



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
BIOINGEGNERIA**

**ANALISI DEL COMPORTAMENTO MECCANICO
DELLA TUNICA ALBUGINEA UMANA**

Relatore: Prof. Silvia Todros

Laureanda: Federica Ciotti

ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022

Data di laurea 28/11/2022

INDICE

SOMMARIO.....	5
---------------	---

CAPITOLO 1

ANATOMIA E ISTOLOGIA DELLE VIE URINARIE INFERIORI.....	7
--	---

1.1 Le vie urinarie inferiori.....	7
1.1.1 La vescica.....	8
1.1.2 L'uretra maschile.....	10
1.2 La tunica albuginea.....	17
1.3 Proprietà meccaniche della tunica albuginea.....	21

CAPITOLO 2

RIPARAZIONE DEI TESSUTI DELLE VIE URINARIE MEDIANTE L'INGEGNERIA DEI TESSUTI.....	27
---	----

2.1 Introduzione.....	27
2.2 Patologie delle vie urinarie inferiori.....	28
2.2.1 La stenosi uretrale.....	28
2.2.2 La malattia di La Peyronie.....	28
2.3 Applicazioni nell'ingegneria dei tessuti.....	31
2.3.1 Materiali autologhi.....	33
2.3.2 Materiali allogenici, xenogenici e sintetici.....	34
2.4 Decellularizzazione della tunica albuginea.....	41
2.4.1 Decellularizzazione.....	41
2.4.2 Decellularizzazione della tunica albuginea umana.....	42
2.4.3 Decellularizzazione della tunica albuginea animale.....	44

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI.....	47
3.1 Decellularizzazione della tunica albuginea.....	47
3.2 Caratterizzazione meccanica della tunica albuginea.....	47
3.2.1 Il sistema Bose® ElectroForce.....	47
3.2.2 Set up sperimentale.....	49
3.2.3 Preparazione dei campioni.....	50
3.2.4 Prove di trazione.....	55
3.2.5 Prove di rilassamento delle tensioni.....	57
3.2.6 Analisi dei dati.....	58
3.2.7 Analisi statistica.....	61

CAPITOLO 4

RISULTATI.....	63
4.1 Prove di trazione.....	63
4.1.1 Tunica albuginea nativa.....	64
4.1.2 Tunica albuginea decellularizzata.....	67
4.1.3 Confronto.....	69
4.2 Prove di rilassamento.....	73
4.2.1 Tunica albuginea nativa.....	74
4.2.2 Tunica albuginea decellularizzata.....	77
4.2.3 Confronto.....	79
CONCLUSIONI.....	83
BIBLIOGRAFIA.....	87

SITOGRAFIA.....94

SOMMARIO

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è lo studio del comportamento meccanico della tunica albuginea umana nativa e decellularizzata. Si tratta di un tessuto contenuto nell'apparato urinario maschile, in particolare avvolge i corpi cavernosi e il corpo spongioso del pene.

Questo tessuto, in particolare quello di tipo umano, è scarsamente studiato, e nella letteratura attuale le ricerche pubblicate mancano di caratterizzazione biomeccanica della tunica albuginea. L'importanza di ottenere maggiori informazioni sulle proprietà della tunica albuginea sta nel fatto che questo tessuto può essere utilizzato per la riparazione delle vie urinarie inferiori ed è una nuova applicazione nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti. I campioni di tunica albuginea umana testati nel presente studio sono stati forniti dal gruppo di ricerca della Sezione di Anatomia Umana del Dipartimento di Neuroscienze. Le porzioni di tessuto sono state estratte da cadaveri umani, gestiti dal Programma di Donazione del Corpo alla Scienza della Sezione di Anatomia Umana dell'Università di Padova. Per la caratterizzazione meccanica del tessuto sono state effettuate prove monoassiali di trazione e di rilassamento delle tensioni presso il laboratorio di Meccanica dei Materiali Biologici del Dipartimento di Ingegneria Industriale.

Nel primo capitolo è stata approfondita l'anatomia e istologia delle vie urinarie inferiori maschili. L'analisi istologica del tessuto è necessaria al fine di comprendere appieno il comportamento biomeccanico della tunica albuginea. Viene focalizzata l'attenzione sullo studio della morfologia dell'uretra maschile e in particolare della porzione spongiosa e della tunica albuginea, tessuto oggetto del lavoro di tesi. In seguito, vengono descritte le proprietà meccaniche di questo tessuto attraverso lo studio dei risultati presenti in letteratura.

Il secondo capitolo tratta delle patologie che interessano le vie urinarie inferiori e delle soluzioni terapeutiche innovative proposte mediante l'approccio dell'ingegneria dei tessuti. In particolare, vengono descritte le due principali patologie che possono essere riparate mediante l'uso della tunica albuginea, ossia la stenosi uretrale e la malattia di La Peyronie. Successivamente vengono illustrati i vari tipi di innesti utilizzati nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti per il trattamento della malattia di La Peyronie. Vengono descritti i risultati sperimentali ottenuti dagli studi presenti in letteratura condotti su modelli

animali e umani, in cui sono stati ricostruiti chirurgicamente difetti nella tunica albuginea. Tuttora nessuno dei materiali da innesto biologici o sintetici utilizzati si è dimostrato ideale, né è stato adottato come standard stabilito. A tal proposito si pensa sia opportuno studiare la tunica albuginea umana decellularizzata come materiale di innesto. Viene fatto un accenno sul trattamento di decellularizzazione e sui protocolli utilizzati da altri gruppi di ricercatori per decellularizzare la tunica albuginea.

Nel terzo capitolo viene descritto brevemente il metodo di prelievo, di decellularizzazione del tessuto, di preparazione dei campioni da testare e sono stati descritti i metodi utilizzati per la caratterizzazione meccanica. Sulla tunica albuginea sono state effettuate prove monoassiali di trazione e di rilassamento delle tensioni, tramite l'utilizzo del sistema Bose ElectroForce.

Il quarto capitolo illustra i risultati delle prove sperimentali di trazione e di rilassamento delle tensioni. I dati sono stati presentati in modo da poter confrontare le proprietà meccaniche del tessuto in base alla direzione di prova (longitudinale e circonferenziale), per valutare un'eventuale anisotropia del tessuto, e in base al trattamento utilizzato (nativo e decellularizzato), per poter valutare l'effetto del trattamento di decellularizzazione sulle proprietà meccaniche del tessuto.

CAPITOLO 1

ANATOMIA E ISTOLOGIA DELLE VIE URINARIE INFERIORI

1.1 Le basse vie urinarie

Una conoscenza approfondita dell'anatomia delle basse vie urinarie è essenziale per il successo delle ricostruzioni chirurgiche di queste strutture, dovute alle varie anomalie che le interessano.

Le basse vie urinarie sono costituite da vescica urinaria, che rappresenta il serbatoio di raccolta dell'urina, e dall'uretra che è responsabile del trasporto dell'urina verso l'esterno. L'urina che viene progressivamente accumulata nella vescica, determina la distensione delle pareti dell'organo che generano lo stimolo della minzione, ovvero la spinta verso l'esterno del liquido attraverso l'uretra.

L'uretra nei due sessi presenta differenze di lunghezza e di decorso e, nel maschio (Figura 1) fa anche parte del sistema genitale poiché veicola all'esterno il liquido seminale [1].

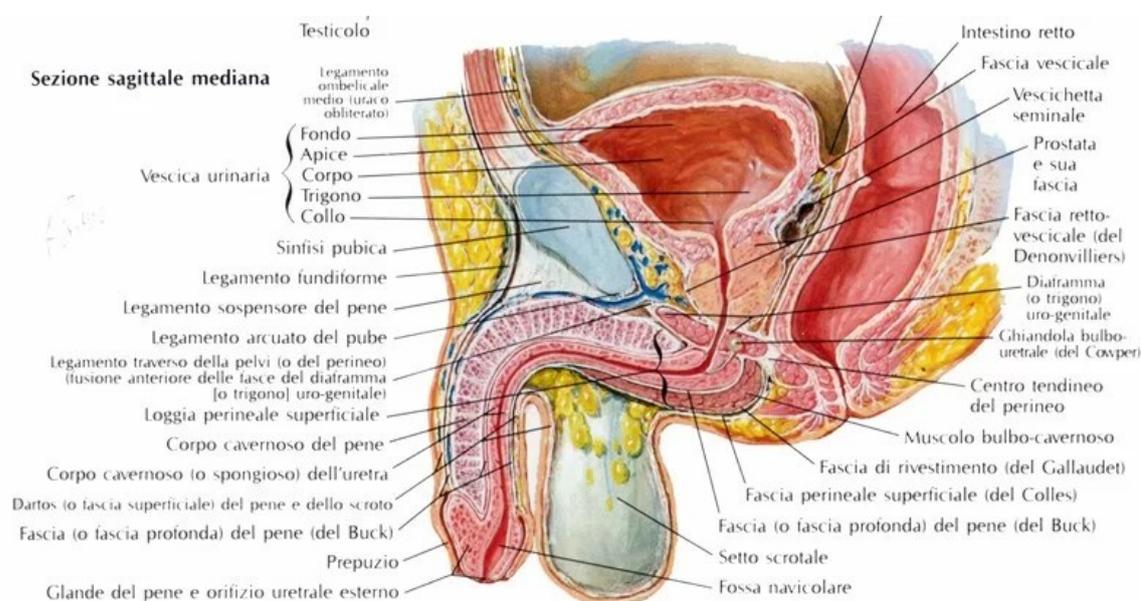


Figura 1.1 Anatomia delle basse vie urinarie maschili [2].

1.1.1 La vescica

La vescica è un organo muscolomembranoso cavo, impari e mediano. Nell'adulto è posta nella cavità pelvica, posteriormente alla sinfisi pubica e anteriormente al retto nel maschio e all'utero nella femmina.

