

Università degli Studi di Padova

Scuola di Ingegneria

Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione

Dipartimento di Ingegneria Industriale

Corso di Laurea Magistrale in Bioingegneria

Tesi di Laurea Magistrale

Caratterizzazione meccanica del pericardio porcino e bovino per la realizzazione di protesi valvolari cardiache percutanee

Relatore: Ch.mo Prof. Andrea Bagno

Correlatore: Ch.mo Prof. Gino Gerosa

Correlatore: Dott.ssa Paola Aguiari

Laureando: Michele Fiorese

A.A. 2013/2014

14 Ottobre 2014

Indice

Abstract	ix
1 Introduzione	1
1.1 Il Pericardio	1
1.1.1 Collocazione del pericardio.....	2
1.1.2 Istologia del pericardio.....	3
1.1.3 Pericardio come biomateriale.....	7
1.2 Valvole cardiache	8
1.2.1 Malattie delle valvole cardiache.....	9
1.3 Protesi valvolari biologiche	10
1.4 Valvole percutanee	12
1.4.1 Tecniche di approccio percutaneo.....	14
1.4.2 Crimping.....	17
1.5 Caratterizzazione biomeccanica	18
2 Materiali e Metodi.....	23
2.1 Trattamento di decellularizzazione.....	23
2.1.1 TriTDoc.....	23
2.2 Preparazione dei campioni.....	27
2.3 Il sistema Bose ElectroForce®	28
2.3.1 Configurazione del sistema	29
2.3.2 WinTest.....	30
2.3.3 Prova di trazione.....	31
2.4 Analisi dei dati.....	34
2.4.1 Modulo elastico.....	35
2.4.2 Analisi Statistiche.....	37
3 Risultati e discussione	39

3.1	Prove UTS	39
3.1.1	Pericardio porcino	39
3.1.2	Pericardio bovino	40
3.1.3	Discussione risultati	40
3.2	Prove UTS con Precondizionamento.....	42
3.2.1	Pericardio porcino	43
3.2.2	Pericardio bovino	44
3.2.3	Discussione risultati	45
3.3	Il precondizionamento	47
3.3.1	Discussione risultati	50
4	Conclusioni.....	53
	APPENDICE.....	55
	Bibliografia.....	63

Elenco delle figure

<i>1.1: Schema degli strati del pericardio.</i>	<i>1</i>
<i>1.2: Immagine del sacco pericardico sezionato in modo da visualizzare il cuore sottostante.</i>	<i>3</i>
<i>1.3: Struttura del collagene.</i>	<i>6</i>
<i>1.4: Effetto elastico dell'elastina.</i>	<i>6</i>
<i>1.5: Le valvole cardiache.</i>	<i>8</i>
<i>1.6: Valvola aortica normale e stenotica.</i>	<i>9</i>
<i>1.7: Edward SAPIEN heart valve.</i>	<i>13</i>
<i>1.8: CoreValve ReValving System.</i>	<i>13</i>
<i>1.9: Tecniche di approccio percutaneo.</i>	<i>14</i>
<i>1.10: Una sala operatoria ibrida [Artis Zee (Siemens AG, Forchheim, Germany)].</i>	<i>15</i>
<i>1.11: A, valvola Edwards SAPIEN compressa nel catetere e poi riportata alla configurazione originale con l'uso di un palloncino. B, crimping machine.</i>	<i>17</i>
<i>1.12: Le tre fasi che caratterizzano la prova a trazione del pericardio.</i>	<i>19</i>
<i>2.1: Mappatura del pericardio porcino nativo: ARV, ventricolo anteriore destro; ALV, ventricolo anteriore sinistro; PRV, ventricolo posteriore destro; PLV, ventricolo posteriore sinistro.</i>	<i>27</i>
<i>2.2: A, celle di carico. B, grips.</i>	<i>28</i>
<i>2.3: A, configurazione per le prove di trazione. B, dettaglio della cella di carico in posizione. C, dettaglio del campione in posizione tra le morse.</i>	<i>29</i>
<i>2.4: Interfaccia del software WinTest.</i>	<i>30</i>
<i>2.5: Forma d'onda registrata dal displacement nella prova UTS.</i>	<i>31</i>
<i>2.6: Forme d'onda del displacement per le prove con: A, preconditionamento al 20%; B, preconditionamento al 30%; C, preconditionamento al 40%; D, preconditionamento al 50%.</i>	<i>32</i>
<i>2.7: Forma d'onda del displacement per la prova UTS con preconditionamento crescente ad 1 ciclo.</i>	<i>33</i>
<i>2.8: Forma d'onda del displacement per la prova UTS con preconditionamento crescente a 5 cicli.</i>	<i>34</i>
<i>2.9: Identificazione di UTS e Failure strain.</i>	<i>35</i>
<i>2.10: Rappresentazione pendenza della prova punto per punto.</i>	<i>36</i>

2.11: Calcolo moduli elastici E_1 e E_2 36

Elenco delle tabelle

<i>3.1: Prove UTS porcino nativo.</i>	<i>39</i>
<i>3.2: Prove UTS porcino decellularizzato.</i>	<i>39</i>
<i>3.3: Test di Student per le prove UTS per pericardio porcino.</i>	<i>39</i>
<i>3.4: Prove UTS bovino nativo.</i>	<i>40</i>
<i>3.5: Prove UTS bovino decellularizzato.</i>	<i>40</i>
<i>3.6: Test di Student per le prove UTS nel pericardio bovino.</i>	<i>40</i>
<i>3.7: Test di Student per le prove UTS per pericardio porcino e bovino nativo.</i>	<i>41</i>
<i>3.8: Test di Student per le prove UTS per pericardio porcino e bovino decellularizzato.</i>	<i>41</i>
<i>3.9: Test ANOVA per pericardio porcino con differenze per decellularizzazione (D) e pericardio (P).</i>	<i>42</i>
<i>3.10: Test ANOVA per pericardio bovino con differenze per decellularizzazione (D) e pericardio (P).</i>	<i>42</i>
<i>3.11: Prove UTS con preconditionamento per pericardio porcino nativo.</i>	<i>43</i>
<i>3.12: Prove UTS con preconditionamento per pericardio porcino decellularizzato.</i>	<i>43</i>
<i>3.13: Test di Student per le prove UTS con preconditionamento per pericardio porcino nativo e decellularizzato.</i>	<i>43</i>
<i>3.14: Prove UTS con preconditionamento per pericardio bovino nativo.</i>	<i>44</i>
<i>3.15: Prove UTS con preconditionamento per pericardio bovino decellularizzato.</i>	<i>44</i>
<i>3.16: Test di Student per le prove UTS con preconditionamento per pericardio bovino nativo e decellularizzato.</i>	<i>44</i>
<i>3.17: Test di Student per le prove UTS con preconditionamento per pericardio porcino e bovino nativi.</i>	<i>46</i>
<i>3.18: Test di Student per le prove UTS con preconditionamento per pericardio porcino e bovino decellularizzati.</i>	<i>46</i>
<i>3.19: Test ANOVA per prove UTS con preconditionamento per pericardio porcino con differenze per decellularizzazione (D) e pericardio (P).</i>	<i>46</i>
<i>3.20: Test ANOVA per prove UTS con preconditionamento per pericardio porcino con differenze per decellularizzazione (D) e cicli (C).</i>	<i>46</i>
<i>3.21: Test ANOVA per prove UTS con preconditionamento per pericardio bovino con differenze per decellularizzazione (D) e pericardio (P).</i>	<i>47</i>

3.22: Test ANOVA per prove UTS con preconditionamento per pericardio bovino con differenze per decellularizzazione (D) e cicli (C).	47
3.23: Test di Student tra prove UTS e prove UTS con preconditionamento per pericardio porcino nativo.	48
3.24: Test di Student tra prove UTS e prove UTS con preconditionamento per pericardio porcino decellularizzato.	48
3.25: Test di Student tra prove UTS e prove UTS con preconditionamento per pericardio bovino nativo.	48
3.26: Test di Student tra prove UTS e prove UTS con preconditionamento per pericardio bovino decellularizzato.	48
3.27: Prove UTS con 1 ciclo di preconditionamento e UTS con 5 cicli di preconditionamento per porcino nativo.	49
3.28: Prove UTS con 1 ciclo di preconditionamento e UTS con 5 cicli di preconditionamento per porcino decellularizzato.	49
3.29: Prove UTS con 1 ciclo di preconditionamento e UTS con 5 cicli di preconditionamento per bovino nativo.	49
3.30: Prove UTS con 1 ciclo di preconditionamento e UTS con 5 cicli di preconditionamento per bovino decellularizzato.	49
3.31: Test di Student tra prove UTS, prove UTS con 1 ciclo di preconditionamento e prove UTS con 5 cicli di preconditionamento per pericardio porcino nativo.	50
3.32: Test di Student tra prove UTS, prove UTS con 1 ciclo di preconditionamento e prove UTS con 5 cicli di preconditionamento per pericardio porcino decellularizzato.	50
3.33: Test di Student tra prove UTS, prove UTS con 1 ciclo di preconditionamento e prove UTS con 5 cicli di preconditionamento per pericardio bovino nativo.	51
3.34: Test di Student tra prove UTS, prove UTS con 1 ciclo di preconditionamento e prove UTS con 5 cicli di preconditionamento per pericardio bovino decellularizzato.	51
A 1: Prove UTS per pericardio porcino nativo.	55
A 2: Prove UTS per pericardio porcino decellularizzato.	55
A 3: Prove UTS per pericardio bovino nativo.	56
A 4: Prove UTS per pericardio bovino decellularizzato.	56
A 5: Prove UTS con preconditionamento per pericardio porcino nativo.	57
A 6: Prove UTS con preconditionamento per pericardio porcino decellularizzato.	58
A 7: Prove UTS con preconditionamento per pericardio bovino nativo.	59
A 8: Prove UTS con preconditionamento per pericardio bovino decellularizzato.	60

<i>A 9: Prove UTS con 1 ciclo di preconditionamento per pericardio porcino nativo.</i>	<i>61</i>
<i>A 10: Prove UTS con 1 ciclo di preconditionamento per pericardio porcino decellularizzato.</i>	<i>61</i>
<i>A 11: Prove UTS con 1 ciclo di preconditionamento per pericardio bovino nativo.</i>	<i>61</i>
<i>A 12: Prove UTS con 1 ciclo di preconditionamento per pericardio bovino decellularizzato.</i>	<i>62</i>
<i>A 13: Prove UTS con 5 cicli di preconditionamento per pericardio porcino nativo.</i>	<i>62</i>
<i>A 14: Prove UTS con 5 cicli di preconditionamento per pericardio porcino decellularizzato.</i>	<i>62</i>
<i>A 15: Prove UTS con 5 cicli di preconditionamento per pericardio bovino nativo.</i>	<i>62</i>
<i>A 16: Prove UTS con 5 cicli di preconditionamento per pericardio bovino decellularizzato.</i>	<i>62</i>

Abstract

Le malattie valvolari cardiache rappresentano, ad oggi, un'importante causa di mortalità nel mondo determinando circa 20000 decessi all'anno. In molti casi, l'unico approccio terapeutico è costituito dalla sostituzione delle valvole malate con protesi valvolari. In questa direzione, i più recenti dispositivi protesici valvolari cardiaci sono rappresentati dalle valvole cardiache percutanee: esse sono realizzate a partire da porzioni di pericardio bovino o porcino opportunamente trattato, sagomate e ancorate ad uno stent metallico espandibile.

Il presente lavoro di tesi ha come obiettivo la caratterizzazione delle proprietà del tessuto pericardico bovino e porcino, nativo e decellularizzato, per la produzione di protesi valvolari cardiache percutanee. I risultati delle prove di trazione uniassiale relativi ai diversi tessuti analizzati sono stati comparati, permettendo di formulare alcune ipotesi sul comportamento meccanico dei componenti della matrice extracellulare. In particolare, è stato possibile valutare gli effetti del preconditionamento sulla risposta meccanica del pericardio.

1 Introduzione

1.1 Il Pericardio

Il pericardio è una sacca fibrosa che avvolge il cuore e lo sostiene all'interno del mediastino, inguainando anche i tratti iniziali del tronco polmonare e dell'aorta, le terminazioni delle vene cave e delle vene polmonari (Figura 1.1).

La forma e le dimensioni del pericardio corrispondono a quelle del cuore, che si sposta al suo interno coerentemente con i cambiamenti volumetrici sisto-diastolici [1].

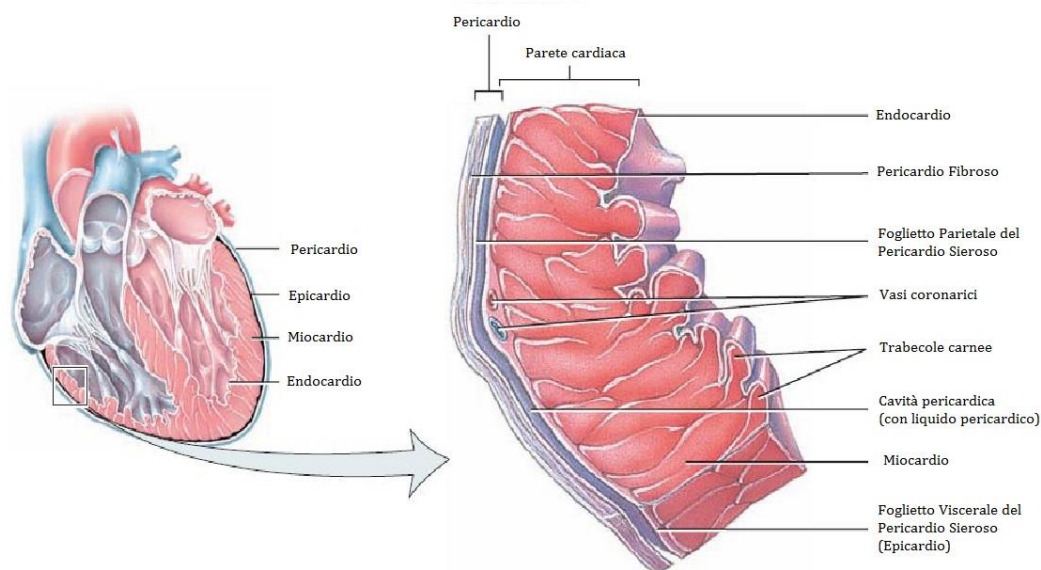


Figura 1.1: Schema degli strati del pericardio.

Si distinguono un *pericardio sieroso* e un *pericardio fibroso*. Il *pericardio sieroso* è un sacco chiuso che circonda il cuore. Si distinguono due foglietti: uno *parietale* e uno *viscerale*, in continuità solo a livello della zona di riflessione attorno ai grossi vasi alla base del cuore. Il *foglietto parietale* (*lamina parietalis*) è molto sottile e tappezza la faccia interna del

pericardio fibroso, da cui non può essere staccato. È costituito da un mesotelio a cellule piatte o cubiche, sostenute da un sottile strato di tessuto connettivo ricco di fibre collagene ed elastiche, direttamente in continuità con il tessuto proprio del pericardio fibroso. Il *foglietto viscerale (lamina visceralis)* non è altro che l'epicardio, che riveste esternamente il miocardio ed è formato da un unico strato di cellule mesoteliali isoprismatiche o appiattite, che riposano su un sottile strato di tessuto connettivo [2]. Questo strato è ricco di fibre elastiche ed è provvisto di una rete capillare e di numerosi elementi nervosi. Tra i due foglietti è presente una cavità (*cavum pericardii*), che in condizioni normali è praticamente virtuale. I due foglietti scivolano liberamente l'uno sull'altro grazie alla presenza di una piccola quantità di liquido pericardico (da 2 a 3 ml nell'uomo). Abitualmente, il liquido pericardico è chiaro, trasparente o è leggermente citrino e un po' vischioso. E' al tempo stesso prodotto e riassorbito dal mesotelio del pericardio sieroso.

Il *pericardio fibroso* è un sacco sottile, ma resistente e inestensibile, la cui forma riproduce praticamente quella del cuore. Presenta infatti una forma conica, leggermente appiattita da un lato all'altro nei mammiferi domestici, in senso dorso-ventrale nell'uomo. Il suo asse maggiore è orientato come quello del cuore, con l'apice diretto verso l'angolo sterno-diaframmatico e con la base che avvolge i grossi vasi, arteriosi e venosi. Il suo colore è biancastro o madreperlaceo. La faccia interna di questa lamina fibrosa si collega direttamente con lo strato di sostegno della lamina parietale del pericardio sieroso, dal quale non può essere separata. Al contrario, la sua faccia esterna è rivestita da *epipericardio* ed è unita alla lamina mediastinica della pleura, mediante un sottile strato di tessuto connettivo lasso, che in certi punti diviene adiposo, permettendone così la separazione tramite dissezione.

Il foglietto parietale del pericardio sieroso, il pericardio fibroso e l'epipericardio, insieme, formano il cosiddetto *pericardio parietale* [2].

1.1.1 Collocazione del pericardio

Nell'uomo, il sacco pericardico aderisce, mediante una superficie relativamente larga, direttamente al versante ventrale del diaframma. Quest'unione avviene tramite tessuto connettivo lasso a livello periferico, mentre diviene una connessione intima nella zona centrale, dove le formazioni fibrose si fondono (Figura 1.2).

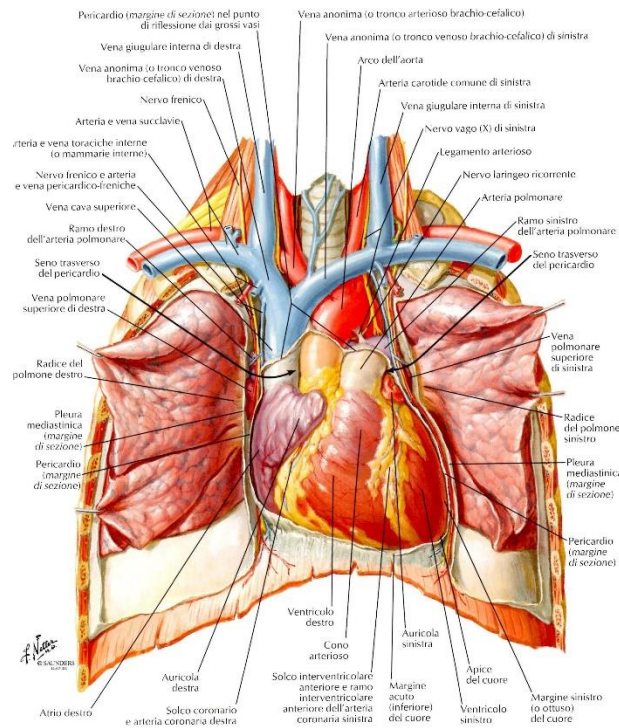


Figura 1.2: Immagine del sacco pericardico sezionato in modo da visualizzare il cuore sottostante [3].

Nei mammiferi domestici, invece, il pericardio rimane separato dal diaframma mediante una stretta parte del mediastino caudale, nel quale è presente il legamento feno-pericardico, più o meno distinto a seconda della specie e dell'individuo. Inoltre, nell'uomo il pericardio è unito allo sterno soltanto mediante due brevi legamenti sterno-pericardici, superiore e inferiore [4]. Questi legamenti hanno equivalenti solo nei ruminanti (bovini) e nel maiale. Infine, tralci fibrosi accompagnano i grossi vasi (arteriosi e venosi) unendo in modo efficace la base del cuore e il pericardio alle pareti e agli organi toracici. In questo modo, il cuore si trova sospeso nella regione mediastinica media in modo solido, ma al tempo stesso elastico, fissato allo sterno, al diaframma e alla colonna vertebrale.

1.1.2 Istologia del pericardio

Il pericardio parietale, come detto sopra, è costituito da tre strati:

1. lo *strato sieroso*, il più interno che guarda la cavità pericardica, formato da cellule mesoteliali;
2. lo *strato fibroso*, intermedio, formato da tessuto connettivo;
3. l'*epipericardio*, il più esterno [4].

Spesso ci si riferisce al pericardio parietale con il termine “pericardio”, anche se quest'ultimo comprenderebbe più propriamente anche il foglietto viscerale sieroso (epicardio). Fatto questo

chiarimento, d'ora in poi si userà il termine “pericardio” in riferimento al solo pericardio parietale.

L'*epipericardio* analogo al rivestimento mesoteliale esterno della pleura parietale, è formato da uno strato di cellule pavimentose dotate di microvilli.

Lo *strato sieroso* è tappezzato da cellule mesoteliali organizzate a formare un epitelio pavimentoso semplice. Le cellule mesoteliali hanno una forma esagonale o poligonale, con un rapporto nucleo/citoplasma piuttosto ampio. La loro superficie luminale, che guarda la cavità pericardica, è ricoperta di microvilli, più o meno lunghi quanto l'altezza delle cellule nel pericardio bovino e porcino, molto più corti, invece, nel pericardio umano. Alcune cellule possono inoltre presentare ciglia sulla loro superficie, a seconda delle condizioni fisiologiche in vivo [4].

Lo *strato fibroso*, infine, è costituito da tessuto connettivo denso in cui si identificano una componente cellulare propria (fibroblasti) e una matrice extracellulare (ECM) [6]. I *fibroblasti* sono le cellule principali dei tessuti connettivi. Non hanno una forma ben definita ma spesso si presentano allungate con alcuni prolungamenti laterali. Sintetizzano e secernono tutti i componenti della ECM: collagene, proteoglicani, glicoproteine ed i componenti macromolecolari delle fibre elastiche. Queste cellule sembrano disporsi lungo le fibre collagene rimodellandole ed organizzando tutta la struttura tridimensionale tissutale, hanno numerosi mitocondri ed un reticolo endoplasmatico liscio e rugoso molto sviluppato. Il citoscheletro di queste cellule è molto ben organizzato allo scopo di rendere efficiente l'esocitosi delle numerose molecole per la formazione della ECM. I fibroblasti del pericardio sintetizzano principalmente collagene di tipo I e III [6].

La ECM oltre alla funzione di sostegno svolge anche un ruolo fondamentale nella modulazione della proliferazione, del differenziamento e dell'orientamento cellulare, influenzando il mantenimento dell'architettura tissutale e gli scambi metabolici fra i vari distretti. Nei tessuti connettivi fibrosi densi a funzione meccanica, come il pericardio, l'estensione della ECM è generalmente più abbondante della componente cellulare e la circonda completamente determinando così le proprietà fisiche del tessuto stesso. Nella ECM si distinguono due componenti principali:

- la sostanza fondamentale amorfa, che permette la diffusione delle sostanze nutrienti e dei cataboliti;
- le proteine fibrillari (collagene, elastina), responsabili dell'elasticità e della resistenza meccanica del tessuto [7].

