

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Ingegneria

Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione

Dipartimento di Ingegneria Industriale

Corso di Laurea in Bioingegneria

Valutazione della propensione alla calcificazione di pericardio decellularizzato di origine animale in un modello in vitro

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Correlatore: Prof.ssa Laura Iop

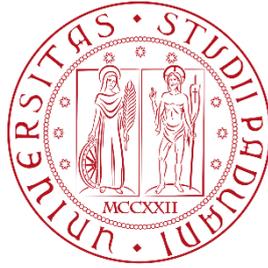
Correlatore: Dott.ssa Tiziana Palmosi

Laureando: Andrea Caruso

Matricola: 1143988

8 Luglio 2019

Anno Accademico 2018/19



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Ingegneria

Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione

Dipartimento di Ingegneria Industriale

Corso di Laurea in Bioingegneria

**Valutazione della propensione alla calcificazione di
pericardio decellularizzato di origine animale in un
modello in vitro**

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Correlatore: Prof.ssa Laura Iop

Correlatore: Dott.ssa Tiziana Palmosi

Laureando: Andrea Caruso

Matricola: 1143988

8 Luglio 2019

Anno Accademico 2018/19

INDICE

Abstract.....	5
1. Le valvole cardiache: anatomia e fisiopatologia	7
1.1 Anatomia del cuore	7
1.1.1 Circolazione del flusso sanguigno	9
1.1.2 Il ciclo cardiaco.....	11
1.2 Pericardio	15
1.3 Valvole cardiache.....	21
1.3.1 Anatomia delle valvole cardiache.....	23
1.3.2 Patologie valvolari	26
1.3.2.1 Patologie della valvola aortica.....	29
1.3.2.2 Patologie della valvola mitrale	33
2. Trattamento cardiocirurgico di sostituzione valvolare	39
2.1 Attuali soluzioni terapeutiche	40
2.1.1 Trattamenti per le disfunzioni della valvola aortica	42
2.1.2 Trattamenti per le disfunzioni della valvola mitrale	46

2.2	Sostituti valvolari	49
2.2.1	Valvole protesiche meccaniche	53
2.2.2	Valvole protesiche biologiche	57
2.2.2.1	Degenerazione calcifica dei sostituti valvolari biologici.....	62
2.2.2.2	Degradazione non calcifica dei sostituti valvolari biologici	66
2.3	Medicina rigenerativa delle valvole cardiache: ingegneria tissutale e modelli sperimentali per la valutazione della calcificazione.....	66
2.3.1	Modelli sperimentali per valutare la calcificazione	74
	Scopo dello studio.....	79
3.	Materiali e metodi	81
3.1	Preparazione alla decellularizzazione ed al trattamento con glutaraldeide .	81
3.2	Decellularizzazione TRICOL.....	83
3.3	Quantificazione del DNA.....	87
3.4	Trattamento con GA.....	88
3.5	Induzione alla calcificazione e successiva quantificazione del calcio	88
3.6	Analisi istologiche.....	89
3.6.1	Ematossilina - eosina	89
3.6.2	Von Kossa.....	90
3.8	Analisi microscopica ed elaborazione delle immagini.....	91

3.8	Analisi statistiche	91
4.	Risultati.....	93
4.1	Valutazione quantitativa della resa di decellularizzazione dei tessuti pericardici sottoposti a TRICOL	93
4.2	Valutazione quantitativa del calcio nei tessuti pericardici trattati	95
4.3	Analisi istologiche.....	98
4.3.1	Ematossilina - eosina	98
4.3.2	Von Kossa.....	100
5.	Discussione.....	103
	Bibliografia	109

Abstract

Negli ultimi 50 anni, è cresciuta l'attenzione per le patologie valvolari cardiache. Si stima infatti che il 20% delle operazioni chirurgiche in ambito cardiovascolare interessino le valvole cardiache. Ciò è dovuto in larga parte all'aumento dell'età media della popolazione, che ha cambiato l'eziologia della malattia nel corso degli anni.

Le protesi valvolari cardiache attualmente usate in clinica, meccaniche e biologiche, non soddisfano i requisiti di sostituto valvolare ideale.

Per superare le limitazioni di questi dispositivi, e in particolare la degenerazione calcifica indotta dal trattamento con glutaraldeide e/o la risposta immunitaria verso le cellule del donatore, l'ingegneria tissutale si pone l'obiettivo di individuare alternative maggiormente biocompatibili. Tra le soluzioni proposte, i sostituti valvolari decellularizzati sono di grande interesse clinico in quanto funzionali e autorigeneranti. Lo scopo di questa tesi è identificare la regione di pericardio più resistente alla calcificazione per procedere successivamente allo sviluppo di sostituti valvolari ad impianto classico o transcateretere. Per questo scopo, sono state considerate due regioni pericardiche molto diverse fra loro in termini di omogeneità della matrice extracellulare, ovvero le parti ventricolari destre anteriore e posteriore. Esse sono state decellularizzate secondo il protocollo TRICOL, confermando la efficace resa nella rimozione di tutti gli elementi cellulari e nella preservazione della architettura tissutale. Sono state quindi sottoposte a un trattamento di induzione alla calcificazione in grado di simulare *in vitro* lo scenario pro-calcifico tipico dei pazienti con metabolismo del calcio alterato e necessità di sostituzione valvolare. In queste particolari condizioni fisiopatologiche, le due regioni non hanno mostrato differenze statisticamente significative in termini di quantità di calcio depositato, ma si è osservata una diversa distribuzione di esso. Inoltre, questo pattern di propensione alla calcificazione non è risultato dissimile in analoghi campioni sottoposti al trattamento con glutaraldeide. Pur non consentendo ancora la scelta della regione maggiormente idonea per la costruzione di una protesi biologica avanzata, questi risultati aprono la strada a nuovi studi sul potenziale pro-calcifico del pericardio decellularizzato, come per esempio a

modelli *in vivo* che considerino il contatto con il sangue, la regione ortotopica di impianto e la risposta immunitaria del ricevente.

CAPITOLO 1

1. Le valvole cardiache: anatomia e fisiopatologia

Per poter approfondire l'anatomia e la fisiologia del cuore, nonché l'ambito in cui le valvole cardiache svolgono la loro funzione, è necessario precisare in quale sistema questo organo occupa un ruolo centrale. Il cuore (Figura 1.1) rappresenta la pompa del sistema circolatorio, organo fondamentale al fine di stabilire un gradiente di pressione sul sangue, per poterlo distribuire poi nei tessuti. Per il sistema circolatorio, il sangue rappresenta il mezzo di trasporto di sostanze – le quali possono essere nutrienti, ossigeno, anidride carbonica o prodotti di rifiuti [1] – e circola nei vasi sanguigni, che fungono da condotti per la diramazione del flusso ematico nei tessuti e per la sua riconduzione al cuore.

Il sistema è suddiviso in due circolazioni: quella polmonare (denominata “piccolo circolo”), che collega il cuore ai polmoni tramite un circolo chiuso di vasi sanguigni, e quella sistemica (definita “grande circolo”), che invece permette di trasportare il sangue verso tutti gli altri organi e tessuti, per farlo poi tornare nuovamente al cuore [2].

1.1 Anatomia del cuore

Il cuore è un organo cavo costituito da tessuto muscolare striato involontario, la cui forma è riconducibile a quella di un cono tronco [2], con asse simmetrico leggermente inclinato rispetto all'asse sagittale. Risiede nella cavità toracica tra i polmoni, nel mediastino anteriore [3], adagiato sul diaframma e racchiuso dallo sterno, dalle

LE VALVOLE CARDIACHE: ANATOMIA E FISIOPATOLOGIA

cartilagini costali (dalla 3° alla 6° [2-4]) e dalla vertebre toraciche posteriormente (dalla 5° alla 8°, dette vertebre cardiache [2-4]), al fine di proteggerlo. Inoltre, l'organo è avvolto dal pericardio, che svolge funzioni di supporto, di protezione e di contenimento, al fine di delimitarne la distensibilità [3].

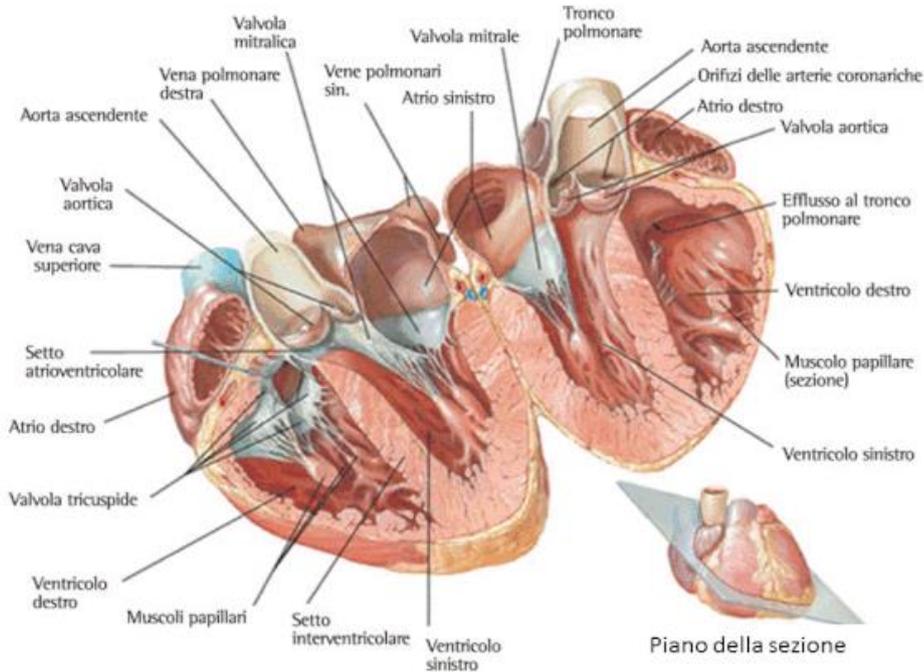


Figura 1.1: Anatomia del cuore [4].

La parete cardiaca è composta da tre strati. L'epicardio è la membrana più esterna che riveste il cuore, dello spessore di circa 20 micron. Rimossa questa membrana, si ha la tonaca mediana, il miocardio, ben più spessa, composta da fibre muscolari e tessuto connettivo, la quale non presenta omogeneità di spessore su tutto il cuore, arrivando addirittura ad avere alcuni millimetri di differenza in zone diverse; infatti, è presente un ispessimento dello strato miocardico a livello del ventricolo sinistro [2], [4], in quanto quest'ultimo si trova coinvolto durante la fase di sistole, che, come verrà approfondito in seguito, necessita di una contrazione muscolare intensa. Infine, la tonaca interna prende il nome di endocardio, la quale presenta le stesse funzioni dell'endotelio – membrana interna dei vasi sanguigni –, ovvero quelle di favorire il

passaggio della corrente sanguigna, ostacolando qualsiasi tipo di attrito che possa dare inizio alla formazione di un coagulo [2].

Sebbene anatomicamente il cuore sia rappresentato di solito come un organo singolo, esso è suddiviso in realtà in due parti (cuore destro e cuore sinistro) non comunicanti mai tra di loro, separati da una parete muscolare continua che impedisce il mescolamento del sangue; ogni parte è costituita, poi, da due cavità, un atrio ed un ventricolo (vedi Figura 1.1). Il setto che separa i due atri è detto setto interatriale, quello che divide i due ventricoli invece setto interventricolare; le due pareti sono distinguibili sia per spessore che per costituzione [2]. Delle quattro camere di cui è composto il cuore, i due atri sono posti superiormente ai rispettivi ventricoli e formano la base del cuore, mentre nella zona apicale inferiore è situato il ventricolo sinistro [4]. Ogni atrio può comunicare esclusivamente con il ventricolo sottostante, nella propria parte del cuore; le due cavità sono comunicanti per mezzo di una valvola (vedi Figura 1.1), la quale assicura che il flusso del sangue non sia retrogrado [3]. Nel cuore esistono quattro valvole: due sono, appunto, quelle che collegano atrio e ventricolo e sono dette valvole atrioventricolari, divise a loro volta in tricuspide e mitrale, rispettivamente nella parte destra e sinistra del cuore. Le altre due valvole sono invece denominate semilunari per la loro forma e collegano i ventricoli alle arterie polmonare ed aortica [2-4].

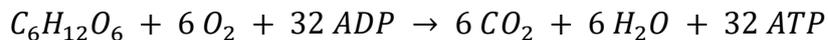
1.1.1 Circolazione del flusso sanguigno

Per la tipologia di conformazione del cuore, la circolazione del flusso sanguigno (Figura 1.2) può essere interpretata come la disposizione in serie di due sistemi circolatori [3]: atrio destro, ventricolo destro ed arteria polmonare per quanto concerne la circolazione polmonare; atrio sinistro, ventricolo sinistro ed aorta per la circolazione sistemica. Pertanto, sebbene inizialmente il cuore sia stato interpretato come una singola pompa, in realtà funge da doppia pompa [1].

LE VALVOLE CARDIACHE: ANATOMIA E FISIOPATOLOGIA

L'atrio destro riceve il sangue che refluisce dalla circolazione sistemica, quindi carico di anidride carbonica, attraverso le vene cave superiore ed inferiore [2], rispettivamente necessarie per il drenaggio del flusso sanguigno presente nella metà sovrastante e sottostante del corpo rispetto al cuore. Il sangue parzialmente deossigenato, una volta giunto nell'atrio, scorre verso il ventricolo sottostante, il quale, attraverso un'attività di pompaggio, lo eietta lungo il sistema circolatorio respiratorio tramite le arterie polmonari sinistra e destra [4].

Di contro, le vene polmonari sinistre immettono sangue ricco di ossigeno nell'atrio sinistro, il quale refluisce la corrente sanguigna nel ventricolo sottostante. Quest'ultimo, tramite un'azione di contrazione, pompa il sangue lungo l'aorta, in cui viene poi diramato nei vari tessuti e organi sistemici. Il sangue arterioso irrorando quindi i tessuti, bisognosi di ossigeno, elemento indispensabile al fine di consentire la reazione chimica della respirazione cellulare, complessivamente racchiusa nella seguente formula [1]:



La CO₂ prodotta viene quindi trasportata dal sangue attraverso le vene fino all'atrio destro, da dove riprende un nuovo circolo completo.

Sebbene abbiano lo stesso ruolo di pompaggio, le due parti del cuore presentano delle sostanziali differenze, dovute principalmente alla diversa morfologia del sistema di vasi che vanno ad irrorare. Infatti, il muscolo cardiaco sul lato sinistro del cuore presenta un ispessimento maggiore rispetto al lato destro [4]. Questo non è dovuto alla quantità di sangue pompato, in quanto entrambe le parti eiettano lo stesso volume ematico, bensì alla diversa mole di lavoro tra i due [1]. Mentre la parte destra provvede a pompare sangue nella circolazione polmonare, che lavora a basse pressioni e bassa resistenza idrodinamica, l'altra parte compie più lavoro, in quanto il circolo sistemico presenta una pressione maggiore e maggiore resistenza idrodinamica [1].

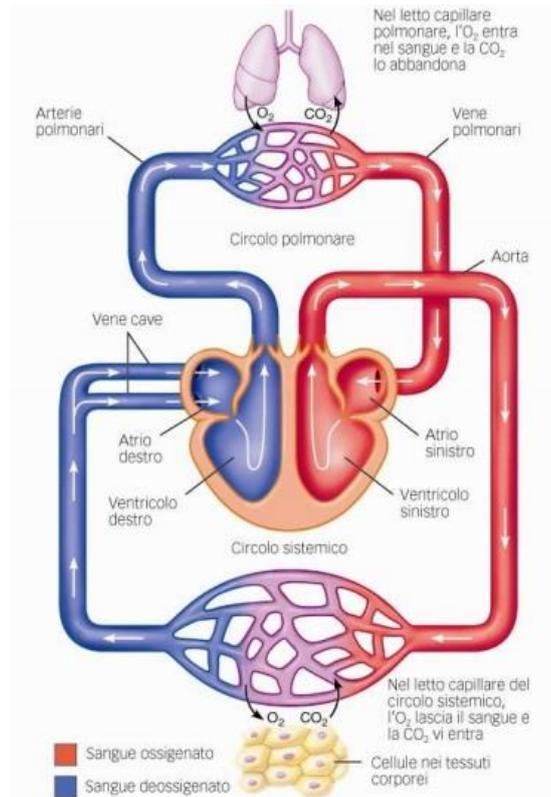


Figura 1.2: Circolazione del flusso sanguigno [5].

1.1.2 Il ciclo cardiaco

In quanto pompa del sistema circolatorio, il cuore effettua una attività di contrazione molto intensa: in media si pensa che il cuore si contragga addirittura tre miliardi di volte nel corso della vita. Questo ruolo è fondamentale per assicurare un'adeguata gittata cardiaca (volume di sangue pompato da ogni ventricolo in un minuto), che può variare dai 5 litri al minuto in un'eventuale situazione di riposo sino perfino a quattro volte tanto, nel caso di intensa attività fisica [1].

Per ciclo cardiaco si intende l'insieme degli avvenimenti presenti tra due battiti cardiaci. Esso è costituito da due fasi alternate: il periodo di sistole, contraddistinto da contrazione e svuotamento, ed il periodo di diastole, rappresentante invece rilasciamento e riempimento, con atri e ventricoli che effettuano dei cicli separati di sistole e di diastole indipendenti [1].

LE VALVOLE CARDIACHE: ANATOMIA E FISIOPATOLOGIA

Per poter analizzare la sequenza di cui si compone il ciclo cardiaco, vanno sottolineati l'origine del battito cardiaco ed il sistema di conduzione (Figura 1.3). Lo stimolo elettrico cardiaco, che dà il via alle fasi di eccitamento e di contrazione, è generato da un sistema specializzato che è definito in alcune aree del cuore, costituito da cellule autoritmiche, diverse da quelle muscolari contrattili, in quanto con caratteristiche più simili a quelle del sistema nervoso, capaci di iniziare e condurre potenziali d'azione responsabili della contrazione cardiaca [3]. Queste cellule, a differenza delle altre citate, non presentano un potenziale di riposo, dando spazio ad un'attività pacemaker, ovvero ad una lenta depolarizzazione tra due potenziali d'azione consecutivi [1].

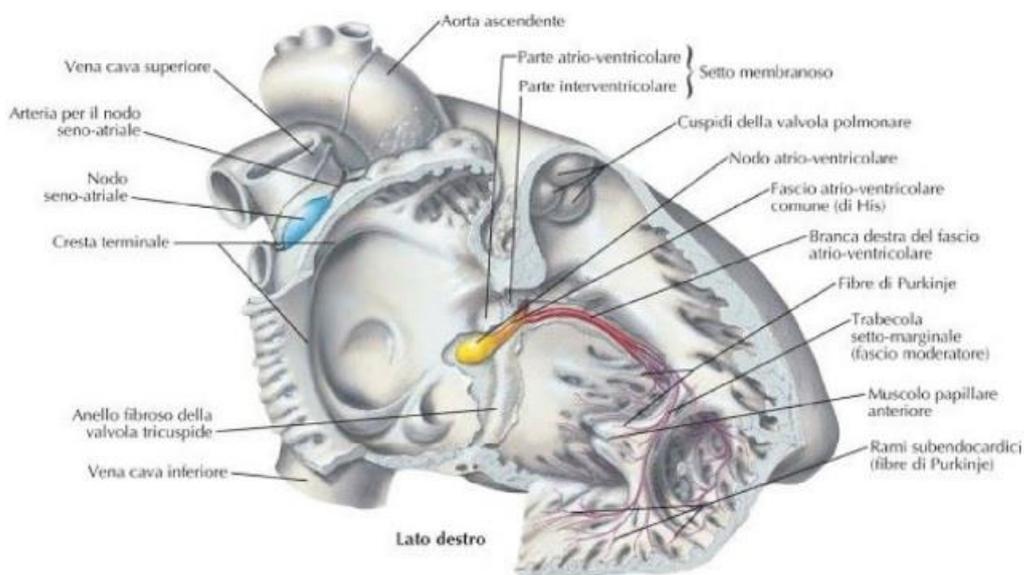


Figura 1.3: Sistema di conduzione cardiaca [4].

L'attività elettrica esposta non può essere registrata in maniera diretta; l'impulso cardiaco però induce un'attività elettrica nei liquidi corporei, la quale è invece misurabile tramite l'elettrocardiogramma (ECG) [1].

Questo esame diagnostico registra la propagazione dell'attività elettrica cardiaca sia durante la depolarizzazione sia durante la ripolarizzazione (Figura 1.4).

LE VALVOLE CARDIACHE: ANATOMIA E FISIOPATOLOGIA

In particolare l'onda P rappresenta la depolarizzazione atriale, mentre il complesso QRS è prodotto da quella ventricolare; infine l'onda T è generata dalla ripolarizzazione ventricolare [6]. Gli intervalli tra queste onde rappresentano rispettivamente il ritardo del nodo atrioventricolare per l'intervallo PR, il tempo necessario per la contrazione e lo svuotamento dei ventricoli per l'intervallo ST ed infine il tempo affinché i ventricoli si rilassino e si riempiano per l'intervallo TP. Gli eventi meccanici del ciclo cardiaco sono in lieve ritardo rispetto alle onde elettriche appena analizzate [1], [6], in quanto le onde di depolarizzazione e ripolarizzazione sono determinanti nell'alternanza rispettiva di contrazione e rilasciamento del cuore.

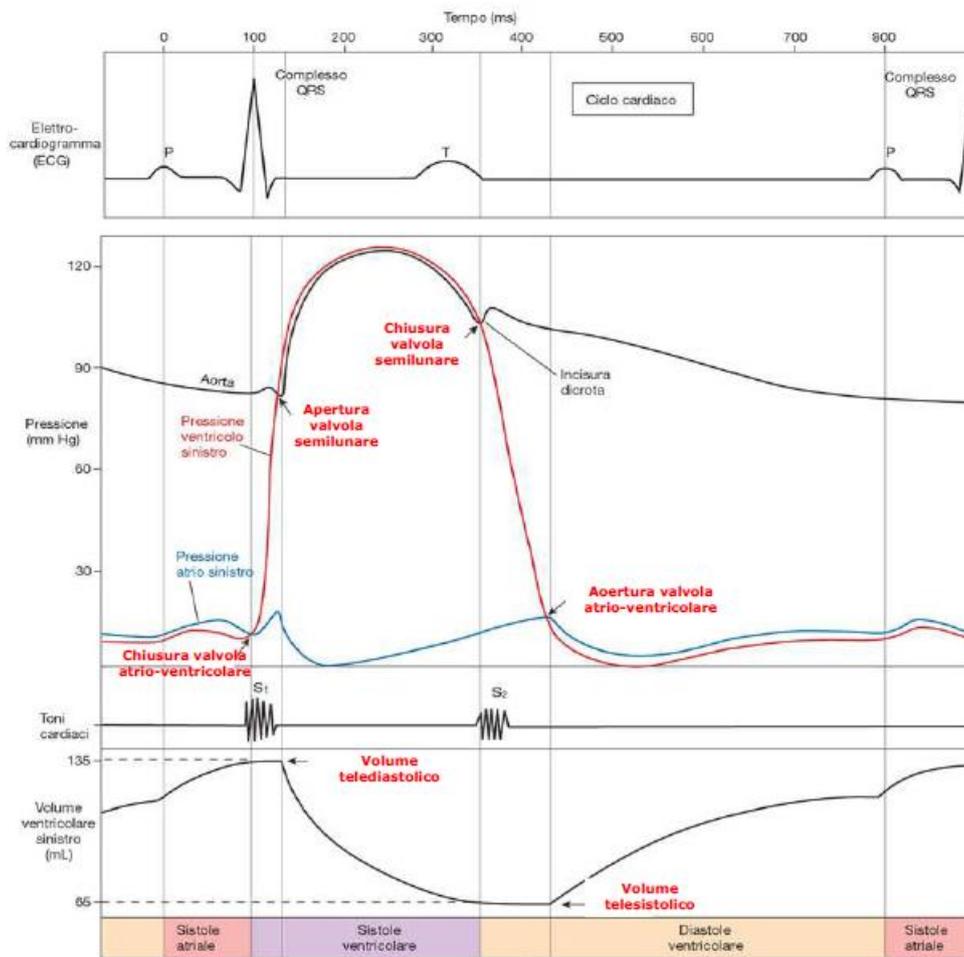


Figura 1.4: Diagramma rappresentante la simultaneità tra gli eventi durante il ciclo cardiaco [7].

Pertanto, la sistole atriale ha inizio poco dopo l'apparizione dell'onda P, mentre la sistole ventricolare verso la fine del dell'onda R, concludendo subito dopo l'onda T. Per analizzare nel dettaglio gli eventi tra un battito e l'altro, si ipotizzi come inizio del ciclo lo stato corrispondente all'intervallo TP sull'ECG, ovvero di diastole ventricolare, visibile anche in Figura 1.5. Durante questo periodo anche l'atrio è ancora in fase di diastole, in riempimento a causa del continuo afflusso di sangue venoso in corso. La presenza di volume ematico nella camera atriale crea una differenza di pressione con il ventricolo sottostante, tale per cui la valvola atrioventricolare si apra e permetta lo scorrere del sangue nella camera sottostante [1]. Mentre il livello di volume ematico aumenta nel ventricolo, avviene la fase di sistole atriale (vedi Figura 1.5), in cui gli atri si contraggono, a causa della depolarizzazione visibile sull'ECG con l'onda P nell'ECG. Come conseguenza, il sangue rimanente nell'atrio viene eiettato nel ventricolo, mantenendo nella camera atriale una pressione maggiore al fine di tenere aperto il nodo AV.

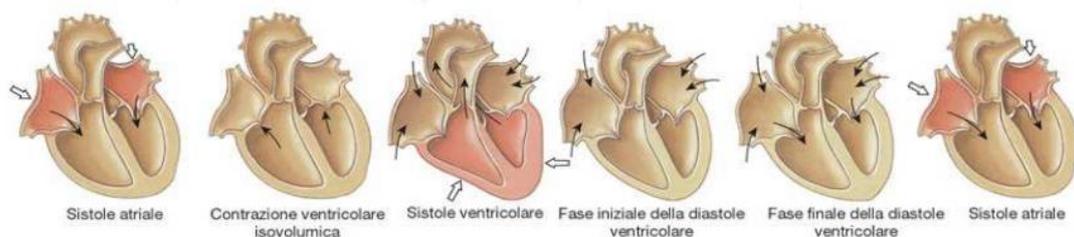


Figura 1.5: Le fasi del ciclo cardiaco [7].

Non appena terminata la sistole atriale, ha inizio quella ventricolare, a causa dell'impulso elettrico che si propaga attraverso il nodo AV (corrispondente al complesso QRS) [1]. In questa fase la contrazione ventricolare crea un aumento graduale di pressione della corrispondente camera tale da far chiudere dapprima il nodo atrioventricolare, per poi, dopo un breve intervallo, far aprire le valvole aortica e polmonare una volta superata la pressione rispettivamente nell'aorta (80 mmHg) e nell'arteria polmonare (10 mmHg) [1]. Ha qui inizio la fase di eiezione ventricolare,

momento in cui il sangue viene pompato nelle arterie, facendo diminuire il volume ventricolare e di conseguenza la pressione intraventricolare. Il ventricolo, alla fine della fase di eiezione, non verrà comunque svuotato completamente, tenendo circa la metà del sangue presente inizialmente [1]. Infine, l'onda T segnala la ripolarizzazione ventricolare nonché la fine della sistole atriale, con il conseguente rilassamento del ventricolo e la chiusura delle valvole aortica e polmonare. Da qui a breve, la pressione atriale supererà quella della camera sottostante, dando la possibilità di iniziare un ulteriore ciclo cardiaco.

1.2 Pericardio

Il pericardio è un sacco fibrosiero contenente il cuore, con il ruolo di sostenerlo all'interno del mediastino; esso è composto dal pericardio esterno fibroso e dal pericardio interno sieroso. Quest'ultimo è a sua volta suddiviso in due foglietti di origine celomatica, uno parietale ed uno viscerale [2]. Il primo è composto da un sottile strato di cellule mesoteliali sostenute da un tessuto connettivo costituito perlopiù da collagene, adeso al pericardio fibroso; il secondo, detto anche epicardio, è costituito da un solo strato di cellule mesoteliali ed avvolge il cuore [8].

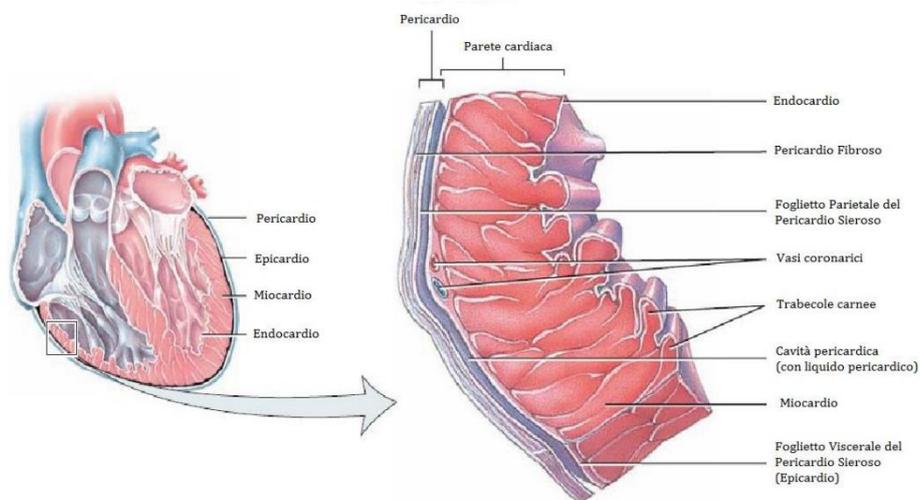


Figura 1.6: Rappresentazione schematica della suddivisione del pericardio [10].

Tra i due foglietti è presente una cavità, il *Cavum Pericardii*, nella quale sono presenti fino a 50mL di liquido pericardico, prodotto dal mesotelio del pericardio sieroso, al fine di diminuire le possibilità di attrito [9].

Il pericardio fibroso si può suddividere in una parete anteriore ed una posteriore. La lamina anteriore è convessa, prolungata su ogni lato sino all'ilo del polmone, ed in rapporto con la faccia mediastinica dei polmoni e con la pleura mediastinica, la quale aderisce e si sovrappone al pericardio. Con lo sterno, poi, avviene un contatto diretto [2].

La parete posteriore, invece, risulta piatta, non a contatto diretto con la colonna vertebrale, in quanto è presente una separazione ad opera dei bronchi principali, dell'esofago ed infine della parte posteriore della faccia mediastinica dei polmoni [4]. Il pericardio fibroso è un rivestimento di tessuto connettivo denso, delimitato ed aderente, oltre che dalle già esposte aree posteriori ed anteriori, in basso dal diaframma ed in alto dall'avventizia dei grossi vasi, estendendosi poi agli organi vicini, con i quali forma dei tratti fibrosi. Quest'ultimi sono identificati come i legamenti del pericardio (Figura 1.7), i quali sono suddivisi in frenopericardici, vertebropericardico e sternopericardici: i primi hanno il ruolo di rafforzare l'aderenza del pericardio fibroso al diaframma e sono suddivisi in anteriori e laterali, destro e sinistro; il secondo è composto da più fasci fibrosi i quali uniscono il pericardio alla colonna vertebrale, all'altezza della quarta o quinta vertebra toracica; infine i legamenti sternopericardici decorrono tra lo sterno ed il pericardio e sono divisi a loro volta in legamento sternopericardico superiore ed inferiore [2].

A differenza di ciò che accade nell'uomo, nei mammiferi domestici il pericardio non presenta alcuna unione al diaframma, dove invece è presente un legamento freno-pericardico di collegamento. I legamenti sterno-pericardici, poi, sono presenti esclusivamente nei bovini e nel maiale, oltre che nell'uomo.

Il pericardio fibroso, come gli altri tessuti animali, è suddiviso in una parte cellulare – che in questo caso è costituita da fibroblasti – e da uno spazio intercellulare riempito da materiale gelatinoso e viscoso [11], detto matrice extracellulare (ECM). I

LE VALVOLE CARDIACHE: ANATOMIA E FISIOPATOLOGIA

componenti di cui è formata quest'ultima sono sintetizzati dai fibroblasti, tra cui il collagene di tipo I e III [12].

In particolare, il pericardio non è suddiviso in parti uguali tra componente cellulare e ECM: quest'ultima, infatti, è ben più presente rispetto alla prima.

I ruoli principali della ECM sono di fungere da supporto e protezione per le cellule, al fine di mantenere la loro integrità; è stato ampiamente dimostrato, poi, l'importanza della matrice nel regolare la proliferazione ed il differenziamento cellulare. Essa è costituita principalmente da due componenti principali, in quanto si tratta di una struttura formata da un intreccio di eteropolisaccaridi e di proteine fibrose [11].