La forma della vescica varia in relazione al suo stato di riempimento. La vescica vuota presenta una forma triangolare appiattita, la vescica piena invece, assume forma ovoidale o sferoidale. Viene divisa macroscopicamente in tre regioni: base (o fondo) inferiormente, corpo con una faccia anteriore, una posteriore, due laterali che si portano anteriormente formando l'apice. Le due facce laterali e quella posteriore convergono inferiormente nel collo vescicale, da cui origina l'uretra. La configurazione interna presenta una mucosa con numerose pliche che si appiattiscono durante il riempimento. Raccoglie l'urina proveniente dai reni e convogliata al suo interno dagli ureteri, e ha una capacità di 200-300 ml di urina.

La parete della vescica è formata dalla sovrapposizione (dall'interno verso l'esterno) delle tonache mucosa, muscolare e avventizia, e dove presente, la sierosa.

La tonaca mucosa è caratterizzata da un epitelio di transizione (o urotelio) dotato di un'ampia lamina propria con abbondanti fibre elastiche. L'urotelio è impermeabile, distensibile e è costituito da 5-7 file di cellule che nella fase di distensione dell'organo si riducono determinando un assottigliamento della parete. L'epitelio di transizione è costituito da tre strati di cellule epiteliali, una fila di cellule basali, più file intermedie di cellule clavate o piriformi e una fila superficiale di cellule a ombrello [1].

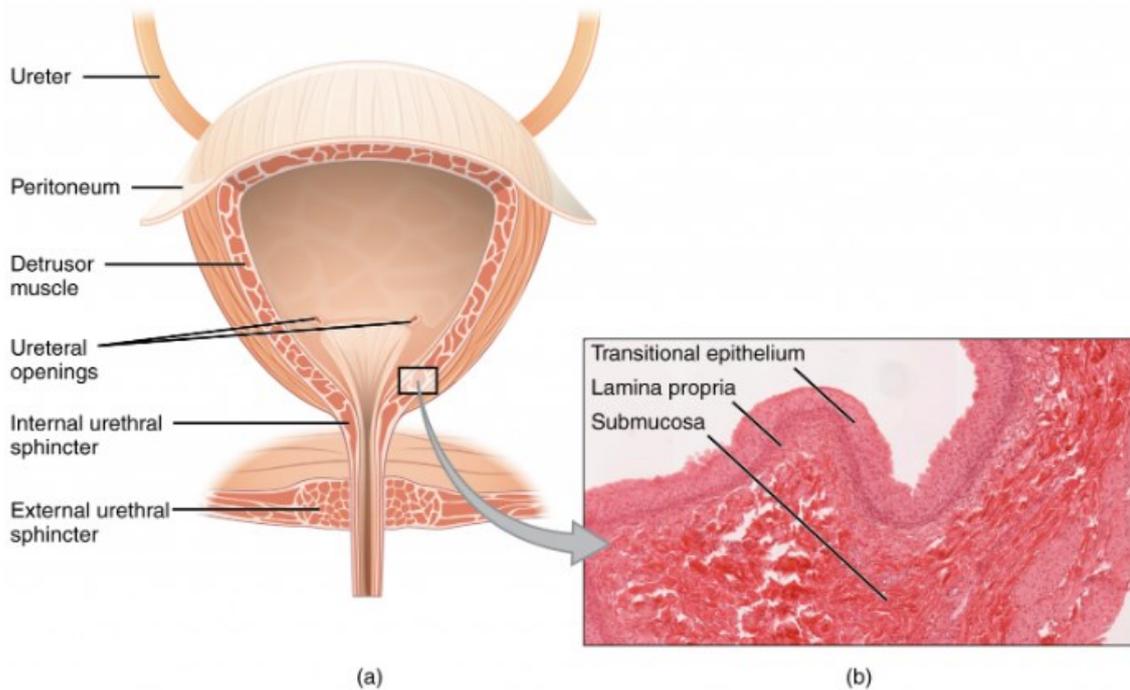


Figura 1.2 Vescica urinaria. (a) Sezione trasversale anteriore della vescica. (b) Muscolo detrusore della vescica [3].

La tonaca muscolare consiste in tre strati sovrapposti di fibre muscolari lisce, che presentano spessore variabile e si compenetrano l'un l'altro. In corrispondenza dello sbocco degli ureteri lo strato muscolare interno si ispessisce e forma una valvola che previene il reflusso dell'urina negli ureteri. Le cellule muscolari sono disposte in fasci circondati da tessuto connettivo, e sono orientate a costituire i vari strati: interno o plessiforme, intermedio o circolare, esterno o longitudinale. Nel complesso la muscolatura prende il nome di muscolo destrusore della vescica, la cui contrazione determina la minzione. Le cellule muscolari disposte attorno all'orifizio dell'uretra formano il muscolo sfintere interno dell'uretra, il quale è costituito da muscolatura liscia, non è quindi sotto il controllo della volontà. La tonaca avventizia è costituita da tessuto connettivo denso. Nelle regioni superiori della vescica l'avventizia è sostituita dalla tonaca sierosa per la presenza del peritoneo[1], [4].

1.1.2 L'uretra maschile

L'uretra è un organo cavo, impari e mediano deputato al trasporto dell'urina dalla vescica all'esterno, con decorso e rapporti differenti nel maschio e nella femmina. Rappresenta l'ultimo tratto delle ve urinarie. Normalmente è compresa tra due muscoli sfinteri: il muscolo sfintere interno (muscolo involontario) e il muscolo sfintere esterno (muscolo volontario). Il primo si trova all'origine dell'uretra e il secondo è presente lungo il passaggio dell'uretra attraverso il diaframma urogenitale della pelvi.

Nel maschio l'uretra è un lungo condotto di 15-20 cm [1] con la doppia funzione di convogliare l'urina durante la minzione e consentire il passaggio dello sperma durante l'eiaculazione. Solo nel tratto iniziale (uretra preprostatica) vi è esclusivo passaggio di urina.

Può essere divisa in quattro parti: *preprostatica*, *prostatica*, *membranosa* e *spongiosa*, solo le prime due regioni si trovano nella pelvi, mentre le altre due si trovano rispettivamente, nel perineo e nella parte libera del pene. L'uretra spongiosa è chiamata così perché si trova interamente nel corpo spongioso del pene e è divisa in tre ulteriori parti: *bulbare*, *peniena*, *navicolare*.

Le regioni preprostatica, prostatica e membranosa dell'uretra sono denotate collettivamente come *uretra posteriore*, mentre l'uretra spongiosa è chiamata *uretra anteriore*.

Quando il pene è flaccido l'uretra presenta una doppia curva, il canale è una stretta fessura quando non c'è passaggio di urina [1], [4], [5].

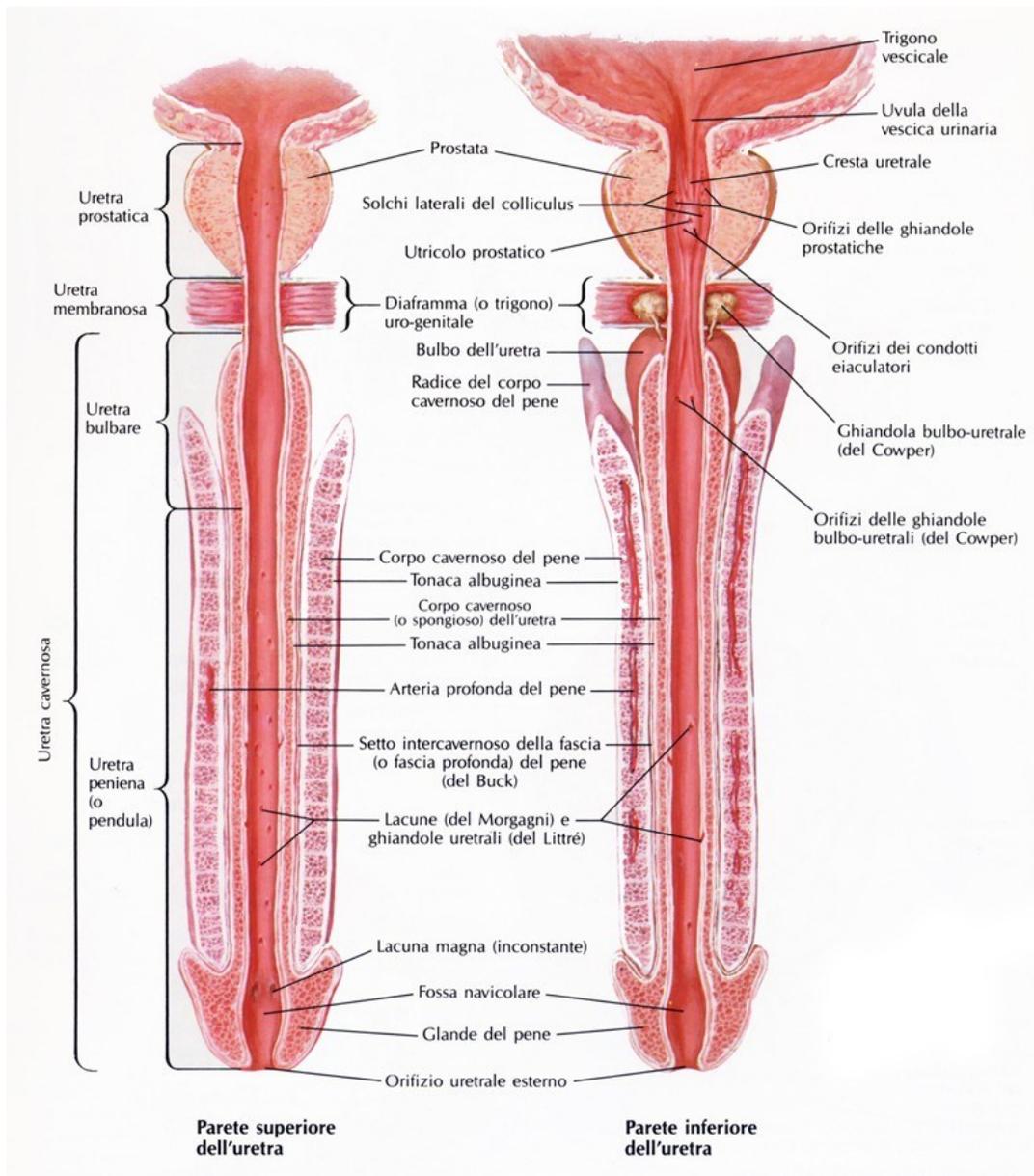


Figura 1.3 Rappresentazione delle pareti superiore e inferiore dell'uretra [2].

