

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA DEI
MATERIALI



Tesi di Laurea Magistrale in Ingegneria dei Materiali

**ANALISI DELLA FUNZIONALITA'
BIOMECCANICA DI UN INNESTO DI TESSUTO
MUSCOLARE DIAFRAMMATICO**

Laureanda: Giovanna Dall'Amico

Relatore: Prof. Piero Pavan

Correlatore: Dott. Niccolò de Cesare

ANNO ACCADEMICO 2017-2018

Introduzione

L'ernia diaframmatica congenita è una delle patologie più gravi a carico di una delle strutture fondamentali coadiuvanti l'atto respiratorio, quale è il muscolo diaframmatico; questa patologia neonatale ad elevata incidenza (1 neonato su 3000), oltre ad un alto tasso di mortalità nell'immediato post parto, che si attesta intorno al 50% dei neonati che nascono con questa malformazione, produce anche un altrettanto elevato grado di morbidità in quei soggetti che riescono a superare il primo anno di vita, a causa dello sviluppo di complicazioni oltre che a livello respiratorio, anche a livello gastrointestinale, scheletrico e psicomotorio.

Ad ora, la soluzione più adottata per la riparazione di questo foro nel diaframma è l'utilizzo di un innesto di materiale sintetico non bio-riassorbibile (Gore-Tex) che costringe il neonato a subire numerosi interventi chirurgici di sostituzione del materiale che, a causa della sua eccessiva rigidità, non permette la compatibilità dell'innesto con il progredire della crescita fisiologica del neonato. Quest'ultimo è uno dei principali limiti che hanno spinto la ricerca verso soluzioni di trattamento di tipo biologico.

Il presente studio di tesi è stato svolto a supporto di un progetto più ampio e su più livelli, condotto in collaborazione con l'Istituto di Ricerca Pediatrica Fondazione Città della Speranza di Padova, a favore di una soluzione di cura sempre più orientata all'utilizzo dell'ingegneria tissutale, con particolare attenzione rivolta verso le potenzialità mostrate dall'utilizzo di un impianto costituito di matrice extracellulare (ECM), in grado di indurre nel tempo risposte biologiche rigenerative.

E' stata svolta un'analisi a livello computazionale che supportasse prove sperimentali di funzionalità eseguite su porzioni di tessuto muscolare diaframmatico di topo, sia operato con innesto biologico di matrice extracellulare (ECM), sia trattato con un innesto sintetico di Goretex e sulle rispettive porzioni controlaterali sane. Lo scopo delle prove sperimentali è stata la valutazione della funzionalità biomeccanica mostrata dalle porzioni di diaframma operate con il *patch* rispetto alle loro porzioni controlaterali sane.

A supporto dell'analisi delle prove sperimentali, sono stati costruiti dei modelli ad elementi finiti che rappresentassero le porzioni di diaframma testate, basati sulla loro

geometria specifica, attraverso cui simulare i dati sperimentali e consentire una descrizione ed una valutazione più dettagliata della risposta biomeccanica delle fibre muscolari, intaccate dalla presenza degli innesti riparativi, in relazione a ciò che è stato ricavato sperimentalmente. Questo è stato possibile grazie ad una descrizione matematica del comportamento costitutivo meccanico delle fibre muscolari e, in particolare, della struttura dei sarcomeri, simulata numericamente attraverso il modello costitutivo di Hill a tre elementi.

Indice

1 Introduzione e scopo	1
1.1 Tessuto muscolare.....	1
1.1.1 Tessuto muscolare scheletrico.....	1
1.1.2 Biomeccanica di contrazione delle fibre muscolari.....	2
1.1.3 Risposta biologica delle fibre muscolari.....	3
1.2 Muscolo diaframma.....	3
1.3 Ernia diaframmatica congenita.....	5
1.3.1 Mortalità e morbilità.....	6
1.3.2 Diagnosi e trattamenti di riparazione.....	6
1.4 Matrice extracellulare.....	7
1.4.1 L'ECM come scaffold biologico.....	8
1.5 Decellularizzazione e Ricellularizzazione.....	8
2 Materiali e metodi	11
2.1 Prove sperimentali.....	11
2.1.1 Preparazione dei provini.....	12
2.1.2 Setup dell'esperimento.....	14
2.1.3 Condizioni sperimentali.....	16
2.1.4 Analisi dei dati sperimentali.....	16
2.2 Modelli ad elementi finiti	20
2.2.1 La geometria.....	20
2.2.2 Definizione delle sezioni e dei materiali.....	25
2.2.3 Mesh.....	26
2.3 Modello costitutivo per le fibre muscolari.....	28
2.3.1 Descrizione del modello costitutivo di Hill a tre elementi.....	29
2.4 Analisi agli elementi finiti.....	32
2.4.1 Step e condizioni di vincolo.....	32
2.4.2 Implementazione del modello costitutivo di Hill a tre elementi.....	33

3 Risultati e discussione	41
3.1 Risultati sperimentali.....	41
3.2 Risultati numerici.....	42
4 Conclusioni	45
Bibliografia	47

Elenco delle figure

1.1	Struttura gerarchica del tessuto muscolare scheletrico.....	2
1.2	Anatomia del diaframma.....	4
1.3	Fasi della respirazione.....	4
1.4	Tipologie più frequenti di ernia diaframmatica congenita.....	5
1.5	Metodi di riparazione dell'ernia diaframmatica.....	7
1.6	Cellule satelliti nella rigenerazione muscolare.....	8
2.1	Procedura per ricavare le porzioni di diaframma.....	13
2.2	Porzioni di diaframma ricavate per le prove sperimentali.....	13
2.3	Componenti del setup di stimolazione elettrofisiologica	14
2.4	Apparato sperimentale.....	15
2.5	Dettagli dell'apparato sperimentale.....	15
2.6	Traccia di <i>twitch</i> visualizzata dal software Labscribe.....	17
2.7	Curve sperimentali medie di <i>twitch</i> per le quattro porzioni di diaframma.....	19
2.8	Curva sperimentale rappresentativa della durata del <i>twitch</i>	20
2.9	Emidiaframma Goretex controlaterale.....	21
2.10	Spessori nelle diverse regioni del diaframma di topo.....	22
2.11	Geometria CAD della porzione di diaframma controlaterale operato con Goretex...23	
2.12	Curve di base e geometrie CAD delle porzioni di diaframma.....	25
2.13	Modelli in Abaqus per le porzioni di diaframma operate con ECM e con Goretex....28	
2.14	Modello di Hill a tre elementi.....	29
2.15	Versori (rosso) che orientano localmente le fibre muscolari.....	34
2.16	Curve di <i>twitch</i> (forza-tempo) per i modelli FE delle porzioni di diaframma.....	37
2.17	Analisi agli elementi finiti. Deformazioni logaritmiche.....	39

Elenco delle tabelle

2.1 Parametri della stimolazione nervosa.....	16
2.2 Valori medi di tensione basale, tensione massima e tensione di <i>twitch</i> e della forza ad esse corrispondente per le quattro porzioni di diaframma.....	19
2.3 Spessore medio scelto per ciascuna regione della porzione di diaframma.....	22
2.4 Proprietà materiali usati nelle simulazioni.....	26
2.5 Regione del modello e tipologia di elemento finito associato.....	27
2.6 Valori della massima tensione di contrazione di <i>twitch</i> , P_t per ciascun modello di emidiaframma.....	35

1 Introduzione e scopo

In questo capitolo verranno descritte brevemente anatomia, istologia e biomeccanica del muscolo diaframmatico, sarà presentata la patologia dell'ernia diaframmatica congenita e lo stato dell'arte nella cura di tale malformazione, infine saranno descritti la biologia della matrice extracellulare (ECM) ed i processi di decellularizzazione e ricellularizzazione di quest'ultima, come metodo di ingegneria tissutale possibile per la cura dell'ernia diaframmatica.

1.1 Tessuto muscolare

Le cellule muscolari sono essenzialmente di due tipi: lisce o striate, dipendentemente dalla presenza o meno di miofilamenti all'interno del citoplasma che si dispongono in maniera ordinata e ripetuta a formare i cosiddetti sarcomeri, unità contrattili tipiche del tessuto muscolare striato. Il tessuto muscolare liscio si ritrova in generale nei muscoli involontari (pareti di molti visceri e tonaca muscolare dei vasi), mentre il tessuto muscolare striato è tipico dei muscoli volontari. Quest'ultimo si suddivide in tessuto muscolare scheletrico, di cui è costituito anche il muscolo diaframmatico, e tessuto muscolare cardiaco, che costituisce il miocardio.

1.1.1 Tessuto muscolare scheletrico

Il tessuto muscolare scheletrico è costituito da fibre muscolari striate, elementi molto allungati e polinucleati con sostanza contrattile trasversalmente striata⁵. Una fibra muscolare è composta da fasci raggruppati di miofibre circondati dal perimisio, il quale a sua volta è contenuto all'interno di una seconda membrana detta epimisio⁵. Le miofibre si estendono longitudinalmente per tutta la lunghezza del muscolo, attaccandosi all'osso

mediante le giunzioni miotendinee. Esse sono costituite dalla giustapposizione di singole cellule multinucleate dette miofibrille⁹. Ciascuna miofibrilla è una successione di unità contrattili elementari detti sarcomeri. I sarcomeri sono a loro volta costituiti da filamenti proteici di spessore diverso: i filamenti sottili di actina e i filamenti più spessi di miosina; il loro accostamento e successione nella miofibrilla conferisce la tipica striatura a bande che caratterizza questo tipo di tessuto muscolare (Figura 1.1). Le miofibre sono circondate da una lamina basale sotto la quale è presente una popolazione di cellule muscolari progenitrici, le cellule satelliti, in stato mitoticamente quiescente⁹.

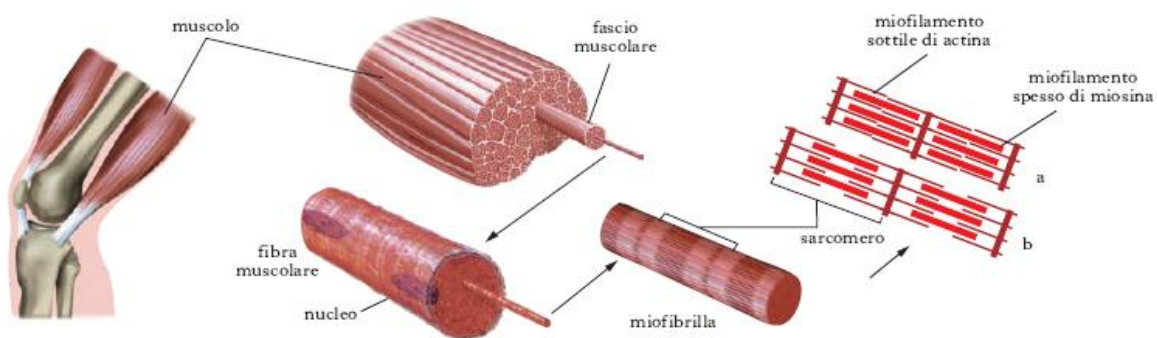


Figura 1.1 – Struttura gerarchica del tessuto muscolare scheletrico.

1.1.2 Biomeccanica di contrazione delle fibre muscolari

Nonostante il meccanismo di contrazione dei sarcomeri non sia ancora pienamente compreso, la teoria più accreditata è la cosiddetta *Cross Bridge Theory*, per cui si ha la formazione di ponti trasversali ATP(*Adenosine triphosphate*)-dipendenti durante l'attivazione muscolare tra le teste della miosina e gli appositi siti dell'actina con la generazione di una forza in grado di causare il conseguente movimento relativo tra i due miofilamenti¹³.

In condizioni fisiologiche i muscoli scheletrici vengono attivati dai motoneuroni, a loro volta governati dal sistema nervoso volontario, producendo un evento contrattile denominato *twitch*, che in media dura circa 150 ms. La stimolazione può anche essere data con impulsi elettrici o chimici, artificialmente prodotti. La stimolazione elettrica induce il rilascio di ioni Ca^{2+} che, migrando all'interno della cellula muscolare, attivano i ponti tra le teste della miosina e gli specifici siti dell'actina¹³.

1.1.3 Risposta biologica delle fibre muscolari

Le prestazioni di un muscolo scheletrico vengono descritte in modo completo da tre variabili: forza, lunghezza e tempo, dalle quali sono derivati velocità e lavoro meccanico. Generalmente si osserva che l'ampiezza e la forza contrattile sviluppate sono funzione della frequenza della stimolazione. Al di sopra di una determinata frequenza (6,6Hz) si verificano progressivamente la somma e la fusione dei singoli *twitch*, con relativo aumento della forza contrattile, fino ad un valore limite al quale la forza di contrazione si stabilizza ad un valore massimo, e non incrementa con l'ulteriore incremento della frequenza: questa condizione viene definita regime tetanico.

Le tipologie di contrazione possibili nel muscolo scheletrico sono la contrazione isometrica e la contrazione isotonica. Quando il muscolo, nello specifico il singolo sarcomero, viene stimolato e allo stesso tempo mantenuto ad una lunghezza costante, si verifica una *contrazione isometrica* e la tensione sviluppata dal sarcomero è funzione della sua lunghezza, ovvero della sovrapposizione dei miofilamenti; la tensione massima si sviluppa quando il sarcomero è mantenuto a lunghezze fisiologiche (riposo), mentre per lunghezze inferiori o superiori a quella ottimale lo sviluppo di forza è inferiore a causa della minore interazione dei miofilamenti. Quando il muscolo è lasciato libero di accorciarsi/allungarsi sotto l'imposizione di un carico costante si parla invece di *contrazione isotonica*.

1.2 Muscolo diaframma

In riferimento all'anatomia umana, il diaframma è un muscolo a forma di cupola che separa la cavità addominale da quella toracica e può essere suddiviso in due regioni: costale e crurale. Il diaframma costale è un sottile strato di muscolo composto da miofibre che si estendono radialmente dalle costole fino al tendine centrale; il diaframma crurale, invece, risulta più spesso e si estende posteriormente, dove si inserisce nelle vertebre, e circonda l'esofago e l'aorta.

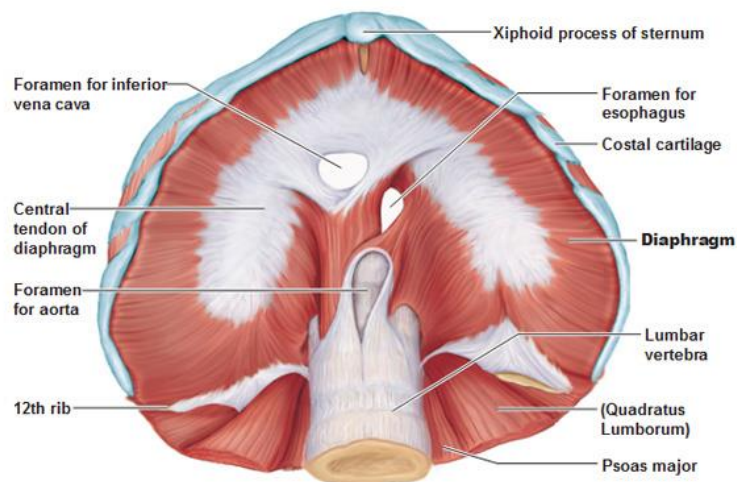


Figura 1.2 – Anatomia del diaframma.

Le miofibre che compongono le due regioni del diaframma si incontrano medialmente e inserzionano nel tendine centrale, situato all'apice della cupola diaframmatica. Il diaframma è innervato simmetricamente nelle due metà dal nervo frenico³ (Figura 1.2).

La funzione principale del diaframma si esplica durante la respirazione, in questa fase i muscoli si contraggono e come conseguenza si ha un appiattimento del diaframma e del tendine centrale, ciò permette alla cavità toracica di espandersi incrementando il suo volume e riducendo la pressione al suo interno, per far entrare l'aria all'interno dei polmoni; in fase di espirazione, invece, i muscoli del diaframma si rilassano nuovamente, il diaframma si rialza riprendendo la sua conformazione e ricomprimendo la cavità toracica, favorendo in questo modo l'espulsione dell'aria dai polmoni³ (Figura 1.3).