Sostanza fondamentale amorfa

La sostanza fondamentale amorfa è un gel altamente idratato che regola gli scambi di nutrienti e cataboliti tra sangue e tessuto e funge da filtro selettivo nel dirigere la migrazione cellulare attraverso la ECM; è omogenea e trasparente. Le due classi di macromolecole che la compongono sono i *proteoglicani* (PGs) e le *glicoproteine*.

I PGs sono complesse strutture molecolari costituite da un asse di ialuronato su cui, ogni 40 nm circa, si inseriscono delle unità proteiche, legate in modo non covalente. Ogni proteina, a sua volta, lega covalentemente a sé dei glicosamminoglicani (GAGs), molecole molto lunghe in cui si ripetono unità disaccaridiche legate insieme a formare macromolecole lineari [8,9]. I GAGs presentano un'elevata concentrazione di cariche negative e una spiccata idrofilicità. Sono quindi in grado di assorbire grandi quantità di acqua, assolvendo ad un importante ruolo meccanico e biologico. In soluzione assumono una conformazione a spirale, conferendo al tessuto plasticità e resistenza alla compressione [10]. Inoltre, i GAGs sono capaci di legare i fattori di crescita e le citochine, influenzando funzione e sopravvivenza cellulare [11]. Nel pericardio sono relativamente scarsi e i più rappresentati sono il *condroitin solfato* ed il *dermatan solfato*. Nella sostanza fondamentale amorfa si trovano anche glicoproteine quali *laminina* e *fibronectina*. La *fibronectina* (Fn) è una glicoproteina strutturale dimerica, che esiste sia in forma solubile che in forma tissutale. La Fn è seconda solo al collagene per quantità nella ECM. È particolarmente rappresentata nella sottomucosa, nella membrana basale e nel tessuto interstiziale. Contiene specifici domini di legame per gli altri componenti della ECM e per le proteine transmembrana delle cellule, svolgendo un ruolo centrale nell'adesione e migrazione cellulare. La *laminina* è un'altra proteina di adesione della ECM, localizzata soprattutto a livello della membrana basale. È uno dei fattori più importanti nella differenziazione, migrazione, crescita e adesione delle cellule epiteliali alla membrana basale, da cui discende la sua importanza durante lo sviluppo embrionale [12].

Collagene

Attualmente si conoscono una ventina di tipi di collagene geneticamente e immunologicamente distinti. I collagene interstiziali di tipo I e III sono presenti nel tessuto pericardico. Il collagene IV, assieme alla laminina e ai PGs, contribuisce alla formazione di aggregati laminari quali le membrane basali. La caratteristica peculiare di una tipica molecola di collagene è la struttura a tripla elica di catene proteiche (catene α , ognuna composta da circa 1000 amminoacidi) contenenti sequenze regolarmente ripetute di Gly-X-Y, dove X e Y sono solitamente rappresentate da prolina, idrossiprolina, idrossilisina e alanina. La molecola

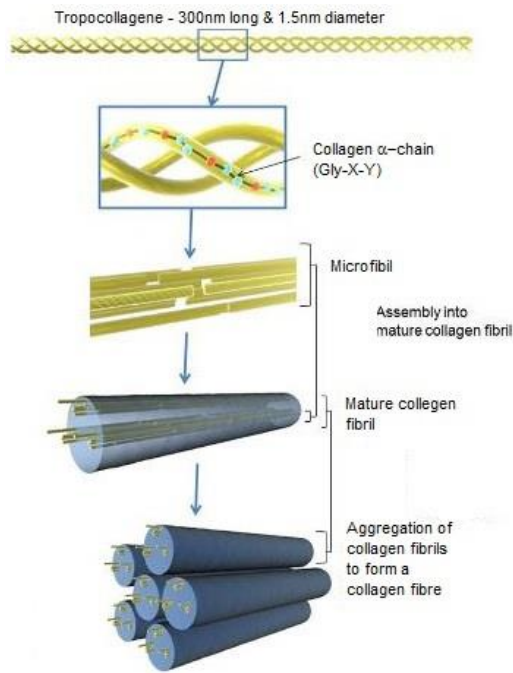


Figura 1.3: Struttura del collagene.

che ne risulta, detta tropocollagene, raggiunge una lunghezza di circa 300 nm e un diametro di 1.5 nm [13]. Le unità di tropocollagene si associano testa-coda e parallelamente tra loro a formare fibrille di collagene (40-200 nm di diametro e lunghe centinaia di micrometri). Generalmente le fibrille si aggregano lateralmente e longitudinalmente a formare le fibre collagene che poi si associano in fasci più o meno ondulati, di spessore variabile. In ogni fascio, le singole fibre collagene sono parallele tra loro [14] (Figura 1.3). Nel pericardio bovino la componente collagenica è per il 90% di tipo I e per il restante 10% di tipo III, mentre nel porcino

la concentrazione è rispettivamente 80% e 20% [15].

Elastina

L'elastina è un componente molto importante del tessuto connettivo e del pericardio nello specifico, dove è presente in quantità pari al 5-6% [16]. È una proteina fibrosa idrofobica e non glicosilata di 830 amminoacidi (72 kDa), che è ricca di prolina e glicina come il collagene ma, a differenza di quest'ultimo, contiene poca idrossiprolina ed è priva di idrossilisina. Viene sintetizzata e secreta nella ECM dai fibroblasti elastogenici sotto forma di tropoelastina, un precursore che si organizza con legami covalenti (*cross-link*) in una struttura molecolare altamente polimerizzata e casuale, dando origine a fibre. Le

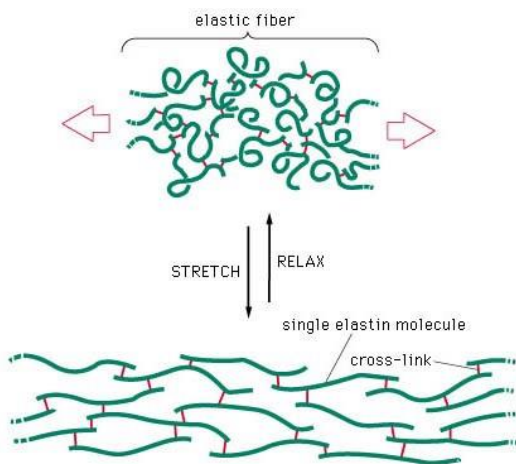


Figura 1.4: Effetto elastico dell'elastina.

fibre elastiche sono composte per più del 90% da una porzione apparentemente amorfa costituita da elastina e per il restante 10% da microfibrille (di diametro 10-12 nm), costituite dalla proteina microfibrillina e da una glicoproteina associata, la MAGP (glicoproteina associata alle microfibrille). Le fibre elastiche del tessuto subiscono modificazioni durante la vita dei mammiferi superiori: sono meno densamente distribuite proporzionalmente all'età

dell'individuo [17]. La presenza di elastina, assieme alle fibre collagene ed ai PGs, contribuisce all'architettura tissutale e consente ai tessuti, come il pericardio, di recuperare le dimensioni originali dopo l'allungamento (Figura 1.4).

Membrana basale

La membrana basale (MB) è una lamina di matrice extracellulare che separa gli epitelii dal tessuto connettivo. Nel caso del pericardio, la membrana basale separa il mesotelio della sierosa parietale dal suo foglietto fibroso. La MB è prodotta dalle stesse cellule che vi risiedono, e modula l'adesione, il differenziamento, la morfogenesi, la divisione cellulare e la motilità cellulare nonché lo scambio selettivo di molecole tra le cellule ed il fluido interstiziale.

1.1.3 Pericardio come biomateriale

Il pericardio di vari mammiferi (bovino, porcino, ovino ed umano) è un tessuto ampiamente utilizzato sia a scopo chirurgico che sperimentale. In ambito neurochirurgico, per esempio, il pericardio bovino ed ovino sono impiegati per la riparazione della dura madre in seguito a patologie delle meningi o a traumi di natura chirurgica/meccanica [18]; negli interventi di tracheoplastica infantile è utilizzato allo scopo di correggere l'anomala saldatura degli anelli tracheali cartilaginei [19]. Inoltre, nella chirurgia maxillo-facciale, il pericardio bovino consente la ricostruzione del pavimento orbitario nella regione orbito-zigomatica, in seguito a fratture, in virtù del suo buon adattamento al sito di impianto [20]. Altri ambiti chirurgici in cui è utilizzato sono la chirurgia oftalmica ed otorinolaringoiatrica.

L'ambito cardiocirurgico è però quello in cui vi è il maggior impiego del tessuto pericardico. Negli interventi su pazienti pediatrici con cardiopatie congenite, il *patch* pericardico è utilizzato per riparare il setto interventricolare o interatriale, separando così il circolo sistemico (gestito dal ventricolo sinistro) da quello polmonare (gestito dal ventricolo destro) [21]. In modo simile, il *patch* pericardico consente anche la correzione chirurgica di anomalie delle arterie coronarie [22] e la riparazione del setto interventricolare dopo rottura post-infartuale. Inoltre, in ambito cardiovascolare, è utilizzato per la costruzione dei lembi valvolari di bioprotesi valvolari cardiache (tradizionali e percutanee).

Attualmente, la collaborazione tra cardiocirurghi, cardiologi ed esperti di biomateriali ha portato allo sviluppo di valvole prostetiche per impianti percutanei la cui produzione è basata sull'utilizzo di pericardio. Grazie alla sua composizione ricca di fasci di collagene e fibre di

elastina, il pericardio dimostra una resistenza a stress meccanici relativamente alta, comparabile con quella dei lembi delle valvole cardiache native. Sono prese in considerazione per questo utilizzo diverse specie di animali: oltre al tessuto umano, sono stati caratterizzati maggiormente i pericardi bovino e porcino ma sono stati valutati anche tessuti provenienti da cani, pecore e struzzi [22].

1.2 Valvole cardiache

Il cuore ha quattro camere (atrio destro e ventricolo destro, atrio sinistro e ventricolo sinistro) e quattro valvole (tricuspide, polmonare, mitrale e aortica). Le valvole cardiache regolano il flusso del sangue all'interno del cuore. Sono appendici di tessuto fibroso, rivestite da endocardio, che controllano il passaggio del sangue attraverso gli orifizi che collegano gli atri con i ventricoli ed i ventricoli con aorta e arteria polmonare (Figura 1.5).

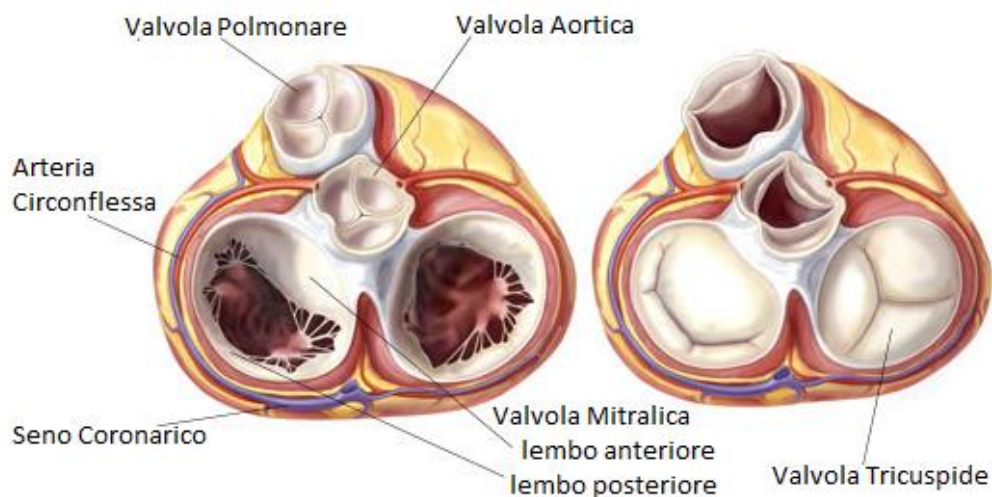


Figura 1.5: Le valvole cardiache.

La valvola tricuspide si trova tra l'atrio e il ventricolo destro, la polmonare tra il ventricolo destro e l'arteria polmonare; la mitrale tra l'atrio e il ventricolo sinistro e l'aortica tra il ventricolo sinistro e l'aorta. In seguito a questa collocazione anatomica, le valvole mitrale e tricuspide sono anche chiamate *valvole atrioventricolari* e le valvole polmonare ed aortica sono chiamate *arterioventricolari*. Le valvole aortica e polmonare sono anche chiamate *semilunari* poiché i loro lembi hanno una forma a semiluna. Le valvole atrioventricolari sono attaccate al muscolo cardiaco (miocardio) per mezzo di muscoli papillari e corde fibrose e sono considerate strutture attive in grado di rispondere alla contrazione miocardica. Le valvole semilunari, invece, non sono direttamente attaccate con le parti mobili dei lembi al

miocardio e per questo in passato si pensava funzionassero passivamente in risposta al flusso sanguigno. E' stato però dimostrato che parti della valvola aortica sono attive [24].

Il compito principale delle valvole cardiache è di impedire il reflusso di sangue verso gli atri durante la contrazione ventricolare (sistole) o verso i ventricoli durante la fase di rilascio ventricolare (diastole), garantendo un'ottimale resistenza passiva.

1.2.1 Malattie delle valvole cardiache

Le disfunzioni delle valvole cardiache stanno attirando una crescente attenzione nella medicina cardiovascolare in particolare a causa del cambiamento nella loro insorgenza e quindi della loro gestione, avvenuto negli ultimi 60 anni. Si stima che la prevalenza di queste disfunzioni sia del 2.5% nella popolazione degli USA e sia in netta crescita dopo i 65 anni. Nei paesi industrializzati, infatti, da una eziologia reumatica delle disfunzioni si è passati a un'eziologia prevalentemente degenerativa in seguito, soprattutto, all'invecchiamento della popolazione. Questo cambiamento ha portato ad una diversificazione delle caratteristiche dei pazienti e della distribuzione del tipo di lesioni valvolari [25]. In Europa, la stenosi aortica (SA) e l'insufficienza mitralica sono i due tipi più comuni di disfunzioni valvolari [26]. Le

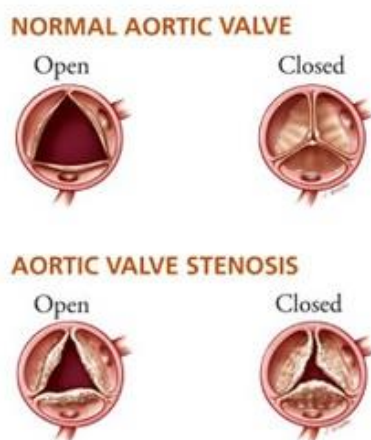


Figura 1.6: Valvola aortica normale e stenotica.

cause principali della SA (Figura 1.6) possono essere la calcificazione di una valvola aortica bicuspidale, la disfunzione post-infiammatoria fibrocalcifica e la degenerazione senile [27]. Al giorno d'oggi però, a causa dell'allungamento della vita media nei paesi industrializzati e del conseguente invecchiamento della popolazione (oltre che ad una più frequente diagnosi per mezzo dell'uso esteso dell'ecocardiografia), è proprio la disfunzione degenerativa senile ad esser la causa più comune di SA, tanto che risulta essere la lesione più comune per cui viene richiesto un trattamento [28]. Nella

SA vi è un impedimento allo svuotamento del ventricolo sinistro a causa della degenerazione della valvola. La degenerazione è causata da un attivo rimodellamento valvolare che coinvolge processi infiammatori e di calcificazione simili a quelli dell'aterosclerosi [29]. La SA inizialmente causa un incremento del carico sul ventricolo sinistro compensato con ipertrofia concentrica, ma gradualmente produce una disfunzione ventricolare, sintomi di dispnea, sincope ed angina e anche morte improvvisa [30]. Macroscopicamente la SA

degenerativa è caratterizzata da ispessimento e irrigidimento dei lembi associati alla presenza di calcificazioni sul lato aortico. Il trattamento di questa disfunzione è tipicamente impiegato per i pazienti sintomatici ed è principalmente costituito dalla sostituzione della valvola disfunzionante con una protesi valvolare, biologica o meccanica.

1.3 Protesi valvolari biologiche

Le protesi valvolari biologiche possono essere suddivise in:

- *bioprotesi* o *xenografts*, solitamente costituite da valvole aortiche porcine o tessuto pericardico bovino trattati con glutaraldeide (GA);
- valvole cardiache tissutali, rappresentate dagli *homografts* e dagli *autografts*.

Le bioprotesi o le valvole biologiche tissutali imitano generalmente le proprietà di flusso e del materiale della valvola nativa. Questo le rende maggiormente compatibili rispetto alle valvole meccaniche.

Gli *homografts* sono sostituti valvolari di disponibilità limitata. Usualmente si tratta di una valvola aortica o polmonare prelevata da cadavere e preparata per essere usata come protesi. La causa principale di fallimento dell'allografts a distanza di 10-15 anni dall'impianto è la degenerazione protesica, soprattutto nei pazienti più giovani [31].

Gli *autografts* sono valvole polmonari appartenenti al paziente. Vengono utilizzate per sostituire la valvola aortica disfunzionante e sono sostituite da un homograft. Questa procedura di sostituzione valvolare (procedura di Ross) è piuttosto complessa e viene eseguita soprattutto nei giovani pazienti con risultati eccellenti [32].

Gli *xenografts*, solitamente rappresentati da valvole aortiche porcine o valvole con tre cuspidi fatte di pericardio bovino, costituiscono la maggioranza delle protesi biologiche. Il tessuto di queste protesi è trattato con GA. Si distinguono in: *stented* e *stentless*. Negli *xenografts stented* il tessuto è montato su un'impalcatura (stent) in metallo o in plastica, ricoperto da tessuto sintetico; in quelle *stentless* lo stent non è presente e le commessure sono ancorate direttamente alla parete aortica nativa del paziente.

Le valvole cardiache biologiche hanno morfologia estremamente simile alla valvola nativa e presentano, in generale, un basso rischio di trombogenicità: questa caratteristica consente di evitare la terapia anticoagulante (richiesta invece per le protesi meccaniche) e, di conseguenza, tutte le sue controindicazioni [32]. Tuttavia, il 10-20% delle valvole allograft e fino al 30% delle valvole xenograft fallisce entro 10-15 anni dall'impianto e necessita quindi

di sostituzione [33]. La limitata durezza delle valvole biologiche può essere associata al loro potenziale immunogenico che spesso scatena reazioni nell'ospite che portano al rigetto. Attualmente le bioprotesi impiegate in cardiocirurgia sono le così dette bioprotesi "man-made", ideate da Carpentier e collaboratori e commercializzate a partire dal 1970 dagli Hancock Laboratories. Carpentier fu il primo in assoluto a sfruttare la GA per la preservazione delle valvole biologiche, aumentandone l'affidabilità a lungo termine e diminuendone i fenomeni di degenerazione rispetto a quelle non trattate. La GA viene utilizzata per fissare i tessuti biologici, rendendone trascurabile l'immunogenicità. Il trattamento con GA, pur prevenendo anche se solo parzialmente [34] la risposta immunitaria causata dalle cellule xenogeniche, porta alla frammentazione della rete collagene-elastina interna al pericardio ed inoltre è una delle prime cause di calcificazione del tessuto biologico [35,36]. Attualmente, per scongiurare questo tipo di rischi, dopo il fissaggio viene effettuata l'estrazione della GA residua, seguita da un processo di detossicazione e dall'applicazione di alcuni trattamenti anticalcificanti. Inoltre è stato scoperto recentemente che la GA non è così efficiente come si credeva nella rimozione degli antigeni specifici animali (i.e. epitope alpha Gal) [37,38].

Un altro principale meccanismo di deterioramento potenzialmente sinergico a quello appena citato è la *calcificazione delle cuspidi*: essa inizia a livello dei fosfolipidi delle membrane cellulari delle cellule devitalizzate in seguito al trattamento con GA [39]. Questi iniziali depositi calcifici possono coalescere e aumentare di dimensioni, formando noduli mineralizzati macroscopicamente evidenti. Si assiste così alla progressione della cristallizzazione. La calcificazione è più rapida nei pazienti giovani, in cui il metabolismo di calcio e fosfato è accelerato. I depositi di calcio seguono la direzione delle fibre collagene e si concentrano nei siti di più intenso stress meccanico, come le commessure. Questo causa un irrigidimento delle cuspidi con successivo malfunzionamento della protesi [40]. Il fissaggio con GA, come detto, sembra accelerare il processo. Proprio per questo motivo, nuove bioprotesi pre-trattate con agenti anticalcificanti sono state introdotte sul mercato [41,42].

Protesi pericardiche

Negli ultimi 25 anni, assieme agli xenografts porcini si sono sviluppate bioprotesi costituite da pericardio (bovino ed equino) trattato con GA. Queste bioprotesi hanno un'emodinamica migliore rispetto alle porcine stented e numerose tipologie sono commercialmente disponibili. La prima generazione di queste bioprotesi (le valvole Ionescu-Shiley) ha dimostrato problemi relativi alla progettazione ed è fallita rapidamente a causa soprattutto di rotture nei lembi

valvolari. Per questo fu ritirata dal mercato alla metà degli anni '80. La seconda generazione di bioprotesi pericardiche (CE Perimount) ha dimostrato un'emodinamica paragonabile alle valvole stentless ed è stata a lungo considerata la migliore, mostrando una durata di oltre 17 anni. Sfortunatamente, anche se più tardivamente, anche questa generazione di protesi va incontro a deterioramento principalmente per calcificazione delle cuspidi. Attualmente nella sostituzione valvolare aortica sono utilizzate le bioprotesi Ionescu-Shiley standard e low-profile, le CE Perimount, le Mitroflow e le Sorin Pericarbon.

1.4 Valvole percutanee

La sostituzione della valvola aortica (AVR) è il trattamento standard per la SA ed è noto come aumenti le percentuali di sopravvivenza. Attualmente, la pratica chirurgica nei pazienti a rischio moderato-alto (la Society of Thoracic Surgery ha predetto un rischio di mortalità del 4-8%) è in grado di raggiungere risultati accettabili (mortalità a 30 giorni: 2.8%). Tuttavia, circa la metà dei pazienti non si sottopongono all'intervento chirurgico per vari motivi, tra cui l'età avanzata o la presenza di comorbidità multiple.