L'**uretra preprostatica** è lunga circa 1 cm [5] e si estende verticalmente dal meato uretrale interno fino alla base della prostata. Possiede un lume stellato. L'uretra preprostatica è circondata da fasci di fibre muscolari lisce. Lo *sfintere preprostatico* (o *sfintere uretrale interno*) è costituito da muscolatura liscia, è controllato dal sistema simpatico ed è una caratteristica tipica del genere maschile. La contrazione dello sfintere preprostatico è involontaria e serve a prevenire il flusso retrogrado dell'eiaculato, attraverso l'uretra nella vescica.

Istologicamente, la parete dell'uretra è delimitata da due tonache, la tonaca mucosa rivestita da epitelio di transizione e la tonaca muscolare (sfintere uretrale interno). La lamina propria su cui poggia l'epitelio è formata da tessuto connettivo denso, ricco di fibre elastiche e linfociti. La tonaca muscolare è costituita da tre strati con orientamento delle fibre analogo a quello della vescica: uno strato interno con fibre disposte longitudinalmente, uno intermedio con fibre disposte circolarmente e uno esterno con fibre disposte longitudinalmente [6]–[8].

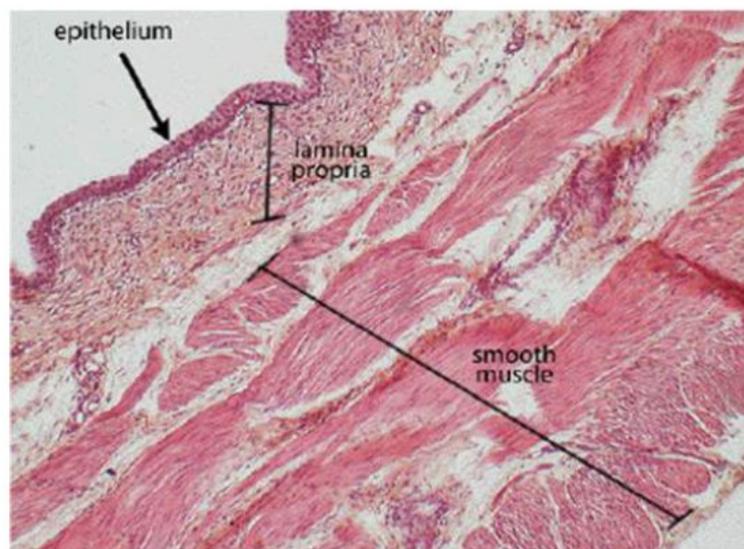


Figura 1.4 Sezione trasversale dell'uretra preprostatica. La muscolatura liscia è formata da tre strati non facilmente distinguibili [63].

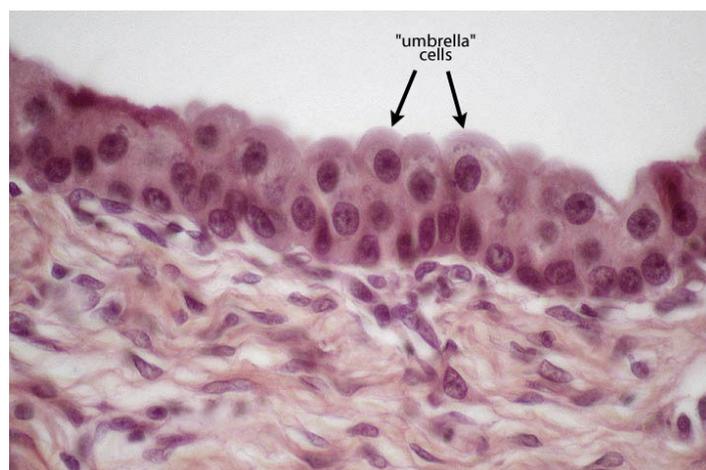


Figura 1.5 Epitelio di transizione [63].

L'**uretra prostatica** è un breve tratto di circa 3 cm [5] che decorre all'interno della prostata, dalla base fino all'apice della prostata. Grazie a tale attraversamento, la prostata comunica con l'uretra e vi immette i fluidi necessari all'attività riproduttiva. È il tratto più ampio e dilatabile dell'uretra maschile, è più larga a metà della sua lunghezza e più stretta dove confina con l'uretra membranosa. Viene divisa in una parte prossimale e una distale di uguali lunghezze. In sezione trasversale appare di profilo a mezzaluna. Questa forma è dovuta alla presenza sulla parete posteriore di una stretta cresta longitudinale, denominata *cresta uretrale* (o *veru montanum*). Ha una lunghezza tra i 15 e i 17 mm e una altezza di circa 3 mm, e ai lati si apre la gran parte dei dotti delle ghiandole prostatiche. Nella parte anteriore della cresta uretrale, al di sotto della sommità c'è un'elevazione, il *collicolo seminale*. Ai lati del collicolo sboccano i dotti eiaculatori, per mezzo dei quali l'uretra riceve il liquido seminale.

Internamente l'uretra prostatica presenta la tonaca mucosa costituita da epitelio di transizione con la lamina propria riccamente vascolarizzata. La tonaca mucosa è circondata dalla tonaca muscolare, in continuazione con la muscolatura della vescica, come nel tratto preprostatico.

L'**uretra membranosa** è lunga 1.5 cm [5] ed è molto stretta, ed è il tratto meno mobile e meno dilatabile dell'uretra. Segue all'uretra prostatica e passa dal collicolo seminale fino a terminare nel bulbo del pene.

L'uretra membranosa è rivestita da epitelio colonnare stratificato/pseudostratificato, l'epitelio poggia su una lamina propria costituita da tessuto connettivo denso, ricco di fibre elastiche. Intorno alla tonaca muscosa le fibre muscolari striate costituiscono il muscolo *sfintere esterno* dell'uretra. Lo sfintere uretrale esterno controlla l'emissione dell'urina ed è critico per la continenza, è un muscolo volontario. La sacca perineale profonda giace sopra la membrana perineale e contiene l'uretra membranosa, lo sfintere uretrale esterno e, nel maschio, le ghiandole bulbo-uretrali [5], [7]–[9].



Figura 1.6 Epitelio colonnare stratificato dell'uretra [63].

L'**uretra spongiosa** è lunga circa 15 cm [5] e rappresenta il tratto terminale contenuto nel corpo spongioso del pene.

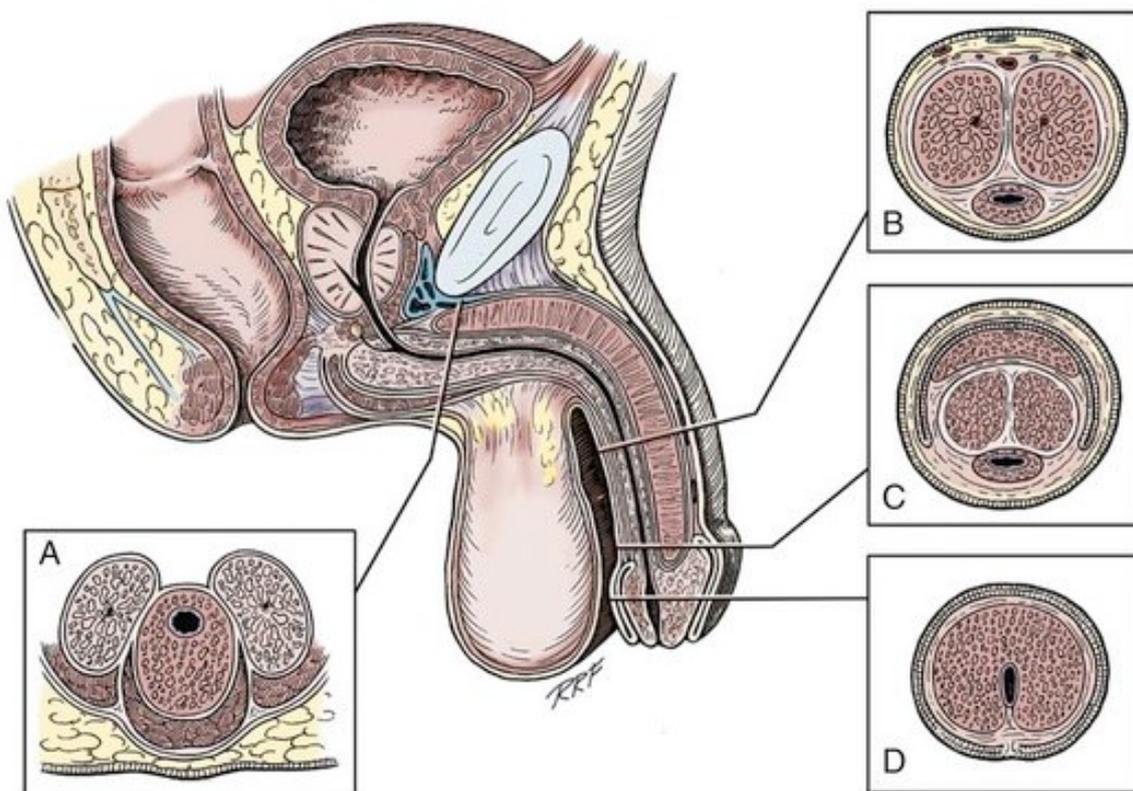


Figura 1.7 Sezione trasversale dell'uretra anteriore. (a) uretra bulbare, (b) uretra spongiosa, (c) margine coronale, (d) glande [64].