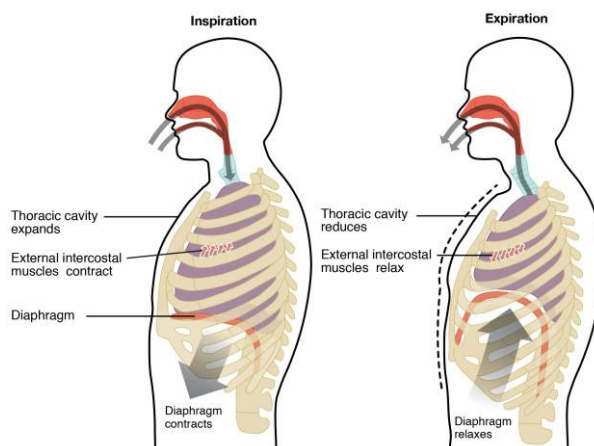


Figura 1.3 – Fasi della respirazione.

1.3 Ernia diaframmatica congenita

L'ernia diaframmatica congenita (*CDH-Congenital diaphragmatic hernia*) è una patologia che può generarsi nel feto fra la 4a e l'8a settimana di gestazione ed è caratterizzata nella maggioranza dei casi dalla non formazione di porzioni di diaframma. Tale condizione si verifica a seguito di una malformazione tra la cavità pleuroperitoneale e il *septum transversum*, con la generazione di un buco che consente ai visceri contenuti nella cavità addominale di protrudere all'interno del torace. L'ernia diaframmatica congenita viene riscontrata approssimativamente in 1 neonato su 3000, con prevalenza nel genere maschile.

La CDH è classificata a seconda della porzione di diaframma che coinvolge (Figura 1.4); si distinguono l'ernia diaframmatica di Bochdalek, che coinvolge una porzione di diaframma situato posterolateralmente e si riscontra in circa l'80-90% dei casi, con un'incidenza dell'85% sul lato sinistro, del 10% sul lato destro e il 5% bilateralmente, l'ernia diaframmatica di Morgagni, che si sviluppa anteriormente nella porzione retrosternale e approssimativamente nel 2% dei casi, ed infine, ma più raramente, ernie diaframmatiche poste centralmente.

La CDH può sorgere come difetto isolato, ma circa nel 40% dei casi è accompagnata da almeno un'altra anomalia addizionale; il difetto maggiormente correlato è il difetto congenito cardiaco (CHD) presente nel 20% dei pazienti circa^{1,14}.

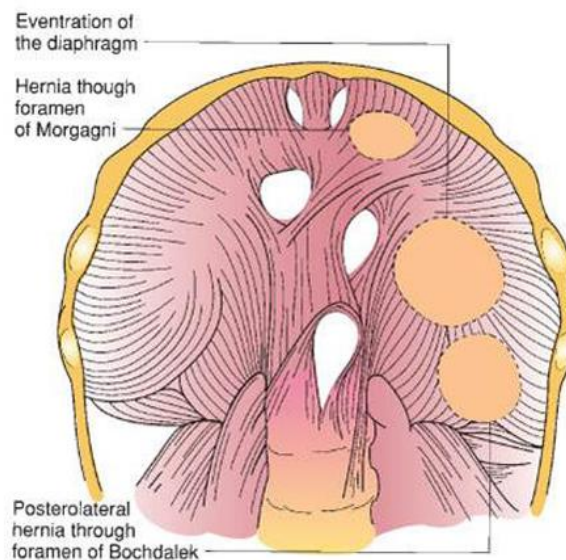


Figura 1.4 –Tipologie più frequenti di ernia diaframmatica congenita.

1.3.1 Mortalità e morbidità

La mortalità si attesta fra il 20% e il 60% ed è estremamente dipendente dalla dimensione del difetto diaframmatico e dal conseguente grado di complicazione a livello polmonare; uno dei maggiori problemi derivanti dalla presenza del difetto è, infatti, l'erniazione di alcuni visceri dalla cavità addominale all'interno del torace con la generazione di una compressione meccanica a livello dei polmoni in via di sviluppo, generando ipoplasia e ipertensione polmonare e causando deficit respiratori spesso molto seri. I soggetti che sopravvivono sono soggetti ad un elevato grado di morbidità nel periodo post-natale, nonostante le cure cui vengono sottoposti nell'immediato dopo parto; oltre a quelle respiratorie, si riscontrano spesso anche complicazioni a livello muscoloscheletrico, gastrointestinale e nello sviluppo neurologico del neonato^{2,15}.

1.3.2 Diagnosi e trattamenti di riparazione

Più del 50% dei casi di CDH sono diagnosticati in periodo prenatale, i metodi di diagnosi più ricorrenti sono tecniche di tipo indiretto quali ultrasuoni e risonanza magnetica con i quali è possibile visualizzare il volume di visceri (fegato ed intestino) presenti nella cavità toracica ed il relativo mal posizionamento del muscolo cardiaco. Tuttavia, nel 20-30% dei casi la malformazione può non venire diagnosticata e presentarsi quindi al momento della nascita con evidenti sintomi respiratori.

Il metodo classico di riparazione della CDH è di tipo chirurgico e prevede di norma un'incisione subcostale utile a riportare i visceri erniati all'interno della cavità addominale e alla riparazione del difetto diaframmatico. Per dimensioni del difetto più considerevoli, causati da un maggiore volume di visceri erniati, tale tecnica non è sufficiente e l'ernia deve essere riparata mediante innesto con materiale autologo, come tessuto addominale. Spesso si ricorre anche a materiale sintetico non biorassorbibile, tipicamente Gore-tex, che vada a chiudere il difetto^{2,4,16,17,18} (Figura 1.5). I neonati sottoposti a quest'ultima tipologia di riparazione devono tuttavia subire numerosi interventi nei primi anni di vita al fine di sostituire l'innesto. Quest'ultimo, infatti, a causa della sua rigidità ed evidente incapacità di rimodellamento non è in grado di seguire il progredire della crescita del circostante tessuto biologico naturale, producendo eccessivi stati di tensione fra diaframma e innesto sintetico che portano successivamente alla sua lacerazione quando la differenza di dimensione fra il difetto e l'innesto è eccessiva^{2,19,20}.

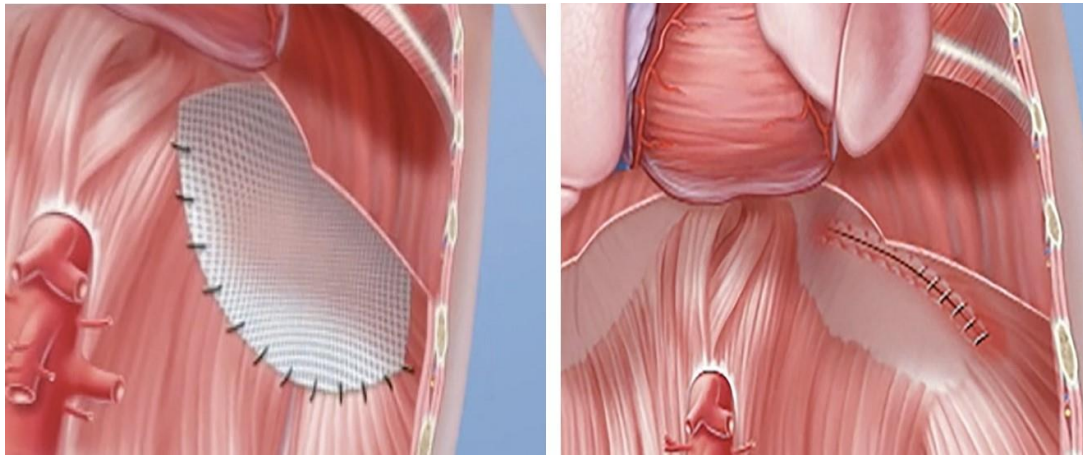


Figura 1.5 – Metodi di riparazione dell’ernia diaframmatica. Riparazione tramite innesto in Gore-tex (sinistra) e riparazione tramite incisione subcostale (destra).

Alla luce delle complicazioni cui va incontro il neonato a seguito del trattamento con tessuti di riparazione di tipo sintetico, la ricerca di una cura mira sempre di più all’utilizzo di tessuti di derivazione biologica da utilizzare come innesti, facendo affidamento quindi all’ingegneria tissutale e alla medicina rigenerativa.

1.4 Matrice Extracellulare

La matrice extra-cellulare (*extra cellular matrix, ECM*) è un’entità strutturale complessa che circonda e supporta le cellule dei tessuti e contiene numerosi pori attraverso cui diffondono le sostanze nutritive e l’ossigeno. L’ECM è composta da tre principali tipi di biomolecole, organizzate in un’architettura tridimensionale specifica per ciascun tessuto:

- Proteine strutturali quali Elastina e Collagene, quest’ultimo rappresenta il maggior costituente della matrice extra-cellulare oltre che il 25% delle proteine dell’intero corpo umano e, conservandosi nelle varie specie, permette l’utilizzo delle ECM xenogeniche come *scaffold* per la rigenerazione tissutale⁸;
- Glicoproteine quali Glicosaminoglicani (GAGs) e Proteoglicani;
- Proteine adesive.⁷

1.4.1 L'ECM come scaffold biologico

L'ECM non svolge solamente una funzione di stabilizzazione strutturale dei tessuti, ma anche un ruolo attivo nella regolazione dello sviluppo, della migrazione, della proliferazione, nonché della forma e funzione delle cellule a stretto contatto con essa⁷. La struttura e la composizione della ECM è in continua evoluzione in risposta all'attività metabolica delle cellule che la popolano. Questa "reciprocità dinamica" tra la ECM e le cellule che la colonizzano costituisce un vantaggio nell'uso della ECM come *scaffold* per l'ingegnerizzazione di tessuti anziché attraverso sostituti di tipo sintetico; utilizzare la ECM come *scaffold*, infatti, permette non soltanto di mantenere una struttura e composizione del tessuto quanto più possibile vicine a quelle naturali, ma i complessi segnali biochimici che essa sviluppa, anche in seno alla sua degradazione, giocano un ruolo importante nel mantenimento e nella rigenerazione del tessuto, nel modulare la migrazione e l'adesione delle cellule e dei fattori di crescita che regolano l'attivazione e la differenziazione delle cellule staminali o progenitrici del tessuto, nello specifico del tessuto muscolare scheletrico le cellule staminali che danno vita ai precursori miogenici e successivamente a nuove cellule muscolari sono dette cellule satelliti^{11,12} (Figura 1.6).

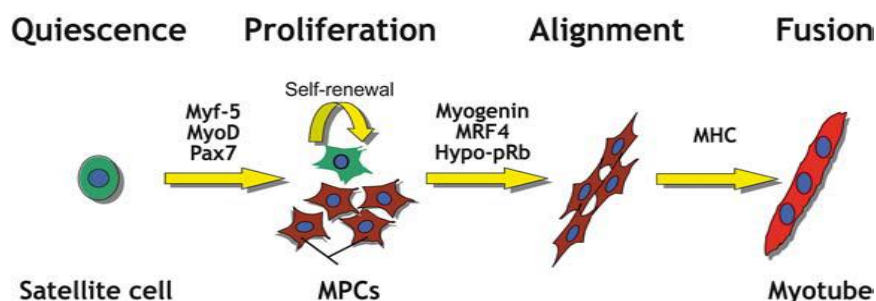


Figura 1.6 – Cellule satelliti nella rigenerazione muscolare.

1.5 Decellularizzazione e Ricellularizzazione

La decellularizzazione è una procedura che viene utilizzata per rimuovere la componente cellulare da un organo o da un tessuto mantenendo la struttura e la composizione native della matrice che li caratterizza, con l'obiettivo di ottenere un substrato quasi del tutto vergine da poter impiegare come *scaffold* tri-dimensionale per la costituzione di un nuovo organo o tessuto. La rimozione della componente cellulare dal tessuto od organo è necessaria affinché non si verifichino risposte immunitarie da parte della componente

cellulare allogenica o xenogenica che verrà utilizzata per il ripopolamento dello scaffold di ECM¹². Il risultato che si vuole ottenere attraverso la decellularizzazione è la completa rimozione della componente cellulare senza intaccare la composizione, l'attività biologica o l'integrità meccanica della rimanente matrice tri-dimensionale.

I metodi di decellularizzazione più utilizzati includono la perfusione di agenti chimici o enzimatici e metodi di tipo fisico come la sonicazione, il congelamento/scongelo, etc. Dal momento che è molto difficile ottenere la completa rimozione delle cellule solamente attraverso uno dei metodi sopra citati, spesso essi vengono utilizzati in combinazione per sfruttarne la sinergia ed ottimizzare l'efficienza del processo di rimozione¹².

La ricellularizzazione è, al contrario, una procedura di ripopolamento della matrice extracellulare, ottenuta da un tessuto precedentemente decellularizzato, con cellule selezionate. Lo scopo è quello di indurre la rigenerazione di tale tessuto mediante rimodellamento e successiva degradazione della ECM iniziale in seguito a proliferazione e differenziamento delle cellule seminate che conducono alla formazione di una nuova ECM e quindi di un nuovo tessuto a tutti gli effetti ingegnerizzato¹². Le metodologie di ricellularizzazione degli scaffold includono: coltura tradizionale di cellule, perfusione di organi isolati, metodi di ingegneria tissutale e terapie di trapianto cellulare. Le due principali fasi che caratterizzano il processo di ricellularizzazione sono la semina della popolazione di cellule selezionata in modo da ridistribuirle in una configurazione spaziale il più vicina possibile a quella in vivo e, successivamente, dalla loro coltura in perfusione al fine di preparare le cellule ad espletare la loro funzionalità in vivo¹².

2 Materiali e Metodi

In questo capitolo viene innanzitutto descritta la procedura sperimentale effettuata in laboratorio per le prove meccaniche sulle porzioni di diaframma operate e sulle corrispondenti porzioni controlaterali di controllo: preparazione dei provini, setup, condizioni sperimentali e analisi dei dati sperimentali. Successivamente si descrive il procedimento di costruzione di uno dei quattro modelli ad elementi finiti (FEM) sviluppati in questo lavoro al fine di replicare le porzioni di diaframma delle prove sperimentali, procedimento che è stato eseguito in modo analogo anche per gli altri 3 modelli. Infine, verrà descritta la procedura di analisi agli elementi finiti eseguita sui modelli al fine di riprodurre i risultati sperimentali.

2.1 Prove sperimentali

In riferimento all'obiettivo primario perseguito dal gruppo di ricercatori della Città della Speranza sull'ernia diaframmatica congenita, lo scopo delle prove sperimentali oggetto di questo lavoro di tesi, è stata la valutazione, su diaframmi di topo, dell'effetto della presenza di *patch* riparativo, sia sintetico (Goretex) che biologico (ECM), sulla risposta biomeccanica di contrazione delle fibre muscolari. Nella fase antecedente l'esecuzione degli esperimenti, il diaframma di due topi di tipo C57GFP, ceppo transgenico esprime una proteina fluorescente (*GFP- Green Fluorescent Protein*) sotto il controllo di un promotore tipico delle cellule di Schwann che avvolgono i nervi, è stato operato chirurgicamente per sostituire una porzione di tessuto muscolare con un innesto biologico costituito da matrice extracellulare (ECM) in uno dei due diaframmi, e con un *patch* di Goretex nell'altro. Le prove sperimentali sono state condotte a 90 giorni dall'intervento, quando i topi sono stati sacrificati e i due diaframmi espianati.

Per ciascun diaframma sono state ricavate due emiporzioni, una in cui è presente il sostituto di riparazione e la seconda, corrispondente controlaterale dal medesimo diaframma,

in cui è presente unicamente tessuto muscolare sano, che è stata utilizzata come controllo nell'esperimento

Sono state condotte due prove sperimentali separate, una per i due emidiaframmi relativi all'intervento con Goretex, e l'altra per quelli relativi all'intervento con ECM. Ciascuna delle due prove sperimentali ha previsto, in apposito *setup* che verrà descritto nel seguito, la stimolazione elettrica nervosa dell'emidiaframma operato e del suo controlaterale; è stata quindi indotta la contrazione delle fibre muscolari di cui è stato acquisito un segnale di tensione per mezzo di un trasduttore connesso al provino. I segnali di tensione registrati dal trasduttore sono quindi stati convertiti in misure di forza per una successiva valutazione della risposta funzionale data dall'emiporzione con *patch* di riparazione e la sua controlaterale di tessuto muscolare diaframmatico integro.

