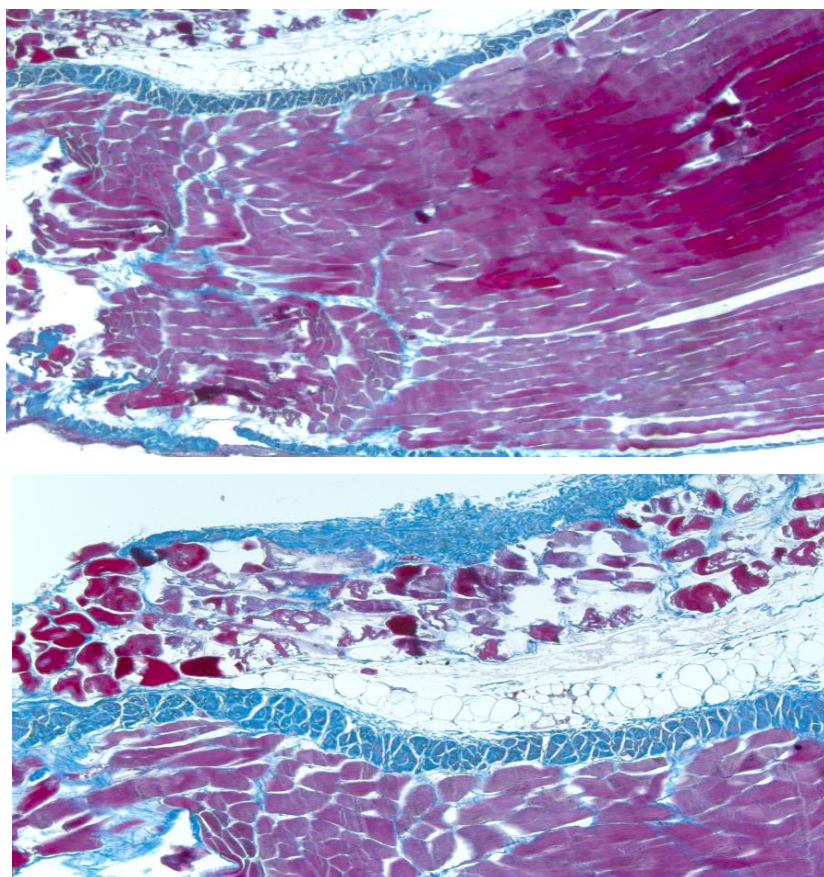


Fig 21 : Colorazione Azan-Mallory di parte di lembo addominale, si nota in blu la ECM e densità cellulare a minor ingrandimento. Ingrandimento 2,5X e 5X.

Il protocollo di decellularizzazione muscolare è stato adattato da protocolli pubblicati in letteratura scientifica, in base ai quali erano risultati eccessivamente presenti nuclei cellulari e fibre muscolari residue, risultando inadatti alle nostre esigenze. Alla fine il processo da noi realizzato, più lento e meno aggressivo, ha permesso di ottenere un quadro confrontabile con quanto precedentemente pubblicato da diversi Autori, fornendo nel contempo un modello compatibile al trasferimento in vivo senza il rischio di scatenare eccessive risposte immunitarie.

Dal punto di vista macroscopico il campione muscolare sottoposto a processo di decellularizzazione subisce una serie di alterazioni, fino a diventare alla settima giornata una struttura bianco-opalescente, di consistenza paragonabile al lembo originario (**Fig. 22**).

L'analisi istologica dei frammenti prelevati dallo scaffold muscolare decellularizzato prescelto per il successivo impianto su animale omologo ricevente ha messo in evidenza, nella colorazione con ematossilina-eosina la totale scomparsa di elementi nucleari, la preservazione discreta di fibre elastiche, la distribuzione ordinata dei residui elastico-connettivali delle fibre muscolari e una sostanziale disidratazione (**Fig. 23**).

La colorazione Azan-Mallory mette in evidenza la preservazione della ECM pressochè paragonabile all'originale e dell'ultrastruttura stessa della medesima a livello vasale (**Fig. 24**).

Infine la colorazione di Van Gieson permette di dimostrare la persistenza di carattere strutturalmente ben composto delle fibre elastiche sino a quelle vascolari, dimostrando un processo di decellularizzazione rispettoso dell'architettura di base della parete muscolare addominale (**Fig. 25**).



Fig. 22 : Scaffold muscolare decellularizzato pronto all'impianto in vivo. Di colore bianco opalescente è di spessore e consistenza paragonabile al campione originale.

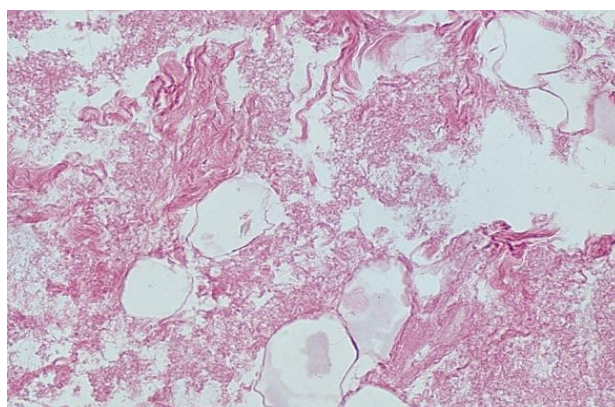
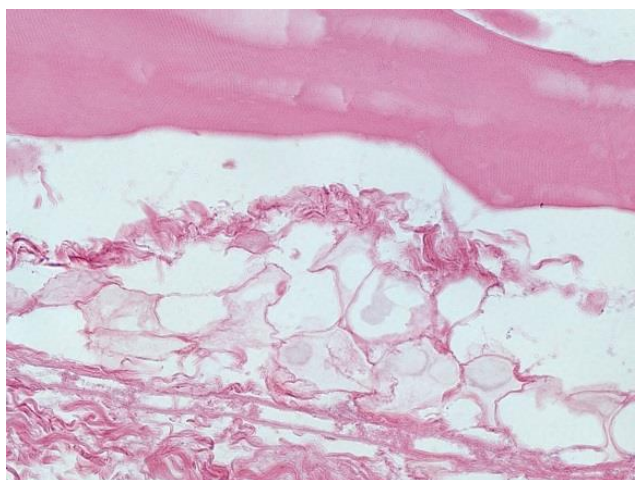
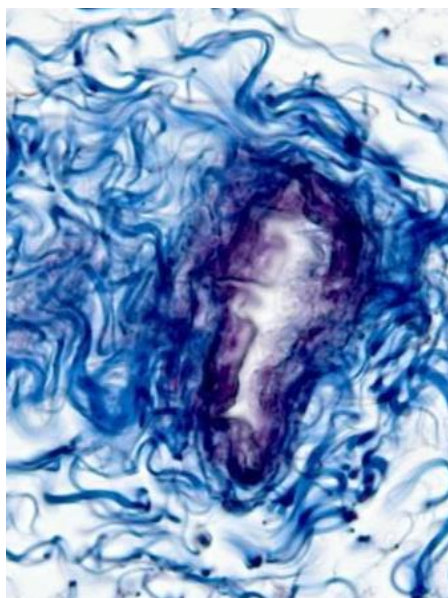


Fig. 23 : Colorazione in ematossilina.eosina. Scomparsa dei nuclei cellulari, disidratazione, persistenza profili ordinati di ECM e fibre elastiche. Ingrandimento 40X.



a)



b)

Fig. 24 : Colorazione Azan – Mallory. Preservazione ECM, paragonabile all'originale sia nel tessuto (a) che nell'ultrastruttura vascolare (b). Ingrandimenti 10X e 40X.

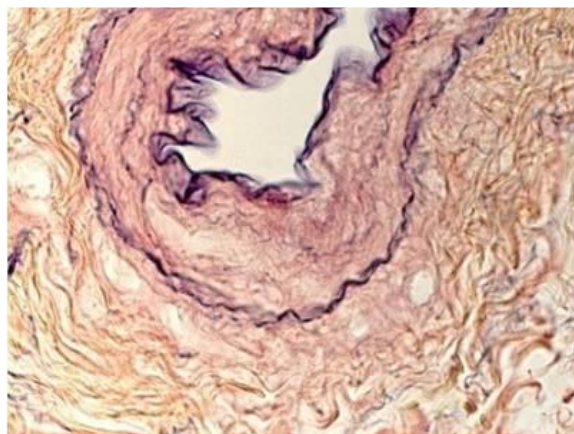


Fig 25 : Colorazione Van Gieson. Conservazione ordinata fibre elastiche, in particolare nel contesto delle pareti vascolari . Ingrandimento 40X.

5.1.2 MUSCOLO POST TRASFERIMENTO

Lo scaffold muscolare ottenuto dal processo di decellularizzazione sopra descritto è stato trasferito , rimanendo in PBS ed antibiotico a 4 C dopo scongelamento graduale e controllato a temperatura ambiente, su di un animale ricevente riparando una perdita di sostanza muscolare con erniazione dei visceri addominali. Nella fase post-operatoria l'animale è stato quotidianamente osservato per 3 settimane, ove si è mosso liberamente, si è nutrito regolarmente , senza dimostrare disfunzioni digestive e senza presentare segni di rigetto. A 3 settimane si eseguiva sacrificio dell'animale e prelievo dell'impianto, assieme a tessuto muscolare originale limitrofo. Macroscopicamente l'impianto si presentava con aspetto roseo, simile al contesto muscolare originale, sanguinante e continuo. Una porzione appariva ancora di aspetto perlaceo, morbida e inglobata in una sorta di tessuto lasso senza evidenza di raccolte infette o di flogosi (**Fig. 26**).