Il tratto iniziale prende il nome di **uretra bulbare**, è lunga 3-4 cm [5] ed ha un calibro luminale più grande dell'uretra prostatica o membranosa. Si estende dalla radice del pene, all'interno del bulbo del corpo spongioso, fino all'uretra peniena. Nell'uretra bulbare sono presenti gli orifizi dei dotti escretori delle ghiandole bulbouretrali (di Cowper). Le aperture delle ghiandole bulbouretrali servono a immettere nella parte finale dell'uretra, una sostanza essenziale dell'eiaculato e con funzione lubrificante del condotto.

L'epitelio di rivestimento dell'uretra bulbare è identico a quello dell'uretra membranosa, essendo di tipo colonnare stratificato/pseudostratificato. L'uretra bulbare è circondata da tessuto spongioso. Procedendo verso l'uretra peniena, il lume si riduce progressivamente di diametro e il corpo spongioso diventa più sottile.

Il *corpo spongioso* del pene è una struttura cilindrica di tessuto erettile, che circonda l'uretra anteriore e risiede nella parte inferiore dell'organo riproduttivo maschile. Nella parte iniziale è espanso a formare il bulbo uretrale e nella parte terminale si espande assumendo una forma sferoidale, costituendo il glande. Sopra il corpo spongioso ci sono due elementi molto simili per forma e istologia, che prendono il nome di *corpi cavernosi*, e che insieme al corpo spongioso costituiscono le formazioni erettili del pene [10], [11].

Il corpo spongioso e i due corpi cavernosi sono costituiti da tessuto connettivo spugnoso e sono occupati internamente da trabecole connettivo-muscolari che delimitano un sistema di cavità sanguigne intercomunicanti. Le pareti dei corpi cavernosi sono più spesse e presentano un'architettura più complessa rispetto al corpo spugnoso [12], [13].

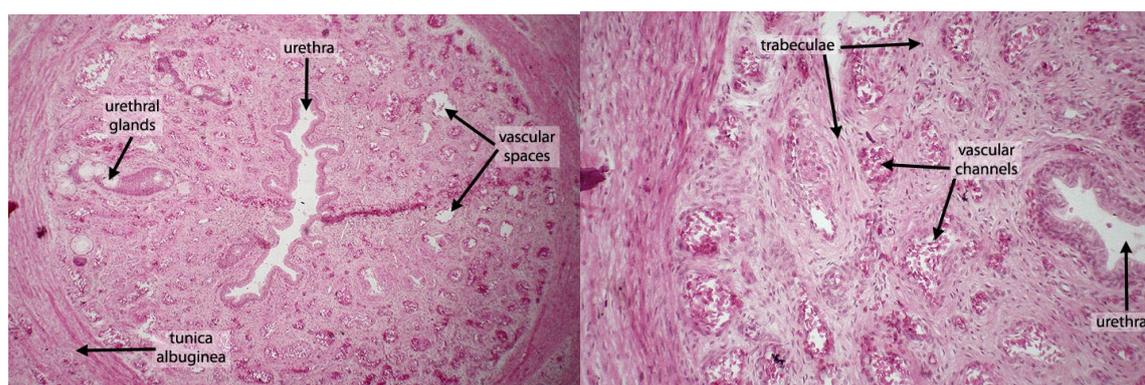


Figura 1.8 A sinistra l'uretra spongiosa e a destra il tessuto erettile del corpo spugnoso [63].

Questi corpi sono contenuti in una densa guaina fibrosa denominata tunica albuginea. Le guaine fibrose dei corpi sono fuse tra loro nelle zone di intersezione. Queste guaine sono collettivamente avvolte dalla fascia peniena profonda (*fascia di Buck*) e da tessuto adiposo.

È stata riscontrata la presenza di tessuto adiposo nei corpi cavernosi e nella tunica albuginea. È stato ipotizzato che il tessuto adiposo nella fascia, perfori insieme ai vasi nutritivi e ai nervi la tunica albuginea per raggiungere i corpi [12], [13].

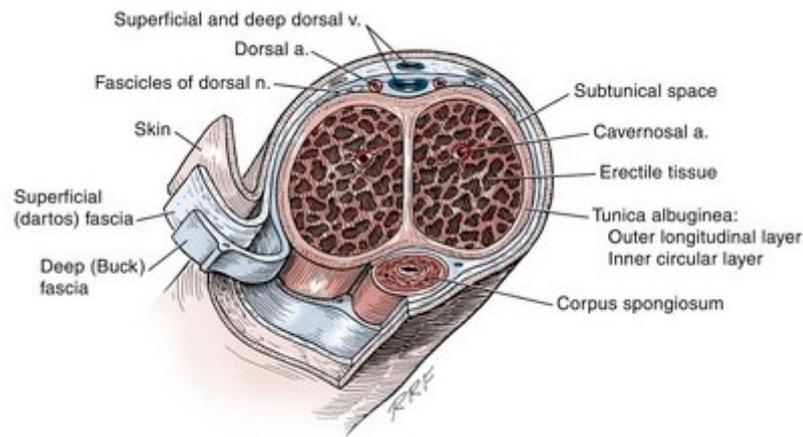


Figura 1.9 Sezione trasversale del pene che illustra gli strati fasciali [64].

Nel corpo del pene la sezione dell'uretra è cilindrica a diametro uniforme, misura circa 6 mm, fino alla *fossa navicolare*, in corrispondenza della regione del glande, in cui la cavità si dilata in una forma ovoidale. Distalmente si apre all'esterno, all'apice del glande del pene, con l'orifizio uretrale esterno. *L'orifizio uretrale esterno* è la parte più contratta dell'uretra, è una fessura verticale di circa 6 mm e delimitata ai lati da due piccole labbra. Nello spessore dell'uretra spongiosa sono presenti le ghiandole uretrali (o ghiandole di Littrè) a secrezione mucosa, il muco serve a proteggere l'epitelio interno dell'uretra dalle sostanze corrosive nell'urina.

L'uretra spongiosa è rivestita nella parte prossimale da epitelio colonnare stratificato e pseudostratificato; mentre nella parte distale, a metà della fossa navicolare l'epitelio diventa pavimentoso composto ed in vicinanza del meato uretrale esterno si fa cheratinizzato per rivestire il glande. L'uretra spongiosa è circondata dalla lamina propria, un sottile strato di tessuto spongioso, dalla tunica albuginea e dalla fascia di Buck. La lamina propria è un tessuto fibroconnettivo con fibre elastiche e muscolatura liscia diffusa, orientata longitudinalmente [5]–[7], [9].

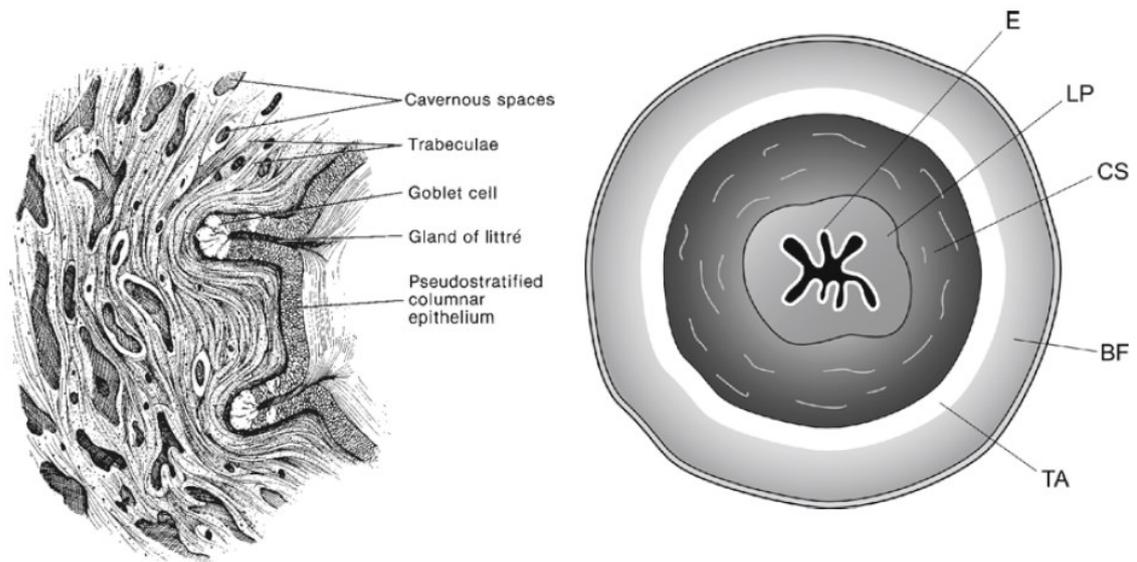


Figura 1.10 A sinistra epitelio e ghiandole dell'uretra peniena, a destra schema della sezione trasversale dell'uretra peniena e dei tessuti periuretrali. Epitelio E, lamina propria LP, corpo spugnoso CS, tunica albuginea TA, fascia di Buck BF (Humphrey)[14].