2.1.1 Preparazione dei provini

Le porzioni di diaframma utilizzate nelle prove sperimentali sono state dissezionate a partire dai due diaframmi interi, in modo da ottenere due emiporzioni di dimensioni confrontabili (Figura 2.1 (a)). Per ciascuna emiporzione si è avuta cura di conservare il corrispettivo nervo frenico, tramite cui verrà inviata la stimolazione muscolare; un singolo provino di diaframma si compone quindi di una parte di tendine centrale del diaframma, tramite la quale si conetterà il provino con il trasduttore, dalla porzione di tessuto muscolare diaframmatico e da una parte ossea formata dalle costole, alle quali si inserziona il muscolo diaframmatico. A ciascuna porzione di diaframma sono stati applicati due fili di cotone in corrispondenza della costola, che servono per fissare il provino al supporto che regge il muscolo durante l'esperimento. Un filo di cotone è stato annodato anche al nervo frenico, per facilitare l'operazione con cui questo è messo in contatto con i due elettrodi di stimolazione. Infine un ulteriore filo di cotone è stato annodato in corrispondenza del tendine per collegare l'emiporzione di diaframma al trasduttore di forza dell'apparato sperimentale (Figura 2.1, (b)). La porzione di diaframma è stata quindi fissata al supporto metallico che sorregge il provino durante la prova (Figura 2.1 (c)), prima di essere trasferita all'apparato di prova.

Le quattro porzioni di diaframma ricavate sono visibili in Figura 2.2: in alto in figura, l'innesto di ECM è individuato sul lato destro del provino appena sopra la costola, mentre quello di Goretex è situato al centro della porzione di tessuto muscolare; in basso, sotto a ciascun emidiaframma riparato, le corrispettive emiporzioni controlaterali sane.

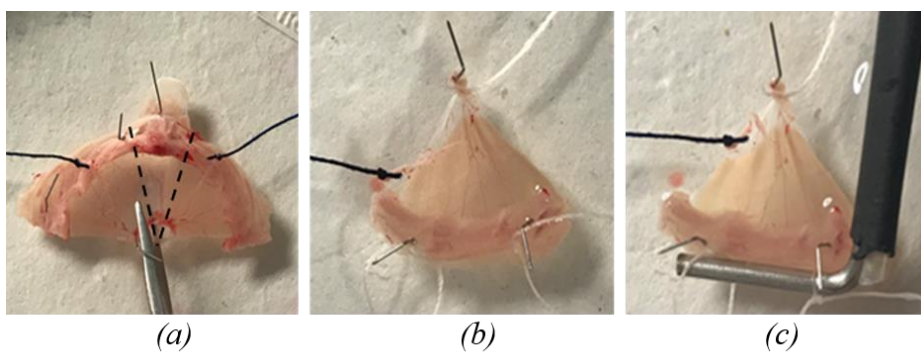


Figura 2.1 – Procedura per ricavare le porzioni di diaframma: dissezione delle emiporzioni di diaframma (a), applicazione dei fili di cotone (b) e fissaggio al supporto per il tessuto (c)

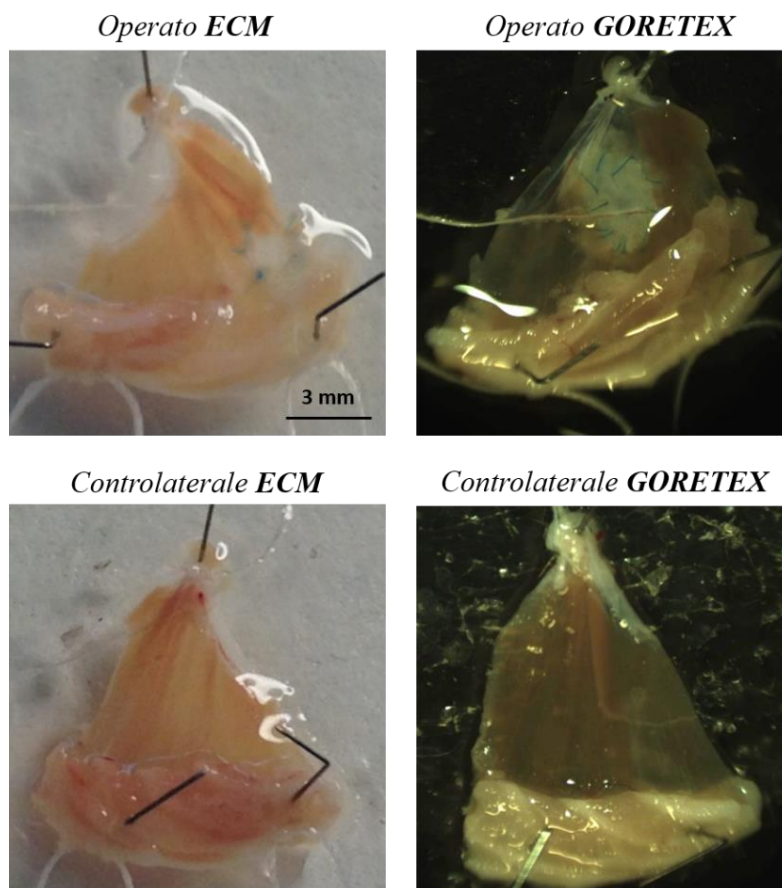


Figura 2.2 – Porzioni di diaframma ricavate per le prove sperimentali: porzione operata con ECM (alto a sinistra), porzione operata con patch in Goretex (alto a destra) e rispettive porzioni controlaterali di controllo (in basso).

2.1.2 Set up dell'esperimento

Per le prove sperimentali, sono stati utilizzati due apparecchi gemelli, uno dei quali è mostrato in Figura 2.3 (1), per poter accogliere ciascuno un emidiaframma e condurre la prova contemporaneamente sulla porzione operata e sulla sua porzione controlaterale di controllo; un singolo apparato si compone di una piccola cameretta (7) contenente un *buffer* di soluzione fisiologica (4 ml, Ringer's solution, 37°C) nella quale è immerso il muscolo fissato all'asticella di supporto (8), e nella quale è in aggiunta fatto gorgogliare ossigeno, tramite un tubicino esterno, per garantire la massima condizione fisiologica di supporto.

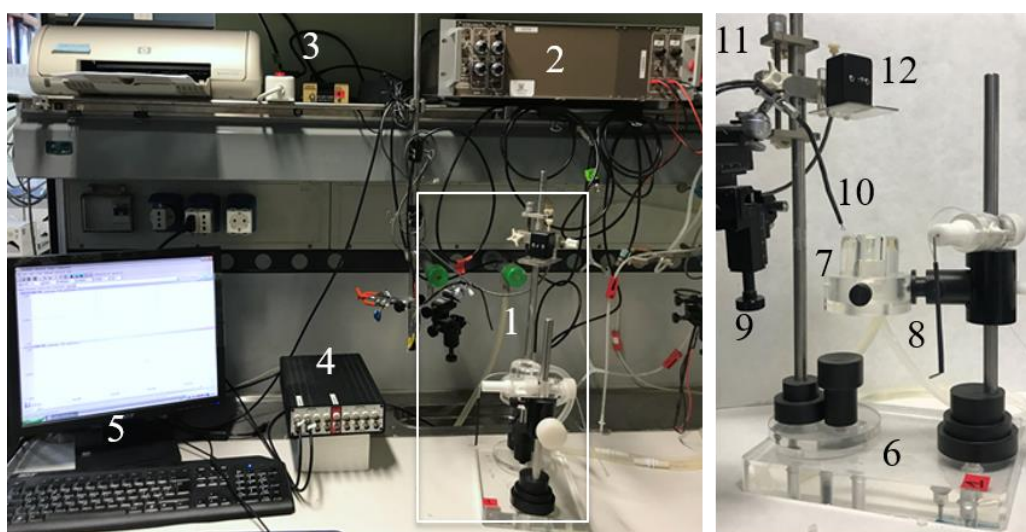


Figura 2.3 – (Sinistra) Componenti del setup di stimolazione. Cameretta di contenimento del muscolo (1), stimolatore (2), trasduttore di tensione (3), sistema di acquisizione dati (4), software di analisi Labscribe (5). (Destra) Dettagli del supporto per il muscolo. Base d'appoggio (6), cameretta per la stimolazione statica (7), supporto per il muscolo e cannula per l'apporto di ossigeno (8), viti micrometriche di regolazione (9,11), elettrodi di Platino (10) e trasduttore di tensione (12).

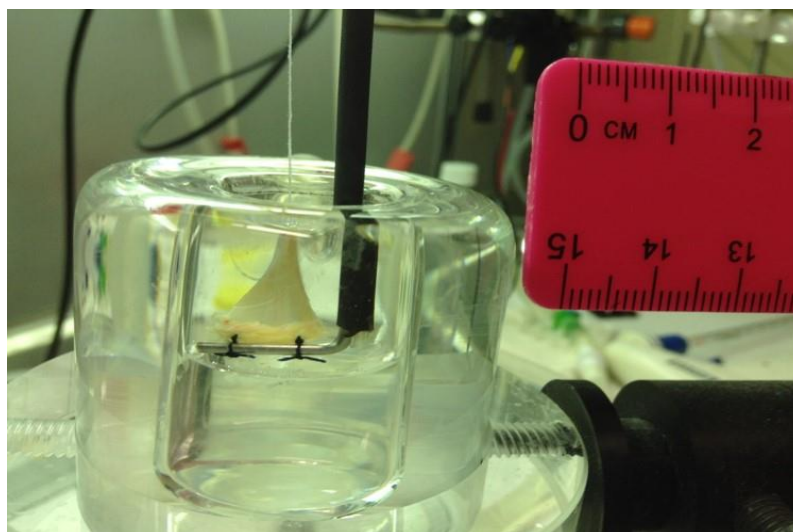


Figura 2.4 – Apparato sperimentale: dettaglio della cameretta di contenimento del muscolo e asticella di supporto del muscolo nella cameretta.

Una volta posizionato il muscolo nella cameretta, come mostrato in dettaglio in Figura 2.4, è stato fissato il filo di cotone, annodato alla componente tendinea che costituisce l'apice del provino, al trasduttore di tensione (Figura 2.5 (a)). È importante che il muscolo sia posizionato perpendicolarmente all'asse del trasduttore e siano evitati contatti tra il filo ed altre parti del setup, in modo da evitare frizioni che potrebbero alterare la misura e non avere una trasduzione completa della forza esercitata dal muscolo durante la sua contrazione (Figura 2.5 (b)).

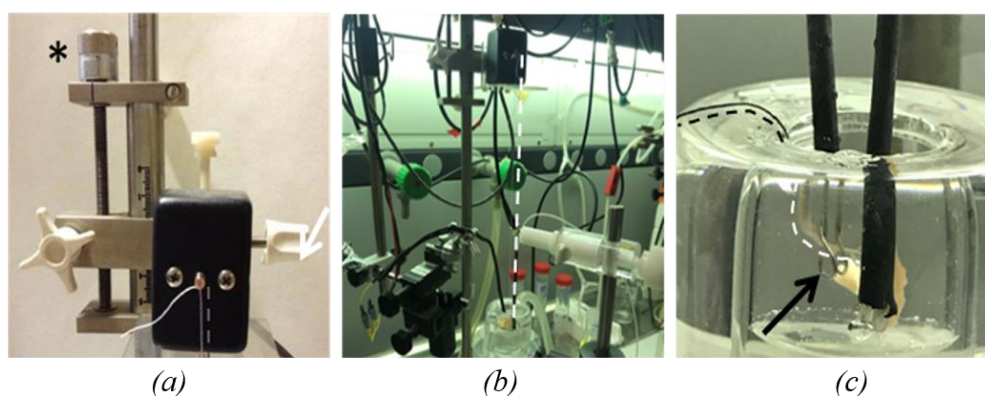


Figura 2.5 – Dettagli dell'apparato sperimentale: trasduttore di tensione isometrica e filo di cotone proveniente dal muscolo (a), connessione tra muscolo e trasduttore (b), posizionamento del nervo frenico fra i due elettrodi (c).

Successivamente, con l'aiuto del filo di cotone precedentemente annodato ad esso, il nervo frenico è stato messo a contatto con gli elettrodi inseriti nella cameretta, evitando il contatto diretto fra questi e la porzione di muscolo (Figura 2.5 (c)). Infine, attraverso la regolazione di una vite di precisione posta in corrispondenza del supporto del trasduttore (Figura 2.5 (a)), è stato applicato un pretensionamento al filo di cotone, corrispondente ad una tensione basale di circa 0.2 V, per tendere in posizione verticale la porzione di diaframma ad esso connessa. La medesima procedura di *setup* descritta è stata eseguita sia sulla porzione di diaframma operata che sulla sua emi-porzione controlaterale utilizzata come controllo.

2.1.3 Condizioni sperimentali

In ciascuno dei due esperimenti, la porzione di diaframma operata e la sua rispettiva porzione di controllo sono state stimulate in parallelo e con i medesimi parametri; ciascuna è stata quindi posizionata nella sua cameretta, connessa al suo trasduttore e stimolata per via nervosa attraverso gli elettrodi di Platino. La stimolazione nervosa è stata inviata con un'onda quadra tramite un generatore di tensione (Harvard Apparatus) in modo continuo. In base ai parametri utilizzati, e riassunti in Tabella 2.1, il tipo di stimolazione indotta è sufficiente ad attivare tutte le fibre muscolari (sopramassimale).

Tabella 2.1 – Parametri della stimolazione nervosa.

<i>Ampiezza (V)</i>	3
<i>Durata dell'onda quadra (ms)</i>	0.1
<i>Frequenza (Hz)</i>	0.1

Settati i parametri è stata indotta la stimolazione elettrica; prima di cominciare l'esperimento è stata necessaria una fase di stabilizzazione degli emidiaframmi, durante la quale si è aggiustato il pretensionamento dei provini attraverso regolazione micrometrica, il tutto al fine di ottenere un segnale di *twitch* regolare.

2.1.4 Analisi dei dati sperimentali

Il *twitch* è stato monitorato grazie al trasduttore di forza messo in collegamento con l'apice (tendine) del provino di diaframma. Lo scopo è quello di convertire (attraverso una relazione lineare) la forza meccanica esercitata dalla porzione di muscolo in una differenza

di potenziale leggibile attraverso il software Labscribe (iWorx Systems Inc., Dover, NH, USA) (Figura 2.3 A-2,3,4,5).

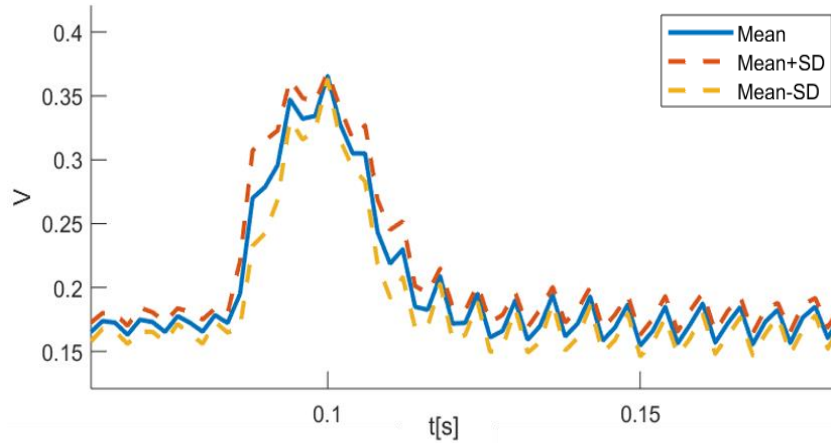
In ciascuno dei due esperimenti, la porzione di diaframma operato e la sua rispettiva porzione di controllo sono state stimulate contemporaneamente con i medesimi parametri; durante l'esecuzione dei due esperimenti, il software ha permesso la visualizzazione e la registrazione delle tracce di tensione acquisite dal trasduttore, per entrambe le porzioni di diaframma.

L'ampiezza di *twitch* è stata calcolata come differenza tra la tensione in corrispondenza del picco generato al momento dello stimolo di contrazione e la tensione basale media prima dello stimolo (Figura 2.6).