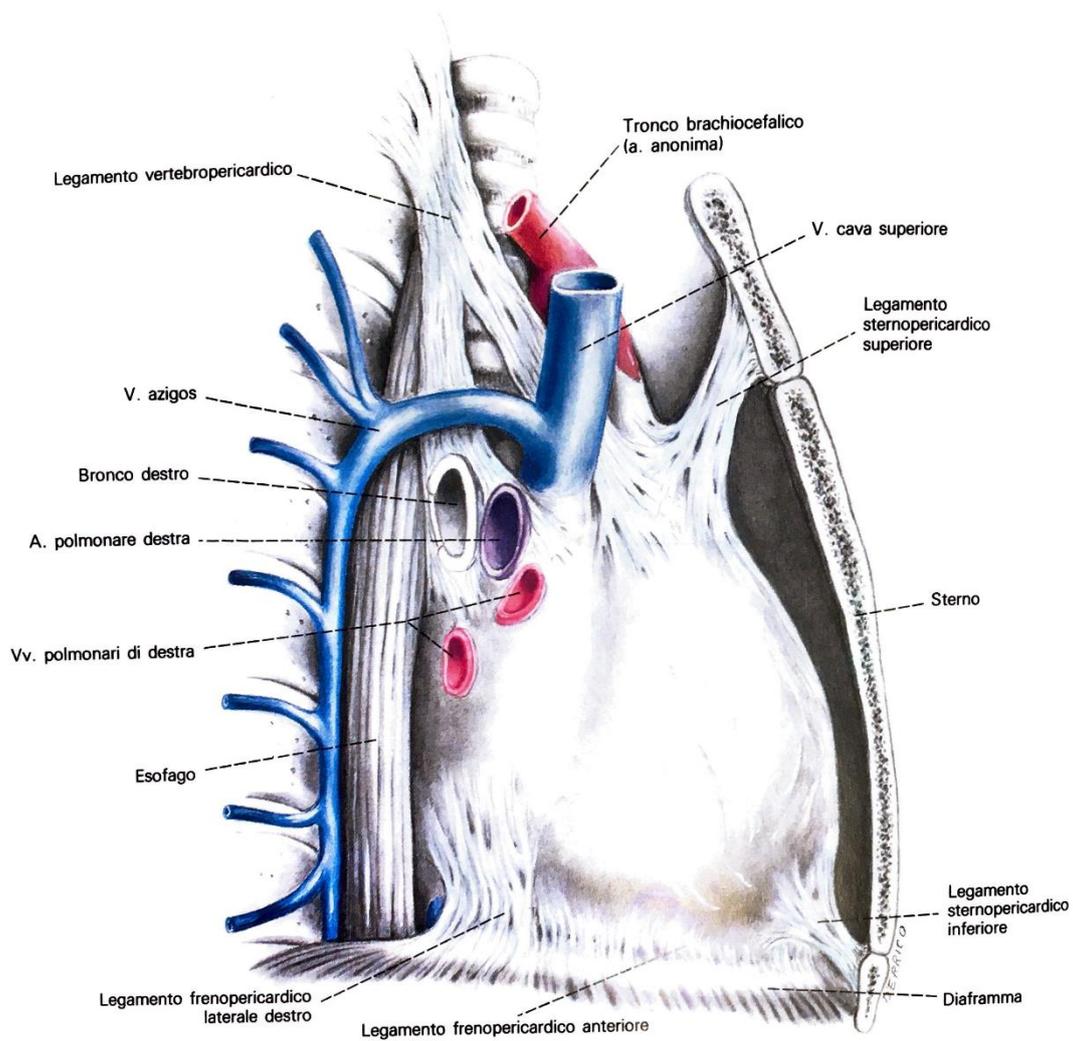


Figura 1.7: Rappresentazione dei legamenti del pericardio [2].

LE VALVOLE CARDIACHE: ANATOMIA E FISIOPATOLOGIA

Gli eteropolisaccaridi sono rappresentati principalmente da glicosamminoglicani e proteoglicani nella ECM, dove costituiscono la sostanza fondamentale amorfa, responsabile della diffusione di nutrienti nel tessuto.

I glicosamminoglicani (GAGs) sono una famiglia di polimeri lineari, formati dalla ripetizione monomerica di due unità glucidiche [11].

I proteoglicani sono a loro volta formati da GAGs che si sono legati a proteine extracellulari. Sono visibili come lunghe catene di un glicosamminoglicano, lo ialuronato, alle quali si legano non covalentemente svariate unità proteiche (Figura 1.8) [11]. Tra le proprietà del composto, sono da annoverarsi un'elevata viscoelasticità, dovuta all'architettura complessa e ramificata, ed una concentrazione di cariche negative ed una spiccata idrofilicità, che lo rendono in grado di trattenere liquido interstiziale [13].

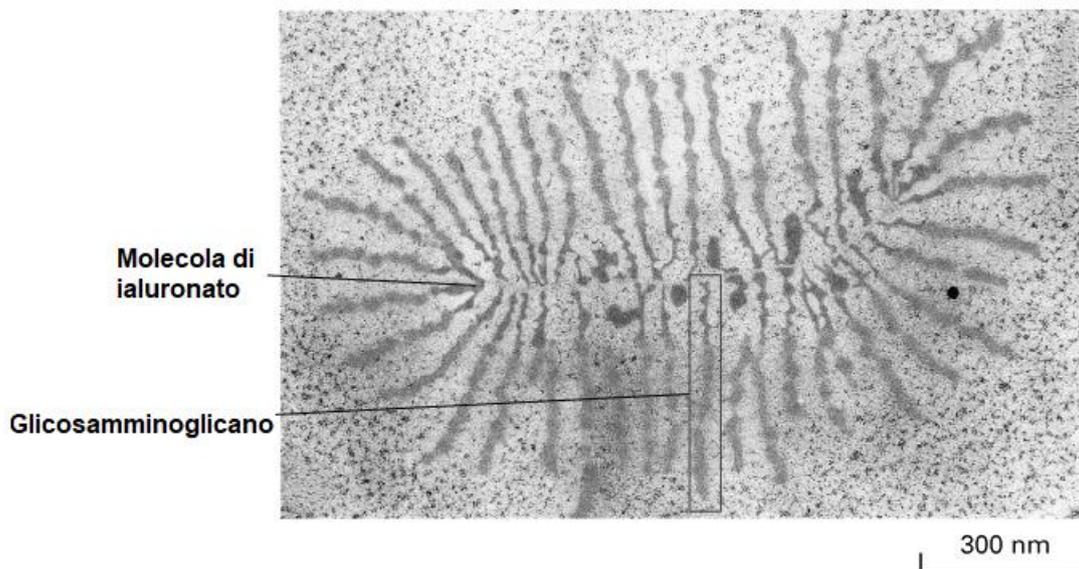


Figura 1.8: Microfotografia elettronica di un proteoglicano [11].

Le proteine fibrose, per le loro proprietà fisiche e per la loro disposizione nella ECM, conferiscono consistenza e resistenza. Le principali proteine fibrose presenti nella ECM sono il collagene e l'elastina.

Il collagene è una proteina strutturale e molto abbondante nel corpo umano, rappresentante il 25% di tutte le proteine presenti [11]. Attualmente sono stati scoperti 28 differenti tipi di collagene in natura [14], ma soltanto quelli di tipo I e III

costituiscono il tessuto pericardico, mentre il collagene di tipo IV è responsabile della formazione della membrana basale [15], assieme alla laminina – una glicoproteina presente nella ECM – e ad alcuni proteoglicani, tra cui eparan solfato, perlecano ed agrina [16].

Le funzioni principali del collagene sono di supporto e di collegamento, dovute ai tipi di amminoacidi ed alle interazioni delle catene che compongono la sua struttura proteica. Nel collagene, infatti, ogni singolo filamento, composto in particolare dalla ripetizione di triplette in sequenza Gly-Pro-Hyp (glicina, prolina, idrossiprolina), assume una struttura elicoidale sinistrorsa; tre filamenti organizzati costituiscono invece il precursore del collagene, il tropocollagene, formando una superelica destrorsa. Lunghe fila parallele e spaiate di molecole di tropocollagene si formano per costituire le microfibrille submicroscopiche (Figura 1.9), in modo tale da creare la massima resistenza possibile alla trazione [11].

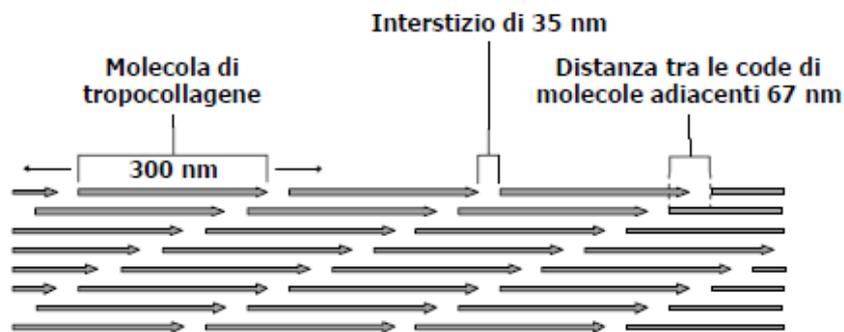


Figura 1.9: Organizzazione delle molecole di tropocollagene [11].

Sebbene sia il pericardio bovino che quello porcino siano costituiti da collagene I e III, quest'ultimi presentano concentrazioni diverse tra i due tessuti, portando a prestazioni biomeccaniche differenti. Infatti, nel pericardio bovino il collagene è suddiviso nel 90% dal tipo I e nel 10% dal tipo III, diversamente a quanto avviene in quello porcino, dove la concentrazione del tipo I è dell'80%, mentre quella di tipo III del 20%. L'aumento del collagene di tipo III comporta una maggiore rigidità ed una minore distensibilità rispetto al pericardio bovino [17].

LE VALVOLE CARDIACHE: ANATOMIA E FISIOPATOLOGIA

L'elastina è la seconda proteina fibrosa della ECM per presenza, senza grandi variazioni di concentrazione tra pericardio porcino e bovino; in particolare in quest'ultimo la quantità di elastina è pari a circa il 4% [18].

Il comportamento elastico dell'elastina è dovuto alla sua conformazione reticolata, spiraliforme e *random coil* [19], che permette di rimanere condensata in fase di riposo, di estendersi durante la presenza di una forza traente (Figura 1.10) e di tornare infine al suo aspetto iniziale una volta terminata la sollecitazione.

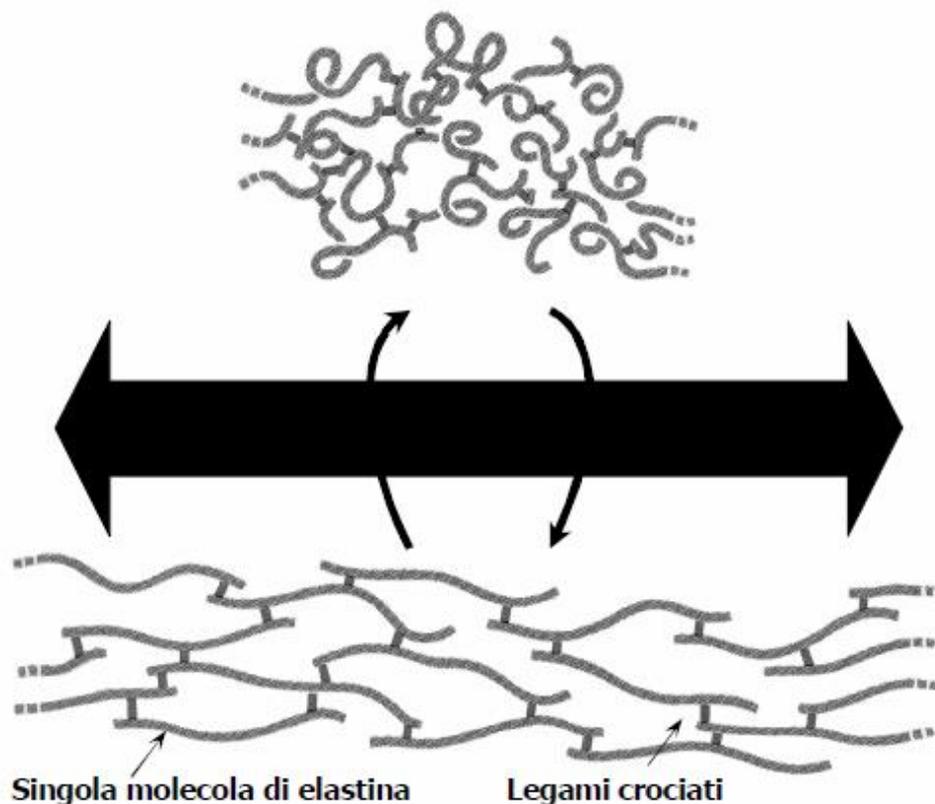


Figura 1.10: Conformazione dell'elastina allo stato di riposo e sotto sforzo [11].

1.3 Valvole cardiache

L'anatomia del cuore e delle sue parti è oggetto di studio fin dall'antica Grecia. Aristotele (384-322 a.C.) aveva definito l'apparato cardiaco come l'organo centrale, *l'arché*, di tutti i vasi sanguigni [20]. E' invece di Erasistrato la prima descrizione delle valvole cardiache, con un approfondimento sul loro ruolo di convogliare il sangue nel cuore [20].

I tratti anatomici delle valvole cardiache sono stati studiati e caratterizzati anche da Leonardo da Vinci, il quale, nel *folio 115 verso* del “Corpus of the anatomical Studies” della collezione della Regina presso il Castello di Windsor, riportò numerosi disegni della valvola aortica (Figura 1.11). L'interesse dello scienziato italiano verso i componenti cardiaci è da ricondursi ai suoi studi sulla fluidodinamica, comprendendo che le valvole avessero delle caratteristiche emodinamiche importanti. La struttura valvolare era stata scomposta da Leonardo per caratterizzare funzione ed anatomia strutturale, definendo *li uscjoli* i lembi e *l'infima bassezza* lo scheletro fibroso. Ha intuito così non solo l'attività di chiusura della valvola, ma motivato perché la configurazione con tre cuspidi fosse più performante rispetto a due o a quattro lembi: “*per la qual cosa langolo piu ottuso e piu forte chellangolo retto del quadrato*” (“per questa ragione l'angolo ottuso è più forte rispetto all'angolo retto del quadrato”).



Figura 1.11: Disegno di Leonardo da Vinci, rappresentante l'anatomia della valvola aortica [21].

LE VALVOLE CARDIACHE: ANATOMIA E FISIOPATOLOGIA

In questo modo, egli di fatto anticipò il concetto di aumento dello stress cuspidale in presenza di malattie congenite valvolari, caratterizzate da un numero anomalo di lembi, come nel caso della valvola bicuspidale.

Come anticipato nel paragrafo 1.1, il cuore presenta quattro valvole cardiache: due sono poste tra atri e ventricoli, dette tricuspide e mitrale, nella parte destra e sinistra del cuore; le altre, invece, sono presenti tra le camere ventricolari e l'arteria polmonare, a destra, e l'aorta, a sinistra, rispettivamente dette valvole polmonare ed aortica [3]. Quest'ultime, inoltre, sono classificate come "semilunari" per la loro forma caratteristica (Figura 1.12).

La funzione principale delle valvole è quella di rendere il flusso ematico unidirezionale anterogrado [3], con un sistema di apertura e chiusura dettato dalla pressione presente nelle camere atriali ventricolari, variabile durante le fasi di sistole e diastole, come visibili nelle Figure 1.12 e 1.13. In particolare, nelle due immagini è possibile notare non solo la forma di ogni valvola, ma anche quali siano aperte durante la fase di sistole, le semilunari, e quali durante la fase di diastole, le atrioventricolari.

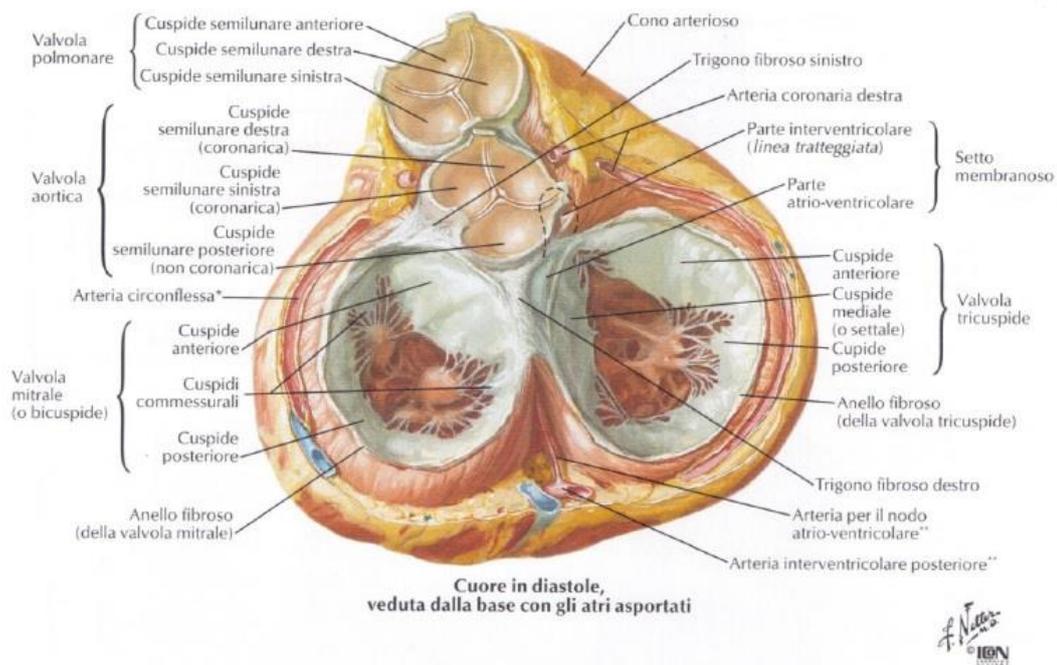


Figura 1.12: Anatomia e posizione delle valvole cardiache durante la fase diastolica cardiaca [4].

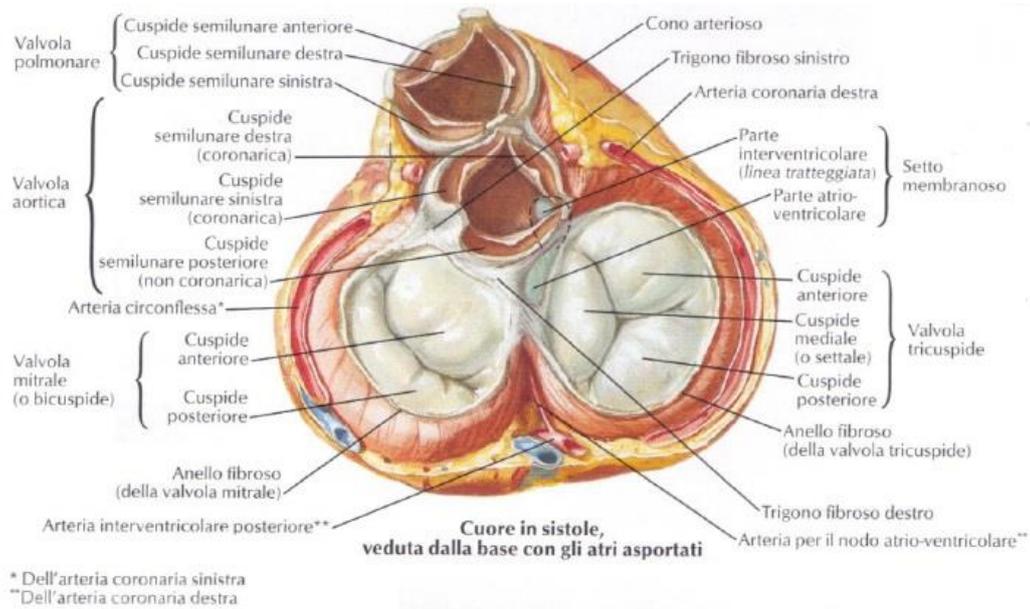


Figura 1.13: Anatomia e posizione delle valvole cardiache durante la fase sistolica cardiaca [4].

1.3.1 Anatomia delle valvole cardiache

Le valvole cardiache sono localizzate negli osti venosi ed arteriosi [2], delimitati da anelli fibrosi che fanno parte dello scheletro del cuore. Quest'ultimo è una formazione fibrosa che offre un impianto per le valvole cardiache e permette una continuità strutturale tra i ventricoli e le arterie [2]. Gli anelli fibrosi sono costituiti perlopiù da collagene ed in parte da elastina, presentando spessori diversi tra di loro; si collocano su uno stesso piano (Figura 1.14), ad eccezione dell'orifizio polmonare, posto leggermente più in alto [22].

La valvola tricuspide è la più grande tra le quattro, arrivando ad avere il 20% di superficie in più della valvola mitrale [23]. Essa è composta da tre cuspidi, le quali si inseriscono sull'anello fibroso che circonda la valvola, dividendosi in settale, inferiore ed antero-superiore, che sono rispettivamente separate fra loro dalle commissure –

LE VALVOLE CARDIACHE: ANATOMIA E FISIOPATOLOGIA

ovvero il punto di passaggio tra un lembo e l'altro – dette antero-settale, supero-inferiore ed infero-settale [24].

La seconda valvola atrioventricolare è quella mitrale, che separa atrio e ventricolo sinistro, formata invece da due lembi, uno definito anteromediale ed uno più piccolo posteromediale [3], i quali sono collegati ai propri muscoli papillari tramite le corde tendinee; quest'ultime sono dei filamenti di collagene che permettono di regolare la chiusura della valvola in modo tale che i lembi combacino perfettamente durante la fase di sistole, andando quindi ad assicurare il gradiente di pressione necessario per il pompaggio cardiaco.

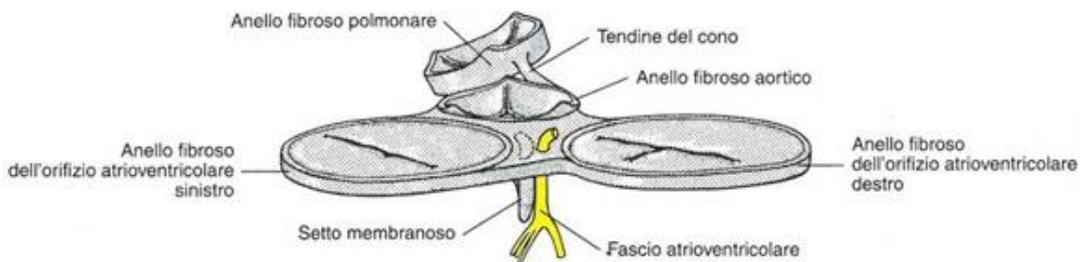


Figura 1.14: Scheletro fibroso del cuore, visto di profilo e da dietro [2].

Le valvole semilunari, più piccole per diametro di quelle mitralica e tricuspide, non presentano corde tendinee. Esse sono morfologicamente simili tra loro e sono formate da tre lembi a forma di nido di rondine [25] e da tre seni di Valsalva [3], [26], piccole dilatazioni della parete aortica in corrispondenza delle cuspidi. Al centro del margine libero di ogni cuspidè è presente una formazione nodulare di natura fibrosa, detta nodulo d'Aranzio, per la valvola aortica, e nodulo di Morgagni, per quella polmonare [26]. Nella valvola aortica, i seni ed i lembi corrispondenti sono definiti come seno e lembo coronarico destro, seno e lembo coronarico sinistro e seno e lembo non coronarico; nella valvola polmonare, invece, le cuspidi sono più sottili e sono definite come anteriore, destra-adiacente e sinistra-adiacente [25].

A livello microscopico, le cuspidi di tutte e quattro le valvole cardiache presentano tre diversi strati (Figura 1.15), i quali conferiscono caratteristiche diverse alla struttura:

LE VALVOLE CARDIACHE: ANATOMIA E FISIOPATOLOGIA

sul versante parietale è visibile una tonaca, denominata *fibrosa*, formata da tessuto connettivo fibroso denso, in particolare collagene I, al fine di aumentare la resistenza della valvola; è presente poi sul versante assiale una tonaca elastica, definita *atrialis* per le valvole atrioventricolari e *ventricularis* per quelle semilunari, a seconda di quale camera si affaccia l'orifizio. Infine, vi è un terzo strato, detto *spongiosa*, posto tra le prime due tonache, costituito da tessuto lasso ricco di glicosaminoglicani, che funge da strato di scorrimento ed assorbimento degli shock meccanici durante il ciclo cardiaco. La tipologia di stratificazione dei lembi è strutturata in modo diverso a causa del tipo di condizione emodinamica che devono fronteggiare. Infatti, la parete elastica è rivolta verso il ventricolo o l'atrio per le sue proprietà che permettono la massima dilatazione durante l'apertura; quella fibrosa, invece, presenta una struttura che assicura maggior resistenza agli stress meccanici e di pressione.

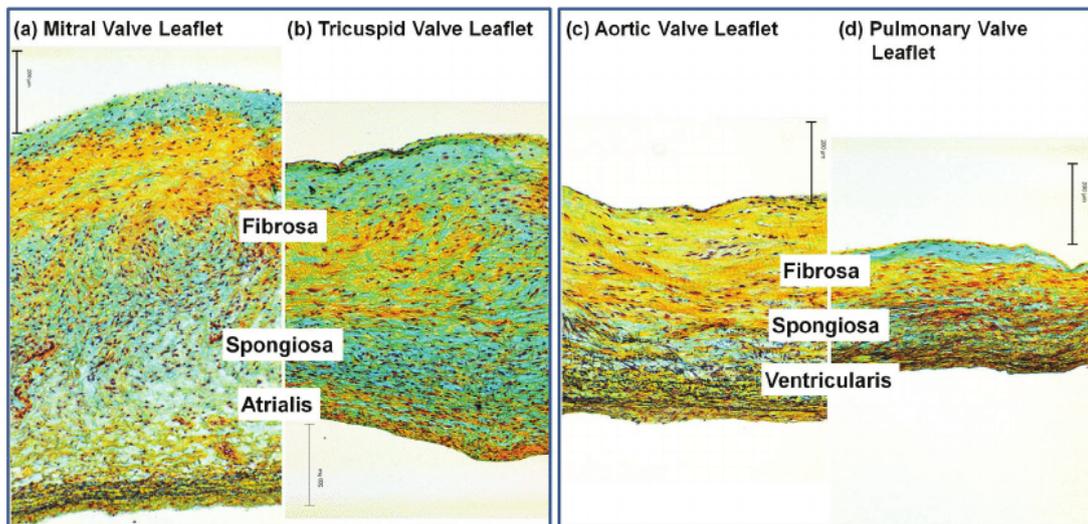


Figura 1.15: Confronto istologico di (a) lembo della valvola mitrale, (b) lembo valvolare tricuspide, (c) cuspidella della valvola aortica e (d) cuspidella della valvola polmonare. Si noti che, per i lembi valvolari mitrali e tricuspidi, la struttura stratificata è fibrosa (fronte il ventricolo), spongiosa ed atriale; per i lembi valvolari aortici e polmonari, la struttura stratificata è fibrosa (fronte l'aorta / arteria polmonare), spongiosa e ventricularis. Barra della scala = 200 μm [27].

Entrambe le superfici sono ricoperte da cellule endoteliali valvolari, fondamentali, tra l'altro, a garantire la proprietà antitrombotica della valvola. A differenza delle cellule endoteliali vascolari, quelle valvolari non si allineano parallele al flusso ematico, bensì perpendicolarmente a questo. secondo alcune ipotesi, questo allineamento è dovuto ai diversi percorsi di meccanotrasduzione che coinvolgono i due tipi endoteliali [28]. Infatti, nei vasi sanguigni lo stress meccanico maggiore si raggiunge in parallelo al flusso ematico [29], nelle cuspidi valvolari invece ortogonalmente. Altri, invece, ritengono che la diversità tra i due tipi di cellule endoteliali siano dovute a diversità dei due fenotipi cellulari, in quanto sono presenti delle differenze nell'espressione genica tra i due [30]. Le due ipotesi esposte sono estremamente correlate l'una all'altra, in quanto, in seguito a qualsiasi tipo di stress o condizione che la cellula affronta, questa modifica la sua espressione genica e, di conseguenza, il suo fenotipo.

Oltre alle cellule endoteliali valvolari, sono presenti anche le cellule interstiziali valvolari, la principale popolazione presente nelle cuspidi o nei lembi. Esse consistono in diversi sottotipi cellulari, tra cui le cellule α -actina-positive e negative, rappresentate rispettivamente da miofibroblasti e fibroblasti [31]. Il ruolo delle cellule interstiziali valvolari è quello di sintetizzare la ECM valvolare, rimodellando inoltre il collagene ed altri componenti importanti di quest'ultima, al fine di adattare e/o riparare la struttura valvolare in seguito a possibili stati di stress o a danni subiti [32].

Alcuni studi hanno approfondito la relazione tra cellule interstiziali valvolari e calcificazione delle valvole [33]. Si ritiene infatti che il cambiamento nei fenotipi di queste cellule sia parte della patogenesi della degenerazione valvolare, in quanto durante la calcificazione si attivano profili genetici correlati ad osteoblasti, adipociti e condrociti [34].

1.3.2 Patologie valvolari

Le patologie cardiache rappresentano la causa di morte primaria per 17.9 milioni di persone ogni anno, di cui l'85% per attacchi di cuore ed ictus [35]. Secondo la

LE VALVOLE CARDIACHE: ANATOMIA E FISIOPATOLOGIA

classifica stilata da *World Health Organization* (Figura 1.16), quest'ultime due patologie colpiscono drammaticamente la popolazione mondiale, rendendosi responsabili del 54% delle morti totali del 2016 [36].

Le valvulopatie sono tra le malattie cardiache più comuni, rappresentanti il 20% delle cause di tutti gli interventi chirurgici cardiaci [37] e divenute negli ultimi 60 anni tra le più studiate nella medicina cardiovascolare, a causa dell'innalzamento dell'età media della popolazione e al conseguente cambiamento della loro insorgenza, con una predominanza di eziologie degenerative [37]. Secondo alcuni studi, infatti, si stima che le disfunzioni delle valvole cardiache coinvolgano il 2.5% dei cittadini USA, una percentuale che si alza con l'aumentare dell'età, andando a superare il 10% tra i 65 ed i 75 anni (Figura 1.17) [38]. Per spiegare questa correlazione, è stata osservata una forte diminuzione della prevalenza delle malattie reumatiche del cuore nei paesi industrializzati, accompagnata però ad un aumento di malattie degenerative della valvola [37].

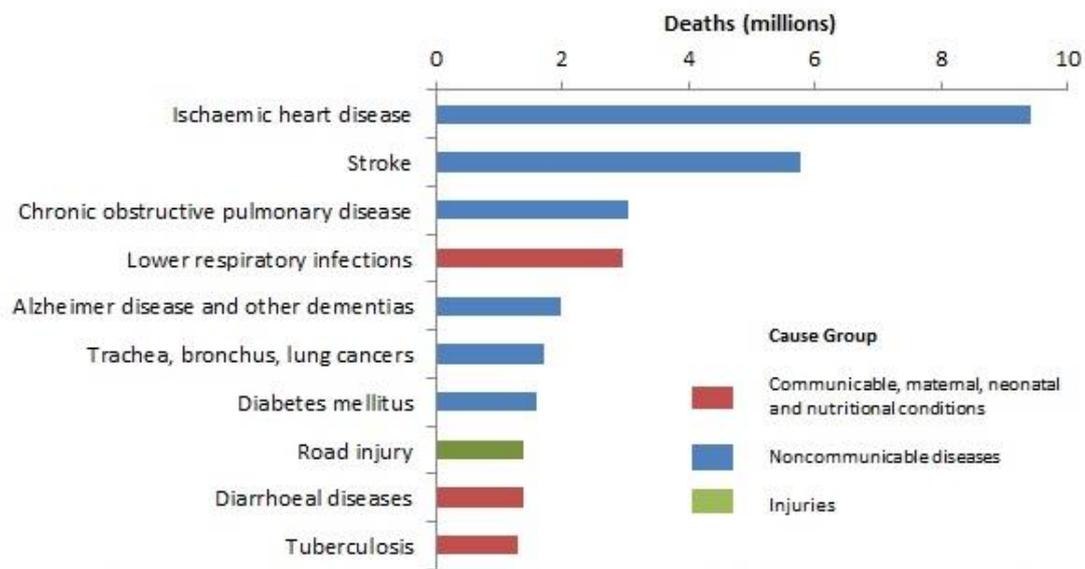


Figura 1.16: Le 10 cause primarie di morti nel mondo nel 2016 [36].

Le patologie che colpiscono le valvole cardiache sono riconducibili a due tipologie di alterazione: restrittiva, se si tratta di stenosi valvolare, o incontinenza, se invece riguarda insufficienza valvolare. Le disfunzioni possono essere isolate o combinate a

tipo steno-insufficienza sulla stessa valvola, o addirittura composte, interessando contemporaneamente più valvole.

Delle due tipologie, solitamente le stenosi derivano da un'insorgenza progressiva, mentre le insufficienze possono presentarsi con aspetti acuto e cronico [3].

Non tutte le valvole cardiache mostrano predisposizione a sviluppare disfunzioni: le valvole polmonare e tricuspidi, infatti, hanno bassa probabilità di essere interessate da patologie, le quali, se presenti, sono legate in maniera significativa ad anomalie congenite più che a casi acquisiti [39]. Non è un caso che queste due valvole appartengano alla parte destra del cuore, sottoposta a minore pressione. Infatti, la circolazione polmonare presenta una pressione che varia dai 10 fino ai 20-25 mmHg [40], a differenza del grande circolo, che raggiunge picchi di 140 mmHg.