Per ovviare al problema, dal 2002 è stata implementata per i pazienti ad alto rischio con stenosi aortica una nuova procedura chiamata TAVI (*Transcatheter Aortic Valve Implantation*). Sono stati condotti finora diversi studi clinici, e i risultati ottenuti indicano che la procedura TAVI è efficace nel migliorare i sintomi [43]. A tal proposito sono state messe a disposizione altre bioprotesi pericardiche per la sostituzione valvolare aortica denominate *valvole percutanee*. Date le caratteristiche della tecnica chirurgica di impianto, posseggono una struttura diversa rispetto alle protesi viste precedentemente.

Ci sono 2 dispositivi utilizzati in Europa, approvati con il marchio CE nel 2007, che possono essere utilizzati per la sostituzione della valvola aortica attraverso TAVI: CoreValve ReValving System (Medtronic, Minneapolis, USA) e Edwards SAPIEN tissue heart valve (Edwards Lifescience, Irvine, California, USA).

L'*Edward SAPIEN heart valve* è una protesi espandibile con pallone, formata da uno stent cilindrico in acciaio inossidabile a cui sono attaccati i lembi in pericardio, equino inizialmente (Cribier-Edwards) e attualmente bovino (Edwards-Sapien) (Figura 1.7). Una fascia di tessuto (*skirt*) è cucita allo stent a livello della porzione valvolare all'interno dell'outflow del ventricolo sinistro, per limitare il rigurgito paravalvolare. La protesi è fissata con GA [44]. Nel 2002 venne innestata la prima valvola aortica con tecnica percutanea da Cribier et al. [45].

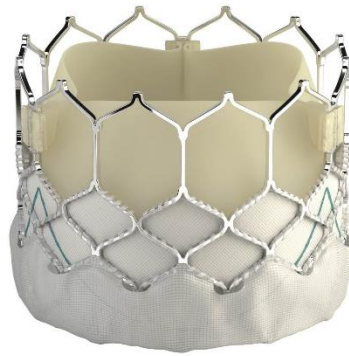


Figura 1.7: Edward SAPIEN heart valve.

La *CoreValve ReValving System* è una bioprotesi con 3 lembi in pericardio montati e suturati su uno stent in nitinolo autoespandibile (Figura 1.8). Lo stent è molto esteso e può essere suddiviso in 3 parti. Il terzo superiore (*outflow portion*) esercita una scarsa forza radiale ma conferisce stabilità longitudinale: si posiziona nell'aorta ascendente orientando la protesi nella direzione della radice aortica e del flusso ematico. Il terzo medio dello stent ospita i lembi valvolari e ha un'elevata forza circonferenziale per resistere alla deformazione e mantenere la normale funzione valvolare. Il terzo inferiore (*inflow portion*) si situa all'interno dell'outflow del ventricolo sinistro ed esercita un'importante forza radiale, in modo da espandere ed escludere i lembi calcificici nativi, senza recoil. Una striscia di pericardio delimita la parte inferiore della valvola e, insieme all'inflow portion, aiuta a creare una “guarnizione” per prevenire il rigurgito paravalvolare [46].

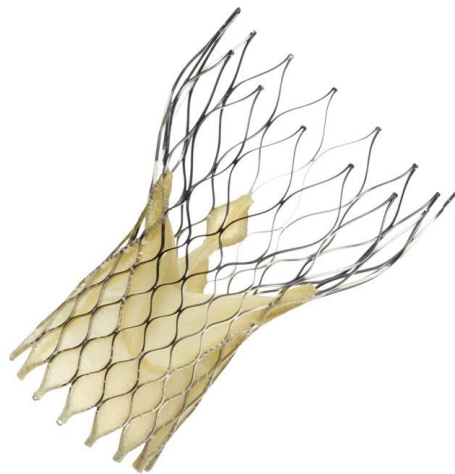


Figura 1.8: CoreValve ReValving System.

Le valvole di prima generazione erano in pericardio bovino, mentre quelle di seconda e terza generazione sono costituite da pericardio porcino. Nel 2006 Grube et al. [47] hanno riportato la fattibilità e la sicurezza della CoreValve in uno studio prospettico multicentrico: successivamente il dispositivo è stato impiantato con successo con la tecnica retrograda [43].

1.4.1 Tecniche di approccio percutaneo

Esistono tre modalità di approccio percutaneo alla sostituzione della valvola aortica: l'approccio anterogrado trans-settale, l'approccio retrogrado e l'approccio trans-apicale (Figura 1.9).

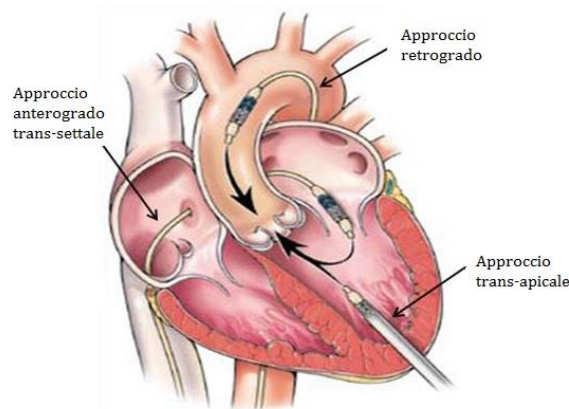


Figura 1.9: Tecniche di approccio percutaneo.

L'approccio anterogrado viene così definito poiché il catetere su cui è montata la valvola è diretto verso il cuore, attraverso il sistema venoso, quindi seguendo lo stesso verso del flusso sanguigno. Per contro, nell'approccio retrogrado, il catetere viene spinto fino al cuore tramite il sistema arterioso, e quindi nel verso opposto a quello del naturale scorrimento del sangue. In tutti e tre i casi, il posizionamento della valvola protesica è determinato dalla struttura e dall'anatomia della valvola nativa del singolo paziente, ed è guidato e monitorato grazie alle seguenti tecniche:

- fluoroscopia: per stabilire il livello delle calcificazioni valvolari;
- aortografia in varie proiezioni: eseguita all'inizio della procedura e ripetuta più volte durante il rilascio, per verificare il corretto allineamento rispetto al piano valvolare ed agli osti coronarici;
- ecocardiografia trans-esofagea: può essere utile per una più accurata misura delle dimensioni dell'annulus aortico e quindi per una corretta scelta delle dimensioni del

dispositivo, oltre che per monitorarne il posizionamento e l'eventuale insorgenza di complicanze periprocedurali.

Quest'ultima metodica è utile soprattutto nei casi con calcificazioni di grado moderato. Il valore aggiuntivo dell'ecocardiografia trans-esofagea tridimensionale deve, però, ancora essere validato. Analoga situazione si ha con l'ecocardiografia intra-cardiaca, con la quale c'è ancora scarsa esperienza e che per il momento non sembra aggiungere informazioni di rilievo rispetto alla metodica trans-esofagea [48]. Data la difficoltà della procedura e la necessità di avere a disposizione una grande varietà di strumenti, l'intervento viene effettuato in una sala operatoria ibrida o in una sala angiografica di diagnostica interventistica (Figura 1.10) [43].



Figura 1.10: Una sala operatoria ibrida [Artis Zee (Siemens AG, Forchheim, Germany)].

L'approccio *anterogrado trans-settale* venne utilizzato da Cribier et al. per il primo impianto di valvola aortica con tecnica percutanea nel 2002 [45]. Tale approccio prevede l'inserimento della valvola attraverso la vena femorale mediante un introduttore e l'esecuzione di una puntura trans-settale. Successivamente la valvola protesica viene fatta passare, mediante l'utilizzo di una guida di supporto rigida detta *stiff*, nell'atrio di sinistra attraverso la valvola mitralica e infine attraverso quella nativa stenotica, dopodiché si procede con l'esternalizzazione finale della guida di supporto dall'arteria femorale controlaterale. I principali vantaggi di tale metodica consistono nel fatto che il catetere su cui è montata la

valvola viene introdotto attraverso la vena femorale, evitando in questo modo le problematiche delle ridotte dimensioni e della particolare tortuosità delle arterie femorali ed iliache, tipiche dei soggetti anziani. Fra gli svantaggi, invece, ci sono la necessità di una puntura trans-settale, possibili danni permanenti o temporanei alla valvola mitrale causati dalla guida rigida che la attraversa, e la generale complessità della metodica. Allo stato attuale, tale approccio è stato quasi del tutto abbandonato in favore dell'approccio retrogrado. Dopo che Hanzel et al. innestarono una valvola cardiaca percutanea in un paziente con una stenosi aortica critica attraverso l'arteria iliaca [44], vennero sviluppate diverse tecniche di approccio retrogrado [43]. L'approccio *retrogrado* è considerato attualmente la prima scelta per la maggior parte dei pazienti. In questo approccio si impiegano cateteri a maggior supporto che permettono un migliore allineamento coassiale della valvola percutanea e una maggiore spinta. Questa tecnica richiede l'inserimento di introduttori di calibro crescente nell'arteria femorale che, al termine della procedura, viene chiusa attraverso metodica classica di chirurgia vascolare oppure attraverso l'utilizzo di sistemi di sutura per via non chirurgica. In alternativa all'accesso femorale, è possibile introdurre il dispositivo per via retrograda tramite l'arteria succlavia o ascellare, previo isolamento chirurgico delle stesse. Tale approccio evita le eventuali complicanze funzionali o meccaniche sul lembo anteriore della valvola mitrale, non necessita della puntura trans-settale ed è tecnicamente più semplice. D'altra parte, esso può essere associato a lesioni dei vasi aorto-femorali, e a potenziali danni della protesi nell'attraversamento dell'arco aortico e/o della valvola stenotica stessa [49]. A causa di ciò, la procedura retrograda non consente il trattamento di quei pazienti che presentano severe tortuosità o calcificazioni a livello delle arterie iliache oppure di quei pazienti con arterie femorali di ridotto calibro (< 6-7 mm).

Ye et al. [50] hanno riportato il primo caso umano di approccio *trans-apicale*. Il posizionamento delle valvole con approccio trans-apicale ventricolare sinistro costituisce forse la terra di passaggio tra l'intervento cardiocirurgico classico di sostituzione valvolare aortica e l'impianto totalmente percutaneo. Questo approccio viene riservato a quei pazienti che presentano controindicazioni alla tecnica retrograda ed è eseguito mediante anestesia generale da parte di un team che combina la presenza di cardiologi interventisti e cardiocirurghi. Si procede con l'esposizione dell'apice cardiaco mediante minitoracotomia antero-laterale (quinto spazio intercostale), dopodiché viene eseguita una incisione a livello dell'apice cardiaco, quindi si inserisce un introduttore emostatico e successivamente introduttori di calibro crescente. La valvola viene posizionata, secondo l'approccio anterograde, all'interno della valvola stenotica; al termine della procedura, il ventricolo

sinistro viene suturato chirurgicamente ed il paziente monitorato in terapia intensiva post-cardiochirurgica per il tempo necessario ad ottenere una definitiva stabilità emodinamica [51]. Il vantaggio principale di questo tipo di tecnica consiste nel fatto che essa garantisce un accesso più diretto alla valvola aortica ed elimina il bisogno di accessi periferici di grandi dimensioni in tutti quei pazienti che soffrono di vasculopatie periferiche. Potenziali svantaggi, invece, sono collegati alla puntura apicale del ventricolo sinistro e includono: rimodellamenti negativi del ventricolo, aneurismi e pseudo-aneurismi ventricolari, complicazioni pericardiche, pneumotorace, aritmia ventricolare maligna, danni alle arterie coronarie e, questione tutt'altro che trascurabile, il bisogno di anestesia generale [49].

1.4.2 Crimping

Il processo di *crimping* viene eseguito immediatamente prima dell'applicazione della protesi: grazie ad un apposito dispositivo i lembi pericardici vengono pressati all'interno di uno stent compresso (Figura 1.11), prima della consegna in sala operatoria [52].

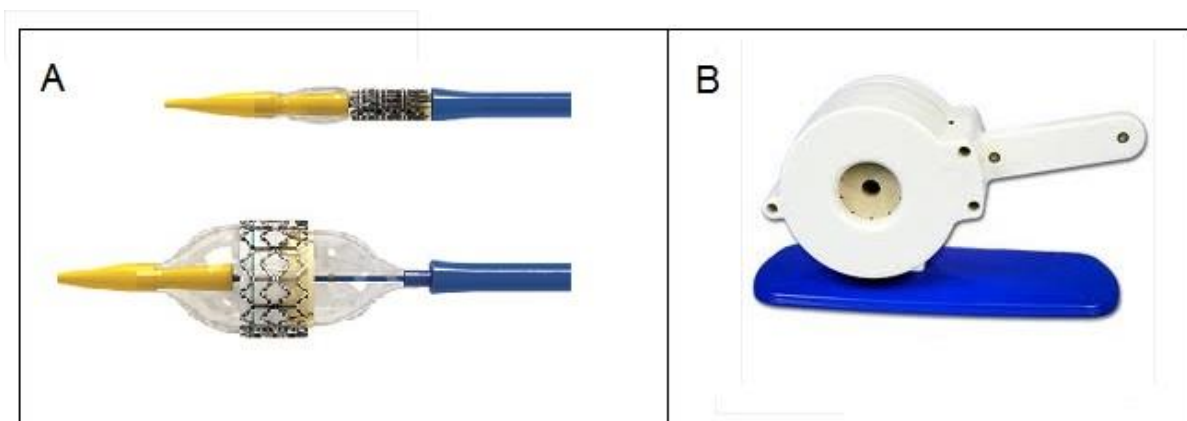


Figura 1.11: A, valvola Edwards SAPIEN compressa nel catetere e poi riportata alla configurazione originale con l'uso di un palloncino. B, crimping machine.

Questo processo rimane una delle fasi più critiche nella TAVI, poiché i lembi della valvola sono esposti ad un livello di stress che normalmente non viene esercitato nelle protesi valvolari [53]. La valvola, inoltre, rimane pressata per un intervallo di tempo significativo, dipendente dalla natura e dalla complessità della procedura [52]. Attualmente sono presenti pochi dati per poter quantificare gli eventuali danni risultanti da questo procedimento. È ben documentato, però, che applicando sollecitazioni meccaniche ai lembi di pericardio si provocano interruzioni nella rete formata dalle fibre collagene, con possibile calcificazione e relativo fallimento precoce della valvola [54,55]. Inoltre un fenomeno collegato è l'effetto

della espansione del palloncino sulla struttura una volta posizionata la protesi. È noto come ciò comporti la rottura delle fibre di collagene nei tessuti pericardici [56]. Gli studi pervenuti finora testimoniano come questa procedura, realmente, possa provocare alla valvola danni transitori o irreversibili, le cui conseguenze possono avere significative ripercussioni sulla effettiva durata della protesi [52,53].

1.5 Caratterizzazione biomeccanica

Gli stress meccanici a cui sono sottoposti i lembi aortici e i biomateriali utilizzati per la loro costruzione nelle protesi valvolari cardiache, possono essere studiati sperimentalmente attraverso la misurazione delle proprietà di *stress-strain*. Quando una forza esterna è applicata ad un lembo, questo sviluppa una forza interna uguale a quella esterna. Lo *stress* (σ) è definito come la forza interna sulla sezione trasversa del lembo. Lo *strain* (ϵ) rappresenta l'allungamento del lembo ed è spesso espresso come variazione percentuale della sua lunghezza. Uno dei test eseguiti per determinare le proprietà meccaniche dei lembi è il test di stress-strain uniassiale ed è applicabile ai biomateriali utilizzati per la costruzione di bioprotesi valvolari cardiache come lembi valvolari porcini e tessuto pericardico. Un esperimento eseguito in questo modo genera una curva forza-lunghezza continua, o una curva carico-allungamento, le quali devono essere convertite in una curva di stress-strain. Lo stress, in *Pascal* [*Pa*], è ottenuto dividendo la forza per la sezione trasversale dell'area del campione di tessuto:

$$\sigma = \frac{F}{A}$$

Lo strain è adimensionale ed è ottenuto dividendo l'incremento della lunghezza per la lunghezza iniziale:

$$\epsilon = \frac{\Delta l}{l_0}$$

È dimostrato che quasi tutti i tessuti contenenti collagene ed elastina hanno un comportamento anisotropo e non lineare. Ne risulta che le proprietà di stress-strain sono differenti nelle diverse direzioni e lo stress varia in maniera non lineare con la deformazione [57]. Nella curva di stress-strain relativa a questa tipologia di tessuti si possono solitamente osservare tre fasi distinte (Figura 1.12) [58]. Nella prima fase, detta *fase dell'elastina*, il lembo oppone una piccola resistenza all'allungamento poiché la trasmissione della forza e la sopportazione del carico sono sostenute principalmente dalle fibre elastiche. Durante questa fase lo strato di fibre collagene presente nella fibrosa si svolge e il collagene dà un contributo

minimo alla trasmissione della forza. In questa fase il tessuto si comporta quasi come un solido elastico con lo stress che cresce linearmente con lo strain. Nella fase di transizione avviene il dispiegamento del collagene e più fibre collagene gradualmente diventano allineate e srotolate. Questo incrementa il contributo alla trasmissione della forza. Nella *fase del collagene* tutte le fibre sono srotolate e sopportano interamente il carico. La salita della curva di stress-strain in questa fase è ripida e quasi costante, riflettendo le proprietà del materiale e delle fibre collagene, che consentono un allungamento limitato evitando la frattura [59]. La fase del collagene normalmente continua bene oltre il range fisiologico, grazie alla riserva di resistenza. Alla fine della fase del collagene, la pendenza della curva comincia a decrescere e un ulteriore incremento del carico porta il tessuto a rottura.

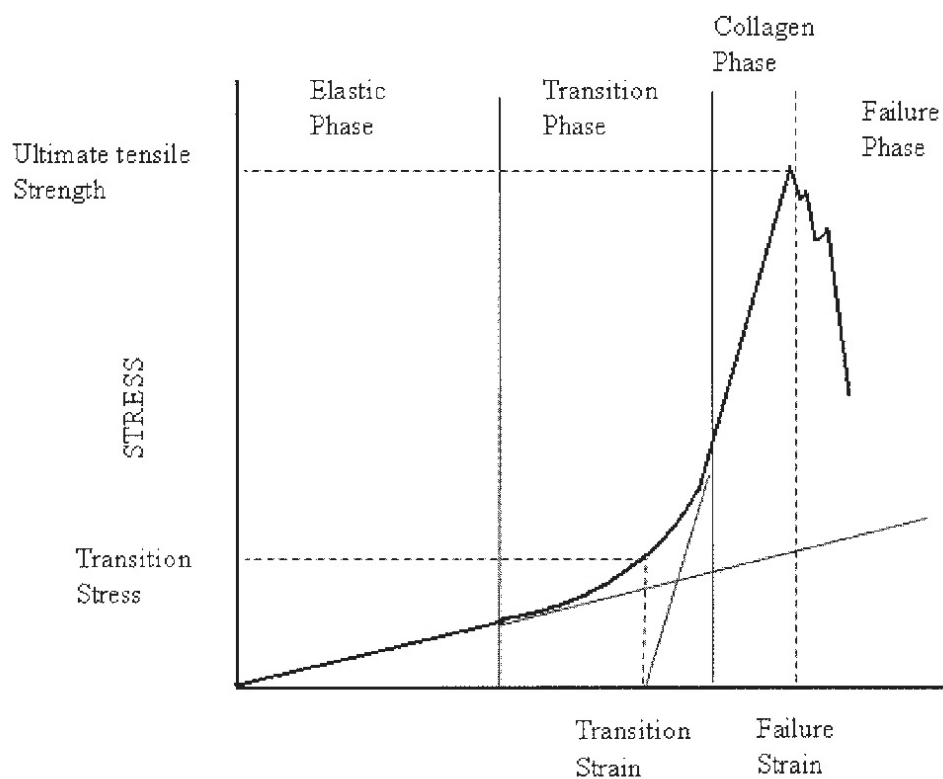


Figura 1.12: Le tre fasi che caratterizzano la prova a trazione del pericardio [60].

Sottoponendo i tessuti ad un carico ciclico, a causa della non linearità tra stress e strain, si può osservare un fenomeno di isteresi tra la fase di carico e quella successiva di rimozione del carico. Questo periodo iniziale di “aggiustamento” dopo una grande perturbazione è chiamato *precondizionamento* ed avviene a causa dell'adattamento della struttura interna del tessuto durante il ciclo. Con i cicli successivi l'isteresi decresce e, eventualmente, è raggiunto uno stato stabile nel quale non avvengono ulteriori cambiamenti fino a che la routine del ciclo venga modificata.

Poiché i lembi della valvola aortica e il pericardio sono composti principalmente di fibre collagene ed elastiche orientate preferenzialmente nella direzione della sollecitazione prevalente, avranno prevedibilmente un comportamento anisotropo e non-lineare analogo a quelle descritto.

Biomeccanica della valvola aortica

Gli stress meccanici nella valvola aortica possono condizionarne la longevità. Il loro eccesso, infatti, può danneggiarla e causare alcune patologie valvolari. La valvola aortica è sottoposta ad una complessa deformazione durante ogni ciclo cardiaco, data dai diversi tipi di sollecitazioni che essa subisce. È possibile schematizzare cosa accade ad ogni ciclo cardiaco cercando di isolare i vari tipi di sollecitazioni applicate ai lembi valvolari. Quando la valvola è aperta sono presenti sollecitazioni di taglio dovute al flusso sanguigno; le sollecitazioni di flessione, invece, sono dovute alla apertura ciclica della valvola e le sollecitazioni di trazione intervengono quando la valvola è chiusa [61]. In una valvola cardiaca le velocità di deformazione e le deformazioni in direzione radiale sono quasi tre volte superiori a quelle in direzione circonferenziale: ciò implica una maggiore estensibilità del tessuto in direzione radiale [62]. Questo dimostra che, quando la valvola è aperta, i lembi smorzano le sollecitazioni di taglio mediante l'allungamento radiale delle fibre. Un efficiente allungamento radiale richiede che le fibre passino dalla configurazione arrotolata ad una configurazione srotolata e allineata e si riorientino nella direzione del flusso sanguigno. Con un aumento della tensione le fibre si allineano ulteriormente nella direzione del flusso e la valvola diventa più rigida [63].