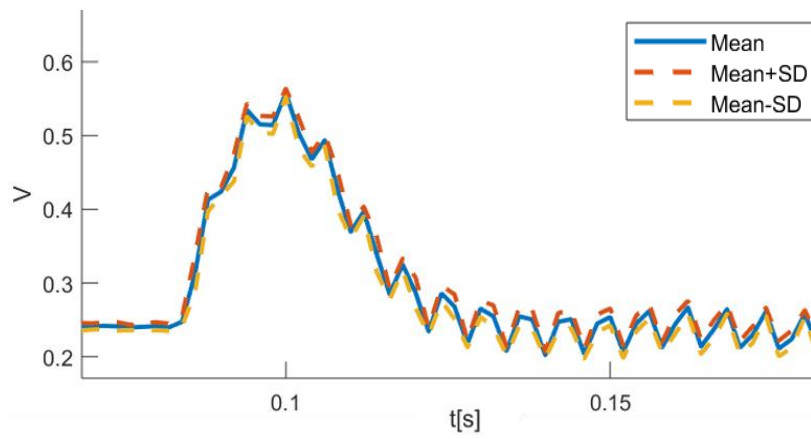


Figura 2.6 – Traccia di twitch visualizzata dal software Labscribe. Calcolo dell'ampiezza di twitch dai tracciati delle prove sperimentali.

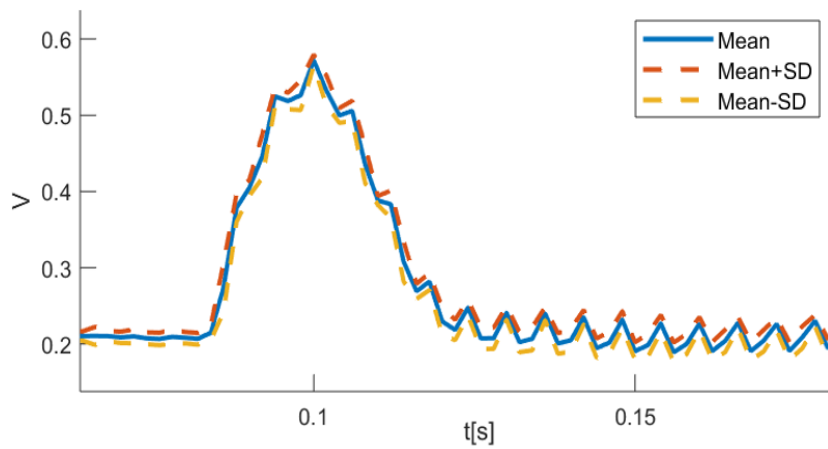
Per eliminare al meglio il rumore del segnale introdotto durante l'acquisizione, ed ottenere un valore riproducibile e rappresentativo delle curve di *twitch*, dai dati estratti è stata ricavata una curva sperimentale di *twitch* media (basata su 15-20 *twitch*) per ciascuna delle quattro porzioni di diaframma (Figura 2.7 (a),(b),(c),(d)).



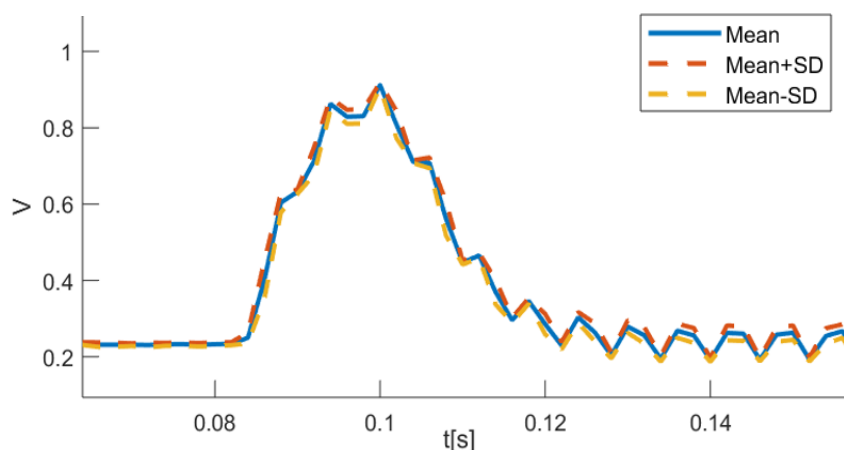
(a) Patch di ECM.



(b) Controllo ECM.



(c) Patch Goretex.



(d) Controllo Goretex.

Figura 2.7 – Curve sperimentali medie di twitch per le quattro porzioni di diaframma.

(a) patch ECM, (b) controllo ECM, (c) patch Goretex e (d) controllo Goretex.

Partendo dalle curve medie di twitch, per ciascuna porzione di diaframma, sono stati ricavati i seguenti parametri: tensione massima di twitch, tensione basale (*resting tension*) e, dalla differenza delle due, la tensione di twitch.

In Tabella 2.2 si riportano i valori medi di tensione; per essi è stato ricavato anche il corrispondente valore di forza (N), dato dalla conoscenza della corrispondenza lineare tra Volt e grammi che caratterizza il trasduttore utilizzato.

Tabella 2.2 – Valori medi di tensione basale, tensione massima e tensione di twitch e della forza ad esse corrispondente per le quattro porzioni di diaframma.

	<i>Patch ECM</i>	<i>Controllo ECM</i>	<i>Patch Goretex</i>	<i>Controllo Goretex</i>
<i>Tensione basale (V)</i>	0.16	0.25	0.21	0.24
<i>Tensione massimo (V)</i>	0.35	0.55	0.59	0.91
<i>Tensione di twitch (V)</i>	0.188	0.30	0.39	0.67
<i>Forza basale (N)</i>	0.0016	0.0024	0.0020	0.0024
<i>Forza massima (N)</i>	0.0034	0.0054	0.0058	0.0089
<i>Forza di twitch (N)</i>	0.0018	0.00297	0.00379	0.0066

È stata inoltre ricavata la durata media del *twitch*, molto simile per ogni porzione di diaframma, che va dall'istante di attivazione della contrazione in cui la tensione sul trasduttore comincia ad aumentare, fino al ristabilirsi della tensione basale dopo il rilassamento delle fibre; la durata totale media del *twitch*, in base ai parametri della stimolazione, è pari a 0,04 s, mentre il tempo impiegato per raggiungere la massima forza di *twitch* è di 0,016 s (Figura 2.8).

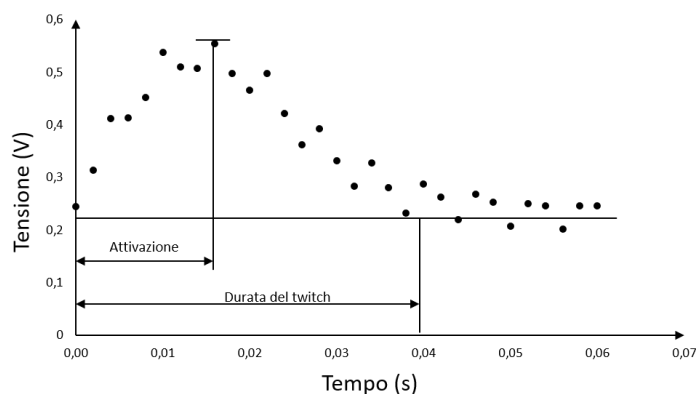


Figura 2.8 – Curva sperimentale rappresentativa della durata del *twitch*.

2.2 Modelli ad elementi finiti

Per meglio analizzare la funzionalità delle porzioni di diaframma e comprendere in maniera più approfondita la risposta delle fibre muscolari avuta nelle prove sperimentali, ci si è avvalsi dell'utilizzo della modellazione agli elementi finiti per correlare i dati sperimentali alla specifica geometria di ciascun emidiaframma; con lo strumento ABAQUS CAE (Simulia), è stato creato un modello solido per ciascuna delle quattro porzioni di diaframma, a partire dalle fotografie realizzate in laboratorio, sui quali sono stati poi costruiti ed analizzati i modelli di ciascun emidiaframma all'interno del software ABAQUS Standard 6.14-5 (Simulia).

2.2.1 La Geometria

Il primo passo per la creazione del modello delle porzioni di diaframma, con cui simulare e comparare la predizione numerica con i risultati sperimentali, è innanzitutto la riproduzione, quanto più verosimile, della geometria dei provini di diaframma.

Per creare la geometria dei modelli solidi 3D è stato usato il software per disegno ABAQUS CAE. Rispettando i rapporti geometrici, sono state riprodotte le curve di base per definire la morfologia della porzione di diaframma, a partire dalle immagini scattate al momento della preparazione dei provini in laboratorio. Le curve sono state create seguendo, mediante una *spline*, la morfologia 2D del campione; sono state distinte le tre aree corrispondenti ai diversi tipi di tessuto presenti nel campione: la porzione di tendine centrale, a cui sperimentalmente è collegato il trasduttore, la porzione di tessuto muscolare che compone il diaframma e la porzione costituita dalle costole del topo, che è utilizzata come ancoraggio del provino all'asticella di supporto nella cameretta di stimolazione. Sempre attraverso *spline* sono stati creati anche i bordi dei tre fori, che riproducono il passaggio dei fili di cotone con cui è stato collegato il diaframma alle componenti del setup di prova. In Figura 2.9 sono delineate, in bianco sulla foto, le curve che definiscono la morfologia di base del provino di emidiaframma controlaterale del Goretex.

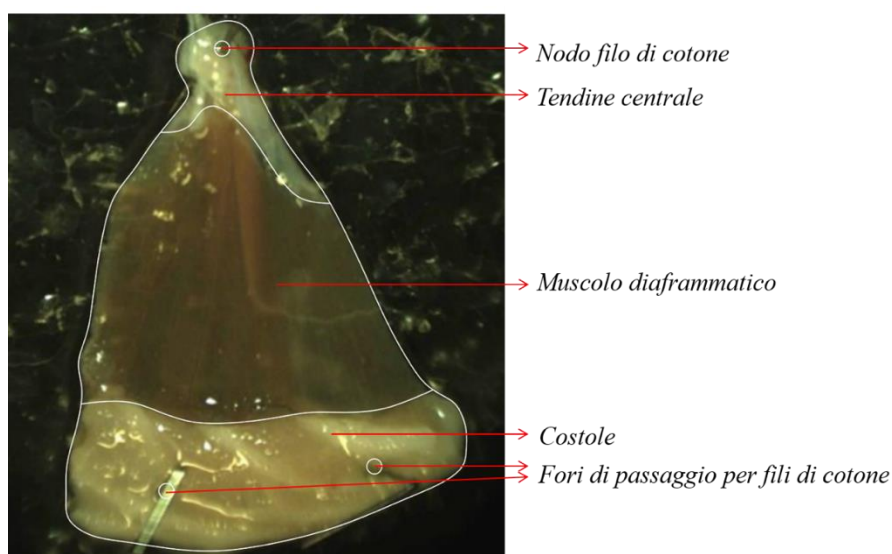


Figura 2.9 – Emidiaframma Goretex controlaterale. Foto del provino e curve di base che ne riprendono la morfologia.

Successivamente sono state create le superfici di base per ciascuna zona del provino a partire dalle curve di bordo precedentemente tracciate, queste sono state poi estruse in verticale, portando alla effettiva creazione dei solidi corrispondenti, di altezza arbitraria. Lo spessore del diaframma di topo varia a partire dal tendine centrale, dove lo spessore è

minore, fino alla costola progressivamente, dove raggiunge lo spessore maggiore (Figura 2.10).

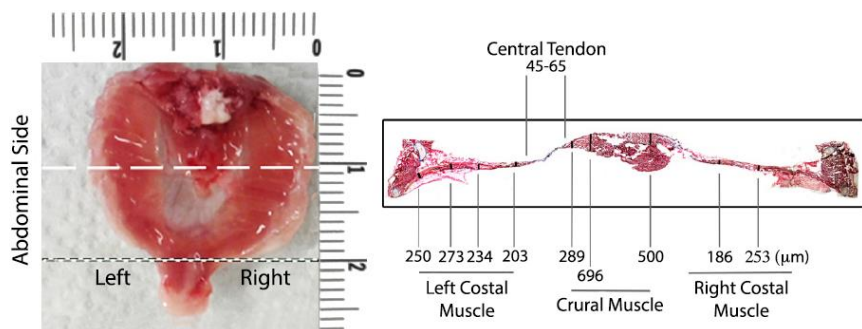


Figura 2.10 – Spessori nelle diverse regioni del diaframma di topo.

Per ricreare la variabilità di spessore lungo i modelli delle porzioni di diaframma, è stato scelto, per ciascuna regione di tessuto, un valore medio nell’ intervallo che li caratterizza, in riferimento a Figura 2.10.

In Tabella 2.3 sono riassunti gli spessori suddivisi per regione.

Tabella 2.3 – Spessore medio scelto per ciascuna regione della porzione di diaframma.

<i>Regione</i>	<i>Spessore (mm)</i>
<i>Tendine centrale</i>	0.075
<i>Muscolo</i>	0.200
<i>Costola</i>	0.280

Per riprodurre i valori di spessore scelti è stato definito, per ciascuna regione di tessuto del modello solido, un insieme di punti non allineati aventi come coordinata z (ortogonale al piano x-y di giacenza delle superfici di base) il valore dei tre spessori medi, attraverso tali punti è stato quindi definito lo spessore variabile dell’intera porzione di diaframma mediante un piano di taglio che, passante per tali punti, intersecasse il solido orizzontalmente (piano x-y) definendone lo spessore verosimile, variabile lungo il provino. In Figura 2.11 sono mostrate le quote principali della geometria CAD della porzione di diaframma controlaterale Goretex e la variabilità dello spessore procedendo dalla componente tendinea fino a quella costolare.

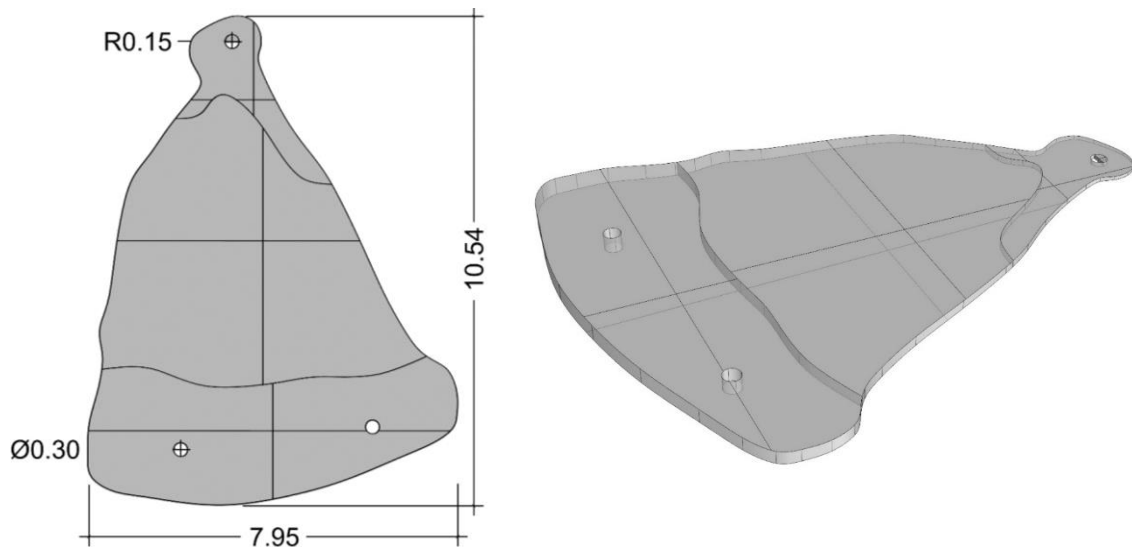
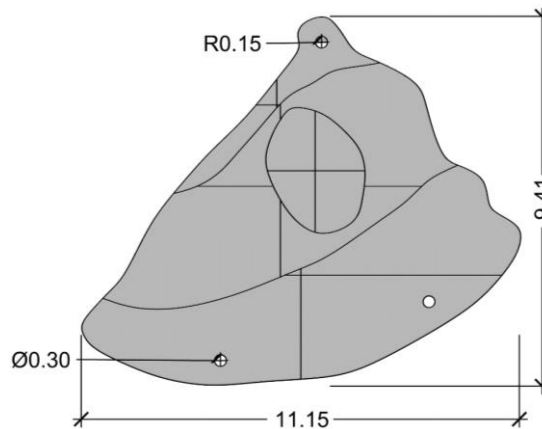
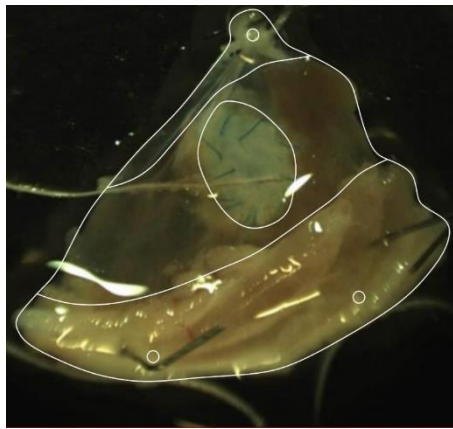


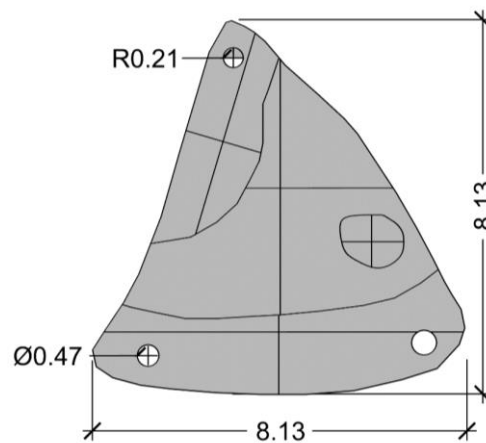
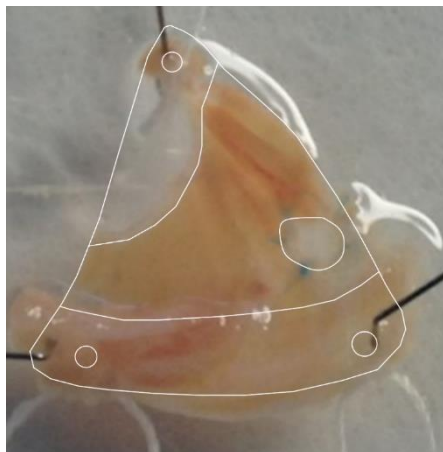
Figura 2.11 – Geometria CAD della porzione di diaframma controlaterale operato con Goretex: quote principali (mm) (sinistra) e variabilità dello spessore nei diversi tipi di tessuti, tendineo, muscolare e osseo (destra).