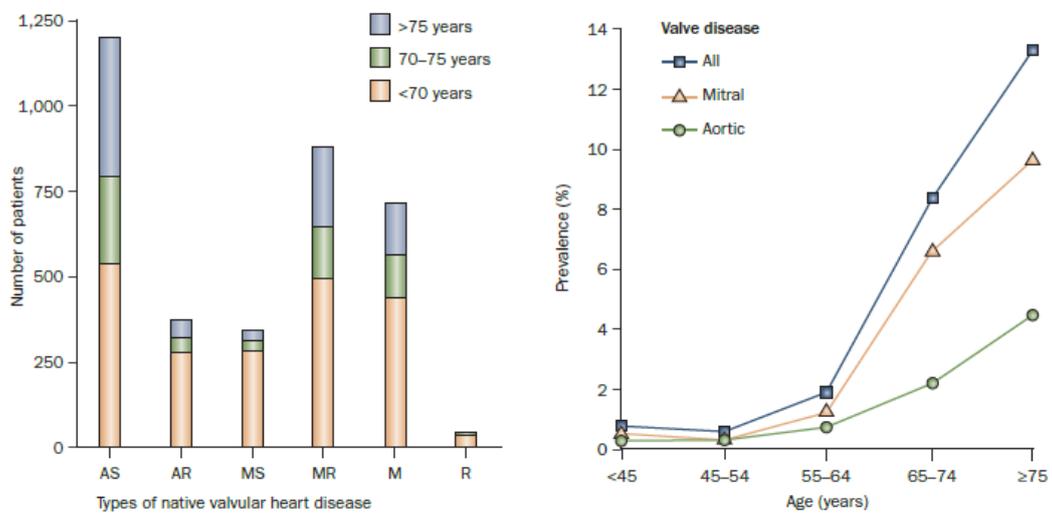


Figura 1.17: A sinistra, distribuzione dei vari tipi di valvulopatie native in pazienti con età differenti [37]. Abbreviazioni: AS, stenosi aortica; AR, insufficienza aortica; MS, stenosi mitrale; MR, insufficienza mitrale; M, valvulopatia multipla; R, valvulopatie nella parte destra del cuore. A destra, grafico che mette in evidenza le disfunzioni aortiche e mitraliche in rapporto all'età dei pazienti [38].

A conferma della bassa frequenza di patologie, si noti il grafico a sinistra della Figura 1.17, rappresentante una distribuzione dei vari tipi di valvulopatie native in uno studio di 3457 pazienti denominato *Euro Heart Survey*. Avviata dalla *European Society of*

Cardiology [41], questa analisi evidenzia che le disfunzioni delle valvole nella parte destra del cuore sono trascurabili rispetto a quelle della parte sinistra; quest'ultima in particolare presenta una maggior frequenza nella stenosi aortica e nell'insufficienza mitrale.

Di seguito si approfondiranno le disfunzioni legate alle valvole della parte sinistra del cuore.

1.3.2.1 Patologie della valvola aortica

La valvola aortica, situata tra l'aorta ed il ventricolo sinistro, è la più incline a valvulopatie, come visibile in Figura 1.17. Le due disfunzioni principali sono rappresentate dalla stenosi e dalla insufficienza valvolare, talvolta presenti contemporaneamente, come nel caso delle valvole bicuspidi (Figura 1.18).



Figura 1.18: Caso di valvola aortica bicuspide calcificata [42].

- *Stenosi aortica*

Essa può definirsi come una malattia congenita o acquisita, caratterizzata principalmente dal restringimento valvolare con ostruzione al flusso ematico. Ciò

implica un conseguente cambiamento del gradiente pressorio che provoca ipertrofia di tipo concentrico al ventricolo sinistro [3].

Le principali cause di questa particolare disfunzione aortica sono da ricondursi a due tipi di malattie. La prima avviene in presenza di una valvola congenitamente malformata, con una percentuale sulla popolazione che può partire dall'1% [3] e che si attesta sul 2% [43] per quanto riguarda la conformazione bicuspid; più raro è invece il caso della valvola quadricuspid, la cui prima osservazione risale al 1862 [44] e che ha un'incidenza sulla popolazione dello 0.008% [45]. Queste malformazioni sono il probabile risultato di un'anomala formazione delle cuspidi durante la valvulogenesi. Ciò porta ad una possibile stenosi aortica, in conseguenza ad un progressivo ispessimento con calcificazione delle cuspidi, accompagnato spesso da un'insufficienza valvolare [3].

La seconda causa di stenosi aortica è da associarsi alla fibrocalcificazione, suddivisibile in malattia post-infiammatoria causata da malattia reumatica, con ispessimento delle cuspidi valvolari, fusione delle commissure e riduzione dell'orifizio valvolare ad una piccola apertura; ed in distrofia senile, la causa più comune di calcificazione, caratterizzata da deposizione lipidica, infiltrazione di cellule infiammatorie e fibroblasti con aspetti di "mineralizzazione" [31] (Figura 1.19).

Ad inizio '900 si era ipotizzato che la calcificazione valvolare aortica fosse un processo passivo, associato perlopiù ad un'età avanzata o a malattie reumatiche, collegabile ad un'usura del tessuto valvolare nel tempo, con accumulo di calcio sulla superficie aortica dei lembi [46]. Alla fine del secolo scorso, però, questa teoria è stata messa in discussione ed ormai archiviata, definendo la calcificazione come un processo attivo che condivide alcune somiglianze con l'aterosclerosi [47]; infatti, sono state segnalate alterazioni simili tra le due patologie, come ad esempio la lesione dell'endotelio, l'infiltrazione lipidica, la deposizione piastrinica, l'infiammazione, la calcificazione distrofica e l'ossificazione [48]. Tuttavia, la distrofia fibrocalcifica valvolare è riconosciuta come entità patologica diversa dalla sclerosi [49], in quanto quest'ultima si differenzia dalla stenosi per l'assenza dell'ostruzione del flusso, nonostante le cuspidi siano ispessite.

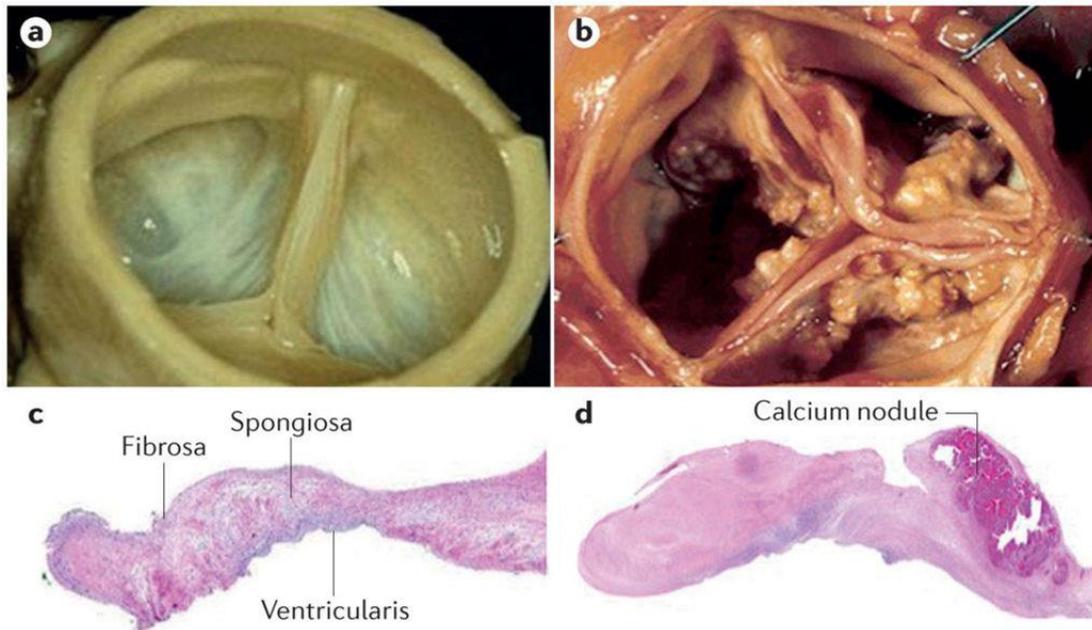


Figura 1.19: Aspetto macroscopico ed istopatologico di valvole aortiche sana e malata. A) una valvola aortica in condizioni fisiologiche; B) una valvola aortica con grave stenosi aortica dovuta a calcificazione; C) Sezione istopatologica della cuspidi di una valvola aortica sana, con colorazione di ematossilina che evidenzia la struttura trilaminare della cuspidi valvolare; D) Sezione istopatologica di una cuspidi di valvola affetta da calcificazione, con colorazione di ematossilina che mette in luce la presenza di materiale fibrotico (rosa) e nodulo calcificato. Il tessuto è ispessito dall'eccesso di materiale fibrotico ed il nodulo calcificato, situato nella fibrosa, modifica l'ordinaria struttura del lembo [50].

Durante la stenosi aortica, l'orifizio può ridurre la sua area anche del 50%, o più, rispetto a quella normale di 3-4 cm². L'ostruzione del flusso implica una resistenza all'eiezione ventricolare, che genera un aumento di pressione intraventricolare, con inevitabile sviluppo di un gradiente pressorio che il ventricolo cerca di colmare: avviene così l'ipertrofia concentrica, ovvero un aumento dello spessore della parete, generato dalla moltiplicazione del numero di miofibrille. Poiché la stenosi aortica dell'adulto si sviluppa in modo graduale, l'aumento della massa muscolare miocardica è una risposta di adattamento alla gravità della disfunzione, lasciando il paziente asintomatico a lungo.

Nonostante l'assenza di sintomi, il cuore ipertrofico richiede un dispendio energetico maggiore, in particolare un aumento del fabbisogno di ossigeno delle fibre muscolari cardiache, a cui però non corrisponde una fornitura adeguata di O₂. Questo disequilibrio nei pazienti con stenosi aortica può sfociare in ischemia miocardica, aritmie parossistiche, episodi sincopali o, nel caso peggiore, in morte improvvisa [3].

- Insufficienza aortica

L'insufficienza valvolare (Figura 1.20) è la seconda disfunzione principale della valvola aortica, presenta una frequenza minore della stenosi ed è caratterizzata da reflusso ematico in fase di diastole, dall'aorta al ventricolo sinistro [51], causato da lesioni delle cuspidi valvolari. Esistono forme acute e croniche riconducibili al tipo di insufficienza valvolare; attualmente, le cause più comuni sono legate ad una malformazione congenita, ad esempio a causa di una valvola bicuspidale, connettivopatie, ipertensione arteriosa, endocardite infettiva o altre patologie della radice aortica [3].

La forma cronica può essere descritta in quattro fasi fisiopatologiche: nel primo stadio, detto di equilibrio stabile, la funzione ventricolare è quasi normale, in quanto il compenso cardiocircolatorio è eccellente ed il paziente è asintomatico. Ad un reflusso di sangue che incrementa il riempimento diastolico del ventricolo, infatti, si ha un aumento del volume di quest'ultimo, con un sovraccarico cronico progressivo che determina un'ipertrofia eccentrica. Lentamente, in un periodo di anni, la malattia evolve, non determinando apparentemente sintomi, nonostante l'ipertrofia miocardica non riesca più a compensare la disfunzione valvolare: si entra nella seconda fase o dell'equilibrio labile, fino a quando lo sviluppo della malattia non porta il paziente ad essere asintomatico solo in caso di attività fisica non intensa, arrivando pertanto al terzo stadio o del compenso labile. La quarta fase è caratterizzata invece da tratti sintomatici, con frazione di eiezione ridotta anche in stato di riposo e non solo sotto sforzo: è questo lo stadio finale dell'insufficienza cronica aortica.

La fase acuta si differenzia da quella cronica per un rigurgito acuto e improvviso, con un conseguente sovraccarico di volume istantaneo che il ventricolo non riesce a

contrastare con un'adeguata ipertrofia compensatoria. Ciò causa un aumento delle pressioni atriali sinistre che si può poi ripercuotere a livello del piccolo circolo, con la generazione di piccole stasi.

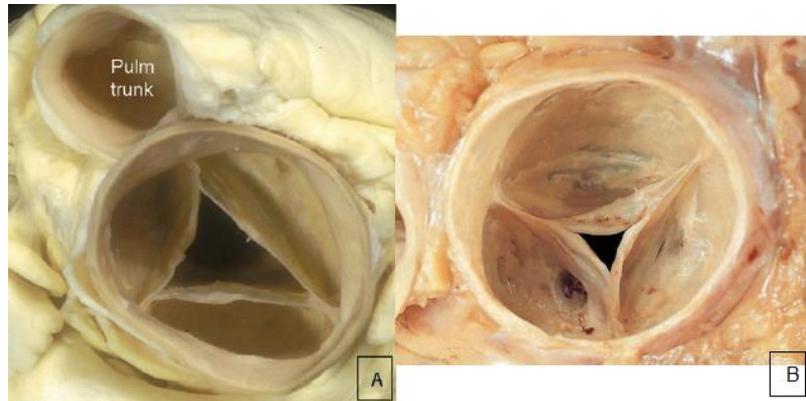


Figura 1.20: Insufficienza di valvole aortiche, con area rigurgitante di dimensioni differenti [42] [52].

1.3.2.2 Patologie della valvola mitrale

Come per la valvola aortica, le disfunzioni principali della valvola mitrale sono la stenosi e l'insufficienza, sebbene in questo caso avvengano con incidenza e cause diverse.

- Stenosi mitralica

Si tratta di una malattia cronica (Figura 1.21), generalmente progressiva, contraddistinta dal restringimento dell'orifizio mitralico, ostacolando quindi il flusso ematico dall'atrio sinistro al ventricolo sottostante, in fase di riempimento diastolico; ciò ha come conseguenza un incremento generale della pressione a livello atriale ed una disfunzione del ventricolo destro [3]. La causa più comune di stenosi è tuttora la cardiopatia reumatica [53], con un'ipotizzata correlazione della risposta immunitaria avviata dalla cross-reattività rispetto ad un antigene streptococcico con il tessuto valvolare [54]. Il processo infiammatorio scatenatosi da attacchi reumatici ha infatti alte possibilità di colpire varie componenti dell'apparato valvolare mitralico, dalle

cuspidi alle commissure, danneggiando i tessuti attraverso un'intensa reazione autoimmune.

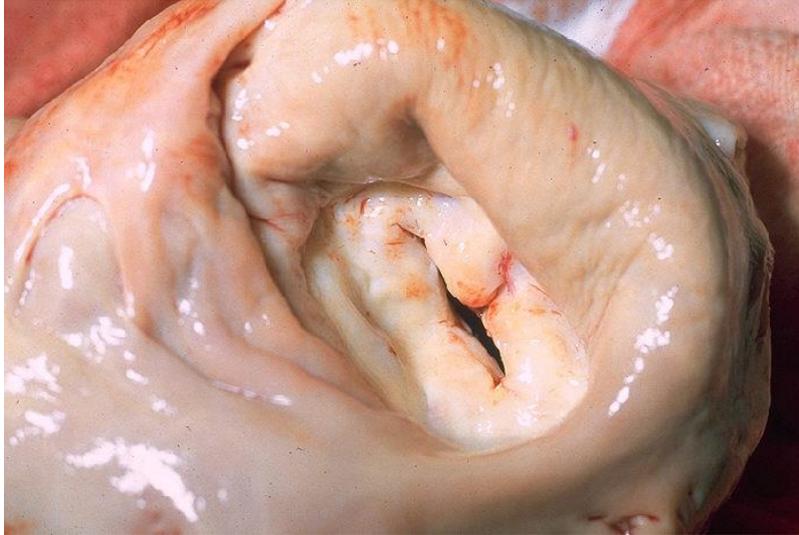


Figura 1.21: Stenosi mitralica con marcato ispessimento dei lembi ed ipertrofia atriale sinistra [55].

I cambiamenti reumatici caratteristici includono abitualmente fusione commissurale, ispessimento dei lembi ed accorciamento e fusione delle corde tendinee valvolari [53]; in particolare a causa di quest'ultima conseguenza, la valvola mitrale assume un aspetto *Fish-mouth*, a bocca di pesce, con una ridotta dimensione dell'orifizio.

A differenza del caso della valvola aortica, la calcificazione causa eccezionalmente una stenosi significativa [56], così come è raro il caso di malattie congenite, come ad esempio il *cor triatriatum*, la valvola a doppio orifizio o l'anello mitralico sopravalvolare [57].

- *Insufficienza mitralica*

L'insufficienza valvolare è la patologia più comune per la valvola mitrale, come osservato in Figura 1.17. Essa è caratterizzata da rigurgito di flusso ematico dal ventricolo sinistro all'atrio sovrastante durante la fase di sistole ventricolare.

I processi patologici che conducono all'insufficienza mitralica presentano una grande varietà di possibili cause, che possono riguardare degenerazione valvolare o

endocarditi, così come disfunzioni ischemiche o malattie congenite. La mancanza di un linguaggio comune per classificare le patologie dovute all'insufficienza ha rappresentato un limite per molti anni in ambito clinico; il primo a sviluppare una classificazione funzionale è stato Alain Carpentier (Figura 1.22). Quest'ultimo introdusse un sistema di classificazione basato sul movimento e la posizione delle cuspidi valvolari e suddiviso in tre tipologie:

- Tipo I: i lembi valvolari presentano un movimento ed una posizione normale rispetto l'*anulus*. In questo caso l'insufficienza è prodotta a causa di una discontinuità della cuspide, come nel caso della dilazione anulare (Figura 1.22a).
- Tipo II: si ha la presenza di eccesso di movimento del lembo, dovuto al prolasso di uno o entrambi dei lembi nell'atrio sinistro. Ciò è dovuto alla rottura di un muscolo papillare o di una corda tendinea (Figura 1.22b).
- Tipo IIIa: il movimento dei lembi è limitato durante la fase sistolica e diastolica, in quanto non è assicurata la loro posizione corretta, a causa dell'ispessimento dei lembi stessi, delle commissure o delle corde tendinee. Trattasi di un possibile caso di malattia reumatica (Figura 1.22c).
- Tipo IIIb: come nel caso precedente, i lembi non presentano libertà di movimento, ma solo in fase sistolica. In questo caso sono presenti delle anomalie ventricolari dovute a malattie ischemiche [53] (Figura 1.22d).

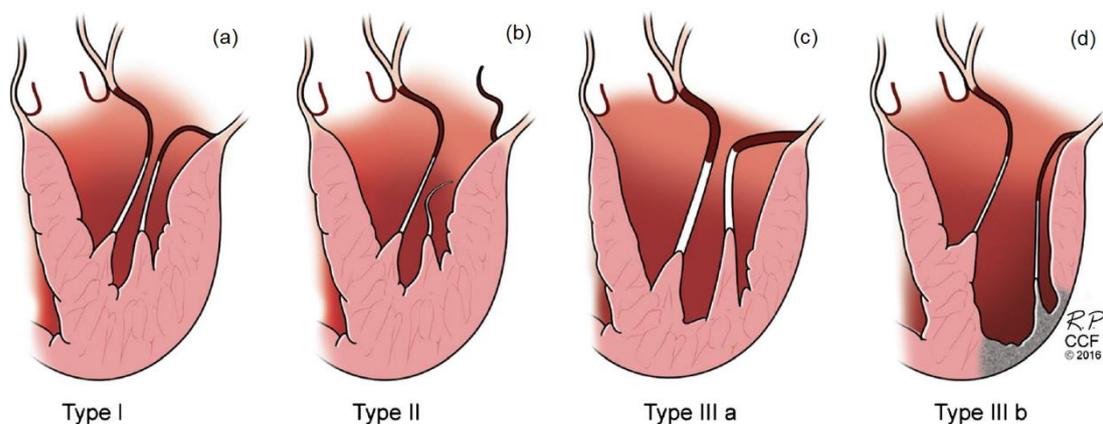


Figura 1.22: Tipologie di insufficienza mitralica secondo la classificazione di Carpentier [53].

L'insufficienza mitralica può essere distinta in primaria e secondaria, a seconda delle cause che hanno portato la disfunzione valvolare. Nel caso delle primarie, si ha un'alterazione primitiva dell'apparato valvolare mitralico, che può coinvolgere lembi, corde tendinee, muscoli papillari o *annulus* [53]. La causa più comune tra le primarie è il prollasso mitralico, che nei paesi sviluppati viene trattato con intervento chirurgico [58]. Il termine prollasso è riferito genericamente allo scivolamento di un organo dalla sua posizione originaria; in riferimento alla valvola mitrale, si descrive lo spostamento dei lembi valvolari nell'atrio sinistro. In particolare, il prollasso mitralico si associa all'insufficienza in più del 50% dei casi riscontrati [3]. Dal punto di vista patologico, sono state descritte due distinte alterazioni degenerative:

- la malattia di Barlow, derivante da una degenerazione mixomatosa. Quest'ultima è caratterizzata da un accumulo significativo di mucopolissaccaridi;
- il deficit fibroelastico, interpretato come conseguenza di anomalie strutturali del tessuto connettivo, che portano ad una perdita di integrità meccanica [59].
- altre eziologie che possono portare all'insufficienza mitralica primaria sono l'endocardite infettiva, la calcificazione anulare mitrale, le cardiopatie reumatiche o le malformazioni congenite [53].

Le cause secondarie, a differenza delle precedenti, impediscono il corretto funzionamento della valvola in seguito a dilatazione della camera ventricolare sinistra e possono essere suddivise a loro volta in ischemiche e non ischemiche. Nel primo caso la disfunzione mitralica è secondaria alla malattia coronarica, nel secondo invece la forma di insufficienza mitralica si verifica in tutti i tipi di cardiomiopatia non ischemica, incluse quelle dilatative, restrittive e ipertrofiche. Questo tipo di disfunzione può essere inoltre secondaria alla fibrillazione atriale [53].

Secondo un altro tipo di classificazione, si suddivide l'insufficienza mitralica in acuta e cronica [3]. Come per il caso dell'insufficienza aortica, la differenza sostanziale tra le due classi di patologie è la modalità di sviluppo della disfunzione: nel caso della fase acuta il ventricolo non si adatta all'improvviso sovraccarico dovuto all'anomalia

LE VALVOLE CARDIACHE: ANATOMIA E FISIOPATOLOGIA

valvolare, non riuscendo ad aumentare di dimensioni né ad ipertrofizzarsi; nella forma cronica, invece, vi è una compensazione cardiaca, con una progressiva dilatazione del ventricolo sinistro tramite ipertrofia eccentrica proporzionale alla disfunzione in atto. Le situazioni più critiche si riscontrano in quest'ultimo caso, in quanto la disfunzione può evolvere rapidamente verso uno shock cardiogeno ed inevitabilmente alla morte.

CAPITOLO 2

2. Trattamento cardiocirurgico di sostituzione valvolare

Nonostante risultino meno comuni della malattia coronarica, dello scompenso cardiaco e dell'ipertensione, le valvulopatie rappresentano con ogni probabilità le patologie cardiache di maggior interesse degli ultimi anni, per molteplici ragioni: innanzitutto, il numero di casi riscontrati è aumentato considerevolmente, proporzionalmente con la prospettiva di vita; in secondo luogo, attualmente il trattamento più efficace per questo tipo di malattie cardiache è l'operazione chirurgica, terapia invasiva e spesso non priva di complicazioni, considerando che le valvulopatie si sviluppano spesso in età avanzata, comportando un aumento del rischio dell'intervento [60]. Infine, esistono pochi studi clinici sulle disfunzioni valvolari, soprattutto di tipo randomizzato, ed aumenta considerevolmente il numero di casi con nuove complicazioni post-intervento chirurgico [61].

Per valutare ogni tipologia di patologia valvolare e decidere quale terapia intraprendere, da alcuni anni sono state pubblicate le "Linee guida per il trattamento delle valvulopatie", le cui ultime versioni sono del 2012 [60] e del 2017 [62]. La stesura di questi protocolli è affidata ad una task force congiunta per il trattamento delle valvulopatie della Società Europea di Cardiologia (ESC) e dell'Associazione Europea di Chirurgia Cardioracica (EACTS) ed ha il fine di condurre il medico nel processo decisionale per curare al meglio la patologia in atto.

2.1 Attuali soluzioni terapeutiche

Sebbene a primo impatto la sostituzione valvolare – e quindi l'intervento chirurgico – rappresenti la terapia più efficiente ed efficace per curare una valvulopatia, non sempre viene impiegata, almeno non prima di aver valutato attentamente il caso e le possibili opzioni. A riguardo, le linee guida per il trattamento delle valvulopatie forniscono un aiuto importante al medico, che deve diagnosticare, quantificare e determinare il meccanismo della patologia, nonché le sue conseguenze [60]. Il processo decisionale è sintetizzato in Figura 2.1.

La valvulopatia è di grado severo?
 Il paziente è sintomatico?
 La sintomatologia è correlata alla patologia valvolare?
 Quali sono l'aspettativa di vita^a e la qualità di vita del paziente?
 I benefici attesi dall'intervento (rispetto alla prognosi naturale) sono superiori ai rischi?
 Cosa desidera il paziente?
 Le risorse locali sono ottimali in rapporto all'intervento previsto?

^al'aspettativa di vita deve essere stimata in base all'età, il sesso, le comorbidità e alla specifica aspettativa di vita di ciascun paese.

Figura 2.1: Domande fondamentali al fine dell'indicazione all'intervento di un paziente [60].

Oltre a guidare il medico ad una decisione sulla terapia da intraprendere, le linee guida evidenziano, per ogni tipologia di trattamento medico, delle classi di raccomandazioni, esposte in Figura 2.2.

Classe della raccomandazione	Definizione	Espressione consigliata
Classe I	Evidenza e/o consenso generale che un determinato trattamento o intervento sia vantaggioso, utile ed efficace	È raccomandato/indicato
Classe II	Evidenza contrastante e/o divergenza di opinione circa l'utilità/efficacia di un determinato trattamento o intervento	
Classe IIa	Il peso dell'evidenza/opinione è a favore dell'utilità/efficacia	Deve essere preso in considerazione
Classe IIb	L'utilità/efficacia risulta meno chiaramente accertata sulla base dell'evidenza/opinione	Può essere preso in considerazione
Classe III	Evidenza o consenso generale che un determinato trattamento o intervento non sia utile/efficace e che in taluni casi possa essere dannoso	Non è raccomandato

Figura 2.2: Classi delle raccomandazioni per ogni tipologia di trattamento o intervento [60].

Per valutare e confermare un'eventuale valvulopatia, la metodica primaria più utilizzata è l'ecocardiografia [60], [62]. In particolare, con questa tecnica diagnostica non invasiva è possibile stabilire il grado di severità di una stenosi e di un'insufficienza valvolare. Per stimare la prima non è sufficiente la sola misurazione dell'area valvolare, ma anche degli indici flusso-dipendenti, quali il gradiente pressorio medio e la velocità massima di flusso; a riguardo, è stata stilata una tabella [61], adattata da quella inizialmente proposta da Baumgartner [63] (Figura 2.3).

	Stenosi aortica	Stenosi mitralica	Stenosi tricuspide
Area valvolare (cm ²)	<1.0	<1.0	–
Area valvolare indicizzata (cm ² /m ² di BSA)	<0.6	–	–
Gradiente medio (mmHg)	>40 ^a	>10 ^b	≥5
Velocità massima transvalvolare (m/s)	>4.0 ^a	–	–
Rapporto della velocità di flusso	<0.25	–	–

BSA, superficie corporea.

^anei pazienti con normale portata cardiaca/flusso transvalvolare.

^butile nei pazienti in ritmo sinusale, deve essere interpretato in relazione alla frequenza cardiaca.

Figura 2.3: Criteri ecocardiografici per la definizione di stenosi valvolare severa [60].

La misura del grado di insufficienza valvolare, invece, richiede i dati quantitativi di più indici, come la vena *contracta* e l'area effettiva dell'orifizio di rigurgito. I criteri per la definizione di questa disfunzione valvolare sono riassunti nella tabella in Figura 2.4 [61], adattata da quella originariamente ideata da Lancellotti [64].

Sebbene queste valutazioni quantitative siano indispensabili al fine di dare una risposta sul tipo di patologia, esse prevedono anche la combinazione di diverse misurazioni che sono estremamente operatore-dipendenti, e quindi facilmente passibili di errore. Pertanto, il loro utilizzo è basato sull'integrazione di un insieme di valutazioni, in modo da diminuire la possibilità di errori diagnostici.

Così come analizzato nel capitolo precedente, anche qui vi sarà un approfondimento sul trattamento delle valvulopatie delle valvole mitralica ed aortica, in quanto le più colpite da disfunzioni [37]. In particolare, si andranno ad osservare i trattamenti

TRATTAMENTO CARDIOCHIRURGICO DI SOSTITUZIONE VALVOLARE

specifici in caso di insufficienza e di stenosi per queste due, essendo le patologie più comuni, approfondendo le molteplici possibilità di scelta del medico in base alla severità della malattia ed alle condizioni del paziente [60].

	Insufficienza aortica	Insufficienza mitralica	Insufficienza tricuspide
Criteri qualitativi			
Morfologia valvolare	Anormale/flail/ampio difetto di coaptazione	Flail di un lembo valvolare/rottura del muscolo papillare/ampio difetto di coaptazione	Anormale/flail/ampio difetto di coaptazione
Flusso di rigurgito al color Doppler	Ampio nei jet centrali, variabile nei jet eccentrici	Jet centrali molto ampi o jet eccentrici aderenti, turbolenti e diretti verso la parete posteriore dell'atrio sinistro	Jet centrali molto ampi o jet eccentrici diretti verso la parete ^a
Segnale del jet di rigurgito al Doppler continuo	Intenso	Intenso/triangolare	Intenso/triangolare con picco di velocità precoce (picco a <2 m/s nell'IT massiva)
Altro	Inversione oloedistolica del flusso in aorta discendente (VTD >20 cm/s)	Ampio flusso di convergenza ^a	–
Criteri semiquantitativi			
Diametro della vena contracta (mm)	>6	≥7 (>8 con metodo biplano) ^b	≥7 ^a
Flusso venoso a monte ^c	–	Inversione del flusso venoso polmonare in sistole	Inversione del flusso venoso epatico in sistole
Afflusso	–	Onda E dominante ≥1.5 m/s ^d	Onda E dominante ≥1 m/s ^e
Altro	PHT <200 ms ^f	Rapporto tra TVI mitralico e aortico >1.4	Raggio PISA >9 mm ^g
Criteri quantitativi			
		Primaria	Secondaria^h
EROA (mm ²)	≥30	≥40	≥20
Volume di rigurgito (ml/battito)	≥60	≥ 60	≥30
Associato ingrandimento delle camere cardiache/vasi	VS	VS, AS	VD, AD, vena cava inferiore

AD, atrio destro; AS, atrio sinistro; EROA, area effettiva dell'orifizio di rigurgito; IT, insufficienza tricuspide; PHT, tempo di dimezzamento pressorio; PISA, area di superficie dell'isovelocità prossimale; TVI, integrale tempo-velocità; VD, ventricolo destro; VS, ventricolo sinistro; VTD, velocità telediastolica.

^alimite di Nyquist a 50-60 cm/s.

^bper la media delle misurazioni in proiezione apicale 4 e 2 camere.

^cin assenza di altre cause che possano giustificare la riduzione della componente sistolica del flusso venoso polmonare (fibrillazione atriale, elevata pressione atriale).

^din assenza di altre cause che possano giustificare la presenza di elevata pressione atriale sinistra o di stenosi mitralica.

^ein assenza di altre cause che possano giustificare la presenza di elevata pressione atriale destra.

^fil PHT si riduce con l'aumentare della pressione diastolica del ventricolo sinistro e nei pazienti in terapia con vasodilatatori o con aorta dilatata, mentre si allunga in presenza di insufficienza aortica cronica.

^gportando il limite di Nyquist in condizioni basali a 28 cm/s.

^hnell'insufficienza mitralica secondaria vengono utilizzati altri valori soglia, e cioè un EROA >20 mm² e un volume di rigurgito >30 ml identificano quei pazienti ad aumentato rischio di eventi cardiaci.

Figura 2.3: Criteri ecocardiografici per la definizione di insufficienza valvolare severa [60].