Quando la valvola è chiusa, come detto, è soggetta ad un carico di trazione uniassiale. In questa condizione le fibre collagene superficiali si orientano perpendicolarmente alla direzione del carico, questa configurazione degli strati superficiali può essere rilevante in vivo in quanto permette che le sollecitazioni di taglio legate al flusso non danneggino la superficie del tessuto. Gli strati più interni del tessuto, che generalmente definiscono la resistenza meccanica, presentano, invece, fibre che si allineano parallelamente alla direzione del carico. Ciò potenzialmente può contribuire allo smorzamento della tensione di trazione e a rendere il tessuto più rigido [61]. Non sono tuttora presenti dati che permettano di caratterizzare il comportamento dei lembi valvolari durante l'apertura ciclica nella quale i lembi sono soggetti a carichi di flessione difficilmente modellabili.

Tutti questi processi si ripetono ad ogni ciclo cardiaco, applicando un grande carico di stress che può portare a fallimento la valvola in diversi modi come la rottura meccanica, la

degradazione ciclica in condizioni di fatica (p. es. deformazioni da flessioni cicliche) e distacchi locali in presenza di sollecitazioni di membrana estremamente concentrate [64,65].

2 Materiali e Metodi

2.1 Trattamento di decellularizzazione

I protocolli di decellularizzazione vengono abitualmente utilizzati per rimuovere le cellule ed i residui cellulari dalla matrice extracellulare di un tessuto, in modo da minimizzare il rischio di eventuali reazioni antigeniche nel ricevente. Vengono in seguito riportate le sostanze ed i passaggi che descrivono il protocollo utilizzato (TriTDoc). Sono impiegate soluzioni tampone, inibitori di proteasi e soluzione fisiologica (utilizzata essenzialmente per lavaggi ed agente idratante durante il trasporto dei campioni). Il protocollo è costituito da 3 step e numerosi lavaggi

2.1.1 TriTDoc

Soluzioni Principali

Tampone madre “A” (T.m.A): Ascorbato di sodio o Acido Ascorbico ed Acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) sciolti in PBS (*Phosphate Buffered Saline*: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄)

Viene utilizzata con sali antiox e inibitori di proteasi che necessitano substrati come ioni bivalenti. Per una migliore miscibilità dei soluti, è necessario utilizzare un agitatore con piastra calda, in quanto la reazione è endotermica.

- PBS;
- Ascorbato di sodio 100 mM - 19.8 gr/L, oppure Acido Ascorbico 100 mM - 17.61 gr/L;

- EDTA 50 mM - 18.6 gr/L;

pH fisiologico di 7.4 (nel caso va tamponato con *NaOH* o *HCl*), filtrato, degassato e flussato ogni volta che è necessario aprire il contenitore altrimenti l'acido ascorbico si ossida.

Inibitori di proteasi

Agiscono a livello del gruppo serinico inibendo le proteasi (alterano il sito catalitico delle proteasi).

Vanno portati a volume con DMSO (dimetilsolfossido). La soluzione non va né filtrata (il DMSO scioglie la nitrocellulosa), né degassata (non è necessario visto che ci sono gli inibitori di proteasi). Le soluzioni sono due (la ricetta è calcolata per un volume finale di 25 ml):

Inibitore A

- Phenylmethylsulfonyl Fluoride (P.M.S.F.) 400 mM, 1.74 gr;
- N-Ethylmaleimide (N.E.M.) 1 M, 3.13 gr;

Inibitore B

- Benzamidina 1 M, 2.57 gr;
- Iodoacetammide 200 mM, 0.93 gr;

Vengono portati a volume con DMSO e conservati a -20°C.

Fisiologica

Viene utilizzata per lavaggi e per il trasposto del campione.

- 0.9 % di *NaCl*;

filtrare.

Protocollo e soluzioni secondarie

Il pericardio prelevato da un macello locale viene posto in fisiologica o PBS e trasportato in laboratorio. Una volta in laboratorio, dopo aver eliminato i depositi adiposi dalla superficie pericardica, i campioni di tessuto vengono posti in soluzione fisiologica fresca in tubi, e lasciate equilibrare sotto agitazione per 4 h a +4°C.

I STEP con inibitori di proteasi:

Nei tubi è stata tolta la fisiologica o il PBS e aggiunta la seguente soluzione contenente gli inibitori di proteasi:

- 10 % di T.m.A.;
- 10 % di DMSO puro;

Si porta a volume con acqua mQ e si aggiungono i seguenti volumi di inibitori:

- 2 ml di inibitore → tubo grande circa 400 ml;
- 1,5 ml di inibitore → tubo piccolo circa 330 ml;

non filtrare nè degassare per i motivi discussi sopra.

I tubi vengono posti 8 h sotto agitazione a + 4°C.

Lavaggio con soluzione ipotonica contenente:

- 10 % di T.m.A.;
- 0.04 % di NaN₃ in mQ;

Vengono lavati via gli inibitori e il DMSO.

La soluzione va filtrata e degassata.

I tubi vengono posti 8 h sotto agitazione a + 4°C.

II STEP con inibitori di proteasi:

Si sostituisce la soluzione dei tubi con una nuova soluzione costituita da:

- 10 % T.m.A.;
- 1 % v/v TRITON X-100;

portati a volume con acqua mQ.

Sul volume totale poi vanno aggiunti, a seconda dei tubi, 2 ml e 1,5 ml di inibitori. I tubi vanno posti per 8 h sotto agitazione a + 4°C, segue lavaggio con:

- 10% T.m.A.;
- % v/v TRITON X-100;

portare a volume con acqua mQ.

La soluzione va filtrata e degassata.

I tubi vanno posti per 8 h sotto agitazione a + 4°C.

Soluzione ipertonica:

- 10 % T.m.A.;
- 0.5 M NaCl (per 1 litro devono essere pesati 29.22 gr);
- % TRITON X-100;

si porta a volume con PBS isotonic.

La soluzione va filtrata e degassata.

I tubi vanno posti per 8 h sotto agitazione a + 4°C. Il lavaggio va effettuato per 2 volte.

Lavaggio con una soluzione costituita da:

- 10 % T.m.A.;
- % TRITON X-100;

il lavaggio va effettuato 2 volte e serve a togliere i sali.

Si porta a volume con acqua mQ per il primo lavaggio, con PBS per il secondo; la soluzione va filtrata e degassata.

I tubi vanno posti per 1.5 h sotto agitazione a + 4°C per il primo lavaggio, e a temperatura ambiente per il secondo (il colato a + 4°C tende a solidificare).

III STEP con aggiunta del TAURODEOSSICOLATO di SODIO:

Nell'aggiunta del Taurodeossicolato di sodio si utilizza una soluzione costituita da:

- 10 % T.m.A.;
- 4mM Taurodeossicolato (PM 521,7 gr/mol);

si porta a volume con PBS.

La soluzione deve risultare a pH fisiologico di 7.4, va filtrata e degassata.

I tubi vanno posti per 8 h sotto agitazione a temperatura ambiente (il colato a + 4°C varia di pH e gelifica). Il lavaggio va effettuato per 2 volte.

Si effettuano lavaggi finali per togliere detergenti e residui di matrice, con PBS isotonico a pH fisiologico di 7.4.

La soluzione va filtrata e degassata.

I tubi vanno posti 1.5 h sotto agitazione.

Il lavaggio va effettuato per 2 volte.

Il primo lavaggio viene tenuto a temperatura ambiente e serve per asportare residui di colato, il secondo lavaggio va mantenuto a + 4°C.

Lavaggio in fisiologica per 30 minuti.

Passaggio in soluzione fisiologica con aggiunta di 10 % di isopropanolo (toglie il colato di sodio e il TRITON).

La soluzione va filtrata e degassata.

I tubi vanno posti per 1 h sotto agitazione a + 4°C. Il lavaggio va effettuato per 2 volte.

2.2 Preparazione dei campioni

Al macello locale è stato prelevato il pericardio dissezionandolo direttamente dal cuore dell'animale da poco macellato. L'isolamento, con l'utilizzo di strumenti chirurgici sterili, è avvenuto in direzione circonferenziale, poiché la maggior parte delle fibre di collagene risultano orientate in detta direzione nella porzione di pericardio corrispondente al ventricolo anteriore sinistro [66] da dove verranno poi prelevati i campioni di pericardio da analizzare. In seguito il tessuto è stato immerso in PBS sterile fino all'arrivo in laboratorio, dove è stato eliminato il tessuto adiposo dalla superficie fibrosa del pericardio (Figura 2.1) e sono stati isolati i frammenti necessari per le prove da eseguire. Sono stati tagliati campioni rettangolari con dimensioni di $20 \times 3 \text{ mm}^2$. È stato, inoltre, misurato lo spessore di ogni campione con un micrometro Mitutoyo (modello ID-C112XB, Aurora, Illinois, USA). Sono stati analizzati i pericardi bovino e porcino, ognuno nella sua conformazione nativa e decellularizzata (con TriTDoc).

Il dataset, per ogni tipologia di pericardio, è composto da:

- 9 campioni ottenuti da 3 lembi di pericardio provenienti da animali diversi, per le prove di trazione a rottura;
- 36 campioni ottenuti da 3 lembi di pericardio provenienti da animali diversi, per le prove di trazione a rottura con diverso preconditionamento (20%, 30%, 40%, 50%).

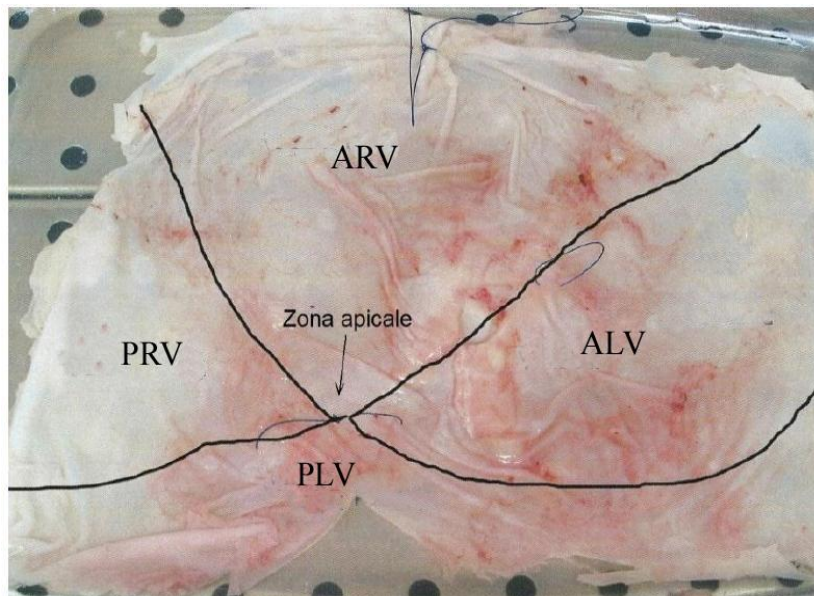


Figura 2.1: Mappatura del pericardio porcino nativo: ARV, ventricolo anteriore destro; ALV, ventricolo anteriore sinistro; PRV, ventricolo posteriore destro; PLV, ventricolo posteriore sinistro.

2.3 Il sistema Bose ElectroForce®

L'ElectroForce planar biaxial TestBench test instrument è un sistema appositamente sviluppato dalla Bose Corporation (Eden Prairie, Minnesota, USA) per la caratterizzazione e lo sviluppo di modelli costitutivi di materiali. In particolare, l'impiego di questo sistema è finalizzato allo studio di tessuti e biomateriali molli, utilizzati per le applicazioni mediche e chirurgiche. Questo tipo di materiali, presentando solitamente caratteristiche d'anisotropia, relazioni di sforzo-deformazione non lineari, grandi deformazioni e comportamento viscoelastico, richiedono analisi particolarmente complesse. Il sistema incorpora la tecnologia dei motori Bose e il software di controllo WinTest [67].

Il sistema è costituito da un banco di prova metallico traforato su cui poggiano quattro motori lineari a magnete permanente, due da 200 N e due da 400 N, tutti con un movimento massimo di 6.25 mm. La presenza di quattro motori consente di effettuare prove di tipo monoassiale e biassiale, poiché essi possono essere fissati mediante viti lungo tutta la superficie del banco di prova in modo da creare la configurazione desiderata per l'esperimento. Sono presenti, inoltre tre celle di carico di diversa capacità (450 N, 225 N, 22.1 N) che possono essere montate in vario modo, a seconda della configurazione desiderata, utilizzando i componenti per l'assemblaggio in dotazione nel sistema, tra cui delle morse (*grips*) per ancorare i campioni ai motori (Figura 2.2). Le celle e i motori fungono da sensori per la rilevazione delle forze in atto durante le prove e sono interfacciati mediante il sistema WinTest che permette un controllo completo durante la prova.

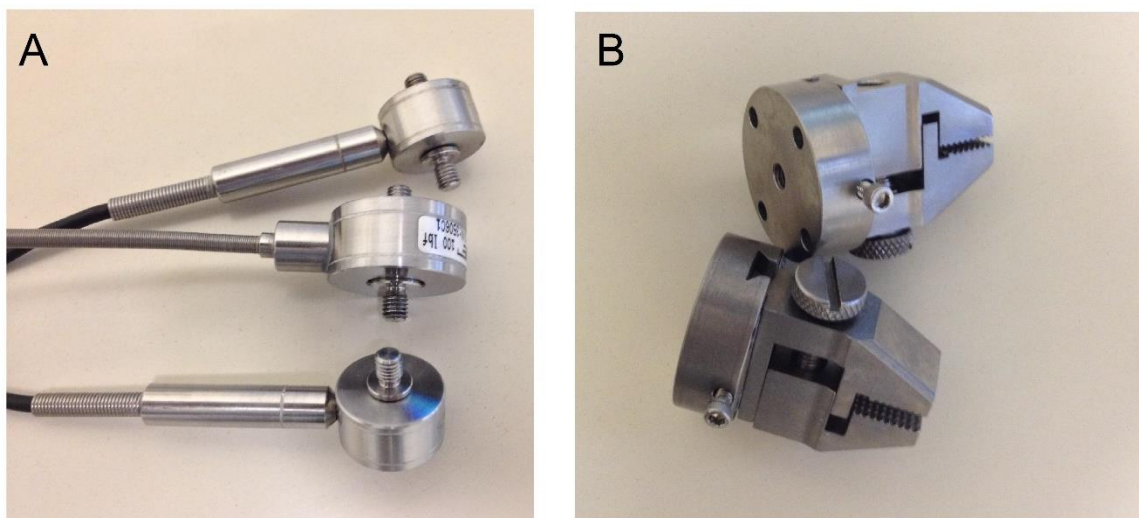


Figura 2.2: A, celle di carico. B, grips.

2.3.1 Configurazione del sistema

Per realizzare le prove di interesse è stata predisposta una configurazione monoassiale con due motori (*displacement*) da 200 N contrapposti in modo da raddoppiare lo spostamento massimo (12.5 mm). Una cella di carico (*load cell*) da 225 N è montata nel braccio di uno dei due motori; ad essa viene avvitata una delle due morse. L'altra morsa viene fissata al braccio del motore sul lato opposto. Le due grips sono posizionate alla stessa altezza ed a 5 mm di distanza. Tra di esse viene fissato il campione da testare, bloccato grazie all'utilizzo di 4 quadrati di balsa che vanno a formare un "wafer" con il tessuto biologico: ciò permette di aumentare l'attrito tra le grips ed il campione in modo da evitare, durante la fase di trazione, eventuali scivolamenti ed impedendo lacerazioni nel campione a causa del contatto diretto con la grip (Figura 2.3).

Le prove meccaniche realizzate in questo lavoro sono tutte con spostamento imposto: il sistema misura mediante la cella di carico la forza che si sviluppa in seguito alla trazione imposta sul campione.

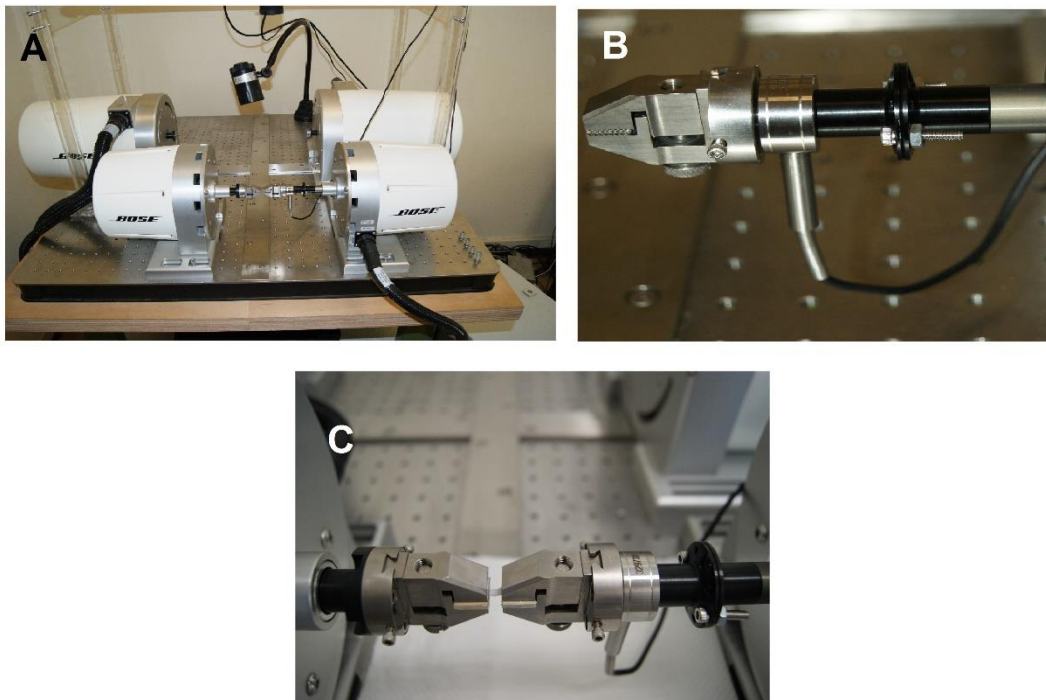


Figura 2.3: A, configurazione per le prove di trazione. B, dettaglio della cella di carico in posizione. C, dettaglio del campione in posizione tra le morse.

2.3.2 WinTest

Il sistema di controllo WinTest permette di interfacciare con il calcolatore motori e celle di carico. Esso include un software ed un controllore PCI elettronico e permette l'acquisizione sincronizzata di dati da più canali e la generazione di forme d'onda da far eseguire ai motori. Il software è installato su un PC desktop in ambiente Windows 7 ed è dotato di un display e di un'interfaccia utente completamente integrata che semplificano le operazioni e forniscono funzionalità avanzate. All'avvio del programma, si apre la caratteristica interfaccia WinTest (Figura 2.3) attraverso la quale è possibile impostare i parametri della prova oltre a tutte le istruzioni da impartire ai motori ed ai trasduttori. Una volta settate le specifiche dell'esperimento, è possibile salvarle in un file che viene reso disponibile ad ogni successivo utilizzo. Durante le prove, WinTest fornisce in tempo reale, mediante una finestra grafica, gli andamenti relativi alle grandezze specificate (*Load e Displacement*), in funzione del tempo (*Time*) (Figura 2.4).

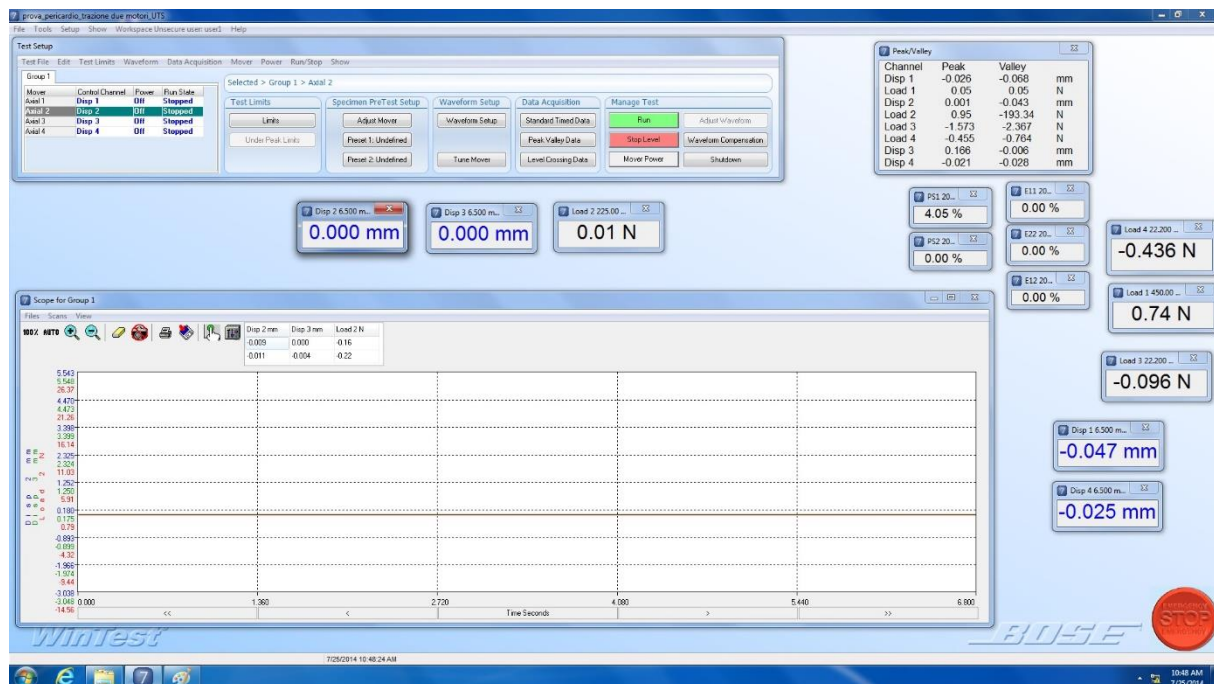


Figura 2.4: Interfaccia del software WinTest.

Al termine di ogni prova si può procedere al salvataggio, con la possibilità di esportare i dati relativi ad ogni campione in formato .csv e .txt per successive elaborazioni ed analisi.

Un primo criterio di esclusione è stato applicato a partire dalla fase di acquisizione dei dati, mediante l'osservazione in tempo reale dei grafici, in modo da scartare preventivamente i campioni che presentavano comportamenti anomali (rottture o scivolamento dalle grips).

