

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**



**FACOLTA' DI INGEGNERIA**  
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

# **Tissue Engineering: nuova via per la sostituzione dell'esofago**

Laureando:  
Alberto MIGLIORANZA

Relatore:  
Ch.mo Prof. Andrea BAGNO

**Corso di laurea triennale in Ingegneria Biomedica**  
Anno Accademico 2011/2012



# INDICE

<b>ABSTRACT</b> .....	III
<b>INTRODUZIONE</b> .....	V
<b>CAPITOLO I – L’ESOFAGO</b> .....	1
1.1 Anatomia dell’esofago.....	1
1.1.1 Anatomia macroscopica.....	1
1.1.2 Anatomia microscopica.....	2
1.2 Patologie dell’esofago.....	3
1.2.1 Atresia esofagea.....	6
1.2.2 Intervento di riparazione in caso di AE.....	8
<b>CAPITOLO II – TISSUE ENGINEERING: ESOFAGO BIOARTIFICIALE</b> .....	11
2.1 Cos’è la Tissue Engineering (TE).....	11
2.1.1 Metodologie della TE.....	12
2.2 Tissue Engineering applicata all’esofago.....	14
2.2.1 I primi passi.....	14
2.2.2 Costrutti privi di cellule.....	15
2.2.3 Costrutti seminati con cellule.....	16
2.2.4 Approccio ibrido: stadio d’avanzamento della ricerca.....	19
2.2.5 Approfondimento: protocollo di isolamento e caratterizzazione....	27
<b>CAPITOLO III – PROPRIETA’ MECCANICHE</b> .....	29
3.1 Caratterizzazione meccanica dei tessuti.....	29

<b>CONCLUSIONI</b> .....	35
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	37

# ABSTRACT

Il continuo sviluppo delle tecniche chirurgiche per il trapianto d'organi permette, al giorno d'oggi, di sostituire e curare molti organi. Le attuali tecniche di trapianto sono, però, soluzioni imperfette perchè limitate da una serie di motivi che vanno dalla possibile incompatibilità tra donatore e ricevente (situazione che obbliga il paziente ad assumere una grande quantità di farmaci ed immunosoppressori) alle stenosi, perdite di tessuto ed elongazioni. Nell'ambito della ricerca, negli ultimi dieci anni un nuovo settore interdisciplinare si è proposto con forza: la Tissue Engineering (TE). La TE, attraverso specifiche metodologie di indagine, sembra poter trovare la soluzione a molte delle problematiche legate agli interventi chirurgici tradizionali e quindi migliorare la vita dei pazienti che li devono subire.

In questo lavoro verranno presentati i recenti progressi della TE per la sostituzione dell'esofago. La trattazione illustrerà, in primo luogo, le caratteristiche e le funzioni di quest'organo, facendo una panoramica sulle principali patologie che lo possono colpire. In seguito verrà presentata la Tissue Engineering e saranno esplicitate le metodologie di indagine che quest'ultima utilizza, entrando, successivamente, nel dettaglio della ricerca per la sostituzione dell'esofago. Partendo da una panoramica delle tappe percorse della TE nella ricerca, il lavoro presenterà i più recenti risultati ottenuti, concludendo con un approfondimento degli ostacoli verso la creazione di un esofago ingegnerizzato.



# INTRODUZIONE

L'insufficienza di un organo allo stadio finale o la perdita di tessuto è uno dei problemi più devastanti e costosi in medicina [1]. Per avere un'idea dell'impatto che queste operazioni hanno a livello economico, basti pensare che solo negli Stati Uniti vengono eseguiti più di 8 milioni di interventi all'anno per un costo dell'assistenza sanitaria superiore a 400 miliardi di dollari e l'impegno di milioni di giorni di lavoro [2]. Le terapie richieste, infatti, non solo sono estremamente costose, ma spesso non sono neanche in grado di svolgere a pieno lo scopo per cui sono state impiegate.

Dal giorno del primo trapianto d'organi effettuato con successo da Murray e colleghi nel 1954 [3], gli sforzi impiegati in ricerca e sviluppo hanno di gran lunga migliorato tutti gli aspetti di quest'ambito della medicina. Sfortunatamente, il trapianto d'organi e tessuti è tuttora una soluzione imperfetta perché limitata da una serie di motivi. In primo luogo, questa tecnica è limitata dall'insufficienza di donatori e dalla possibile incompatibilità tra donatore e ricevente, mentre l'utilizzo, in alternativa, di organi artificiali non può essere applicato in modo routinario a causa di problemi tecnici non ancora superati.

Dal problema della compatibilità deriva tutta una serie di complicazioni e terapie necessarie che gravano sul paziente e ne possono influenzare anche l'intera esistenza. Quando il trapianto non è autologo, ossia non prevede l'innesto di materiale prelevato dal paziente stesso, ma da individui della stessa specie (allograpianto) o anche di specie differenti (xenotrapianto), si devono fronteggiare problemi acuti e iperacuti di rigetto. L'unico modo per far fronte a questo rischio è l'assunzione da parte del paziente di immunosoppressori e di una grande varietà di farmaci per periodi di tempo molto lunghi i quali possono portare anche all'insorgenza, a lungo andare, di assuefazioni, intolleranze o, peggio, forme tumorali. L'utilizzo di organi e tessuti provenienti da altri essere viventi rende, inoltre, assolutamente necessario controllare che il materiale da innestare non sia portatore di malattie virali. Queste sono solo le problematiche strettamente legate all'intervento, ma ne seguono poi altre legate alla durata dell'innesto; ad esempio possono presentarsi stenosi, o perdite di tessuto, o ancora elongazioni.

Negli ultimi dieci anni un nuovo settore di ricerca, per sua natura estremamente interdisciplinare, è emerso con forza e sembra poter essere la soluzione a molte delle problematiche sopra elencate: si tratta della ingegneria tessutale (Tissue Engineering,

TE). Le ricerche in questo settore hanno reso possibile coltivare a livello di laboratorio e, in molti casi, anche industriale, linee cellulari e tessuti con le stesse caratteristiche del ricevente. Questo significa che i tessuti ingegnerizzati, a differenza delle tecniche odierne di trapianto, non sono delle semplici “toppe”, ma si integrano con il paziente contribuendo alla cura dello stato patologico. Alcuni miglioramenti che questo approccio porta sono di immediato riscontro; innanzitutto non vi è alcun pericolo di rigetto, poiché si parla sempre di trapianti autologhi, e poi vi è la possibilità di coltivare i tessuti partendo dal prelievo di poche cellule, abbattendo la barriera della mancanza di donatori.

Questa tesi tratterà la possibilità di applicare i principi della Tissue Engineering come nuova strada per la sostituzione dell'esofago, organo dell'apparato digerente che collega la laringe allo stomaco. Esistono diverse condizioni, sia congenite che acquisite, nelle quali tale sostituzione si rende necessaria [4]. In questo lavoro l'attenzione è concentrata su una patologia pediatrica che richiede l'intervento della chirurgia: l'atresia esofagea. Questa malformazione congenita, classificata in vari tipi in base all'anatomia dell'esofago, fa sì che quest'ultimo non sia un tubo continuo, ma sia spezzato in due monconi chiusi, facendo mancare la comunicazione tra laringe e stomaco. Le attuali tecniche chirurgiche prevedono l'operazione del neonato durante i primi giorni di vita. In linea generale possono essere effettuati due interventi: se la distanza tra i due monconi dell'esofago non è molta viene realizzata una anastomosi esofago-esofagea primaria, mentre se si è in presenza di long-gap la procedura risulta notevolmente più complicata. In questo caso è necessario praticare una miotomia e successivamente operare la sostituzione dell'esofago con una trasposizione che può essere gastrica, intestinale o del colon. Questa soluzione risulta avere, tuttavia, un alto tasso di morbilità o, nei casi più gravi, mortalità.

In questa trattazione si vuole analizzare la possibilità di applicare i principi della Tissue Engineering per questa particolare patologia, illustrando come essi risolvano molti dei gravi problemi delle tecniche di trapianto attuali, delineando lo stato di avanzamento della ricerca nella produzione di un esofago ingegnerizzato ed enunciando quali siano gli ostacoli non ancora superati per il raggiungimento di tale obiettivo.



# CAPITOLO I

## L'esofago

### *1.1 Anatomia dell'esofago*

L'esofago è un tubo muscolare cavo che conduce i cibi solidi e liquidi allo stomaco [5]. Esso è, quindi, quell'organo dell'apparato digerente che collega la faringe allo stomaco, lungo all'incirca 25 cm e di 2-3 cm di diametro.

#### *1.1.1 Anatomia macroscopica*

L'esofago (Figura 1.1), posizionato dietro la trachea, si estende dalla VI-VII vertebra cervicale alla X-XI vertebra toracica; è composto pertanto da una porzione cervicale (5 cm), una porzione toracica (16 cm) e una porzione addominale. Subisce lungo il suo percorso tre curvature che lo portano a distaccarsi dalla colonna e presenta quattro restringimenti:

- 1) presso la cartilagine cricoide della laringe (cricoideo);
- 2) all'incrocio posteriore con l'arco dell'aorta (aortico);
- 3) all'altezza del bronco destro (bronchiale);
- 4) nella sua porzione interna al diaframma (diaframmale).

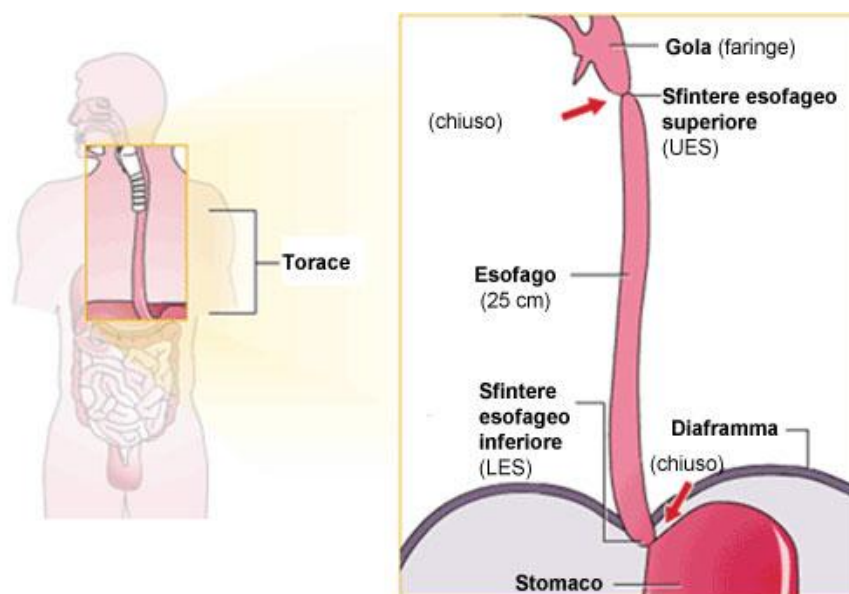
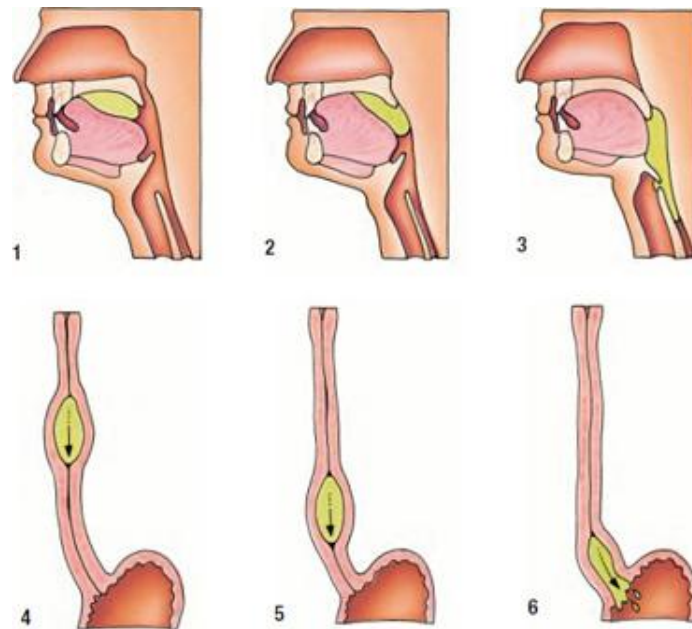


Figura 1.1 Esofago: posizione nell'uomo rispetto alla faringe e allo stomaco.

Benché l'esofago non sia dotato di un ben definito muscolo sfintere, si usa ugualmente parlare di sfintere esofageo superiore ed inferiore, poiché, in corrispondenza dell'inizio e della fine del tubo, sono presenti due restrizioni che, normalmente chiuse, si aprono per permettere il passaggio del cibo. Una volta che il bolo alimentare si trova all'interno del lume ciò che lo spinge verso lo stomaco è un'azione peristaltica costituita da forti onde di contrazione muscolare (Figura 1.2). Non ha grande influenza la forza di gravità: basti pensare che la deglutizione è possibile anche a testa in giù.

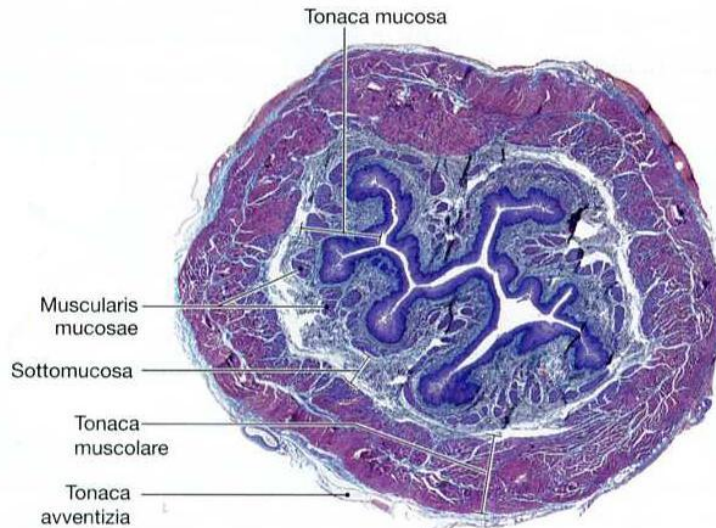


**Figura 1.2 Fase esofagea deglutizione.**

L'esofago viene vascolarizzato dalle arterie esofagee e da rami di: (1) *tronco tireocervicale e arterie carotidi esterne* nel collo; (2) *arterie bronchiali e arterie esofagee* nel mediastino; (3) *arteria frenica inferiore e arteria gastrica sinistra* nell'addome [5]. Il sangue passa poi dai capillari esofagei nelle *vene tiroidea inferiore, azygos, esofagea e gastrica* [5]. Esso è innervato da plessi nervosi posizionati nello strato sottomucoso e muscolare ad opera del nervo vago e del sistema simpatico attraverso il plesso esofageo.