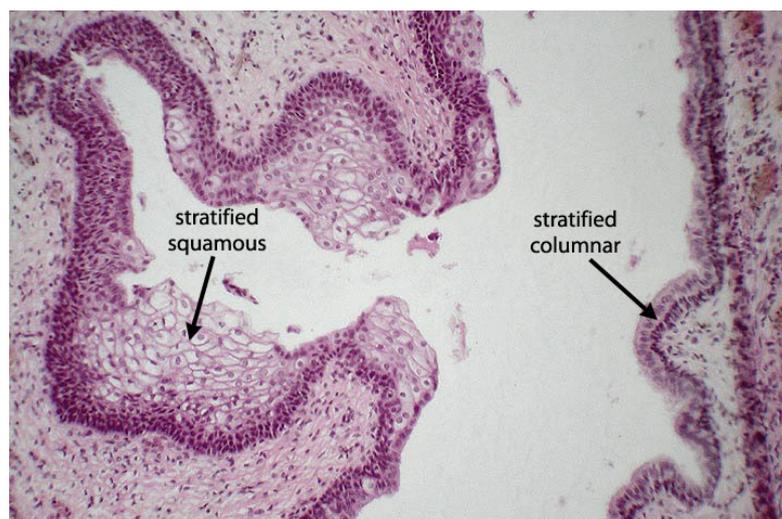


Figura 1.11 Porzione distale dell'uretra peniena, dove l'epitelio colonnare stratificato diventa pavimentoso [63].

1.2 Tunica albuginea

La tunica albuginea è una struttura complessa e progettata in modo funzionale, è costituita da uno spesso strato di tessuto connettivo denso e circonda i corpi cavernosi e il corpo spugnoso del pene.

Il tessuto connettivo che la compone è costituito prevalentemente da strati di fibre di collagene e da fibre elastiche in quantità minore. Le fibre elastiche sono distribuite in modo

non uniforme, formando una rete irregolare all'interno della quale abbondano le fibre di collagene. Le fibre elastiche nella tunica albuginea sono corte e collegano i fasci di collagene ondulati, stabilizzando la struttura. Questi fasci devono consentire l'allungamento e l'aumento della circonferenza durante l'erezione, fornendo allo stesso tempo resilienza per tornare allo stato rilassato. La struttura tridimensionale della tunica albuginea conferisce al pene grande flessibilità e rigidità.

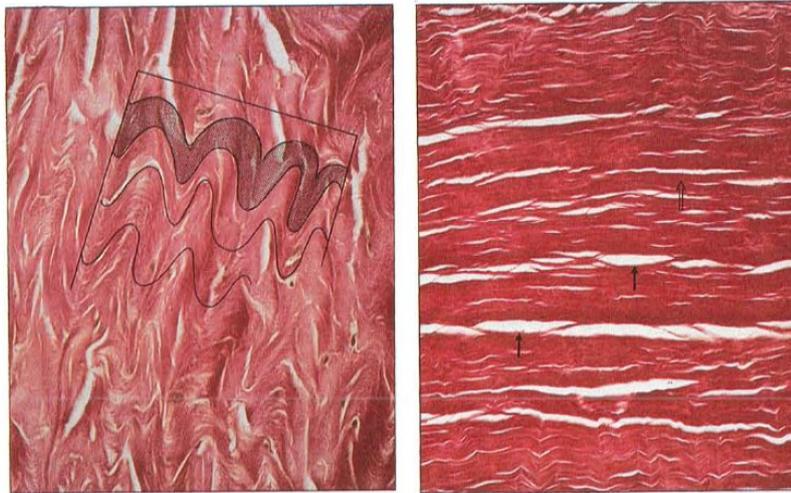


Figura 1.12 Fibre di collagene della TA prima e dopo lo stiramento [15].

La distribuzione di queste componenti varia tra i corpi cavernosi, il corpo spugnoso e il glande, conferendo funzioni specifiche alle diverse zone. Il numero di fibre elastiche aumenta nei tessuti che richiedono il massimo aumento della lunghezza o della circonferenza.

Quando il tessuto è sovraccaricato le fibre elastiche si rompono e il reticolo ondulado di fibre scompare.

La tunica albuginea esibisce una grande variabilità dello spessore tra individui diversi e in base alla zona specifica.

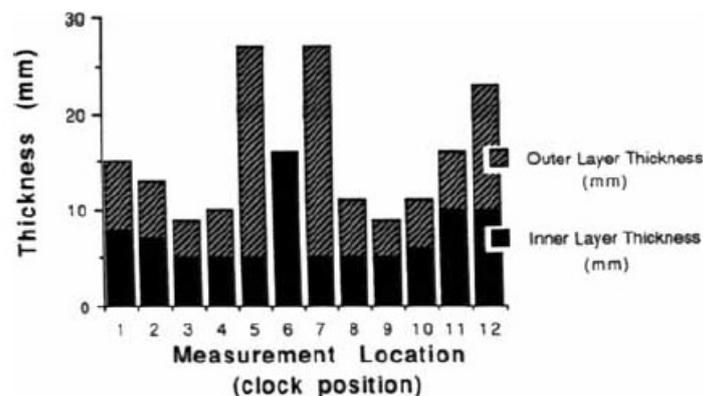


Figura 1.13 Spessore della TA misurato in diverse posizioni (Brock)[16].

La tunica albuginea dei corpi cavernosi è una struttura a doppio strato in cui ogni strato è composto da più sottostrati di fasci di collagene. I fasci di collagene sono orientati circolarmente o longitudinalmente e formano strutture in cui i fasci di collagene possono scorrere l'uno contro l'altro. I fasci più fini, orientati circolarmente, costituiscono lo strato interno che circonda e penetra nel tessuto cavernoso, contenendolo e supportandolo. Questi fasci formano il setto mediano che è completo prossimalmente, ma spesso incompleto distalmente. Da questo strato si irradiano dei pilastri intracavernosi che forniscono supporto al tessuto erettile. I fasci degli strati esterni sono più grossi e sono orientati longitudinalmente, spesso formano uno strato incompleto e si condensano per formare strutture simili a legamenti, chiamate ispessimenti ventrali. Dorsalmente i fasci longitudinali si condensano in strutture chiamate ispessimenti dorsali. Lo strato esterno determina principalmente lo spessore e la resistenza della tunica [13], [16].

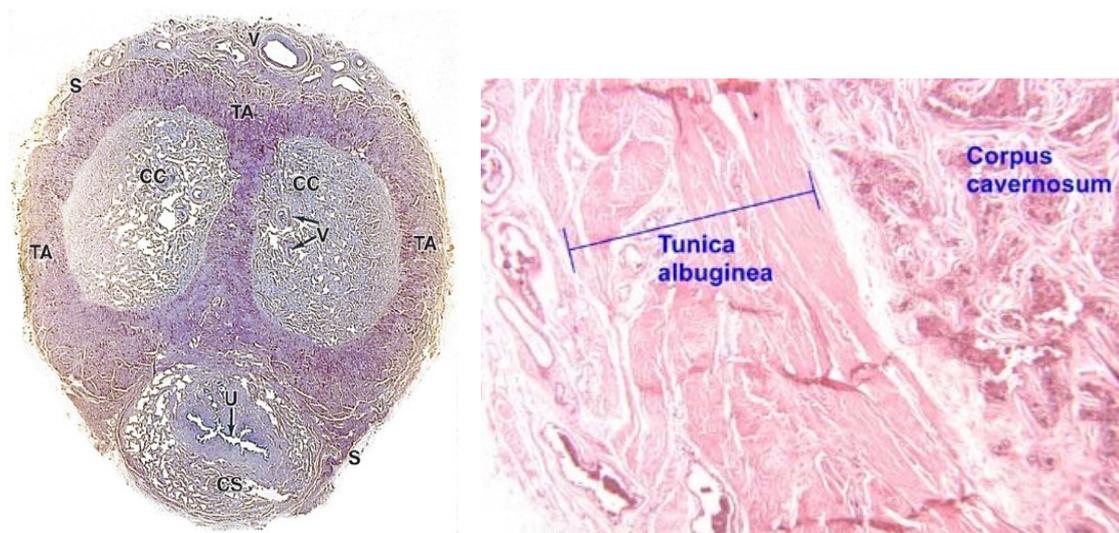


Figura 1.14 A sinistra Sezione trasversale dell'uretra peniena. Corpo spongioso (CS), corpo cavernoso (CC), tunica albuginea (TA) (Mescher)[11]. A destra tunica albuginea e corpo cavernoso [65].

Lo strato interno circolare presenta uno spessore relativamente uniforme, minore di 1 mm, fa eccezione la posizione ad ore 6, in cui il numero di fasci interni aumenta. In quel punto la tunica albuginea presenta uno spessore di 1.7 mm. Lo strato esterno longitudinale presenta spessori marcatamente disomogenei e molto variabili con la posizione. Nella regione tra le ore 5 e 7 c'è assenza di fasci esterni.

Da uno studio sull'istologia della tunica albuginea condotto da Shafik et al. [17] su 28 esemplari cadaverici, è emerso che la struttura a due strati della tunica albuginea dei corpi cavernosi è la più comune, per il 71.4% degli esemplari. Nel 21.4% degli esemplari è stata osservata una struttura a tre strati: uno circolare interno, uno longitudinale intermedio e uno

circolare esterno. Mentre la struttura a un solo strato longitudinale è stata riscontrata nel 7.2% degli esemplari.

È stato ipotizzato che il numero diverso di strati influenzi la rigidità del pene, la struttura a tre strati conferirebbe una maggiore fermezza all'erezione. In alternativa l'aumento degli strati potrebbe impedire il processo erettile.

La tunica nelle porzioni più distali e prossimali del pene, dove terminano i fasci dello strato interno e dove termina il tessuto erettile, è costituita esclusivamente da collagene, mentre le fibre elastiche sono quasi inesistenti. Questo serve ad ancorare i corpi cavernosi al glande e alla tuberosità ischiatica. All'interno del tessuto cavernoso la maggior parte del reticolo elastico è una continuazione della tunica albuginea.