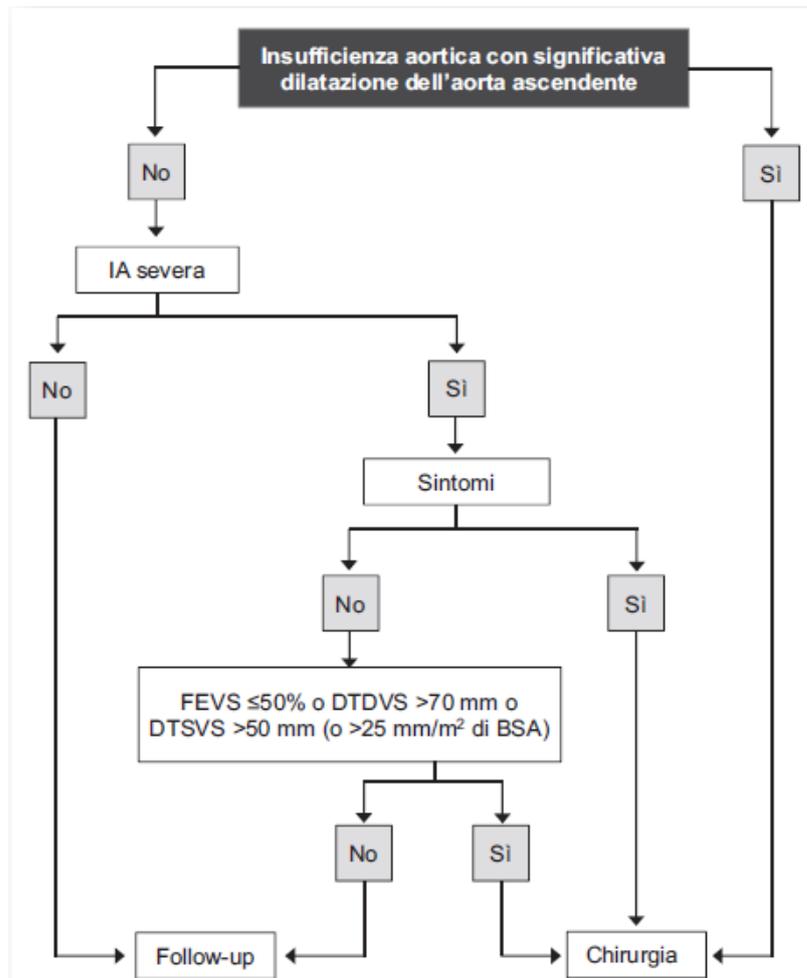
2.1.1 Trattamenti per le disfunzioni della valvola aortica

Quando si è in presenza di una insufficienza aortica, il miglior esame diagnostico, è senz'altro l'ecocardiografia, in quanto permette di valutare la severità della patologia, definire l'anatomia valvolare e determinare la fattibilità o meno dell'intervento di riparazione valvolare [64]. Per accertamenti più approfonditi, spesso si ricorre alla tomografia computerizzata multistrato, utile per quantificare la frazione rigurgitante e

TRATTAMENTO CARDIOCHIRURGICO DI SOSTITUZIONE VALVOLARE

verificare la presenza di calcificazione, o alla risonanza magnetica, qualora si volesse valutare il massimo diametro della valvola [60], [62].

Così come sviluppato nel primo capitolo, è bene individuare anche il percorso di diagnosi e trattamento dell'insufficienza aortica, che ben si distingue a seconda che si tratti di forma acuta o cronica [62]. In Figura 2.4, è rappresentato l'iter diagnostico seguito dal medico per il trattamento di un'insufficienza aortica. In particolare, se la valvulopatia ha avuto un'insorgenza acuta, si richiede un intervento chirurgico urgente, a causa dell'instabilità delle condizioni emodinamiche. Qualora non si procedesse all'intervento, nella maggioranza dei casi si avrebbe una prognosi sfavorevole [60]



BSA, superficie corporea; DTDVS, diametro telediastolico ventricolare sinistro; DTSVS, diametro telesistolico ventricolare sinistro; FEVS, frazione di eiezione ventricolare sinistra; IA, insufficienza aortica.

Figura 2.4: Iter diagnostico dell'insufficienza aortica [60].

TRATTAMENTO CARDIOCHIRURGICO DI SOSTITUZIONE VALVOLARE

La forma cronica dell'insufficienza valvolare può essere correlata alla sintomatologia della malattia, allo status del ventricolo sinistro o, infine, alla dilatazione dell'aorta ascendente. Qualora quest'ultima fosse significativa, l'operazione chirurgica sarebbe l'unica soluzione per evitare eventi fatali.

Sebbene non sia molto comune, in alcuni casi di insufficienza aortica è possibile procedere alla riparazione della valvola, al posto della sostituzione [62].

La terapia medica per questo tipo di valvulopatia è riservata perlopiù ai pazienti con scompenso cardiaco severo che sono candidati alla chirurgia della valvola, pertanto sono terapie a breve termine costituite da vasodilatatori o inotropi, al fine di migliorarne le condizioni prima dell'intervento.

Così come la valvulopatia appena descritta, anche la stenosi aortica può essere valutata attraverso l'ecocardiografia; con questo esame diagnostico, infatti, si può avere una conferma della stenosi ed una valutazione del grado di calcificazione [60] [62].

In Figura 2.5 è possibile approfondire il percorso diagnostico raccomandato dalle linee guida per il trattamento della stenosi aortica severa, definita normalmente sulla base di un'area valvolare inferiore a 1.0 cm^2 .

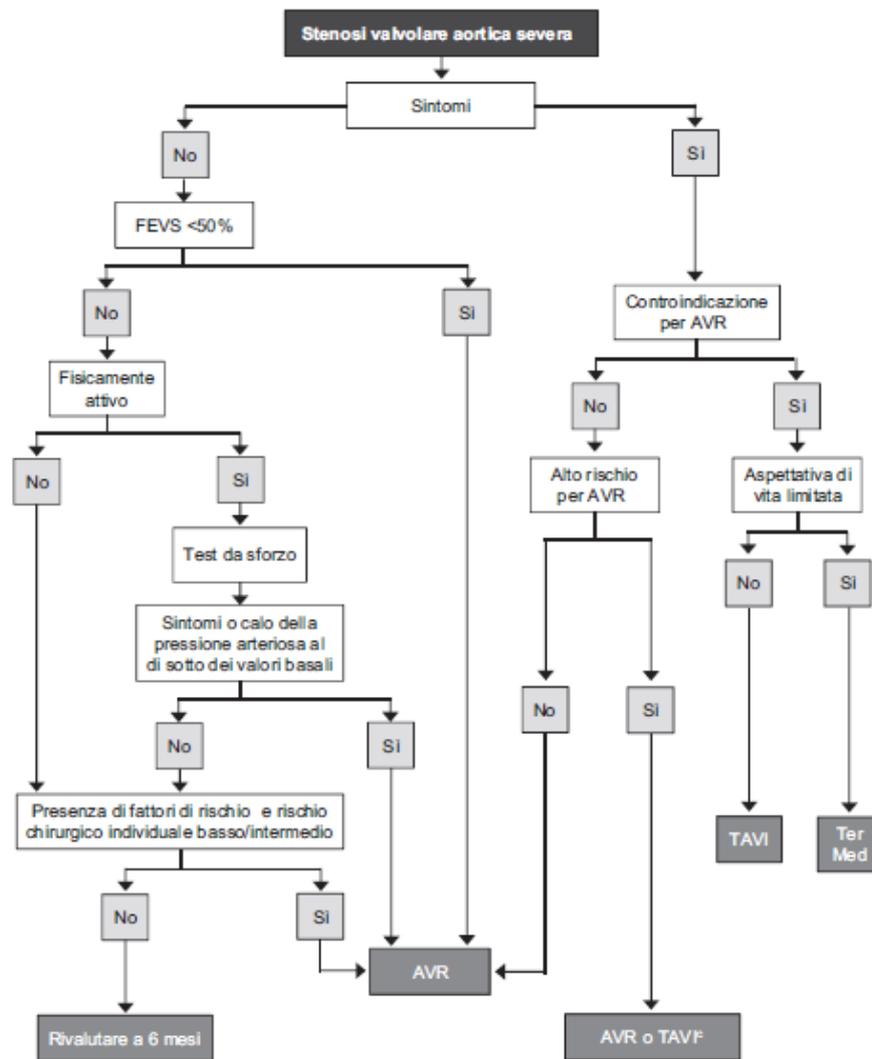
Per valutare la miglior terapia medica da adottare, la prima discriminante è la sintomatologia. Infatti, se un paziente risulta sintomatico, la priorità è l'operazione chirurgica; la tradizionale sostituzione valvolare a cuore aperto, però, è sconsigliata ai pazienti con una limitata aspettativa di vita – dovuta ad età avanzata od a comorbilità – e a coloro il cui rischio di mortalità per un'operazione così invasiva è troppo elevato. Una soluzione alternativa al classico intervento è dato dall'impianto valvolare aortico transcatetere (*Transcatheter Aortic Valve Implantation or Replacement*), abbreviato in TAVI o TAVR, operazione meno invasiva che prevede più frequentemente l'utilizzo di un approccio transfemorale o transapicale [65] senza fermare l'attività del cuore. La TAVI è stata introdotta in clinica nel 2007 e da allora la sua applicazione aumenta di anno in anno [66], sebbene sia ancora dibattuta l'equivalenza in durata di tale trattamento rispetto alla chirurgia classica.

Nel caso in cui il paziente non avesse sintomi, vengono valutati altri parametri, come ad esempio la frazione di eiezione ventricolare sinistra ed i risultati a test da sforzo: in

TRATTAMENTO CARDIOCHIRURGICO DI SOSTITUZIONE VALVOLARE

base alla severità della patologia si decide se operare o se prevedere follow up semestrali [62].

La progressione della stenosi degenerativa è un processo attivo che presenta dei tratti comuni con quello aterosclerotico, come si approfondirà nel Paragrafo 2.2.2.1. In questo caso, nessuna terapia medica ha dato buoni risultati per curare o perlomeno rallentare la degenerazione della valvola, motivo per cui la sostituzione valvolare deve essere svolta tempestivamente per i pazienti con sintomi e rimane l'unica vera soluzione a questo tipo di valvulopatia.



AVR, sostituzione valvolare aortica; FEVS, frazione di eiezione ventricolare sinistra; TAVI, impianto transcateretere di valvola aortica; Ter Med, terapia medica.

Figura 2.5: Iter diagnostico della stenosi aortica severa [60].

2.1.2 Trattamenti per le disfunzioni della valvola mitrale

L'insufficienza mitralica ricopre un ruolo di grande interesse, in quanto rappresenta la valvulopatia più comune per quanto concerne le valvole atrioventricolari. L'auscultazione come esame diagnostico può non essere sufficientemente informativa per questa disfunzione, in quanto il soffio risulta spesso di debole intensità, se presente; non è idoneo nemmeno l'eco-Doppler, in quanto tende a sottostimare la severità della lesione.

Proprio come per la valvola aortica, anche in questo caso si utilizza quindi l'ecocardiografia, mezzo migliore per valutare e definire l'eventuale insufficienza in corso.

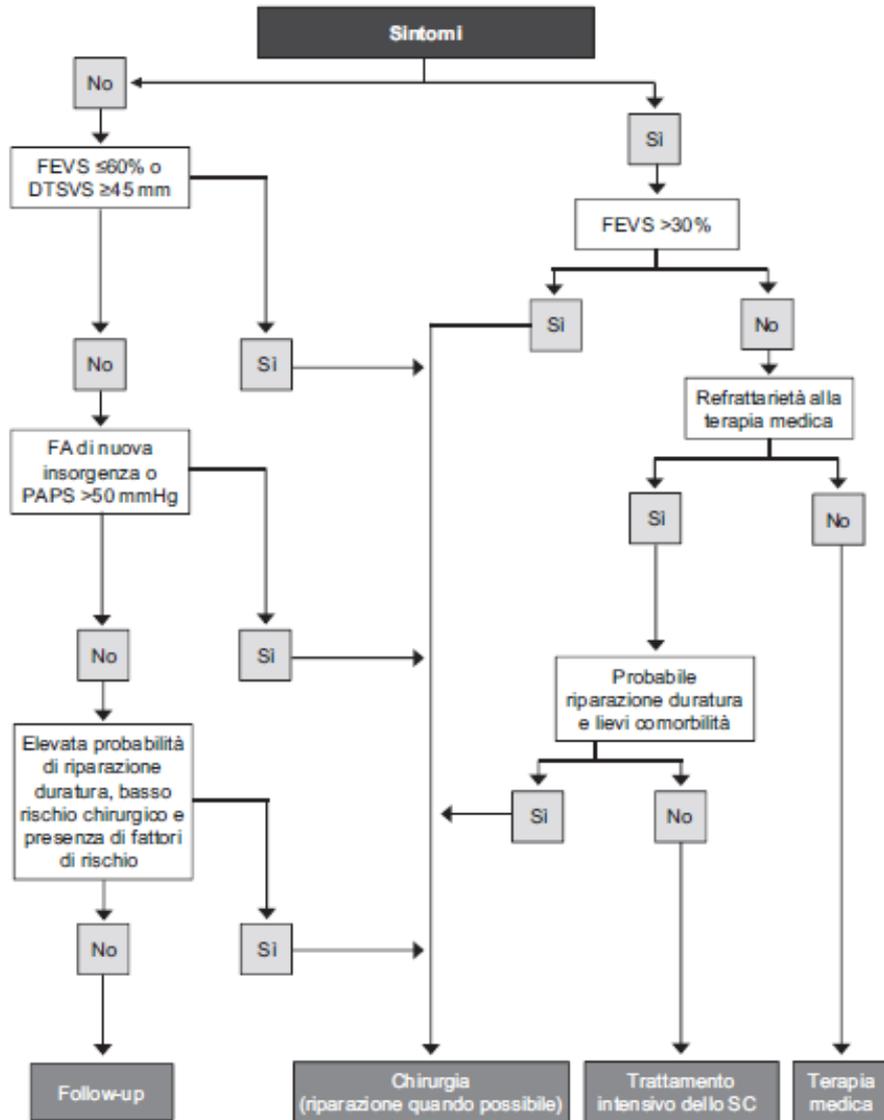
Nel caso di disfunzione mitralica acuta, l'operazione chirurgica è l'unica soluzione al fine di evitare che la patologia sia infausta al paziente. Per quanto riguarda l'insufficienza primaria cronica, invece, la linea guida è ben definita in Figura 2.6: come analizzato per le valvulopatie aortiche, nel caso in cui il paziente si presenti con sintomi, la chirurgia rimane la soluzione migliore. In questo caso, però, l'operazione chirurgica è volta alla riparazione della valvola, dove possibile. Inoltre, la mortalità ospedaliera è solo dello 0.9%, contro il 4% per la sostituzione valvolare [67]. Infine, i casi di re-intervento rappresentano il 3,6%, meno della metà rispetto ai pazienti a cui è stata sostituita la valvola [67]. Nel caso in cui non ci fossero sintomi, vengono approfonditi gli esami per valutare altri parametri utili a comprendere la necessità di intervenire o meno con un'operazione chirurgica.

Il trattamento migliore per quanto riguarda l'insufficienza mitralica secondaria non è ben definito come quello appena approfondito, sia per le comorbilità che spesso presenta, sia per la scelta non sempre semplice di quale terapia adottare. L'intervento in questo caso è consigliato, ma mai indicato, a causa anche dell'alto tasso di mortalità rispetto all'insufficienza mitralica primaria (11.4% contro il 6.8%) [68].

Anche la stenosi mitralica, così come la valvulopatia appena affrontata, prevede innanzitutto una distinzione basata sull'eventuale sintomatologia del paziente (Figura 2.7). A differenza della precedente, però, gli esami diagnostici non prevedono

TRATTAMENTO CARDIOCHIRURGICO DI SOSTITUZIONE VALVOLARE

l'esclusivo utilizzo dell'ecocardiografia, ma anche l'elettrocardiografia e la radiografia toracica.



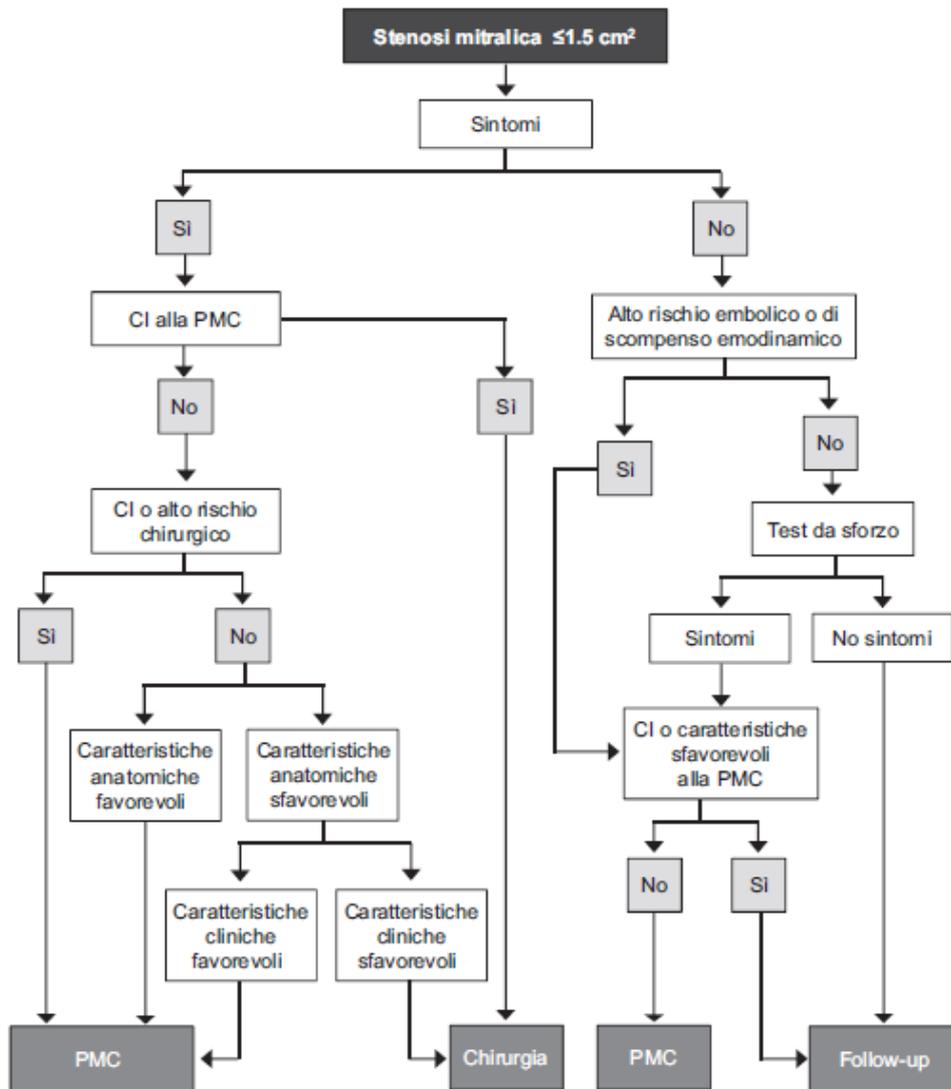
DTSVS, diametro telesistolico ventricolare sinistro; FA, fibrillazione atriale; FEVS, frazione di eiezione ventricolare sinistra; PAPS, pressione arteriosa polmonare sistolica; SC, scompenso cardiaco.

Figura 2.6: Iter diagnostico dell'insufficienza primaria mitrale cronica [60].

Come per la stenosi aortica è previsto un trattamento senza un'operazione a cuore aperto per mezzo della TAVI, anche per la valvola mitrale si possono attuare misure

chirurgiche di ridotta invasività, fra cui la commissurotomia mitralica percutanea (PMC).

Quest'ultima è una tecnica non invasiva di allargamento della valvola, tramite catetere transfemorale con palloncino. L'avvento della PMC ha rivoluzionato per certi aspetti il trattamento di questa patologia, in particolare per i pazienti non sottoponibili ad un intervento a cuore aperto. Inoltre, i dati clinici di follow-up confermano l'efficacia a più lungo termine della PMC con una sopravvivenza libera da eventi avversi compresa tra il 30% e il 70% a 10-20 anni [69].



CI, controindicazione; PMC, commissurotomia mitralica percutanea.

Figura 2.7: Iter diagnostico della stenosi mitralica [60].

Se la PMC è stata eseguita con successo, nella maggior parte dei casi i risultati a lungo termine sono ottimi, a tal punto da evitare ogni caso di re-intervento, se non nei pochi episodi di restenosi [69]. Pertanto, in caso di sintomatologia del paziente, l'intervento, che sia a cuore aperto o tramite PMC, è inevitabile. In caso contrario, qualora non ci fossero sintomi, sia in stato di riposo che sotto sforzo, la soluzione migliore è quella di effettuare un follow up su base semestrale, per valutare l'evoluzione ed eventuali peggioramenti della malattia.

2.2 Sostituti valvolari

Come appena approfondito, la sostituzione valvolare rappresenta nella maggior parte dei casi la terapia più efficace alle valvulopatie. Questo trattamento inizia ad essere utilizzato nella seconda metà degli anni 50' del Novecento [70] e prevede un'operazione con sternotomia, il momentaneo arresto del cuore ed infine la circolazione sanguigna extracorporea. L'operazione è quindi molto invasiva ed accompagnata da un notevole rischio di mortalità perioperatoria, soprattutto nei casi in cui si renda necessario il re-intervento. Nei pazienti a più alto rischio, la funzione valvolare viene ripristinata con alternative come la TAVI e la PMC per quanto riguarda rispettivamente le stenosi delle valvole aortica e mitralica, come accennato nel paragrafo precedente.

Attualmente, la sostituzione valvolare prevede l'utilizzo di protesi valvolari, le quali possono essere:

- meccaniche;
- biologiche.

I dispositivi meccanici rappresentano il primo modello di protesi valvolare realizzato e, come si vedrà in seguito, sono costituiti da materiali non biologici, necessitano di una terapia anticoagulante ed hanno una durata di 20-30 anni [71]; le bioprotesi, al contrario, presentano costituenti provenienti da tessuto biologico, non necessitano di

TRATTAMENTO CARDIOCHIRURGICO DI SOSTITUZIONE VALVOLARE

alcuna terapia anticoagulante, ma la loro durata non supera mediamente i 10-15 anni, a causa di un'inevitabile degenerazione.

Le due categorie di protesi valvolari presentano particolari caratteristiche che ne rendono l'uso più indicato nel trattamento di condizioni o pazienti diversi, come visibile in Figura 2.8. I cardiocirurghi europei ed americani concordano sull'importanza di scegliere una valvola meccanica per pazienti sotto i 60 anni; viceversa per i pazienti con un'età superiore ai 70 anni, la scelta tende a ricadere su una valvola biologica.

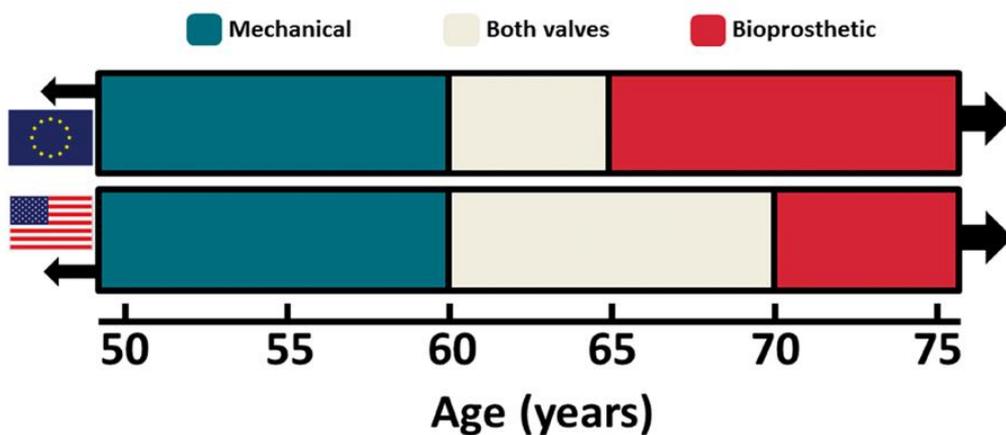


Figura 2.8: Raccomandazioni sulle linee guida per l'uso di protesi meccaniche e bioprotesiche per la sostituzione della valvola aortica [71], rispettivamente da parte di AHA/ACC nordamericano e da linee guida ESC/EACTS europee.

Come specificato nelle linee guida ESC/EACTS la scelta cardiocirurgica di impiantare una valvola rispetto ad un'altra si focalizza su:

- aspettativa di vita;
- rischio stimato di un potenziale re-intervento futuro;
- rischio di complicazioni a causa di specifiche comorbidità o problemi di conformità;
- comorbidità, come ad esempio fibrillazione atriale o malattie vascolari periferiche;

TRATTAMENTO CARDIOCHIRURGICO DI SOSTITUZIONE VALVOLARE

- il rischio di degradazione strutturale della valvola, che può essere accelerato nei pazienti giovani;
- il desiderio di una paziente di rimanere incinta;
- preferenze del paziente [60],

ai fattori elencati, le linee guida redatte dai medici americani aggiungono le prestazioni emodinamiche come un fattore importante quando si considera il tipo di protesi [72].

Nonostante queste indicazioni, negli ultimi anni si è verificato un aumento dell'utilizzo clinico di protesi biologiche. Secondo uno studio condotto in Gran Bretagna ed Irlanda, il numero di bioprotesi impiantate tra il 2004 ed il 2009 è passato dal 65.4% al 77.8% [73], interessando tutte le fasce di età. (Figura 2.9). Per il database nazionale della Cardiocirurgia olandese c'è stato un aumento di bioprotesi impiantate tra il 1995 ed il 2010, ma inerente solo alla fascia d'età compresa dai 55 ai 70 anni; per i pazienti giovani la percentuale non è cambiata, con una larga preferenza per i dispositivi meccanici.

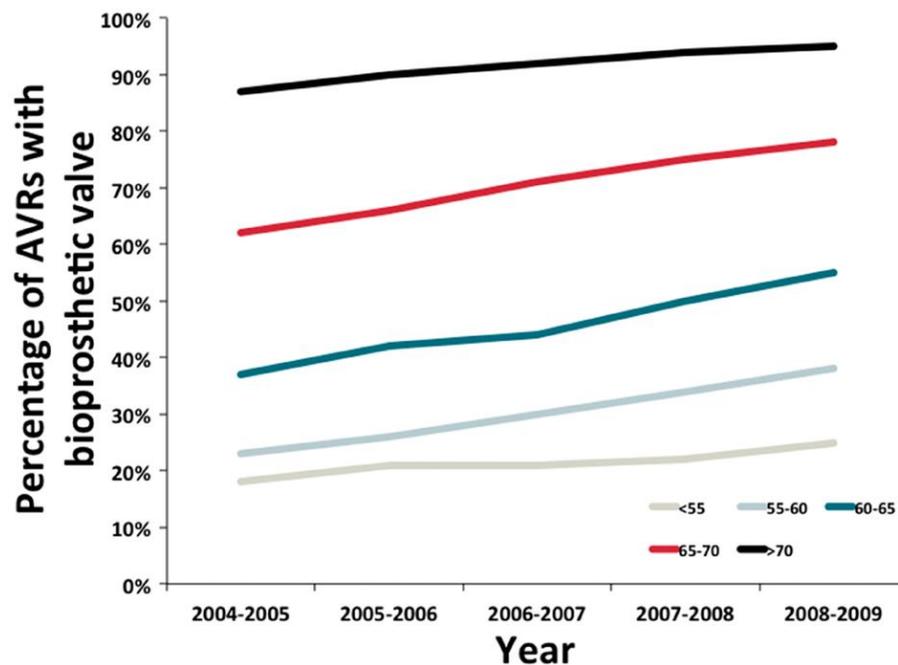


Figura 2.9: Percentuale di sostituzioni valvolari aortiche con protesi biologiche in Gran Bretagna e Irlanda [71].

Questi dati sono in contrapposizione con le linee guida precedentemente menzionate, le quali consigliavano le protesi biologiche nei pazienti con età non inferiore ai 65 anni. Infatti, la degenerazione delle bioprotesi nei pazienti più giovani avviene in minor tempo, in quanto il metabolismo del fosfato e del calcio è maggiormente accelerato, portando ad una degradazione calcifica in minor tempo [74]. Inoltre, un'aspettativa di vita in continuo miglioramento espone i pazienti ad un rischio più elevato di re-interventi, con probabilità sempre maggiore di complicanze durante l'operazione [71].

Pertanto, la scelta tra protesi meccanica e biologica non è spesso facile, in quanto dipende da diversi fattori. A prescindere dalla tipologia, le caratteristiche principali che un sostituto valvolare deve possedere sono state redatte nel 1962 da uno dei pionieri della cardiocirurgia, Dwight Harken, e sono valide tuttora [75].

Le proprietà imprescindibili sono le seguenti:

- il sostituto deve presentare caratteristiche meccaniche di emodinamica comparabili a quelle della valvola nativa;
- deve essere non ostruttivo e la chiusura deve essere tempestiva;
- deve essere costituito di un tessuto vitale, in grado di sostenere l'adesione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule del paziente;
- deve adattarsi alla crescita somatica del ricevente, in particolare nei casi pediatrici;
- deve risultare resistente alle infezioni;
- non deve presentare degenerazione nel corso degli anni, in modo da durare per tutta la vita del paziente;
- non deve scatenare reazioni infiammatorie o immunologiche;
- non deve presentare caratteristiche di trombogenicità;
- deve essere disponibile commercialmente.

Analizzando l'elenco è chiaro che un sostituto valvolare con queste proprietà ancora non esiste. Ad ogni modo, 60 anni dopo lo sviluppo di questi punti, un ramo dell'ingegneria, definita "tissutale", sta lavorando proprio in questa direzione, al fine di migliorare le protesi valvolari.

Nei prossimi paragrafi vi sarà un approfondimento riguardante le valvole meccaniche e biologiche, analizzando la loro rispettiva storia, i costituenti delle due tipologie di protesi ed i modelli attualmente commercializzati, osservando infine la degenerazione dell'impianto. L'ultimo paragrafo sarà invece dedicato all'ingegneria tissutale ed alla ricerca di alternative agli attuali dispositivi protesici, basate perlopiù su nuovi trattamenti dei tessuti animali che le costituiscono.

2.2.1 Valvole protesiche meccaniche

Storicamente il primo impianto di sostituzione valvolare è stato effettuato con una valvola meccanica. Il primo dispositivo risale al 1952, ad opera di Charles A. Hufnagel, il quale posizionò la protesi nel tratto discendente dell'aorta (posizione eterotopica). Essa era costituita da una gabbia di plexiglass e da una pallina di polietilene al suo interno, che fungeva da occlusore (Figura 2.10) [76].



Figura 2.10: Valvola di Hufnagel, la prima valvola artificiale creata [76].

TRATTAMENTO CARDIOCHIRURGICO DI SOSTITUZIONE VALVOLARE

La prima valvola meccanica in posizione ortotopica viene impiantata solo nel 1961, ad opera di Albert Starr e Lowell Edwards. A differenza dei circa 200 trapianti della precedente valvola, questa fu messa in commercio ed utilizzata per circa 2000 casi di sostituzione mitralica e circa 1000 di quella aortica [76]. In questo caso la valvola era formata da una *caged ball* (Figura 2.11), con la palla di silicone, con il compito di attenuare gli urti, e la gabbia, composta di acciaio inossidabile. A causa della sua elevata trombogenicità, questo modello fu modificato nel corso degli anni fino ad esserne completamente rivoluzionato [76].

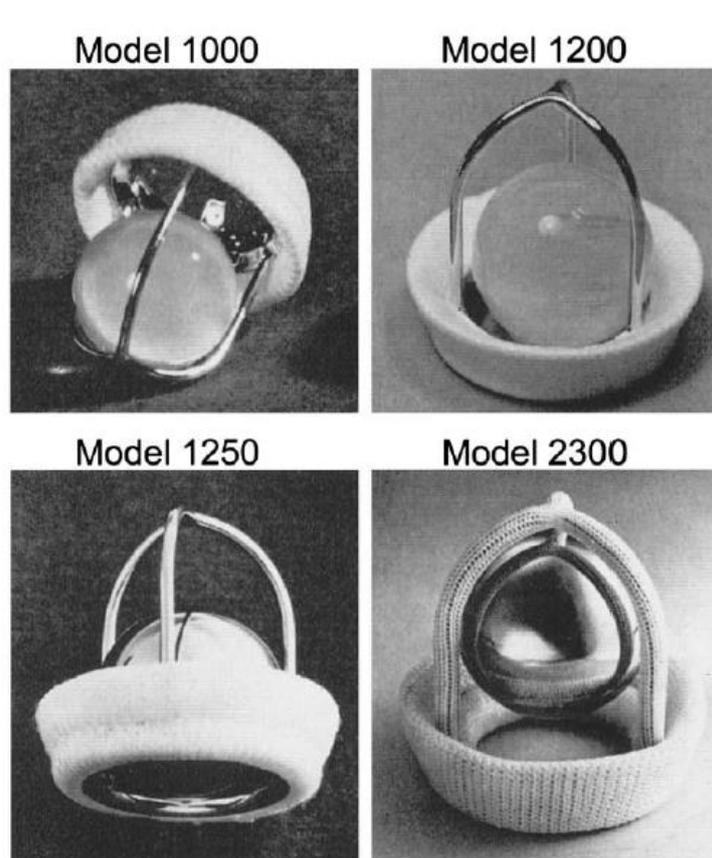


Figura 2.11: Evoluzione della valvola Starr-Edwards dal 1961 al 1980 [76].

Accantonata la scelta della *caged ball*, sono state introdotte le valvole *single tilting-disc* (a singolo disco oscillante), in grado di assicurare una riduzione della distorsione del flusso ematico, dei moti turbolenti e del conseguente danneggiamento cellulare

TRATTAMENTO CARDIOCHIRURGICO DI SOSTITUZIONE VALVOLARE

[76]. Questo modello di valvola venne introdotta nel 1969 ed in pochi anni ne nacquero diverse tipologie, con fasi di aggiornamento che durano fino ai giorni nostri (Figura 2.12). Pur non essendo il modello più utilizzato, la valvola a singolo disco oscillante è infatti tuttora sul mercato.