Al esame istologico microscopico si evidenziava :

Alla colorazione in ematossilina-eosina:

- Presenza di reazione infiammatoria di tipo granulomatoso solo in alcuni punti, in assenza di abbondanti infiltrati flogistici con distruzione cellulare (infezione/rigetto) , probabilmente raccolti nelle aree di sutura (filo riassorbibile Monosyn ancora presente all'espianto (**Fig. 27**).
- Presenza di nuclei cellulari ordinati (mioblasti?), struttura complessivamente preservata ed una ricca struttura di tipo vascolare neoformata (neoangiogenesi), distinguibile dalla proliferazione vascolare infiammatoria per assenza di aggregati linfocitari limitrofi (**Fig. 28**).

- Alla giunzione con la struttura muscolare ricevente si denota buona biointegrazione, con fusione delle fibre muscolari originale con quelle elastiche ordinate dell'impianto in assenza di soluzioni di continuità o di reazioni evidenti di rigetto.

(**Fig. 29**)

Alla colorazione di Van- Gieson :

- Preservazione delle fibre elastiche in modo ordinato e paragonabile alla struttura pre-impianto, a dimostrazione di una buona immunotollerabilità con conseguente assenza di processi di rigetto con distruzione mediante elastasi e molecole infiammatorie dell'ultrastruttura impiantata.

(**Fig. 30**)

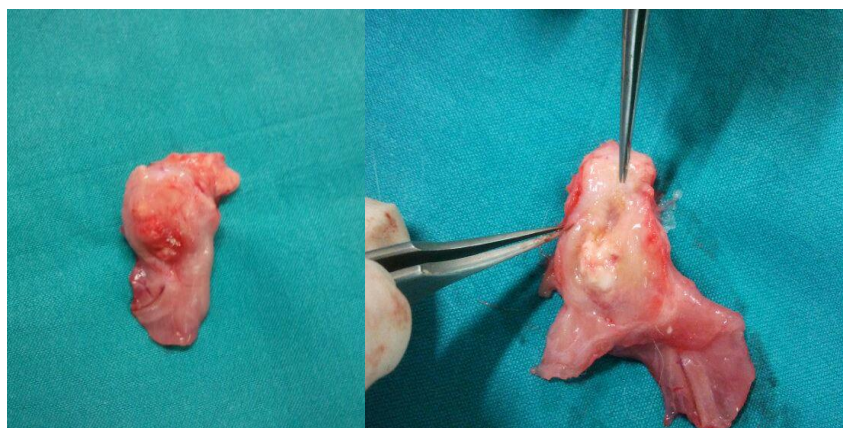


Fig. 26 : Lembo muscolare all'espanto. I margini appaiono rosei e sfumati nel contesto del muscolo ricevente (biointegrazione). Una porzione appare più intensamente vascolarizzata (reazione granulomatosa) e posteriormente inglobata nel contesto di un tessuto non infiammato né infetto. Assenti fistole o rotture meccaniche

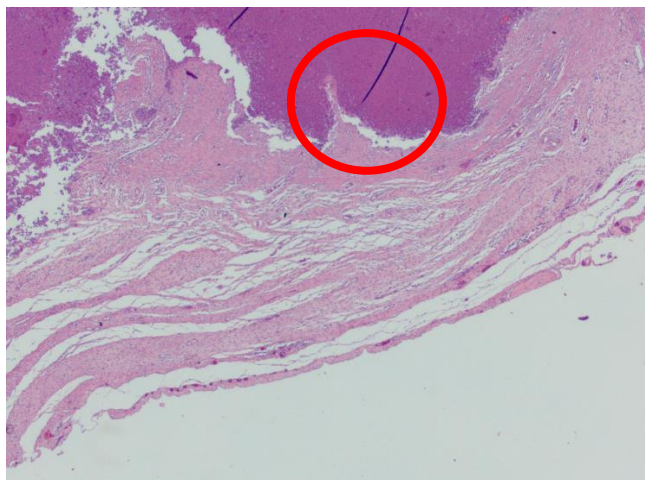


Fig. 27 : Colorazione in ematossilina-eosina. Presenti numerosi nuclei cellulari ben distribuiti, architettura delle fibre longitudinali conservata, raccolte infiammatorie di tipo granulomatoso in zone periferiche (in evidenza probabile passaggio della sutura). Ingrandimento 5X.

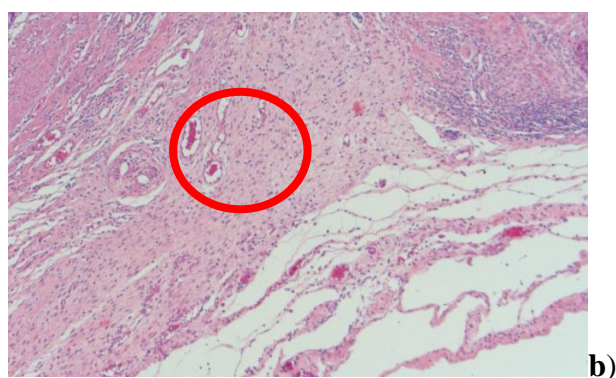
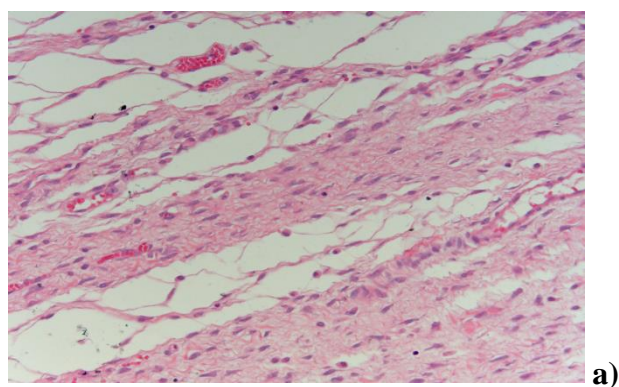


Fig 28 : Colorazione ematossilina-eosina. Evidenti nuclei cellulari numerosi

(mioblasti?). Distribuzione ordinata. Scarso infiltrato flogistico (a). Ingrandimento 10X. Presenza di numerosi vasi neoformati e pervi, non di tipo flogistico (b). Ingrandimento 5X

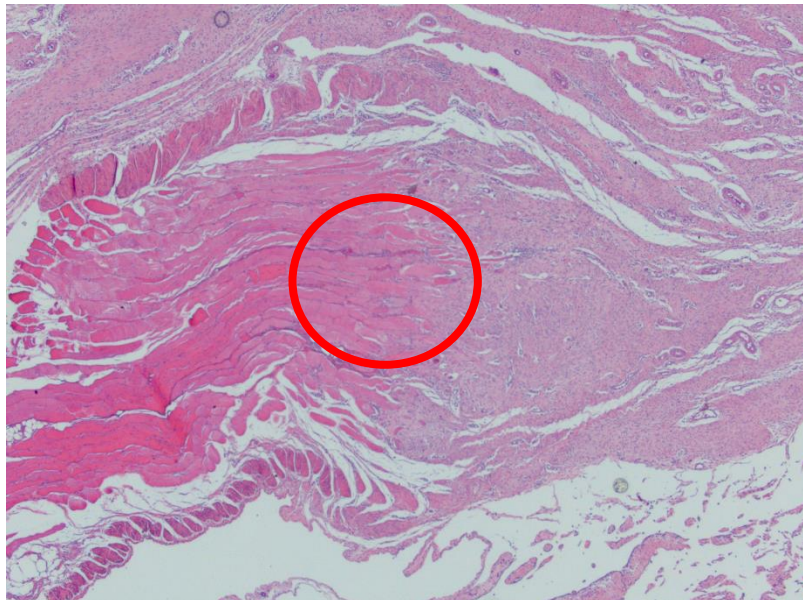
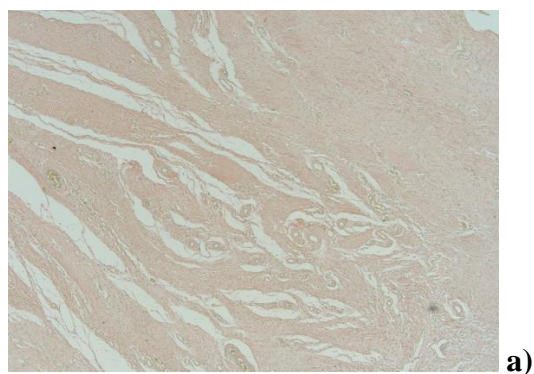


Fig. 29 : Colorazione in ematossilina-eosina. Giunzione impianto-muscolo ricevente. Buona integrazione, assenza di rigetto, non soluzioni di continuità o cedimenti strutturali. Ingrandimento 5X.



a)

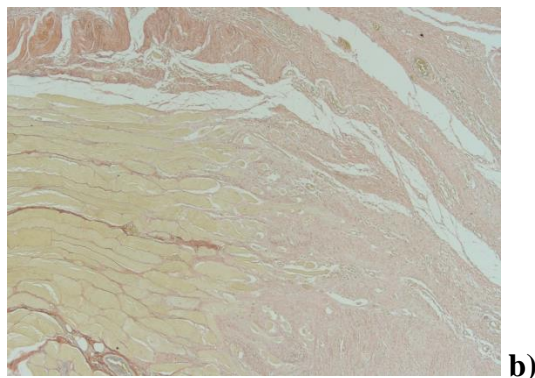


Fig. 30 : Colorazione di Van Gieson. Preservazione ultrastrutturale delle fibre elastiche in assenza di processi distruttivi da rigetto e distribuzione ordinata. Presenza di numerosi vasi con fibre elastiche correttamente disposte