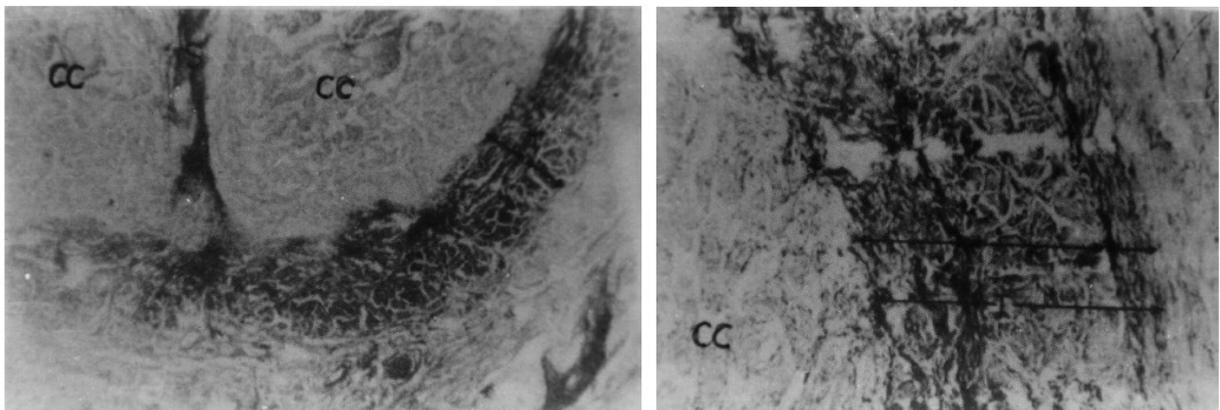


Figura 1.15 Sezione trasversale dei corpi cavernosi (CC). A sinistra è mostrata la TA formata da due strati, a destra la TA formata da tre strati. (Shafik) [17].

La tunica albuginea del corpo spugnoso non presenta lo strato esterno longitudinale, ma è costituita da un solo strato di fibre orientate circolarmente. Nel corpo spugnoso le fibre elastiche si trovano in quantità maggiore rispetto ai corpi cavernosi e assumono un caratteristico aspetto tortuoso. L'assenza di fasci longitudinali tra gli ispessimenti ventrali consente al corpo spongioso di espandersi, senza restrizioni. Nel glande si trovano le fibre elastiche nella quantità maggiore e formano le reti più fitte.

All'intersezione tra i corpi cavernosi e il corpo spugnoso la tunica albuginea è costituita da un solo strato di fibre circolari [13], [16],[17].

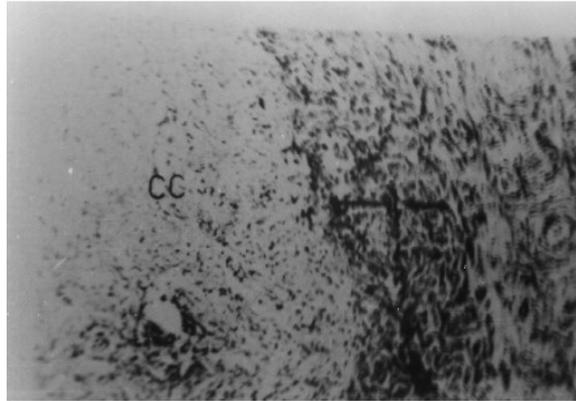


Figura 1.16 Sezione trasversale dei corpi cavernosi (CC). È mostrata la TA formata da un solo strato circolare (Shafik) [17].

1.3 Proprietà meccaniche della tunica albuginea

Nella letteratura attuale c'è scarsità di dati sulle proprietà biomeccaniche della tunica albuginea. Ciò è sorprendente in quanto la tunica albuginea è il principale tessuto portante durante l'erezione del pene. Le analisi biomeccaniche pubblicate caratterizzano la tunica albuginea dei corpi cavernosi. Lo studio di Bitsch et al. [15] ha esaminato il comportamento elastico e la resistenza meccanica della tunica albuginea, utilizzando provini rettangolari di tessuto in un tensiometro uniassiale. I campioni di tunica albuginea sono stati ricavati da undici cadaveri umani, per ogni soggetto sono stati ottenuti 3 provini rettangolari di diametro di 10 millimetri. I campioni di tessuto sono stati testati tra le 12 e le 24 ore dopo il decesso.

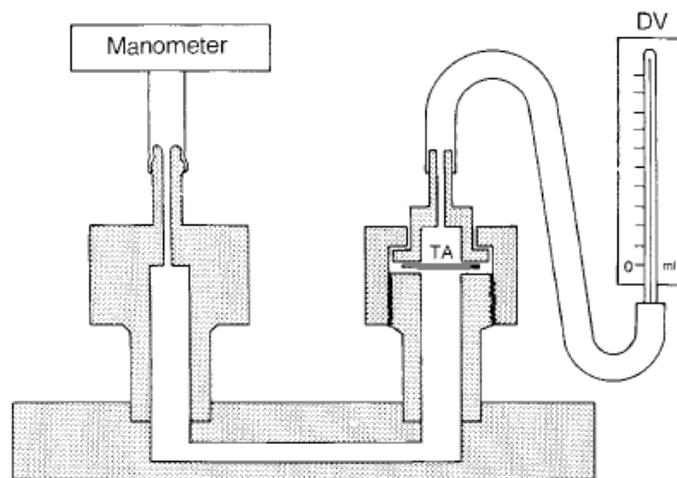


Figura 1.17 Tensiometro, la tunica albuginea (TA) è soggetta a una pressione generata da un manometro. La scala graduata corrisponde al volume spostato (DV) [15].

In questo studio è stato misurato un modulo elastico medio di circa 100 MPa e un carico di rottura medio tra 0.01 e 0.1 MPa (600-700 mmHg). Il carico di rottura è stato calcolato come il rapporto tra la forza massima misurata e l'area della sezione trasversale. Quando il tessuto è stato esposto ad una pressione superiore alla resistenza meccanica la configurazione ondulatoria delle fibre di collagene è scomparsa o era meno pronunciata. Infatti, oltre questi valori le fibre elastiche possono rompersi e la struttura viene irreparabilmente alterata, con la conseguente perdita delle sue proprietà elastiche.

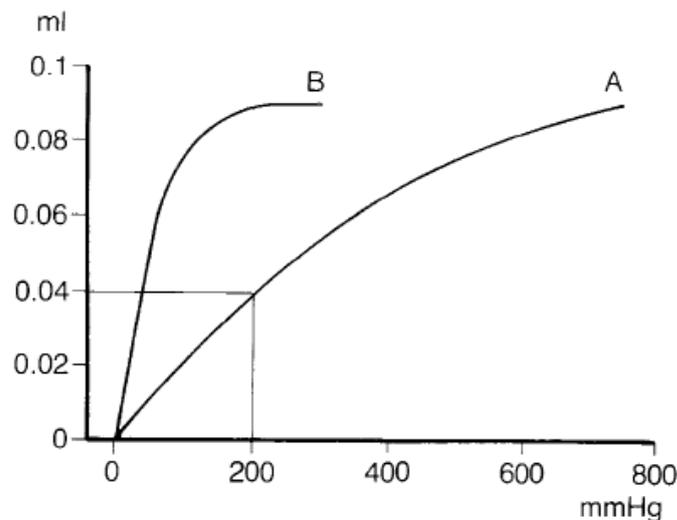


Figura 1.18 Curva rappresentativa del volume spostato in funzione della pressione [15].

Un diverso studio di Hsu et al. [13] ha esaminato la resistenza alla penetrazione (tensione di rottura) in diverse posizioni di campioni di tunica albuginea di sette cadaveri umani. Per misurare la pressione è stato utilizzato un dinamometro meccanico dotato di un ago a testa piatta all'estremità. La pressione misurata è stata poi calcolata in termini di resistenza meccanica. La resistenza alla penetrazione nelle posizioni a ore 7, 9 e 11 è risultata rispettivamente di 16 ± 2 MPa, 30 ± 3 MPa e 45 ± 5 MPa. La regione tra le ore 5 e 7 mostrava la minore resistenza meccanica. Questo studio ha dimostrato che la resistenza meccanica e lo spessore sono correlati alla posizione.

Lo studio di Hou [18] ha quantificato le proprietà elastiche e viscoelastiche della tunica albuginea umana. Il tessuto è stato sezionato da donatori umani e preparato come campioni di 3 cm per 3 cm. I campioni di tessuto sono stati caricati simultaneamente in due direzioni, lungo la direzione longitudinale e quella circonferenziale, fino a un carico di 45N. La deformazione è stata mantenuta per un tempo di 30 minuti in modo da consentire al tessuto

di subire il rilassamento delle tensioni in entrambe le direzioni e, dopo un periodo di recupero, i campioni hanno ricevuto lo stesso protocollo di carico.

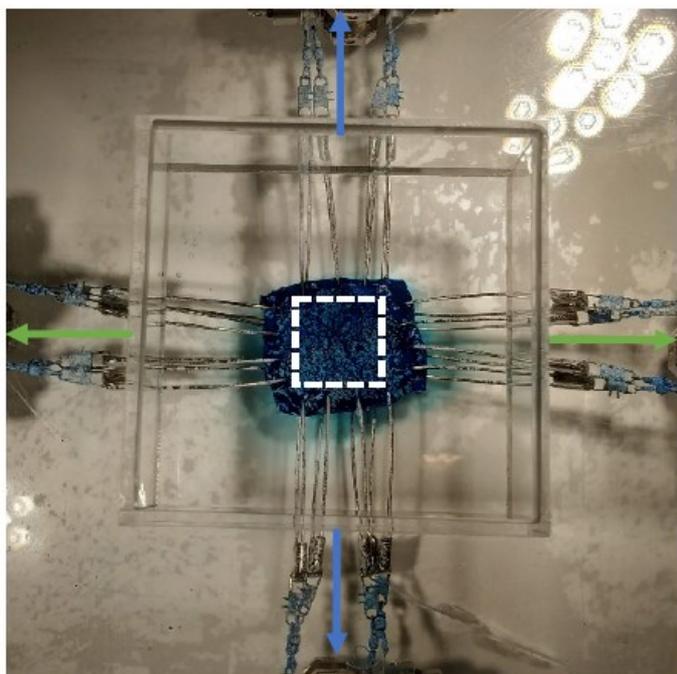


Figura 1.19 Prova di carico biassiale su campione di tunica albuginea [18].