Valve and Date of First Implant		Valve Description		Date Production Ceased	Total Implants ¹ A – Aortic M – Mitral	Miscellaneous
		Housing – Disc	Pyrolyte Disc			
		Unique Design				
Bjork-Shiley (Flat-disc) 1969		Stellite – Delrin Tilting flat disc	1971	1986	A ~ 157,000 M ~ 140,000	Excellent performance and durability
(Convexo-concave disc) 1975		Stellite – Pyrolyte Tilting convex disc	1975	1986	A ~ 46,000 M ~ 40,000	DC'd because of strut fracture in < 2% of pts
Lillehei-Kaster 1970		Titanium – Pyrolyte Disc contained by prominent “prongs”	1970	1987	A ~ 29,000 M ~ 26,000	One of first valves with pyrolyte poppet
Omni-Science 1978		Titanium – Pyrolyte “Prong” profile markedly reduced	1978		A ~ 72,000 M ~ 26,000	Curvilinear pyrolyte disc
Omni-Carbon 1984		Pyrolyte – Pyrolyte Design similar to Omnisience	1984		A ~ 17,000 M ~ 13,000	All pyrolyte valve
Hall-Kaster Medtronic-Hall 1977		Titanium – Pyrolyte Hole in center of disc for guide strut	1977		A ~ 183,000 M ~ 122,000	Hall – Kaster valve became Medtronic – Hall in 1987

Figura 2.12: Tabella riassuntiva dei diversi modelli di valvola a singolo disco oscillante [76].

Il *gold standard* delle valvole cardiache meccaniche è dato dall'ultima evoluzione, la *Bileaflet valve*, tuttora la tipologia di protesi artificiale più impiantata al mondo. Messa in commercio nel 1974 dalla *St. Jude Regent* (Figura 2.13), questo modello di protesi è costituita da due emidischi che fungono da occlusore, interferendo minimamente con il flusso sanguigno, e permettono di riprodurre un'emodinamica molto simile a quella naturale dettata dalle valvole native.

Il disco, formato da un nucleo di grafite, è reso radiopaco da un'impregnazione in tungsteno. Il nucleo di grafite è rivestito di carbone pirolitico, che permette buone

TRATTAMENTO CARDIOCHIRURGICO DI SOSTITUZIONE VALVOLARE

performance emodinamiche e minimizza la trombogenicità della valvola. I due emidischi in posizione chiusa formano un angolo ottuso di 120° , per tollerare al meglio gli stress meccanici a cui è sottoposto il dispositivo. Il movimento della parte mobile presenta infine un movimento passivo, che dipende dal gradiente pressorio e dai cambiamenti del flusso ematico. Un esempio di valvole meccaniche a singolo e a doppio disco oscillante è visibile in Figura 2.13.

Sebbene le protesi attuali presentino biomateriali con elevata emocompatibilità, il rischio di formazione di coaguli rimane molto elevato, in quanto si tratta pur sempre di superfici diverse dall'endotelio sano. Pertanto, la terapia post-intervento chirurgico prevede un trattamento anticoagulante ed antiaggregante per il resto della vita.

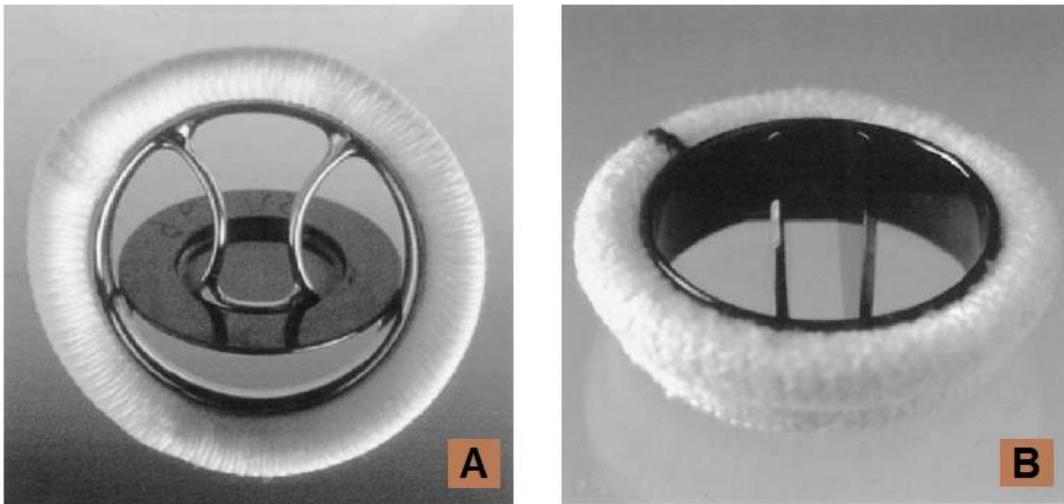


Figura 2.13: A: protesi Single-Tilting disk (Bjork-Shiley); B: protesi Bileaflet valve (St. Jude Regent) [77].

Nonostante la progettazione delle protesi valvolari meccaniche abbia subito radicali cambiamenti, tre elementi fondamentali sono stati mantenuti:

- un *occluder*, rappresentato di solito da una o più parti rigide e mobili, come una palla (nelle protesi *Starr-Edwards*), un disco (in quelle *Bjork-Shiley*) o due semidischi (nelle valvole *St. Jude Regent*). Questo componente deve garantire

apertura e chiusura, senza interferire con il flusso ematico, e adattarsi alle differenze di pressione;

- un *housing*, ovvero la sede in cui è inserito l'*occluder*;
- un *sewing ring*, la base o il corpo della protesi. Solitamente è un anello di sutura in metallo o in graffite rivestito con carbone pirolitico. Rappresenta l'area dove viene eseguita l'anastomosi della protesi con i tessuti del ricevente.

2.2.2 Valvole protesiche biologiche

Le protesi biologiche nascono dall'esigenza di ricreare nel paziente la medesima performance fisiologica garantita da una valvola sana, condizione che è possibile solo parzialmente con i dispositivi meccanici. La terapia anticoagulante, inoltre, rimane uno svantaggio insormontabile per molti aspetti, ad esempio per le giovani donne che desiderano avere una gravidanza.

Nell'attuale utilizzo clinico, le bioprotesi possono essere suddivise in *autografts* e *homografts* (o *allografts*). Per *homografts* si intendono le valvole provenienti dalla stessa specie, mentre per *autografts* quelle dallo stesso individuo. Gli *xenografts*, infine, si distinguono dalle precedenti in quanto costituite dal tessuto di un'altra specie rispetto a quella che subirà l'intervento di sostituzione valvolare.

Storicamente, il primo intervento di valvola biologica avviene nel 1955 ad opera di Gordon Murray, che trapiantò una valvola aortica *homograft* per curare un'insufficienza [78].

Da allora, col passare degli anni, l'industria e la ricerca hanno valutato la possibilità di utilizzo di *xenografts*, i quali si possono produrre in grande quantità, a differenza delle valvole umane. Qualora il tessuto venisse inserito senza alcun trattamento, però, il sistema immunitario del paziente riconoscerebbe come corpo estraneo la nuova valvola, avviando una reazione di rigetto e quindi provocando l'insuccesso dell'impianto. Per prevenire simili reazioni, nel corso degli anni sono stati studiati diversi trattamenti chimici da applicare al tessuto dell'animale donatore.

Tra le prime protesi xenogeniche trattate sono da annoverare quelle con sali di mercurio, testate nell'uomo nel 1965. Anche così, però, si è evidenziata una risposta infiammatoria, con conseguente degenerazione della valvola in brevi periodi di tempo [79]. Successivamente, Binet e Carpentier hanno trattato chimicamente una valvola suina con formaldeide al 4% [80]: l'entusiasmo per l'iniziale successo è stato placato dall'elevata percentuale di insuccesso dell'impianto, il 68% [81]. Quest'ultimo esperimento, però, apre le porte alla possibilità di utilizzare un altro agente cross-linkante per il tessuto biologico valvolare, ossia la glutaraldeide (GA). Il cross-linking delle fibre di collagene del tessuto trattato permette una eccellente stabilità dell'impianto. Inoltre, lo scopo del trattamento con GA è quello di prevenire possibili risposte immunitarie, costituendo una barriera chimica in grado di mascherare gli xenoantigeni [82].

L'idea di utilizzare una valvola biologica trattata con GA risale al 1970 ad opera di William Angell, che, con la cooperazione dei laboratori Shiley, produsse la prima bioprotesi cinque anni più tardi, la "Angell-Shiley (AS) xenograft valve", derivata da tessuto suino [83]. La bioprotesi uscì dalla produzione per malfunzionamenti già dopo un anno dall'impianto, con percentuali intorno al 10% di insuccesso dopo solo 12 mesi dall'operazione [84].

Nel 1981, dopo i primi approcci avvenuti negli anni precedenti, il sodalizio fra il cardiocirurgo Carpentier e l'industria Edwards dà il via alla seconda generazione di bioprotesi, tuttora sul mercato. L'evoluzione di queste valvole verte sul trattamento con GA a bassa pressione e non più ad alta, come in precedenza [81]. Inoltre, la percentuale di GA utilizzata per il crosslinking, lo 0.625%, in modo tale da ottimizzare i vantaggi che porta il fissativo e minimizzare gli aspetti critici. Infatti, oltre alle ottime potenzialità elencate precedentemente, la GA tende ad irrigidire il tessuto, oltre che ad essere citotossica. Con queste premesse, si rende impossibile un eventuale ripopolamento della valvola. Infine, si ipotizza che questo agente cross-linkante sia responsabile della degenerazione calcifica della protesi mediamente in 10-15 anni [85], come si approfondirà nel prossimo paragrafo.

TRATTAMENTO CARDIOCHIRURGICO DI SOSTITUZIONE VALVOLARE

Nonostante negli anni successivi siano state realizzate altre tipologie di valvole, la seconda generazione di bioprotesi valvolari di Carpentier-Edwards rappresenta la più utilizzata tra le biologiche (Figura 2.14) [81].

Le attuali protesi di tessuto di origine di tessuto animale sono suddivise in due categorie diverse: *stented* e *stentless* (Figura 2.14). La prima tipologia rappresenta le tradizionali bioprotesi valvolari, è realizzata montando *xenografts* su *stent*, ovvero su strutture cilindriche metalliche o polimeriche. Quest'ultime presentano una doppia funzionalità: permettono l'applicazione della bioprotesi e la sostengono preservandone la struttura. Solitamente si utilizzano valvole cardiache o pericardio animali: a differenza delle prime, quest'ultimo viene suturato esternamente ad un supporto, determinando un lume valvolare più ampio.

Valve type	Manufacturer or anatomic source	Dates of manufacture	No. of implants
Homografts	Aortic	1956–discontinued	–
	Dura mater	1971–1974	694
Heterografts	Hancock 342	1969–1977	35 000
	Medtronic	1970–present	–
	Tascon Bio	1984–1986	24
	Edwards Lifesciences	1970–present	c. 1 200 000
Pericardial	Ionescu–Shiley	1976–discontinued	–
	Edwards Life Sciences	1981–present	–
	Carpentier–Edwards	1981–present	–
	Perimount		
New biological (in trials)	Sorin Stentless	1991–present	–
	ATS Equine	1991–present	800

Figura 2.14: Bioprotesi valvolari utilizzate in ambito clinico nel passato e nel presente [81].

Al fine di migliorare le bioprotesi, è stato sviluppato nel 1991 un nuovo tipo di valvole biologiche senza *stent*, da cui il nome *stentless*. Quest'ultime rispetto alle prime presentano minori problemi di emodinamica e di trombogenicità [86], sebbene la mancanza dello *stent* renda più complesso l'intervento di sostituzione.

In genere, i tessuti più utilizzati per costituire gli *xenografts* derivano da valvole suine e da pericardio bovino e suino (Figura 2.15), meno comunemente da quello equino.

TRATTAMENTO CARDIOCHIRURGICO DI SOSTITUZIONE VALVOLARE

[87]. Riguardo le valvole umane criopreservate, esse sono considerate il *gold standard* fra le bioprotesi per la derivazione allogenica, le ottime caratteristiche emodinamiche e le loro proprietà strutturali. Ad ogni modo, presentano alcuni svantaggi. Innanzitutto, uno di questi è la scarsa disponibilità: il numero di donatori è di gran lunga minore rispetto ai pazienti che necessitano di impianto, con la forbice tra i due gruppi che si allarga di anno in anno [88]. L'età media dei donatori d'organi, poi, si sta notevolmente alzando, aumentando anche l'accumularsi nei tessuti cardiovascolari dei segni fisiopatologici tipici di patologie come l'aterosclerosi e l'ipertensione. In uno studio condotto nel 2012, infatti, si è stimata che l'età media dei donatori post-mortem fosse di 54 anni [89].

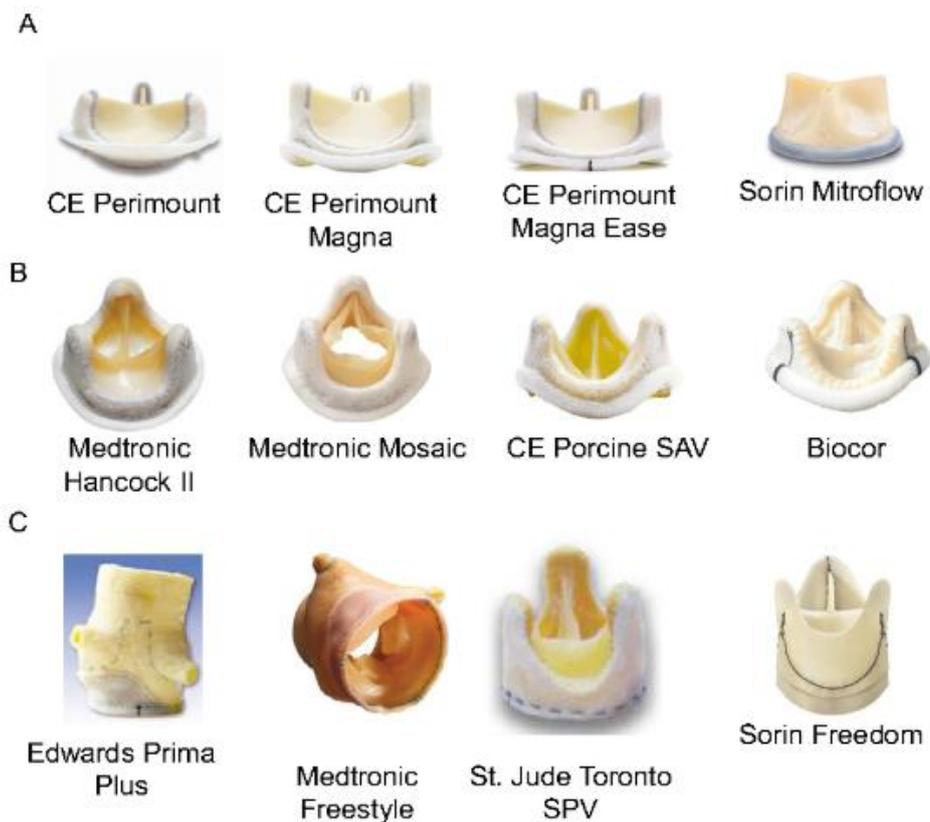


Figura 2.15: Diverse tipologie di protesi biologiche valvolari. A) Sostituti valvolari biologici stented di origine bovina; B) Sostituti valvolari biologici stented di origine suina; C) Valvole biologiche "stentless" [90]

TRATTAMENTO CARDIOCHIRURGICO DI SOSTITUZIONE VALVOLARE

Questo riduce ancor di più il potenziale successo a lungo termine di terapie sostitutive basate su *homografts*. Inoltre, l'iter che porta dalla preparazione degli *allografts* valvolari del donatore fino all'impianto nel ricevente è complesso e non sempre ottimale al fine della conservazione della vitalità cellulare del tessuto. Infatti, generalmente le valvole umane vengono prelevate dal donatore cadavere dopo 24 ore, per poi essere decontaminate con antibiotici ed infine criopreservate in terreno contenente dimetilsolfossido (DMSO) [91]. Quest'operazione è preliminare alla distribuzione alle cliniche cardiocirurgiche delle valvole allogeniche trattate. Esse vengono poi scongelate nella sala operatoria, allestita per l'impianto. Molte variabili legate alla preparazione dell'impianto possono avere effetti importanti sulla funzionalità a lungo termine dello stesso. Fra queste, il tempo di prelievo dopo la morte, l'utilizzo di DMSO (criopreservante, ma citotossico a temperatura ambiente), il congelamento ed il successivo scongelamento devono essere attentamente controllati per prevenire la mortalità delle cellule del tessuto valvolare trattato.

La degenerazione degli *allografts*, infine, presenta analoghe tempistiche di insorgenza rispetto a quella degli *xenografts*. Nonostante il sostituto valvolare sia di natura umana, il ricevente può sviluppare reazioni immunitarie anti-donatore nel periodo post-impianto. Queste ultime sono dovute agli alloantigeni maggiori di istocompatibilità, specifici per ogni individuo.

Nonostante le problematiche evidenziate, è chiaro che l'illimitata disponibilità di *xenografts* rappresenta un vantaggio notevole per il trattamento cardiocirurgico di un più ampio numero di pazienti affetti da valvulopatia.

Sebbene le protesi biologiche valvolari migliorino in generale la qualità di vita del paziente rispetto all'impianto di una valvola meccanica – basti pensare al rumore di apertura-chiusura ed alla terapia anticoagulante necessaria in seguito a questo trattamento –, rimane tuttavia da risolvere il problema della degenerazione tissutale, che è bene classificare in base alla presenza o meno di calcificazione tra le cause dell'insuccesso dell'impianto.

2.2.2.1 Degenerazione calcifica dei sostituti valvolari biologici

La degenerazione calcifica rappresenta il principale processo patologico alla base della disfunzione degli *allografts* e *xenografts* valvolari [92]. Questo fenomeno è distinguibile in due tipologie: si parla di calcificazione intrinseca quando i depositi calcifici sono localizzati nel tessuto cuspidale, o estrinseca se invece i depositi di calcio nelle cuspidi si agglomerano fino alla possibilità di svilupparsi in pseudotrombi [93], con il rischio di staccarsi dal tessuto e diventare potenziali emboli. Storicamente questa degradazione patologica è stata considerata come un processo degenerativo, passivo e non passibile di regolazione, ma alcune ipotesi recenti suppongono che i meccanismi responsabili della calcificazione valvolare possano essere in realtà regolati, in modo simile alla mineralizzazione fisiologica dell'osso [94].

All'origine della calcificazione nelle bioprotesi valvolari di natura eterologa, su cui ci si concentrerà maggiormente in questo paragrafo, vi sono attualmente solo cause ipotetiche. Tra i modelli ipotizzati più accreditati vi è quello di Frederick J. Schoen (Figura 2.16): la sua ipotesi considera i fattori relativi al metabolismo ospitante la protesi, la struttura dell'impianto ed i suoi trattamenti chimici, nonché i fattori meccanici.

Egli mette in relazione l'iniziale nucleazione minerale con l'aumento del calcio intracellulare nelle cellule residue, devitalizzate a causa della GA e quindi non in grado di tenere attivo il sistema di equilibrio del calcio a livello cellulare.

Schoen sostiene che il processo di mineralizzazione nelle cuspidi delle valvole cardiache bioprotesiche inizi all'interno di cellule del tessuto connettivo devitalizzate – e quindi non rimosse – mediante il trattamento con GA [94-96].

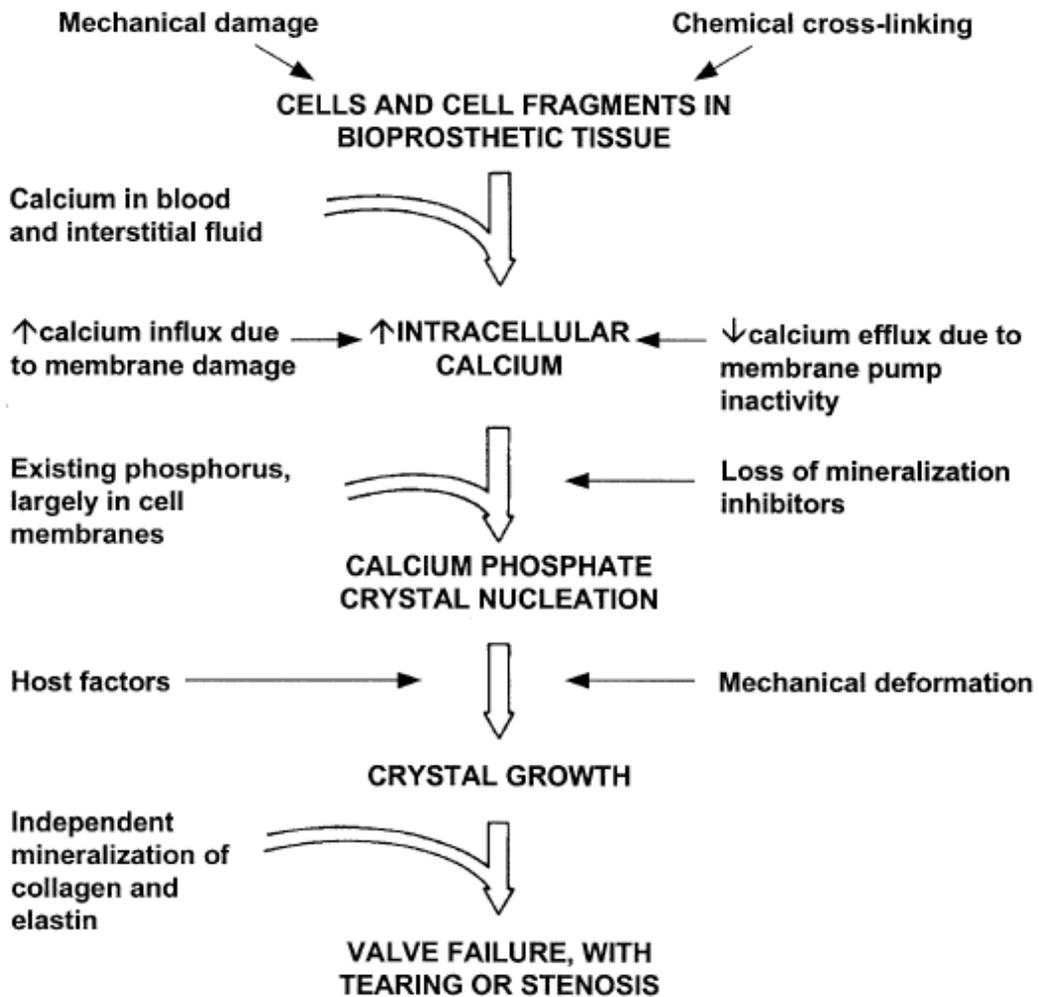


Figura 2.16: Modello per la calcificazione di protesi valvolare biologica, con conseguente fallimento dell'impianto secondo Schoen [93].

La calcificazione delle cellule avviene quindi dopo il coinvolgimento del fluido extracellulare, contenente calcio, con il fosfato associato alla membrana trattata [93]; questo fenomeno si verifica con ogni probabilità a causa della mancata fuoriuscita degli ioni calcio nel tessuto. Quest'ultimo, fissato con GA, non presenta una fisiologica funzione dei meccanismi di omeostasi e di eliminazione di queste molecole, in quanto le cellule residenti morte non possono più compensare con alcun sistema di equilibrio. L'ambiente creatosi favorisce quindi la nucleazione ed i depositi iniziali di calcificazione, che, unendosi ed inevitabilmente ingrandendosi, irrigidiscono ed

indeboliscono il tessuto sino a rendere impossibile il funzionamento corretto della protesi.

Parallelamente a Schoen, un'altra spiegazione al fenomeno della degenerazione bioprotesica è stata proposta da Gaetano Thiene e Marialuisa Valente. Anche in questo caso, viene ipotizzata una probabile cascata d'eventi che collega il trattamento chimico della bioprotesi alla mineralizzazione del tessuto ed al conseguente insuccesso dell'impianto (Figura 2.17). Quest'ipotesi è formulata con un presupposto simile a quello di Schoen: confermato il ruolo eccellente della GA nella stabilizzazione dei tessuti e nella neutralizzazione dell'antigenicità dell'innesto, mascherando gli xenoantigeni, la devitalizzazione delle cellule del tessuto xenogenico ed il rilascio dei residui di aldeide provocano rispettivamente calcificazione e citotossicità.

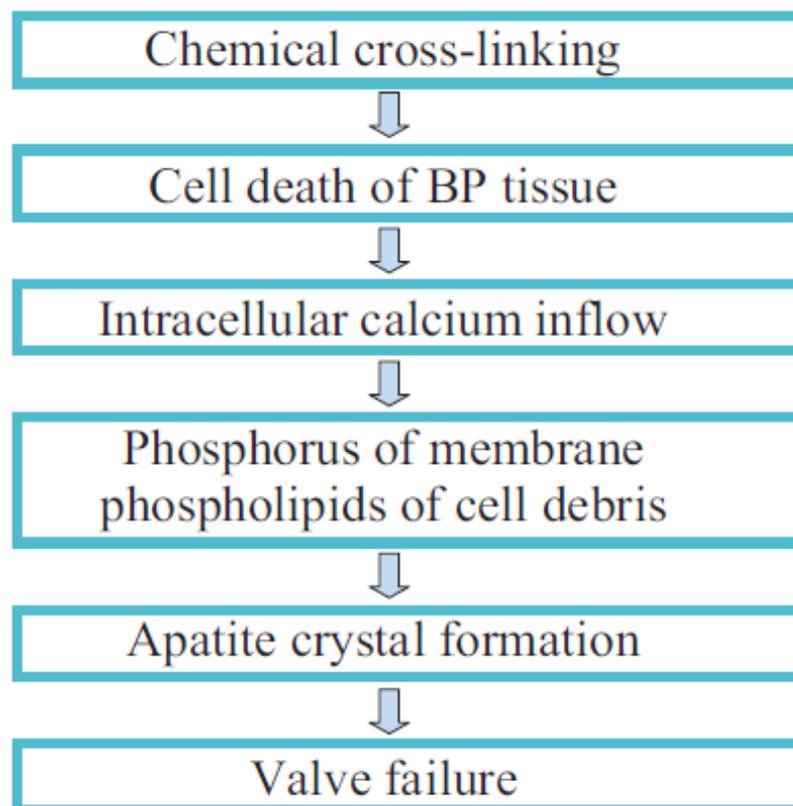


Figura 2.17: Modello che porta alla calcificazione ed al fallimento delle bioprotesi secondo Thiene e Valente [92].

Come si nota dalla cascata in Figura 2.17, il cross-linking chimico attuato dal trattamento con GA agisce come un *killer of xenograft cells* [92], le quali, non più vitali, non equilibrano il calcio al loro interno, con un conseguente afflusso nel compartimento citoplasmatico [96]. Il livello aumentato di calcio intracellulare e la presenza di fosfati nei residui cellulari, ovvero nel nucleo e nella membrana, innescano quindi l'insorgenza della formazione di fosfato di calcio sotto forma di cristalli di apatite. Infine, avviene la mineralizzazione del collagene, con il fallimento della bioprotesi innestata [92].

Circa i responsabili del processo di calcificazione, un'ulteriore ipotesi approfondisce una possibile risposta immunitaria dell'ospite. Le bioprotesi valvolari, infatti, esprimono diversi epitopi, propri della specie di origine del tessuto animale. Per poter soddisfare i requisiti di un'eventuale applicazione clinica, l'eliminazione o l'inattivazione di questi è necessaria. Nonostante il trattamento con GA abbia anche come razionale la creazione di una barriera fra sangue del ricevente e tessuto xenogenico del donatore, si è dimostrato che esso non è in grado di fornire una copertura completa e che molti xenoantigeni non sono mascherati [97]. In particolare, la presenza residua di xenoantigeni alpha-Gal è stata correlata a una specifica risposta immunitaria già dopo 10 giorni dall'impianto della valvola bioprotesica [97][98]. Questo epitopo non è espresso nella membrana delle cellule umane e non può essere metabolizzato dall'uomo. Vista la presenza nella flora gastrointestinale di batteri che esprimono alpha-gal, l'uomo risponde prontamente a questo xenoantigene per controllare i livelli della stessa attraverso delle immunoglobuline specifiche già preformate. Come evidenziato da vari studi clinici [97][98], è altamente probabile che alpha-gal sia causa di opsonizzazione del tessuto valvolare xenogenico, con avvio di uno specifico reclutamento di macrofagi, linfociti e di una conseguente risposta immunitaria di rigetto iperacuto, solo rallentata dal trattamento mascherante con GA [99].

2.2.2.2 Degradazione non calcifica dei sostituti valvolari biologici

Anche la degradazione non calcifica delle bioprotesi valvolari sembra in correlazione al trattamento della stessa con GA. Infatti, il fissaggio comporta la devitalizzazione del tessuto, e quindi viene persa la capacità di rimodellamento e riparazione prerogativa delle cellule vive residenti nello *xenograft*. Inoltre, il cross-linking delle fibre del collagene comporta un innaturale allineamento di queste ed un conseguente irrigidimento della bioprotesi, con maggiore probabilità di disfunzione valvolare [100]. Questa configurazione porta anche ad un deterioramento delle fibre del collagene che si ipotizza possa essere indipendente rispetto alla calcificazione [101].

2.3 Medicina rigenerativa delle valvole cardiache: ingegneria tissutale e modelli sperimentali per la valutazione della calcificazione

L'ingegneria tissutale rappresenta un campo innovativo multidisciplinare, che nasce con l'obiettivo di proporre un'alternativa più biocompatibile alle soluzioni terapeutiche attualmente applicate nella clinica. Sebbene stia diventando di notevole interesse biomedico solo negli ultimi anni, una prima definizione di "Ingegneria Tissutale" si ha già nel 1987 da parte di Fung, durante un congresso della "National Science Foundation" [102]. Nel 1998 questo ramo dell'ingegneria è stato poi definito come *"una tecnica interdisciplinare che applica i principi e i metodi dell'ingegneria e delle scienze biologiche con l'obiettivo di comprendere le relazioni fondamentali tra struttura e funzione nei tessuti sani e malati dei mammiferi e di sviluppare sostituti biologici in grado di ripristinare, mantenere o migliorarne le funzioni"* [11]. L'innovazione principale di questo approccio è quella di differire dalle tradizionali tecniche di trapianto/impianto proponendo l'uso di un tessuto bioingegnerizzato che permetta l'integrazione totale con il ricevente e che prevenga, quindi, re-interventi o

trattamenti farmacologici post-trapianto/impianto. Un altro fondamentale obiettivo è quello di innestare un impianto che abbia la capacità di accrescimento con il paziente. Per quanto concerne lo studio su tessuto ingegnerizzato per le protesi valvolari, l'ingegneria tissutale può essere considerata come la manipolazione di molecole, di origine biologica o sintetica, e di cellule, al fine di realizzare nuovi costrutti tissutali che siano metabolicamente attivi e che possano trovare utilizzo come sostituti di strutture disfunzionanti o malformate [102]. In particolare, vi è l'esigenza di trovare soluzioni terapeutiche nei casi pediatrici, che necessitano di bioprotesi valide per tutta la vita, senza ulteriori re-interventi, con aumentata mortalità peri-operatoria.

La ricerca di questo tipo di caratteristiche è la conferma che il sostituto valvolare ideale è quello descritto da Dwight Harken (Paragrafo 2.2); in particolare, l'ingegneria tissutale potrebbe essere proprio l'unico approccio in grado di sviluppare nuove strategie terapeutiche che superino le limitazioni delle attuali soluzioni cliniche (Figura 2.18).

Nell'ambito dell'ingegneria tissutale, lo *scaffold* valvolare deve possedere alcune proprietà fondamentali al fine di risultare idoneo:

- l'architettura deve essere il più simile possibile alla valvola nativa da sostituire, sia a livello macroscopico che microscopico, in quanto una differenza sostanziale potrebbe influenzare le proprietà meccaniche e la funzionalità cellulare;
- capacità di supporto all'adesione, alla proliferazione e al differenziamento cellulare, oltre che al rimodellamento, in modo da risultare non trombogenico e da non scatenare risposte immunitarie.

Oltre a queste, la struttura deve presentare delle buone proprietà biomeccaniche, di resistenza agli stress emodinamici e di elasticità durante tutti i cicli di apertura e chiusura della valvola durante l'intera vita del paziente [103].

TRATTAMENTO CARDIOCHIRURGICO DI SOSTITUZIONE VALVOLARE

Per la scelta del tipo di materiale da utilizzare, vi sono due possibili approcci per l'ottenimento del supporto, ovvero:

- utilizzo di materiali sintetici;
- utilizzo di supporti di derivazione biologica.

Per i primi, la scelta del materiale ricadrà su biopolimeri biodegradabili e biorisorbibili, come ad esempio l'acido polilattico e l'acido poliglicolico, che vantano inoltre, in alcuni casi, dell'approvazione per un possibile utilizzo in ambito clinico [104]. Biopolimeri con queste caratteristiche stimolano la colonizzazione cellulare e la sintesi di nuova ECM con crescita di tessuto autologo, che prenderà il loro posto non appena terminata la loro funzione di guida [11]. Tuttavia, alcuni *scaffold* sintetici si sono dimostrati poco biodegradabili o inaffidabili, a causa ad esempio dell'incapacità di sostenere lo stress subito, che ha causato microfratture sul materiale [105].