5.2 ECOGRAFIA

- La valutazione con esame ecografico ha permesso di aggiungere, accanto alle valutazioni istologiche e macroscopiche una dimostrazione qualitativa in vivo della situazione e del funzionamento dell'impianto decellularizzato. L'esame è stato condotto sotto anestesia iniettiva da un Medico Radiologo specializzato in ecografia, acquisendo sia immagini ecografiche classiche che ecodoppler successivamente analizzate sulla base delle registrazioni effettuate (Fig.13). Sia la valutazione durante la procedura che la successiva elaborazione hanno permesso di determinare:
 - ❖ L'impianto si presenta come massa opaca, inserito nel contesto dei ventri muscolari dei retti e delle relative guaine in posizione statica e le anse intestinali non presentano segni di erniazione(**Fig. 31**) . In posizione dinamica, con pressione della sonda, non contrae rapporti con le anse intestinali che vengono spostate e

schiacciate; si muove contestualmente al gruppo muscolare con caratteristiche di resistenza elastica similare (Fig.32)

- ❖ All'esame ecodoppler si apprezza l'aorta addominale al di sotto dell'impianto, non vi sono soluzioni di continuità con la parete addominale, le anse intestinali si muovono indipendentemente dall'impianto (**Fig. 33**)
- ❖ A maggiore ingrandimento l'impianto si confonde in parte con la porzione connettivale/vascolare dei muscoli (integrazione) ed è in parte opaca (zona di isolamento come c.e.). Non segni di rottura, erniazione, raccolte. (**Fig. 34**)

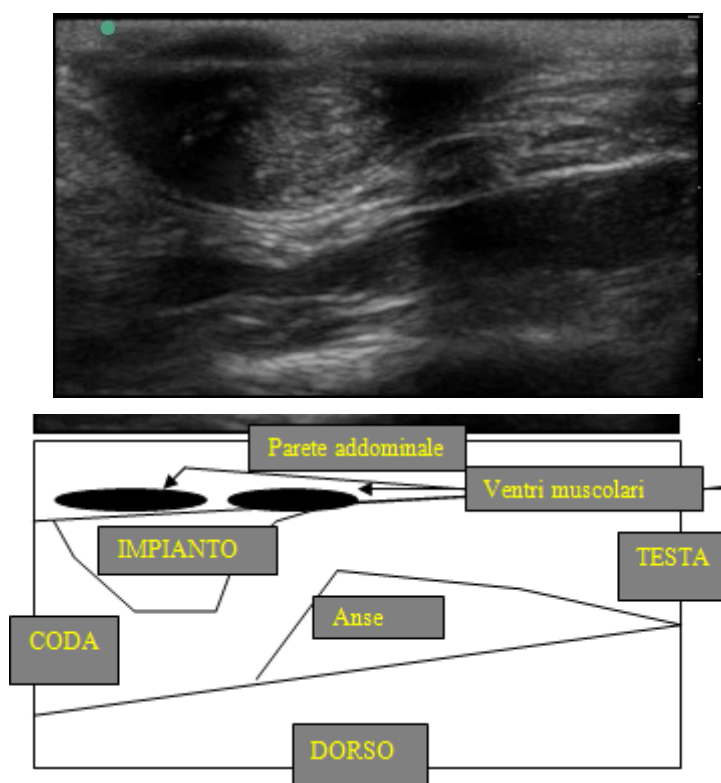


Fig. 31 : In condizione statica si apprezzano fisiologicamente le anse intestinali al di sotto del impianto. I margini dell'impianto sono ad angolo acuto verso la porzione terminale dato che origina dalla parete addominale e non dalla cavità peritoneale.

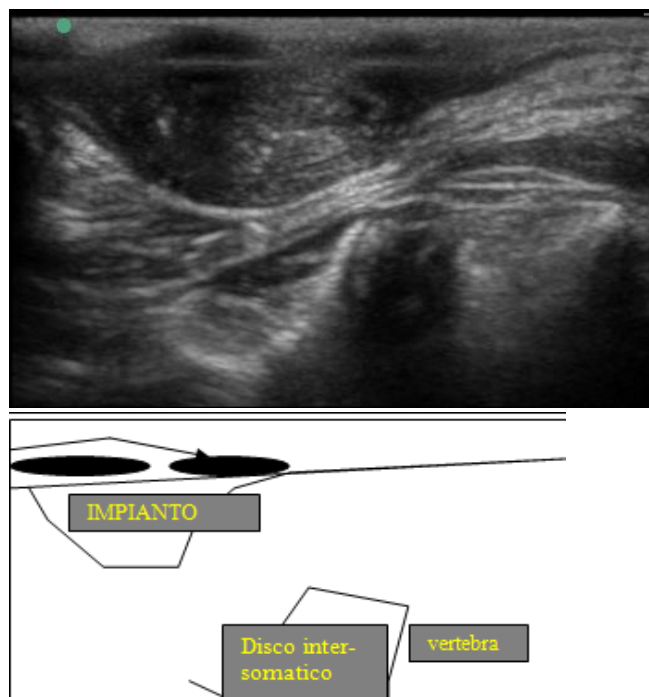


Fig. 32 : Alla pressione della sonda spariscono le anse intestinali a conferma che le anse non hanno rapporto con l'impianto e non c'è fibrosi estesa tra i 2 elementi. Con la pressione lo spazio sottocutaneo rimane costante di spessore, come pure l'impianto: quindi questo è contenuto nella parete addominale

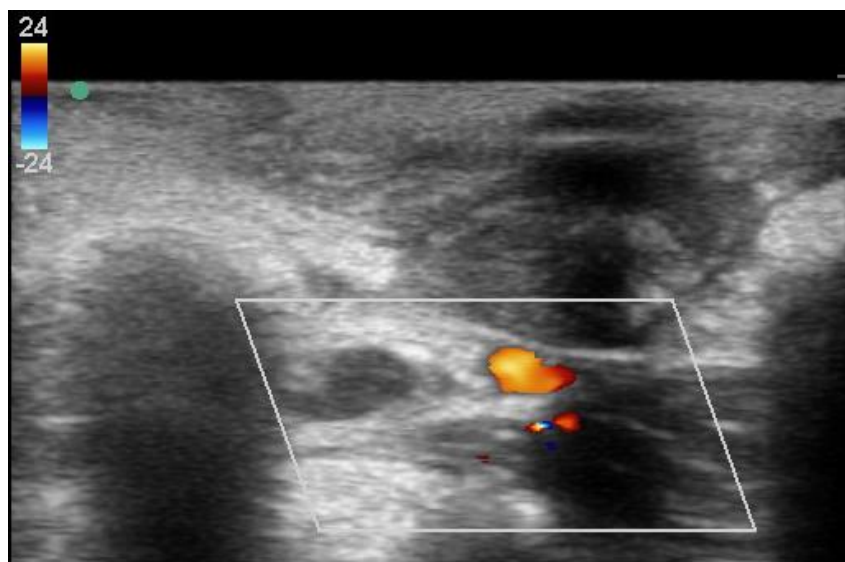


Fig. 33 : Immagine ecocolordoppler. Aorta passante poco sotto al impianto e separata dal margine muscolare; le anse intestinali sono spostate dalla pressione della sonda.

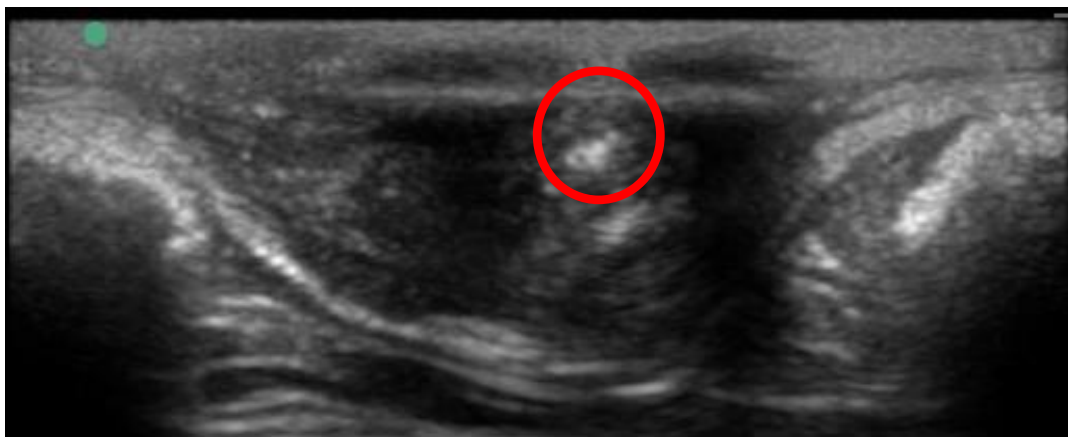


Fig. 34 : Immagine a maggior ingrandimento: meglio apprezzabili i margini del impianto ad angolo acuto (vedi sopra) e la parete addominale che lo contiene. Alcuni tratti appaiono sfumati ed indistinguibili dai ventri muscolari circostanti , si apprezza un area iperriflettente che corrisponde macroscopicamente alla porzione non integrata dell'impianto.