### *1.1.2 Anatomia microscopica*

L'organizzazione istologica della parete dell'esofago è simile all'organizzazione degli altri organi dell'apparato digerente, che consiste, generalmente, dall'interno verso l'esterno, in: tonaca mucosa, tonaca sottomucosa, tonaca muscolare, tonaca sierosa. L'esofago presenta, però, alcune peculiarità (Figura 1.3) rispetto allo schema generale.



**Figura 1.3 Istologia di una sezione dell'esofago.**

Esso possiede una mucosa contenente un epitelio pavimentoso stratificato resistente alle abrasioni e, come si può notare dalla Figura 1.3, mucosa e sottomucosa si sollevano in pieghe che occupano l'intera lunghezza dell'esofago. Questo ripiegamento fa sì che il lume si possa allargare nel momento del passaggio del grosso bolo e, escluso questo momento (deglutizione), fa sì che, grazie al tono muscolare, il lume rimanga chiuso. Lo strato della muscolatura liscia della *muscularis mucosae* aumenta di spessore gradualmente man mano che ci si avvicina allo stomaco; molto sottile o anche assente in prossimità della faringe, arriva ad essere di 200 – 400 µm vicino allo stomaco. Inoltre, la sottomucosa è provvista di ghiandole tubolari semplici, le quali rilasciano un secreto mucoso che lubrifica il bolo e protegge l'epitelio.

La muscolatura di questo organo mostra due strati: all'interno circolare e all'esterno longitudinale. Dal terzo superiore al terzo inferiore questi due strati possiedono, dapprima, solo fibre scheletriche, infine, solo fibre lisce ed entrambe sono controllate da riflessi viscerali. Infine, esternamente alla tonaca muscolare, l'esofago non possiede una tonaca sierosa, bensì una tonaca avventizia. Quest'ultima è uno strato di tessuto connettivo che fissa l'esofago alla parete corporea dorsale.

## ***1.2 Patologie dell'esofago***

In questo paragrafo verrà presentata una panoramica delle patologie che posso colpire l'esofago con particolare attenzione all'atresia esofagea, malformazione congenita che costringe i neonati che la possiedono a sottoporsi ad un intervento chirurgico dopo solo

pochi giorni di vita. Si procede alla presentazione di questo quadro generale con l'illustrazione delle malattie funzionali dell'organo.

Le malattie funzionali sono patologie benigne caratterizzate da disordini di tipo motorio a carico del corpo e/o degli sfinteri dell'esofago [6]. Si suddividono in primarie e secondarie come mostra la Tabella 1.1.

#### *Classificazione dei principali disordini motori esofagei*

<b>Primitivi:</b>	<b>Secondari a:</b>
- Acalasia	- Sclerodermia
- Spasmo esofageo diffuso	- Diabete mellito
- Nutcracker	- Affezioni neuromuscolari
- Disordini motori aspecifici	- Malattia Chagas

**Tabella 1.1** Classificazione dei disordini funzionali dell'esofago.

La malattia funzionale più conosciuta è l'*acalasia*, disordine motorio primitivo che causa l'assenza totale di peristalsi lungo tutto il tubo e, al momento della deglutizione, il mancato rilassamento dello sfintere esofageo inferiore. Le cause di questo disturbo non sono note, anche se è stato documentato che nei soggetti acalasi si verifica una degenerazione delle cellule gangliari del plesso mioenterico di Auerbach. I sintomi dell'acalasi si presentano più frequentemente nella fascia d'età tra i 30 ed i 60 anni con un'incidenza di 1 caso ogni 100.000 soggetti (nella popolazione occidentale).

Un altro disordine motorio è lo *spasmo esofageo diffuso*, malattia caratterizzata da contrazioni spastiche dell'esofago associate ad alterazioni della peristalsi (peristalsi assente in almeno il 40% degli atti deglutitivi e onde peristaltiche aumentate in ampiezza e durata) [6]. Quadro clinico simile a quest'ultimo è quello del *Nutcracker esophagus* che si differenzia dallo spasmo esofageo diffuso poiché il soggetto affetto dalla malattia presenta peristalsi normale ma con onde peristaltiche aumentate in ampiezza e durata a livello dell'esofago distale [6]. Esistono infine una serie di alterazioni della funzionalità esofagea di raro riscontro (*ipertono dello sfintere inferiore, incoordinazione faringo esofagea*) [6].

Altro tipo di patologia di quest'organo sono i *diverticoli esofagei*, estroflessioni sacciformi della parete esofagea, solitamente una patologia acquisita [6]. Essi sono classificati secondo due criteri: uno anatomico (sede del diverticolo) e uno patogenico (Tabella 1.2). A livello patogenico i diverticoli si suddividono in diverticoli da pulsione e da trazione. I primi si formano a causa di un aumento della pressione endoesofagea che provoca, nelle zone in cui la resistenza della componente muscolare della parete è minore, una progressiva estroflessione della mucosa esofagea. Nel caso dei diverticoli da trazione, invece, il responsabile della patogenesi è un processo di retrazione

cicatriziale di strutture peribronchiali andate incontro a un processo infiammatorio, che stirano (in toto) la parete esofagea [6]. Come si può vedere dalla Tabella 1.2 a livello anatomico i diverticoli si dividono in faringo-esofagei, iuxta-bronchiali ed epifrenici.

I diverticoli faringo-esofagei (Zenker) ed epifrenici sono diverticoli da pulsione e, attualmente, lo sono anche la maggior parte degli iuxta-bronchiali. Gli unici diverticoli da trazione sono iuxta-bronchiali e, nel passato, erano classici quelli dovuti ad una infiammazione tubercolare dei linfonodi peribronchiali.

<i>Diverticoli esofagei</i>	
<b>Sede:</b>	<b>Patologie:</b>
- Faringo-esofagei	—————→ - Pulsione
- Iuxta-bronchiali	—————→ - Trazione/pulsione
- Epifrenici	—————→ - Pulsione

**Tabella 1.2 Classificazione dei diverticoli esofagei.**

Tra le più gravi e pericolose patologie che possono insorgere in un individuo ci sono sicuramente le neoplasie maligne, malattie che possono presentarsi anche nell'esofago. Il cancro dell'esofago, nonostante i progressi di questi ultimi anni, rimane una delle neoplasie con peggiore prognosi a distanza. L'incidenza di questa neoplasia risulta alta soprattutto nella zona compresa tra il litorale del Mar Caspio e la Cina settentrionale, con 50-100 casi per 100.000 abitanti, e nel nostro paese rappresenta il 3% dei tumori nell'uomo e l'1% nella donna, colpendo prevalentemente soggetti tra i 50 e 70 anni (nel nord-est il numero di decessi per cancro esofageo è il doppio rispetto alla media nazionale)[6]. Le due più comuni *neoplasie maligne esofagee* sono quella *squamocellulare* e *l'adenocarcinoma* e, come per la maggior parte delle neoplasie, l'eziologia non è conosciuta. Nonostante questo, per il cancro all'esofago sono stati messi a punto alcuni modelli di oncogenesi: per esempio, per il carcinoma squamoso l'esofagite cronica e le sue successive fasi sembrerebbero le tappe per la sua insorgenza. Vi sono poi delle neoplasie maligne esofagee di rarissimo riscontro come: *i melanomi*, *i linfomi* e *i sarcomi*. Esistono sicuramente dei fattori di rischio che favoriscono l'insorgenza della neoplasia, quali: l'abuso di alcolici, il fumo di sigaretta, la carenza alimentare di alcune vitamine e l'assunzione routinaria di cibi e bevande molto calde [6]. Inoltre un rischio maggiore è stato evidenziato per i soggetti affetti da altre malattie dell'esofago come acalasia o diverticoli (Tabella 1.3).

### ***Fattori di rischio per l'insorgenza delle neoplasie esofagee***

- Abuso di alcolici	- Acalasia, diverticoli, stenosi da caustici
- Fumo di sigarette	- Reflusso gastro-esofageo
- Carenze alimentari	- Familiarità
- Assunzione di alimenti caldi	- Neoplasie delle vie aereo-digestive

**Tabella 1.3 Fattori di rischio per le neoplasie esofagee.**

Macroscopicamente questo tipo di cancro si può presentare in tre forme differenti: infiltrante, ulcerata o vegetante. La metà delle neoplasie all'esofago è localizzata a livello del terzo medio, la restante metà dei casi si suddividono per il 30% nel terzo inferiore e per il 20% a livello cervicale. Per concludere la descrizione delle neoplasie esofagee si precisa che interessante è notare come una delle peculiarità istologiche di quest'organo, cioè l'assenza di rivestimento sieroso, faciliti la diffusione della malattia, che si propaga per contiguità agli organi vicini.

#### ***1.2.1 Atresia esofagea***

Come già anticipato, nella panoramica delle patologie dell'esofago, si dedica particolare attenzione ad una malformazione congenita denominata atresia esofagea. L'atresia esofagea (AE) è una malformazione congenita dell'esofago che consiste in una discontinuità del lume; ciò significa che l'organo si presenta in due monconi ciechi, uno collegato alla bocca (prossimale) e l'altro allo stomaco (distale). Questo tipo di malformazione, oltre alla mancata formazione di un lume continuo, può dar luogo alla creazione di una fistola tracheoesofagea, cioè alla creazione di un collegamento tra esofago e trachea (collegamento vie respiratorie – vie digerenti) che nell'86% dei casi si trova nel moncone distale.

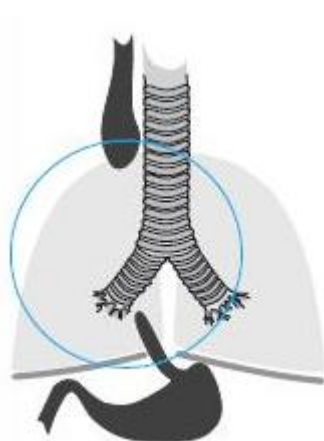
L'effetto dell'AE si verifica tra la quarta e l'ottava settimana di gravidanza, periodo in cui l'intestino primitivo dovrebbe dividersi dando origine, dalla sua parte anteriore, alla trachea e, dalla sua parte posteriore, all'esofago. Un'idea molto semplice, per comprendere il fenomeno, che viene a volte data per spiegare ai futuri genitori quello che sta accadendo al loro figlio, è che è come se qualcuno premesse il tasto "pausa" e bloccasse lo sviluppo del feto e poi, dopo qualche tempo, riprendesse a farlo scorrere [7]. Le cause che portano a questa malformazione, come già visto per molte altre patologie, sono sconosciute, ma diversi studi hanno riscontrato un'alta percentuale di gemellarità negli individui affetti da atresia esofagea, facendo supporre che la gemellarità stessa possa essere un fattore predisponente. L'incidenza con cui questa



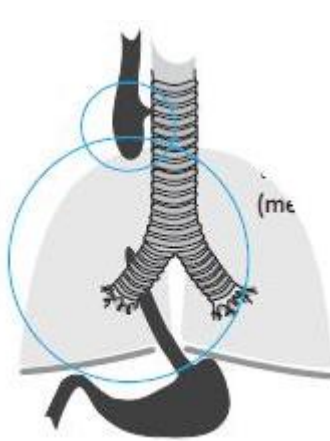
malformazione si presenta va da un massimo di 1 bambino su 2500 ad un minimo di 1 bambino su 4000 nati vivi [8].

L'AE si può presentare in 5 tipi anatomici differenti, in base alla formazione, disposizione anatomica dei monconi e della fistola:

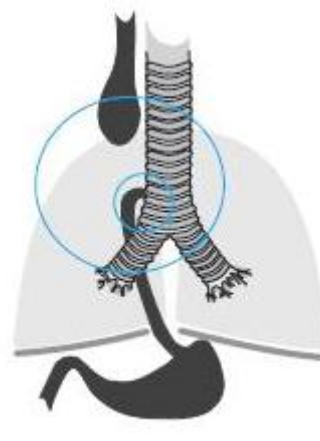
- Tipo I) Senza fistola e con l'esofago che termina con un cordoncino fibroso (8% dei casi) (Figura 1.4);
- Tipo II) Fistola dell'esofago prossimale collegata alla trachea o, più raramente, con il bronco sinistro (meno del 2% dei casi) (Figura 1.5);
- Tipo III) Fistola dell'esofago distale collegata alla trachea (85% dei casi). Se la distanza tra i due monconi supera i 3 spazi vertebrali si definisce *long gap* (lunga distanza) (Figura 1.6);
- Tipo IV) Fistola doppia (1% dei casi) (Figura 1.7);
- Tipo V) Fistola ad H, senza atresia (5% dei casi). Nonostante rientri nella classificazione non sarebbe una vera e propria atresia (Figura 1.8).