Funzionalità da ottimizzare	Convenzionale (meccanico, bioprotesico)	Tessuto progettato
Chiusura delle cuspidi	Rapido e completo	Rapido e completo
Dimensione dell'area dell'orifizio	Meno di quello delle valvole naturali	Migliore
Proprietà meccaniche	Stabile	Stabile
Inserimento chirurgico	Facile e permanente	Facile e permanente
Rischio di trombosi	Sì, soprattutto le valvole meccaniche, che richiedono anticoagulanti, causando vulnerabilità all'emorragia	No; superficie endoteliale per inibire la trombogenesi
Rischio di disfunzione strutturale	Degradazione di materiali sintetici rari con valvole meccaniche	Resistente alla degradazione e alla calcificazione
	Degradazione tissutale e calcificazione di volantini con valvole bioprotesiche	
Rischio di infezione	Sempre presente	Resistente alle infezioni
vitalità	No	Sì, in grado di riparare lesioni, rimodellare e potenzialmente crescere con il paziente

Figura 2.18: Obiettivi di progettazione e caratteristiche delle valvole cardiache sostitutive [82].

TRATTAMENTO CARDIOCHIRURGICO DI SOSTITUZIONE VALVOLARE

Il supporto biologico può essere suddivisibile in base al tipo di tessuto da cui è derivato. Infatti, esso ad esempio può essere di origine valvolare – quindi *xenografts* o *allografts* – o non valvolare, come, tra gli altri, pericardio o fibrina [106]. A prescindere da quale si utilizzi, come verrà approfondito in seguito in questo paragrafo, lo *scaffold* biologico deve essere deprivato di tutte le componenti che potrebbero indurre reazioni avverse nel ricevente.

Un confronto tra *scaffold* sintetici e biologici è visibile in Figura 2.19, evidenziando vantaggi e svantaggi.

	Scaffold sintetici	Scaffold biologici
vantaggi	Controllo della struttura e delle proprietà del materiale (ad es. Dimensione dei pori, stabilità, velocità di degradazione)	Mantenere l'architettura del tessuto nativo (potenzialmente valvola)
	Facilmente riproducibile	Mantenere le informazioni biologiche (ad es. Siti reattivi, fattori di crescita)
	riassorbibile	Potenzialmente riassorbibile
svantaggi	Difficoltà nel controllo dell'adesione cellulare e nella riorganizzazione dei tessuti	La decellularizzazione può alterare le proprietà fisiche
	Inflammatione dovuta a degradazione incompleta del polimero o mancanza di biocompatibilità	Difficoltà di penetrazione cellulare all'interno
	Lo spazio precedentemente occupato dal polimero e i suoi interstizi sono sostituiti da fibrosi / cicatrice	Può indurre reazioni immunologiche
	Perfusione limitata alle cellule profonde	Potenziale di calcificazione

Figura 2.19: Confronto tra scaffold sintetico e biologico [82].

Con uno *scaffold* sintetico possono esserci maggiori controlli di produzione e riproducibilità, ma sussistono comunque degli svantaggi significativi nell'utilizzo di biomateriali di questo tipo, tra cui la difficoltà nella costruzione di una struttura stabile, resistente e flessibile, così come una maggiore probabilità di elevata trombogenicità ed una scarsa adesione cellulare sulla superficie [11].

TRATTAMENTO CARDIOCHIRURGICO DI SOSTITUZIONE VALVOLARE

La scelta di uno *scaffold* biologico, d'altro canto, ha grandi vantaggi, tra tutti quello di possedere una ECM che contenga la struttura ed i componenti originali e ottimali per ospitare le cellule del ricevente [11]. E' possibile, però, che si riscontri un maggiore potenziale calcifico o possibili reazioni immunologiche, come per le valvole bioprotesiche [82].

Una volta deciso il tipo di *scaffold* da adottare, vi sono due strategie diverse per il ripopolamento cellulare. La prima prevede la semina cellulare *in vitro*, ovvero l'approccio convenzionale dell'ingegneria tissutale (Figura 2.20) [82], che presume il ripopolamento con cellule e nutrienti nella piastra Petri in laboratorio. Lo step successivo è il condizionamento del costrutto per favorire l'adeguata formazione e maturazione del tessuto, che solitamente avvengono per mezzo di un bioreattore, in grado di creare un'ambiente favorevole alla crescita cellulare. Una volta terminato quest'ultimo processo, il tessuto è idealmente pronto per essere innestato nel paziente [11].

Per questa soluzione, un aspetto cruciale è dato dalla scelta delle cellule da utilizzare. Un esempio nel caso di applicazioni in ambito cardiovascolare, è l'uso di cellule isolate dalle arterie periferiche [11].

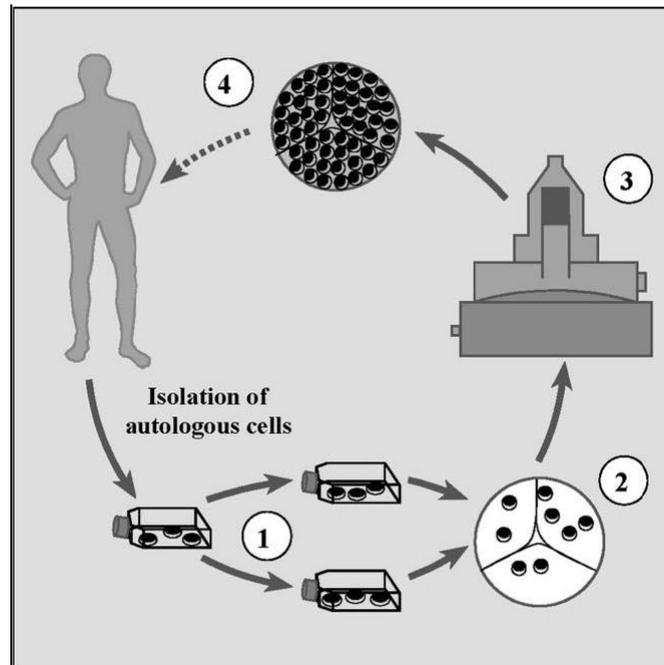


Figura 2.20: Schematizzazione dell'approccio convenzionale dell'ingegneria tissutale.

1. Isolamento ed espansione di cellule autologhe; 2. Semina cellulare su scaffold; 3. Condizionamento delle cellule in un bioreattore; 4. Tessuto pronto per l'innesto nel paziente [11].

Un approccio diverso – e più innovativo – è detto “*Tissue Guided regeneration*” o, più brevemente, “*in situ*”: la differenza sostanziale rispetto al primo metodo è la mancanza della semina cellulare *in vitro*, in quanto lo *scaffold* viene direttamente impiantato nel ricevente.

Un approccio che preveda l'utilizzo di tessuto biologico, valido sia per la tecnica *in vitro* sia per quella *in situ*, è quello della decellularizzazione, come accennato. Essa prevede alcuni requisiti per la sua buona riuscita: innanzitutto l'obiettivo è la rimozione dal tessuto di tutte le cellule residenti, i loro residui ed epitopi antigenici [107]. Da questo trattamento, inoltre, si cerca di preservare la ECM, al fine di salvaguardare una corretta funzione dell'impianto una volta innestato [108]. Infine, la membrana basale non dovrebbe essere intaccata: in caso contrario, ci sarebbero

difficoltà di adesione delle cellule e, di conseguenza, di ripopolamento e crescita cellulare sulla superficie trattata [107].

Esistono diverse tecniche di decellularizzazione, sia per *scaffold* xenogenici sia per allogenici. A prescindere dallo specifico tessuto su cui viene applicato, solitamente il protocollo prevede una combinazione di metodi fisici, chimici ed enzimatici.

Metodi fisici

Congelamento-scongelamento e agitazione, sia rotazionale che orizzontale, sono alcuni dei metodi fisici utilizzati nella fase di decellularizzazione [109]. In particolare, con quest'ultima è possibile aumentare l'efficacia del trattamento in corso.

Oltre a questi, la pressione idrostatica è stata utilizzata talvolta per la rimozione delle cellule, mentre la sonicazione, ovvero l'utilizzo di onde acustiche, perlopiù ultrasuoni, è stata usata dopo lisi cellulari per eliminare possibili residui conseguenti [110].

Metodi chimici

I principali agenti appartenenti a questa categoria sono i seguenti:

- **Acidi e basi:** sono i responsabili o i catalizzatori della degradazione idrolitica delle biomolecole [109]. Tra i più utilizzati vi è l'acido peracetico, battericida che va usato in piccole percentuali per evitare il danneggiamento della ECM, come si vedrà nel prossimo capitolo. Le basi, invece, sono comunemente usate per rimuovere i peli dai campioni di derma durante le prime fasi di alcune decellularizzazioni [111]. Inoltre, esse possono rimuovere i fattori di crescita dalla matrice e diminuire le proprietà meccaniche dell'ECM in modo più significativo rispetto ad agenti chimici ed enzimatici [111]. Alcuni esempi di base usate sono l'idrossido di calcio, il solfuro di sodio e l'idrossido di sodio.
- **Detergenti:** Si distinguono in ionici e non ionici. I primi sono efficaci nella solubilizzazione delle membrane cellulare e nucleare, anche se presentano lo svantaggio di denaturare le proteine distruggendo le interazioni proteina-proteina [112]. I più utilizzati sono il sodio colato, il sodio deossicolato ed il sodio-dodecil-solfato. Quest'ultimo, in particolare, è in generale più efficace

rispetto ad altri per la rimozione di residui cellulari, ma è anche più dannoso per l'ECM se usato ad alte concentrazioni [113]. I detergenti non ionici presentano invece un effetto più blando, andando ad agire sulle interazioni lipidi-lipidi e lipidi-proteine, con meno efficacia su eventuali legami proteine-proteine. Tra i più utilizzati dei detergenti non ionici è da annoverare il Triton X-100 (tert-octylphenylpolyoxyethylen), che può rimuovere efficacemente i residui cellulari dai tessuti più spessi, come ad esempio i condotti delle valvole [109].

Al fine di ottenere un'efficace decellularizzazione, è bene lavare attentamente i residui chimici. Durante il trattamento, infatti, gli agenti penetrano nei tessuti e devono essere poi rimossi, con un'attenzione particolare per quelli citotossici, come il sodio-dodecil-solfato.

- Soluzioni ipotoniche-ipertoniche: l'utilizzo di combinazioni di questo tipo di soluzioni induce shock osmotici. Infatti, l'immersione in soluzioni ipotoniche alternate a quelle ipertoniche causa un rigonfiamento e sgonfiamento delle cellule fino alla loro rottura. Con l'inevitabile morte cellulare, aumenta l'azione dei detergenti sui componenti citoplasmatici, in assenza della membrana cellulare a protezione dell'interno della cellula [109].

Metodi enzimatici

Gli enzimi utilizzati nei protocolli di decellularizzazione possono fornire un'elevata specificità per la rimozione di residui cellulari [109]. Tra i più importanti si annoverano la tripsina e la nucleasi.

- Tripsina: enzima in grado di rompere i legami tra le cellule presenti nella ECM [110]. Rispetto ad alcuni detergenti questo enzima possiede capacità maggiormente distruttive nei confronti dei componenti dell'ECM [109].
- Nucleasi: suddivisi a loro volta in endonucleasi ed esonucleasi. I primi, come ad esempio la BenzonaseTM, inducono l'idrolisi di legami interni di catene di RNA e DNA, mentre i secondi quella dei legami esterni. Pertanto, le prime possono essere maggiormente efficaci rispetto a quest'ultimi [109].

Metodi non enzimatici

Vi sono, infine, agenti non enzimatici che costituiscono una parte importante nel protocollo della decellularizzazione. Tra questi vi sono agenti chelanti come l'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), che aiuta nella dissociazione fra cellule ed ECM [109]; gli inibitori di proteasi, che prevengono danni indesiderati all'ECM dopo lisi e rilascio di enzimi cellulari, come viene approfondito nel prossimo capitolo; Antibiotici ed antimicotici, come ad esempio la penicillina, streptomina o la amphotericina B, utilizzati per decontaminare lo *scaffold* decellularizzato [109].

2.3.1 Modelli sperimentali per valutare la calcificazione

Un biomateriale destinato al contatto intimo e prolungato con l'organismo umano, ancor di più se a contatto con il sangue, deve essere sottoposto ad una completa valutazione di biocompatibilità, prima della commercializzazione e del suo uso.

A riguardo, la *Food and Drug Administration* (FDA), ente governativo statunitense che si occupa della regolamentazione dei prodotti alimentari e farmaceutici, procede ad approvare il dispositivo biomedico solo dopo il superamento di specifici test esposti nelle sue linee guida [114].

L'iter di valutazione preliminare di biocompatibilità è fondamentale al fine di verificare l'adeguatezza del biomateriale all'innesto nell'uomo senza che possano esserci effetti collaterali sfavorevoli per il paziente.

Fra i test di biocompatibilità, un'importante valutazione per le bioprotesi valvolari è rappresentata dalle analisi di propensione alla calcificazione. A questo scopo, possono essere utilizzate due modalità di indagine: la prima prevede l'utilizzo di modelli *in vitro*, la seconda *in vivo*.

Il modello sperimentale *in vitro* può essere a sua volta realizzato secondo due possibili approcci. Infatti, l'induzione alla calcificazione su modelli *in vitro* può avvenire per mezzo di agenti chimici, che creano un ambiente pro-calcifico variando i livelli di calcio nella soluzione: in questo modo la concentrazione di questi ioni sarà costante

ed alto. Per permettere ciò, vengono utilizzati ad esempio Desametasone, acido ascorbico e β -glicerofosfati [115], [116], o possono essere creati dei sistemi di iniezione di soluzioni di calcio atte a creare un microambiente pro-calcifico [117], oppure è possibile utilizzare l'endotossina batterica lipopolisaccaride con effetto pro-calcifico [118].

Un altro modello *in vitro* è proposto da Marcello Rattazzi attraverso un meccanismo di mineralizzazione indotta da una maggiore concentrazione di siero rispetto alla percentuale normalmente presente nel sangue (50% vs. 41%) [119]. Si mira a ricreare *in vitro* l'ambiente cellulare ed extracellulare tipicamente presente in pazienti in cui è alterato il controllo del metabolismo del calcio, come per esempio nelle condizioni patologiche di iperparatiroidismo o di insufficienza renale. In queste condizioni, la calcificazione vascolare avviene più rapidamente. Si è inoltre osservato che il siero contiene un potenziale calcificante intrinseco della ECM [120][121]. Questa proprietà potrebbe essere attribuita ad un fattore di calcificazione del siero che è in grado di guidare la calcificazione selettiva delle fibre di collagene [122].

A differenza del primo modello basato su fattori esogeni, quest'ultimo rispecchia maggiormente la fisio(pato)logia dell'organismo umano, con una conseguente maggior attendibilità dei risultati, sebbene l'ambiente ricreato rispecchi le peggiori condizioni possibili di impianto del sostituto valvolare biologico.

Anche i modelli *in vivo*, come i precedenti, sono principalmente di due tipi: il più utilizzato è l'impianto sottocute in roditore, solitamente ratto, per valutare le reazioni dell'ospite al corpo estraneo. Sebbene questo modello sperimentale sia approvato dalla FDA, le condizioni fisiologiche e patologiche dell'uomo sono simulate solo parzialmente. Ad esempio, la reazione immunitaria causata dall'epitopo α Gal non è presente nel ratto, a differenza di ciò che accade nell'uomo, e quindi il potere predittivo della propensione alla calcificazione mediata da risposta immunitaria xenoantigene-mediata è sicuramente insufficiente.

Il modello *in vivo* sui grandi animali, infine, richiede un impianto nella sede dove il biomateriale andrà ad avere la propria funzionalità. Il modello animale più utilizzato

TRATTAMENTO CARDIOCHIRURGICO DI SOSTITUZIONE VALVOLARE

per valutare il potenziale calcifico di una bioprotesi valvolare è la pecora, la quale a differenza dell'uomo presenta un processo di mineralizzazione molto accelerato [123]. Nell'iter delineato dall'FDA, questo passaggio è l'ultimo prima dei Trials clinici.

I vantaggi dei modelli *in vitro* riguardano il lato economico (meno dispendiosi) ed il maggior controllo. D'altro canto, questo modello trascura alcune importanti variabili presenti *in vivo*, come ad esempio il contatto con il sangue (elementi, flusso, pressione, ecc) e la risposta immunitaria dell'ospite.

SCOPO DELLO STUDIO

Scopo dello studio

Le bioprotesi cardiache rappresentano la tipologia di dispositivi per sostituzioni valvolari più utilizzata negli ultimi anni, come alternativa alle protesi meccaniche. Sebbene i dispositivi protesici di origine biologica abbiano numerosi vantaggi rispetto a quelli meccanici, essi presentano ancora degli svantaggi che incidono sulla qualità di vita del paziente, primo fra tutti la durata, stimata attorno ai 10 anni. Ciò è dovuto in larga parte alla degenerazione del dispositivo biologico, a causa di diversi fattori tra cui la calcificazione. Sulle possibili cause di quest'ultima si stanno formulando diverse ipotesi, tra cui quella che sia una conseguenza dell'utilizzo della glutaraldeide (GA), con cui gli attuali sostituti valvolari sono trattati prima dell'impianto. La ricerca sta spostando l'attenzione verso metodi alternativi al trattamento con GA, come ad esempio la decellularizzazione delle valvole biologiche, preservando comunque la struttura della ECM.

L'obiettivo di questa tesi è quello di valutare in un modello di calcificazione *in vitro* il potenziale pro-calcifico di un tessuto animale ampiamente utilizzato per lo sviluppo di bioprotesi valvolari, ovvero il pericardio suino, dopo averlo decellularizzato, secondo il protocollo TRICOL. In particolare, si intende valutare se regioni pericardiche diverse fra loro in termini di ECM e cellularità, come le zone ventricolari destre anteriore e posteriore (rispettivamente, più e meno omogenea) possano mostrare anche una variabile propensione alla calcificazione. Inoltre, come ulteriore confronto fisiopatologico rispetto alla degenerazione bioprotesica osservata clinicamente, si considereranno analoghe regioni pericardiche native sottoposte a trattamento con GA, alla stessa concentrazione rispetto a quella utilizzata per i sostituti valvolari xenogenici attualmente commercializzati e impiantati nei pazienti.

SCOPO DELLO STUDIO

CAPITOLO 3

3. Materiali e metodi

In questo capitolo si approfondiscono le metodologie ed i materiali impiegati. Se non diversamente specificato, i reagenti utilizzati nel corso degli esperimenti sono stati acquisiti dalla ditta Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

3.1 Preparazione alla decellularizzazione ed al trattamento con glutaraldeide

Per l'isolamento delle diverse regioni tissutali di interesse allo studio, sono stati prelevati cuori interi di suino provvisti di pericardio (n=6), da un macello locale (F.lli Guerriero Srl, Villafranca Padovana, Italia).

Per il trasporto in condizioni di preservazione, i tessuti sono stati immersi in mezzo di coltura non completo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) a temperatura ambiente e trasportati tramite *Bio-Carrier*. Una volta giunti in laboratorio, sono stati sezionati i pericardi di ciascun cuore con l'ausilio di forbici chirurgiche e bisturi sterili. Disteso l'intero pericardio di ogni cuore, è stata operata una selezione di pericardi (n=3, nominati A1, A2, A3) sezionati per suddividere le parti omogenea (*Anterior Right Ventricular Pericardium: ARVP*) e disomogenea (*Posterior Right Ventricular Pericardium: PRVP*) del tessuto (Figura 3.1), in considerazione di precedenti studi ed approfondimenti del gruppo di Medicina Rigenerativa Cardiovascolare [124], all'interno del quale è stato svolto questo progetto di tesi sperimentale.

Dopo aver sezionato le regioni di interesse, è stato eliminato lo strato adiposo adeso alla superficie fibrosa del pericardio ed i tessuti sono stati inseriti in contenitori sterili da 250 ml, immersi in soluzione fisiologica allo 0.9% di cloruro di sodio (NaCl) e

MATERIALI E METODI

lasciati per un'ora a 4° C su un oscillatore a scuotimento orizzontale, in modo da rimuovere eventuali residui ematici.

Al termine del lavaggio, è stato tolto il connettivo lasso più disorganizzato nella superficie, utilizzando delle pinzette di precisione.

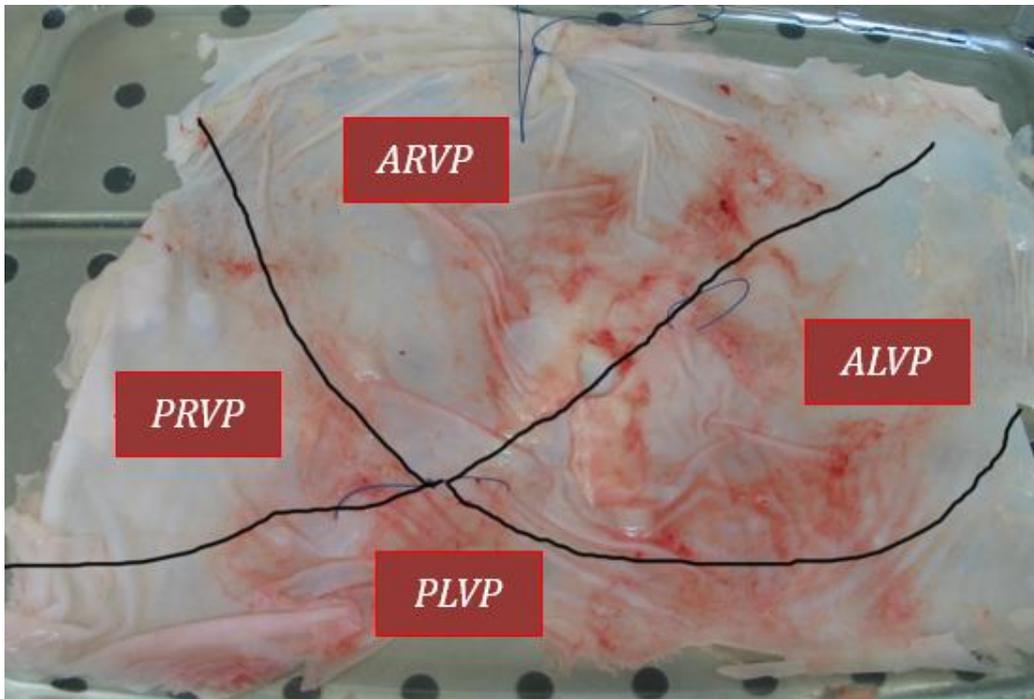


Figura 3.1: Pericardio suino diviso in regioni di interesse. Legenda: PLVP: Posterior Left Ventricular Pericardium; ALVP: Anterior Left Ventricular Pericardium. Per le successive analisi, si considerano solo ARVP e PRVP,

I tessuti pericardici, divisi in PRVP e ARVP, sono stati a loro volta suddivisi ciascuno in due parti, in modo che aree contigue fossero sottoposte a decellularizzazione e a trattamento con GA (Figura 3.2).

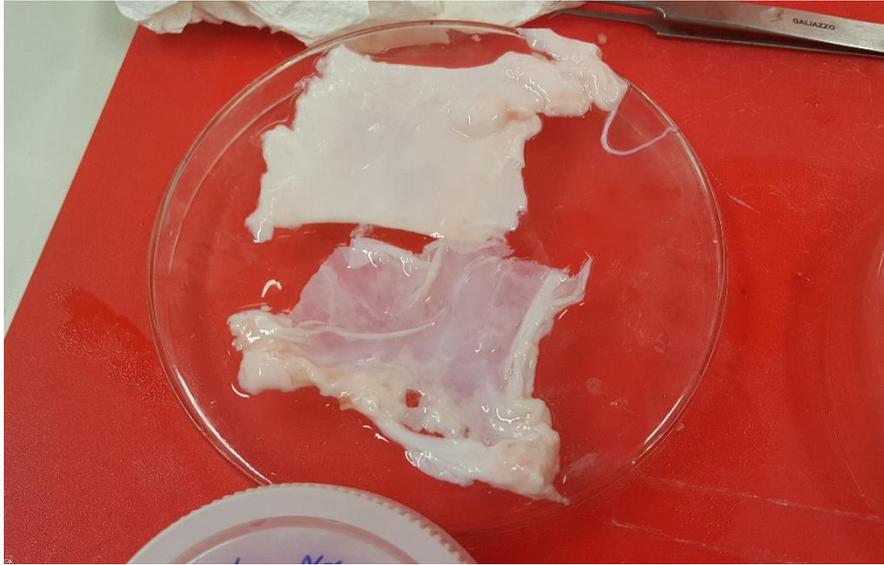


Figura 3.2: PRVP. Già alla visione macroscopica, è possibile notare la disomogeneità tissutale.

3.2 Decellularizzazione TRICOL

Il protocollo scelto per decellularizzare i tessuti è denominato TRICOL, utilizzato già in passato con efficacia per il trattamento di valvole aortiche e polmonari, sia porcine che umane, ma anche di pericardi bovini e suini[125][126][127][128]. Questa tecnica associa al detergente non ionico Triton X-100, soluzioni ipo/ipertoniche, il detergente ionico sodio colato, nonché endonucleasi aspecifiche [125].

In particolare, il sodio colato, con il Triton X-100, è il detergente principale della procedura TRICOL [125]. Esso è un acido biliare, carico negativamente e non coniugato. Presenta una buona efficacia nella solubilizzazione sia della membrana cellulare che della membrana nucleare, con un'azione meno aggressiva sulla ECM, a differenza di altri detergenti ionici più potenti [112].

Nelle fasi del trattamento di decellularizzazione TRICOL, è prevista sempre l'aggiunta di 10% di "Buffer A", una soluzione tampone (pH = 7.40) con azione antiossidante, ed è costituita da:

MATERIALI E METODI

- *Phosphate Buffer Saline* (PBS);
- 100 mM Ascorbato di sodio, rappresenta antiossidante naturale;
- 50 mM EDTA.

Per la soluzione di ogni step, i pericardi sezionati (n=3 per ciascuna regione) sono stati collocati in 100 ml ciascuno dentro un contenitore sterile (Figura 3.3).

Il primo step della decellularizzazione è stato il seguente:

- 10% DMSO;
- 0.5% di inibitore di proteasi A;
- 0.5% di inibitore di proteasi B;

e portato a volume con H₂O milliQ.



Figura 3.3: Contenitori sterili da 250 ml, contenenti i tessuti di pericardio da decellularizzare.

Un ruolo importante in questo passaggio è stato dato dagli inibitori di proteasi, affinché le proteasi rilasciate dalle cellule nel tessuto non digeriscano le proteine della ECM, preservando quindi quest'ultima dalla degradazione. La soluzione dell'inibitore di proteasi A ha contenuto 400 mM di fenilmetilsulfonyl fluoride e 1 M di N-Etilmaleimide; l'inibitore di proteasi B invece 200 mM di iodoacetammide e 1 M di benzamidina. Questi inibitori sono stati disciolti in DMSO. Il primo passaggio della decellularizzazione ha avuto una durata di 8 ore a 4° C, con i contenitori in continua

MATERIALI E METODI

agitazione tramite l'oscillatore a scuotimento orizzontale. Una volta terminato, è stato realizzato un lavaggio per tutta la notte (*overnight*) in soluzione ipotonica, in agitazione a 4° C.

Il secondo step, della durata di 8 ore, è stato costituito da:

- 1% Triton X-100;
- 0.5% Inibitore di proteasi A;
- 0.5% Inibitore di proteasi B;

il tutto portato a volume finale con H₂O milliQ. Alla fine delle 8 ore, è stato realizzato un lavaggio con una soluzione con 0.1% di Triton X-100 in H₂O milliQ, lasciandolo agire *overnight*. Sia il secondo passaggio che il conseguente lavaggio sono stati realizzati tenendo i tessuti da trattare in agitazione a 4° C.

Il terzo step è stato mirato a compiere un'azione ipertonica, avendo così una sequenza di soluzioni ipo/ipertoniche in grado di indurre uno shock osmotico, denaturare le proteine e lisare le membrane cellulari [109]. In questo caso, i reagenti sono stati i seguenti:

- 0.5 M NaCl;
- 1% Triton X-100.

Questa volta il raggiungimento del volume finale è stato compiuto con PBS, a differenza dei due step precedenti. Questo passaggio è stato effettuato due volte ed ha la durata di 8 ore ciascuno, in agitazione a 4° C.

Sono stati quindi seguiti due lavaggi, da 3 ore e mezza ciascuno. Entrambi prevedevano 0.1% di Triton X-100, ma mentre il primo è stato effettuato in H₂O milliQ, il secondo in PBS; inoltre, nell'ultimo lavaggio si è lasciato in agitazione a temperatura ambiente e non più a 4° C.

Il cambio della temperatura di agitazione è stato dettato dal successivo step, che prevede l'utilizzo del sodio colato, 10 mM in PBS (pH finale = 7.40), in due cicli da 8

MATERIALI E METODI

ore. Quest'ultimo gelifica a basse temperature, con il rischio che questa sostanza citotossica, dopo diffusione all'interno del tessuto trattato, vi rimanga intrappolata.

Terminato il doppio ciclo di sodio colato, sono stati eseguiti dei lavaggi dei pericardi trattati. Innanzitutto, ne sono stati fatti due in PBS da 90 minuti ciascuno, il primo a temperatura ambiente ed il secondo a 4° C. Poi, si è continuato con un risciacquo rapido da 30 minuti in soluzione fisiologica NaCl 0.9%; infine, si è proceduto con un doppio lavaggio in 10% di isopropanolo in soluzione fisiologica, sotto agitazione a 4° C, per 1 ora.

Uno step fondamentale, una volta compiuti i lavaggi, è quello che è avvenuto con l'ausilio della Benzonase™, endonucleasi aspecifica utilizzata per la digestione degli acidi nucleici residui nei tessuti decellularizzati. Prima di iniziare il trattamento, il pericardio è stato dapprima suddiviso in *punches* dal diametro di 8 mm tramite l'ausilio di puncher da biopsia (Kai Medical, Solingen, Germania), poi sottoposto ad un lavaggio *overnight* con buffer di equilibratura, composto da 50 mM di Tris(idrossimetil)amminometano cloridrato e 1mM di Cloruro di Magnesio (MgCl₂) disciolti in H₂O milliQ. La stessa Benzonase™, il giorno seguente, è stata disciolta nel buffer realizzato, in rapporto 100 µL/30 cm².

Il ciclo di Benzonase™ è stato realizzato in 24 ore ed è stato svolto per due volte consecutive, in agitazione a 37° C.

Completato il trattamento con Benzonase™, sono stati eseguiti due lavaggi di soluzione fisiologica ed infine i *punches* sono stati incubati per ulteriori 24 ore in una soluzione di antibiotici ed antimicotici, costituita da:

- 50 mg/L di Vancomicina (Fluka, Strasbourg, France);
- 80 mg/L di Gentamicina (Fluka, Strasbourg, France);
- 240 mg/L di Cifoxitina (Fluka, Strasbourg, France);
- 250 mg/L di Anfotericina B (EuroClone®, Milano, Italia);

disciolti in soluzione fisiologica. Come per il precedente step, le provette da 50 ml contenenti il tessuto sono rimaste in agitazione, a 37° C.

MATERIALI E METODI

Svolto questo passaggio, con ulteriori due lavaggi veloci da 30 minuti di semplice soluzione fisiologica, è avvenuto l'ultimo step, che prevede il trattamento con acido peracetico ad una concentrazione dello 0.05% in H₂O milliQ. Quest'acido presenta proprietà battericide, fungicide, virucide e sporicide, compiendo un'azione ossidante contro le eventuali contaminanti [126]. Questo step ha avuto una durata di 3 ore totali, in agitazione in stufa a 27° C.

Tutte le soluzioni sono state sterilizzate e degassate – ad eccezione dei primi due step, in quanto contenenti inibitori di proteasi – prima del loro utilizzo. Per la sterilizzazione è stato utilizzato un filtro *Vacuum Filter System* con un diametro dei pori di 0.22 µm (EuroClone®, Milano, Italia).

3.3 Quantificazione del DNA

La quantificazione del DNA nei campioni trattati con la procedura TRICOL è un passaggio fondamentale per analizzare la resa di decellularizzazione. Per la sua estrazione si è utilizzato il kit “DNeasy® Blood & Tissue” (Qiagen, Hilden, Germania) [129].

Dopo aver eseguito il protocollo, la quantificazione degli acidi nucleici presenti in concentrazione ng/µl è stata effettuata tramite l'ausilio di uno spettrofotometro (Nanodrop, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA). Come indicato da Crapo et al nel 2011 [109], affinché un tessuto risulti decellularizzato, la quantità di DNA presente deve essere al di sotto di una soglia di 50 ng/mg. Per poter confrontare le nostre misurazioni con quest'ultima, esse sono state normalizzate per il peso dei *punches*.

3.4 Trattamento con GA

Parallelamente alla procedura TRICOL, è avvenuto il trattamento con GA, per lo stesso numero di tessuti omogenei e disomogenei di pericardi suini prelevati per la decellularizzazione. In questo caso, la divisione in *punches* da 8 mm è avvenuta prima del trattamento, a differenza del processo analizzato nel paragrafo precedente.

Una volta sezionati i *punches* di pericardio nativo, sono stati inseriti in provette da 50 ml contenenti una soluzione con GA allo 0.625% in PBS. La percentuale per il fissativo è stata scelta in quanto è la stessa utilizzata per i sostituti valvolari bioprotetici più utilizzati clinicamente, tra cui quelle della Carpentier-Edwards [81].