Nel complesso, i risultati di questo studio indicano che la tunica albuginea non presenta differenze statisticamente significative nelle direzioni (longitudinale e circonferenziale) per quanto riguarda la rigidità, il modulo elastico, la deformazione normale nel punto di flesso e la percentuale di rilassamento delle tensioni. La rigidità e il modulo elastico sono stati calcolati rispettivamente come la pendenza massima della curva carico-spostamento e della curva sforzo-deformazione per ciascuna delle due direzioni anatomiche. Sulla base dei risultati di questo studio, è stato osservato che la tunica albuginea diventa più rigida e si rilassa all'aumentare della tensione applicata. Nelle condizioni di carico biassiale prescritte, il tessuto mostra isotropia meccanica. Nessuna ricerca disponibile specifica se gli strati orientati longitudinalmente o circonferenzialmente della tunica albuginea creino un comportamento anisotropo o quasi isotropico.

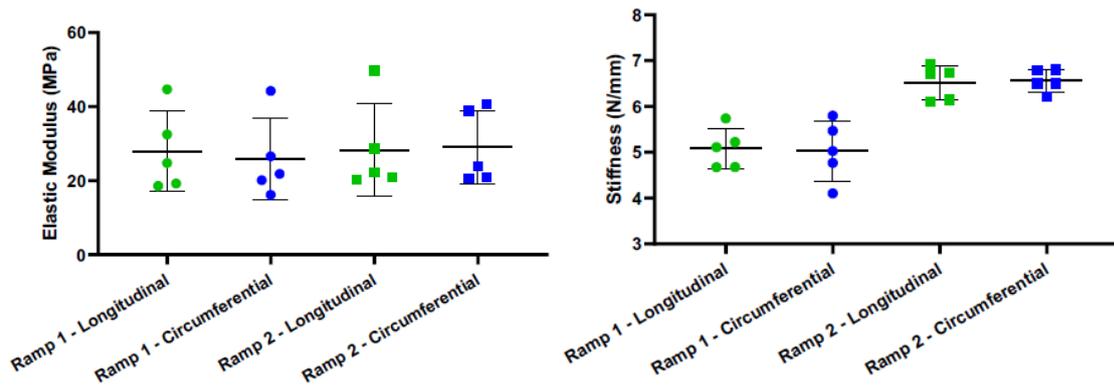


Figura. 1.20 A sinistra il modulo elastico e a destra la rigidezza dei campioni longitudinali e circolarziali di tunica albuginea [18].

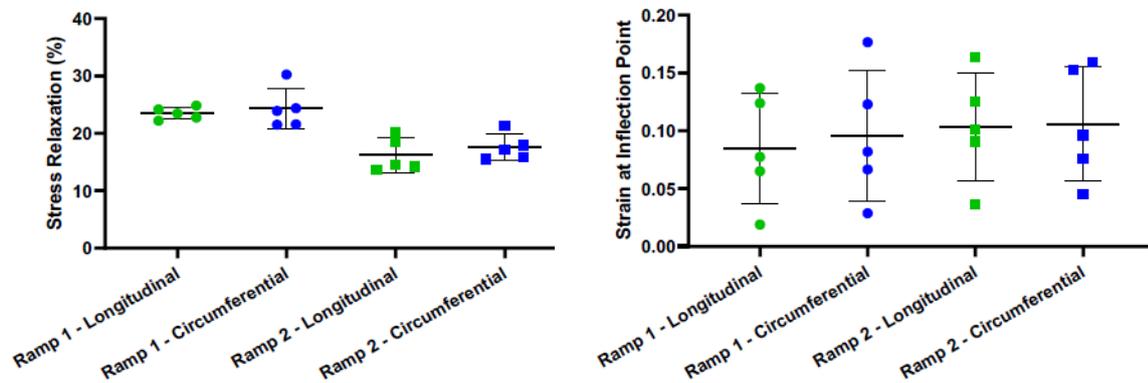


Figura. 1.21 A sinistra la percentuale di rilassamento delle tensioni e a destra la deformazione nel punto di flesso dei campioni longitudinali e circolarziali di tunica albuginea [18].

Uno studio recente di Kandabarow et al. [19] ha misurato il modulo di Young e la resistenza a trazione. La tunica albuginea è stata sezionata da tre soggetti umani in direzione longitudinale e circolarziale, e sono state misurate le dimensioni di ogni campione, in totale sono stati ricavati sei campioni. Le curve sforzo-deformazione sono state generate tramite estensimetria meccanica utilizzando una macchina Instron. Dalle curve sforzo deformazione sono stati ricavati il modulo di Young e la resistenza a trazione. I valori medi di modulo di Young trovati risultano 8.1 MPa (SD 1.7) longitudinalmente e 10.3 MPa (SD 3.1) circolarzialmente. I valori di resistenza ultima a trazione risultano 1.8 MPa (SD 0.6) longitudinalmente e 1.7 MPa (SD 0.1) circolarzialmente.

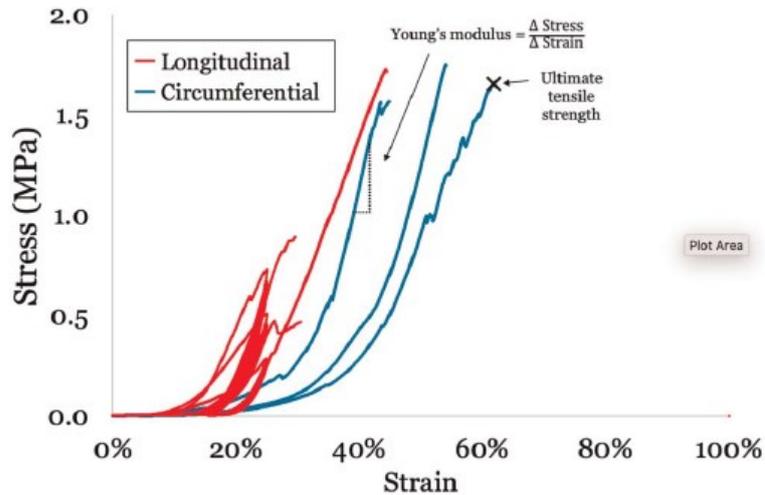


Figura 1.22 Curve tensione-deformazione della TA umana [19].

Un ulteriore studio ha caratterizzato le proprietà meccanica della tunica albuginea affetta dalla malattia di La Peyronie. Hanno prelevato i campioni di tessuto fibrotico da cinque pazienti sottoposti all'intervento chirurgico di escissione della placca e innesto. È stato utilizzato il macchinario Bose 3200 per analizzare i campioni di tunica albuginea. I risultati hanno mostrato un'elevata variabilità meccanica e morfologica delle placche fibrotiche di Peyronie e un comportamento alterato con la mineralizzazione. Hanno ipotizzato che le placche maggiormente mineralizzate mostrino minore resistenza a trazione, modulo elastico maggiore e deformazione a rottura minore. La variazione del comportamento tra i campioni non ha potuto convalidare le ipotesi. Infatti, i campioni hanno mostrato un'elevata variabilità inter e intra-soggetto. La rottura dell'organizzazione del collagene a seguito della patologia potrebbe eliminare qualsiasi effetto anisotropo Brady et al. [20].

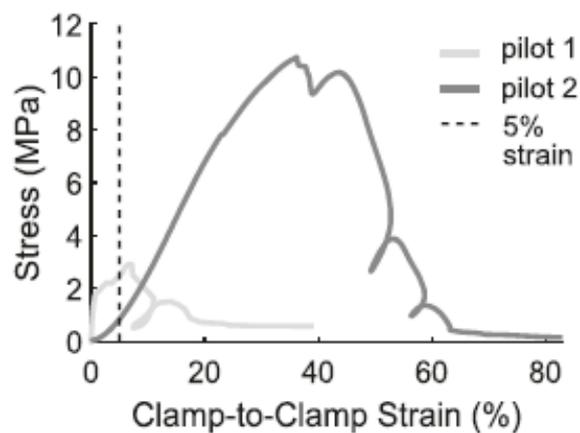


Figura 1.23 Confronto delle curve sforzo-deformazione di due provini [20].

CAPITOLO 2

RIPARAZIONE DEI TESSUTI DELLE VIE URINARIE MEDIANTE L'INGEGNERIA DEI TESSUTI

2.1 Introduzione

Disturbi congeniti, traumi o altre condizioni del tratto urogenitale possono provocare danni o perdita di funzione dell'organo, rendendo necessaria la ricostruzione o sostituzione delle strutture danneggiate. Tuttavia, le attuali tecniche ricostruttive sono limitate a causa di problemi di disponibilità e compatibilità dei tessuti. Queste tecniche utilizzano tessuti dell'ospite, tessuti da donatori, tessuti eterologhi o materiali artificiali. Tutti questi materiali possono però portare a complicazioni significative derivanti da rigetto immunologico o disallineamenti tra i tessuti nativi e quelli impiantati [21]. Inoltre, l'organo trapiantato subisce un progressivo danneggiamento a causa di una forma di rigetto cronico, la terapia antirigetto procura effetti collaterali e c'è scarsa disponibilità degli organi da trapiantare [22], [23].

Al fine di ridurre queste complicazioni, medici e scienziati hanno iniziato a esplorare tecniche dell'ingegneria tissutale e medicina rigenerativa per la riparazione del sistema urogenitale [21]. Per questo la medicina rigenerativa ha sviluppato un approccio alternativo per la sostituzione di organi e tessuti, basato sulla rigenerazione in vitro di organi o tessuti geneticamente compatibili con il paziente. Questo processo prevede una fase di decellularizzazione per ottenere diversi tipi di matrici extracellulari, che derivano da tessuti omologhi o eterologhi. Queste matrici fungono da scaffold biologici tridimensionali, che successivamente possono essere seminati con cellule, favorendo l'angiogenesi e la crescita delle cellule e consentono la rigenerazione del tessuto nativo [22], [23].