2.3.3 Prova di trazione

Per caratterizzare le proprietà meccaniche dei tessuti in esame si applicano test di trazione monoassiale. Per ogni condizione di prova sono stati utilizzati 9 campioni da 3 pericardi provenienti da animali diversi. Sono state applicate quattro tipologie di prove di trazione:

- **UTS:** prova a rottura, il campione viene deformato fino a giungere la rottura (Figura 2.5). Il protocollo impostato per ciascun motore è il seguente:
 - Ramp to Level 0.5 mm/s to 2.5 mm con controllo sul Displacement.

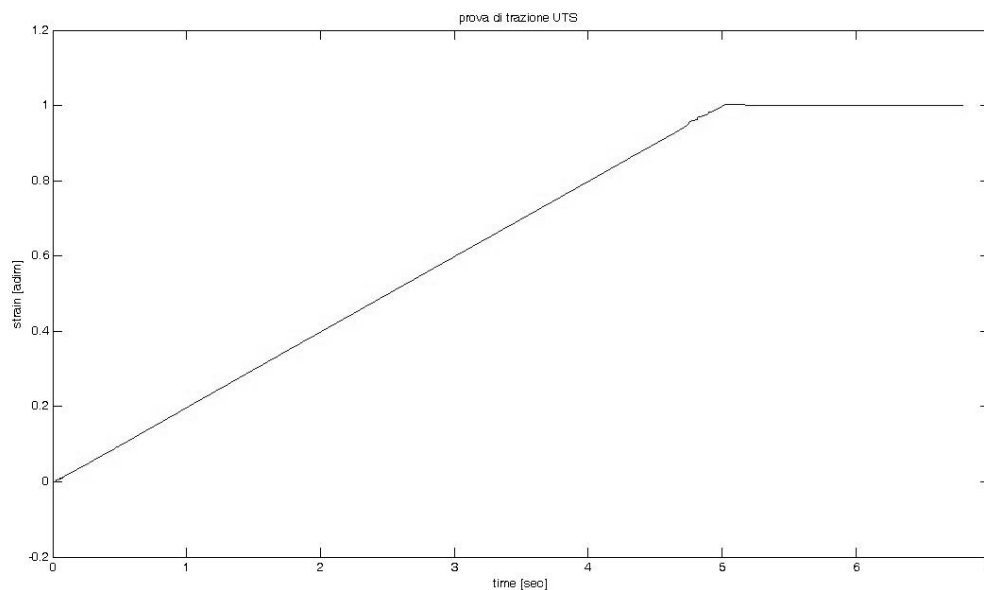


Figura 2.5: Forma d'onda registrata dal displacement nella prova UTS.

- **UTS con preconditionamento:** il campione viene preconditionato a diverse ampiezze e poi portato a rottura (Figura 2.6):
 - UTS con preconditionamento al 20%, il protocollo per ciascun motore è:
 - Ramp to Level 0.5 mm/s to 0.5 mm con controllo sul Displacement;
 - Ramp to Level 0.5 mm/s to 0 mm con controllo sul Displacement;
 - Repeat 5 times;
 - Ramp to Level 0.5 mm/s to 2.5 mm con controllo sul Displacement.
 - UTS con preconditionamento al 30%, il protocollo per ciascun motore è:
 - Ramp to Level 0.5 mm/s to 0.75 mm con controllo sul Displacement;
 - Ramp to Level 0.5 mm/s to 0 mm con controllo sul Displacement;
 - Repeat 5 times;

- Ramp to Level 0.5 mm/s to 2.5 mm con controllo sul Displacement.
- UTS con preconditionamento al 40%, il protocollo per ciascun motore è:
 - Ramp to Level 0.5 mm/s to 1 mm con controllo sul Displacement;
 - Ramp to Level 0.5 mm/s to 0 mm con controllo sul Displacement;
 - Repeat 5 times;
 - Ramp to Level 0.5 mm/s to 2.5 mm con controllo sul Displacement.
- UTS con preconditionamento al 50%, il protocollo per ciascun motore è:
 - Ramp to Level 0.5 mm/s to 1.25 mm con controllo sul Displacement;
 - Ramp to Level 0.5 mm/s to 0 mm con controllo sul Displacement;
 - Repeat 5 times;
 - Ramp to Level 0.5 mm/s to 2.5 mm con controllo sul Displacement.

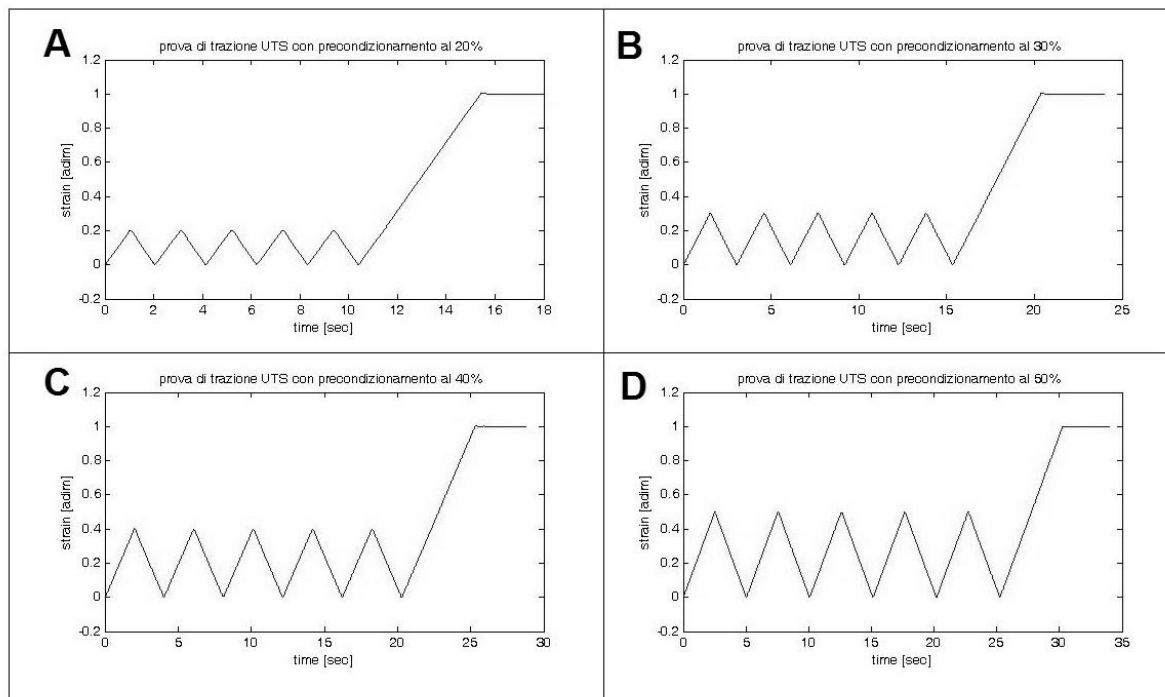


Figura 2.6: Forme d'onda del displacement per le prove con: A, preconditionamento al 20%; B, preconditionamento al 30%; C, preconditionamento al 40%; D, preconditionamento al 50%.

- **UTS con 1 ciclo di preconditionamento:** il campione viene preconditionato con 1 ciclo ad ampiezze crescenti (20%, 30%, 40%, 50%) e poi portato a rottura (Figura 2.7), il protocollo per ciascun motore è:

- Ramp to Level 0.5 mm/s to 0.5 mm con controllo sul Displacement;
- Ramp to Level 0.5 mm/s to 0 mm con controllo sul Displacement;
- Ramp to Level 0.5 mm/s to 0.75 mm con controllo sul Displacement;
- Ramp to Level 0.5 mm/s to 0 mm con controllo sul Displacement;
- Ramp to Level 0.5 mm/s to 1 mm con controllo sul Displacement;
- Ramp to Level 0.5 mm/s to 0 mm con controllo sul Displacement;
- Ramp to Level 0.5 mm/s to 1.25 mm con controllo sul Displacement;
- Ramp to Level 0.5 mm/s to 0 mm con controllo sul Displacement;
- Ramp to Level 0.5 mm/s to 2.5 mm con controllo sul Displacement.

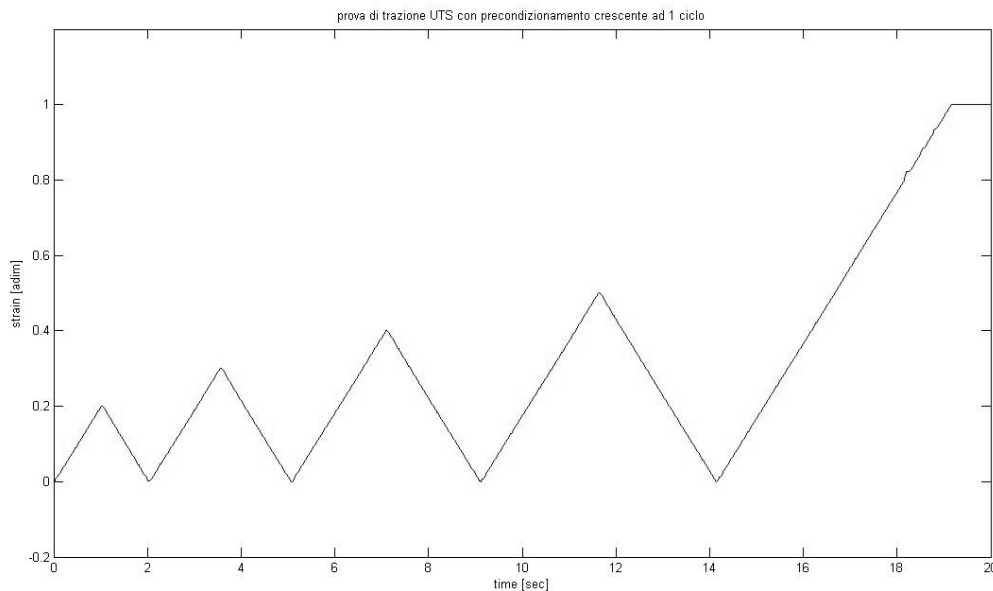


Figura 2.7: Forma d'onda del displacement per la prova UTS con preconditionamento crescente ad 1 ciclo.

- **UTS con 5 cicli di preconditionamento:** il campione viene preconditionato con 5 cicli ad ampiezze crescenti (20%, 30%, 40%, 50%) e poi portato a rottura (Figura 2.8), il protocollo per ciascun motore è:
 - Ramp to Level 0.5 mm/s to 0.5 mm con controllo sul Displacement;
 - Ramp to Level 0.5 mm/s to 0 mm con controllo sul Displacement;
 - Repeat 5 times;
 - Ramp to Level 0.5 mm/s to 0.75 mm con controllo sul Displacement;
 - Ramp to Level 0.5 mm/s to 0 mm con controllo sul Displacement;

- Repeat 5 times;
- Ramp to Level 0.5 mm/s to 1 mm con controllo sul Displacement;
- Ramp to Level 0.5 mm/s to 0 mm con controllo sul Displacement;
- Repeat 5 times;
- Ramp to Level 0.5 mm/s to 1.25 mm con controllo sul Displacement;
- Ramp to Level 0.5 mm/s to 0 mm con controllo sul Displacement;
- Repeat 5 times;
- Ramp to Level 0.5 mm/s to 2.5 mm con controllo sul Displacement.

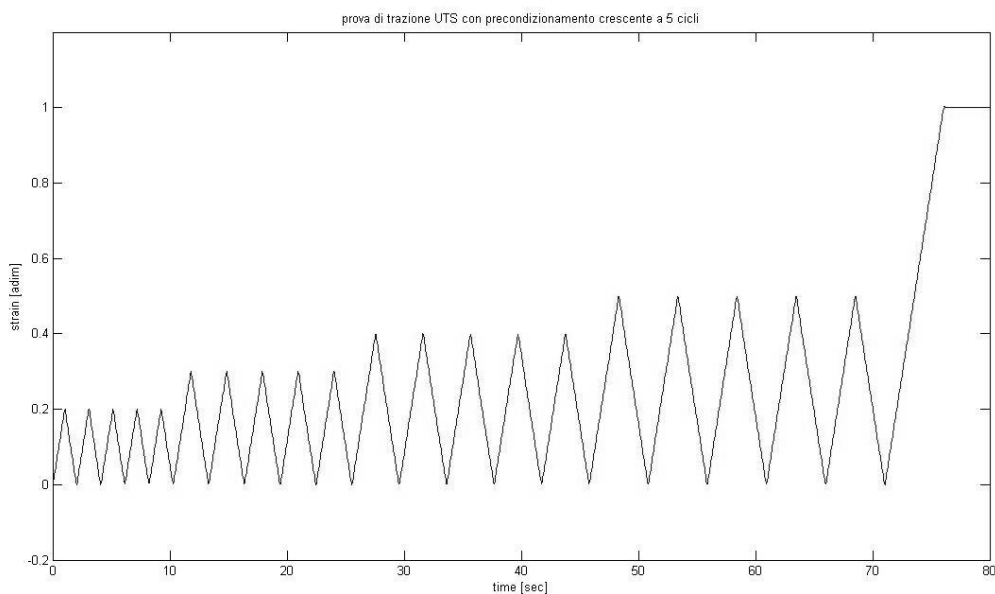


Figura 2.8: Forma d'onda del displacement per la prova UTS con preconditionamento crescente a 5 cicli.

2.4 Analisi dei dati

I dati esportati dal software WinTest forniscono i parametri della prova relativi: al tempo di ogni prova (*time*) in secondi, al movimento di entrambi i motori (*disp*) in mm, ed alla sollecitazione registrata dalla cella di carico (*load*) in Newton. Questi dati vengono esportati ed elaborati con *Matlab*.

Inizialmente sono stati ottenuti i valori di stress σ (MPa):

$$\sigma = \frac{load}{A}$$

calcolando l'area come $A = l_a \cdot s$, con la larghezza l_a e lo spessore s del campione ottenuti durante la preparazione.

I valori di ε (adim) sono stati calcolati come:

$$\varepsilon = \frac{l_u - l_0}{l_0}$$

con l_0 lunghezza iniziale del campione, corrispondente alla distanza tra le grips, e l_u lunghezza maturata durante la prova calcolata come: $l_u = disp + l_0$.

Sono stati inoltre calcolati dei parametri caratteristici di ogni prova utili per il confronto e la valutazione dei risultati ottenuti (Figura 2.9):

- **UTS (MPa):** (*Ultimate Tensile Strength*) rappresenta il punto tensionale di rottura, viene calcolato come il massimo valore di tensione raggiunto dal campione durante la prova;
- **Failure strain (adim):** rappresenta il valore di deformazione ultima, è calcolato come il dato di deformazione corrispondente a UTS.

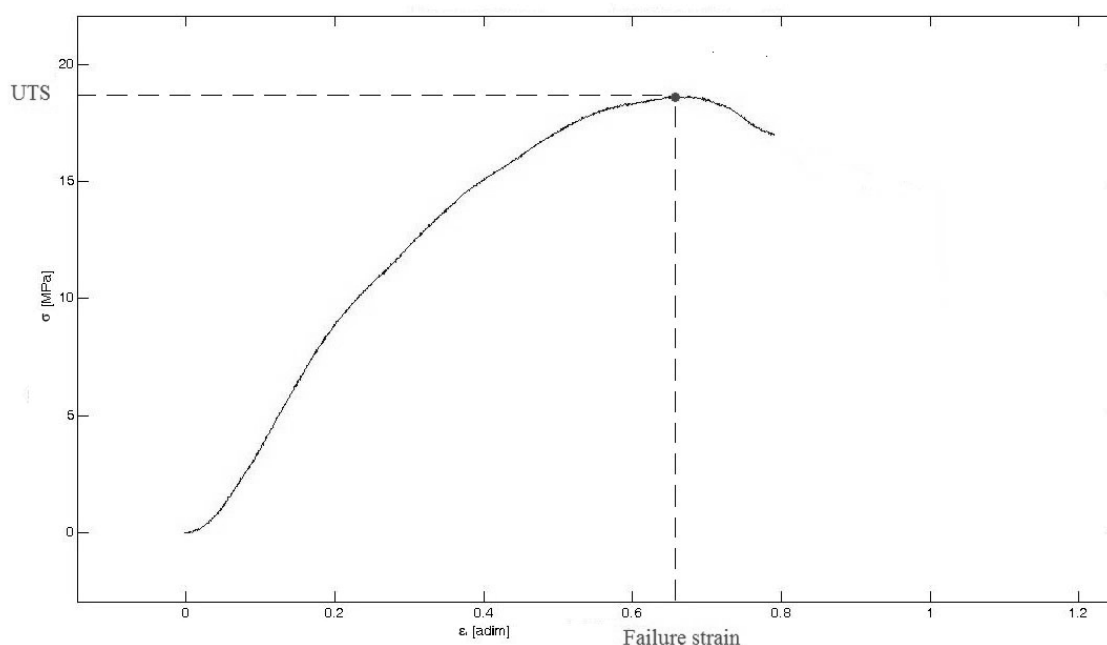


Figura 2.9: Identificazione di UTS e Failure strain.

2.4.1 Modulo elastico

Un indice di importanza determinante nella caratterizzazione del comportamento meccanico di un materiale è il modulo elastico o modulo di Young. Si è rivelato, quindi, necessario sviluppare un metodo per il calcolo di tale parametro da applicare indistintamente a tutte le prove, permettendone il confronto. Osservando le curve tensione-deformazione (*stress-strain*) ottenute dagli esperimenti si può notare come ognuna di esse presenti un cambiamento netto della pendenza (*inflection point*) che le divide in due parti. Partendo da questa osservazione sono stati calcolati due diversi moduli elastici (E_1 e E_2) riconducibili a diverse rigidità del

tessuto. La pendenza della curva è stata rappresentata punto per punto lungo il corso della prova (Figura 2.10), quindi sono stati calcolati i due parametri come i valori di modulo elastico più “ricorrenti” nelle porzioni di curva separate dal punto di flesso. In altre parole, è stato calcolato E_1 , il valore di modulo elastico rappresentativo della rigidità del campione nella prima parte della curva, prima del punto di flesso; è stato calcolato E_2 rappresentativo della rigidità del campione nella seconda parte della curva, dopo il punto di flesso e prima della rottura (Figura 2.11).

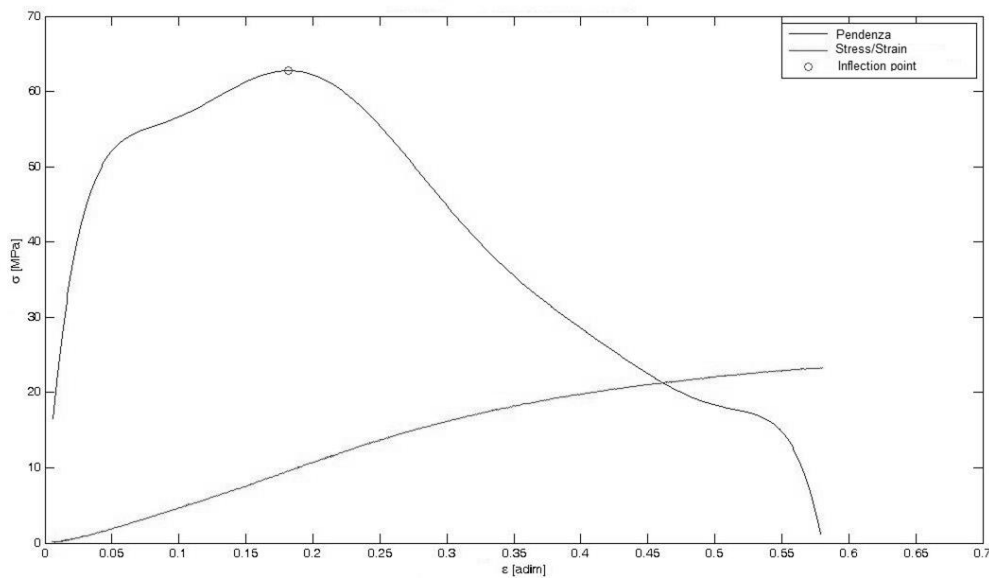


Figura 2.10: Rappresentazione pendenza della prova punto per punto.

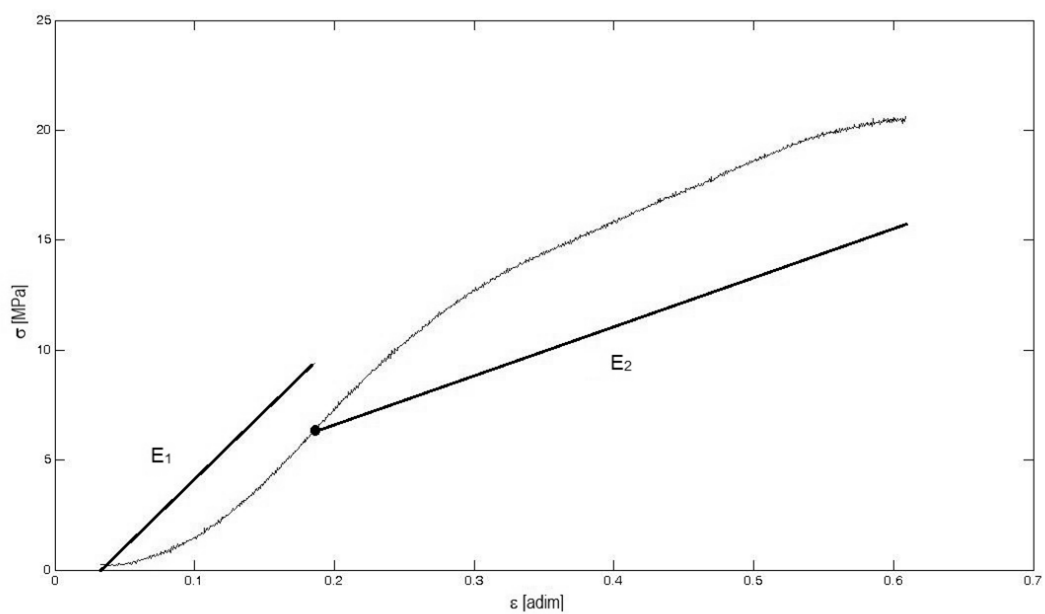


Figura 2.11: Calcolo moduli elastici E_1 e E_2 .