Le provette sono state coperte da fogli di alluminio, al fine di proteggere i campioni dalla luce, e poste in un oscillatore rotante a temperatura ambiente, per 96 ore.

Una volta terminato il trattamento, i *punches* sono stati conservati a 4° C in una soluzione di penicillina-streptomina al 3% ed Anfotericina B allo 0.25% in H₂O milliQ, in attesa dei successivi trattamenti.

3.5 Induzione alla calcificazione e successiva quantificazione del calcio

Tutti i campioni trattati, sia quelli con glutaraldeide sia quelli con TRICOL, sono stati sottoposti al protocollo di induzione alla calcificazione *in vitro*. Questo importante passaggio è avvenuto in collaborazione con il Laboratorio di Biologia vascolare del Prof. Marcello Rattazzi, secondo un protocollo precedentemente pubblicato [119]. I *punches* pericardici diversamente trattati sono stati esposti per tredici giorni a DMEM addizionato con siero bovino fetale (FBS) al 50%; come controllo interno del modello, è stato utilizzato lo stesso mezzo di coltura senza aggiunte.

Al termine del trattamento pro-calcifico i campioni sono stati incubati per una notte in una soluzione di acido cloridrico (HCl) alla concentrazione 0.6 M per poter procedere

MATERIALI E METODI

alla quantificazione biochimica dell'indotta calcificazione. Il calcio estratto è stato poi quantificato utilizzando il metodo "o-cresolphtalein complexone" [119].

I dati ottenuti sono stati elaborati con l'ausilio del lettore di micropiastre ad assorbanza (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germania).

3.6 Analisi istologiche

Dopo il trattamento dei campioni, gli esami istologici sono utili a comprendere l'avvenuta decellularizzazione e a valutare gli effetti del trattamento di induzione alla calcificazione. Prima di eseguire le colorazioni, ogni campione pericardico diversamente trattato è stato precedentemente congelato con fumi di azoto ed OCT e conservato a -80° C. Successivamente è stato sezionato al criostato (Leica Microsystems, Buffalo Grove, USA), con spessore di 6 µm. Infine, le criosezioni sono state sottoposte a due colorazioni, ematossilina-eosina e von Kossa.

3.6.1 *Ematossilina - eosina*

L'ematossilina-eosina rappresenta uno degli esami istologici più utilizzati in ricerca e diagnostica. Come suggerisce il nome, essa prevede una bicromia, composta da una colorazione violacea per i nuclei ed i vari componenti acidi del citoplasma, dovuta dall'ematossilina, colorante basico, e da una colorazione rosacea per i tessuti basici, tra cui le fibre di collagene, a causa dell'eosina, reagente di contrasto al primo [130]. In questo caso per effettuare quest'istologia è stato utilizzato "H&E Staining Kit" della Bio-Optica (Bio-Optica, Milano, Italia), che fornisce un metodo rapido di colorazione per sezioni al criostato. Il protocollo prevede innanzitutto l'utilizzo di tre reagenti, rispettivamente l' "A" indica l'Ematossilina (30 secondi), il "B" una soluzione di viraggio (costituita da 5 gocce di reagente B in 50 ml di H₂O milliQ) ed infine il "C"

MATERIALI E METODI

l'eosina. Dopo questo passaggio, le criosezioni state disidratate attraverso una serie ascendente di alcoli ed infine Xilene.

Una volta terminato il protocollo, i campioni sono stati coperti con un vetrino copri-oggetto mediante l'utilizzo di un montante non acquoso "DPX Mountant for histology".

3.6.2 Von Kossa

La colorazione Von Kossa è ritenuta tra le analisi istologiche *gold standard* per valutare la calcificazione in un tessuto. Essa, infatti, evidenzia la possibile presenza di depositi di calcio: grazie al trattamento della sezione d'interesse con nitrato di argento (AgNO_3), avviene una reazione con il calcio nel tessuto, se presente. Una volta avvenuta la riduzione tramite raggi ultravioletti, in sede di reazione si forma un deposito marrone-nero.

Il protocollo utilizzato è composto dai seguenti step:

- asciugare le sezioni a temperatura ambiente;
- utilizzare la pap-pen "Dako pen" (Agilent, California, USA), per confinare le sezioni con un liquido idrorepellente, al fine di non disperdere i reagenti sul vetrino. Inoltre, si procede con l'isolamento di una sezione presente nel vetrino tramite pap-pen, per un controllo negativo della colorazione;
- due lavaggi con dH_2O per 5 minuti;
- appoggiare i vetrini sopra un foglio di alluminio, incubando con Nitrato d'Argento 1% (Titolchimica, Rovigo, Italia) per 20 minuti sotto raggi UV;
- lavaggio in dH_2O ;
- incubare in Sodio Tiosolfato (Bio-Optica, Milano, Italia) per 4 minuti, al fine di togliere il nitrato d'argento in eccesso;
- lavaggio in H_2O di fonte e poi in dH_2O ;
- incubare in Ematossilina di Harris per 20 secondi per contrastare l'eventuale materiale nucleare;
- lavaggio in H_2O corrente;

MATERIALI E METODI

- utilizzo del montante acquoso “Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium” per coprire la sezione con vetrino copri-oggetto.

3.8 Analisi microscopica ed elaborazione delle immagini

Per quanto riguarda le colorazioni ematossilina – eosina, le analisi sono state effettuate con un microscopio Nikon (Nikon Corporation, Tokyo, Giappone), mentre l’elaborazione delle immagini è avvenuta con il programma “NIS-Elements” della stessa ditta.

La valutazione delle istologie effettuate con Von Kossa è avvenuta con l’ausilio del microscopio Leica DMR (Leica Microsystems, Buffalo Grove, USA). Per elaborare le immagini è stato utilizzato il programma “Leica Application Suite”, versione 4.5.

3.8 Analisi statistiche

I risultati sono stati elaborati con l’ausilio di Microsoft Excel 2016 ed i dati quantitativi espressi come media \pm deviazione standard. Anche le analisi con il T-test, per valutare eventuali differenze statistiche significative, sono state condotte con lo stesso programma, impostando come soglia di significatività il valore $p=0.05$.

CAPITOLO 4

4. Risultati

In questo capitolo sono riassunti i risultati ottenuti durante questa ricerca. In particolare, è stata condotta un'analisi quantitativa del DNA presente nel tessuto decellularizzato e del calcio presente sia nel pericardio trattato con GA, sia in quello con TRICOL. Inoltre, sono state effettuate le analisi istologiche ematossilina-eosina e von Kossa, per avere informazioni sulla qualità degli *scaffold* pericardici dopo la decellularizzazione e valutare la distribuzione di eventuali depositi di calcio, la cui formazione è stata indotta dal modello di calcificazione *in vitro*.

4.1 Valutazione quantitativa della resa di decellularizzazione dei tessuti pericardici sottoposti a TRICOL

Dopo aver effettuato il protocollo TRICOL sulle varie regioni pericardiche, è stata condotta un'analisi del DNA presente nei *punches* decellularizzati, tramite spettrofotometro (Nanodrop, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA).

Per poter procedere alla quantificazione, è stato necessario prima pesare i *punches* asciutti di pericardio decellularizzato. Con bilancia analitica (Sartorius, Göttingen, Germania), sono state eseguite le seguenti pesature, considerando per ogni animale due misurazioni distinte di 2 pool di *punches* diversi tra loro (n=3 per ognuno):

- ARVP

Animale A1: - media = 21.675 mg;

- SD = \pm 1.760 mg;

Animale A2: - media = 21.330 mg;

- SD = \pm 1.527 mg;

Animale A3: - media = 21.350 mg;

RISULTATI

- SD = ± 2.913 mg;

- PRVP

Animale A1: - media = 23.690 mg;

- SD = ± 1.159 mg;

Animale A2: - media = 23.780 mg;

- SD = ± 1.343 mg;

Animale A3: - media = 22.145 mg;

- SD = ± 2.114 mg;

Il contenuto residuo di DNA nei campioni pericardici decellularizzati è riportato in Figura 4.1.

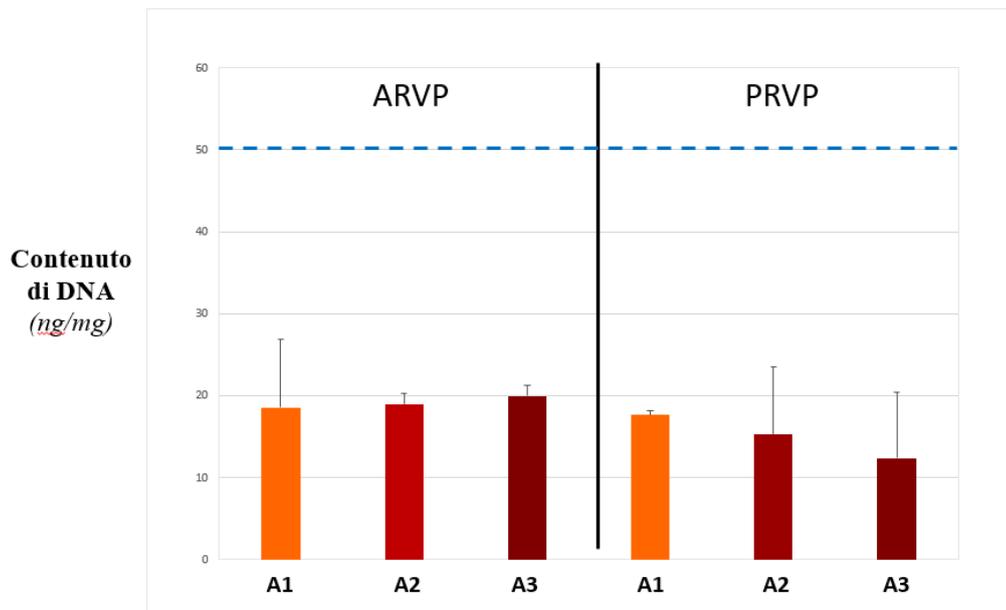


Figura 4.1: Quantificazione del DNA presente nel tessuto decellularizzato. A1=Animale 1; A2=Animale 2; A3= Animale 3. ARVP=Pericardio ventricolare anteriore destro; PRVP=Pericardio ventricolare posteriore destro; linea tratteggiata=50 ng/mg, valore soglia per il quale si definisce decellularizzato un tessuto, come indicato da Crapo et al [109].

Affinché un tessuto risulti decellularizzato, la quantità di DNA presente deve essere al di sotto di una soglia di 50 ng/mg, come indicato da Crapo et al nel 2011 [109].

RISULTATI

Come si può notare dalla Figura 4.1, la quantità di DNA è ben inferiore a questo valore per tutti e tre gli animali e per entrambi le parti di pericardio trattato, ARVP e PRVP, senza alcuna differenza statisticamente significativa. Ciò dimostra l'efficacia della decellularizzazione.

4.2 Valutazione quantitativa del calcio nei tessuti pericardici trattati

Dopo aver indotto la calcificazione attraverso il modello *in vitro* proposto da Rattazzi et al [119], come approfondito nel paragrafo 3.4, è stata condotta un'analisi quantitativa del calcio nei *punches* trattati.

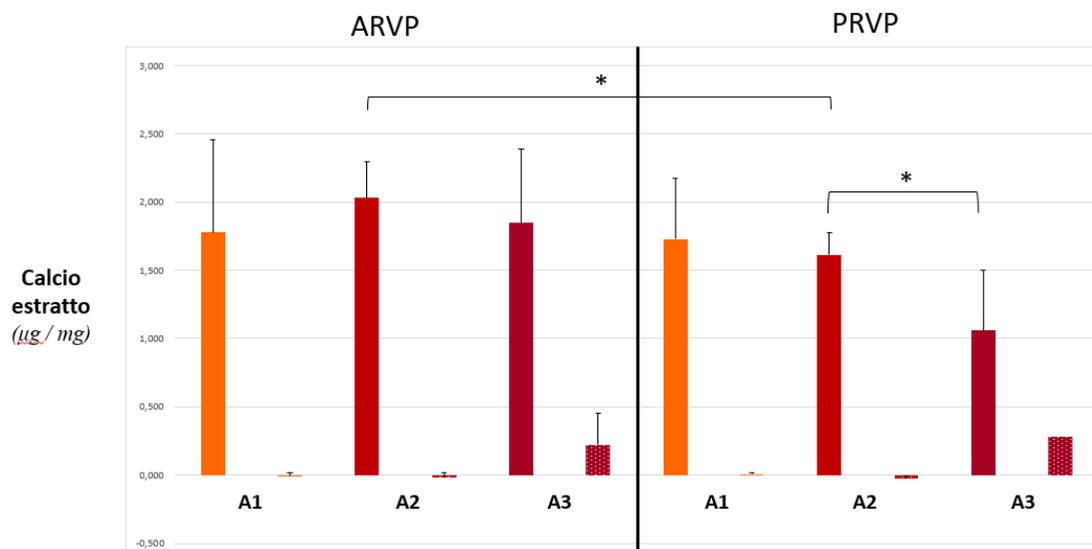


Figura 4.2: Calcio estratto dai punches di pericardio suino decellularizzato dopo 13 giorni di trattamento pro-calcifico. Per ogni animale, la prima colonna rappresenta i punches indotti alla calcificazione, la seconda (pattern di pallini bianchi) gli analoghi campioni di controllo non sottoposti a trattamento calcificante. A1=Animale 1; A2=Animale 2; A3= Animale 3. ARVP=Pericardio ventricolare anteriore destro; PRVP=Pericardio ventricolare posteriore destro; * = differenza significativa per $p < 0.05$.

RISULTATI

In Figura 4.2 è possibile osservare la deposizione di calcio per i campioni decellularizzati dopo l'induzione alla calcificazione, accompagnati dalla quantificazione di calcio effettuata su analoghi campioni di controllo non sottoposti al trattamento calcificante.

Riguardo ARVP, non è stata registrata alcuna differenza significativa tra i differenti animali, quindi con una quantificazione di calcio non statisticamente diversa. Per il PRVP, invece, è presente una differenza statisticamente significativa tra l'animale 2 e l'animale 3, mentre non sussiste differenza significativa in altre condizioni di confronto per la stessa parte. Comparando, invece, parti di pericardio diverse, ovvero ARVP e PRVP, provenienti dallo stesso animale, l'unica differenza significativa è registrata per l'animale 2.

In Figura 4.3, sono riportati i risultati sulla quantificazione di calcio effettuata sui *punches* trattati con GA, anche in questo caso accompagnati dall'analisi effettuata su analoghi campioni di controllo.

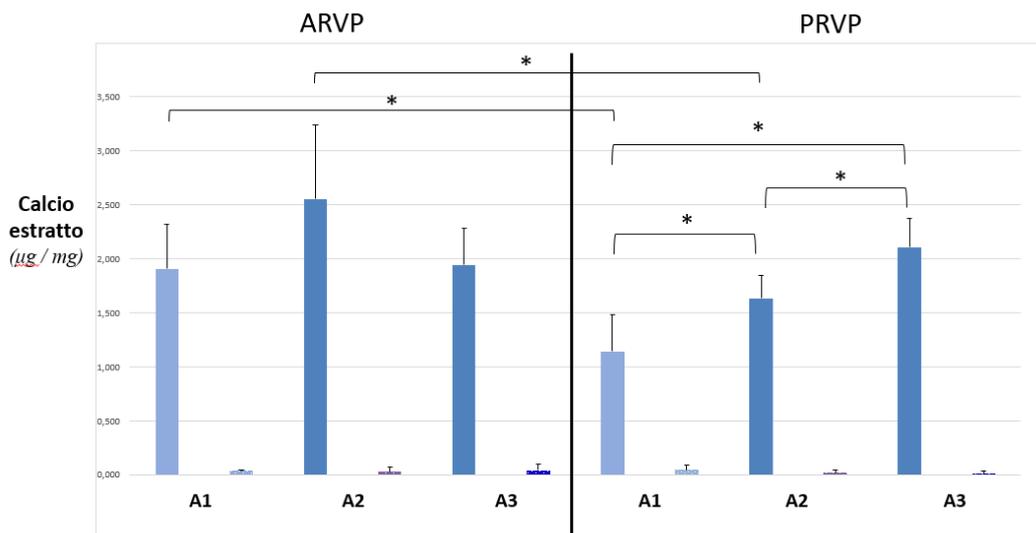


Figura 4.2: Calcio estratto dai *punches* di pericardio suino fissato con GA dopo 13 giorni di trattamento pro-calcifico. Per ogni animale, la prima colonna rappresenta i *punches* indotti alla calcificazione, la seconda (pattern di pallini bianchi) gli analoghi campioni di controllo non sottoposti a trattamento calcificante. A1=Animale 1; A2=Animale 2; A3= Animale 3. ARVP=Pericardio ventricolare anteriore destro; PRVP=Pericardio ventricolare posteriore destro; * = differenza significativa per $p < 0.05$.

RISULTATI

Anche in questo caso, non si registrano differenze statisticamente significative per il ARVP. Per quanto riguarda PRVP, invece, sono presenti differenze statisticamente significative tra tutti e tre gli animali. Analizzando, infine, parti di pericardio diverse dello stesso animale, si evidenziano delle differenze statisticamente significative negli animali 1 e 2. alcuna differenza significativa notata, invece, per l'animale 3.

In Figura 4.4, infine, è rappresentato un grafico di confronto della quantificazione di ARVP e PRVP sottoposti a TRICOL ed al suo controllo clinico GA, per evidenziare possibili differenze di propensione alla calcificazione osservate dopo l'applicazione del metodo di induzione. Dopo il trattamento pro-calcifico, non vi sono differenze statisticamente significative fra gli ARVP trattati con TRICOL e GA; similmente, si può osservare un analogo comportamento fra gli PRVP sottoposti agli stessi trattamenti.

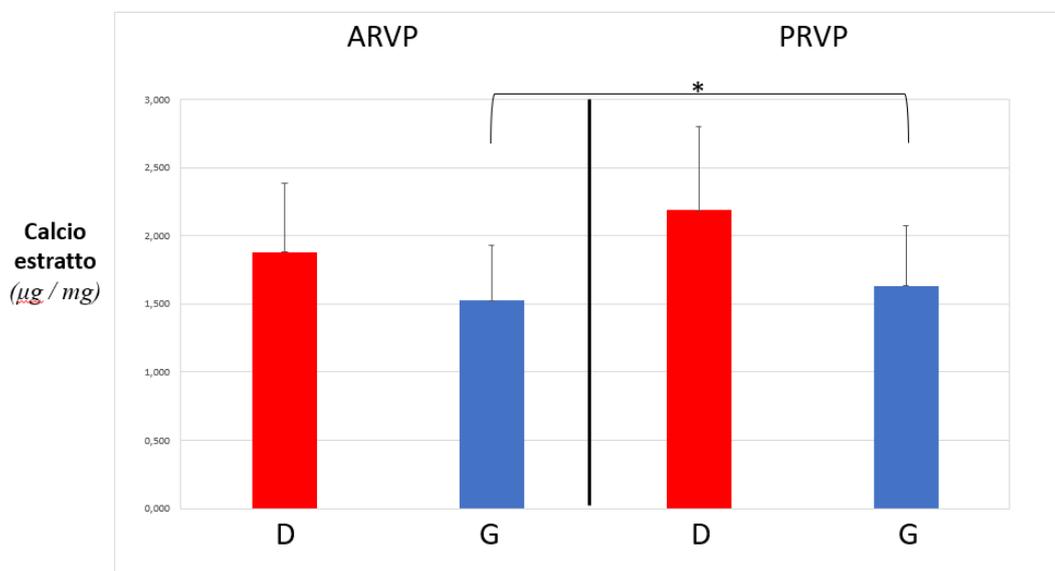


Figura 4.4: Grafico riassuntivo del calcio estratto nei tre animali dopo 13 giorni di trattamento pro-calcifico, dopo il trattamento con TRICOL ed il suo controllo clinico GA.

* = differenza statisticamente significativa, $p < 0.05$. D=Decellularizzati; G=Trattati con glutaraldeide; ARVP=Pericardio ventricolare anteriore destro; PRVP=Pericardio ventricolare posteriore destro; * = differenza significativa per $p < 0.05$.

RISULTATI

Inoltre, se dopo l'induzione alla calcificazione si comparano fra loro i pericardi decellularizzati provenienti da regioni diverse emerge che non vi è alcuna differenza statisticamente significativa, diversamente dagli analoghi campioni trattati con GA.

4.3 Analisi istologiche

In questo paragrafo sono riportati i risultati qualitativi delle istologie effettuate. Dopo aver elaborato le immagini delle colorazioni relativi a tutti gli animali ed aver constatato che presentano risultati omogenei tra i tre, è stato scelto di esporre in questo capitolo l'animale 1 come rappresentativo.

4.3.1 Ematossilina - eosina

In Figura 4.5 sono riassunti i risultati ottenuti con la colorazione ematossilina – eosina per i *punches* trattati con TRICOL e con GA; per ogni trattamento, alcuni *punches* sono stati poi indotti alla calcificazione per 13 giorni, mentre altri sono stati immersi in DMEM, quindi non inseriti in alcun ambiente pro-calcifico.

Utilizzando la tecnica ematossilina-eosina come metodo per il controllo della resa di TRICOL, è possibile dapprima notare che la decellularizzazione è andata a buon fine. Non si evidenzia, infatti, la presenza di nuclei sui tessuti decellularizzati e la ECM appare omogenea e ben preservata (Figura 4.5)

Per quanto riguarda invece le criosezioni di campioni trattati con GA, la presenza di nuclei è ben evidente. Inoltre, la ECM non si presenta omogenea come per i campioni trattati con TRICOL, probabilmente per un artefatto introdotto dalla combinazione di crosslinking chimico indotto da GA e dal successivo congelamento dei campioni necessario per la realizzazione delle indagini istologiche (Figura 4.5B).

RISULTATI

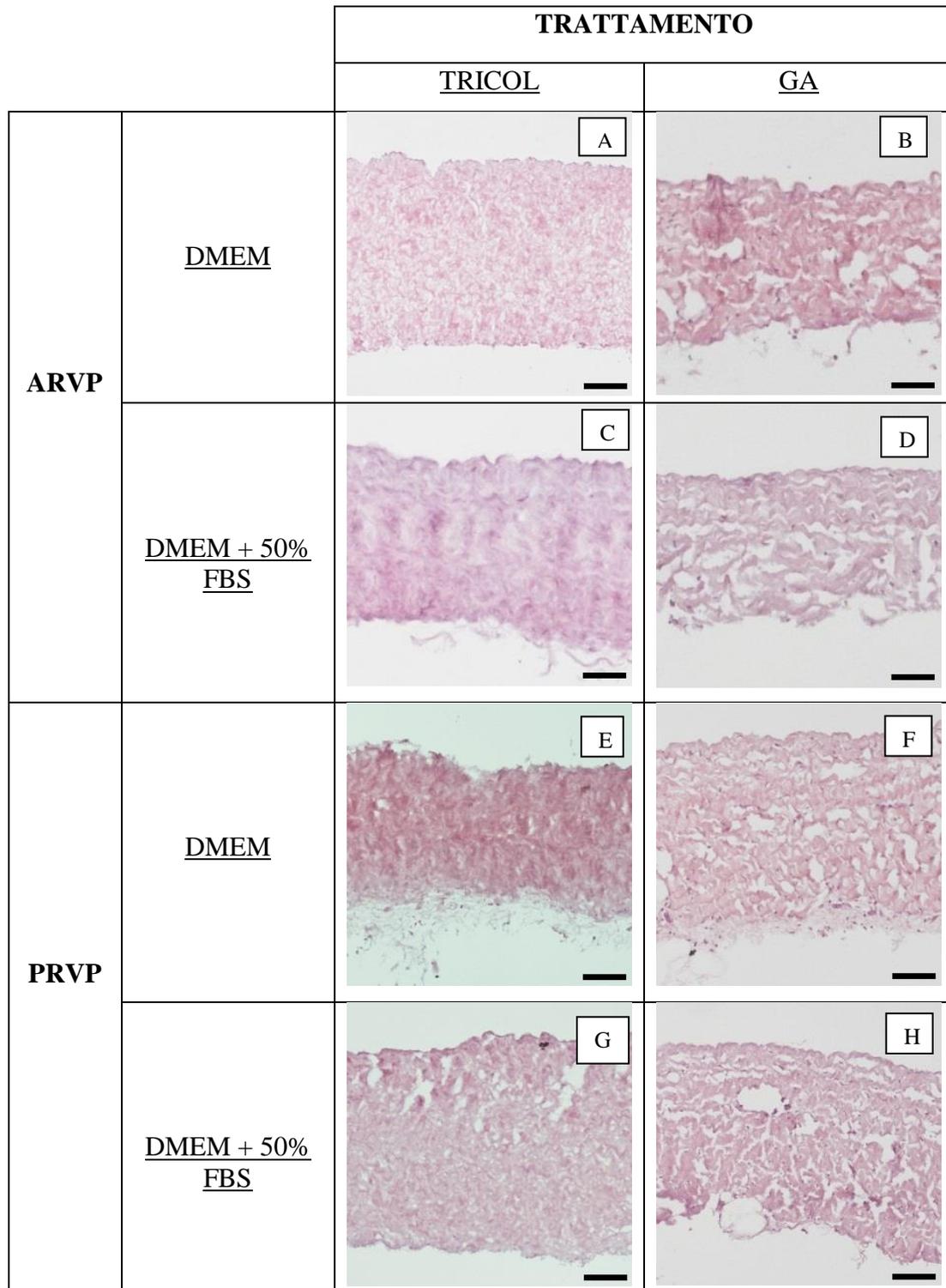


Figura 4.5: Immagini istologiche ematossilina-eosina: confronto tra decellularizzati e trattati con GA e, per ciascun trattamento, tra punches indotti alla calcificazione e quelli non sottoposti ad ambiente pro-calcifico. ARVP=Pericardio ventricolare anteriore destro; PRVP=Pericardio ventricolare posteriore destro; GA= glutaraldeide; Ingrandimento 10X, scale bar = 100 μ m.

RISULTATI

In particolare, si può osservare come i tessuti decellularizzati ARVP e PRVP non sottoposti all'ambiente calcificante abbiano preservato la ECM (Figura 4.5A e 4.5E).

Per quelli invece sottoposti al trattamento pro-calcifico, si notano varie fenestrature e stress degli scaffold, soprattutto per i PRVP (Figura 4.5G).

Per quanto riguarda i campioni trattati con GA, le differenze visive sono meno evidenti tra quelli indotti alla calcificazione e non, a causa anche della non omogeneità della ECM. Appare comunque un tessuto maggiormente danneggiato in quelli sottoposti ad ambiente pro-calcifico, in particolare in Figura 4.5D e H, dove la ECM si presenta fenestrata, disallineata e danneggiata in maggior misura rispetto agli altri campioni trattati con GA.

4.3.2 Von Kossa

La colorazione von Kossa ha evidenziato i depositi di calcio presenti dopo l'induzione alla calcificazione, i cui risultati ottenuti sono mostrati in Figura 4.6. Quest'analisi istologica è stata effettuata sia sui pericardi decellularizzati che trattati con GA; dopo essere stati sottoposti ad ambiente pro-calcifico o alla condizione controllo.

I depositi di calcio sono stati osservati solo nelle criosezioni dei campioni sottoposti a calcificazione indotta (Figure 4.5C, D, G, H), con alcune differenze visibili tra quelli trattati con TRICOL e quelli con GA. Innanzitutto, sono apparsi più visibili i depositi di calcio nei decellularizzati rispetto agli altri. Inoltre, il calcio presente sembrava avere una distribuzione maggiormente puntiforme in quelli trattati con TRICOL, mentre in quelli trattati con GA si sono osservati dei precipitati più grossi con pattern meno omogeneo.

RISULTATI

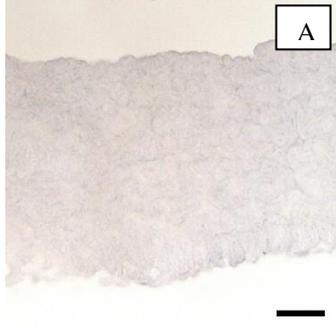
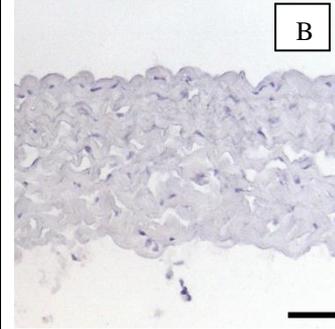
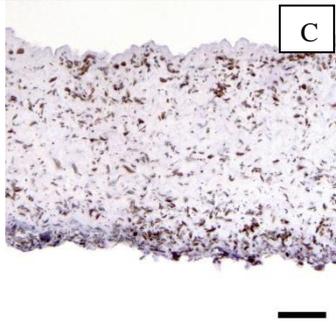
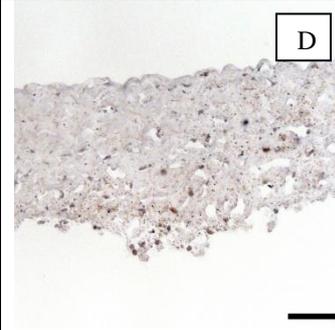
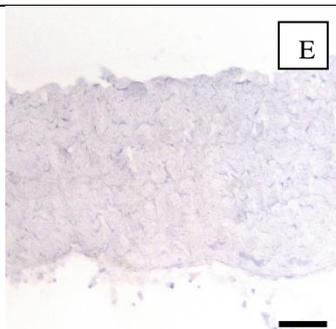
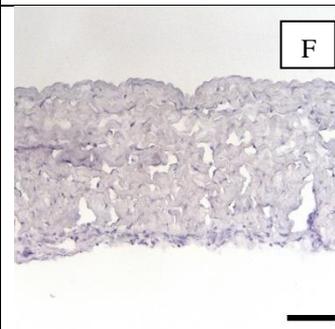
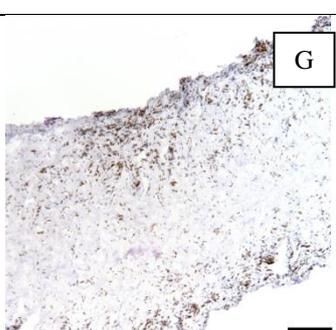
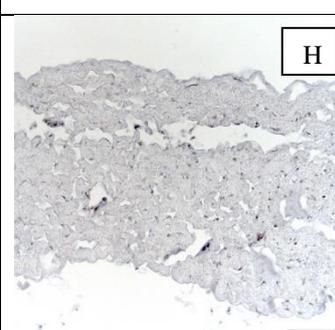
		TRATTAMENTO	
		TRICOL	GA
ARVP	DMEM	 A	 B
	DMEM + 50% FBS	 C	 D
PRVP	DMEM	 E	 F
	DMEM + 50% FBS	 G	 H

Figura 4.6: Immagini istologiche von Kossa: pericardi decellularizzati e trattati con GA, divisi, per ciascun trattamento, in indotti alla calcificazione e in non sottoposti ad ambiente pro-calcifico. ARVP=Pericardio ventricolare anteriore destro; PRVP=Pericardio ventricolare posteriore destro; GA= glutaraldeide; Ingrandimento 20X, scale bar = 100 μ m.

RISULTATI

In particolare, andando a confrontare ARVP e PRVP, erano maggiori le differenze tra i pericardi decellularizzati. Gli ARVP, infatti, si presentavano con depositi di calcio omogenei lungo tutta la criosezione (Figura 4.6C), mentre i PRVP, evidenziavano una maggior concentrazione di precipitati sulla parte esterna della fibrosa e sulla sierosa (Figura 4.6G). Diversamente dai pericardi trattati con GA, si sono notati depositi di calcio verosimilmente di maggior grandezza nella regione ARVP (Figura 4.6D) rispetto a quella PRVP (Figura 4.6H).

CAPITOLO 5

5. Discussione

Le patologie delle valvole cardiache sono oggetto di crescente attenzione nel mondo della medicina cardiovascolare, a causa del cambiamento della loro eziologia negli ultimi 50 anni e del considerevole aumento della popolazione mondiale che ne è affetta. Ad oggi, il 20% delle operazioni cardiovascolari interessa le valvole cardiache [37].

Le principali soluzioni cliniche prevedono la sostituzione della valvola patologica con protesi meccaniche o biologiche. Queste ultime sono costituite con tessuto xenogenico trattato con il cross-linkante GA, comunemente allo 0.625%. Esse vanno incontro a degenerazione calcifica mediamente dopo 10-15 anni dall'impianto. Secondo alcune ipotesi, tale patologia può avvenire a causa della devitalizzazione che la GA induce sul tessuto trattato. Nelle cellule morte, non più in grado di equilibrare il metabolismo del calcio al proprio interno, si innescano reazioni fra lo stesso ione libero e i fosfati dei residui cellulari, che causano la formazione di depositi di fosfato di calcio [92, 93]. La mineralizzazione si propaga poi al collagene, causando disfunzione nella performance valvolare e quindi il fallimento della bioprotesi impiantata. Un'altra ipotesi sostiene che, nonostante il rationale per l'utilizzo della GA sia la copertura degli xenoantigeni, in realtà il mascheramento non sia completo. Vengono infatti lasciati esposti alcuni xenoantigeni alpha-gal [99], che innescano una risposta immunitaria nel ricevente, ovvero una forma di rigetto iperacuto rallentata dal trattamento con GA. Inoltre, lo stress derivante dal ciclo cardiaco a cui è sottoposto l'impianto potrebbe causare la comparsa di fenestrature nella barriera costituita dal GA, con la possibilità di esporre progressivamente maggiori xenoantigeni. A conferma di questo, è stato osservato un aumento crescente della risposta immunitaria alpha-gal-specifica dal giorno 10 fino ad almeno 6 mesi successivi dall'impianto [97, 99, 131].