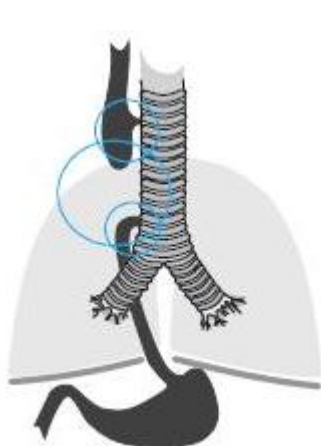
**Figura 1.4 Tipo I.**



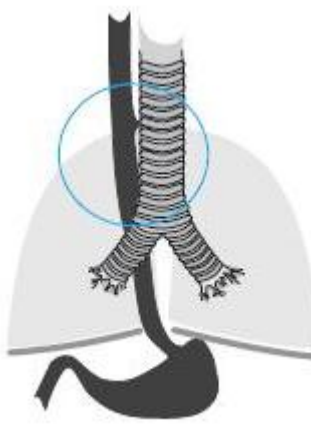
**Figura 1.5 Tipo II.**



**Figura 1.6 Tipo III.**



**Figura 1.7 Tipo IV.**



**Figura 1.8 Tipo V.**

Purtroppo in una buona parte di casi, l'atresia esofagea si presenta associata a malformazioni di altri organi come la colonna vertebrale, il cuore, l'apparato urogenitale e anorettale, i reni, gli arti superiori. Quando almeno 3 di questi organi sono colpiti da malformazione la patologia prende il nome di Associazione VACTREL o VATER, acronimo che racchiude tutti gli organi che possono essere interessati (V = vertebra, A = ano, C = cuore, T = trachea, R = reni o rachide, E = esofago, L = limbs [arti superiori]). L'Associazione VACTREL è ancor più rara dell'atresia esofagea e colpisce 1.6 casi su 10000 nati vivi.

Il problema principale che l'AE causa è l'impossibilità per il neonato di nutrirsi o di compiere la semplice azione di deglutizione della saliva. Anche nel Tipo I, quindi, in assenza di fistola, se non si prendessero provvedimenti immediati, il neonato andrebbe incontro a soffocamento causato dal riempimento del moncone prossimale e dal successivo riversamento della saliva nella trachea. Negli altri casi poi, la presenza della fistola e, quindi, di un collegamento tra le vie respiratorie e quelle digerenti, aumenta notevolmente il rischio di soffocamento, poiché aumentano le situazioni che possono favorire l'arrivo di fluidi ai polmoni.

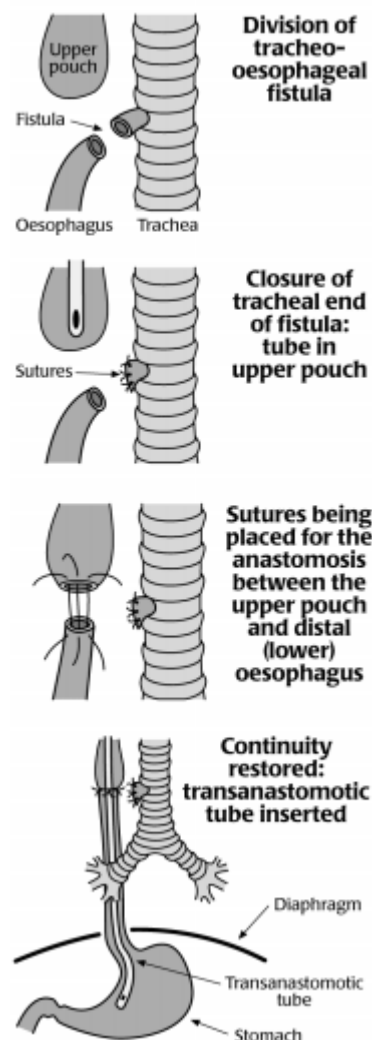
### *1.2.2 Intervento di riparazione in caso di AE*

Come accettato all'inizio di questo paragrafo, il bambino nato affetto da atresia esofagea è destinato a subire un intervento a poche ore dalla nascita (più correttamente qualche giorno). Questa necessità deriva dal fatto, sopra citato, che il neonato è impossibilitato a nutrirsi, per l'assenza di un collegamento tra bocca e stomaco, e rischia il soffocamento. Nell'attesa dell'intervento vengono applicati al paziente un sondino che aspira la saliva ed evita il soffocamento, alcune volte un respiratore e, se il tempo di attesa si prolunga, viene effettuata una gastrotomia ed applicato un tubicino per nutrire il bambino, nutrimento che fino a quel momento gli arrivava per via endovenosa.



Nei casi meno complicati, ossia in pazienti in cui la malformazione non è di tipo III long gap, l'operazione consiste in una anastomosi. La procedura prevede un'incisione tra il IV e il V spazio intercostale a destra, con delicate manovre per spostare diaframma ed altri fasci muscolari si raggiunge l'esofago e, se presente, per prima cosa si elimina la fistola. L'eliminazione della fistola consiste nel chiuderla legandola per poi sezionarla; infine si suturano entrambi gli organi (esofago e trachea). Si continua, poi, con l'individuazione del moncone prossimale con l'aiuto da parte dell'anestesista che, tramite un tubo, fa pressione sul moncone. Successivamente si prende anche il moncone distale ed entrambi vengono sezionati per aprire il lume. A questo punto vengono tirati fino ad essere congiunti e suturati (anastomosi) (Figura 1.9). Questo tipo di operazione, benché abbia percentuali di riuscita abbastanza elevate, può portare a disturbi e complicazioni sia immediate che successive. Nell'immediato post-operatorio potrebbe verificarsi una rottura delle suture e potrebbe presentarsi l'esigenza di intervenire nuovamente. Inoltre, potrebbero verificarsi stenosi o problemi di gastroreflusso.

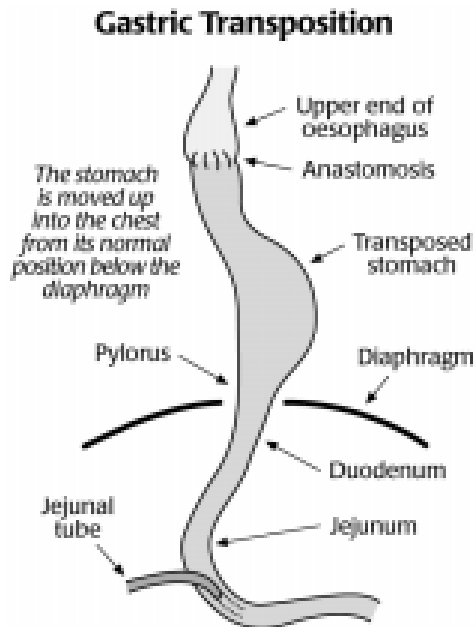
### Surgery for TOF/OA



**Figura 1.9** Intervento di riparazione dell'esofago.

Ancor più complicata è l'operazione che deve affrontare un neonato con una distanza tra i due monconi superiore ai 3 spazi vertebrali (long gap). Innanzitutto, si prolunga la fase di attesa; infatti, viene fatto passare qualche mese e si aspetta che i monconi crescano spontaneamente. In questo tempo il bambino viene dimesso, ma dovrà tenere, fino al momento dell'operazione, i sondini per nutrirsi e per l'aspirazione della saliva. In base alla crescita dei due monconi, dopo alcuni mesi, si possono scegliere due strade:

- 1) applicare l'interposizione gastrica, che consiste nel tirare su lo stomaco fino a raggiungere il moncone superiore e creare il nuovo esofago (Figura 1.10). Questa tecnica ha i vantaggi di richiedere una sola anastomosi, fatto che riduce i rischi legati alle perdite di sostanze, e l'utilizzo dello stomaco, organo irrorato molto bene di sangue, riduce i rischi legati proprio alla anastomosi in sé. Uno dei maggiori svantaggi, però, è la possibilità di un reflusso gastrointestinale dovuto all'innalzamento dello stomaco sopra al diaframma;



**Figura 1.10 Interposizione gastrica.**

2) sostituire l'esofago con un pezzo di colon, o meglio congiungere i due monconi con un pezzo di colon. Questa tecnica è utilizzata più spesso in Italia e come la precedente ha molti pro e contro. Lo svantaggio più grande di questa tecnica è che il tessuto del colon non ha le stesse caratteristiche di quelle dell'esofago ed oltre a non avere la stessa motilità, causa di possibili interventi futuri, assorbe sostanze e rilascia muco all'interno del lume.

Tutte le procedure soffrono, inoltre, di un fenomeno denominato "stenosi" e dovuto allo stiramento dei tessuti. Questo può portare al restringimento del lume nella zona cicatriziale e alla necessità di un intervento di endoscopia per dilatare l'esofago.

# CAPITOLO II

## Tissue Engineering: esofago bioartificiale

### *2.1 Cos'è la Tissue Engineering (TE)*

L'ingegneria tessutale (TE) è stata definita nel 1998 come *“una tecnica interdisciplinare che applica i principi e i metodi dell'ingegneria e delle scienze biologiche con l'obiettivo di comprendere le relazioni fondamentali tra struttura e funzione nei tessuti sani e malati dei mammiferi e di sviluppare sostituti biologici in grado di ripristinare, mantenere o migliorare le funzioni”*[9]. L'obiettivo che si pone è quello di ripristinare le funzionalità compromesse di un tessuto e/o di un organo rigenerandolo a partire da cellule del paziente. Attualmente è già possibile, infatti, realizzare linee cellulari e tessuti completi a partire dalla coltura di poche cellule.

La differenza sostanziale tra l'approccio di questa tecnologia innovativa e le tradizionali tecniche di trapianto è che, in caso di successo dell'innesto, i tessuti ingegnerizzati si integrano con il tessuto sano del paziente, andando ad apportare un importante contributo, specifico e duraturo, alla cura della malattia, senza richiedere debilitanti e costosi trattamenti farmacologici. È chiaro, allora, che la strada aperta da questo nuovo settore di ricerca può essere la soluzione a molte problematiche di cui le attuali tecniche di cura soffrono, sia a livello di salute del paziente che economico.

Come sottolineato anche nella definizione, la TE è una tecnica interdisciplinare e al suo interno si trovano contributi provenienti dalle scienze di base, dalla biologia molecolare, dalle scienze dei biomateriali, dalla bioingegneria, dalla medicina e dalle biotecnologie[9]. Questo fa sì che i campi di ricerca verso i quali si espande siano innumerevoli: sicuramente uno dei più importanti è quello della biologia cellulare. Infatti, è sempre più importante conoscere a fondo quali siano i meccanismi che guidano la formazione e la crescita dei tessuti e quali siano i ruoli che i singoli elementi ricoprono. Ad esempio, grande rilevanza hanno le modalità con cui la matrice extracellulare interagisce con le cellule e di conseguenza quali siano i fattori di adesione e crescita che entrano in gioco durante la morfogenesi.

Altro importante settore di ricerca è quello dello studio dei materiali. Se infatti l'utilizzo di materiali naturali ha il vantaggio di portare con sé particolari sequenze segnale, i fattori di adesione e crescita indagati dalla biologia cellulare, l'impiego di materiali di

sintesi, nonostante comportino il rischio di un'interazione indesiderata con le cellule, ha il vantaggio di poter mantenere sotto controllo tutta una serie di parametri chimici e biochimici e assicurano un'elevata riproducibilità.

Il possibile impiego di materiali di sintesi apre, allora, altri ampi settori di ricerca, come lo sviluppo di metodi di analisi superficiale, la messa a punto di modelli matematici per il controllo e la previsione del comportamento delle cellule in vitro ed in vivo e lo sviluppo di sistemi di rilascio controllato delle sequenze segnale (in modo da permettere una più sicura formazione e crescita di tessuto).

In conclusione, l'ingegneria tessutale offre la possibilità di disporre di una vasta gamma di sostituti tessutali con versatilità maggiore e costi di gran lunga inferiori rispetto a quelli relativi all'impiego di organi naturali[9], ma soprattutto sposta l'attenzione dalla patologia, produzione di massa di farmaci per la cura di quella malattia, al singolo paziente, partendo da cellule del paziente stesso per creare un tessuto che ripristini le funzionalità e curi la malattia.

Prima di passare a vedere come questi principi vengano applicati per la formazione di un esofago ingegnerizzato e quale sia lo stato di avanzamento della ricerca in questo senso, si fornisce uno schema generale di come opera la TE.

### *2.1.1 Metodologie della TE*

I tre maggiori approcci utilizzati nella TE sono[1]:

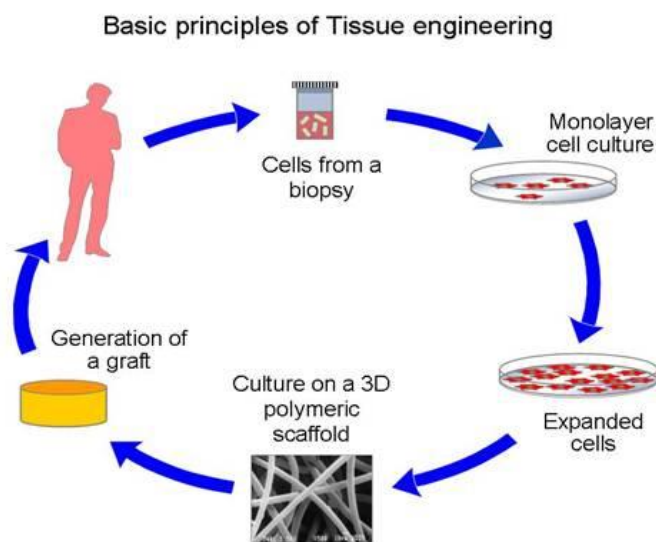
- L'utilizzo di sola matrice ingegnerizzata per guidare la rigenerazione tessutale;
- L'innestazione di cellule isolate (allogeniche o xenogeniche) per sostituire selettivamente le sole cellule malate;
- L'utilizzo di una struttura composta da cellule e matrice.

I metodi più utilizzati e promettenti sono gli ultimi due.

L'utilizzo di cellule isolate presenta alcuni aspetti interessanti sia perchè permette di sostituire selettivamente le cellule malate con altre in grado di ripristinare le funzionalità momentaneamente perse e sia perchè, non prevedendo interventi chirurgici importanti, riduce i rischi sempre connessi a questo tipo di approccio[9]. Lo sviluppo di questa metodologia è però strettamente legato alla possibilità di impiegare cellule staminali, ossia cellule non ancora differenziate ed in grado, perciò, di specializzarsi nel tessuto in esame.