2.4.2 Analisi Statistiche

Per tutti i parametri di interesse sono stati calcolati i valori medi, le deviazioni standard (SD) e le mediane utilizzando Microsoft Excel 2013. Inoltre, a supporto delle valutazioni fatte sui dati, sono stati effettuati alcuni test statistici per valutare la significatività delle differenze nei parametri calcolati.

T-Test

La T di student (o T-test) è una procedura di statistica inferenziale utilizzata per determinare se le medie di due gruppi di dati uniformi appartengano o meno alla stessa popolazione. La formula per il calcolo della T-test tiene conto di 2 parametri: l'ampiezza della differenza tra le medie e l'ampiezza dell'errore standard. Più la differenza tra le due medie è alta, più è probabile che essa sia significativa; viceversa, più è elevata la variabilità dei dati (quindi l'errore della stima) più è bassa la probabilità che le differenze osservate tra le medie siano significative. Viene utilizzato come discriminante un livello di significatività (*p-value*) $p = 0.05$.

ANOVA test

Per effettuare un'ulteriore analisi statistica, è stato utilizzato il test ANOVA a due vie. Tale test, infatti, rappresenta una tecnica statistica che analizza il modo in cui il valore medio di una variabile è influenzato da classificazioni di vario tipo dei dati. Come per il T-test, è stato preso come discriminante di significatività il valore 0.05.

3 Risultati e discussione

3.1 Prove UTS

3.1.1 Pericardio porcino

Si riportano nel seguito i risultati ottenuti nel corso delle prove a trazione eseguite su campioni di pericardio porcino, nativo e decellularizzato, secondo i protocolli descritti nel precedente capitolo.

Porcino nativo

	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
Media	24.8794	0.6168	0.1199	71.5898	27.8697	0.1618
SD	7.8794	0.1550	0.0371	27.2026	19.3311	0.0494
Mediana	26.4394	0.6268	0.1220	62.4223	22.5582	0.1750

Tabella 3.1: Prove UTS porcino nativo.

Porcino decellularizzato

	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
Media	19.2731	0.4691	0.1115	63.0779	42.7719	0.1797
SD	6.1076	0.0904	0.0302	21.9948	26.3019	0.0216
Mediana	1.3131	0.4706	0.1120	59.4810	33.7814	0.1810

Tabella 3.2: Prove UTS porcino decellularizzato.

Analisi statistica tra porcino nativo e decellularizzato.

	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
p_value	0.1108	0.0251	0.6085	0.4760	0.1897	0.3345

Tabella 3.3: Test di Student per le prove UTS per pericardio porcino.

3.1.2 Pericardio bovino

Si riportano nel seguito i risultati ottenuti nel corso delle prove a trazione eseguite su campioni di pericardio bovino, nativo e decellularizzato, secondo i protocolli descritti nel precedente capitolo.

Bovino nativo

	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
Media	17.2699	0.6960	0.1152	51.3781	18.4210	0.3272
SD	2.4498	0.1388	0.0401	13.8481	10.3813	0.0297
Mediana	17.7122	0.6568	0.0946	47.2002	19.8405	0.3370

Tabella 3.4: Prove UTS bovino nativo.

Bovino decellularizzato

	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
Media	15.2542	0.5719	0.1307	48.6695	20.6448	0.3146
SD	3.6518	0.0628	0.0333	14.7301	9.9013	0.0466
Mediana	14.5313	0.5850	0.1264	46.3151	21.7818	0.3160

Tabella 3.5: Prove UTS bovino decellularizzato.

Analisi statistica tra bovino nativo e decellularizzato.

	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
p_value	0.188	0.0264	0.3842	0.6931	0.6482	0.5012

Tabella 3.6: Test di Student per le prove UTS nel pericardio bovino.

3.1.3 Discussione risultati

Si può notare (Tabella 3.1, Tabella 3.2, Tabella 3.4 e Tabella 3.5) come il pericardio porcino raggiunga, a rottura, tensioni più alte (MPa) del bovino ma con deformazioni inferiori (%). Osservando i moduli elastici si può vedere, inoltre, una rigidità molto maggiore nel pericardio porcino rispetto al bovino che presenta però SD contenute. In generale, è riscontrabile nel pericardio porcino una minor riproducibilità delle misure: le deviazioni standard sono mediamente superiori a quelle del pericardio bovino. Dai p-value ottenuti mediante Test di Student (Tabella 3.7 e Tabella 3.8) non si riscontrano differenze significative tra porcino e bovino, ad eccezione del valore di UTS nel confronto tra porcino e bovino nativi

($p = 0.0137$) e del valore di E_2 nel confronto tra porcino e bovino decellularizzati ($p = 0.0312$).

L'effetto della decellularizzazione comporta in entrambi i pericardi un abbassamento delle prestazioni, sebbene nel porcino questo dato sia più accentuato. Per quanto riguarda i moduli elastici, si nota nel pericardio porcino un aumento dell'elasticità nella parte iniziale (E_1) e un aumento della rigidità (più apprezzabile nelle mediane) nella parte finale (E_2). Le misure, inoltre, acquistano riproducibilità con una sensibile diminuzione della SD. Nel pericardio bovino, invece, si conservano i valori di E_1 e E_2 . Dai p-value ottenuti mediante Test di Student non si riscontrano differenze significative tra nativo e decellularizzato tranne sulla deformazione ultima (vedi Tabella 3.3 e Tabella 3.6).

È interessante notare che il valore dei punti di flesso ($\sim 11\%$) si conserva in entrambi in tessuti, sia nativi che decellularizzati: È possibile ipotizzare che il limite dell'11% di allungamento sia dovuto alla massima estensione delle fibre di collagene crimpate, che sono organizzate in modo simile nel bovino e nel porcino. Differenze nella rigidità potrebbero d'altra parte dipendere dalla diversa quantità di fibre collagene presenti nei due tessuti.

Analisi statistica tra porcino e bovino nativi.

	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E_1 [MPa]	E_2 [MPa]
p_value	0.0137	0.2704	0.8002	0.0644	0.2148

Tabella 3.7: Test di Student per le prove UTS per pericardio porcino e bovino nativo.

Analisi statistica tra porcino e bovino decellularizzati.

	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E_1 [MPa]	E_2 [MPa]
p_value	0.1096	0.0128	0.2185	0.122	0.0312

Tabella 3.8: Test di Student per le prove UTS per pericardio porcino e bovino decellularizzato.

Il test ANOVA a due vie (Tabella 3.9 e Tabella 3.10) evidenzia differenze significative dovute: alla decellularizzazione (riga D), alla differenza tra campioni appartenenti a diversi pericardi (riga P) e infine ad entrambi i contributi in maniera additiva (riga P+D).

Test ANOVA a due vie per il pericardio porcino.

	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]
D	0.0073	0.0173	0.5859	0.3843	0.1241
P	0.0003	0.376	0.7499	0.0173	0.022
P+D	0.0205	0.0926	0.0944	0.6493	0.7309

*Tabella 3.9: Test ANOVA per pericardio porcino con differenze per decellularizzazione (D) e pericardio (P).**Test ANOVA a due vie per il pericardio bovino.*

	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]
D	0.0968	0.0192	0.3234	0.6059	0.4964
P	0.0112	0.1483	0.1794	0.0534	0.0014
P+D	0.3844	0.2572	0.1145	0.0433	0.7656

Tabella 3.10: Test ANOVA per pericardio bovino con differenze per decellularizzazione (D) e pericardio (P).

Nel pericardio porcino è presente una differenza significativa nella tensione ultima UTS causata da entrambi i contributi, anche in maniera additiva. È chiara, inoltre, una differenza significativa in quasi tutti i parametri di interesse causata dalla differenza tra i diversi pericardi, in accordo con le constatazioni fatte sulla bassa riproducibilità in questa specie.

Si può osservare, poi, una differenza significativa della deformazione ultima dovuta alla decellularizzazione che interessa entrambi i tessuti: nel porcino $p = 0.0173$ e nel bovino $p = 0.0192$. Nel pericardio bovino non è apprezzabile alcun “trend” significativo tale da poter trarre delle conclusioni.

3.2 Prove UTS con precondizionamento

Si riportano nel seguito i risultati ottenuti nel corso delle prove a trazione con precondizionamento eseguite su campioni di pericardio porcino e bovino, nativo e decellularizzato, secondo i protocolli descritti nel precedente capitolo.

3.2.1 Pericardio porcino

Porcino nativo.

20%	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
Media	18.5503	0.5211	0.1787	70.9598	22.2605	0.1576
SD	5.2070	0.1833	0.0119	32.4844	13.8397	0.0427
Mediana	18.0180	0.4344	0.1817	78.0793	18.7535	0.1470
30%						
Media	22.0751	0.4752	0.2769	75.7980	44.3596	0.1371
SD	4.7769	0.1027	0.0066	26.0908	32.6427	0.0347
Mediana	22.6898	0.4672	0.2749	81.5800	34.5692	0.1350
40%						
Media	19.8604	0.5788	0.3775	60.9523	42.6410	0.1371
SD	3.8753	0.1196	0.0116	29.9208	43.7878	0.0347
Mediana	18.6835	0.5418	0.37623	45.5136	19.3697	0.1350
50%						
Media	20.6404	0.6082	0.4761	74.6770	74.5285	0.1542
SD	4.7724	0.0412	0.0155	22.8875	37.3561	0.0436
Mediana	22.3860	0.6034	0.4802	78.5423	84.9337	0.1790

Tabella 3.11: Prove UTS con preconditionamento per pericardio porcino nativo.

Porcino decellularizzato.

20%	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
Media	22.7973	0.5432	0.1815	77.7211	24.6621	0.1773
SD	4.6243	0.0945	0.008	44.7767	9.5803	0.0327
Mediana	23.641	0.5562	0.1768	93.9074	23.1803	0.1710
30%						
Media	18.8745	0.5848	0.2753	63.1215	15.0059	0.1794
SD	2.3314	0.1071	0.0089	30.6573	5.4416	0.0361
Mediana	18.4946	0.5822	0.2764	53.7029	14.8796	0.1920
40%						
Media	20.0857	0.6262	0.3758	54.1138	30.3886	0.1791
SD	4.9949	0.1019	0.0102	24.5900	31.8557	0.0288
Mediana	20.4912	0.636	0.3774	49.6558	17.9031	0.1840
50%						
Media	24.5932	0.6681	0.4778	75.3417	53.6675	0.1743
SD	8.0424	0.09844	0.012	33.7868	51.9155	0.0226
Mediana	23.6926	0.6612	0.4822	67.4227	23.4333	0.1770

Tabella 3.12: Prove UTS con preconditionamento per pericardio porcino decellularizzato.

Analisi statistica per pericardio porcino nativo e decellularizzato:

	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
p_value 20%	0.0860	0.7521	0.5557	0.7187	0.6743	0.2861
p_value 30%	0.0897	0.0416	0.6766	0.3589	0.0171	0.0220
p_value 40%	0.9162	0.3790	0.7547	0.6036	0.5070	0.0886
p_value 50%	0.2229	0.1115	0.7865	0.9616	0.3424	0.1825

Tabella 3.13: Test di Student per le prove UTS con preconditionamento per pericardio porcino nativo e decellularizzato.

3.2.2 Pericardio bovino

Bovino nativo.

20%	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
Media	17.6839	0.6142	0.1810	51.1073	12.1974	0.3269
SD	6.0726	0.1413	0.01	31.9413	3.1790	0.0542
Mediana	19.2766	0.546	0.1844	56.1463	11.3603	0.3390
30%						
Media	15.1015	0.6346	0.2729	47.0486	9.8832	0.3271
SD	3.4743	0.0916	0.0057	32.6050	5.5545	0.0425
Mediana	13.6179	0.6022	0.2732	24.4912	7.1511	0.3370
40%						
Media	15.4004	0.7378	0.3662	40.1735	10.1785	0.3369
SD	3.1235	0.1537	0.0104	28.8298	4.6382	0.0519
Mediana	16.273	0.713	0.3701	37.6073	8.5094	0.3310
50%						
Media	14.5325	0.6964	0.4754	41.2870	5.8126	0.3352
SD	3.0813	0.0946	0.0082	33.7597	2.0847	0.0353
Mediana	14.3323	0.6636	0.4738	32.0041	5.2526	0.3330

Tabella 3.14: Prove UTS con preconditionamento per pericardio bovino nativo.

Bovino decellularizzato.

20%	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
Media	16.3197	0.5500	0.1847	57.8930	19.4149	0.2990
SD	1.7264	0.1336	0.0087	23.9143	5.7852	0.0393
Mediana	15.8544	0.5058	0.1814	57.2648	21.2538	0.3160
30%						
Media	17.1793	0.6067	0.2744	47.2924	14.8382	0.2898
SD	4.9779	0.1755	0.0113	17.7966	6.5891	0.0385
Mediana	17.2611	0.5684	0.278	44.2130	15.8930	0.2980
40%						
Media	13.6890	0.5623	0.3786	50.3958	29.6116	0.3102
SD	3.6875	0.1446	0.0123	20.1453	25.9340	0.0407
Mediana	12.8769	0.5380	0.3804	44.0768	14.6697	0.3140
50%						
Media	15.8861	0.6894	0.4721	48.1820	20.1685	0.3307
SD	4.4649	0.1122	0.0071	23.4274	24.3096	0.0439
Mediana	16.2676	0.6884	0.4735	52.0482	8.5429	0.3180

Tabella 3.15: Prove UTS con preconditionamento per pericardio bovino decellularizzato.

Analisi statistica per bovino nativo e decellularizzato.

	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
p-value 20%	0.5260	0.3365	0.4125	0.6169	0.0047	0.2294
p-value 30%	0.3198	0.6789	0.7324	0.9845	0.1038	0.0686
p-value 40%	0.3038	0.0239	0.0354	0.2598	0.0459	0.2429
p-value 50%	0.4650	0.8891	0.3706	0.8170	0.1490	0.6351

Tabella 3.16: Test di Student per le prove UTS con preconditionamento per pericardio bovino nativo e decellularizzato.

3.2.3 Discussione risultati

I risultati delle prove a trazione con preconditionamento (Tabella 3.11, Tabella 3.12, Tabella 3.14 e Tabella 3.15) nel pericardio bovino confermano i risultati ottenuti con le prove a rottura per quanto riguarda i valori di deformazione ultima (Failure strain); i valori di tensione ultima (UTS) invece aumentano dopo la decellularizzazione. Il pericardio porcino presenta, rispetto alle prove UTS, un incremento medio nei valori di tensione e deformazione dopo la decellularizzazione.

Non è facile commentare i valori dei moduli elastici per le prove con preconditionamento a causa di una scarsa riproducibilità dei risultati, sia nel pericardio porcino che bovino. Le deviazioni standard, molto alte, impediscono osservazioni adeguate a causa, probabilmente, della variabilità della risposta del tessuto a cicli di preconditionamento a grandi ampiezze (40%, 50%). Tuttavia, si possono confermare le valutazioni espresse nelle prove a rottura UTS, cioè una rigidità maggiore da parte del pericardio porcino.

Dai valori di p-value calcolati con il Test di Student, si nota che nel pericardio porcino (Tabella 3.13) c'è una significativa differenza tra pre- e post-decellularizzazione in un valore di deformazione ultima ($p = 0.0416$ al 30%).

Nel pericardio bovino (Tabella 3.16) si riscontra una differenza significativa solo in un valore di deformazione ($p = 0.0239$ al 40%). Nei valori dei moduli elastici si può notare che le uniche differenze significative indotte dalla decellularizzazione, sia nel pericardio porcino che bovino, si trovano nel parametro E_2 , relativo alla pendenza della seconda parte della curva stress-strain, che è caratterizzata da una maggiore variabilità.

Dopo il preconditionamento varia molto la modalità in cui il campione giunge a rottura: alcune prove presentano una lunga fase plastica (E_2 basso) mentre altre no (E_2 alto). Questo comportamento spiega anche le alte SD.

Tra porcino e bovino nativi (Tabella 3.17) ci sono differenze significative in quasi tutti i parametri a partire dal preconditionamento al 30%, mentre la decellularizzazione (Tabella 3.18) avvicina i due tessuti: le differenze significative riguardano i soli valori di tensione ultima (UTS).

Va peraltro fatto notare che nelle prove con preconditionamento il valore del punto di flesso viene misurato sull'ultima curva, a preconditionamento eseguito. Di conseguenza il valore del punto di flesso nelle precedenti tabelle assume valori assai vicini a quelli della estensione imposta al campione durante i cicli di preconditionamento e perciò inevitabilmente diversi dal valore dell'11% misurato nelle prove UTS (vedi paragrafo 3.1).

Analisi statistica tra porcino e bovino nativi.

	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]
p-value 20%	0.7495	0.245	0.658	0.2096	0.0494
p-value 30%	0.0027	0.0031	0.1922	0.0555	0.0065
p-value 40%	0.0162	0.0262	0.0453	0.1463	0.0422
p-value 50%	0.0053	0.0208	0.9179	0.0218	0.0000

Tabella 3.17: Test di Student per le prove UTS con preconditionamento per pericardio porcino e bovino nativi.

Analisi statistica tra porcino e bovino decellularizzati.

	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]
p-value 20%	0.0012	0.9027	0.4287	0.2584	0.1787
p-value 30%	0.3686	0.7535	0.8509	0.1991	0.9538
p-value 40%	0.007	0.2944	0.6142	0.7303	0.9554
p-value 50%	0.0118	0.6737	0.2353	0.065	0.0987

Tabella 3.18: Test di Student per le prove UTS con preconditionamento per pericardio porcino e bovino decellularizzati.

Il test ANOVA a due vie viene applicato per evidenziare differenze significative:

- causate dalla decellularizzazione (riga D), dall'appartenenza a pericardi diversi (riga P) e da entrambi i contributi in maniera additiva (riga P+D) (Tabella 3.19 e Tabella 3.21);
- provocate dalla decellularizzazione (riga D), dal variare dell'ampiezza dei cicli di preconditionamento (riga C) e da entrambi i contributi in maniera additiva (riga D+C) (Tabella 3.20 e Tabella 3.22).

Test ANOVA a due vie per il pericardio porcino.

	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]
D	0,2533	0,0312	0,9889	0,6223	0,0711
P	0,0282	0,5607	0,0635	0,0005	0,5083
P+D	0,0703	0,0608	0,9980	0,0025	0,1300

Tabella 3.19: Test ANOVA per prove UTS con preconditionamento per pericardio porcino con differenze per decellularizzazione (D) e pericardio (P).

	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]
D	0,2768	0,0272	0,8870	0,6836	0,0536
C	0,4227	0,0100	0,0000	0,3166	0,0020
D+C	0,0987	0,6947	0,8936	0,8022	0,5058

Tabella 3.20: Test ANOVA per prove UTS con preconditionamento per pericardio porcino con differenze per decellularizzazione (D) e cicli (C).

Test ANOVA a due vie per il pericardio bovino:

	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]
D	0,9179	0,0444	0,8904	0,3319	0,0007
P	0,0018	0,7031	0,0571	0,1879	0,9236
D+P	0,1465	0,8097	0,9986	0,5000	0,8054

Tabella 3.21: Test ANOVA per prove UTS con preconditionamento per pericardio bovino con differenze per decellularizzazione (D) e pericardio (P).

	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]
D	0,9256	0,0331	0,1154	0,3512	0,0004
C	0,2877	0,0958	0,0000	0,6819	0,2955
D+C	0,3938	0,2452	0,1009	0,9567	0,3384

Tabella 3.22: Test ANOVA per prove UTS con preconditionamento per pericardio bovino con differenze per decellularizzazione (D) e cicli (C).

Da questi risultati si può notare che in entrambi i tessuti il valore di deformazione ultima, come nelle prove UTS, presenta una differenza significativa dovuta alla decellularizzazione. Il punto di flesso, misurato dopo aver applicato il preconditionamento, varia significativamente al variare dei cicli (p nullo). Nel pericardio porcino si ha una differenza significativa al variare dell'ampiezza del ciclo di preconditionamento anche per la deformazione ultima.

3.3 Il preconditionamento

Per quanto concerne il ruolo del preconditionamento nelle prove meccaniche, ci sono pareri discordanti [68]. È utilizzato da alcuni ricercatori poiché si ritiene che esso crei nel tessuto uno "stato" riproducibile, ma in condizioni molto diverse tra loro in termini di deformazione applicata e modalità di carico (frequenza e numero dei cicli). Vinci et al. applicano ai campioni un preconditionamento al 15% di deformazione a rottura stimata con una velocità di 0.17 mm/s, per 6-8 cicli fino a quando le curve carico-scarico risultano sovrapposte [69]. Gauvin et al. invece utilizzano un preconditionamento al 10% della deformazione a rottura stimata per 3 cicli [70]. Tedder et al. e Sun et al. applicano 10 cicli di preconditionamento (*equi biaxial stress state*) [71,72]. Come si può osservare, il preconditionamento non arriva mai ad interessare deformazioni che il campione raggiungerà nella prova vera e propria. Per verificare gli effetti del preconditionamento sono stati confrontati i risultati delle prove a rottura (UTS) con quelli delle prove precedute da diversi stadi di preconditionamento (UTS preconditionato). Nelle seguenti tabelle sono esposti i relativi risultati.

Porcino nativo.

	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]
p-value 20%	0.0614	0.2488	0.9650	0.4893
p-value 30%	0.3744	0.0363	0.7420	0.2107
p-value 40%	0.1054	0.5679	0.2841	0.7429
p-value 50%	0.1861	0.8732	0.9082	0.0062

Tabella 3.23: Test di Student tra prove UTS e prove UTS con preconditionamento per pericardio porcino nativo.

Porcino decellularizzato.

	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]
p-value 20%	0.1865	0.1086	0.3916	0.0701
p-value 30%	0.8571	0.0247	0.9973	0.0069
p-value 40%	0.7613	0.0032	0.5872	0.5452
p-value 50%	0.1336	0.0004	0.3688	0.7182

Tabella 3.24: Test di Student tra prove UTS e prove UTS con preconditionamento per pericardio porcino decellularizzato.

Bovino nativo.

	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]
p-value 20%	0.8519	0.2332	0.9817	0.1048
p-value 30%	0.1455	0.2839	0.7187	0.0449
p-value 40%	0.1769	0.5533	0.1781	0.0348
p-value 50%	0.0533	0.9950	0.6062	0.0115

Tabella 3.25: Test di Student tra prove UTS e prove UTS con preconditionamento per pericardio bovino nativo.

Bovino decellularizzato.