6. DISCUSSIONE

La chirurgia Plastica ha sviluppato nella propria secolare storia una grande quantità di tecniche e procedure atte alla ricostruzione morfo-funzionale dell'organismo umano, al punto da essere considerata non una chirurgia d'organo ma di metodo. L'affinamento delle metodiche e dello strumentario, sino alla grande rivoluzione della microchirurgia, ha permesso di ottenere guarigioni impensabili in passato o risultati eclatanti, con lo scopo ultimo di limitare il più possibile i tempi operatori e le risorse autologhe del corpo. Infatti, se da un lato le procedure ricostruttive si sono rese sempre più ardite e valide, dall'altro il ricorso autarchico ai tessuti stessi del paziente imponeva ancora limitazioni di vario genere alla loro piena realizzazione. La ricerca ha elaborato negli ultimi anni una serie di presidi su base sintetica o semi-sintetica, che hanno ulteriormente migliorato o ampliato le possibili scelte del chirurgo Plastico

. L'ambito attualmente molto foriero di speranze e risultati eclatanti è rappresentato dalla bioingegneria tissutale, la quale ha permesso di ipotizzare, sulla base dei risultati conseguiti in laboratorio e delle conoscenze acquisite in campo biologico, genetico, immunologico ed istochimico la realizzazione di tessuti che potessero essere compatibili con l'organismo umano e applicabili chirurgicamente con minimo rischio, risultato valido e con assoluto risparmio delle risorse del paziente. Gli ostacoli che si sono posti ai ricercatori nel passaggio dalle colture cellulari in vitro alle ricostruzioni complesse in vivo, sono stati numerosi e hanno necessitato molteplici approcci diversi con finalità comuni.

Le scoperte relative alla differenziazione delle cellule staminali, dei fattori di crescita, delle interazioni intercellulari e dei processi di apoptosi hanno rappresentato i capisaldi per la realizzazione di biostrutture in vitro. Tuttavia lo sviluppo di strutture complesse, utili al campo ricostruttivo, sono state limitate dalle principali difficoltà costituite dall'ottenimento di una crescita cellulare ordinata e funzionale, la cui base era insita nello sviluppo e nelle interazioni di diversi tipi cellulari e nella struttura necessaria alla loro nutrizione. Relativamente a queste necessità la procedura di decellularizzazione dei tessuti nativi ha rappresentato una chiave di volta nella realizzazione di biocostrutti, ponendo le basi per la prosecuzione delle teorie in merito allo sviluppo dei tessuti umani

in laboratorio. Il fondamento razionale è costituito dalla constatazione che, ad oggi, il tessuto biologico presente in natura è una struttura complessa nella sua costituzione, funzionamento e composizione, difficile da riprodurre *in vitro* e, al contempo, la sua ultrastruttura, definita principalmente come ECM (matrice extra-cellulare), mantiene intatte le proprietà per lo sviluppo e per la crescita delle cellule. Infatti la scoperta che l'ECM non è una semplice impalcatura amorfa di ogni tessuto ma una struttura complessa capace di interagire in modo spesso decisivo con la migrazione e la differenziazione cellulare, regolandola in modo fine e specifico, ha gettato le basi per la comprensione stessa dell'ambiente basilare allo sviluppo tissutale. Ne è derivato, pertanto, un approccio teso a ricostituire un tessuto partendo dalla sua impalcatura originaria piuttosto che da materiali di sintesi o di diversa origine biologica, privi delle necessarie ultrastrutture regolatrici e funzionali. Per ottenere questo gli sforzi si sono diretti nel mettere appunto procedure di varia natura e tipologia atte ad ottenere una struttura biologica basilare partendo da un tessuto nativo, eliminandone la componente cellulare che lo renderebbe incompatibile in caso di passaggio ad organismo omologo o xenologo o che impedirebbe una corretta differenziazione delle cellule che si vorrebbero sviluppare su di esso. Nasceva pertanto il concetto di scaffold, ovvero una impalcatura biologica per lo sviluppo di colture cellulari complesse, la base di un tessuto e delle sue molteplici differenti peculiarità. Tuttavia, affinché uno scaffold divenga la base utile alla differenziazione cellulare esso va adeguatamente nutrito e questo può avvenire più facilmente *in vivo* ove l'apporto siero-ematico è il miglior terreno di coltura ad oggi pensabile. Si è giunti così alla realizzazione di scaffold a partire da tessuti biologici dotati di ricca vascolarizzazione, da preservare durante il processo di decellularizzazione, consentendo sia la crescita delle cellule coltivate sullo scaffold che la colonizzazione da parte delle circolanti. Ne è noto esempio in letteratura il tessuto omentale, ove la dimostrazione della capacità di conservare l'architettura strutturale della matrice extracellulare e della più fine struttura vascolare da parte del protocollo di decellularizzazione ha permesso di ipotizzare che uno scaffold così ottenuto fosse in grado di promuovere la crescita e la differenziazione in modo para-fisiologico di eventuali popolazioni cellulari seminate nel suo contesto(112). Infatti l'architettura vascolare appariva inalterata, non solo per la disposizione spaziale e la densità dei canali vascolari all'interno del tessuto ma anche per quel che riguarda l'ultrastruttura delle pareti vascolari, mantenendo sia la pervietà dei

lumi che la struttura collagenica delle pareti, nonché, gli strati di fibre elastiche delle pareti dei vasi di calibro maggiore, fondamentali nel mantenerne integrità e funzione in vivo. L'ottenimento di simili scaffold ha gettato le basi per poter pensare alla crescita di popolazioni cellulari in vivo e la ricostituzione di un tessuto, ma i limiti che si sono comunque appalesati erano costituiti dal fatto che il sistema immunologico ricevente poteva talvolta reagire all'impianto come un corpo estraneo, in modo direttamente proporzionale alla componente cellulare nativa rimasta in sede, come nel caso del rigetto, e che le diverse popolazioni cellulari di un medesimo tessuto erano difficili da ottenere .

Pertanto si è ipotizzato, che lo scaffold potesse essere reso maggiormente biointegrabile perfezionando le procedure di decellularizzazione con il massimo rispetto, in ogni caso, della ECM e mediante applicazione di fattori di crescita cellulo-specifici assieme , o meno, a cellule staminali di diversa origine (adipose, embrionali, midollari) di modo da ottenere potenzialmente una struttura tridimensionale in grado di integrarsi in vivo e ricostituirsi nel tessuto originario (113,114). Successive ricerche hanno dimostrato, inoltre, come le ipotesi relative all'importanza della ECM nello sviluppo tissutale sia a tal punto complessa che l'ultrastruttura non è semplicemente fondamentale da un punto di vista tridimensionale ma altresì per peculiarità di segnali cellulari tessuto-specifici. L'importanza della struttura tridimensionale era evidente negli studi condotti sulla trachea decellularizzata ,ove il mantenimento della ECM permetteva di riprodurre nel campo della ingegneria tissutale quella sua forma unica e altamente funzionale (115). Tuttavia, anche per strutture più semplici come mucosa o muscolo si era dimostrato che la loro ECM era supporto essenziale per differenziazione e sviluppo proprio nel senso tissutale originario. Il concetto che si è diffuso , dunque, è che lo scaffold dovesse essere ,preferibilmente, originato dalla struttura che si prefiggeva di ricostituire (*similibus cum similibus*). Ipoteticamente questo può essere valido per strutture semplici , ove la struttura microcapillare sembra mantenersi comunque adeguata, ma risulta di più difficile applicazione se si considerano strutture più complesse, dato che la necessità di garantire una vascolarizzazione idonea al biocostrutto è condizione imprescindibile alla sua integrazione e possibile sviluppo. Infatti, gli studi che hanno avuto ad oggi gli aspetti maggiormente interessanti in questo campo hanno sottolineato che lo sviluppo cellulare avviene con un limite temporale per poi diminuire, a causa di un mismatch tra sviluppo cellulare e apporto vascolare. Il concetto , pertanto, che da un tessuto omologo se ne possa

ottenere uno che si integri e funzioni nel ricevente come una struttura autologa ha permesso di coniare il termine omo-autologo, le cui basi stesse sono insite nelle procedure sopraesposte di decellularizzazione e di bioingegneria tissutale, e che per potere essere effettivamente funzionale deve prevedere la possibilità di conservare la micro e la macrostruttura vascolare e ottenere la rivascolarizzazione al pari dei lembi microchirurgici.

Il presente studio è nato pertanto sulla base della letteratura pubblicata in merito, della nostra esperienza maturata sulla decellularizzazione sperimentale di omento murino ed umano e dalla collaborazione con un centro di Chirurgia Plastica dedito alla procedura di trapianto microchirurgico di parete addominale. Quest'ultimo si accompagna al trapianto multiviscerale ed è stato presentato come procedura che segue e completa il trapianto stesso. Il lembo di parete addominale ha rappresentato il *primum movens* della ricerca che, successivamente, si è particolarmente soffermata sul tessuto muscolare della parete addominale. Difatti, l'ipotesi di ottenere un lembo microchirurgico omo-autologo rappresenterebbe una svolta epocale nel campo della chirurgia plastica ricostruttiva, dal momento che, poter ottenere dal cadavere, parimenti alla cute o tessuti di banca già noti nelle loro applicazioni cliniche (osso, nervo, tendine, fascia lata), strutture complesse come i lembi sarebbe in grado di abbattere tutte le attuali limitazioni alle ricostruzioni microchirurgiche. Tuttavia, al momento attuale, sia nello svolgimento del presente lavoro che nella letteratura internazionale, non è stato possibile ancora ottenere nulla che potesse essere assimilabile ad un lembo omo-autologo, dal momento che una medesima procedura di decellularizzazione valida tanto quanto per il lembo che per i peduncoli vascolari da anastomizzare non è disponibile ed è oggetto di ulteriori studi da parte nostra. L'ottenimento, tuttavia, di un lembo muscolare semplice decellularizzato, mediante una procedura innovativa ricavata da altre pubblicate in letteratura, ha permesso di ipotizzare la creazione, in ogni caso, di un tessuto bioingegnerizzato utile nel campo ricostruttivo. Un lembo muscolare capace di ottenere una biointegrazione ed uno sviluppo in senso muscolare sarebbe utile sia per la ricostruzione di lesioni complesse della parete addominale, concetto alla base stessa del nostro progetto, affrontata attualmente con l'impiego di reti sintetiche o biologiche, lembi o dall'insieme di più metodiche, sia nel sostituire un gran numero di lembi basati sulla mobilizzazione di muscoli, anche se per quelli di maggiori dimensioni permane la problematica legata alla vascolarizzazione.