L'approccio attualmente più utilizzato nella TE è, allora, l'utilizzo di un costrutto di cellule e matrice, con la possibilità di sfruttare sia un sistema chiuso che aperto. Nel primo caso, l'impianto è isolato dal resto dell'organismo da una membrana che permette

il passaggio delle sostanze nutrienti e lo protegge dalla risposta immunitaria dell'organismo. Questo tipo di sistema prevede tre tipi di configurazioni: apparati vascolari, sistemi a macrocapsule e sistemi a microcapsule[1,9]. Quella che in questa trattazione interessa di più è, però, la configurazione a sistema aperto. In tale sistema, come negli altri due casi sopra elencati, tutto parte dal paziente da cui, una volta individuata la patologia ed il tessuto da sostituire, vengono prelevate un certo numero di cellule attraverso una biopsia (Figura 2.1).



**Figura 2.1 Principi della TE.**

Queste cellule vengono, dapprima, coltivate in vitro per farle aumentare di numero e, successivamente, seminate su di una struttura, detta scaffold, che ha il compito di dare supporto alle cellule e di guidare la generazione del nuovo tessuto. Gli scaffold ricoprono un ruolo fondamentale nel processo di neomorfogenesi e, quindi, le loro caratteristiche richiedono attenzioni particolari. Queste strutture possono essere di origine sintetica o naturale e di conseguenza richiedere o no l'aggiunta di fattori di adesione e crescita. Inoltre, sempre in base alla loro natura possono essere biomateriali biomimetici, biorisorbibili o biodegradabili: tali caratteristiche condizioneranno la vita del tessuto all'interno dell'organismo.

Altre importanti caratteristiche per uno scaffold sono le sue strutture microscopiche, la distanza tra le fibre, la porosità superficiale, ect. che influenzano lo sviluppo delle cellule. Ad ogni modo, il costruito composto da cellule e scaffold trascorre un certo tempo di condizionamento in vitro all'interno di un bioreattore, strumento che riproduce le condizioni nel quale vive il tessuto da sostituire e, perciò, macchina che "istruisce"

funzionalmente le cellule del nuovo tessuto. Una volta che la neomorfogenesi è completata, si passa alla generazione dell'innesto e al trapianto sul paziente, il quale non corre nessun rischio di rigetto e non necessita di somministrazione prolungata di immunosoppressori.

## ***2.2 Tissue Engineering applicata all'esofago***

La descrizione anatomica e patologica dell'esofago, fatta nel primo capitolo di questa tesi, mette in luce varie situazioni, sia congenite sia acquisite, in cui è necessaria la sostituzione dell'esofago. Mostra, inoltre, nel caso particolare di soggetti affetti da atresia esofagea, come le tecniche ora utilizzate per questa sostituzione siano tutte affette da problematiche che portano a gravi complicanze postoperatorie e ad una qualità di vita compromessa. Le strategie innovative studiate dalla TE, poco fa descritte, sembrano poter essere la soluzione di molti di questi problemi. Tuttavia, la creazione di un organo bioartificiale con l'utilizzo di queste metodologie richiede un impegno multidisciplinare sul fronte della ricerca che tutt'ora va avanti.

### ***2.2.1 I primi passi***

I primi tentativi di ricostruzione chirurgica dell'esofago risalgono già ai primi anni del XX secolo, con i tentativi di Bircher (1097) e Neuhof e Ziegler (1922). Da allora un'intensa attività di ricerca è stata portata avanti su parecchi modelli animali con l'obiettivo di individuare il costrutto che più assomigliasse all'esofago nativo[4]. Sono stati fatti studi su un'ampia gamma di protesi, sia biologiche che sintetiche e nel 1983, per la prima volta fu dimostrato che i materiali non riassorbibili non permettono un'adeguata crescita del tessuto. In quell'anno, infatti, Fukushima e colleghi fabbricarono un tubo di gomma di silicone circondato da una maglia di Dacron e sostituirono l'esofago di 16 cani con questo costrutto[4]. Sorprendentemente, una sostanziosa parte di quelle cavie sopravvisse all'intervento ( il 25% anche più di 6 anni). Nonostante questo e nonostante gli studi successivi avessero mostrato che, nella zona adiacente l'anastomosi, la submucosa era molto simile a quella nativa, nella zona centrale dell'impianto furono trovate la presenza di tessuto fibroso e la totale assenza di cellule muscolari o ghiandole. Per superare queste insorgenze e tutti i problemi riconducibile alle complicanze post-operatorie, la ricerca iniziò a indagare costrutti estraibili o materiali riassorbibili (i primi scaffold). Ecco che inizia lo sviluppo nel verso della TE (Tabella 2.1).

**Table 1** Overview of studies of the last decade on esophageal tissue engineering

Author	Year	Scaffold	Cell type	Type of experimentation
Takimoto	1998	Silicone tube	—	in vivo (dog)
Shinhar	1998	Vicryl® mesh	—	in vivo (dog)
Badylak	2000	Extracellular matrix (from small gut or bladder submucosa)	—	in vivo (dog)
Lopes	2006	Porcine small gut submucosa	—	in vivo (rat)
Lynen Jansen	2004	Vicryl® and PVDF meshes	—	in vivo (rabbit)
Isch	2001	Decellularized human collagen	—	in vivo (dog)
Bhrany	2006	Rat decellularized esophagus	Rat esophageal epithelial cells	in vitro and in vivo (rat)
Ozeki	2006	Rat decellularized esophagus	Esophageal epithelial cells	in vitro
Urita	2007	Gastric acellular matrix	—	in vivo (rat)
Watanabe	2005	Gore-Tex vascular graft	—	in vivo (goat)
Grikscheit	2003	Organoid unit (mesenchymal core)	Rat esophageal epithelial cells	in vivo (rat)
Hayashi	2004	Pig type I collagen sheet	Human esophageal epithelial cells, human dermal fibroblasts, human smooth muscle cells	in vivo (rat)
Beckstead	2005	Alloderm, PLLA, PLGA75, PLGA50, PCL/PLLA	Rat esophageal epithelial cells	in vitro
Marzaro	2006	Pig decellularized esophagus	Autologous smooth muscle cells	in vitro and in vivo (pig)

Abbreviations: PVDF, polyvinylidene fluoride; PLLA, poly(L-lactic acid); PLGA75, poly(lactic-co-glycolic acid (75:25); PLGA50, poly(lactic-co-glycolic acid (50:50); PCL/PLLA, polycaprolactone/poly(L-lactic acid) (50:50).

**Tabella 2.1 Storia Te per la sostituzione dell'esofago.**

### 2.2.2 Costrutti privi di cellule

Come si può vedere dalla Tabella 2.1 nel 1998 due gruppi distinti portarono avanti le due tecniche citate nel paragrafo precedente. Takimoto e i suoi colleghi realizzarono un tubo di silicone ricoperto di collagene antigenico da estrarre a quattro settimane dall'impianto[4]. Il funzionamento di questo sostituto era abbastanza semplice: il collagene che ricopriva il tubo era gradualmente rimpiazzato dal tessuto ospite rigenerato, permettendo così di rimuovere lo stent di silicone e lasciare per la maggior parte intatto il nuovo tessuto esofageo generatosi. L'esame istologico sul nuovo tessuto mostrò la presenza di epitelio stratificato piatto, strati sia longitudinali che circolari di tessuto muscolare e ghiandole. L'altro gruppo, invece, guidato da Shinhar, utilizzò collagene ricoperto da una maglia di Vicryl come supporto per la crescita degli elementi fondamentali della parete esofagea. Questo prodotto andava poi man mano a scomparire senza lasciare alcuna traccia.

Per ridurre ulteriormente le complicazioni legate alla risposta immunitaria dell'organismo ricevente nei confronti di corpi estranei, negli ultimi 10 anni molti gruppi di ricercatori hanno concentrato la loro attenzione sullo sviluppo di scaffold realizzati con matrici di tessuto decellularizzato[4]. Il primo gruppo che prese questa direzione fu quello di Isch e colleghi che, nel 2001, utilizzò collagene umano decellularizzato (AlloDerm) su dei cani. Gli animali sopravvissero tutti e gli esami non segnalavano la presenza di disfagia, perdite di tessuto o stenosi ed anzi fu osservata una parziale riepitelizzazione con neovascolarizzazione. I risultati ottenuti da questo primo tentativo rafforzarono il nuovo concetto che la matrice decellularizzata ed il collagene

siano il giusto supporto per la guarigione del tessuto. Nel 2007 l'equipe di Urita fece un esperimento utilizzando matrice decellularizzata di tessuto gastrico, ottenendo una buona rigenerazione della mucosa senza, peraltro, l'insorgenza di stenosi e dilatazioni. Questo lavoro evidenziò, però, un'insufficiente rigenerazione muscolare, così gli autori, per migliorare l'insoddisfacente risultato, utilizzarono una combinazione di scaffold di collagene e fattori di crescita, nel caso specifico *basic fibroblast growth factor* (bFGF). In quest'ultimi impianti, l'esame istologico confermò un sostanzioso aumento dei vasi sanguigni rispetto agli impianti senza fattori di crescita.

L'applicazione di qualsiasi costrutto non seminato di cellule fu soddisfacente, però, solamente se utilizzato come *patch* per la correzione di difetti laterali dell'esofago, come fatto da Badylack e colleghi nel 2000. L'impianto di questi innesti per sole piccole porzioni del tubo non causa, infatti, la formazione di stenosi e permette un buon, ma soprattutto rapido, rimodellamento tessutale. Badylack usò come patch porzioni di matrice extra-cellulare derivate dalla submucosa dell'intestino tenue (small intestinal submucosa SIS) e dalla submucosa della vescica urinaria. L'esperimento evidenziò proprio il rapido riassorbimento del costrutto (2 mesi). Purtroppo l'utilizzo di patch trova limitate applicazioni cliniche. Risultarono, invece, fallimentari i più interessanti tentativi di innesti fatti per sostituire intere porzioni dell'organo (innesti cilindrici – tubi). Tutti i tipi di costrutti, sia sintetici che naturali, in quest'ultima configurazione, infatti, presentavano sempre problemi legati al rimodellamento tessutale, eccessivamente lento o anche assente, e, nella maggior parte dei casi, la formazioni di stenosi o carenze strutturali.

Comunque, tutti questi sforzi non sono da considerarsi vani, ma anzi hanno dato un contributo fondamentale nell'analisi della biocompatibilità di un gran numero di materiali e nell'analisi della capacità di diverse matrici nel favorire e supportare il rimodellamento tessutale. Ad esempio, è emerso che gli scaffold assorbibili naturali, come la matrice decellularizzata derivata da SIS, i quali sono commercialmente utilizzabili per applicazioni cliniche, danno uno dei migliori risultati, completando la rigenerazione di uno strato muscolare maturo in 5 mesi[10, 11].

### 2.2.3 Costrutti seminati con cellule

Contemporaneamente all'indagine di costrutti decellularizzati, alcuni gruppi di ricerca studiarono l'interazione tra cellule e scaffold, realizzando strutture seminate di cellule coltivate in vitro. Il primo esperimento documentato risale al 1994, quando Sato e i suoi collaboratori crearono una struttura tridimensionale composta di collagene, una maglia



di acido poliglicolico e cellule epiteliali esofagee umane coltivate[12]. Gli autori isolarono le cellule dalla mucosa normale presa da un campione di esofago di un paziente affetto da cancro e le coltivarono sulla superficie del gel di collagene. Questo costrutto venne successivamente impiantato sui lembi del muscolo gran dorsale di una ben specifica razza di topi (*Athymic rats*). Le istologie eseguite sui campioni diedero delle ottime risposte, basti pensare che l'esame eseguito 20 giorni dopo l'innesto, mostrò che l'epitelio era cresciuto a 15 strati di cellule, situazione molto simile alla conformazione dell'esofago umano. Un altro approccio sperimentale venne dato a distanza di quasi 10 anni dall'equipe di Grikscheit nel 2003. La strategia di questo gruppo si basava sull'utilizzo di particolari unità (*esophagus organoid units*) per rimpiazzare una porzione addominale dell'esofago nativo[13]. Questo tipo di unità, per altro descritte dalla stessa equipe in un precedente lavoro sull'intestino, si basa su unità multicellulari contenenti un nucleo mesenchimale circondato da epitelio intestinale polarizzato capaci di generare tutte le cellule dell'intestino e dell'esofago. Grikscheit e colleghi impiantarono il costrutto, composto da un tubo di acido poliglicolico seminato delle unità sopra descritte, nel peritoneo di alcuni topi, dove questo cresceva come un singolo lume e successivamente, dopo circa 4 settimane, lo sostituivano ad un tratto dell'esofago originale.

Ad ogni modo, gli autori in questo primo studio si concentrarono sulla fattibilità di produrre un condotto brevettato in vitro. Nonostante questo approccio potesse risultare interessante, esso ha un limite forte sul numero di unità presenti nell'intestino, il quale è generalmente basso. Per questo motivo, i tentativi successivi presero in considerazione cellule provenienti da varie fonti[4]. Un tentativo rilevante venne fatto da Hayashi e collaboratori nel 2004, i quali svilupparono un esofago ingegnerizzato utilizzando cellule epiteliali umane coltivate, cellule muscolari lisce, fibroblasti e collagene[14]. Il costrutto era formato da un foglio di collagene ottenuto da tendini umani sui quali erano incorporati i fibroblasti dermali derivati dalla pelle e le cellule muscolari lisce estratte dall'aorta. Su di questo erano poi seminate le cellule epiteliali coltivate ed ottenute dalla mucosa normale di un campione di un paziente affetto da cancro esofageo. Come l'equipe di Sato fece nel '94, anche questa trapiantò il nuovo esofago artificiale sui lembi del muscolo gran dorsale di topi athymic rats. Dopo un tempo variabile dai 7 ai 14 giorni il costrutto venne estratto ed all'esame istologico mostrò una struttura laminare molto simile a quella che caratterizza l'epitelio dell'esofago umano, la submucosa inoltre evidenziò un proprio strato muscolare[14]. I risultati ottenuti in questo esperimento sono da considerarsi estremamente positivi: infatti, ad esempio, il

tempo per lo sviluppo del costrutto, a differenza dell'esperienza fatta da Sato 10 anni prima, risulta praticamente dimezzato.