	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]
p-value 20%	0.4403	0.6621	0.3392	0.7518
p-value 30%	0.3634	0.5824	0.8603	0.1624
p-value 40%	0.3790	0.8573	0.6881	0.4450
p-value 50%	0.7466	0.0144	0.7810	0.5328

Tabella 3.26: Test di Student tra prove UTS e prove UTS con preconditionamento per pericardio bovino decellularizzato.

Sono state inoltre effettuate due ulteriori tipologie di test nel corso dei quali il campione è stato preconditionato a deformazioni crescenti (20%, 30%, 40%, 50% della lunghezza iniziale) per 1 ciclo (UTS1precond) e per 5 cicli (UTS5precond), e poi portato a rottura.

Porcino nativo.

		UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]
UTS1precond	Media	22.857	0.649	0.096	59.279	36.792
	SD	9.275	0.099	0.037	18.182	20.538
	Mediana	22.582	0.623	0.085	48.639	28.108
UTS5precond	Media	29.124	0.632	0.096	101.436	39.454
	SD	1.520	0.003	0.006	8.750	5.674
	Mediana	29.764	0.632	0.096	99.522	39.489

Tabella 3.27: Prove UTS con 1 ciclo di preconditionamento e UTS con 5 cicli di preconditionamento per porcino nativo.

Porcino decellularizzato.

		UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]
UTS1precond	Media	19.946	0.548	0.125	71.778	63.943
	SD	7.789	0.040	0.025	21.175	28.027
	Mediana	20.994	0.537	0.124	64.748	59.404
UTS5precond	Media	15.272	0.641	0.125	34.429	30.343
	SD	7.378	0.114	0.022	5.595	11.383
	Mediana	13.159	0.587	0.126	34.044	24.895

Tabella 3.28: Prove UTS con 1 ciclo di preconditionamento e UTS con 5 cicli di preconditionamento per porcino decellularizzato.

Bovino nativo.

		UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]
UTS1precond	Media	14.333	0.797	0.147	35.886	21.001
	SD	3.082	0.150	0.053	7.706	5.795
	Mediana	14.561	0.756	0.141	35.143	20.267
UTS5precond	Media	11.669	0.605	0.113	42.684	26.661
	SD	3.321	0.132	0.029	10.233	17.133
	Mediana	12.188	0.563	0.102	43.893	20.659

Tabella 3.29: Prove UTS con 1 ciclo di preconditionamento e UTS con 5 cicli di preconditionamento per bovino nativo.

Bovino decellularizzato.

		UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]
UTS1precond	Media	17.317	0.660	0.121	47.565	27.904
	SD	5.615	0.114	0.034	4.928	16.046
	Mediana	17.545	0.643	0.125	45.903	27.846
UTS5precond	Media	21.775	0.753	0.129	54.555	28.696
	SD	2.564	0.046	0.040	8.746	4.830
	Mediana	21.475	0.779	0.111	50.195	27.479

Tabella 3.30: Prove UTS con 1 ciclo di preconditionamento e UTS con 5 cicli di preconditionamento per bovino decellularizzato.

3.3.1 Discussione risultati

Dal confronto tra le prove a rottura (UTS) e le prove a rottura con preconditionamento (UTS preconditionato) nel pericardio porcino (Tabella 3.23 e Tabella 3.24) sono presenti differenze significative per quanto riguarda la deformazione ultima a partire dal preconditionamento al 30%. Nel pericardio bovino nativo (Tabella 3.25) si possono notare differenze significative solo nel modulo elastico E_2 compatibili con quanto detto in precedenza sulle prove con preconditionamento. Non sono presenti differenze significative tra prove UTS e UTS preconditionato per tutti i tessuti in esame sotto il 30% di deformazione. Nel pericardio bovino decellularizzato si presenta una differenza significativa relativa alla deformazione ultima solo in corrispondenza del 50% (Tabella 3.26).

Nelle successive tabelle si espongono i risultati della analisi statistica tra prove UTS, prove UTS con 1 ciclo di preconditionamento e prove UTS con 5 cicli di preconditionamento.

Porcino nativo.

p-value	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E_1 [MPa]	E_2 [MPa]
UTS1precond-UTS5precond	0.285	0.782	0.988	0.004	0.834
UTS-UTS1precond	0.625	0.606	0.123	0.678	0.877
UTS-UTS5precond	0.389	0.871	0.191	0.110	0.910

Tabella 3.31: Test di Student tra prove UTS, prove UTS con 1 ciclo di preconditionamento e prove UTS con 5 cicli di preconditionamento per pericardio porcino nativo.

Porcino decellularizzato.

p-value	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E_1 [MPa]	E_2 [MPa]
UTS1precond-UTS5precond	0.385	0.050	0.995	0.015	0.078
UTS-UTS1precond	0.8409	0.0291	0.259	0.3624	0.2013
UTS-UTS5precond	0.369	0.023	0.434	0.047	0.327

Tabella 3.32: Test di Student tra prove UTS, prove UTS con 1 ciclo di preconditionamento e prove UTS con 5 cicli di preconditionamento per pericardio porcino decellularizzato.

Bovino nativo.

p-value	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]
UTS1precond-UTS5precond	0.1869	0.0505	0.255	0.2087	0.3766
UTS-UTS1precond	0.040	0.159	0.193	0.026	0.940
UTS-UTS5precond	0.006	0.292	0.900	0.498	0.435

Tabella 3.33: Test di Student tra prove UTS, prove UTS con 1 ciclo di preconditionamento e prove UTS con 5 cicli di preconditionamento per pericardio bovino nativo.

Bovino decellularizzato.

p-value	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]
UTS1precond-UTS5precond	0.2234	0.211	0.7541	0.1056	0.9364
UTS-UTS1precond	0.3692	0.0589	0.3069	0.6083	0.9739
UTS-UTS5precond	0.018	0.001	0.699	0.275	0.912

Tabella 3.34: Test di Student tra prove UTS, prove UTS con 1 ciclo di preconditionamento e prove UTS con 5 cicli di preconditionamento per pericardio bovino decellularizzato.

Il test di Student permette di confrontare i dati ottenuti dalle prove UTS con 1 e 5 cicli di preconditionamento.

Per il pericardio porcino al variare del numero dei cicli di preconditionamento (Tabella 3.31 e Tabella 3.32) si riscontrano differenze significative per il parametro E₁ sia nel nativo che nel decellularizzato.

Nel confronto con le prove UTS si può notare una differenza significativa nella deformazione ultima, compatibile con la vicinanza dell'ultimo ciclo (50%) alla rottura di questo tessuto.

Per il pericardio bovino (Tabella 3.33 e Tabella 3.34) si possono notare differenze tra le prove UTS e le prove con 1 e 5 cicli di preconditionamento per quanto riguarda le tensioni a rottura: nel nativo rispettivamente $p = 0.040$ e $p = 0.006$; nel decellularizzato $p = 0.018$ tra UTS e UTS5precond.

Per quanto attiene il confronto tra le prove UTS con 1 e 5 cicli di preconditionamento, sono da sottolineare le seguenti due evidenze:

- nel pericardio bovino, la totale assenza di differenze significative tra tutti i valori misurati;
- nel pericardio porcino, la presenza di differenze significative nel solo parametro E₁: nel nativo $p = 0.004$, nel decellularizzato $p = 0.015$.

I risultati ottenuti permettono di stabilire che:

- il preconditionamento è utile solo se si impongono al campione deformazioni analoghe a quelle che verranno poi applicate durante la prova a trazione: se durante la prova a trazione il campione viene deformato oltre la soglia applicata nel preconditionamento, esso si comporta come un campione non preconditionato;
- è sufficiente un solo ciclo di preconditionamento.

Queste evidenze sperimentali permettono di ipotizzare che all'interno del tessuto sia presente un meccanismo di risposta "a catena" che consiste nell'attivazione progressiva degli elementi resistenti all'interno della matrice. Tali elementi resistenti esibiscono peraltro rigidità diversa e ciò consente di spiegare la particolare forma delle curve sforzo-deformazione del pericardio.

4 Conclusioni

Nella prospettiva di identificare materiali affidabili per la costruzione di valvole cardiache protesiche percutanee, i risultati ottenuti nel corso delle prove sperimentali eseguite per questo lavoro di tesi hanno permesso di valutare il comportamento meccanico a trazione di due tipi di tessuto: pericardio porcino e bovino, sia nativi che decellularizzati.

Da un lato il pericardio porcino, dato il minore spessore, potrebbe sembrare più adatto al tipo di applicazione, essendo richiesta la compressione della protesi durante la fase di *crimping* che immediatamente precede l'innesto chirurgico; dall'altro lato, il pericardio bovino, soprattutto decellularizzato, pur avendo maggiore spessore, esibisce una minore rigidità e in generale prestazioni meccaniche più riproducibili.

I risultati delle prove a trazione hanno inoltre permesso di indagare la risposta del pericardio porcino e di quello bovino alla sollecitazione meccanica: entrambi presentano curve di stress-strain la cui pendenza cambia in corrispondenza di un valore di deformazione pari all'11%. Questo comportamento permette di ipotizzare caratteristiche microstrutturali analoghe, legate al processo di *uncrimping* delle fibre collagene. La diversa rigidità dei due tessuti è d'altra parte attribuibile al diverso numero di fibre collagene presenti.

Le prove a trazione hanno avuto come ulteriore obiettivo lo studio degli effetti del preconditionamento, applicato con uno o più cicli di carico a diverse percentuali di deformazione. Si è potuto osservare che il preconditionamento, spesso utilizzato in letteratura, appare utile a conseguire uno stato maggiormente riproducibile nel tessuto solo se la deformazione indotta rientra nel medesimo intervallo della deformazione raggiunta nel corso della successiva prova a trazione. D'altra parte, l'applicazione di più cicli di preconditionamento non influisce in modo significativo sulle prestazioni del pericardio.

Altre indagini sperimentali dovranno, nel prossimo futuro, riguardare la caratterizzazione dei tessuti pericardici prima e dopo il processo di *crimping*, con lo scopo di valutare gli eventuali danni alle componenti della matrice per effetto della compressione.

APPENDICE

Prove UTS:

Porcino nativo:

Campione	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
1	26.4394	0.771	0.0742	50.494	30.009	0.176
2	32.8986	0.6268	0.1422	107.950	22.558	0.184
3	28.4756	0.8704	0.149	64.384	11.395	0.164
4	13.5417	0.445	0.122	45.347	24.278	0.208
5	20.6095	0.6088	0.1848	61.328	22.263	0.175
6	12.9986	0.66	0.1272	43.794	8.991	0.239
7	35.4035	0.4574	0.1182	116.764	64.838	0.095
8	24.5361	0.4152	0.0914	62.422	53.985	0.097
9	29.0113	0.697	0.0698	91.825	12.510	0.118

Tabella A 1: Prove UTS per pericardio porcino nativo.

Porcino decellularizzato:

Campione	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
1	17.3131	0.3474	0.1078	64.972	54.166	0.165
2	17.6667	0.4936	0.0982	56.350	37.060	0.14
3	12.0265	0.435	0.1616	38.424	16.225	0.176
4	15.0276	0.3698	0.0882	59.481	32.518	0.181
5	15.8990	0.549	0.0586	58.266	22.552	0.165
6	15.2222	0.6258	0.1192	30.080	19.231	0.21
7	30.5495	0.4706	0.112	101.893	85.453	0.182
8	23.5140	0.4022	0.1122	84.920	83.961	0.203
9	26.2393	0.5284	0.146	73.315	33.781	0.195

Tabella A 2: Prove UTS per pericardio porcino decellularizzato.

Bovino nativo:

Campione	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
1	21.8811	0.6472	0.1376	58.692	19.840	0.342
2	17.7739	0.6568	0.0814	40.864	33.199	0.283
3	17.7122	0.4490	0.0946	84.540	29.823	0.271
4	18.9590	0.8346	0.1492	47.200	14.462	0.333
5	18.6548	0.6510	0.1134	54.718	24.449	0.337
6	16.2824	0.7744	0.1998	40.096	23.407	0.347
7	14.4940	0.9378	0.0838	43.936	4.749	0.359
8	14.1294	0.6452	0.0822	44.583	4.199	0.335
9	15.5424	0.6682	0.0946	47.774	11.661	0.338

Tabella A 3: Prove UTS per pericardio bovino nativo.

Bovino decellularizzato:

Campione	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
1	17.7374	0.4968	0.1798	49.407	40.876	0.33
2	14.6748	0.6028	0.1186	41.792	21.782	0.328
3	14.1645	0.5724	0.159	46.315	24.980	0.389
4	22.9006	0.506	0.1128	79.106	24.907	0.208
5	17.0501	0.591	0.1264	57.668	11.461	0.313
6	14.5313	0.4926	0.1264	58.785	25.118	0.32
7	11.4119	0.6222	0.081	36.887	9.124	0.314
8	14.1139	0.678	0.1	35.673	15.413	0.316
9	10.7029	0.585	0.1726	32.392	12.142	0.313

Tabella A 4: Prove UTS per pericardio bovino decellularizzato.

Prove UTS con preconditionamento:*Porcino nativo.*

	Campione	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
20%	1	12.3293	0.3082	0.1918	79.2376	18.7535	0.166
	2	18.0180	0.8664	0.1767	69.8675	18.6029	0.222
	3	12.5624	0.428	0.1859	32.5397	10.0763	0.147
	4	16.6667	0.7036	0.1611	85.2808	1.4893	0.205
	5	23.4043	0.3486	0.1928	135.7535	36.6173	0.094
	6	14.1796	0.427	0.1848	78.0793	13.3797	0.193
	7	27.2271	0.5258	0.1723	45.3438	36.8118	0.113
	8	22.9604	0.4344	0.1817	30.2468	42.9873	0.143
30%	9	19.6049	0.6478	0.1609	82.2897	21.6260	0.135
	10	22.6898	0.7076	0.2749	44.9905	8.9885	0.202
	11	23.9548	0.5112	0.2755	63.9215	24.7937	0.177
	12	15.0939	0.375	0.2914	68.5346	75.2288	0.142
	13	18.6070	0.3582	0.2833	91.0254	88.0474	0.134
	14	17.4383	0.408	0.2701	32.4635	88.9644	0.108
	15	26.8395	0.4826	0.2715	83.2602	13.9109	0.135
	16	28.3489	0.4658	0.2733	109.5904	51.4544	0.107
40%	17	26.9203	0.4672	0.2745	106.8163	34.5692	0.092
	18	18.7835	0.5016	0.2774	81.5800	13.2788	0.137
	19	18.6835	0.4226	0.3916	53.3952	94.4419	0.119
	20	17.2366	0.7032	0.3666	23.8354	13.6576	0.193
	21	20.2599	0.67	0.3719	45.5136	11.7270	0.218
	22	16.8093	0.6686	0.3762	81.7527	6.1368	0.187
	23	22.9839	0.7504	0.3573	44.1297	19.3697	0.124
	24	14.6809	0.4982	0.3873	43.7067	22.8677	0.141
50%	25	23.8441	0.5418	0.3808	115.3275	16.7581	0.124
	26	17.6667	0.4858	0.3914	44.5839	72.1970	0.13
	27	26.5789	0.4686	0.3742	96.3256	126.6133	0.114
	28	23.4244	0.618	0.4883	91.7217	30.8291	0.183
	29	22.9609	0.6158	0.4859	86.4115	92.7094	0.179
	30	23.6132	0.675	0.4730	70.0857	11.5256	0.131
	31	14.8454	0.5692	0.4828	88.6519	89.6575	0.194
	32	14.7937	0.6664	0.4458	59.1202	58.4786	0.21
33	17.8957	0.5886	0.4802	64.4166	86.6212	0.179	
34	16.9444	0.5522	0.4966	27.5046	84.9337	0.12	
35	22.3860	0.585	0.4714	78.5423	76.5961	0.095	
36	28.9003	0.6034	0.4605	105.6387	139.4056	0.097	

Tabella A 5: Prove UTS con preconditionamento per pericardio porcino nativo.

Porcino decellularizzato.

	Campione	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
20%	1	20.6061	0.5138	0.1768	37.3445	19.6636	0.154
	2	23.6410	0.522	0.1848	35.5836	38.3569	0.13
	3	13.8702	0.5562	0.1876	18.3434	6.2867	0.149
	4	26.1345	0.6824	0.1764	93.9074	29.8222	0.238
	5	24.4737	0.5666	0.1746	122.7688	20.8233	0.19
	6	23.6869	0.5274	0.1746	111.3657	27.3678	0.198
	7	30.7018	0.6272	0.1837	135.5117	20.8896	0.171
	8	19.9333	0.3368	0.1985	106.1481	35.5689	0.2
	9	22.1285	0.5562	0.1769	38.5168	23.1803	0.166
30%	10	18.4946	0.4888	0.2766	97.2497	6.3531	0.155
	11	14.4213	0.4012	0.2926	43.3287	26.1546	0.144
	12	18.2090	0.5822	0.2651	34.2721	19.2882	0.134
	13	21.7484	0.7128	0.2698	108.4107	14.1049	0.204
	14	18.3489	0.5262	0.2810	53.7029	11.3909	0.214
	15	19.0278	0.5588	0.2697	90.1574	12.6860	0.192
	16	18.8462	0.6758	0.2764	27.9087	14.8796	0.234
	17	22.6154	0.7262	0.2651	34.9374	15.3098	0.195
	18	18.1585	0.5916	0.2814	78.1261	14.8864	0.143
40%	19	15.9491	0.5576	0.3813	56.0601	17.9031	0.144
	20	15.3298	0.7622	0.3639	22.1731	5.5123	0.187
	21	22.3179	0.4974	0.3835	80.8982	96.6446	0.151
	22	26.4815	0.6574	0.3606	64.5944	25.2179	0.216
	23	25.8696	0.7044	0.3674	99.8676	29.6035	0.184
	24	12.3529	0.466	0.3924	45.3483	69.5783	0.17
	25	20.4912	0.7282	0.3803	35.6121	13.7810	0.19
	26	24.0658	0.6264	0.3758	49.6558	13.8995	0.223
	27	17.9138	0.636	0.3774	32.8147	1.3575	0.147
50%	28	40.3132	0.7178	0.4638	95.7170	8.1647	0.149
	29	30.0000	0.7084	0.4690	106.9199	107.1094	0.177
	30	16.1963	0.5704	0.4878	57.0773	70.1758	0.163
	31	28.5816	0.6628	0.4643	119.8885	23.4333	0.188
	32	18.3167	0.6562	0.4942	43.5472	13.3200	0.2
	33	28.7079	0.559	0.4869	112.8087	157.9797	0.178
	34	19.2326	0.6612	0.4822	41.6774	22.1891	0.139
	35	23.6926	0.8832	0.4657	33.0168	12.1014	0.167
	36	16.2981	0.594	0.4868	67.4227	68.5344	0.208

Tabella A 6: Prove UTS con precondizionamento per pericardio porcino decellularizzato.

Bovino nativo.

	Campione	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
20%	1	28.4697	0.5072	0.1685	47.6679	7.3868	0.22
	2	19.2766	0.811	0.1679	61.3167	9.8468	0.341
	3	21.6410	0.5194	0.1929	16.8600	10.3604	0.26
	4	20.1770	0.6966	0.1775	87.5341	12.2889	0.339
	5	20.0201	0.8388	0.1849	78.4426	17.6282	0.331
	6	16.2203	0.5306	0.1866	90.2553	15.0210	0.351
	7	13.1990	0.546	0.1844	12.1039	15.1239	0.397
	8	7.7536	0.4378	0.1945	9.6384	10.7603	0.368
	9	12.3980	0.6404	0.1719	56.1463	11.3603	0.335
30%	10	20.7031	0.5754	0.2669	96.5981	7.1511	0.256
	11	18.5369	0.6022	0.2690	79.7956	6.0824	0.262
	12	13.6179	0.823	0.2640	24.4912	4.6293	0.328
	13	18.7009	0.7208	0.2758	77.6417	17.8768	0.331
	14	12.6163	0.6336	0.2732	11.8387	4.6062	0.344
	15	13.2754	0.6596	0.2780	67.1207	9.8999	0.345
	16	9.9802	0.5096	0.2828	20.6978	5.7417	0.337
	17	13.5304	0.5934	0.2732	21.4970	15.6579	0.389
	18	14.9527	0.5934	0.2732	23.7567	17.3038	0.352
40%	19	16.2730	0.5316	0.3729	39.5909	9.4827	0.254
	20	16.7491	0.6752	0.3718	35.6236	7.5360	0.283
	21	9.9673	0.6322	0.3733	42.6454	10.9488	0.306
	22	15.4222	0.836	0.3587	6.3179	10.1673	0.375
	23	18.7412	0.5498	0.3812	65.6419	17.5296	0.331
	24	17.6398	0.713	0.3701	81.3038	6.3447	0.322
	25	13.4527	0.8476	0.3545	17.4095	6.8366	0.391
	26	11.5819	0.898	0.3647	7.9124	6.3721	0.413
	27	18.7768	0.957	0.3489	67.5876	17.1592	0.357
50%	28	13.8573	0.6198	0.4799	36.0584	4.0816	0.299
	29	15.8240	0.6642	0.4738	40.8270	5.8876	0.269
	30	14.3323	0.6636	0.4680	44.3033	1.3222	0.327
	31	16.6228	0.852	0.4666	27.9499	8.8888	0.38
	32	18.2703	0.6396	0.4850	115.7015	9.0803	0.37
	33	18.0326	0.8654	0.4689	1.9354	3.8525	0.327
	34	9.4967	0.6564	0.4812	24.6059	4.2047	0.351
	35	14.0166	0.6872	0.4678	55.8930	5.5874	0.361
	36	10.3403	0.6192	0.4878	27.3248	4.9179	0.333

Tabella A 7: Prove UTS con preconditionamento per pericardio bovino nativo.

Bovino decellularizzato.