L'impianto muscolare decellularizzato da noi ottenuto ha dimostrato delle caratteristiche assimilabili a quanto riportato in letteratura (116). Si è evidenziato, da un lato, una certa tollerabilità del tessuto ed una risposta infiammatoria non particolarmente elevata, una ricca ricellularizzazione e neo vascolarizzazione assieme a fenomeni di reazione capsulare. La ricellularizzazione non è stata studiata da un punto di vista istochimico ma è ipotizzabile sia in larga parte costituita da fibroblasti e, come in altri studi simili, l'integrazione del tessuto è paragonabile ad un processo di fibrosi, in assenza di segni di neoformazione muscolare. Altresì l'istochimica potrebbe valutare la qualità del nostro protocollo determinando l'effettiva persistenza di tutte quelle proteine di membrana così importanti nello sviluppo tissutale, che possiamo solo ipotizzare sulla base di studi simili. Come suggerito da diversi autori una possibile soluzione è il potenziamento della differenziazione in senso muscolare mediante cellule pluripotenti, di varia origine, preferibilmente ottenibili dal ricevente, in aggiunta a fattori di crescita specifici per il muscolo (117).

Relativamente a questo è doveroso sottolineare come questo procedimento, che potremmo definire di potenziamento-condizionamento non è scevro da difficoltà e risultati scadenti per la difficoltà di seminare e fare crescere adeguatamente le cellule (supporti, mezzi di coltura, tempi e condizioni fisico-chimiche). Un lembo decellularizzato assieme al suo asso vascolare potrebbe rappresentare un aiuto ulteriore in quanto la semina potrebbe avvenire per perfusione del peduncolo assicurando una distribuzione capillare di cellule e fattori e con sviluppo, dapprima, proprio dei vasi che sono alla base della sopravvivenza e differenziazione dello scaffold. Inoltre, sebbene la reazione di rigetto non fosse presente, risulterebbe utile, come dimostrato in alcuni articoli, eseguire una valutazione quantitativa dei residui cellulari del tessuto nativo di modo da poter verificare e predire la risposta di tipo fibrotico in seguito ad una reazione granulomatosa, tanto più intensa quanto più residuo omologo rimanga in sede. Sulla base di quanto dedotto dalla letteratura scientifica in merito, è stato possibile paragonare i risultati istologici del nostro lavoro con quelli ottenuti relativamente a prodotti che sono attualmente impiegati nella pratica clinica per la riparazione e ricostruzione della parete addominale. Il livello di biointegrazione, inteso come risposta infiammatoria dell'ospite e la resistenza alla colonizzazione batterica è sovrapponibile con quanto riportato istologicamente riguardo a scaffold biologici (118). La nostra biostruttura permette una

buona vascolarizzazione che è alla base di un processo immunologico adeguato, risultando in grado di impedire infezioni parimenti ad altri biocostrutti, proprietà assente nelle strutture sintetiche. Clinicamente il comportamento biomeccanico è inoltre simile con assenza di erniazione, aderenze o fistolizzazioni in merito ai visceri addominali., come confermato dallo specifico studio ecografico condotto assieme ad una valutazione esterna macroscopica. Se paragonato , clinicamente, all'aspetto che le matrici di derivazione biologica assumono durante la biointegrazione , da noi osservate sia direttamente che in articoli pubblicati, potremo notare alcune sostanziali differenze.

Mentre le biostrutture in commercio , che hanno una base xenologa rispetto all'organismo umano e sono immunologicamente inerti, dimostrano una sorta di vascolarizzazione basata su un processo di inosculatione con mantenimento del loro aspetto macroscopico, l'impianto muscolare appare assumere una vascolarizzazione più intensa, in assenza di flogosi o essudato, con porzioni indistinguibili dal tessuto muscolare originario circostante e aree di incapsulamento. Sulla base di queste osservazioni, che andrebbero suffragate da apposite microscopie e saggi immunochimici, possiamo dedurre che il processo di vascolarizzazione sui costrutti xenologici sia per semplice crescita di vasi circostanti, sviluppo di nuovi basi per un microambiente favorevole ove esistevano reti vascolari nel tessuto originario ed infine per il consueto processo di granulazione reattiva ad un corpo estraneo. La medesima osservazione è stata condotta su materiali biologici omologhi come fascia lata o pericardio che risultano parimenti tollerati immunologicamente. Il muscolo decellularizzato, impiantato nel retto dell'addome, assume un aspetto di maggiore vascolarizzazione laddove, verosimilmente, come accennato, la sua ECM conserva segnali specifici per una tipologia di vascolarizzazione che è muscolo-specifica; laddove questo avvenga in misura minore l'organismo conduce piuttosto un processo di reazione capsulare ed isolamento del biocostrutto che appare scarsamente integrato ma, data la sua inerzia immunologica, non comunque rigettato data l'assenza di fenomeni necrotico-colliquativi tipici di questo processo.

Sulla base di queste semplici impressioni di tipo macroscopico possiamo affermare che i materiali biologici per la ricostruzione tissutale, con particolare riferimento alla parete addominale, risultano preferibili ai materiali di sintesi quantunque quelli ottenuti in laboratorio, maggiormente disponibili, risolverebbero le limitazioni di

approvvigionamento legate alle donazioni delle parti biologiche conservate presso le banche dei tessuti. Altresì un biomateriale che sia originato dal medesimo tessuto che si propone di riparare potrebbe presentare ulteriori aspetti favorevoli di biointegrazione.

Attualmente non conosciamo né possiamo ipotizzare se vi siano differenze tra il biomateriale tessuto-specifico di origine xenologa rispetto all'omologo. In generale la decisione del chirurgo plastico, relativa a quale supporto ricostruttivo utilizzare, basata spesso sulla sua esperienza in merito e l'accesso a queste risorse, risponde a criteri che sono ancora tema di valutazione e dibattito. Infatti l'interpretazione tra i diversi risultati ottenuti da impianti xenologhi rispetto agli omologhi non individua una netta superiorità di uno rispetto ad un altro e la scelta ricade nell'ambito di pensieri differenti. Infatti se da un lato i biomateriali xenologhi, forniti dall'industria, sono più largamente disponibili rispetto agli omologhi da donatore, forniti dalle Banche dei Tessuti, dall'altro lato i loro costi appaiono ancora nettamente superiori ai secondi, contrapponendo il prezzo della ricerca, dei materiali e della distribuzione a quello della gratuità nel donare gli organi e di costi di gestione inferiore dei tessuti donati.

7. CONCLUSIONI

Le nuove frontiere della Chirurgia Plastica Ricostruttiva sono attualmente rappresentate dai risultati ottenuti in laboratorio e nei centri di chirurgia sperimentale dalla Bioingegneria dei Tessuti. Altresì la trapiantologia d'organo vede nelle medesime ricerche una risorsa innovativa di assoluto valore. Nel nostro studio, partendo dall'ardito proposito di ottenere un lembo omo-autologo di parete addominale utilizzabile per un trasferimento microchirurgico, siamo giunti ad una serie di importanti risultati personali con un tessuto muscolare decellularizzato con tecnica innovativa ed impiantato in vivo, paragonabile ad altri casi di recente letteratura internazionale. Nell'ambito della chirurgia sperimentale, infatti, la ricostruzione dell'addome mediante tessuti bioingegnerizzati prosegue a ritmo serrato, date le notevoli ricadute cliniche e si basa essenzialmente sui diversi approcci che abbiamo presentato. Le procedure ed il concetto stesso di decellularizzazione sono oramai associate all'interno della comunità dei ricercatori e trovano sempre più spazio anche tra i clinici, pertanto l'evoluzione è ora rappresentata da tutte le procedure che possono potenziare la biointegrabilità di queste strutture o ottenere la decellularizzazione, contemporaneamente, di più tessuti. Abbiamo riportato i lavori scientifici in grado di evidenziare, nel primo caso, che le procedure attuate hanno utilizzato cellule progenitrici (potenziamento) o fattori di crescita (condizionamento) o entrambi, concentrando la ricerca su questi aspetti piuttosto che la decellularizzazione tessuto specifica della ECM. Nel secondo caso si sono ottenute, con simili procedure, la decellularizzazione di tessuti diversi quali muscolo e fascia, aprendo la strada alla decellularizzazione multipla. Per quanto concerne le valutazioni sperimentali preliminari da noi effettuate, è possibile sottolineare come lo scaffold muscolare sia una valida alternativa ad altri prodotti noti nell'uso clinico quotidiano. Il nostro cammino, tuttavia, risulta ancora lungo e pone, per il futuro, una serie di sfide ancora aperte da intraprendere al fine di poter veramente realizzare una banca di lembi omo-autologhi, suffragati dalle necessarie prove sperimentali, con amplissime possibilità di impiego.