I buoni risultati che questa strada iniziava a portare spinsero, l'anno successivo, il gruppo di ricerca guidato da Beckstead a studiare l'interazione tra le cellule epiteliali dell'esofago e gli scaffold naturali e sintetici. L'intento era di capire quale delle due soluzioni (naturali o sintetici) meglio supportasse l'adesione e la proliferazione cellulare. L'equipe analizzò allora tutti i parametri che influiscono sul processo di sviluppo di uno strato cellulare: composizione dello scaffold, concentrazione di calcio, porosità della superficie, comportamento delle cellule. La conclusione a cui arrivarono era che sia gli scaffold naturali che quelli sintetici supportano l'adesione e la proliferazione delle cellule, ma che gli scaffold naturali portano già con loro la corretta morfologia strutturale per lo sviluppo del tessuto senza che ci sia bisogno di apportare delle modifiche[4-15]. Quindi, mentre sugli scaffold sintetici è essenziale l'aggiunta di diversi fattori di crescita per promuovere il processo di sviluppo cellulare e tissutale, negli scaffold naturali i fattori di crescita (e i loro inibitori) sono già presenti e sono sufficienti per avviare la crescita e la differenziazione delle cellule impiantate.

Sempre nel 2005 si ottenne per la prima volta la prova concreta del fatto che l'utilizzo di costrutti seminati di cellule era la giusta strada da seguire. In quell'anno Badylak e colleghi mostrarono infatti che l'unione di cellule muscolari e matrice decellularizzata garantisce protezione dalla formazione di stenosi, provoca una risposta infiammatoria ed una reazione fibrotica minore e aumenta il processo di riepitelizzazione[10]. Il rafforzamento e la conferma dei concetti portati alla luce da Badylak arrivò nel 2006 dall'equipe di Marzaro. Gli autori produssero un sostituto composto dall'unione di una matrice decellularizzata e cellule muscolari lisce autologhe e, successivamente, impiantarono su alcuni maiali sia questo costrutto, sia un costrutto composto dalla sola matrice decellularizzata[16]. Il confronto tra gli esami effettuati su i due diversi tipi di impianti mostrò l'effettiva minor risposta infiammatoria da parte dell'organismo in presenza delle cellule muscolari ed evidenziò, inoltre, una velocità maggiore da parte del costrutto a rigenerare strati muscolari organizzati.

Intorno agli anni 2005 - 2006 si è dunque arrivati ad una svolta decisiva nella ricerca che ha permesso di convogliare le forze nella corretta direzione. Tra il 2006 ed il 2009 fu anche dimostrato che non sono solo le cellule muscolari ad apportare grandi vantaggi alla rigenerazione tissutale dell'organo, ma anche quelle epiteliali. Fu mostrato che la presenza di cellule epiteliali promuove la cicatrizzazione dell'incisione e riduce l'infiammazione della submucosa[17] ed inoltre, la loro presenza, aumenta la

rigenerazione muscolare[18]. Infine, fu provato che le cellule epiteliali contribuiscono a ridurre l'insorgere di stenosi dovute all'intervento[19].

Negli ultimi 10 anni, dunque, la ricerca ha fatto emergere che nella Tissue Engineering l'utilizzo di costrutti seminati di cellule, siano esse muscolari o epiteliali, è di gran lunga migliore rispetto all'utilizzo di sola matrice di supporto per la ricostruzione di tessuti di una certa complessità. Le cellule migliorano, infatti, molti aspetti critici dell'interazione tra l'organismo ricevente e il nuovo impianto come la risposta infiammatoria, la risposta fibrotica, la cicatrizzazione della ferita e l'insorgenza di complicanze postoperatorie e, inoltre, riducono i tempi di creazione del nuovo costrutto. L'indagine sugli scaffold ha poi evidenziato che sia quelli di origine naturale che quelli di origine sintetica sono adatti alla proliferazione di queste cellule, ma che scaffold di origine naturale, come ad esempio la matrice extra cellulare derivata dalla submucosa dell'intestino tenue (SIS), oltre ad essere commercialmente utilizzabili, possiedono già l'architettura adatta e i fattori necessari allo sviluppo degli strati cellulari. Secondo queste osservazioni, allora, la ricerca si è diretta verso una nuova strategia: l'approccio ibrido. Questa tecnica consiste nell'assemblare individualmente le varie componenti tessutali in vitro e successivamente di mescolarle per comporre il nuovo tessuto[19].

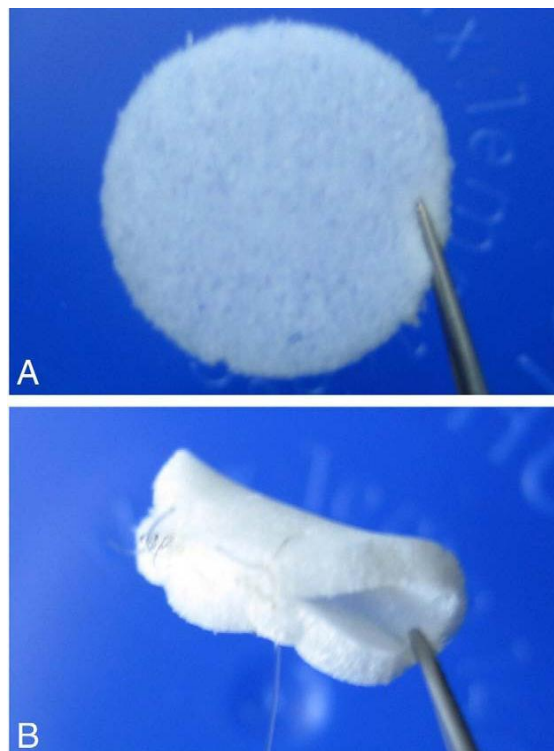
Dopo aver ripercorso le tappe più importanti della ricerca della TE nell'ambito dello sviluppo di un esofago ingegnerizzato, si può ora esporre la strategia attuale.

#### *2.2.4 Approccio ibrido: stadio d'avanzamento della ricerca*

L'applicazione dei principi della TE a organi complessi, come può essere l'esofago, richiede di agire secondo l'approccio ibrido che, come detto, prevede di creare i singoli tessuti in vitro per poi assemblarli e ingegnerizzare l'organo desiderato. Per seguire questo approccio, allora, la prima necessità è verificare la fattibilità e la sopravvivenza delle cellule epiteliali e muscolari sullo scaffold. Un'esperienza di questo tipo è stata fatta dall'equipe formata da Ainothofer, Höllwarth, Kofler e Saxena, che ha studiato la vitalità di cellule epiteliali e della muscolatura liscia, isolate da una particolare specie di topo (female Sprague-Dawley rat), su di uno scaffold di collagene (OptiMaix<sup>TM</sup>)[20].

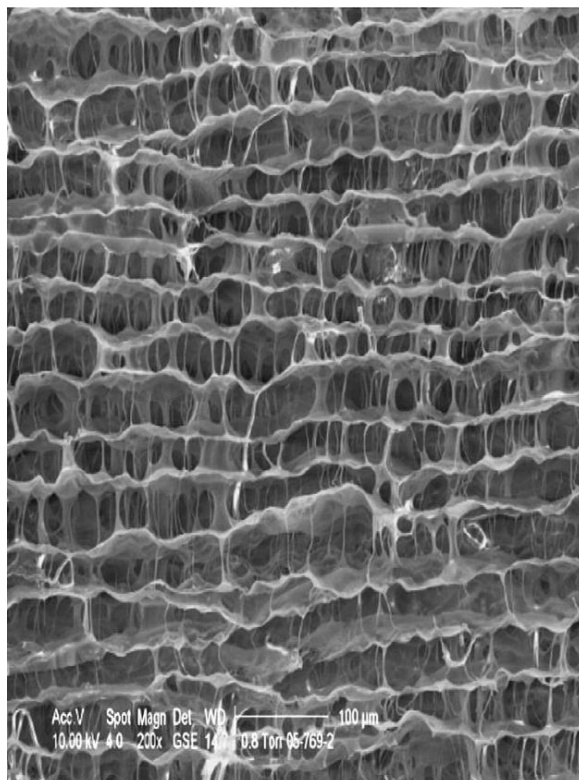
Il primo ed importantissimo passo di una ricerca di questo tipo è l'isolamento delle cellule e la loro cultura. È un passaggio importante e critico dal momento che una variazione, anche minima, di uno qualsiasi dei parametri da tenere sotto controllo può provocare il fallimento di tutta la procedura. Quest'ultima, insieme ai parametri da rispettare, è precisata in un protocollo. Un'esempio di protocollo per l'isolamento e la caratterizzazione di cellule epiteliali verrà dato più avanti in questo capitolo (metodo

sviluppato da Saxena e colleghi [21]). Il passo successivo è la semina delle cellule coltivate sullo scaffold, operazione che richiede, ovviamente, la scelta e la progettazione di uno supporto adatto. Come sottolineato anche in precedenza, è fondamentale la scelta del materiale che può essere di origine naturale o sintetica, ma è ancora più importante, poi, la morfologia dello scaffold. Essa deve essere scelta in modo da rispecchiare la morfologia dell'esofago nativo e, microscopicamente, in modo da favorire ed aiutare la sedimentazione e la proliferazione delle cellule. L'OptiMaix collagen utilizzato dall'equipe di Saxena è un disco di 13-mm di diametro e di 1.5-mm di spessore (Figura 2.2).



**Figura 2.2 OptiMaix collagen scaffold: A) OptiMaix disk; B) sutured disk to create tubular support.**

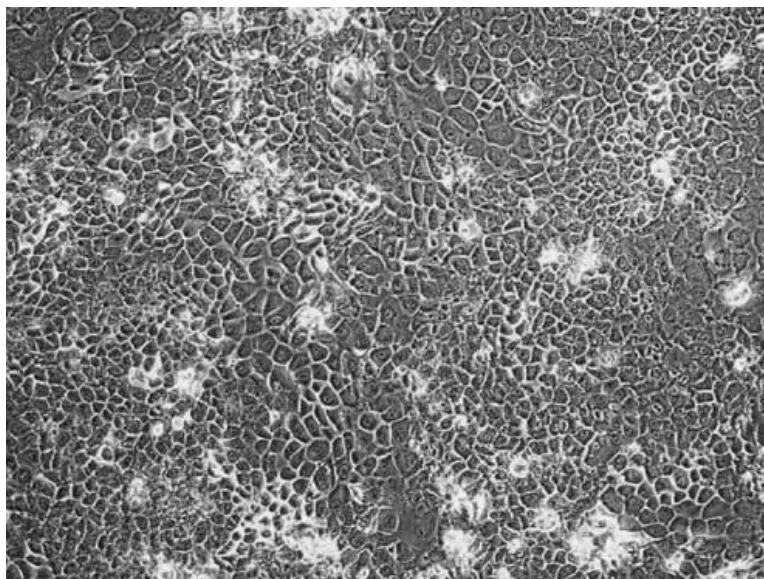
Uno dei parametri più importanti è la porosità, o meglio, la dimensione dei pori, che nell'OptiMaix varia tra 25 e 100  $\mu\text{m}$  (Figura 2.3).



**Figura 2.3 SEM image of OptiMaix collagen scaffold with pore diameters of 50  $\mu\text{m}$ : showing geometric orientation of the scaffold.**

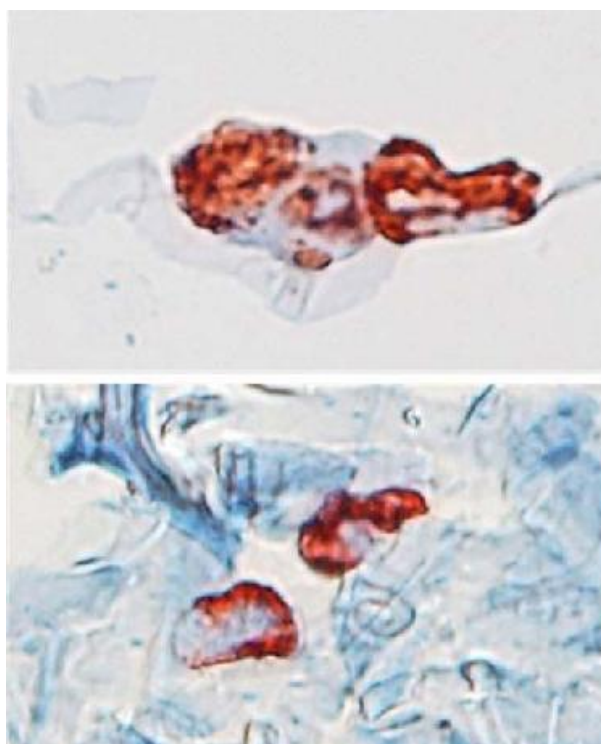
Da queste osservazioni si deduce che tessuti differenti richiedono caratteristiche differenti; così per le cellule epiteliali, nell'esperimento in esame, è stato usato uno scaffold 2D, mentre per le cellule muscolari uno scaffold 3D. Dopo una settimana di coltura le cellule epiteliali, che mostrano una morfologia sferica, vengono seminate sullo scaffold con una densità di 100000 cellule/ $\text{cm}^2$ . Le cellule del tessuto muscolare liscio, invece, vengono seminate solamente dopo 21 giorni di coltura con una densità di 250000 cellule/ $\text{cm}^2$ . La fase di semina termina con l'introduzione del mezzo di nutrimento, il quale deve coprire totalmente lo scaffold. Prima di aggiungerlo, però, le cellule sono lasciate aderire al supporto per circa 30 minuti. L'ultimo passo di questo studio della vitalità su scaffold prevede, allora, la crescita del tessuto. Il costrutto immerso nel mezzo di nutrimento viene sottoposto con cadenza settimanale ad analisi istochimiche per verificarne lo sviluppo. Nello studio di Saxena e colleghi, i dischi seminati sono stati mantenuti in vitro per 8 settimane, tempo che ha dimostrato la capacità di sopravvivenza delle cellule seminate sullo scaffold. Le analisi settimanali hanno messo in evidenza che dopo solo 14 giorni la differenziazione e la crescita delle

cellule epiteliali è completa, mostrando sullo scaffold la formazione di un foglio epiteliale maturo (Figura 2.4)[20].