I modelli CAD sono stati successivamente importati in Abaqus come modelli solidi omogenei e deformabili. Per comodità è stata creata anche la geometria della parte solida 3D che andrà a simulare il corpo del filo di cotone, di lunghezza 100 mm, che collega sperimentalmente il pezzo di diaframma al trasduttore di forza, mediante un elemento trave con profilo circolare, di diametro pari 0,30 mm. Nella sezione di assemblaggio sono state create le istanze rappresentative delle parti della geometria importate dal CAD; le istanze sono delle copie di parti che è possibile modificare e posizionare, una rispetto all'altra, in un sistema di riferimento globale. Una volta assemblate le istanze del modello (costola, muscolo, tendine e filo di cotone) a comporre la geometria della porzione di diaframma, tra di esse è stato imposto un *merge*, che le unisce in un'unica istanza, dando continuità alla geometria, ma permettendo di conservarne i bordi geometrici e assegnare loro successivamente proprietà e materiali differenti. L'istanza del nodo di cotone e quella del corpo del filo sono state connesse l'una con l'altra con un vincolo *MPC (Multi Point Constraint)*. Completata l'operazione di assemblaggio e di definizione dei vincoli geometrici al modello, il passo successivo è l'assegnazione dei materiali a ciascuna regione. Con la medesima procedura sono state create anche le geometrie dei modelli per le porzioni

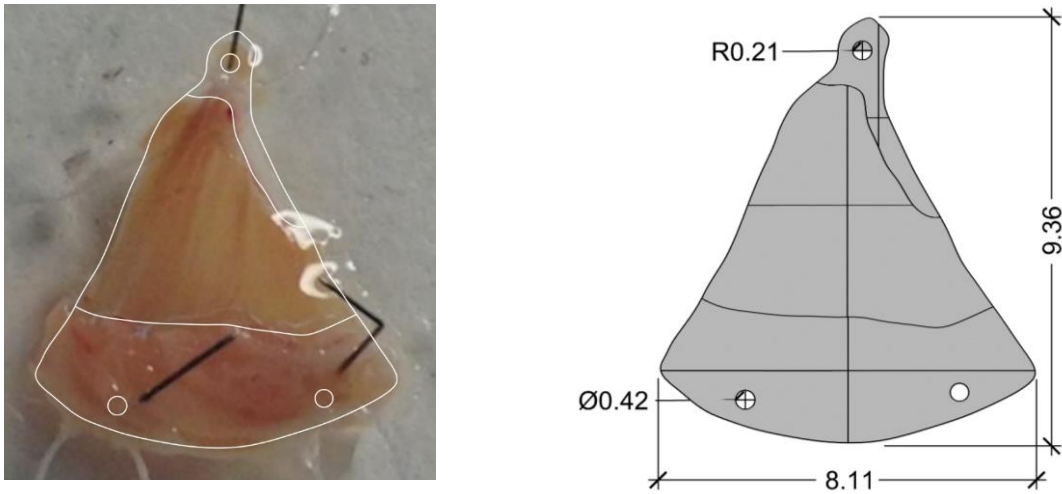
di diaframma rispettivamente operato con patch di Goretex, operato con innesto biologico di ECM e il suo controlaterale di controllo (Figura 2.12 (a),(b),(c)).



(a) *Porzione di diaframma con innesto di Goretex.*



(b) *Porzione di diaframma con innesto biologico di ECM.*



(c) *Porzione di diaframma controlaterale ECM.*

Figura 2.12 – Riproduzione delle curve di base sull'immagine sperimentale (sinistra) e geometrie CAD (destra) delle porzioni di diaframma (a) operato con patch di Goretex, (b) operato con innesto biologico di ECM e (c) sua porzione controlaterale.

2.2.2 Definizione delle sezioni e dei materiali

Per quanto riguarda la tipologia delle sezioni, tutte le parti sono state definite come solidi omogenei, ad eccezione del filo di cotone che, essendo un elemento monodimensionale in cui la dimensione prevalente è la lunghezza rispetto al diametro, è stato definito tramite un elemento a trave.

In Tabella 2.4 sono riassunte le caratteristiche meccaniche dei materiali che costituiscono le parti dei modelli, e quindi tessuto tendineo, tessuto muscolare, tessuto osseo, matrice extracellulare e Goretex, utilizzate e ricavate da letteratura.

Tabella 2.4 – Proprietà materiali usati nelle simulazioni.

	<i>Tendine</i>	<i>Costole</i>	<i>Muscolo</i>	<i>Cotone</i>	<i>Impianto ECM</i>	<i>Impianto Goretex</i>
<i>E (MPa)</i>	-	10000	-	5500	-	-
<i>P (g/cm³)</i>	1	1.9	1	1.55	1	2.16
<i>v</i>	-	0.3	-	0.3	-	-
<i>C10 (MPa)</i>	75	-	-	-	-	5.66
<i>Mod. Cost.</i>	<i>Iperelastico</i>	<i>Elastico</i>	<i>Hill</i>	<i>Elastico</i>	<i>Hill</i>	<i>Iperelastico</i>
<i>Comp. tà</i>	<i>Incomp.</i>	-	-	-	-	<i>Incomp.</i>
<i>Pot. En. Def.</i>	<i>Neo Hooke</i>	-	-	-	-	<i>Neo Hooke</i>

Tessuto muscolare

Il comportamento meccanico dinamico di contrazione del tessuto muscolare del diaframma, ed in particolare la funzionalità delle fibre muscolari, è stato simulato mediante il modello costitutivo meccanico di Hill a tre elementi descritto nel seguito. Alla matrice extracellulare di tessuto muscolare sono assegnate le stesse caratteristiche meccaniche delle fibre muscolari, ma ad essa non sono conferite proprietà contrattili durante la simulazione, essendo essa una struttura biologica avente la medesima architettura tridimensionale del tessuto muscolare, ma priva della componente cellulare che conferisce la capacità contrattile; questa ipotesi è giustificata dal fatto che a 90 giorni dall'innesto del *patch* di ECM nel muscolo, le sue proprietà meccaniche passive sono paragonabili a quelle del tessuto muscolare integro.

2.2.3 Mesh

Una volta completato l'assemblaggio delle istanze delle parti a formare i modelli delle quattro porzioni di diaframma, su di esse deve essere a questo punto creata la *mesh*, ovvero la struttura di elementi finiti che viene associata alla geometria del modello e su cui si basa l'integrazione e l'analisi delle variabili meccaniche implicate nella simulazione. Per le istanze del muscolo e della matrice extracellulare, della costola e del nodo di cotone a contatto con il tendine, sono stati utilizzati elementi esaedrici ad 8 nodi con ordine geometrico lineare; all'istanza del tendine e del *patch* di Goretex, invece, sono stati assegnati elementi esaedrici ad 8 nodi con formulazione ibrida per tenere conto della loro

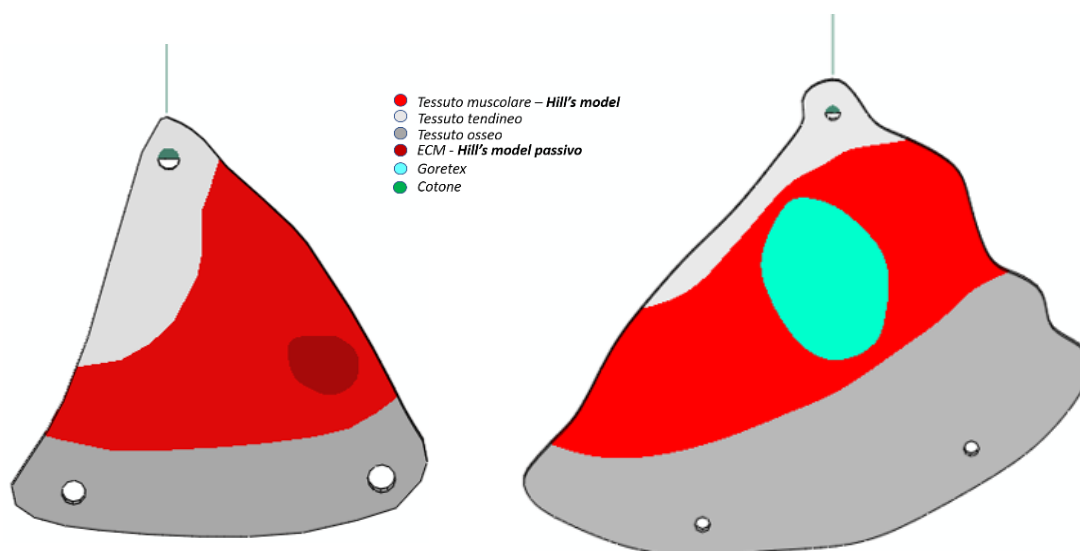
quasi-incomprimibilità. Infine, l'istanza monodimensionale del corpo del filo di cotone è stata definita secondo elementi lineari (trave) a 2 nodi.

I tipi di elementi di Abaqus sono riassunti in Tabella 2.5.

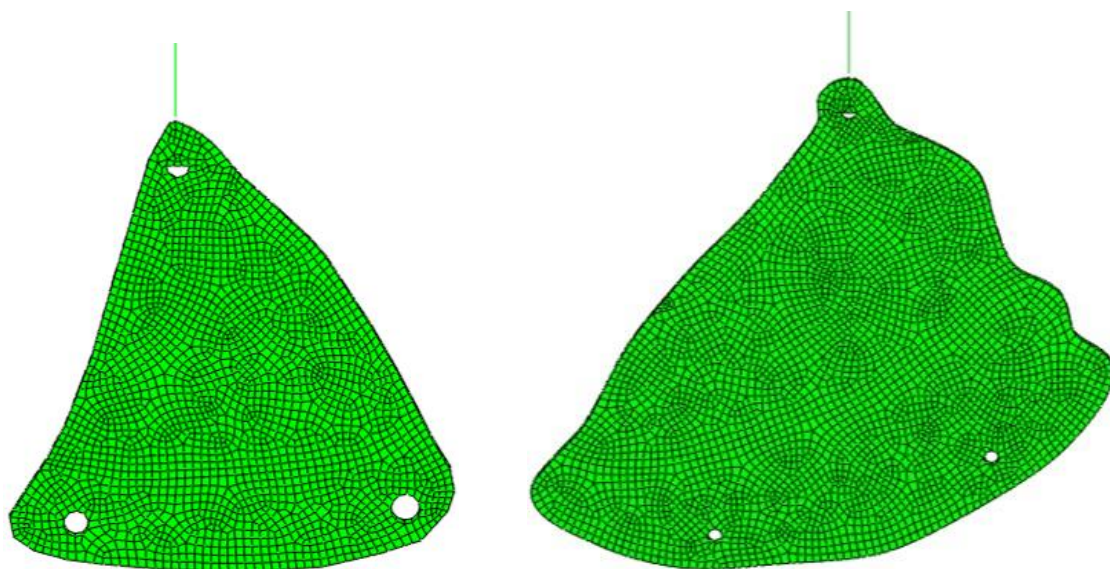
Tabella 2.5 – Regione del modello e tipologia di elemento finito associato.

<i>Materiale</i>	<i>Tipologia di elemento finito</i>
<i>Tendine</i>	<i>C3D8H</i>
<i>Muscolo</i>	<i>C3D8</i>
<i>Costole</i>	<i>C3D8</i>
<i>Cotone: -nodo</i>	<i>C3D8</i>
<i>-filo</i>	<i>B31</i>
<i>Goretex</i>	<i>C3D8H</i>
<i>ECM</i>	<i>C3D8</i>

In Figura 2.13 sono mostrati come esempio i modelli per le due porzioni di diaframma operate, con ECM e con Goretex, per ognuna delle quali si riportano i materiali assegnati ad ogni parte e la *mesh* generata sul modello.



(a) *Materiali*



(b) Mesh

Figura 2.13 – Modelli in Abaqus per le porzioni di diaframma operate con ECM (sinistra) e con Goretex (destra): materiali assegnati alle parti del modello (a) e mesh (b).

2.3 Modello costitutivo per le fibre muscolari

I muscoli scheletrici sono coinvolti in quasi tutte le attività umane, fra queste una delle più importanti è la respirazione, che vede coinvolto il muscolo diaframmatico; lo studio della loro funzionalità è quindi di rilevante interesse sia per la comprensione di condizioni fisiologiche normali, ma soprattutto anche per gravi condizioni patologiche a carico di questi muscoli, come nello specifico l'ernia diaframmatica congenita, trattata in questo lavoro di tesi. La funzione macroscopica di questi muscoli è il risultato di una struttura microscopica multi-scala; infatti, le forze e gli accorciamenti/allungamenti che si richiedono ai muscoli durante le attività quotidiane, che possono raggiungere valori anche molto elevati, sono prodotti da forze e spostamenti, pico e nanometrici, generati a livello molecolare dall'interazione dei miofilamenti di actina e miosina, costituenti fondamentali delle unità contrattili delle fibre muscolari, i sarcomeri.

Per l'analisi computazionale del comportamento dinamico delle porzioni di tessuto muscolare diaframmatico, le proprietà contrattili delle fibre muscolari sono state descritte con il modello costitutivo di Hill a tre elementi, che è fra i più usati nella modellazione

muscolare. È stato, inoltre, simulato con il modello costitutivo di Hill anche il comportamento meccanico dell'innesto di matrice extracellulare, con gli stessi parametri costitutivi dati al muscolo, a meno di quelli coinvolti nella funzione di attivazione delle fibre muscolari, in modo che durante la simulazione numerica si comporti in modo passivo senza contrarre, come invece viene permesso alla parte del muscolo circostante²³.

2.3.1 Descrizione del modello costitutivo di Hill a tre elementi

Il modello di Hill a tre elementi costituisce una rappresentazione semplificata della struttura dei sarcomeri, ed è composto da un elemento contrattile (CE), un elemento elastico (SE) in serie con l'elemento contrattile ed un ulteriore elemento elastico (PE) in parallelo con CE ed SE, in questo modo i due elementi in serie risultano condizionati dalle proprietà di interconnessione che si hanno tra le diverse fibre muscolari, rappresentata dall'elemento PE (Figura 2.14).