Le tappe da realizzare sono riassumibili in :

- Potenziamento della biointegrazione e della differenziazione in senso muscolare degli impianti decellularizzati mediante applicazione di cellule staminali pluripotenti e loro condizionamento tessuto-specifico con fattori di crescita ed , eventualmente, segnali chimici per cellule e fattori circolanti (*potenziamento-condizionamento*). Supporto dei risultati mediante quantizzazione della decellularizzazione, saggi immunoistochimici, microscopia elettronica, prove meccaniche di resistenza.

- Realizzazione di una decellularizzazione valida di strutture vascolari e loro impianto microchirurgico in vivo. Valutazione di possibili risvolti chirurgici dei vasi bioingegnerizzati anche assieme al potenziamento/condizionamento cellulare, in conformità con quanto recentemente pubblicato. (vedi cenni sopra sui vasi)

- Realizzazione di un protocollo adeguato per decellularizzare contemporaneamente tessuto del lembo e asse vascolare (lembo omo-autologo) e potenziamento/condizionamento per perfusione.

La decellularizzazione di più componenti risulta il punto chiave per la realizzazione di strutture complesse come i lembi. Pertanto, ad oggi, le sempre più numerose e recenti pubblicazioni , in merito a tutte queste procedure che fanno da riferimento altresì per la prosecuzione delle nostre ricerche, gettano le basi per possibili future ricadute nell'ambito clinico. L'affinamento delle tecniche di laboratorio, la possibilità di collaborazioni e scambi internazionali ed interdisciplinari sui vari argomenti di bioingegneria e di eventuali applicazioni chirurgiche, fanno ben sperare nel conseguimento di validi risultati sviluppando campi innovativi quali quello della Chirurgia Rigenerativa e della Bioingegneria Microchirurgica.

8. BIBLIOGRAFIA

- 1) Chang KP, Lai CH, Chang CH, Lin CL, Lai CS, Lin SD. *Free flap options for reconstruction of complicated scalp and calvarial defects: report of a series of cases and literature review*. *Microsurgery*. 2010;30(1):13-8. Review.
- 2) Howard MA, Polo K, Pusic AL, Cordeiro PG, Hidalgo DA, Mehrara B, Disa JJ. *Breast cancer local recurrence after mastectomy and TRAM flap reconstruction: incidence and treatment options*. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Apr 15;117(5):1381-6.
- 3) Webster J, Scuffham P, Sherriff KL, Stankiewicz M, Chaboyer WP. *Negative pressure wound therapy for skin grafts and surgical wounds healing by primary intention*. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Apr 18;4:CD009261.
- 4) Siemionow M, Ozturk C. *An update on facial transplantation cases performed between 2005 and 2010*. *Plast Reconstr Surg*. 2011 Dec;128(6):707e-20e.
- 5) Kaufman CL, Breidenbach W. *World experience after more than a decade of clinical hand transplantation: update from the Louisville hand transplant program*. *Hand Clin*. 2011 Nov;27(4):417-21
- 6) Solanki NS, Nowak KM, Mackie IP, Greenwood JE. *Using biobrane: techniques to make life easier* *Eplasty*. 2010 Dec 20;10:e70
- 7) Tiengo C, Amabile A, Azzena B *The contribution of a dermal substitute in the three-layers reconstruction of a nose tip avulsion*. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2012 Jan;65(1):114-7.

- 8) Keck M, Haluza D, Lumenta DB, Burjak S, Eisenbock B, Kamolz LP, Frey M. *Construction of a multi-layer skin substitute: Simultaneous cultivation of keratinocytes and preadipocytes on a dermal template* Burns. 2011 Jun;37(4):626-30.
- 9) Damien E, Hing K, Saeed S, Revell PA. *A preliminary study on the enhancement of the osteointegration of a novel synthetic hydroxyapatite scaffold in vivo*. J Biomed Mater Res A. 2003 Aug 1;66(2):241-6.
- 10) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7
- 11) Strelchenko N, Verlinsky O, Kukhareenko V, Verlinsky Y. *Morula-derived human embryonic stem cells*. Reprod Biomed Online. 2004 Dec;9(6):623-9.
- 12) Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. *Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells*. Science. 1988 Jul 1;241(4861):58-62
- 13) Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. *Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow*. Blood. 2001 Oct 15;98(8):2396-402.
- 14) Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. *Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology*. Trends Biotechnol. 2006 Apr;24(4):150-4
- 15) Puglisi MA, Saulnier N, Piscaglia AC, Tondi P, Agnes S, Gasbarrini A. *Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and hepatic differentiation: old concepts*

and future perspectives. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2011 Apr;15(4):355-64. Review.

- 16) Wilson A, Butler PE, Seifalian AM. *Adipose-derived stem cells for clinical applications: a review.* Cell Prolif. 2011 Feb;44(1):86-98. doi: 10.1111/j.1365-2184.2010.00736.x.
- 17) Weiss ML, Troyer DL. *Stem cells in the umbilical cord.* Stem Cell Rev. 2006;2(2):155-62. Review.
- 18) Leeb C, Jurga M, McGuckin C, Moriggl R, Kenner L. *Promising new sources for pluripotent stem cells.* Stem Cell Rev. 2010 Mar;6(1):15-26. Review.
- 19) Brignier AC, Gewirtz AM. *Embryonic and adult stem cell therapy.* J Allergy Clin Immunol. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S336-44. Epub 2010 Jan 12. Review.
- 20) Villegas SN, Canham M, Brickman JM. *FGF signalling as a mediator of lineage transitions--evidence from embryonic stem cell differentiation.* J Cell Biochem. 2010 May;110(1):10-20.
- 21) Song SY, Chung HM, Sung JH. *The pivotal role of VEGF in adipose-derived-stem-cell-mediated regeneration.* Expert Opin Biol Ther. 2010 Nov;10(11):1529-37. Epub 2010 Sep 23. Review.
- 22) Kaji H, Camci-Unal G, Langer R, Khademhosseini A. *Engineering systems for the generation of patterned co-cultures for controlling cell-cell interactions.* Biochim Biophys Acta. 2011 Mar;1810(3):239-50. Epub 2010 Jul 23.

- 23) Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M. *Probing heterotypic cell interactions: hepatocyte function in microfabricated co-cultures* J Biomater Sci Polym Ed. 1998;9(11):1137-60.
- 24) Fukuda J, Khademhosseini A, Yeh J, Eng G, Cheng J, Farokhzad OC, Langer R. *Micropatterned cell co-cultures using layer-by-layer deposition of extracellular matrix components*. Biomaterials. 2006 Mar;27(8):1479-86. Epub 2005 Oct 19.
- 25) Bianchi F, Rosi M, Vozzi G, Emanuelli C, Madeddu P, Ahluwalia A. *Microfabrication of fractal polymeric structures for capillary morphogenesis: applications in therapeutic angiogenesis and in the engineering of vascularized tissue*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2007 May;81(2):462-8.
- 26) Tan W, Desai TA. *Layer-by-layer microfluidics for biomimetic three-dimensional structures*. Biomaterials. 2004 Mar-Apr;25(7-8):1355-64.
- 27) B. L. Seal, T. C. Otero and A. Panitch. *Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration*. Mat. Sci. Eng R, 34, 147-230
- 28) Rosso F, Marino G, Giordano A, Barbarisi M, Parmeggiani D, Barbarisi A. *Smart materials as scaffolds for tissue engineering*. J Cell Physiol. 2005 Jun;203(3):465-70
- 29) Mano JF, Silva GA, Azevedo HS, Malafaya PB, Sousa RA, Silva SS, Boesel LF, Oliveira JM, Santos TC, Marques AP, Neves NM, Reis RL. *Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends*. J R Soc Interface. 2007 Dec 22;4(17):999-1030

- 30) Li JP, de Wijn JR, Van Blitterswijk CA, de Groot K. *Porous Ti6Al4V scaffold directly fabricating by rapid prototyping: preparation and in vitro experiment.* Biomaterials. 2006 Mar;27(8):1223-35.
- 31) Orlando G, Baptista P, Birchall M, De Coppi P, Farney A, Guimaraes-Souza NK, Opara E, Rogers J, Seliktar D, Shapira-Schweitzer K, Stratta RJ, Atala A, Wood KJ, Soker S. *Regenerative medicine as applied to solid organ transplantation: current status and future challenges.* Transpl Int. 2011 Mar;24(3):223-32. Review.
- 32) Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. *Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty.* Lancet. 2006 Apr 15;367(9518):1241-6.
- 33) Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, Cogan TA, Dodson A, Martorell J, Bellini S, Parnigotto PP, Dickinson SC, Hollander AP, Mantero S, Conconi MT, Birchall MA. *Clinical transplantation of a tissue-engineered airway.* Lancet. 2008 Dec 13;372(9655):2023-30.
- 34) Rangappa S, Makkar R, Forrester J. *Review article: current status of myocardial regeneration: new cell sources and new strategies.* J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2010 Dec;15(4):338-43. Review.
- 35) Radisic M, Deen W, Langer R, Vunjak-Novakovic G. *Mathematical model of oxygen distribution in engineered cardiac tissue with parallel channel array perfused with culture medium containing oxygen carriers.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 Mar;288(3):H1278-89.