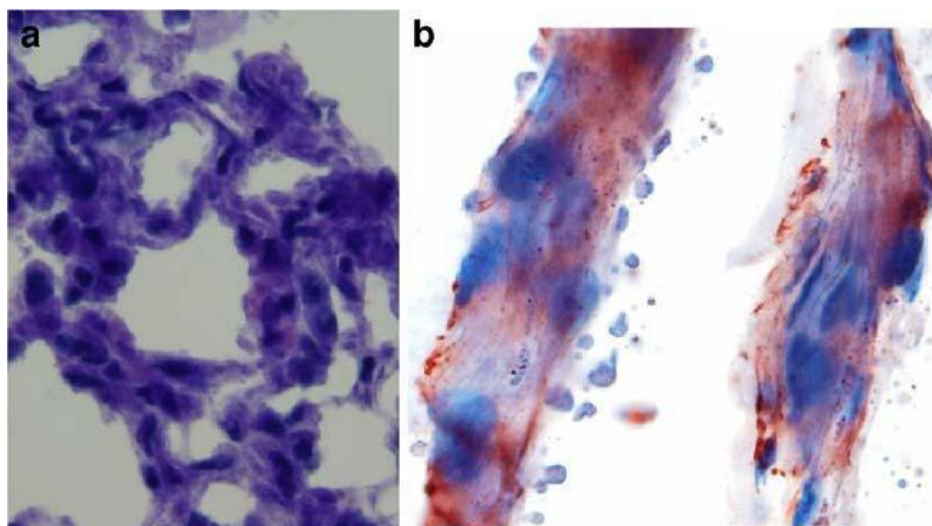
**Figura 2.4** Cellule epiteliali esofagee dopo 14 giorni di cultura: mostrano differenziazione e formazione di un foglio di tessuto epiteliale (20x).

L'esame immunohistochimico ha confermato la presenza di un solo tipo di cellule sullo scaffold, confermando la purezza del tessuto creato, e, inoltre, la presenza di tali cellule sia isolate che in gruppo (cluster) ha dimostrato la possibilità di sopravvivenza anche dopo 8 settimane di mantenimento in vitro (Figura 2.5)[20].



**Figura 2.5** Cluster di cellule (sopra) e cellule isolate (sotto) vive sullo scaffold dopo 8 settimane(60x).

Per quanto riguarda le cellule muscolari lisce, da questa ricerca è emerso che, affinché queste crescendo vadano a formare un tessuto muscolare orientato, è necessario che lo scaffold su cui vengono seminate sia una struttura con una direzione preferenziale, quindi organizzata lungo un'unica direzione. Gli autori hanno, infatti, seminato le cellule muscolari coltivate sia su scaffold non organizzati che su scaffold unidirezionali. Il confronto tra i risultati ottenuti ha dimostrato che tessuto muscolare orientato può essere ingegnerizzato con uno scaffold organizzato, poichè, in caso contrario, il tessuto muscolare che si genera non è organizzato (Figura 2.6)[20].



**Figura 2.6 a) tessuto muscolare non organizzato generato su scaffold non organizzato; b) tessuto muscolare orientato generato su scaffold unidirezionale**

In tutta questa prima fase di sviluppo, uno degli aspetti più importanti è l'intera epitelizzazione del costrutto: è fondamentale, infatti, che le cellule epiteliali coprano l'intero scaffold. Se così non fosse, le zone rimaste scoperte rappresenterebbero delle zone deboli, quindi potenziali punti di formazione di stenosi o perdite.

Verificata la vitalità su scaffold in vitro, è necessario studiare la sopravvivenza del costrutto in vivo e creare l'effettivo tratto di esofago ingegnerizzato. In generale, questa fase di evoluzione della struttura è eseguita attraverso un bioreattore. Una delle tecniche utilizzate dalla Tissue Engineering applicata all'esofago consiste nella generazione in situ del condotto. Questa strategia prevede l'impianto dello scaffold seminato di cellule e avvolto su di uno stent all'interno dell'organismo, solitamente suturandolo sul grande omento, porzione della sierosa peritoneale collocata nella cavità addominale. Lo stesso Saxena, autore degli studi citati sopra, ha partecipato allo studio di un costrutto tubolare e vascolarizzato generato in situ. In questo lavoro Saxena e colleghi hanno seminato su

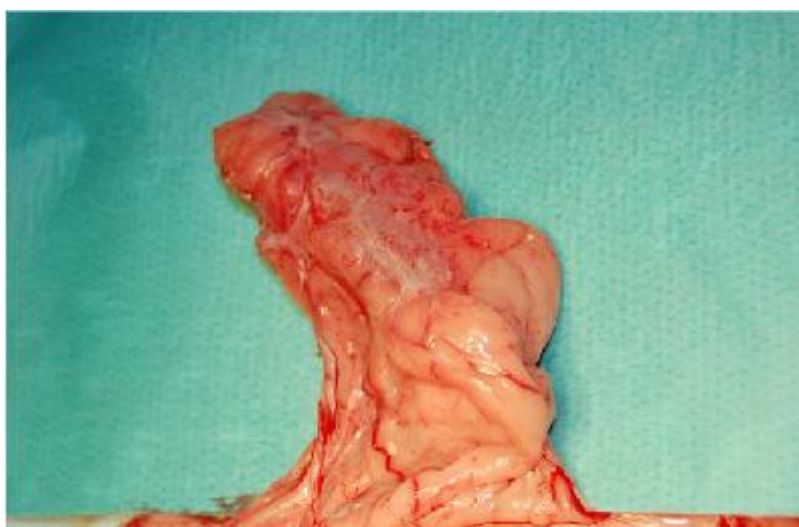


uno scaffold di matrice di collagene cellule epiteliali ovine ed avvolto questo su di un tubo endotracheale per donargli la forma tubolare caratteristica dell'esofago (Figura 2.7)[22].



**Figura 2.7** Foglio di matrice di collagene seminato di cellule epiteliali esofagee ovine avvolto su un tubo endotracheale.

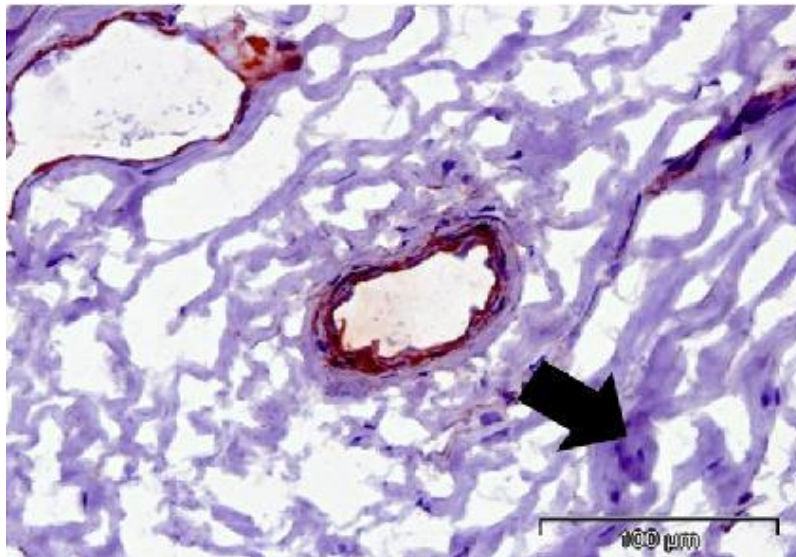
Gli autori della ricerca hanno poi estratto il costrutto in due diversi tempi: a 8 e a 12 settimane. Per la sopravvivenza dei tessuti è fondamentale l'apporto di sangue e, quindi la vascolarizzazione. Già negli impianti estratti dopo 8 settimane il costrutto risulta ben integrato con l'area dell'omento con rami vascolari sviluppatisi tutto attorno ad esso (Figura 2.8)[22].



**Figura 2.8** Il tessuto dell'omento avvolge il costrutto esposto e fornisce il supporto vascolare adeguato.



I risultati degli esami fatti sugli impianti estratti a distanza di 12 settimane rafforzano la validità di questa strategia di crescita. Innanzitutto, il costruito è ora un tessuto tubolare con una fodera liscia lungo il lato interno[22]. L'aspetto più interessante è, però, la crescita di nuove cellule sulla struttura porosa dello scaffold e, soprattutto, della presenza, nelle zone periferiche, di ricrescita vascolare. Infatti, essa è essenziale per il supporto della ricrescita cellulare appena citata (Figura 2.9).



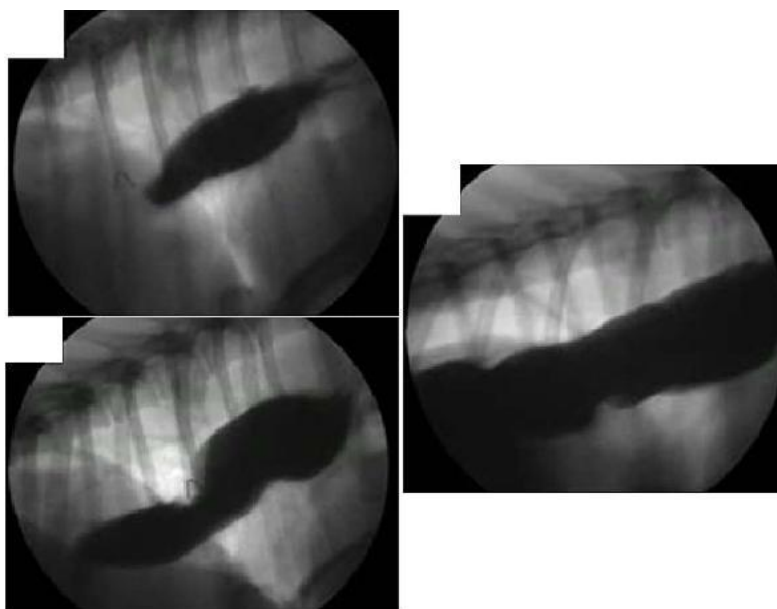
**Figura 2.9 Ricrescita cellulare nella zona periferica della matrice di collagene.**

Lo studio eseguito da Saxena e colleghi ha quindi dimostrato la bontà della tecnica in situ per lo sviluppo di un piccolo tratto di esofago ingegnerizzato. Esso è risultato avere uno spessore costante di 4 mm, un rivestimento nella parte interna e morfologia complessiva molto simile all'esofago nativo[22].



**Figura 2.10 Costrutto rudimentale tubolare vascolarizzato.**

L'ultima fase di questo approccio, passaggio obbligatorio per ogni strategia, prevede la verifica della sopravvivenza e della funzionalità in vivo. Ciò significa effettuare la sostituzione di un piccolo tratto di esofago nativo con l'esofago ingegnerizzato. Buoni risultati emergono dall'esperienza fatta da Nakamura, Nakase, Kin e colleghi, i quali, attraverso tecniche differenti rispetto a quelle adottate da Saxena e collaboratori nello studio appena visionato, hanno, dapprima, creato un tratto di esofago ingegnerizzato facendolo crescere in situ e poi sostituito una piccola porzione di esofago intratoracico di alcune femmine di beagle con il costrutto ottenuto. I tessuti di quest'ultimo, finita la fase di sviluppo in situ, risultano avere caratteristiche simili a quelle dei tessuti ottenuti da Saxena e colleghi, perciò pronti per essere impiantati. Gli esami eseguiti sul costrutto innestato nell'esofago hanno rivelato un'ottima sopravvivenza ed integrazione del tratto e una buona risposta funzionale. Il sostituto ha dimostrato una buona dilatabilità ed un buon passaggio del cibo, nonostante l'assenza di attività peristaltica sulle pareti ingegnerizzate[19].



**Figura 2.11** Successione fotografica della distensione dell'impianto.

L'avanzamento della ricerca nell'approccio ibrido per la generazione di un esofago ingegnerizzato, benchè, come visto, abbia già portato ad ottimi risultati, si scontra ancora con alcuni limiti per la maggior parte meccanici. Tutti i risultati ottenuti e, soprattutto, quelli ottenuti da Nakamura e colleghi, derivano dalla creazione ed applicazione di un condotto tubolare di piccole dimensioni, situazione che limita i punti critici ancora da superare.

### 2.2.5 Approfondimento: protocollo di isolamento e caratterizzazione

Come anticipato al paragrafo precedente, si vuole ora dare un esempio di protocollo per l'isolamento e la caratterizzazione di cellule epiteliali. Chiaramente esistono protocolli per ogni fase sopra descritta e anche diversi protocolli per la stessa fase. L'intento è di mostrare la peculiarità delle azioni da compiere e la complessità di ogni fase della ricerca.

Il protocollo è riportato dall'articolo: *“Esophagus tissue engineering: in vitro generation of esophageal epithelial cell sheets and viability on scaffold”* di Ainödhofer H, Höllwarth M, Saxena A.