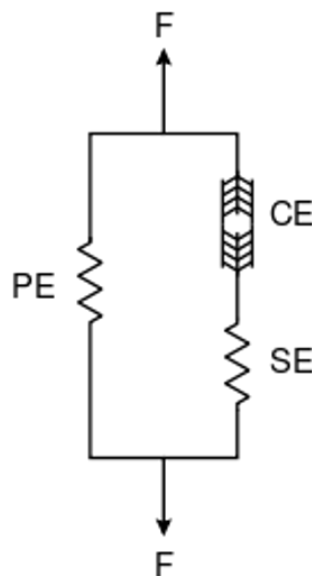


Figura 2.14 – *Modello di Hill a tre elementi: CE elemento contrattile, SE elemento elastico in serie, PE elemento elastico in parallelo.*

Il modello prevede l'imposizione delle seguenti condizioni:

- Le lunghezze correnti dei tre elementi devono rispettare la relazione:

$$l_{PE} = l_{CE} + l_{SE}$$

- Le lunghezze iniziali dell'elemento contrattile e dell'elemento elastico in serie sono in relazione secondo la costante k: $L_{SE} = kL_{CE}$
- Essendo in serie, la tensione sugli elementi CE e SE deve essere la stessa in ogni istante di tempo: $P_{CE} = P_{SE}$.

Per una contrazione isometrica, ad una determinata lunghezza iniziale del sarcomero, $L_{PE} = L_{CE} + L_{SE}$, il valore corrente l_{SE} aumenta mentre l_{CE} diminuisce.

In generale la componente contrattile CE si contrae fino a che la forza generata dai due elementi in serie (CE ed SE) si equilibra e, quindi: $P_{CE} = P_{SE} = P_0$.

Gli allungamenti negli elementi PE, SE e CE sono definiti rispettivamente come:

- $\lambda_f = l_{PE}/L_{PE}$
- $\lambda_s = l_{SE}/L_{SE}$
- $\lambda_m = l_{CE}/L_{CE}$

Elemento elastico in parallelo (PE)

L'elemento elastico PE è responsabile dell'elasticità passiva della componente connettiva con cui le fibre muscolari sono in contatto.

La risposta tensionale dell'elemento PE è data dall'equazione:

$$P_{PE} = \begin{cases} 0 & \lambda_f \leq 0 \\ \gamma(\lambda_f - 1)^2 & \lambda_f > 0 \end{cases}$$

Dove γ è un parametro relativo al *fitting* tra curva sperimentale e modello matematico.

Elemento contrattile (CE)

L'elemento CE rappresenta la generazione attiva di forza da parte delle fibre muscolari ed è descritto dalle caratteristiche di contrazione muscolare:

- Velocità di contrazione raggiunta contro un carico costante
- Massima forza di contrazione isometrica generata ad una determinata lunghezza dei sarcomeri
- Forza generata a diversi livelli di attivazione delle fibre muscolari

La risposta tensionale dell'elemento CE varia quindi nel tempo secondo le funzioni che descrivono tali caratteristiche ed ha equazione:

$$P_{CE} = P_0 f_a(t) f_l(\lambda_m) f_v(\dot{\lambda}_m)$$

La funzione $f_a(t)$ descrive il livello di attivazione delle fibre ad ogni istante di tempo t ; la sua forma dipende dal particolare protocollo sperimentale che si vuole simulare.

La funzione di attivazione è espressa da due funzioni esponenziali che descrivono rispettivamente la crescita di attivazione delle fibre, fino al valore massimo, e il loro rilassamento dopo la contrazione. In questo caso è stata assunta una funzione di attivazione con il seguente andamento:

$$f_a(t) = \begin{cases} a_0 & t \leq t_0 \\ a_0 + (a_1 - a_0) \times h_t(t, t_0) & t_0 \leq t \leq t_1 \\ a_0 + (a_1 - a_0) \times h_t(t_1, t_0) \times [1 - h_t(t, t_1)] & t_1 < t \end{cases}$$

dove t_0 e t_1 sono rispettivamente gli istanti di inizio e di fine dell'attivazione, a_0 e a_1 sono costanti poste rispettivamente pari a 0 e 1 e la funzione h_t è definita come: $h_t(t, t_i) = 1 - \exp[-S(t - t_i)]$, S è la costante temporale che definisce la pendenza dell'esponenziale e quindi la rapidità con cui la fibra raggiunge il valore di massima attivazione.

La funzione $f_l(\lambda_m)$ descrive la relazione forza-lunghezza dei sarcomeri ed è assunta come:

$$f_l(\lambda_m) = \begin{cases} \frac{\lambda_m - \lambda_{min}}{\lambda_{opt} - \lambda_{min}} \times \exp\left[\frac{(2\lambda_{min} - \lambda_m - \lambda_{opt})(\lambda_m - \lambda_{opt})}{2(\lambda_{min} - \lambda_{opt})^2}\right] & \lambda_m > \lambda_{min} \\ 0 & \lambda_m \leq \lambda_{min} \end{cases}$$

dove λ_{min} e λ_{opt} sono rispettivamente la lunghezza minima e la lunghezza ottimale dei sarcomeri. La lunghezza ottimale del sarcomero corrisponde alla lunghezza alla quale riesce a sviluppare la massima tensione di contrazione, in quanto si ha il maggior numero di interazione fra i miofilamenti di actina e miosina. In generale, la lunghezza ottimale dei sarcomeri si ha alla lunghezza a riposo del muscolo. Al contrario, alla lunghezza minima si hanno le minori interazioni e quindi la minor tensione sviluppata.

Infine, la funzione $f_v(\dot{\lambda}_m)$ rappresenta la relazione di tipo iperbolico forza-velocità, in questo modello definita dalla funzione:

$$f_v(\dot{\lambda}_m) = \begin{cases} \frac{1 - \dot{\lambda}_m/\dot{\lambda}_{max}}{1 + k_c \dot{\lambda}_m/\dot{\lambda}_{max}} & \dot{\lambda}_{max} < \dot{\lambda}_m \leq 0 \\ 0 & \dot{\lambda}_m \leq \dot{\lambda}_{max} \end{cases}$$

Dove $\dot{\lambda}_m$ e $\dot{\lambda}_{max}$ sono, rispettivamente, la velocità di allungamento dell'elemento CE ed il suo valore massimo in una singola fibra; tale valore massimo è in relazione con la massima velocità di contrazione attraverso la relazione: $V_{max} = \dot{\lambda}_{max}/(1 + k)$.

Elemento elastico in serie (SE)

L'elemento elastico SE descrive la risposta a variazioni repentine nel carico esterno e in questo modello la risposta tensionale dell'elemento è stata assunta non lineare tra la tensione nominale e l'allungamento secondo l'equazione:

$$P_{SE} = \beta \{ \exp[\alpha(\lambda_f - 1)] - 1 \}$$

2.4 Analisi agli elementi finiti

Una volta completata la costruzione dei quattro modelli FE delle porzioni di diaframma in Abaqus CAE, per ciascuno di essi è stata simulata la corrispondente prova sperimentale con un'analisi agli elementi finiti, sempre nel software FE Abaqus Standard.

Per la simulazione è stato necessario impostare gli *step* dell'analisi, ovvero gli istanti temporali che insieme definiscono la durata della simulazione e in cui si definiscono le condizioni al contorno, che comprendono gli eventuali vincoli, spostamenti e rotazioni, e/o i carichi cui saranno sottoposti i modelli per riprodurre le condizioni sperimentali. Successivamente sono state impostate e aggiustate le costanti del modello costitutivo, assegnate come proprietà di materiale alla porzione di muscolo, per simulare e riprodurre i dati sperimentali di forza acquisiti

2.4.1 Step e condizioni di vincolo

Di default Abaqus imposta uno *step* iniziale dopo il quale è possibile aggiungere in sequenza a piacimento gli *step* di interesse per la specifica analisi che si vuole condurre.

Dato che, durante le prove sperimentali, ciascuna porzione di diaframma è stata fissata tramite la costola all'asticella di supporto del muscolo, nello *step* iniziale sono stati assegnati due incastri, ciascuno in corrispondenza di uno dei fori inferiori che simulano i nodi dei fili di cotone, e tale condizione è stata propagata anche agli *step* successivi, non modificandosi nel corso della prova sperimentale. Dopo lo *step* iniziale sono stati inseriti altri due *step*, denominati “Pretensione” e “ContraZIONE”, che avverranno in questa sequenza e che saranno settati singolarmente per ogni analisi in modo da riprodurre la rispettiva prova sperimentale di ciascun modello.

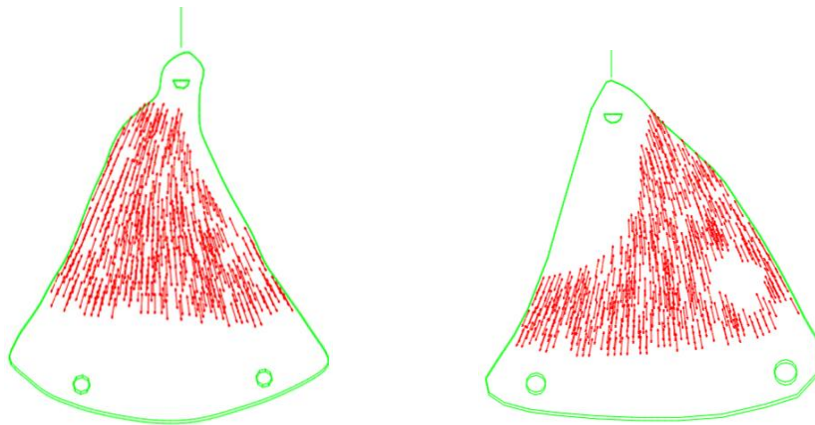
Lo *step* di pretensione è di analisi statica generale e per questo gli è stata assegnata una durata fittizia di 1s; in esso viene simulato il pretensionamento sperimentale con cui è stato teso in posizione verticale il provino; per ciascun modello è stato quindi imposto uno spostamento in direzione verticale, longitudinalmente al filo di cotone che congiunge il provino al trasduttore, (le restanti componenti di spostamento e rotazione sono state imposte pari a 0) all'apice dell'istanza del filo di cotone corrispondente all'ottenimento di una forza di reazione sull'apice del filo pari a quella misurata dal trasduttore e coincidente con la tensione basale ; lo spostamento imposto è stato propagato anche al successivo *step* di contraZIONE.

Lo *step* di contraZIONE è di analisi dinamica di tipo implicito e la sua durata deve corrispondere alla durata reale del *twitch* realizzata nelle prove sperimentali; la durata dello *step* di contraZIONE è stata posta pari a 0.04s. In questo *step* si implementa il modello costitutivo di Hill a tre elementi, per tessuto muscolare per diaframma di topo, attraverso la *subroutine* “UMAT” di Abaqus, alle cui variabili si associano i parametri del modello costitutivo.

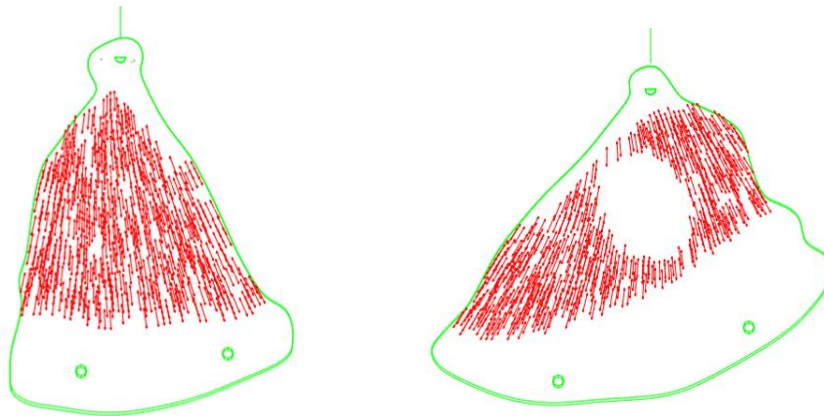
2.4.2 Implementazione del modello costitutivo di Hill a tre elementi

Per poter implementare la contraZIONE muscolare sulla rispettiva porzione di tessuto di ciascun modello di emidiaframma, nella sezione di assegnazione dei materiali in Abaqus CAE sono state inserite le costanti del modello costitutivo come proprietà del materiale definite dall'utente, che sono lette al momento dell'esecuzione dell'analisi FE dalla *subroutine* di Abaqus ed assegnate al modello costitutivo per la sua implementazione. Le costanti della parte isotropa del tessuto e di quella passiva delle fibre muscolari sono state dedotte da letteratura ²⁴.

All'interno della *subroutine* è stato definito anche un algoritmo che permette, al primo incremento, di orientare localmente le fibre della porzione di muscolo secondo la direzione più verosimile in base alla morfologia del provino. A tale scopo sono state definite due rette di appoggio alle due estremità libere della porzione di muscolo e per esse sono stati definiti i relativi versori; le fibre muscolari sono quindi state orientate mediante un'interpolazione tra i versori delle rette di appoggio (Figura 2.15). Sono state ipotizzate, per ciascun emidiaframma, una densità ed una tipologia di fibre muscolari omogenee, in mancanza di dati sperimentali specifici.



(a) Controllo ECM (sinistra) e patch di ECM (destra).



(b) Controllo Goretex (sinistra) e patch di Goretex (destra).

Figura 2.15 – Rappresentazione dei versori (rosso) che orientano localmente le fibre muscolari in ciascuna porzione di diaframma. Porzioni di controllo e con patch di ECM (a), porzioni di controllo e con patch di Goretex (b).

Per riprodurre i risultati delle prove sperimentali, sono stati aggiustate le costanti P_0 , t_0 , t_1 e S , che definiscono la funzione di attivazione; t_0 e t_1 , istanti iniziale e finale rispettivamente di attivazione delle fibre muscolari, sono stati posti in modo che $t_1 - t_0 = 0.016$ s, come risulta sperimentalmente, e la costante temporale S è stata posta pari a 500 per riprodurre nel modo più verosimile il ramo di attivazione della curva esponenziale che descrive la funzione. In tutte le prove sperimentali la modalità di stimolazione elettrica è la medesima, t_0 , t_1 e S sono uguali per ciascun modello di emidiaframma, mentre P_0 , massima tensione di contrazione isometrica, è stata aggiustata in ciascun modello per riprodurre i valori di forza di contrazione misurati sperimentalmente dal trasduttore nei diversi esperimenti. E' opportuno specificare che, sperimentalmente, la massima tensione di contrazione isometrica P_0 , tramite cui si descrive la risposta tensionale dell'elemento contrattile nel modello di Hill, viene misurata in condizioni di tetanizzazione del muscolo, che si verifica in un particolare intervallo di frequenza della stimolazione elettrica, e non essendo il caso delle prove sperimentali eseguite sulle porzioni di diaframma, in cui è stata inviata una stimolazione sopramassimale, non è corretto in questo caso riferirsi a P_0 in termini di massima tensione di contrazione isometrica, quanto piuttosto di massima tensione di *twitch*, il cui valore è in generale minore della massima tensione di contrazione isometrica. Per questo motivo ci si riferisce al parametro di massima tensione di *twitch* descritto nella funzione di attivazione più correttamente in termini di P_t anziché P_0 .

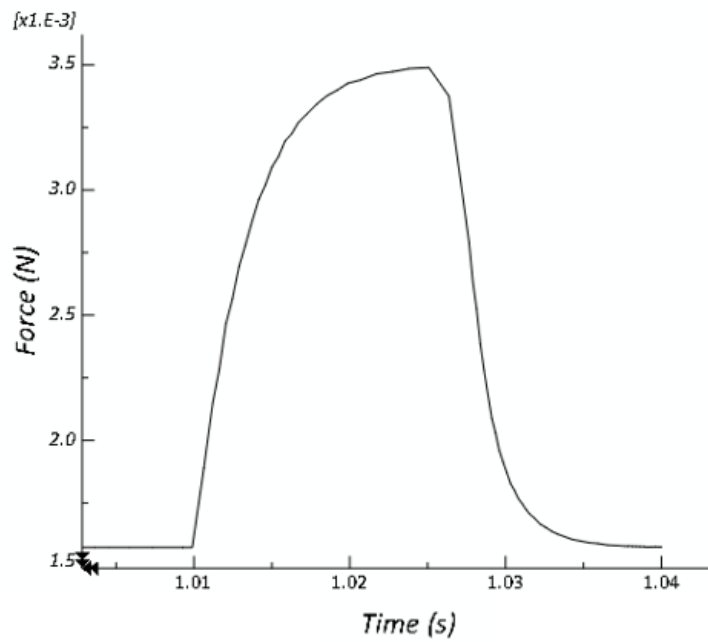
In Tabella 2.6 si riassumono i valori di P_t trovati per i quattro modelli.

Tabella 2.6 – Valori della massima tensione di contrazione di *twitch*, P_t , per ciascun modello di emidiaframma.