DISCUSSIONE

La ricerca quindi sta cercando di formulare il sostituto valvolare che superi queste limitazioni, secondo delle caratteristiche ideali ben definite da Dwight Harken già nel 1962 [75]. Nello sviluppo di nuove alternative terapeutiche per il trattamento della patologia valvolare, la decellularizzazione del tessuto da impiantare ricopre un ruolo di grande interesse biomedico.

Questa ricerca si inserisce proprio in questo scenario, ovvero nell'individuazione di alternative più valide agli attuali dispositivi utilizzati in clinica. In particolare, ha come obiettivo l'identificazione della regione pericardica decellularizzata più idonea per costruire sostituti valvolari avanzati per procedure di impianto sia tradizionale che transcateretere. Per meglio effettuare questa valutazione, si è proceduto a un confronto con il pericardio trattato con GA, che rappresenta il materiale di cui molte bioprotesi valvolari sono costituite.

Studi preliminari del gruppo di Medicina Rigenerativa Cardiovascolare, al cui interno il presente studio è stato svolto, hanno evidenziato come il pericardio non sia in realtà omogeneo in tutta la sua composizione. Infatti, esistono nel pericardio suino due regioni che si distinguono principalmente per la distribuzione delle fibre strutturali, ovvero la più omogenea, ARVP, e quella meno ordinata, PRVP. Queste diverse regioni sono state quindi sottoposte a decellularizzazione TRICOL. Nonostante le differenze iniziali, per entrambe la decellularizzazione è avvenuta con successo, rimuovendo le cellule residenti e preservando la ECM, così come evidenziato dalla quantificazione del DNA e dalle colorazioni istologiche eseguite.

Allo scopo di identificare la regione pericardica più resistente alla calcificazione, si è fatto uso di un modello di calcificazione *in vitro* in grado di simulare le condizioni fisiopatologiche di un paziente con alterato metabolismo del calcio e necessità di intervento di sostituzione valvolare [119]. Entrambi i pericardi ARVP e PRVP decellularizzati sono calcificati, come si evince dalla valutazione quantitativa del calcio, in modo non statisticamente dissimile. Il confronto con campioni nativi ottenuti da analoghe regioni, ma trattati con GA, non ha evidenziato alcuna differenza significativa nel quantitativo di calcio depositato.

DISCUSSIONE

Questo risultato è stato osservato inaspettatamente: il protocollo TRICOL, infatti, è già stato applicato per la formulazione di sostituti valvolari decellularizzati, che dopo 15 mesi nel modello sperimentale allogenico *in vivo* non sono andati incontro a mineralizzazione [132]. Inoltre, è attualmente utilizzato per la decellularizzazione di *allografts* valvolari aortici, che vengono impiantati nelle procedure chirurgiche di ricostruzione del tratto di flusso ventricolare destro in pazienti congeniti adulti: le valutazioni ecocardiografiche a tre anni dall'intervento sostitutivo non hanno evidenziato alcuna calcificazione.

Una possibile ipotesi per motivare questo risultato ottenuto *in vitro* si correla allo specifico tipo di modello utilizzato per l'induzione alla calcificazione, che come già sottolineato simula le peggiori condizioni cliniche in cui impiantare una bioprotesi biologica, ovvero un paziente in cui il metabolismo del calcio è alterato e vi è necessità di effettuare una sostituzione valvolare. Questo modello induce una calcificazione accelerata, portando alla mineralizzazione nel breve arco di 13 giorni anche il tessuto pericardico che rappresenta il controllo clinico, ovvero quello trattato con GA, che normalmente calcifica *in vivo* dopo 10-15 anni.

Un altro importante aspetto da considerare riguarda la diffusione del mezzo calcificante nei tessuti diversamente trattati. Ciò avviene in modo facilitato nel pericardio decellularizzato, più poroso dopo la rimozione cellulare, rispetto invece al trattato con GA, cioè un tessuto nativo devitalizzato in cui il cross-linkante ha costituito anche una barriera superficiale. Di conseguenza, in assenza di cellule del sangue, come i macrofagi che rilasciano enzimi litici e del normale stress a cui la valvola è sottoposta durante i cicli cardiaci, la barriera di GA si mantiene conservata. Inoltre, il modello usato non permette di riprodurre *in vitro* la possibile risposta immunitaria. Pertanto, potenzialmente si potrebbe aver sottostimato il fenomeno. Per meglio simulare una condizione *in vivo* attraverso un approccio *in vitro*, si potrebbe introdurre uno stretch meccanico del pericardio durante il condizionamento pro-calcifico. In aggiunta, si potrebbero aumentare il numero di campioni di pericardio trattati, in modo tale da poter convalidare i dati ottenuti con più ampi confronti statistici.

DISCUSSIONE

Alla valutazione istologica con la colorazione von Kossa, la deposizione di calcio non è omogenea fra ARVP e PRVP sottoposti a decellularizzazione. In particolare, la regione più ordinata dal punto di vista della distribuzione delle fibre e delle cellule native presenta anche un pattern più omogeneo di mineralizzazione. Un'ipotesi sulla differenza di omogeneità dei precipitati di calcio tra ARVP e PRVP trattati con TRICOL potrebbe proprio tenere conto della distribuzione cellulare e della maggiore porosità creatasi dopo rimozione delle cellule native con TRICOL. Infatti, se si considerano i campioni nativi, mentre in ARVP le cellule sono disposte in maniera omogenea lungo la *fibrosa* e la *sierosa* del pericardio, in PRVP si evidenzia una maggiore densità cellulare sulla *sierosa* e sulla parte esterna della *fibrosa*. Proprio secondo tale distribuzione, si osserva una maggior predisposizione alla calcificazione. Il calcio depositato, non diverso quantitativamente fra i tessuti decellularizzati e quelli trattati con GA, sembra invece essere differente nell'analisi qualitativa degli stessi campioni. I risultati della colorazione von Kossa, infatti, evidenziano una deposizione apparentemente maggiore di calcio nei decellularizzati rispetto a quelli trattati con GA. Questi discordanti risultati fra analisi quantitativa e qualitativa potrebbero essere dovuti al parziale mascheramento della GA, che ha prevenuto il legame per affinità del calcio al nitrato d'argento, reagente fondamentale nella colorazione von Kossa per evidenziare la mineralizzazione tissutale.

In conclusione, le informazioni ottenute da questo studio, seppur importanti, non permettono ancora di scegliere la regione più idonea fra ARVP e PRVP per la costruzione di una protesi biologica avanzata e più resistente alla calcificazione.

Per avere un quadro più completo, saranno quindi necessari ulteriori test *in vivo*, atti a verificare la propensione alla calcificazione nei modelli classici, come ad esempio nel sottocute di roditore, o ancor meglio in un grande animale in posizione ortotopica e interazione eterologa. In quest'ultima modalità, in effetti, la valutazione sarà più completa, in quanto il tessuto ingegnerizzato sarà a contatto con il sangue e potranno essere quindi valutate non solo la performance valvolare, ma anche la risposta immunologica, così da comprendere maggiormente il ruolo degli xenoantigeni nella calcificazione.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografia

- [1] L. Sherwood, *Fisiologia umana*, Prima ediz. Bologna, 2008.
- [2] G. Balboni, A. Bastianini, and E. Brizzi, *Anatomia Umana*, Terza Ediz. Milano, 2000.
- [3] S. Dalla Volta, L. Daliento, and R. Razzolini, *Malattie del Cuore e dei Vasi*, Terza ediz. Milano, 2005.
- [4] F. H. Netter, *Atlante di anatomia umana*, Quinta edi. Milano, 2014.
- [5] W. J. Germann and C. L. Stanfield, *Fisiologia*, Seconda Ed. 2007.
- [6] G. Slavich, *Elettrocardiografia Clinica*. 1997.
- [7] D. U. Silverthorn, *Fisiologia*, Terza Ediz. 2007.
- [8] D. H. Spodick, *The pericardium*. New York, 1997.
- [9] B. D. Hoit, “Anatomy and Physiology of the Pericardium,” *Cardiol Clin.*, pp. 481–490, 2017.
- [10] G. J. Tortora and D. Bryan, *Conosciamo il corpo umano*. 2009.
- [11] A. Bagno and C. Di Bello, *Biomateriali. Dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche*. 2016.
- [12] D. T. Simionescu and K. Nicholas, “The biosynthesis of proteoglycans and interstitial collagens by bovine pericardial fibroblasts,” *Exp. Cell Res.*, vol. 195, no. 1, pp. 171–176, 1991.
- [13] R. V Iozzo and L. Schaefer, “Proteoglycan form and function: A comprehensive

BIBLIOGRAFIA

- nomenclature of proteoglycans,” *Matrix Biol*, pp. 11–55, 2016.
- [14] S. Ricard-Blum, “The Collagen Family,” *Cold Spring Harb Perspect Biol*, pp. 1–19, 2011.
- [15] M. Mao, M. V. Alavi, C. Labelle-Dumais, and D. B. Gould, “Type IV Collagens and Basement Membrane Diseases: Cell Biology and Pathogenic Mechanisms,” *Curr. Top. Membr.*, vol. 76, pp. 61–116, 2015.
- [16] A. Pozzi, P. D. Yurchenco, and R. V Iozzo, “The nature and biology of basement membranes,” *Matrix Biol*, pp. 1–11, 2017.
- [17] W. A. Naimark, J. M. Lee, H. Limeback, and D. T. Cheung, “Correlation of structure and viscoelastic properties in the pericardia of four mammalian species.,” *Am. J. Physiol.*, vol. 263, no. 4 Pt 2, pp. H1095–H1106, 1992.
- [18] H. Wei, H. Liang, M. Lee, and Y. Huang, “Construction of varying porous structures in acellular bovine pericardia as a tissue-engineering extracellular matrix,” *Biomaterials*, vol. 26, pp. 1905–1913, 2005.
- [19] M. Faye *et al.*, “Order, Disorder, and Temperature-Driven Compaction in a Designed Elastin Protein,” *J. Phys. Chem. B*, 2018.
- [20] W. Pagel, *Le idee biologiche di Harley*, Prima ediz. Milano, 1979.
- [21] L. Da Vinci, “Folio 115 verso,” in *Corpus of the anatomical studies*, .
- [22] R. Pagliaro, *Osteopatia viscerale: Il sistema pneumofonatorio e cardiovascolare*. Milano, 2018.
- [23] F. Ancona *et al.*, “Multimodality imaging of the tricuspid valve with implication for percutaneous repair approaches,” *Heart*, pp. 1073–1081, 2017.
- [24] M. Y. Henein, M. Sheppard, J. Pepper, and M. Rigby, *Ecocardiografia clinica*.

BIBLIOGRAFIA

2006.

- [25] R. Dionigi, P. Cabitza, G. Carcano, and P. Castelli, *Chirurgia, basi teoriche e chirurgia generale*, Sesta Ediz. Milano, 2017.
- [26] G. D'Amati and C. Della Rocca, *Anatomia Patologica, La sistematica*, Seconda Ed. Milano, 2018.
- [27] B. Brazile *et al.*, "On the bending properties of porcine mitral, tricuspid, aortic, and pulmonary valve leaflets," *J. Long. Term. Eff. Med. Implants*, vol. 25, no. 1–2, pp. 41–53, 2015.
- [28] J. D. Deck and C. Virginia, "Endothelial cell orientation on aortic valve leaflets," *Cardiovasc. Res.*, 1986.
- [29] B. Imberti, "The Response of Endothelial Cells to Fluid Shear Stress Using a Co-Culture Model of the Arterial Wall The Response of Endothelial Cells to Fluid Shear Stress Using a Co-Culture Model of the Arterial Wall," *Endothelium*, vol. 3329, no. June, 2009.
- [30] J. T. Butcher and A. M. Penrod, "Unique Morphology and Focal Adhesion Development of Valvular Endothelial Cells in Static and Fluid Flow Environments," *Arter. Thromb Vasc Biol*, pp. 1429–1434, 2004.
- [31] B. Wu, Y. Wang, F. Xiao, J. T. Butcher, K. E. Yutzey, and B. Zhou, "Developmental Mechanisms of Aortic Valve Malformation and Disease," *Annu. Rev. Physiol.*, pp. 21–41, 2017.
- [32] F. J. Schoen, "Heart valve tissue engineering: quo vadis?," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 22, no. 5, pp. 698–705, 2011.
- [33] E. Rabkin, M. Aikawa, and J. R. Stone, "Activated Interstitial Myofibroblasts Express Catabolic Enzymes and Mediate Matrix Remodeling in Myxomatous

BIBLIOGRAFIA

- Heart Valves,” *Circ. Res.*, pp. 2525–2533, 2001.
- [34] L. Osman, M. H. Yacoub, N. Latif, M. Amrani, and A. H. Chester, “Role of Human Valve Interstitial Cells in Valve Calcification and Their Response to Atorvastatin,” *Circ. Res.*, pp. 547–552, 2006.
- [35] “Statistiche dell’organizzazione mondiale della sanità riguardo l’incidenza delle malattie vascolari nel mondo.” [Online]. Available: https://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/.
- [36] “Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by country and by Region, 2000-2016. Geneva, World Health Organization, 2018.” [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- [37] B. Iung and A. Vahanian, “Epidemiology of valvular heart disease in the adult,” *Nat. Rev. Cardiol.*, vol. 8, no. 3, pp. 162–172, 2011.
- [38] V. T. Nkomo, J. M. Gardin, T. N. Skelton, J. S. Gottdiener, C. G. Scott, and M. Enriquez-sarano, “Burden of valvular heart diseases: a population-based study,” *Lancet*, vol. 368, pp. 1005–1011, 2006.
- [39] M. Fathallah and R. A. Krasuski, “Pulmonic Valve Disease: Review of Pathology and Current Treatment Options,” *Curr Cardiol Rep*, 2017.
- [40] M. R. Abbolito, E. Adami, A. Alfieri, and M. Aloisi, *Enciclopedia medica italiana, volume 4*, Seconda ed. Firenze, 1975.
- [41] “The first survey programme initiated by the European Society of Cardiology about Valvular Heart Disease.” [Online]. Available: <https://www.escardio.org/Research/Registries-&-surveys/Observational-research-programme/Euro-Heart-Survey>.

BIBLIOGRAFIA

- [42] S. Y. Ho, "Structure and anatomy of the aortic root," *Eur. J. Echocardiogr.*, vol. 10, no. 1, pp. 3–10, 2009.
- [43] A. Tripathi, Y. Wang, and J. M. Jerrell, "Population - based treated prevalence , risk factors , and outcomes of bicuspid aortic valve in a pediatric Medicaid cohort," *Ann. Pediatr. Cardiol.*, vol. 11, pp. 119–124, 2018.
- [44] J. Timperley, R. Milner, A. J. Marshall, and T. J. Gilbert, "Quadricuspid Aortic Valves," *Clin. Cardiol.*, vol. 25, no. 2, pp. 548–552, 2002.
- [45] J. P. Simonds, "Congenital Malformations of the aortic and pulmonary valves," *Am. J. Med. Sci.*, vol. 166, no. 4, p. 584, 1923.
- [46] J. G. Monckeberg, "Der normale histologische Bau und die Sklerose der Aortenklappen," *Virchows Arch Pathol Anat Physiol*, vol. 176, pp. 472–514, 1904.
- [47] C. M. Otto *et al.*, "Prospective study of asymptomatic valvular aortic stenosis: clinical, echocardiographic, and exercise predictors of outcome.," *Circulation*, vol. 95, pp. 2262–2270, 1997.
- [48] S. Scardi and A. Cherubini, "È possibile prevenire la progressione della sclerosi e della stenosi valvolare aortica? Necessità di uno studio prospettico randomizzato," *Ital Hear. J Suppl*, vol. 6, pp. 403–312, 2005.
- [49] D. S. Owens and C. M. Otto, "Is it Time for a New Paradigm in Calcific Aortic Valve Disease?*" *JCMG*, vol. 2, no. 8, pp. 928–930, 2009.
- [50] B. R. Lindman *et al.*, "Calcific aortic stenosis," *Nat Rev Dis Prim.*, vol. 2, 2016.
- [51] O. A. Akinseye, A. Pathak, and U. N. Ibebuogu, "Aortic Valve Regurgitation: A Comprehensive Review," *Curr. Probl. Cardiol.*, vol. 43, no. 8, pp. 315–334, 2018.

BIBLIOGRAFIA

- [52] M. Sheppard, *Practical Cardiovascular Pathology*, Seconda ed. 2011.
- [53] S. C. Harb and B. P. Griffin, “Mitral Valve Disease : a Comprehensive Review,” *Curr Cardiol Rep*, 2017.
- [54] J. R. Carapetis, M. McDonald, and N. J. Wilson, “Acute rheumatic fever,” *Lancet*, vol. 366, pp. 155–168, 2005.
- [55] “Superior view of the mitral valve with stenosis.” [Online]. Available: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=849>.
- [56] G. S. Pressman, A. Agarwal, L. E. Braitman, and S. M. Muddassir, “Mitral Annular Calcium Causing Mitral Stenosis,” *Am. J. Cardiol.*, vol. 105, no. 3, pp. 389–391, 2010.
- [57] R. N. Ruckman and R. Van Praagh, “Anatomic types of congenital mitral stenosis: Report of 49 autopsy cases with consideration of diagnosis and surgical implications,” *Am. J. Cardiol.*, vol. 42, no. 5, pp. 592–601, 1978.
- [58] P. Luxereau, R. Dorent, G. De Gevigney, P. Bruneval, G. Chomette, and G. Delahaye, “Aetiology of surgically treated mitral regurgitation,” *Eur. Heart J.*, vol. 12, pp. 2–4, 1991.
- [59] A. C. Anyanwu and D. H. Adams, “Etiologic Classification of Degenerative Mitral Valve Disease: Barlow’s Disease and Fibroelastic Deficiency,” *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, vol. 12, pp. 90–96, 2007.
- [60] A. Vahanian *et al.*, “Linee guida per il trattamento delle valvulopatie (versione 2012),” *G. Ital. Cardiol.*, vol. 14, pp. 167–214, 2013.
- [61] B. Iung *et al.*, “A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe : The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease,” *Eur. Heart J.*, vol. 23, pp. 1231–1243, 2003.

BIBLIOGRAFIA

- [62] H. Baumgartner *et al.*, “Guidelines for the management of valvular heart disease,” *Eur. Heart J.*, vol. 38, pp. 2739–2786, 2017.
- [63] H. Baumgartner *et al.*, “Echocardiographic Assessment of Valve Stenosis : EAE / ASE Recommendations for Clinical Practice,” *J. Am. Soc. Echocardiogr.*, vol. 22, no. 1, pp. 1–23, 2009.
- [64] P. Lancellotti *et al.*, “European Association of Echocardiography recommendations for the assessment of valvular regurgitation . Part 1 : aortic and pulmonary regurgitation (native valve disease),” *Eur. J. Echocardiogr.*, pp. 223–244, 2010.
- [65] J. Rodés-cabau *et al.*, “Transcatheter Aortic Valve Implantation for the Treatment of Severe Symptomatic Aortic Stenosis in Patients at Very High or Prohibitive Surgical Risk Acute and Late Outcomes of the Multicenter Canadian Experience,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 55, no. 11, pp. 1080–1090, 2010.
- [66] M. Arsalan and T. Walther, “Durability of prostheses for transcatheter aortic valve implantation,” *Nat. Rev. Cardiol.*, vol. 13, pp. 360–367, 2016.
- [67] J. P. Jacobs *et al.*, “The Society of Thoracic Surgeons National Database 2017 Annual Report,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 104, no. 6, pp. 1774–1781, 2017.
- [68] T. European Association for Cardio-Thoracic Surgery, “Fourth EACTS adult cardiac surgical database report 2010,” Henley-on-Thames, UK, 2010.
- [69] C. Bouleti *et al.*, “Late Results of Percutaneous Mitral Commissurotomy up to 20 Years Development and Validation of a Risk Score Predicting Late Functional Results From a Series of 912 Patients,” *Circulation*, vol. 125, no. 17, pp. 2119–2127, 2012.
- [70] W. Edwards and L. Smith, “Aortic valve replacement with a subcoronary ball

BIBLIOGRAFIA

- valve.,” *Surg. Forum*, vol. 9, pp. 309–313, 1958.
- [71] S. J. Head, M. Celik, and P. Kappetein, “Clinical update Mechanical versus bioprosthetic aortic valve replacement,” *Eur. Heart J.*, vol. 38, pp. 2183–2191, 2017.
- [72] R. A. Nishimura *et al.*, “AHA / ACC Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease A Report of the American College of Cardiology / American Heart Association Task Force on Practice Guidelines,” *Circulation*, vol. 129, no. 23, pp. 521–643, 2014.
- [73] J. Dunning *et al.*, “Aortic valve surgery : Marked increases in volume and significant decreases in mechanical valve use — an analysis of 41 , 227 patients over 5 years from the Society for Cardiothoracic Surgery in Great Britain and Ireland National database,” *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 142, no. 4, p. 776–782.e3, 2011.
- [74] W. R. E. Jamieson *et al.*, “Carpentier-Edwards supraannular porcine bioprosthesis evaluation over 15 years,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 66, no. 6, pp. S49–S52, 1998.
- [75] D. E. Harken *et al.*, “Aortic valve replacement with a gaged ball valve,” *Am. J. Cardiol.*, vol. 9, no. 2, pp. 292–299, 1962.
- [76] V. L. Gott, D. E. Alejo, and D. E. Cameron, “Mechanical Heart Valves : 50 Years of Evolution,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 76, pp. 2230–2239, 2003.
- [77] J. Butany *et al.*, “Mechanical heart valve prostheses: identification and evaluation,” *Cardiovasc. Pathol.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–22, 2003.
- [78] G. Murray, “Aortic Valve Transplants,” *J. Vasc. Dis.*, vol. 11, no. 2, pp. 99–102, 1960.

BIBLIOGRAFIA

- [79] R. P. Lifton, “Essay Lasker Award to Heart Valve Pioneers,” *Cell*, vol. 130, no. 6, pp. 971–974, 2007.
- [80] J. P. Binet, C. G. Duran, A. Carpentier, and J. Langois, “Heterologous Aortic Valve Transplantation,” *Lancet*, vol. 286, no. 7425, p. 1275, 1965.
- [81] A. H. . Olivencia-Yurvati, R. T. Mallet, and J. R. B. Fernandez, “Developments in cardiovascular valve technology,” *Biomater. Devices Circ. Syst.*, pp. 89–122, 2010.
- [82] F. J. Schoen and K. Mendelson, “Heart Valve Tissue Engineering : Concepts , Approaches , Progress , and Challenges,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 34, no. 12, pp. 1799–1819, 2006.
- [83] J. Butany *et al.*, “Biological replacement heart valves Identification and evaluation,” *Cardiovasc. Pathol.*, vol. 12, no. 3, pp. 119–139, 2003.
- [84] Y. Kagawa, K. Tabayashi, T. Ito, and N. Sato, “Intermediate Mitral Valve Term Results of Isolated with Porcine and between Valve Replacement : Clinical Comparison and Glutaraldehyde-Preserved Xenograft Hemodynamic Hancock Valve Valve,” *Tohoku J. Exp. Med.*, vol. 150, no. 1, pp. 37–50, 1986.
- [85] G. L. Grunkemeier, W. R. E. Jamieson, D. C. Miller, and A. Starr, “Actuarial versus actual risk of porcine structural valve deterioration,” *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 108, no. 4, pp. 709–718, 1994.
- [86] J. Dunning, R. J. Graham, J. Thambyrajah, M. J. Stewart, S. W. H. Kendall, and S. Hunter, “Stentless vs stented aortic valve bioprostheses : a prospective randomized controlled trial,” *Eur. Heart J.*, vol. 28, pp. 2369–2374, 2007.
- [87] P. Singhal, A. Luk, and J. Butany, “Bioprosthetic Heart Valves : Impact of Implantation on Biomaterials,” *ISRN Biomater.*, pp. 1–14, 2013.

BIBLIOGRAFIA

- [88] “Organ Donation Statistics - U.S. Government Information on Organ Donation and Transplantation.” [Online]. Available: <https://www.organdonor.gov/statistics-stories/statistics.html>.
- [89] R. J. Johnson, L. L. Bradbury, and K. Martin, “Organ Donation and Transplantation in the UK V The Last Decade : A Report From the UK National Transplant Registry,” *Transplant. J.*, vol. 97, no. 1, pp. 1–27, 2014.
- [90] N. Piazza *et al.*, “Transcatheter aortic valve implantation for failing surgical aortic bioprosthetic valve: from concept to clinical application and evaluation (part 1).,” *JACC Cardiovasc. Interv.*, vol. 4, no. 7, pp. 721–732, 2011.
- [91] K. M. Dossche *et al.*, “Cryopreserved Aortic Allografts for Aortic Root Reconstruction : A Single Institution ’ s Experience,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 67, no. 6, pp. 1617–1622, 1999.
- [92] G. Thiene and M. Valente, “Anticalcification Strategies to Increase Bioprosthetic Valve Durability,” *J. Heart Valve Dis.*, vol. 20, no. 6, pp. 37–44, 2011.
- [93] F. J. Schoen and R. J. Levy, “Calcification of Tissue Heart Valve Substitutes : Progress Toward Understanding and Prevention,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 79, no. 3, pp. 1072–1080, 2005.
- [94] L. L. Demer, “Vascular calcification and osteoporosis : inflammatory responses to oxidized lipids,” *Int. J. Epidemiol.*, vol. 31, pp. 737–741, 2002.
- [95] F. J. Schoen and R. J. Levy, “Tissue Heart Valves : Current Challenges and Future Research Perspectives,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 47, no. 4, pp. 439–465, 1999.
- [96] D. P. Giddens, A. P. Yoganathan, and F. J. Schoen, “Prosthetic Cardiac Valves,” *Cardiovasc. Pathol.*, vol. 2, no. 3, pp. 167–177, 1993.

BIBLIOGRAFIA

- [97] K. Z. Konakci *et al.*, “Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery,” *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 35, no. 1, pp. 17–23, 2005.
- [98] U. Galili, “The alpha-gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy,” *Cell Biol.*, vol. 83, no. 6, pp. 674–686, 2005.
- [99] F. Naso *et al.*, “First quantification of alpha-Gal epitope in current glutaraldehyde-fixed heart valve bioprostheses,” *Xenotransplantation*, vol. 20, pp. 252–261, 2013.
- [100] J. Fisher and G. Davies, “Buckling in bioprosthetic valves,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 48, no. 1, pp. 147–148, 1989.
- [101] I. Vesely, J. Barber, and N. Ratliff, “Tissue damage and calcification may be independent mechanisms of bioprosthetic heart valve failure,” *J. Heart Valve Dis.*, vol. 10, no. 4, pp. 471–477, 2001.
- [102] I. Vesely, “Heart Valve Tissue Engineering,” *Circ. Res.*, vol. 97, pp. 743–755, 2005.
- [103] S. Brody and A. Pandit, “Approaches to Heart Valve Tissue Engineering Scaffold Design,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 83B, no. 1, pp. 16–43, 2007.
- [104] L. Dainese *et al.*, “Valvole cardiache ingegnerizzate : stato dell ’ arte,” *G. Ital. Cardiol.*, vol. 9, no. 3, pp. 167–172, 2008.
- [105] I. Alferiev *et al.*, “Prevention of polyurethane valve cusp calcification with covalently attached bisphosphonate diethylamino moieties,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 66A, no. 2, pp. 385–395, 2002.
- [106] W. Bensaid, J. . Triffitt, C. Blanchat, K. Oudina, L. Sedel, and H. Petite, “A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation,”

BIBLIOGRAFIA

- Biomaterials*, vol. 24, no. 14, pp. 2497–2502, 2003.
- [107] A. Ketchedjian *et al.*, “Recellularization of Decellularized Allograft Scaffolds in Ovine Great Vessel Reconstructions,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 79, pp. 888–896, 2005.
- [108] E. Rieder *et al.*, “Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells,” *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 127, no. 2, pp. 399–405, 2004.
- [109] P. M. Crapo, T. W. Gilbert, and S. F. Badylak, “An overview of tissue and whole organ decellularization processes,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 12, pp. 3233–3243, 2011.
- [110] S. F. Badylak, D. Taylor, and K. Uygun, “Whole-Organ Tissue Engineering : Decellularization and Recellularization of Matrix Scaffolds,” *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 13, pp. 27–53, 2011.
- [111] S. Hsiong, A. Huber, K. E. Kullas, S. Tottey, and S. F. Badylak, “The Effects of Processing Methods upon Mechanical and Biologic Properties of Porcine Dermal Extracellular Matrix Scaffolds,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 33, pp. 8626–8633, 2011.
- [112] A. M. Seddon, P. Curnow, and P. J. Booth, “Membrane proteins , lipids and detergents : not just a soap opera,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1666, pp. 105–117, 2004.
- [113] M.-T. Kasimir *et al.*, “Comparison of Different Decellularization Procedures of Porcine Heart Valves,” *Int. J. Artif. Organs*, vol. 26, no. 5, pp. 421–427, 2003.
- [114] FDA, “Use of International Standard ISO 10993-1, ‘Biological evaluation of medical devices: Evaluation and testing within a risk management process,’”

BIBLIOGRAFIA

2016. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/use-international-standard-iso-10993-1-biological-evaluation-medical-devices-part-1-evaluation-and>.
- [115] F. Langenbach and J. Handschel, "Effects of dexamethasone , ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro," *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 4, no. 117, 2013.
- [116] C. Vater, P. Kasten, and M. Stiehler, "Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 2, pp. 463–477, 2011.
- [117] K. J. Kelynack and S. G. Holt, "An In Vitro Murine Model of Vascular Smooth Muscle Cell," *Methods Mol. Biol.*, vol. 1397, pp. 209–220, 2016.
- [118] F. Ortolani *et al.*, "Pro-calcific responses by aortic valve interstitial cells in a novel in vitro model simulating dystrophic," *Ital. J. Anat. Embryol.*, vol. 115, no. 1/2, pp. 135–139, 2010.
- [119] M. Rattazzi *et al.*, "Extracellular pyrophosphate is reduced in aortic interstitial valve cells acquiring a calcifying profile: Implications for aortic valve calcification," *Atherosclerosis*, vol. 237, no. 2, pp. 568–576, 2014.
- [120] P. A. Price, H. H. June, N. J. Hamlin, and M. K. Williamson, "Evidence for a Serum Factor That Initiates the Re-calcification of Demineralized Bone," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 18, pp. 19169–19180, 2004.
- [121] P. A. Price, W. S. Chan, D. M. Jolson, and M. K. Williamson, "The Elastic Lamellae of Devitalized Arteries Calcify When Incubated in Serum Evidence for a Serum Calcification Factor," *Arter. Thromb Vasc Biol*, pp. 1079–1085, 2006.
- [122] D. Toroian and P. A. Price, "The essential Role of Fetuin in the Serum-Induced Calcification of Collagen," *Calcif. Tissue Int.*, vol. 82, no. 2, pp. 116–126, 2008.

BIBLIOGRAFIA

- [123] A. Go *et al.*, “Orthotopic replacement of the aortic valve with decellularized allograft in a sheep model,” *Biomaterials*, vol. 30, pp. 6240–6246, 2009.
- [124] A. Gastaldello, “Ingegneria Tissutale delle Valvole Cardiache : valutazione di metodi di decellularizzazione e semine cellulari su Pericardio Bovino e Porcino,” Università di Padova, 2012.
- [125] M. Spina *et al.*, “Isolation of intact aortic valve scaffolds for heart-valve bioprostheses : Extracellular matrix structure , prevention from calcification , and cell repopulation features,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 67A, no. 4, pp. 1338–1350, 2003.
- [126] C. Fidalgo *et al.*, “A Sterilization Method for Decellularized Xenogeneic Cardiovascular Scaffolds,” *Acta Biomater.*, vol. 67, pp. 282–294, 2018.
- [127] L. Iop *et al.*, “The influence of heart valve leaflet matrix characteristics on the interaction between human mesenchymal stem cells and decellularized scaffolds,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 25, pp. 4104–4116, 2009.
- [128] S. Zouhair *et al.*, “Preservation strategies for decellularized pericardial scaffolds for off-the-shelf availability,” *Acta Biomater.*, vol. 84, pp. 208–221, 2019.
- [129] Qiagen, “DNeasy® Blood & Tissue Handbook.” pp. 1–62, 2006.
- [130] A. De Santanna, F. Ghiotto, and A. Moretta, *Atlante di istologia*. 2016.
- [131] R. A. Manji, W. Lee, and D. K. C. Cooper, “Xenograft bioprosthetic heart valves : Past , present and future,” *Int. J. Surg.*, vol. 23, pp. 280–284, 2015.
- [132] L. Iop *et al.*, “Decellularized Allogeneic Heart Valves Demonstrate Self-Regeneration Potential after a Long-Term Preclinical Evaluation,” *PLoS One*, vol. 9, no. 6, 2014.