*“Le cellule epiteliali esofagee di topo sono state isolate modificando un protocollo pubblicato precedentemente[23]. Brevemente, gli esofagi di topo sono stati presi da topi di razza Sprague-Dawley come approvato dall'organo Animal Care and Use Committee del ministero della scienze e la ricerca, Vienna, Austria. L'esofago è stato ben lavato in una soluzione a 4° C di PBS (Phosphate buffered saline) (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) contenente antibiotici ( 100 U/mL of penicillin G sodium, 100 mg/mL of streptomycin sulfate, and 0.25 mg/mL of amphotericin B; Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) e incubato tutta la notte a 4° C in dispasi (50 caseinolytic U/mL; BD Biosciences, Bledford, Mass) contenente antibiotici. Il giorno successivo, lo strato epiteliale è stato separato meccanicamente dal tessuto connettivo e tagliato longitudinalmente utilizzando un microscopio operatorio o loop per ingrandire la struttura. L'epitelio è stato quindi trattato per 10 minuti con 0.05% di tripsina in 0.53 mmol/L di EDTA ( Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) a 37° C, seguita da pipettaggio continuo per 10 minuti. Il mezzo di coltura più 10% di siero fetale bovino (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) è stato aggiunto per neutralizzare la tripsina, e le cellule sono state pellettizzate per centrifugazione (1000 rivoluzioni per minuto per 5 minuti). Infine, le cellule sono state risospese in coltura e piastrate su collagene rivestito di pozzetti. Il mezzo di coltura consiste del mezzo EpiLife (Cascade Biologics, Portland, Ore) nel quale è stato aggiunto calcio per raggiungere la concentrazione di 0.06 mmol/L, integrato con il supplemento alla crescita di cheratinociti umani (Cascade Biologics, Portland, Ore), estratto di ipofisi bovina (0.2%), insulina (5 µg/mL), idro-cortisone (0.18 µg/mL), fattori di crescita epidermali umani (0.2 ng/mL), mezzo di trasferimento (5 µg/mL), triiodotironina (6.51 ng/mL) (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo), e glutammina-penicillina-streptomomicina/amfotericina-B (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo). Le cellule sono state fatte*

*crescere a 37° C con un 5% di anidride carbonica. Il mezzo è stato cambiato a giorni alterni.*

*Per confermare l'identità delle REEC, le cellule coltivate sono state fissate in acetone (Merck, Darmstadt, Germany) e evidenziati utilizzando un anticorpo anti-CK-14 (sc-13878, santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif). Il controllo era costituita da un campione incubato con concentrazione di Igc di topo abbinato (sc-13878, santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif) invece dell'anticorpo primario. Le cellule sono state poi incubate con (Isotiocianato di fluoresceina) coniugato con anti-topo di coniglio (F0232, Dako, Glostrup, Denmark) e To-Pro-3-ioduro (Imvitrogen, Crlsband, Calif) è stato usato come contrasto nucleare. Le cellule sono state riprese utilizzando un microscopio a fluorescenza.”[22].*

# CAPITOLO III

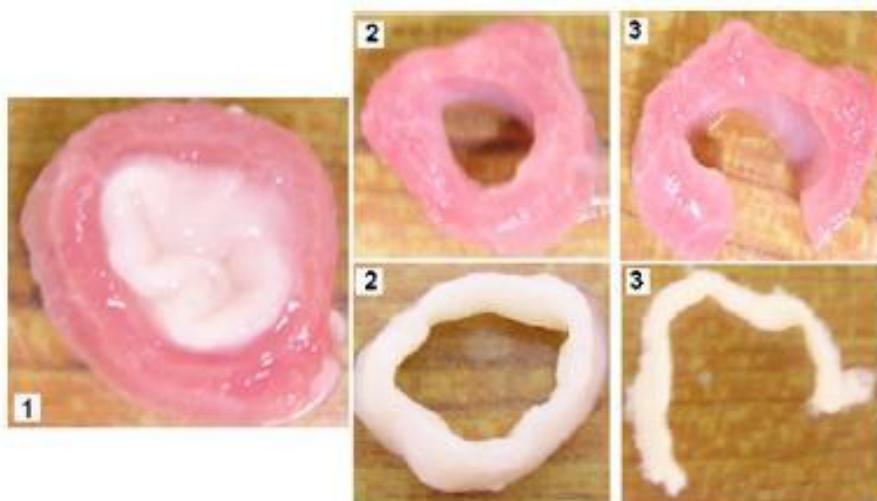
## Proprietà meccaniche

### *3.1 Caratterizzazione meccanica dei tessuti*

Uno dei maggiori ostacoli verso l'avanzamento dello sviluppo di un esofago ingegnerizzato è rappresentato da limiti di tipo meccanico. Fino ad ora sono stati realizzati, infatti, solamente costrutti di piccole dimensioni, poichè i tessuti ingegnerizzati prodotti soffrono di una certa "fragilità". Per migliorare questo aspetto ed ottenere tessuti migliori è necessario, in primo luogo, conoscere le proprietà meccaniche dell'esofago nativo.

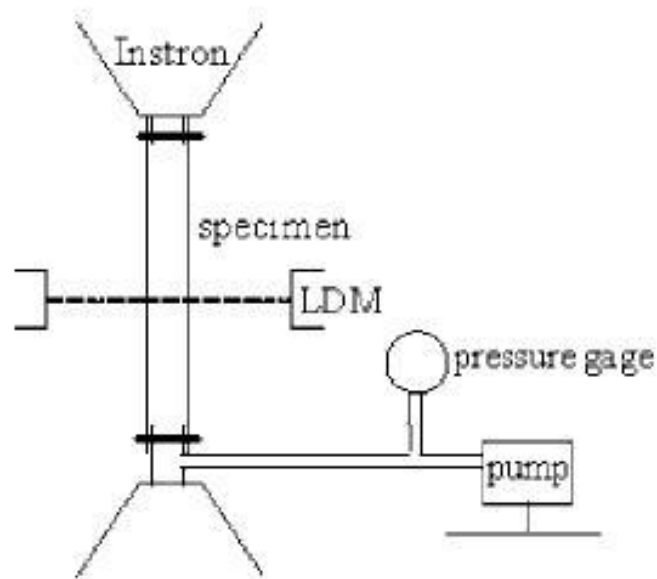
Come è stato descritto nel capitolo I, l'esofago è un tubo muscolare cavo la cui organizzazione istologica è una struttura multistrato composta principalmente da uno strato interno di tonaca mucosa e uno esterno di tonaca muscolare. Intuitivamente, ci si può aspettare che le differenze tra i due strati che compongono il tessuto dell'organo da un lato influenzino il comportamento del tessuto e dall'altro contribuiscano alla distribuzione non omogenea degli stress. Ai fini di una caratterizzazione meccanica, quindi, si vorrebbero conoscere tanto le proprietà meccaniche dei singoli strati, quanto il loro comportamento congiunto.

Uno studio delle proprietà meccaniche dei tessuti dell'esofago è stato fatto da Chain, Chong, Fung e Yang[24], i quali hanno condotto varie esperienze per caratterizzare questo organo: la principale consisteva nell'indagare la relazione tra resistenza assiale, diametro e pressione di una porzione di esofago attraverso test di inflazione a vari e fissati allungamenti lungo l'asse. Gli autori hanno per prima cosa trattato gli esofagi a loro disposizione in modo da ottenere tubi cilindrici privi di tessuto esterno, dalle cui estremità hanno tagliato un anello di circa 2 mm per misurare le geometrie della struttura. Immediatamente dopo, lo strato di mucosa e quello muscolare sono stati separati, in modo da studiare le caratteristiche dei singoli tessuti. Sempre durante questa prima fase preliminare, una parte dei campioni è stata utilizzata per misurare lo stato di "sollecitazione zero" del tessuto, ottenuta, dopo un bagno all'interno di una soluzione salina (PBS) e un riposo di circa 30 minuti, attraverso un taglio longitudinale del cilindro (Figura 3.1).



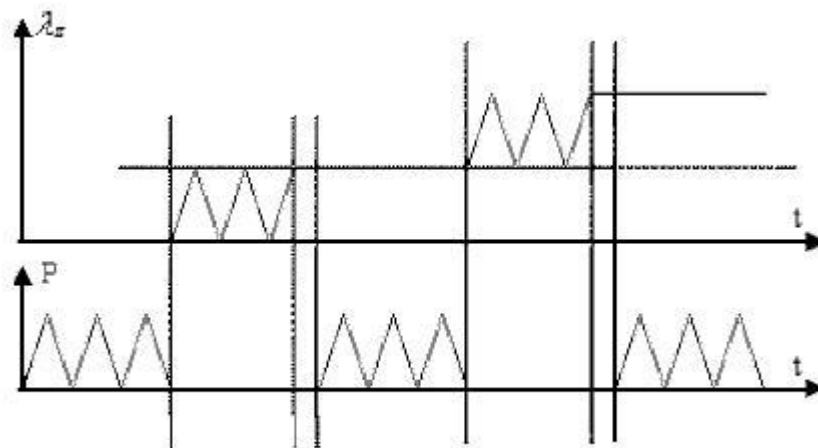
**Figura 3.1** Procedura per ottenere lo stato di sollecitazione zero: 1) assenza di carico con tessuti legati; 2) assenza di carico con tessuti separati; 3) stato di sollecitazione zero.

Per il test a inflazione i ricercatori hanno utilizzato una pompa, un misuratore di pressione, un Laser Micro Diameter (LDM) e uno strumento Instron 5566. Con quest'ultimo i campioni sono stati fissati e caricati assialmente con carico costante durante l'inflazione. Lo schema sottostante (Figura 3.2) rappresenta la configurazione sperimentale per il test che, in linea generale, funziona nel seguente modo: la pompa perfonde nel lume del campione il PBS, mentre il manometro misura la pressione e LDM il diametro esterno del lume.



**Figura 3.2** Configurazione sperimentale per il test a inflazione.

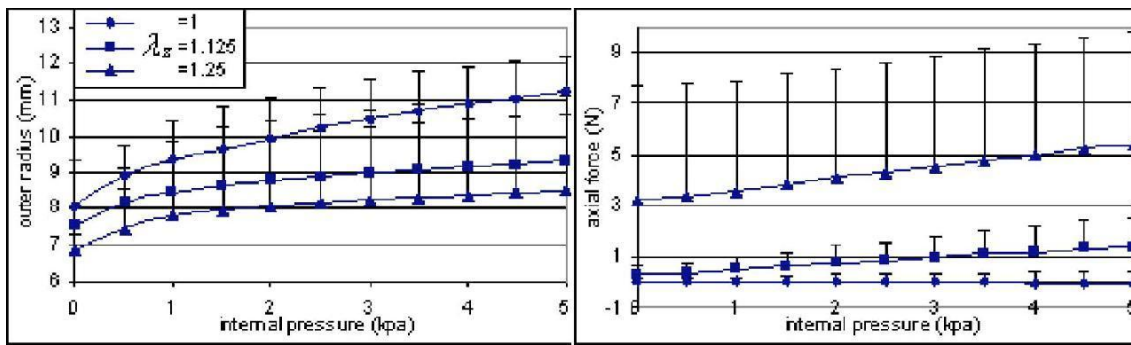
Ogni singolo campione è stato sottoposto ad un ben specifico protocollo per l'ottenimento di dati significativi. Innanzitutto, dopo aver montato il campione, Chian e colleghi hanno applicato un precarico per rimuovere le lassità del tessuto e misurare la lunghezza assiale di riferimento[24]. Successivamente essi hanno applicato la seguente procedura ciclica: per preconditionare il campione nella direzione circolare, è stata imposta e rimossa una pressione compresa tra 0 e 5 kPa alla velocità di circa 10 Pa/s per tre volte, quindi, azzerata la pressione, il campione è stato allungato, sempre per tre volte, da 0% al 12.5% alla velocità di 5 mm/min e durante l'ultimo allungamento esso è stato mantenuto allungato a 1.125. Dopo 30 s di riposo, mantenendo l'allungamento di 1.125, vengono ripetuti i tre cicli di inflazione per ottenere i dati di pressione, diametro e asse necessari. Azzerata nuovamente la pressione, riprende l'allungamento che va da 1.125 a 1.25 e si ripete, poi, il processo di pressurizzazione (Figura 3.3).



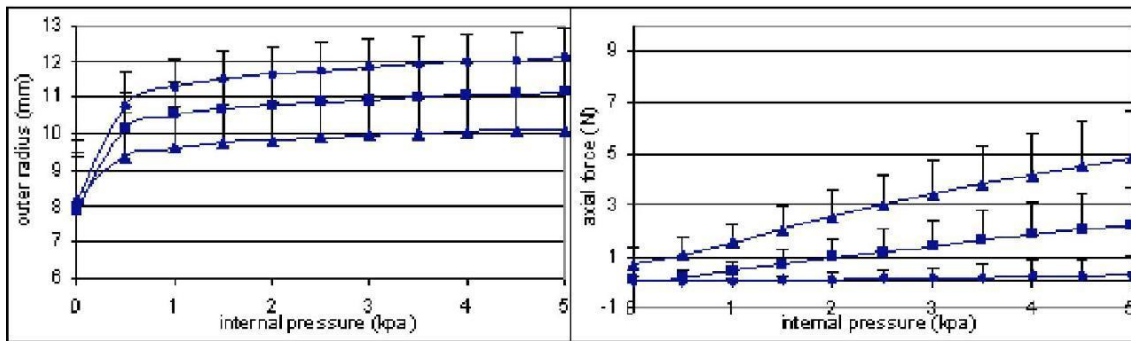
**Figura 3.3** Grafico di protocollo sperimentale (P=pressione,  $\lambda_z$ =allungamento).

Dai dati rilevati, gli autori hanno ottenuto informazioni di tipo meccanico sui singoli strati (mucosa e muscolare) e hanno cercato di ricavare un modello costitutivo per predire il comportamento dei due tessuti legati (non trattato in questa tesi), basandosi sull'approccio di Vaishnav [25].

Il primo passo dell'analisi è stato quello di graficare la relazione tra pressione interna, applicata dalla pompa, e, separatamente, raggio esterno e resistenza assiale per i due strati (Figura 3.4).