	Campione	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
20%	1	14.6483	0.612	0.2067	50.6894	21.2538	0.327
	2	15.6627	0.5112	0.1813	73.9574	22.5224	0.332
	3	18.1393	0.8556	0.1858	50.8889	6.1140	0.335
	4	15.4779	0.392	0.1841	85.0463	17.3727	0.286
	5	19.4100	0.4752	0.1814	36.9090	17.0994	0.226
	6	17.6694	0.5058	0.1777	89.3964	22.2689	0.246
	7	14.1222	0.4814	0.1788	57.2648	19.0554	0.3
	8	15.8927	0.616	0.1855	63.8294	26.4970	0.323
	9	15.8544	0.5004	0.1813	13.0557	22.5502	0.316
30%	10	18.1875	0.6264	0.2728	17.4857	16.8580	0.32
	11	18.4330	0.8494	0.2717	61.1616	14.1793	0.351
	12	15.9284	0.5684	0.2780	75.0311	15.8930	0.298
	13	28.0470	0.6778	0.2597	44.2130	25.1013	0.227
	14	12.9702	0.3982	0.2828	50.1565	18.6892	0.257
	15	18.4695	0.4996	0.2797	39.7604	17.3047	0.257
	16	15.4615	0.4996	0.2797	33.2847	14.4863	0.307
	17	9.8556	0.4404	0.2907	38.7906	0.9593	0.277
	18	17.2611	0.9008	0.2543	65.7479	10.0729	0.314
40%	19	12.7416	0.4582	0.3804	47.7881	59.9604	0.338
	20	12.8769	0.4578	0.3934	44.0768	56.2478	0.314
	21	14.1806	0.6132	0.3626	39.3930	7.6710	0.358
	22	19.7701	0.6178	0.3679	94.5226	14.6697	0.261
	23	11.8110	0.538	0.3810	35.8840	9.6910	0.254
	24	10.7500	0.4742	0.3895	35.7067	0.0861	0.28
	25	18.2342	0.9046	0.3620	72.4999	11.7256	0.37
	26	15.0831	0.5532	0.3769	47.7842	66.2949	0.301
	27	7.7532	0.4434	0.3936	35.9067	40.1575	0.316
50%	28	17.9270	0.5868	0.4797	62.6399	70.7307	0.283
	29	21.5548	0.7014	0.4685	54.2747	8.5429	0.313
	30	20.3063	0.9548	0.4588	4.9085	6.3535	0.37
	31	16.2676	0.6884	0.4735	65.8486	8.3374	0.284
	32	20.3915	0.7136	0.4650	83.3960	16.4188	0.281
	33	10.8595	0.5898	0.4795	52.0482	52.7280	0.318
	34	14.1644	0.6468	0.4744	51.4113	7.7672	0.361
	35	11.8127	0.715	0.4712	29.0100	9.5712	0.388
	36	9.6914	0.6084	0.4785	30.1008	1.0672	0.378

Tabella A 8: Prove UTS con precondizionamento per pericardio bovino decellularizzato.

UTS con 1 ciclo di preconditionamento:*Porcino nativo.*

Campione	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
1	27.9896	0.8050	0.1910	46.9333	52.2651	0.257
2	15.4633	0.7672	0.0680	37.0664	22.2808	0.241
3	21.5385	0.7000	0.0850	48.6392	28.1075	0.221
4	9.3905	0.5340	0.0930	46.6892	27.7107	0.175
5	25.0000	0.7042	0.0830	68.9016	16.7445	0.150
6	13.6111	0.5456	0.0740	48.4020	21.1363	0.180
7	30.8501	0.5960	0.1030	72.7586	57.8597	0.149
8	22.5819	0.5664	0.0910	69.8865	28.2022	0.173
9	39.2892	0.6232	0.0760	94.2372	76.8174	0.136

Tabella A 9: Prove UTS con 1 ciclo di preconditionamento per pericardio porcino nativo.

Porcino decellularizzato.

Campione	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
1	18.7146	0.5370	0.1216	56.2897	43.2079	0.153
2	22.2330	0.5290	0.1636	90.5058	77.3814	0.103
3	29.1039	0.5146	0.1619	116.7788	124.2613	0.093
4	17.5676	0.5174	0.1138	53.1313	59.4038	0.111
5	9.7321	0.5506	0.1260	50.8610	53.0039	0.112
6	7.2391	0.5450	0.0954	62.8276	48.1169	0.099
7	20.9938	0.5158	0.1243	64.7480	67.3498	0.161
8	30.4034	0.5876	0.1286	71.5535	77.0469	0.157
9	23.5283	0.6352	0.0919	79.3079	25.7191	0.171

Tabella A 10: Prove UTS con 1 ciclo di preconditionamento per pericardio porcino decellularizzato.

Bovino Nativo.

Campione	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
1	8.9737	0.7556	0.1940	35.1432	13.9873	0.367
2	12.5935	0.7038	0.1140	26.7672	20.0870	0.401
3	10.7227	0.5856	0.1790	32.5974	33.1617	0.369
4	18.0508	0.9996	0.1170	31.6158	20.9639	0.354
5	16.1368	0.8350	0.1410	38.1423	20.2671	0.346
6	15.7835	0.9344	0.1780	36.5739	25.2323	0.351
7	14.3776	0.7036	0.0720	42.8405	22.6449	0.316
8	14.5608	0.6630	0.2350	27.8152	18.0712	0.296
9	17.7936	0.9890	0.0950	51.4802	14.5947	0.281

Tabella A 11: Prove UTS con 1 ciclo di preconditionamento per pericardio bovino nativo.

Bovino decellularizzato.

Campione	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
1	9.6556	0.5546	0.0620	43.9372	4.9324	0.271
2	14.6545	0.5482	0.1470	52.1757	30.3546	0.275
3	26.6224	0.7654	0.1250	58.1061	31.2139	0.226
4	21.5912	0.8994	0.1740	45.0511	27.5847	0.287
5	19.1768	0.6766	0.1350	48.0611	27.1611	0.247
6	16.9865	0.6818	0.1200	43.7767	27.8463	0.271
7	20.5303	0.6432	0.1280	48.4389	50.6462	0.308
8	17.5450	0.5868	0.1230	45.9029	47.9181	0.296
9	9.0919	0.5852	0.0760	42.6342	3.4775	0.312

Tabella A 12: Prove UTS con 1 ciclo di preconditionamento per pericardio bovino decellularizzato.

UTS con 5 cicli di preconditionamento:*Porcino nativo.*

Campione	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
1	27.3883	0.6300	0.1010	93.8020	33.7625	0.097
2	30.2181	0.6318	0.0900	99.5220	39.4887	0.107
3	29.7643	0.6350	0.0960	110.9855	45.1111	0.099

Tabella A 13: Prove UTS con 5 cicli di preconditionamento per pericardio porcino nativo.

Porcino decellularizzato.

Campione	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
1	9.1815	0.5630	0.1030	29.0369	22.7086	0.281
2	13.1592	0.5868	0.1260	34.0439	24.8952	0.268
3	23.4767	0.7720	0.1460	40.2075	43.4258	0.279

Tabella A 14: Prove UTS con 5 cicli di preconditionamento per pericardio porcino decellularizzato.

Bovino nativo.

Campione	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
1	7.2658	0.4978	0.1090	36.5207	21.9845	0.306
2	13.1492	0.7968	0.0950	31.4841	19.3327	0.344
3	11.2275	0.5546	0.1550	51.2647	51.8080	0.334
4	15.0329	0.5708	0.0930	51.4651	13.5192	0.304

Tabella A 15: Prove UTS con 5 cicli di preconditionamento per pericardio bovino nativo.

Bovino decellularizzato.

Campione	UTS [MPa]	Failure strain [adim]	Inflection point [adim]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]	Spessore [mm]
1	19.3744	0.7794	0.174	48.8462	27.4790	0.341
2	24.4765	0.78	0.101	64.6231	24.5906	0.312
3	21.4750	0.6992	0.111	50.1947	34.0188	0.287

Tabella A 16: Prove UTS con 5 cicli di preconditionamento per pericardio bovino decellularizzato.

Bibliografia

1. Barone R. Anatomia comparata dei mammiferi domestici. Bortolami R and Callegari E. eds. 1993; 5:69-74.
2. Spodick DH. The Pericardium. Dekker M eds, New York, 1997; 7-26.
3. Netter F. Atlas of Human Anatomy, chapter Chest: Heart. Masson Publ, Milano. 2005; 207-225.
4. Ishihara T, Ferrans VJ, Jones M, Boyce SW, Kawanami O, Roberts WC. Histologic and ultrastructural features of normal human parietal pericardium. Am J Cardiol. 1980; 46(5):744-753.
5. Fentie IH, Allen DJ, Schenck MH, Didio LJA. Comparative electron microscopic study of bovine, porcine and human parietal pericardium, as material for cardiac valve bioprostheses. J Submicrosc Cytol. 1986; 18(1):53-65.
6. Simionescu DT, Kefalides NA. The biosynthesis of proteoglycans and interstitial collagens by bovine pericardial fibroblasts. Exp Cell Res, 1991; 195(1):171-176.
7. Whittaker M, Ayscough A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. current status and future challenges. Cell transmission, 2000; 17:3-14.
8. Di Bello C, Biomateriali: introduzione allo studio dei materiali per uso biomedico. Patron Editore. 2009.
9. Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms, many functions. FASEB J. 1992; 6:861-870.
10. Sacks MS, Yoganathan AP. Heart valve function: a biomechanical perspective. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2007; 362(1484):1369-1391.
11. Johnson NA, Sengupta S, Saidi SA, Lessan K, Charnock-Jones SD, Scott L, Stephens R, Freeman TC, Tom BD, Harris M, Denyer G, Sundaram M, Sasisekharan R, Smith SK, Print CG. Endothelial cell preparing to die by apoptosis initiate a program of transcriptome and glycome regulation. FASEB J. 2004; 18 (1):188 190.

12. Li S, Harrison D, Carbonetto S, Fassler R, Smyth N, Edgar D, Yurchenco PD. Matrix assembly, regulation and survival function of laminin and its receptors in embryonic stem cell differentiation. *J Cell Biol.* 2002; 157(7):1279-1290.
13. Van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J.* 1991; 5: 2814-2823.
14. Bateman JF, Lamande SR, Ramshaw JAM. Collagen superfamily. *Extracellular Matrix*, Gordon and Breach Pub. 1996; 2:22-67.
15. Naimark WA, Lee JM, Limeback H, Cheung DT. Correlation of structure and viscoelastic properties in the pericardia of four mammalian species. *Am J Physiol.* 1992 263(4 Pt 2):H1095 1106.
16. Courtman DW, Pereira CA, Kashef V, McComb D, Lee JM, Wilson GJ. Development of a pericardial acellular matrix biomaterial. Biochemical and mechanical effects of cell extraction. *J Biomed Mater Res*, 1994; 28(6):655 666.
17. Hiester ED, Sacks MS. Optimal bovine pericardial tissue selection sites. I. Fiber architecture and tissue thickness measurements. *J Biomed Mater Res.* 1998; 39(2):207 214.
18. Baharuddin A, Go BT, Firdaus MN, Abdullah J. Bovine pericardium for dural graft: clinical results in 22 patients. *Clin Neurol Neurosurg.* 2002; 104(4):342 344.
19. Backer CL, Mavroudis C, Gerber ME, Holinger LD. Tracheal surgery in children: an 18-year review of four techniques. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2001; 19(6):777-784.
20. Rinna C, Ungari C, Saltarel A, Cassoni A, Reale G. Orbital floor restoration. *J Craniofac Surg.* 2005; 16:968-972.
21. Schoof PH, Hazekamp MG, van Ulzen K, Bartelings MM, Bruyn JA, Helbing W, Huysmans HA. Autologous pericardium for ventricular septal defect closure. *J Heart Valve Dis.* 1998; 7(4):407-409.
22. Bonnet D, Bonhoeffer P, Sidi D, Kachaner J, Acar P, Villain E, Vouhé PR.. Surgical angioplasty of the main coronary arteries in children. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999; 117(2):352-357.
23. Aguiari P, Fiorese M, Gerosa G, Bagno A. Mechanical assessment of pericardium to manufacture percutaneous prosthetic heart valves. In corso di pubblicazione.
24. Thubrikar M. The aortic valve. 1st ed. Boca Raton: CRC Press. 1990.
25. Sacks MS, Schoen FJ, Mayer JE. Bioengineering challenges for heart valve tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng.* 2009; 11:289-313.

26. Iung B, Vahanian A. Epidemiology of valvular heart disease in the adult. *Nat Rev Cardiol.* 2011; 8(3):162-172.
27. Westaby S, Piwnica A. *Surgery for Acquired Aortic Valve Disease.* Taylor and Francis. 1997.
28. Iung B, Baron G, Butchart EG, Delahaye F, Gohlke-Bärwolf C, Levang OW, Tornos P, Vanoverschelde JL, Vermeer F, Boersma E, Ravaud P, Vahanian A. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J.* 2003; 24(13):1231-1243.
29. Parolari A, Loardi C, Mussoni L, Cavallotti L, Camera M, Biglioli P, Tremoli E, Alamanni F. Nonrheumatic calcific aortic stenosis: an overview from basic science to pharmacological prevention. *Eur J Cardiothorac.* 2009; 35(3):493-504.
30. Bonow RO, Carabello BA, Chatterjee K, de Leon AC Jr, Faxon DP, Freed MD, Gaasch WH, Lytle BW, Nishimura RA, O'Gara PT, O'Rourke RA, Otto CM, Shah PM, Shanewise JS; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2008 focused update incorporated into the ACC/AHA 2006 guidelines 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 (Writing Committee to revise the 1998 guidelines for the management of patients with valvular heart disease). Endorsed by the Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 52(13):e1-142.
31. Takkenberg JJ, Eijkemans MJ, van Herwerden LA, Steyerberg EW, Lane MM, Elkins RC, Habbema JD, Bogers AJ. Prognosis after aortic root replacement with cryopreserved allografts in adults. *Ann Thorac Surg.* 2003; 75(5):1482-1490.
32. Butany J, Fayet C, Ahluwalia MS, Blit P, Ahn C, Munroe C, Israel N, Cusimano RJ, Leask RL. Biological replacement heart valves. Identification and evaluation. *Cardiovasc Pathol.* 2003; 12(3):119-139.
33. Di Bello C, Bagno A. *Interazioni tra biomateriali e tessuti.* Pàtron Editore. 2009.
34. Mangold A, Szerafin T, Hoetzenecker K, Hacker S, Lichtenauer M, Niederpold T, Nickl S, Dworschak M, Blumer R, Auer J, Ankersmit HJ. Alpha-Gal specific IgG immune response after implantation of bioprostheses. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2009; 57 (4):191-195.

35. Braile MC, Carnevalli NC, Goissis G, Ramirez VA, Braile DM. In vitro properties and performance of glutaraldehyde crosslinked bovine pericardial bioprotheses treated with glutamic acid. *Artif Organs*. 2011; 35(5):497-501.
36. Chambers JB, Rajani R, Parkin D, Rimington HM, Blauth CI, Venn GE, Young CP, Roxburgh JC. Bovine pericardial versus porcine stented replacement aortic valves: early result of a randomized comparison of the Perimount and the Mosaic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008; 136(5):1142-1148.
37. Naso F, Gandaglia A, Iop L, Spina M, Gerosa G. First quantitative assay of alpha-Gal in soft tissues: presence and distribution of the epitope before and after cell removal from xenogeneic heart valves. *Acta Biomater*. 2011; 7(4):1728-1734.
38. Naso F, Gandaglia A, Iop L, Spina M, Gerosa G. Alpha-Gal detectors in xenotransplantation research: a word of caution. *Xenotransplantation*. 2012; 19(4):215-220.
39. Valente M, Bortolotti U, Thiene G. Ultrastructural substrates of dystrophic calcification in porcine bioprosthetic valve failure. *Am J Pathol*. 1985; 119(1):12-21.
40. Schoen FJ, Levy RJ. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg*. 2005; 79(3):1072-1080.
41. Vesely I, Barber JE, Ratliff NB. Tissue damage and calcification may be independent mechanisms of bioprosthetic heart valve failure. *J Heart Valve Dis*. 2001; 10(4):471-477.
42. Thiene G, Valente M. Anticalcification strategies to increase bioprosthetic valve durability. *J Heart Valve Dis*. 2011; 20(1):37-44.
43. Sawa Y. Transcatheter aortic valve implantation. *Surg Today*. 2014.
44. Webb JG, Chandavimol M, Thompson CR, Ricci DR, Carere RG, Munt BI, Buller CE, Pasupati S, Lichtenstein S.. Percutaneous aortic valve implantation retrograde from the femoral artery. *Circulation*. 2006; 113(6):842-850.
45. Cribier A, Eltchaninoff H, Bash A, Borenstein N, Tron C, Bauer F, Derumeaux G, Anselme F, Laborde F, Leon MB. Percutaneous transcatheter implantation of an aortic valve prosthesis for calcific aortic stenosis: first human case description. *Circulation*. 2002; 106(24):3006-3008.
46. Piazza N, de Jaegere P, Schultz C, Becker AE, Serruys PW, Anderson RH. Anatomy of the aortic valvar complex and its implications for transcatheter implantation of the aortic valve. *Circ Cardiovasc Interv*. 2008; 1(1):74-81.

47. Grube E, Laborde JC, Gerckens U, Felderhoff T, Sauren B, Buellesfeld L, Mueller R, Menichelli M, Schmidt T, Zickmann B, Iversen S, Stone GW. Percutaneous implantation of the CoreValve self-expanding valve prosthesis in high-risk patients with aortic valve disease: the Siegburg first-in-man study. *Circulation*. 2006; 114(15):1616–1624.
48. Santoro G, Vitali E, Tamburino C, Quaini E, Ramondo A, Pizzuto F, Innocenti D, Di Pasquale G; Italian Federation of Cardiology (FIC); Italian Society for Cardiac Surgery (SICCH). [Transcatheter aortic valve implantation for patients with aortic stenosis: a scientific statement from the Italian Federation of Cardiology (FIC) and the Italian Society for Cardiac Surgery (SICCH)]. *G Ital Cardiol (Rome)*. 2010; 11(1):45-53.
49. Singh IM, Shishehbor MH, Christofferson RD, Tuzcu EM, Kapadia SR. Percutaneous treatment of aortic valve stenosis. *Cleve Clin J Med*. 2008; 75(11):805-812.
50. Ye J, Cheung A, Lichtenstein SV, Carere RG, Thompson CR, Pasupati S, Webb JG. Transapical aortic valve implantation in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006; 131(5):1194–1196.
51. Godino C, Colombo A. Il trattamento percutaneo della stenosi aortica: indicazione e limiti. *Rapp. tecn. Unità di Emodinamica, Ospedale San Raffaele di Milano*.
52. Alavi SH., Groves EM, Kheradvar A. The effects of transcatheter valve crimping on pericardial leaflets. *Ann Thorac Surg*. 2014; 97(4):1260-1266.
53. Ferrari E. Severe intraprosthesis regurgitation following trans-catheter aortic valve implantation-to crimp or not to crimp? This might be the problem. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2011; 39(4):593–594.
54. Zegdi R, Bruneval P, Blanchard D, Fabiani JN. Evidence of leaflet injury during percutaneous aortic valve deployment. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2011; 40(1):257–259.
55. Schoen FJ, Levy RJ. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg*. 2005; 79(3):1072–1080.
56. de Buhr W, Pfeifer S, Slotta-Huspenina J, Wintermantel E, Lutter G, Goetz WA. Impairment of pericardial leaflet structure from balloon-expanded valved stents. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2012; 143(6):1417–1421.
57. Yamada H. *Strength of Biological Materials*. Williams and Wilkins. 1970; 111.
58. Sauren AA, van Hout MC, van Steenhoven AA, Veldpaus FE, Janssen JD. The mechanical properties of porcine aortic valve tissues. *J Biomech*. 1983; 16(5):327-337.

59. Korossis SA, Booth C, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. Tissue engineering of cardiac valve prostheses ii: biomechanical characterization of decellularized porcine aortic heart valves. *J Heart Valve Dis.* 2002 11 (4):463-471.
60. Oswal D, Korossis S, Mirsadraee S, Wilcox H, Watterson K, Fisher J, Ingham E. Biomechanical characterization of decellularized and cross-linked bovine pericardium. *J Heart Valve Dis.* 2007;16(2):165-74.
61. Alavi SH, Ruiz V, Krasieva T, Botvinick EL, Kheradvar A. Characterizing the collagen fiber orientation in pericardial leaflets under mechanical loading conditions. *Ann Biomed Eng.* 2013; 41(3):547-561
62. Sacks MS, Yoganathan MP. Heart valve function: a biomechanical perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2007; 362(1484):1369–1391.
63. Billiar KL, Sacks MS. Biaxial mechanical properties of the native and glutaraldehyde-treated aortic valve cusp: Part II--A structural constitutive model. *J Biomech Eng.* 2000; 122(4):327-335.
64. Thubrikar MJ, Deck JD, Aouad J, Nolan SP. Role of mechanical stress in calcification of aortic bioprosthetic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1983; 86(1):115-125.
65. Vesely I, Boughner D, Song T. Tissue buckling as a mechanism of bioprosthetic valve failure. *Ann Thorac Surg.* 1988; 46(3):302–308.
66. Sacks MS, Chuong CJ, More R. Collagen fiber architecture of bovine pericardium. *ASAIO J.* 1994; 40(3):M632-637.
67. Bose corporation. ElectroForce® Planar Biaxial TestBench Test Instrument. 2012. url: http://worldwide.bose.com/electroforce/en/web/planar_biaxial_4_motor/page.html
68. Aguiari P, Fiorese M, Spina M, Gerosa G, Bagno A. The role of preconditioning on the mechanical assessment of native bovine and porcine pericardium. In corso di pubblicazione.
69. Vinci MC, Tessitore G, Castiglioni L, Prandi F, Soncini M, Santoro R, Consolo F, Colazzo F, Micheli B, Sironi L, Polvani G, Pesce M. Mechanical compliance and immunological compatibility of fixative-free decellularized/cryopreserved human pericardium. *PLoS One.* 2013;8(5):e64769.
70. Gauvin R, Marinov G, Mehri Y, Klein J, Li B, Larouche D, Guzman R, Zhang Z, Germain L, Guidoin R. A comparative study of bovine and porcine pericardium to highlight their potential advantages to manufacture percutaneous cardiovascular implants. *J Biomater Appl.* 2013 (4):552-565.

71. Tedder ME, Liao J, Weed B, Stabler C, Zhang H, Simionescu A, Simionescu DT. Stabilized collagen scaffolds for heart valve tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(6):1257-1268.
72. Sun W, Sacks M, Fulchiero G, Lovekamp J, Vyavahare N, Scott M. Response of heterograft heart valve biomaterials to moderate cyclic loading. *J Biomed Mater Res A*. 2004;69(4):658-669.