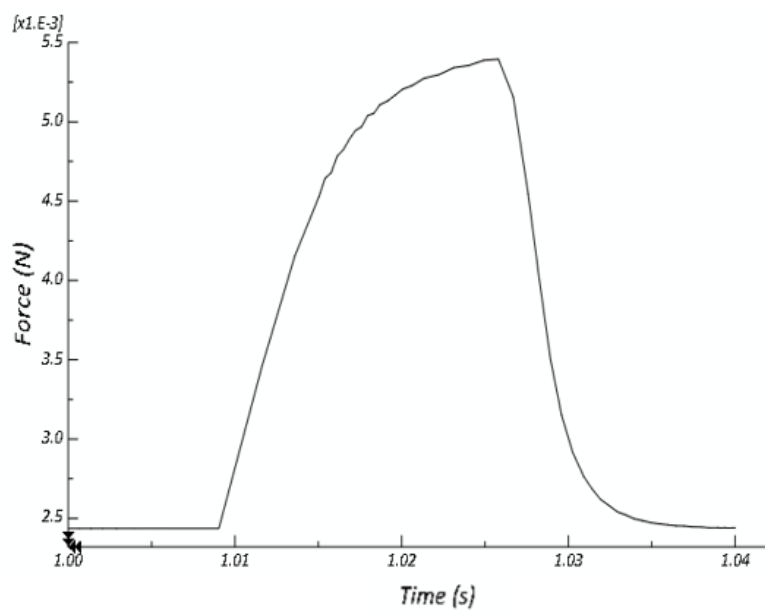
	<i>Patch ECM</i>	<i>Controllo ECM</i>	<i>Patch GORETEX</i>	<i>Controllo GORETEX</i>
P_t (MPa)	0.0023	0.0044	0.0034	0.0096

In Figura 2.16 ((a),(b),(c) e (d)) sono mostrate le curve forza-tempo di *twitch* ottenute dall'analisi FE in Abaqus nello step di contrazione, corrispondenti all'andamento della funzione di attivazione definita nel modello costitutivo, per ciascuno dei quattro modelli, e che riproducono i valori di forza ottenuti sperimentalmente; in questo step l'istante d'inizio dell'attivazione delle fibre muscolari t_0 è stato imposto a 1.01 s e quello di fine attivazione t_1 a 1.026 s, dopo il quale si ha il rilassamento delle fibre. Le curve di

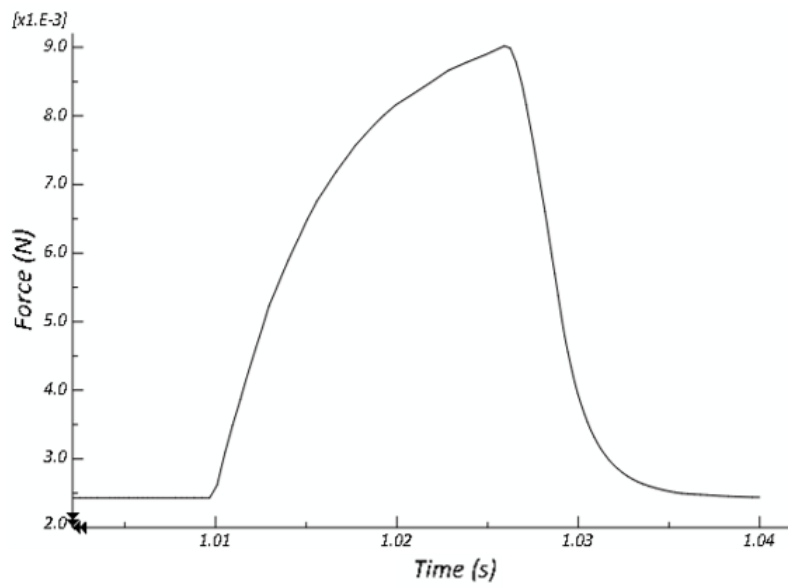
twitch ottenute dall'analisi FE hanno la forma doppio-esponenziale con cui è stata descritta la funzione di attivazione nel modello costitutivo



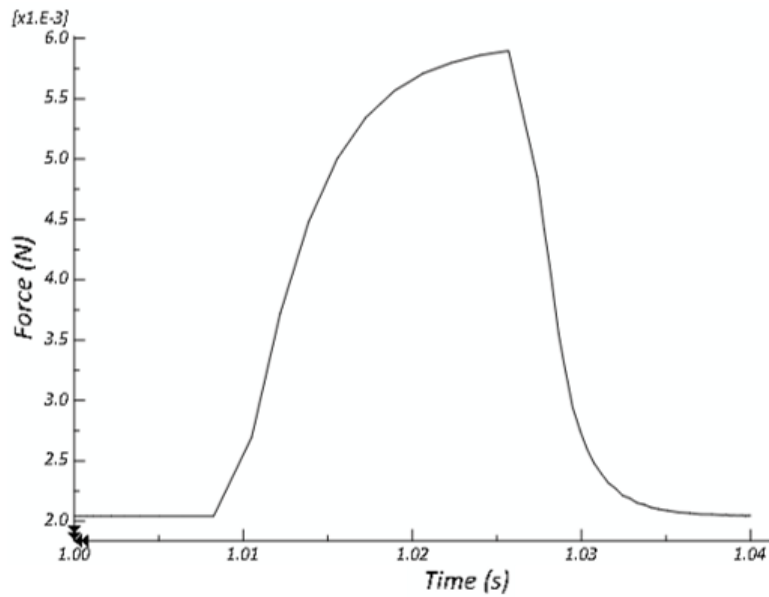
(a) Emidiaframma di controllo ECM.



(b) Emidiaframma con patch di ECM.



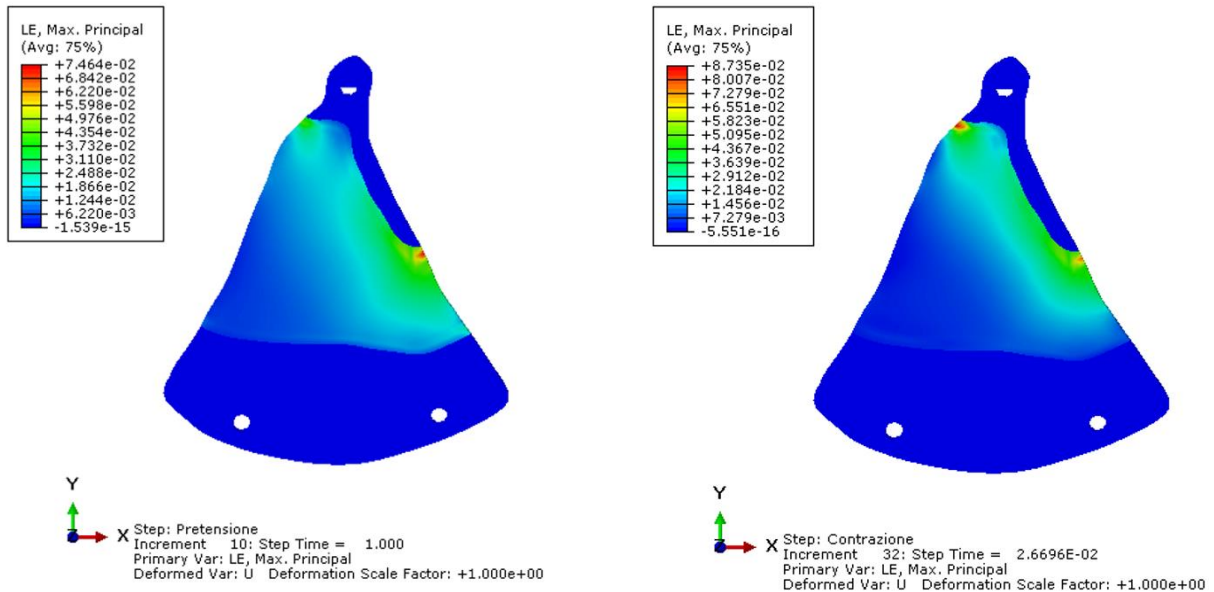
(c) Emidiaframma di controllo Goretex.



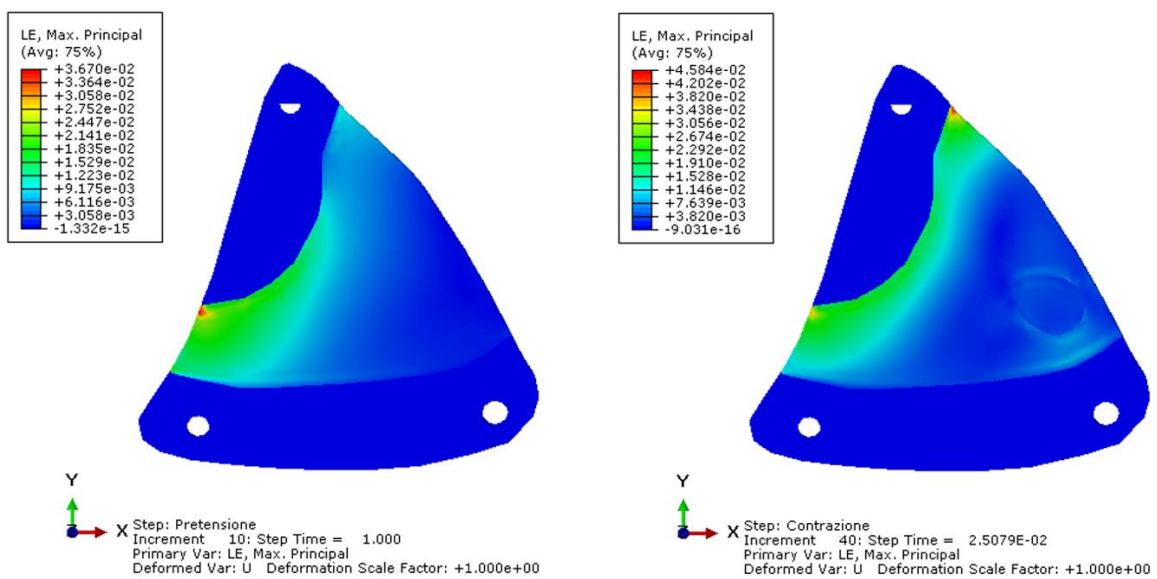
(d) Emidiaframma con patch in Goretex.

Figura 2.16 – Curve di twitch (forza-tempo) per i modelli FE delle porzioni di diaframma: controllo ECM (a), patch di ECM (b), controllo Goretex (c) patch di Goretex (d).

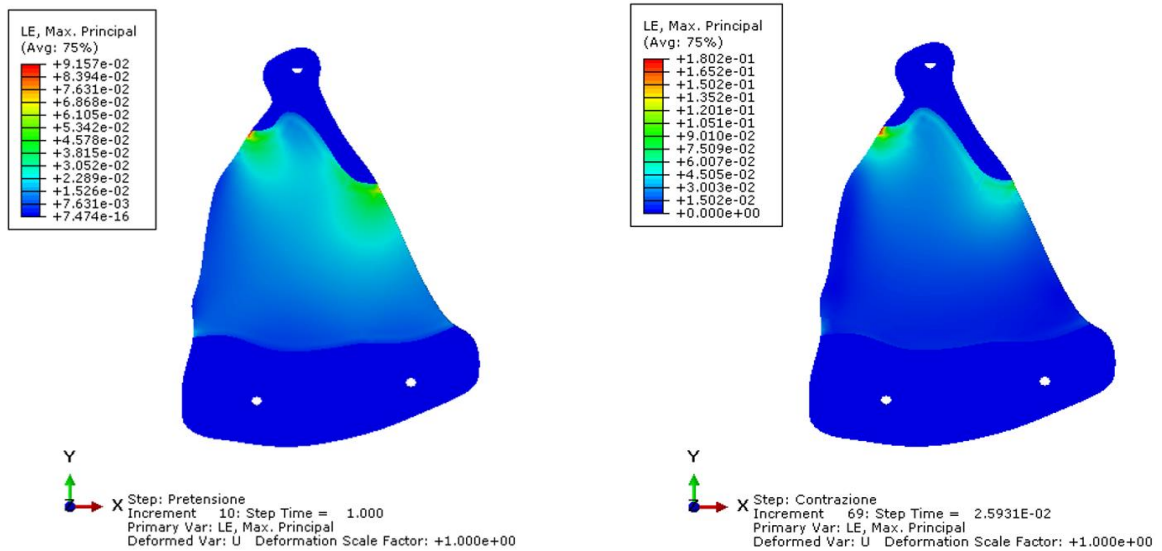
In Figura 2.17 ((a),(b),(c) e (d)) è mostrata invece, per ciascun modello di emidiaframma, la mappa colori delle deformazioni logaritmiche in corrispondenza della fine dello *step* di pretensione (sinistra), e quindi riferite alla forza basale applicata, ed in corrispondenza della massima attivazione delle fibre muscolari nello *step* di contrazione (sinistra), e quindi riferite alla massima forza di *twitch*.



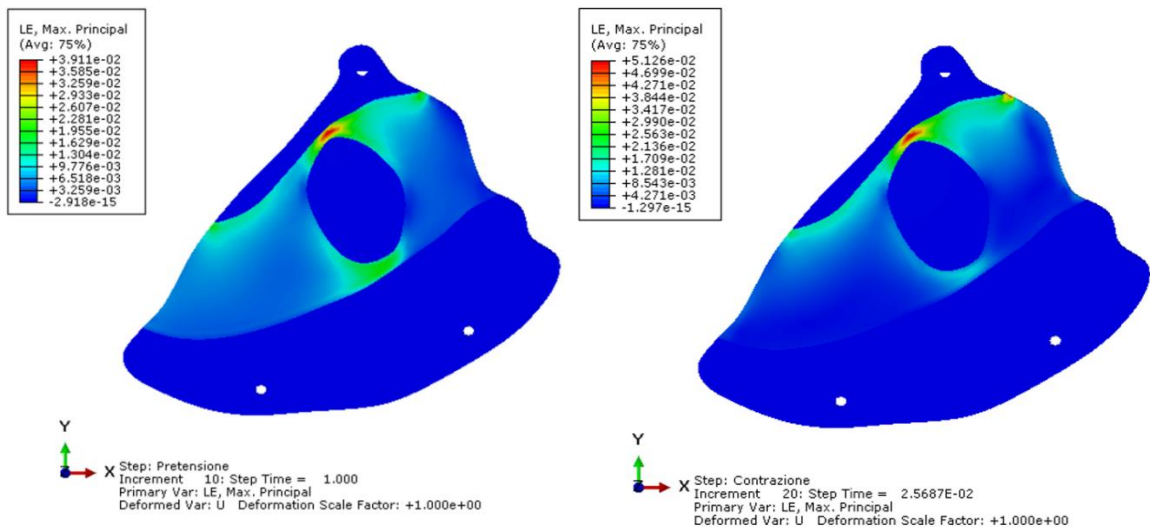
(a) Emidiaframma di controllo ECM. Pretensione(sinistra), Contrazione(destra).



(b) Emidiaframma con patch di ECM. Pretensione(sinistra), Contrazione(destra).



(c) Emidiaframma di controllo Goretex. Pretensione(sinistra), Contrazione(destra).



(d) Emidiaframma con patch di Goretex. Pretensione(sinistra), Contrazione(destra).

Figura 2.17 – Analisi agli elementi finiti. Deformazioni logaritmiche: in corrispondenza del valore di tensione basale e in corrispondenza della massima forza di contrazione. (a) controllo ECM, (b) patch ECM, (c) controllo Goretex e (d) patch Goretex.

3 Risultati e discussione

In questo Capitolo si presentano e si discutono i risultati ottenuti dalle prove sperimentali sulle porzioni di diaframma con patch di ECM e di Goretex e sulle rispettive porzioni controlaterali sane, e successivamente i risultati numerici ottenuti a supporto di quelli sperimentali, per verificare la relazione tra i valori di forza misurati con il trasduttore sperimentalmente e il termine di qualità delle fibre muscolari cui si è potuti arrivare tramite la descrizione del comportamento meccanico delle porzioni di muscolo con il modello costitutivo di Hill a tre elementi.