- 36) Moon JJ, Saik JE, Poché RA, Leslie-Barbick JE, Lee SH, Smith AA, Dickinson ME, West JL. *Biomimetic hydrogels with pro-angiogenic properties*. *Biomaterials*. 2010 May;31(14):3840-7.
- 37) Bader A, Schilling T, Teebken OE, Brandes G, Herden T, Steinhoff G, Haverich A. *Tissue engineering of heart valves--human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves*. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1998 Sep;14(3):279-84.
- 38) Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, Silberhumer G, Wolner E, Weigel G, Simon P. *Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves*. *Int J Artif Organs*. 2003 May;26(5):421-7.
- 39) Chen RN, Ho HO, Tsai YT, Sheu MT. *Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications*. *Biomaterials*. 2004 Jun;25(13):2679-86.
- 40) Tottey S, Johnson SA, Crapo PM, Reing JE, Zhang L, Jiang H, Medberry CJ, Reines B, Badylak SF. *The effect of source animal age upon extracellular matrix scaffold properties*. *Biomaterials*. 2011 Jan;32(1):128-36. Epub 2010 Sep 25.
- 41) Borschel GH, Dennis RG, Kuzon WM Jr. *Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an acellular scaffold*. *Plast Reconstr Surg*. 2004 Feb;113(2):595-602.
- 42) Lin P, Chan WC, Badylak SF, Bhatia SN. *Assessing porcine liver-derived biomatrix for hepatic tissue engineering*. *Tissue Eng*. 2004 Jul-Aug;10(7-8):1046-53.

- 43) Deeken CR, White AK, Bachman SL, Ramshaw BJ, Cleveland DS, Loy TS, Grant SA. *Method of preparing a decellularized porcine tendon using tributyl phosphate.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2011 Feb;96(2): 199-206.
- 44) Yim EK, Leong KW. *Proliferation and differentiation of human embryonic germ cell derivatives in bioactive polymeric fibrous scaffold.* J Biomater Sci Polym Ed. 2005;16(10):1193-217.
- 45) Derda R, Li L, Orner BP, Lewis RL, Thomson JA, Kiessling LL. *Defined substrates for human embryonic stem cell growth identified from surface arrays.* ACS Chem Biol. 2007 May 22;2(5):347-55. Epub 2007 May 4.
- 46) Lee SJ, Lee IW, Lee YM, Lee HB, Khang G. *Macroporous biodegradable natural/synthetic hybrid scaffolds as small intestine submucosa impregnated poly(D,L-lactide-co-glycolide) for tissue-engineered bone.* J Biomater Sci Polym Ed. 2004;15(8):1003-17.
- 47) Mooney DJ, Kaufmann PM, Sano K, Schwendeman SP, Majahod K, Schloo B, Vacanti JP, Langer R. *Localized delivery of epidermal growth factor improves the survival of transplanted hepatocytes.* Biotechnol Bioeng. 1996 May 20;50(4):422-9.
- 48) Vehof JW, Fisher JP, Dean D, van der Waerden JP, Spauwen PH, Mikos AG, Jansen JA. *Bone formation in transforming growth factor beta-1-coated porous poly(propylene fumarate) scaffolds.* J Biomed Mater Res. 2002 May;60(2):241-51.

- 49) Royce SM, Askari M, Marra KG. *Incorporation of polymer microspheres within fibrin scaffolds for the controlled delivery of FGF-1*. J Biomater Sci Polym Ed. 2004;15(10):1327-36.
- 50) Tran KT, Griffith L, Wells A. *Extracellular matrix signaling through growth factor receptors during wound healing*. Wound Repair Regen. 2004 May-Jun;12(3):262-8. Review.
- 51) Mercurius KO, Morla AO. *Cell adhesion and signaling on the fibronectin 1st type III repeat; requisite roles for cell surface proteoglycans and integrins*. BMC Cell Biol. 2001;2:18. Epub 2001 Aug 20.
- 52) Moghal N, Neel BG. *Integration of growth factor, extracellular matrix, and retinoid signals during bronchial epithelial cell differentiation*. Mol Cell Biol. 1998 Nov;18(11):6666-78.
- 53) Kapila YL, Wang S, Johnson PW. *Mutations in the heparin binding domain of fibronectin in cooperation with the V region induce decreases in pp125(FAK) levels plus proteoglycan-mediated apoptosis via caspases*. J Biol Chem. 1999 Oct 22;274(43):30906-13.
- 54) Anderson JM. *Inflammatory response to implants*. ASAIO Trans. 1988 Apr-Jun;34(2):101-7.
- 55) Badylak S, Liang A, Record R, Tullius R, Hodde J. *Endothelial cell adherence to small intestinal submucosa: an acellular bioscaffold*. Biomaterials. 1999 Dec;20(23-24):2257-63.

- 56) Musahl V, Abramowitch SD, Gilbert TW, Tsuda E, Wang JH, Badylak SF, Woo SL. *The use of porcine small intestinal submucosa to enhance the healing of the medial collateral ligament--a functional tissue engineering study in rabbits.* J Orthop Res. 2004 Jan;22(1):214-20.
- 57) Record RD, Hillegonds D, Simmons C, Tullius R, Rickey FA, Elmore D, Badylak SF. *In vivo degradation of ¹⁴C-labeled small intestinal submucosa (SIS) when used for urinary bladder repair.* Biomaterials. 2001 Oct;22(19):2653-9.
- 58) Wissink MJ, Beernink R, Poot AA, Engbers GH, Beugeling T, van Aken WG, Feijen J. *Improved endothelialization of vascular grafts by local release of growth factor from heparinized collagen matrices.* J Control Release. 2000 Feb 14;64(1-3):103-14.
- 59) Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ. *Polymeric system for dual growth factor delivery.* Nat Biotechnol. 2001 Nov;19(11):1029-34.
- 60) Crenshaw SA, Roller MD, Chapman JK. *Immediate breast reconstruction with a saline implant and AlloDerm, following removal of a Phyllodes tumor.* World J Surg Oncol. 2011 Mar 21;9:34.
- 61) Jung SN, Chung JW, Yim YM, Kwon H. *One-stage skin grafting of the exposed skull with acellular human dermis (AlloDerm).* J Craniofac Surg. 2008 Nov;19(6):1660-2. Review.
- 62) Katerinaki E, Zanetto U, Sterne GD. *Histological appearance of Strattice tissue matrix used in breast reconstruction.* J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2010 Dec;63(12):e840-1.

- 63) Huston TL, Taback B, Rohde CH. *Chest wall reconstruction with porcine acellular dermal matrix (strattice) and a latissimus myocutaneous flap*. Am Surg. 2011 Jun;77(6):115-6.
- 64) Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. *Decellularization of tissues and organs*. Biomaterials. 2006 Jul;27(19):3675-83. Epub 2006 Mar 7. Review.
- 65) Jackson DW, Grood ES, Cohn BT, Arnoczky SP, Simon TM, Cummings JF. *The effects of in situ freezing on the anterior cruciate ligament. An experimental study in goats*. J Bone Joint Surg Am. 1991 Feb;73(2):201-13.
- 66) Gulati AK. *Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve*. J Neurosurg. 1988 Jan;68(1):117-23.
- 67) Freytes DO, Badylak SF, Webster TJ, Geddes LA, Rundell AE. *Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds*. Biomaterials. 2004 May;25(12):2353-61.
- 68) Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, König K, Riemann I, Halbhuber KJ, Wahlers T, Stock UA. *Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves*. J Struct Biol. 2003 Sep;143(3):201-8.
- 69) Pruss A, Kao M, Kiesewetter H, von Versen R, Pauli G. *Virus safety of avital bone tissue transplants: evaluation of sterilization steps of spongiosa cuboids using a peracetic acid-methanol mixture*. Biologicals. 1999 Sep;27(3):195-201.

- 70) Wilshaw SP, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. *Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering*. Tissue Eng. 2006 Aug;12(8):2117-29.
- 71) Seddon AM, Curnow P, Booth PJ. *Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera*. Biochim Biophys Acta. 2004 Nov 3;1666(1-2):105-17.
- 72) Woods T, Gratzner PF. *Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft*. Biomaterials. 2005 Dec;26(35):7339-49.
- 73) Gailit J, Ruoslahti E. *Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cations*. J Biol Chem. 1988 Sep 15;263(26):12927-32.
- 74) Moore R, Madara JL, MacLeod RJ. *Enterocytes adhere preferentially to collagen IV in a differentially regulated divalent cation-dependent manner*. Am J Physiol. 1994 Jun;266(6 Pt 1):G1099-107.
- 75) Petersen TH, Calle EA, Colehour MB, Niklason LE. *Matrix Composition and Mechanics of Decellularized Lung Scaffolds*. Cells Tissues Organs. 2011 Apr 18.
- 76) Bader A, Schilling T, Teebken OE, Brandes G, Herden T, Steinhoff G, Haverich A. *Tissue engineering of heart valves--human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves*. Eur J Cardiothorac Surg. 1998 Sep;14(3):279-84.
- 77) Teebken OE. , Bader A, Steinhoff G, Haverich A. *Tissue engineering of vascular grafts: human cell seeding of decellularised porcine matrix*. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2000 Apr;19(4):381-6.