(a) Muscle



(b) Mucosa

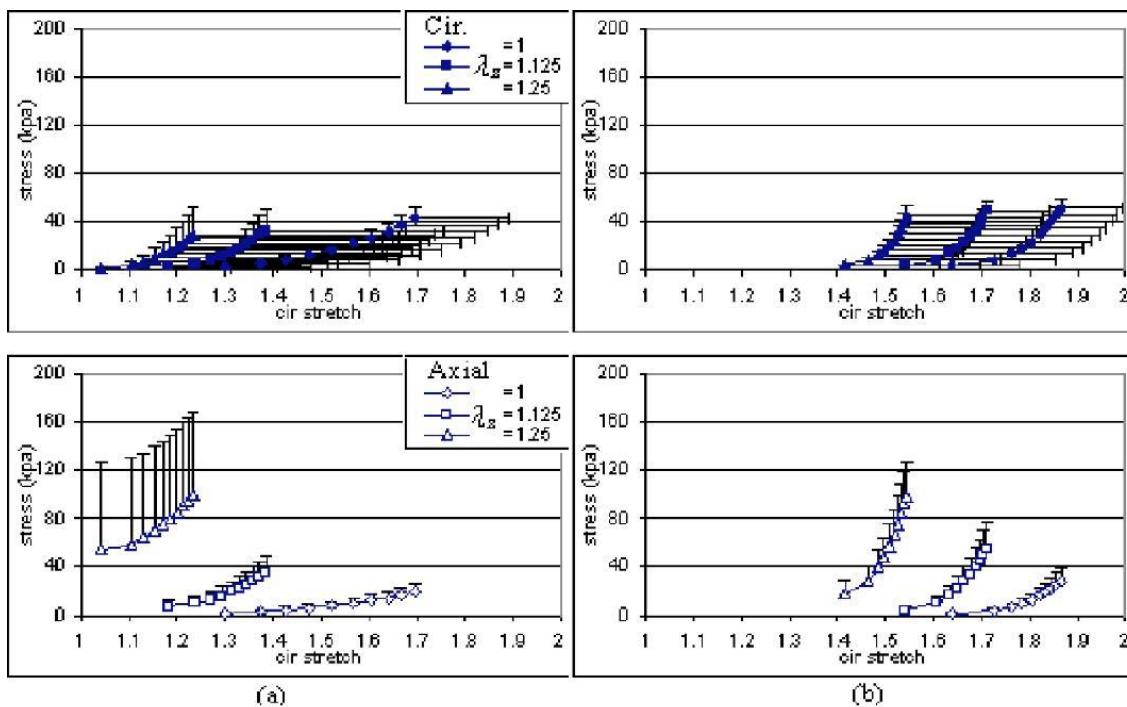
**Figura 3.4** Grafici del raggio esterno e della resistenza assiale in funzione della pressione interna per (a) strato muscolare (b) strato di mucosa. 3 curve per grafico: una per ogni valore di allungamento (valore principale  $\pm$  SD).

Per quanto riguarda il raggio esterno, si vede che per entrambi i tessuti esso aumenta all'aumentare della pressione interna durante l'inflazione e la mucosa ha un incremento significativamente maggiore rispetto al muscolo. In particolare per la mucosa, l'aumento maggiore si verifica tra 0 e 0.5 kPa e successivamente il suo incremento è meno rapido rispetto a quello del raggio del tessuto muscolare (Figura 3.4 grafici di sinistra). Dai dati sperimentali emerge, perciò, che la mucosa, inizialmente, è più cedevole e, superati gli 0.5 kPa di pressione, diventa più rigida in direzione circolare dello strato muscolare. Per quanto riguarda, invece, la resistenza assiale si nota che, durante l'inflazione eseguita senza l'applicazione di un allungamento, questa diminuisce, solo inizialmente, all'aumentare della pressione applicata, mentre per i test eseguiti applicando un allungamento al campione, aumenta all'aumentare della pressione.

Il secondo passo dell'analisi ha indagato, invece, le distribuzioni dello stress nei due tessuti, tenendo conto di tutte le sollecitazioni che il test ad inflazioni produce. Utilizzando le equazioni ottenute dall'approccio di Vaishnav, gli autori hanno potuto graficare gli stress principali come funzione dell'allungamento in direzione circolare (Figura 3.5). I grafici evidenziano che per le stesse condizioni di pressione e



allungamento assiale, la mucosa ha una percentuale di sollecitazione in direzione circolare maggiore del muscolo.



**Figura 3.5** Curva stress principale-allungamento nel range di pressione 0.5-5 kPa per (a) strato muscolare, (b) strato di mucosa (valore principale  $\pm$  SD).

I risultati emersi sottolineano il più pronunciato comportamento non lineare dello strato di mucosa, soprattutto influenzato dal gran salto di comportamento dell'aumento del raggio esterno sotto l'azione di una pressione superati i 0.5 kPa circa.

Rispetto ad altri tipi di test e tecniche di indagine, il test ad inflazione ha mostrato di avere due grandi vantaggi: è un test triassiale e da informazioni fisiologicamente più significative per gli stati di deformazione[24]. Infatti, l'incrocio tra i dati sperimentali ed il modello costitutivo utilizzato dall'equipe ha evidenziato che la quantità di elastina è maggiore nello strato muscolare, mentre il contenuto di collagene è maggiore nello strato di mucosa. Inoltre, questo studio ha mostrato che quando i due strati lavorano insieme, la distribuzione dello stress all'interfaccia tra i due è fortemente discontinuo, poichè la mucosa non contribuisce a resistere al carico applicato. Riprendendo la Figura 3.1, si vede, infatti, che nello stato di nessun carico applicato lo strato di mucosa è compresso in modo da occupare il minor spazio possibile. Quindi, quando viene applicata la pressione interna, la mucosa viene gradualmente distesa e nessuna tensione è rilevata. In aggiunta, è stato poco fa dimostrato che lo strato di mucosa è inizialmente molto cedevole e lo stress può essere supposto tanto piccolo da non tenerne conto.

Le informazioni ottenute riguardo il comportamento delle due tonache e la distribuzione dello stress su di esse e sull'intera parete dell'esofago sono molto importanti per lo studio delle funzioni dell'organo. Sapendo che l'esofago subisce un allungamento in situ del 20% circa e che il bolo alimentare impone una pressione compresa tra i 3 kPa ed i 5 kPa[26], si possono riconoscere e valutare eventuali patologie dall'analisi dello stress rilevato.

# CONCLUSIONI

Le attuali tecniche chirurgiche per il trapianto o la riparazione di organi, garantiscono con buona probabilità il ripristino delle funzionalità. Questo vale, ovviamente, anche per l'esofago, organo dell'apparato digerente che congiunge laringe e stomaco. Nel primo capitolo di questo lavoro, si è vista una panoramica generale delle patologie che possono colpire l'esofago e si è visto, nel caso dell'atresia esofagea, quali siano le attuali soluzioni chirurgiche. Nonostante queste tecniche permettano all'organo di svolgere le normali funzioni, esse portano alcune problematiche che non garantiscono al paziente una adeguata qualità di vita. Innanzitutto, chi si sottopone ad un intervento di questo tipo, per evitare reazioni di rigetto, deve assumere a vita immunosoppressori e molti altri farmaci, con conseguenze per la salute complessiva e con un ingente esborso economico (fattore da non sottovalutare). Possono insorgere, poi, problematiche di tipo meccanico strettamente legate all'intervento, quindi all'interposizione di tessuti diversi, alla suturazione, al possibile allungamento del tessuto rimanente, che potrebbero far insorgere fenomeni come la stenosi, la perdita di tessuto e, ancora, la comparsa di elongazioni.

Nel corso di questa trattazione si è visto come negli ultimi anni sia emerso un settore di ricerca interdisciplinare che si pone l'obiettivo di sostituire o riparare un organo senza incorrere in quei problemi sopra elencati: si tratta della Tissue Engineering. L'applicazione dei suoi principi generali al caso specifico dell'esofago, dopo anni di ricerca e risultati non sempre positivi, ha portato allo sviluppo dell'approccio ibrido, si è visto che con questo approccio sono stati ottenuti risultati molto positivi sia per quanto riguarda la tempistica, sia per quanto riguarda la qualità dei tessuti prodotti e che è stato possibile creare una porzione di esofago ingegnerizzato funzionante. Nell'ultima parte di questo lavoro l'attenzione si è poi fermata su quelli che sono, ancora, ostacoli da superare e ha messo in luce quanto particolari siano i tessuti che costituiscono l'organo nativo.

I risultati ottenuti sono senza dubbio promettenti, ma nuove ricerche sono necessarie per arrivare a sviluppare un esofago ingegnerizzato utilizzabile a livello clinico e sicuramente gran parte degli sforzi dovrà essere orientata verso lo studio delle proprietà meccaniche che si desiderano nei tessuti ingegnerizzati. Il raggiungimento dello

sviluppo di un intero esofago ingegnerizzato non sarebbe solamente un traguardo importante per la soluzione di molte patologie esofagea, ma rappresenterebbe una grande spinta verso l'ingegnerizzazione di altri gli organi. L'esofago è uno degli organi più semplici dell'organismo umano: lo sviluppo di nuove metodologie per il superamento di alcuni importanti limiti ottenuti durante il suo sviluppo, potrebbe servire all'ingegnerizzazione di organi più complessi.

# BIBLIOGRAFIA

- [1] Fuchs JR, Nasser BA, Vacanti JP. Tissue Engineering: A 21st Century Solution to Surgical Reconstruction. *Ann Thorac Surg* 2001;72:577-91.
- [2] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920-6.
- [3] Vacanti JP. Beyond transplantation. Third annual Samuel Jason Mixter lecture. *Arch Surg* 1998;123:545-9.
- [4] De Coppi P, Elvassore N, Pierro A, Zani A. Tissue engineering: an option for esophageal replacement? *Seminars in Pediatric Surgery* (2009); 18, 57-62.
- [5] Martini FH, Tallitsch RB, Timmons MJ. *Anatomia umana. Terza edizione* – EdiSES s.r.l- Napoli Copyright © 2008; pg. 661.
- [6] Bresadola V. *Chirurgia per le professioni sanitarie. EdiSES – Napoli Copyright © 2006; Cap. 8 pg. 87-92.*
- [7] Atresia esofagea. Avviabile da: URL:  
[http://www.atresiaesofagea.it/page\\_2.html](http://www.atresiaesofagea.it/page_2.html)
- [8] Bambino Gesù ospedale pediatrico. Avviabile da: URL:  
<http://www.ospedalebambinogesu.it/portale2008/Default.aspx?iditem=119>
- [9] Di Bello C. *Biomateriali: introduzione allo studio dei materiali per uso biomedico. Prima edizione – Patron editore- Quarto Inferiore(BO) Copyright © 2004; cap.12 pg. 414.*
- [10] Cattan P, Gaujoux S, Larghero J, Poghosyan T, Sfeir R. Bioartificial Oesophagus in the Era of Tissue Engineering. *JPGN Volume 52, Supplement 1, May 2011.*
- [11] Cabrita A, Ilharco J, Lopes MF, et al. Esophageal replacement in rat using porcine intestinal submucosa as a patch or a tube-shaped graft. *Dis Esophagus* 2006; 19:254-9.
- [12] Ando N, Sato M, Ozawa S, et al. An artificial esophagus consisting of cultured human esophageal epithelial cells, polyglycolic acid mesh, and collagen. *ASAIO J* 1994; 40:M389-92.
- [13] Grikscheit T, Ochoa ER, Srinivasan A, et al. Tissue-engineered esophagus: experimental substitution by onlay patch or interposition. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 126:537-44.

- [14] Anurov M, Klinge U, Lynen Jansen P, et al. Surgical mesh as a scaffold for tissue regeneration in the esophagus. *Eur Surg Res* 2004; 36:104-11.
- [15] Beckstead BL, Bhrany AD, Pan S, et al. Esophageal epithelial cell interaction with synthetic and natural scaffold for tissue engineering. *Biomaterials* 2005; 26:6217-28.
- [16] Marzaro M, Oselladore B, Vigolo S, et al. In vitro and in vivo proposal of an artificial esophagus. *J Biomed Mater Res A* 2006; 77:795-801.
- [17] Murakami D, Ohki T, Yamato M, et al. Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue-engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model. *Gut* 2006; 55:1704-10.
- [18] Tan B, Tan MY, Wei RQ, et al. Grafts of porcine small intestinal submucosa with cultured autologous oral mucosal epithelial cells for esophageal repair in canine model. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009; 234:453-61.
- [19] Kin S, Nakamura T, Nakase Y, et al. Intrathoracic esophageal replacement by in situ tissue-engineered esophagus. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 136:850-9.
- [20] Ainödhofer H, Höllwarth M, Kofler K, Saxena A. Esophagus Tissue Engineering: Hybrid Approach with Esophageal Epithelium and Unidirectional Smooth Muscle Tissue Component Generation *In Vitro*. *J Gastrointest Surg* (2009); 13: 1037-1043.
- [21] Ainödhofer H, Höllwarth M, Saxena A. Esophagus tissue engineering: in vitro generation of esophageal epithelial cell sheets and viability on scaffold. *Journal of Pediatric Surgery* (2009); 44: 896-901.
- [22] Ainödhofer H, Baumgart H, Höllwarth M, Kofler K, Komann C, Saxena A, Soltysiak P. Esophagus tissue engineering: in situ generation of rudimentary tubular vascularized esophageal conduit using the ovine model. *Journal of Pediatric Surgery* (2010); 45:859-864.
- [23] Eng L, Oda D, Savard CE, et al. Reconstituted human oral and esophageal mucosa in culture. *In-Vitro Cell Dev Biol Anim* 1998; 34:46-52.
- [24] Chain KS, Chong CK, Fung TC, Yang W. 3D Mechanical Properties of the Layered Esophagus: Experiment and Constitutive Model. *Journal of Biomedical Engineering* (2006); 128:899-908.
- [25] Humphrey, J.D. *Cardiovascular Solid Mechanics: Cells, Tissues and Organs*. Springer-Verlag, New York, 2002.
- [26] Gregersen, H. *Biomechanics of the Gastrointestinal Tract: New Perspectives in Motility Research and Diagnostics*. Springer-Verlag, London, 2003.

### *Riferimenti testuali*

- Di Bello C. Biomateriali: introduzione allo studio dei materiali per uso biomedico. Prima edizione -Pàtron editore- Quarto Inferiore(BO) Copyright © 2004; cap.12.
- Martini FH, Tallitsch RB, Timmons MJ. Anatomia umana. Terza edizione – EdiSES s.r.l- Napoli Copyright © 2008; pg. 661.

### *Links utili*

- Tofs. Avviabile da: URL: <http://www.tofs.org.uk>