3.1 Risultati sperimentali

Ciascuna prova sperimentale, volta alla valutazione della risposta di contrazione delle porzioni di diaframma con *patch* rispetto alle rispettive controlaterali sane, ha restituito come dato sperimentale il valore di tensione, in Volt, acquisito dal trasduttore, per ognuno degli emidiaframmi; tale valore di tensione è una misura della forza esercitata dalla porzione di muscolo di ciascun emidiaframma durante la contrazione delle fibre muscolari stimulate elettricamente durante le prove. Per l'analisi il valore di tensione è stato convertito in valore di forza (N), sapendo che per il trasduttore utilizzato era valida la conversione lineare tra tensione e massa ($1V = 1g$). I valori sperimentali considerati nei risultati, riassunti in Tabella 2.2, sono i valori medi corrispondenti alle curve medie di *twitch* calcolate come riferimento rappresentativo dei dati di *twitch* sperimentali. Il valore preso come riferimento per la comparazione della risposta data dalle porzioni di diaframma con patch con le rispettive controlaterali è il valore di forza di *twitch*, F_t , calcolato come differenza tra il valore di forza di contrazione massimo, corrispondente all'apice del picco di contrazione, ed il valore di forza basale del muscolo durante l'esperimento.

Per entrambe le porzioni di diaframma operate con il rispettivo *patch*, si è evidenziato un dimezzamento della forza di contrazione (F_t) rispetto alle corrispettive

emiporzioni controlaterali sane, come è evidente dal confronto tra i valori di forza esercitati:

Emidiaframma con patch in Goretex

$$F_t^{GTx} = 0.58 F_t^{ctr}$$

Emidiaframma con patch in ECM

$$F_t^{ECM} = 0.61 F_t^{ctr}$$

La porzione di diaframma che presenta l'innesto in matrice extracellulare (ECM) risulta apparentemente conservare una risposta biomeccanica migliore rispetto alla porzione di diaframma con *patch* in Goretex, in relazione con le rispettive emiporzioni controlaterali. Tuttavia il solo dato di forza ottenuto dal trasduttore non è sufficiente per stabilire una possibile relazione tra la qualità meccanica delle fibre muscolari presenti nella porzione di muscolo di ciascun emidiaframma ed il valore di forza generato sul trasduttore, in quanto tutti caratterizzati dalla loro specifica geometria, in particolar modo l'area trasversale fisiologica, e disposizione delle fibre muscolari rispetto all'asse del trasduttore. Questo è il motivo che ha giustificato ed incentivato l'ausilio dell'analisi numerica agli elementi finiti per riprodurre i risultati sperimentali ed analizzarli anche sotto il punto di vista ingegneristico.

3.2 Risultati numerici

L'analisi numerica agli elementi finiti ha permesso di simulare su ciascun modello di emidiaframma la relativa prova sperimentale di contrazione, riproducendo con buona approssimazione i valori di forza restituiti sperimentalmente dal trasduttore. Grazie alla descrizione del comportamento meccanico delle fibre muscolari attraverso il modello costitutivo di Hill a tre elementi, è stato possibile associare a dei parametri ben precisi, e rispettosi delle differenti geometrie degli emidiaframmi, la risposta meccanica delle fibre costituenti le porzioni di muscolo diaframmatico in ciascun modello.

Il parametro del modello costitutivo che è stato aggiustato durante le analisi numeriche, per fittare i dati sperimentali di forza, è la massima tensione di *twitch* (P_t), che caratterizza la funzione di attivazione delle fibre muscolari, relativa all'elemento contrattile del modello costitutivo di Hill a tre elementi; dato che le condizioni sperimentali hanno

indotto sulle porzioni di diaframma delle contrazioni di tipo isometrico (senza accorciamento), non è stato quindi necessario agire anche sui parametri che regolano le funzioni forza-velocità e forza-lunghezza del modello costitutivo.

Nell'analisi agli elementi finiti, ciascun elemento finito è caratterizzato da un modello di Hill a tre elementi e dunque è in sostanza una rappresentazione semplificata della struttura di una fibra muscolare. Nel muscolo, la forza sviluppata da una fibra muscolare è la somma delle forze sviluppate da tutte le miofibrille, che la costituiscono, disposte in parallelo, e non dipende quindi dalla lunghezza della fibra in sé; numericamente è stato possibile estrapolare quindi l'effettivo valore di massima tensione di *twitch* esplicita dalla porzione di muscolo che compone ciascun modello di emidiaframma poiché ci si è potuti basare sulla specifica geometria, più in particolare sulla specifica sezione trasversale di ciascun modello, e sulla disposizione verosimile delle fibre muscolari in ciascun modello.

Coerentemente con i risultati sperimentali, anche la massima tensione isometrica di *twitch* (P_t) esercitata dalle porzioni di diaframma, secondo il modello costitutivo di Hill, è inferiore rispetto a quella delle porzioni di diaframma controlaterali sane.

Rispetto ai valori sperimentali di forza, però, la diminuzione di funzionalità, indice di una peggiore qualità delle fibre, della porzione operata rispetto a quella sana è decisamente più marcata per il Goretex, risultando circa 1/3 di quella della porzione controlaterale:

$$P_t^{GTx} = 0.35 P_t^{ctr}$$

Dalla predizione del modello risulta quindi una condizione peggiorativa maggiore sulla qualità delle fibre rispetto a quanto emerso dai risultati sperimentali.

Per quanto riguarda la porzione di diaframma operata con ECM, invece, la predizione del modello numerico in termini di qualità delle fibre muscolari resta in accordo con i risultati sperimentali di forza; si ha anche in termini di qualità delle fibre un dimezzamento della risposta funzionale, in termini di massima tensione isometrica di *twitch*, delle fibre circostanti il *patch*:

$$P_t^{ECM} = 0.53 P_t^{ctr}$$

Anche in questo caso però la qualità di risposta delle fibre risulta peggiore di quanto si attesta dal solo valore di forza sperimentale, ma in misura minore di quanto visto per il Goretex.

In base ai dati sperimentali e alle valutazioni numeriche appare che nel diaframma con impianto di ECM le fibre muscolari sembrano avere maggiori capacità contrattili di quelle del diaframma con *patch* in Gore-tex.

4 Conclusioni e sviluppi

Le prove sperimentali di funzionalità biomeccanica su porzioni di diaframma di topo, alla base di questo lavoro di tesi, sono state svolte come step iniziale di un percorso più ampio e ramificato, condotto dai ricercatori della Città della Speranza, sullo studio delle potenzialità di innesti biologici di matrice extracellulare come sostituti al Goretex nella riparazione di danni da *CDH (Congenital Diaphragmatic Hernia)*.

Con questo lavoro di tesi si è voluto offrire un ulteriore strumento di analisi per una più completa interpretazione e valutazione dei dati ottenuti in laboratorio, secondo una descrizione matematica delle evidenze sperimentali. Dai dati sperimentali è emerso che la presenza dell'innesto ha portato ad un dimezzamento della forza massima di contrazione rilevata dal trasduttore sia per il Goretex che per l'ECM, anche se la porzione di diaframma con ECM è apparsa ritenere una risposta contrattile un po' più alta rispetto al Goretex.

Dai risultati numerici è stata valutata la massima tensione di contrazione nei modelli ed è emerso che la qualità delle fibre muscolari dell'emidiaframma operato con Goretex è risultata peggiorativa rispetto a quanto osservato sperimentalmente dal solo valore di forza: la massima tensione di contrazione sviluppata è risultata un terzo di quella dell'emidiaframma di controllo.

Per l'emidiaframma operato con ECM la qualità delle fibre muscolari si è mostrata in accordo con le osservazioni sperimentali, dando un dimezzamento della massima tensione di contrazione dell'emidiaframma operato rispetto al controlaterale sano.

Si conferma quindi il mantenimento di una migliore funzionalità biomeccanica delle fibre muscolari a contatto con il *patch* di ECM rispetto a quello di Goretex, per il quale è visibile numericamente anche una notevole rigidità in termini di deformazioni del tessuto durante la contrazione. Non è stato tenuto conto inoltre che il comportamento meccanico dell'innesto di ECM è stato considerato passivo rispetto alla contrazione, ma non è da escludere che nel corso dei 90 giorni di permanenza nel diaframma prima degli esperimenti, la matrice si sia in parte ricellularizzata fino a formare un certo numero di fibre funzionali e che la stimolazione rigenerativa continui a crescere nel tempo.

I futuri obiettivi, alla Città della Speranza, sono volti a mettere in luce, sia dal punto di vista biologico che funzionale, le potenzialità dell'utilizzo di ECM per la riparazione delle ernie diaframmatiche; in particolare, c'è il progetto di testare, inizialmente sempre su diaframmi di topo, l'effetto di una stimolazione meccanica esterna, su porzioni di diaframma danneggiate con una cardiotossina, attraverso un particolare bioreattore. Questo bioreattore è costituito da una membrana di PDMS, sulla quale verrebbe adagiata la porzione di diaframma, che spinta da un sistema meccanico mima i movimenti di espansione e contrazione simili a quelli fisiologici; in questo modo dovrebbe venire dato alle cellule uno stimolo a crescere secondo il gradiente deformativo radiale imposto dalla membrana e favorirne una migrazione ed una crescita secondo l'orientazione preferenziale delle fibre muscolari. Se l'efficacia di questa stimolazione meccanica dovesse essere provata, tale bioreattore potrebbe essere indicato anche per indurre una ricellularizzazione orientata su scaffold di ECM che, una volta innestati in un diaframma danneggiato, costituiscano un "terreno" fertile per l'evoluzione verso la rigenerazione del tessuto muscolare mancante ed un recupero sempre più completo della funzionalità del diaframma. Interessante sarà anche in questo caso accoppiare l'analisi sperimentale e quella numerica nella valutazione della funzionalità e della qualità delle fibre muscolari.

Bibliografia

1. Pober, B., Russell, M., Ackerman, K., 2010. *Congenital Diaphragmatic Hernia Overview*. GeneReviews ®.
2. David J. Wilkinson, Paul D. Losty, 2013. *Management of congenital diaphragmatic hernia*.
3. Merrell, A.J., Kardon, G., 2013. *Development of the diaphragm - a skeletal muscle essential for mammalian respiration*. FEBS Journal. 280 (17), 4026-4035.
4. Losty, P. D., 2014. *Congenital diaphragmatic hernia: where and what is the evidence?* Seminars in Pediatric Surgery. 23 (5), 278-282.
5. G. Chiarugi- L. Bucciante. *Istituzioni di anatomia dell'uomo*, Vol. 1, Cap. 4.
6. R. Pietrabissa. *Biomateriali per protesi e organi artificiali. Collana di Ingegneria Biomedica*. Patron Editore. Cap.4, pp. 121-127.
7. Carlo Di Bello, Andrea Bagno. *Interazioni tra biomateriali e tessuti*, Collana di Ingegneria Biomedica, Patron Editore, Capitolo 3.3-La Matrice extra-cellulare.
8. Daley, W. P., Peters, S. B., Larsen, M., 2008. *Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine*. Journal of Cell Science. 121, 255-264.
9. Anthony Scime, Annabelle Z. Caron, Guillaume Grenier. *Advances in myogenic cell transplantation and skeletal muscle tissue engineering*. [Frontiers in Bioscience 14, 3012-3023, January 1, 2009].
10. Andrea Porzionato, Maria Martina Sfriso, Alex Pontini, Veronica Macchi, Lucia Petrelli, Piero G.Pavan, Arturo N. Natali, Franco Bassetto, Vincenzo Vindigni,

Raffaele De Caro. *Decellularized Human Skeletal Muscle as Biologic Scaffold for Reconstructive Surgery*. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, *16*, 14808-14831.

11. M. Piccoli, L. Urbani, M.E. Alvarez-Fallas, C. Franzin, A. Dedja, E. Bertin, G. Zuccolotto, A. Rosato, P. Pavan, N. Elvassore, P. De Coppi, M. Pozzobon. *Improvement of diaphragmatic performance through orthotopic application of decellularized extracellular matrix patch*. *Biomaterials* 74 (2016) 245-255.
12. Stephen F. Badylak, Doris Taylor, Korkut Uygun. *Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds*. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2011. 13:27–53.
13. Arti Ahluwalia. *Approccio alla biomeccanica del tessuto muscolare*. Dispensa di Bioingegneria Meccanica 1 (2003).
14. Wynn, J., Yu, L., Chung, W. K., 2014. *Genetic causes of congenital diaphragmatic hernia*. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 19 (6), 324-330.
15. Leeuwen, L., Fitzgerald, D. A., 2014. *Congenital diaphragmatic hernia*. *Journal of Paediatrics and Child Health*. 50 (9), 667-673.
16. Brouwer, K. M., and Daamen, W. F., and Reijnen, D. and Verstegen, R. H. and Lammers, G. and Hafmans, T. G. and Wismans, R. G. and van Kuppevelt, T. H. and Wijnen, R. M., 2013. *Repair of surgically created diaphragmatic defect in rat with use of a crosslinked porous collagen scaffold*. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 7 (7), 552-561.
17. Conconi, M. T., Bellini, S., Teoli, D., De Coppi, P., Ribatti, D., Nico, B., Simonato, E., Gamba, P. G., Nussdorfer, G. G., Morpurgo, M., Parnigotto, P. P., 2009. *In vitro and in vivo evaluation of acellular diaphragmatic matrices with muscle precursors cells and coated with VEGF silica gels to repair muscle defect of the diaphragm*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 89 (2), 304-316.

18. Zhao, W., Ju, Y. M., Christ, G., Atala, A., Yoo, J. J., Lee, S. J., 2013. *Diaphragmatic muscle reconstruction with and aligned electrospun poly (ε-caprolactone)/collagen hybrid scaffold*. *Biomaterials*. 34 (33), 8235-8240.
19. Fauza, D. O., 2014. *Tissue engineering in congenital diaphragmatic hernia*. *Seminars in Pediatric Surgery*. 23 (3), 135-140.
20. Romao RL, Nasr A, Chiu PP, Langer JC. *What is the best prosthetic material for patch repair of congenital diaphragmatic hernia? Comparison and meta-analysis of porcine small intestinal submucosa and polytetrafluoroethylene*. *Journal of Pediatric Surgery* 2012; 47(8): 1496-1500.
21. Michel, Gurvan; Thierry Tonon; Delphine Scornet; J. Mark Cock; Bernard Kloareg (October 2010). "*The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga Ectocarpus siliculosus. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes*". *New Phytologist*. 188 (1): 82–97.
22. Alberts, Bruce (2002). *Molecular biology of the cell* (4. ed. ed.). New York [u.a.]: Garland.
23. L.Marcucci, C.Reggiani, A.N.Natali, P.Pavan (2017). *From single muscle fiber to whole muscle mechanics: a finite element model of a muscle bundle with fast and slow fibers*. Springer.
24. C.Y.Tang, G.Zhang, C.P.Tsui (2009). *A 3D skeletal muscle model coupled with active contraction of muscle fibres and hyperelastic behavior*. *Journal of Biomechanics*. Elsevier.

Ringraziamenti

Giunta al termine di questo mio percorso di studi, vorrei ringraziare quelle persone che a loro modo mi hanno affiancata, supportata, sopportata ed accompagnata lungo questa parte della mia vita.

Vorrei, innanzitutto, ringraziare il mio relatore, il Professor Piero Pavan, per avermi dato, con fiducia, la possibilità di iniziare ad inoltrarmi in un mondo in cui fondere la mia passione per la Medicina con l'Ingegneria, di avermi permesso di ampliare le mie conoscenze e di aver dato un senso a quelle già acquisite.

Ringrazio anche il mio Correlatore, Niccolò de Cesare, mio diavolo custode, ma anche mio grillo parlante; grazie per avermi insegnato, "a modo tuo", a non aver paura di provare e soprattutto di sbagliare, ma senza mai negarmi il tuo sostegno, per aver creduto in me e nelle mie capacità, grazie per la tua ironia e per il tuo umorismo. Grazie per avermi sopportata.

Ringrazio la dottoressa Martina Piccoli, per avermi accolta ed avermi dato la possibilità di fare parte, nel mio piccolo, del suo nobile progetto, e Paola Caccin, per la dolcezza e la simpatia con cui mi ha accompagnata e supportata nel mio percorso di tesi.

Ringrazio i miei amici, vicini e lontani, e i miei compagni di Università Pieralberto, Alberto, Marco e Riccardo.

Ringrazio le mie amiche Giuliana, Irene, Jenny, Ilaria, Elena, Elizabeth e Tijana, di fare parte della mia vita.

Ringrazio mia mamma Carla e mio papà Alessandro, i miei pilastri; e i miei fratelli Gloria ed Alberto, la mia squadra; tutta la mia famiglia: porto sicuro nel mare della mia vita.

Infine ringrazio i mie nonni, Raffaello e Gradisca, e nonna Odilla che porto ogni giorno nell'anima, per la loro bontà eterna, pezzi del mio cuore.