- 78) Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. *Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods*. Eur J Cardiothorac Surg. 2005 Apr;27(4):566-71.
- 79) Flynn L, Semple JL, Woodhouse KA. *Decellularized placental matrices for adipose tissue engineering*. J Biomed Mater Res A. 2006 Nov;79(2):359-69.
- 80) Zhou J, Fritze O, Schleicher M, Wendel HP, Schenke-Layland K, Harasztosi C, Hu S, Stock UA. *Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity*. Biomaterials. 2010 Mar;31(9):2549-54. Epub 2010 Jan 12.
- 81) Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, Rieder E, Wolner E. *Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients*. Eur J Cardiothorac Surg. 2003 Jun;23(6):1002-6; discussion 1006.
- 82) Glowacki J, Mizuno S. *Collagen scaffolds for tissue engineering*. Biopolymers. 2008 May;89(5):338-44. Review.
- 83) Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. *Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function*. Acta Biomater. 2009 Jan;5(1):1-13. Epub 2008 Oct 2. Review.
- 84) Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, Taylor DA. *Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart*. Nat Med. 2008 Feb;14(2):213-21. Epub 2008 Jan 13.

- 85) Cen L, Liu W, Cui L, Zhang W, Cao Y. *Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications*. *Pediatr Res*. 2008 May;63(5):492-6. Review.
- 86) Maeshima Y, Colorado PC, Torre A, Holthaus KA, Grunkemeyer JA, Ericksen MB, Hopfer H, Xiao Y, Stillman IE, Kalluri R. *Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane*. *J Biol Chem*. 2000 Jul 14;275(28):21340-8.
- 87) Keefe J, Wauk L, Chu S, DeLustro F. *Clinical use of injectable bovine collagen: a decade of experience*. *Clin Mater*. 1992;9(3-4):155-62. Review.
- 88) Herford AS, Akin L, Cicciu M, Maiorana C, Boyne PJ. *Use of a porcine collagen matrix as an alternative to autogenous tissue for grafting oral soft tissue defects*. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Jul;68(7):1463-70. Epub 2010 Apr 22.
- 89) Wang Y, Cui FZ, Hu K, Zhu XD, Fan DD. *Bone regeneration by using scaffold based on mineralized recombinant collagen*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008 Jul;86(1):29-35.
- 90) Rosenbloom J, Abrams WR, Mecham R. *Extracellular matrix 4: the elastic fiber*. *FASEB J*. 1993 Oct;7(13):1208-18. Review.
- 91) Daamen WF, Veerkamp JH, van Hest JC, van Kuppevelt TH. *Elastin as a biomaterial for tissue engineering*. *Biomaterials*. 2007 Oct;28(30):4378-98. Epub 2007 Jul 12. Review.
- 92) Paule WJ, Bernick S, Strates B, Nimni ME. *Calcification of implanted vascular tissues associated with elastin in an experimental animal model*. *J Biomed Mater Res*. 1992 Sep;26(9):1169-77.

- 93) Kim SH, Turnbull J, Guimond S. *Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor*. J Endocrinol. 2011 May;209(2):139-51. Epub 2011 Feb 9. Review.
- 94) Hynes RO. *The extracellular matrix: not just pretty fibrils*. Science. 2009 Nov 27;326(5957):1216-9. Review.
- 95) Takada Y, Ye X, Simon S. *The integrins*. Genome Biol. 2007;8(5):215.
- 96) Faraldo MM, Deugnier MA, Thiery JP, Glukhova MA. *Growth defects induced by perturbation of beta1-integrin function in the mammary gland epithelium result from a lack of MAPK activation via the Shc and Akt pathways*. EMBO Rep. 2001 May;2(5):431-7.
- 97) Tennenbaum T, Li L, Belanger AJ, De Luca LM, Yuspa SH. *Selective changes in laminin adhesion and alpha 6 beta 4 integrin regulation are associated with the initial steps in keratinocyte maturation*. Cell Growth Differ. 1996 May;7(5):615-28.
- 98) Couchman JR, Woods A. *Syndecan-4 and integrins: combinatorial signaling in cell adhesion*. J Cell Sci. 1999 Oct;112 (Pt 20):3415-20. Review.
- 99) Slevin M, Krupinski J, Gaffney J, Matou S, West D, Delisser H, Savani RC, Kumar S. *Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways*. Matrix Biol. 2007 Jan;26(1):58-68. Epub 2006 Sep 19. Review.
- 100) Rahman S, Patel Y, Murray J, Patel KV, Sumathipala R, Sobel M, Wijelath ES. *Novel hepatocyte growth factor (HGF) binding domains on fibronectin and*

vitronectin coordinate a distinct and amplified Met-integrin induced signalling pathway in endothelial cells. BMC Cell Biol. 2005 Feb 17;6(1):8.

- 101) Schönherr E, Hausser HJ. *Extracellular matrix and cytokines: a functional unit.* Dev Immunol. 2000;7(2-4):89-101. Review.
- 102) Nathan C, Sporn M. *Cytokines in context.* J Cell Biol. 1991 Jun;113(5):981-6. Review
- 103) Batacchi S, Matano S, Nella A, Zagli G, Bonizzoli M, Pasquini A, Anichini V, Tucci V, Manca G, Ban K, Valeri A, Peris A. *Vacuum-assisted closure device enhances recovery of critically ill patients following emergency surgical procedures* Crit Care. 2009;13(6):R194
- 104) Maxhimer JB, Hui-Chou HG, Rodriguez ED. *Clinical applications of the pedicled anterolateral thigh flap in complex abdominal-pelvic reconstruction.* Ann Plast Surg. 2011 Mar;66(3):285-91
- 105) Fejjal N, Hafidi J, Belmir R, El Mazouz S, Abbassi A, Lahlou K, Gharib N. *Two-stage free latissimus dorsi flap: A safe strategy for reconstruction of large defects of the abdominal wall.* J Plast Surg Hand Surg. 2013 Apr 3.
- 106) Tiengo C., Pontini A., Azzena B., *Combined use of homologous fascia lata graft and acellular dermal substitute for the repair of a complex abdominal wound* European Journal of Plastic Surgery February 2013, Volume 36, Issue 2, pp 125-129
- 107) Levi DM, Tzakis AG, Kato T, Madariaga J, Mittal NK, Nery J, Nishida S, Ruiz P. *Transplantation of the abdominal wall* Lancet. 2003 Jun 28;361(9376):2173-6.

- 108) Selvaggi G, Levi DM, Cipriani R, Sgarzani R, Pinna AD, Tzakis AG *Abdominal wall transplantation: surgical and immunologic aspects* Transplant Proc. 2009 Mar;41(2):521-2.
- 109) Matthew T. Wolf , Kerry A. Daly , Janet E. Reing , Stephen F. Badylak *Biologic scaffold composed of skeletal muscle extracellular matrix* Biomaterials 33 (2012) 2916e2925
- 110) Rodriguez M, Juran C, McClendon M, Eyadiel C, McFetridge PS. *Development of a mechanically tuneable 3D scaffold for vascular reconstruction.* J Biomed Mater Res Part A 2012;100A:3480–3489.
- 111) Wang L., Johnson AJ, Chang DW, Zhang Q., *Decellularized musculofascial extracellular matrix for tissue engineering* Biomaterials 34 (2013) 2641e2654
- 112) Flynn LE. *The use of decellularized adipose tissue to provide an inductive microenvironment for the adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells.* Biomaterials. 2010 Jun;31(17):4715-24. Epub 2010 Mar 20.
- 113) Rodriguez LV, Alfonso Z., Zhang R., Leung J., Wu B., Ignarro LJ *Clonogenic multipotent stem cells in human adipose tissue differentiate into functional smooth muscle cells* PNAS August 8, 2006 vol. 103 no. 32 12167–12172
- 114) Conconi MT, De Coppi P, Bellini S., Zara G., Sabatti M., Marzaro M., Zanon G, Gamba PG, Parnigotto P, Nussdorfer G, *Homologous muscle acellular matrix seeded with autologous myoblasts as a tissue-engineering approach to abdominal wall-defect repair* Biomaterials 26 (2005) 2567–2574

- 115) Zang M, Zhang Q, Chang EI, Mathur AB, Yu P. *Decellularized tracheal matrix scaffold for tissue engineering* Plast Reconstr Surg. 2012 Sep;130(3):532-40.
- 116) Gamba PG, Conconi MT, Lo Piccolo R, Zara G, Spinazzi R, Parnigotto PP, *Experimental abdominal wall defect repaired with acellular matrix* Pediatr Surg Int (2002) 18: 327–331
- 117) Jeremy J. Song and Harald C. Ott *Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds* Trends in Molecular Medicine August 2011, Vol. 17, No. 8- Review
- 118) Fahrenbach EN, Qi C, Ibrahim O, Kim JY, Alam M. *Resistance of Acellular Dermal Matrix Materials to Microbial Penetration*. JAMA Dermatol. 2013 Feb 20:1-5

RINGRAZIAMENTI :

Desidero ringraziare innanzitutto il Dott. Cipriani, per avermi sempre dato la spinta, la fiducia e i necessari insegnamenti per far fruttare le mie conoscenze.

Ringrazio tantissimo la Prof. Conconi, donna e docente davvero straordinaria, di una squisita disponibilità e umanità.

Ringrazio il Prof. Bassetto, con tanta gratitudine per avermi accettata a Padova nel suo reparto.

Ringrazio il Dott. Pontini e il Dott. Vindigni, “veri” artefici di gran parte di questo lavoro.

Ringrazio tutti i miei pazienti, per quanto hanno saputo insegnarmi, migliorarmi e rafforzarmi nella convinzione che, dopotutto, quanto facciamo vale la pena farlo proprio per loro

... e ringrazio Giulio, che mi ha permesso di finire questa tesi aspettando di nascere a fine dicembre..