In questo capitolo, si descrivono alcune patologie che richiedono la ricostruzione dei tessuti delle vie urinarie inferiori e le principali alternative attualmente in fase di studio nell'ambito degli approcci dell'ingegneria dei tessuti e della medicina rigenerativa.

2.2 Patologie delle vie urinarie inferiori

2.2.1 La stenosi uretrale

La stenosi uretrale è una cicatrizzazione che restringe il calibro dell'uretra a causa di lesioni o infiammazioni del tessuto, solitamente provocati da un trauma. Per trattare le stenosi vengono utilizzate varie tecniche di chirurgia ricostruttiva dell'uretra anteriore. Le stenosi uretrali lunghe richiedono la tecnica dell'uretroplastica.

L'uretroplastica delle stenosi lunghe può essere eseguita tramite la sostituzione della parte affetta da stenosi con degli innesti di pelle genitale, di mucosa buccale o di mucosa vescicale. L'uretroplastica con diversi innesti richiede competenze tecniche e i tassi di restrizione sono elevati. Attualmente l'innesto della mucosa buccale è considerato la sostituzione standard. Un'altra tecnica per l'uretroplastica prevede l'uso della tunica albuginea dei corpi cavernosi localmente disponibile. La faccia ventrale della tunica albuginea dei corpi cavernosi viene usata per formare il tetto della neouretra. Infatti, la tunica albuginea dei corpi cavernosi presenta somiglianze anatomiche e istologiche con la copertura dell'uretra.

L'uretroplastica con la tunica albuginea comporta vari vantaggi, in particolare:

- è facile da eseguire e non richiede molta competenza tecnica,
- viene utilizzato tessuto localmente disponibile,
- i tassi di restrizione postoperatoria sono molto bassi,
- si evitano gli svantaggi dell'uso di tessuti contenenti peli.

I risultati postoperatori si sono rivelati soddisfacenti e paragonabili alle altre tecniche. Questa pratica risulta quindi consigliabile piuttosto che utilizzare tessuti distanti e istologicamente dissimili [24].

2.2.2 La malattia di La Peyronie

La malattia di La Peyronie (o Induratio Penis Plastica) è una patologia del tessuto connettivo del pene che porta alla formazione progressiva di placche fibrotiche sulla tunica albuginea dei corpi cavernosi. Nei casi più gravi porta alla mineralizzazione, creando masse anelastiche su un tessuto elastico, che causa una serie di problematiche per il paziente. Può

contribuire alla disfunzione erettile, curvatura, deformità e dolore. La prevalenza della malattia è stata misurata allo 0.8% della popolazione generale; tuttavia, la vera prevalenza potrebbe essere più alta. Nella malattia di La Peyronie gli strati di collagene non hanno più un aspetto ordinato, all'interno della regione della placca si trovano depositi eccessivi di collagene, fibre elastiche disordinate e fibrina. Le placche di formano più comunemente dorsalmente e lateralmente. La dimensione della placca non ha mostrato alcuna correlazione con la gravità dei sintomi [25], [26].

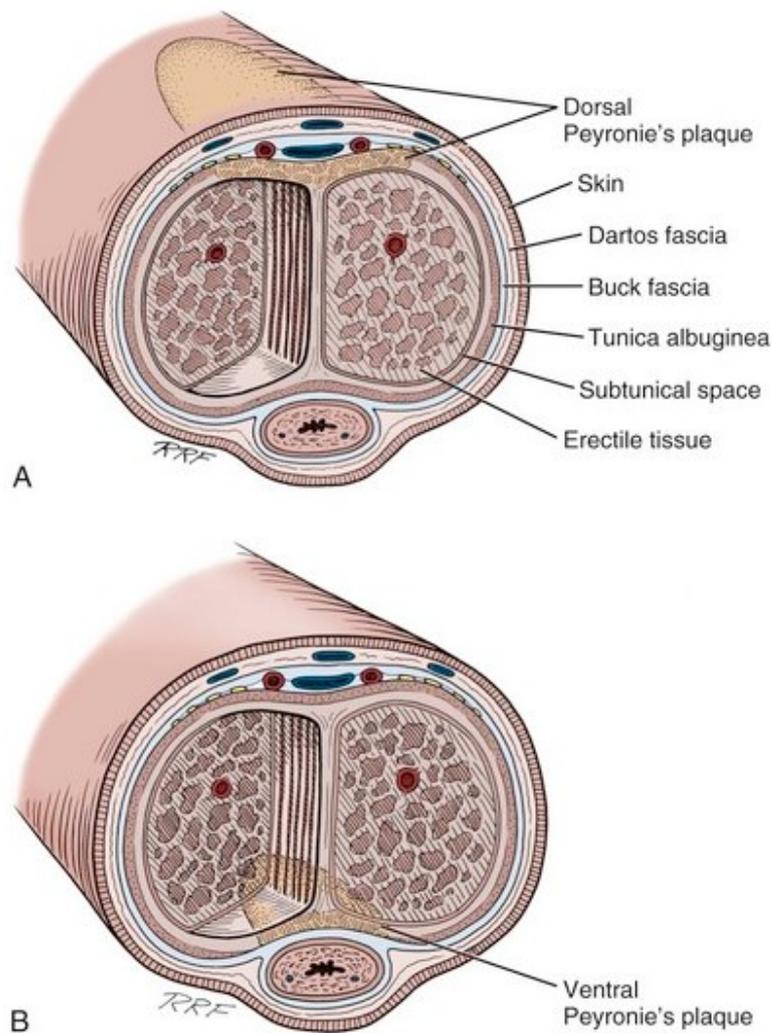


Figura 2.1 Sezione trasversale del pene affetto dalla malattia di La Peyronie. A. Placca fibrotica dorsale B. Placca fibrotica ventrale [66].

Questa malattia influenza le proprietà meccaniche del pene, si presume che le placche fibrotiche possano aumentare la rigidezza.

Esistono molteplici trattamenti chirurgici, la cui scelta dipende dalla progressione della malattia e dagli obiettivi del paziente dopo il trattamento.

Un possibile trattamento consiste nell'incisione o escissione della placca e nell'innesto di una patch di vari potenziali materiali. Il materiale ottimale non è ancora stato determinato. L'interazione meccanica tra la patch e i tessuti penieni circostanti può essere analizzata per consentire una selezione ottimale del materiale, così come della geometria. Questo trattamento è diventato la tecnica standard per la correzione delle curvature più gravi. I candidati per la correzione chirurgica dovrebbero avere una malattia cronica e stabile, una curvatura maggiore di 60 gradi con un significativo accorciamento del pene e l'assenza di disfunzione erettile

Type of graft		Graft site
Autologous		Dermis
		Vein
		Tunica vaginalis
		Temporalis fascia
		Buccal mucosa
Nonautologous	Processed human cadaveric	Pericardium
		Dermis
		Fascia lata
		Dura mater
	Processed animal grafts (xenografts)	Bovine pericardium
		Porcine small intestinal submucosa
		Porcine dermis

Tabella 2.1 Materiali di innesto utilizzati nel trattamento chirurgico della malattia di La Peyronie [25].

Un altro trattamento è la plicatura della tunica albuginea, consiste nell'accorciare il lato più lungo della curvatura del pene, eseguendo un'incisione nella tunica albuginea. Le procedure di plicatura vengono utilizzate con successo, ma il conseguente accorciamento del pene non è sempre accettabile.

A volte, specialmente nei casi in cui la malattia è accompagnata da disfunzionalità erettile, è desiderabile il trattamento con un dispositivo protesico gonfiabile poiché la correzione della curvatura del pene non corregge la disfunzionalità erettile [25], [26].

2.3 Applicazioni nell'ingegneria dei tessuti

L'ingegneria tissutale consente lo sviluppo di sostituti biologici in grado di ripristinare la normale funzione. Ciò può comportare l'uso di matrici sintetiche o naturali denominate scaffold. Esistono due diversi tipi di tecnologie: in vitro e in vivo.

- La tecnologia di ingegneria tissutale in vitro utilizza scaffold che possono essere seminati in vitro con cellule provenienti dall'ospite. Il costrutto risultante può essere impiantato nel paziente al fine di ripristinare la struttura e la funzione di tessuti e organi danneggiati.
- La tecnologia in vivo consiste nel posizionamento di uno scaffold senza cellule nell'ospite, per consentire il naturale processo di rigenerazione. Alcuni scaffold possono facilitare la naturale capacità del corpo di rigenerarsi regolando la crescita di nuovi tessuti [21].

Il tipo di cellula utilizzato è fondamentale per l'esito del trapianto. Sono stati sviluppati nuovi metodi di coltura cellulare e questi metodi consentono di coltivare cellule autologhe ex vivo, raccolte da un piccolo campione del tessuto di un paziente. Queste cellule possono quindi essere combinate con uno scaffold appropriato. Questo processo può essere in grado di generare le grandi quantità di materiale necessarie per la ricostruzione del tessuto. Inoltre, il tessuto ingegnerizzato sarebbe biocompatibile e il rischio di rigetto sarebbe eliminato [27].

Le caratteristiche ideali per un materiale da innesto dovrebbero essere le seguenti: biocompatibile, basso costo, prontamente disponibile, flessibile, ampiamente testato, facilmente maneggiabile e suturabile, a basso rischio di infezioni e antigenicità, bassa morbilità, minima reazione tissutale e infine conservando le stesse caratteristiche del tessuto ricevente. Tuttavia, nessun materiale è in grado di soddisfare tutti questi criteri [26].

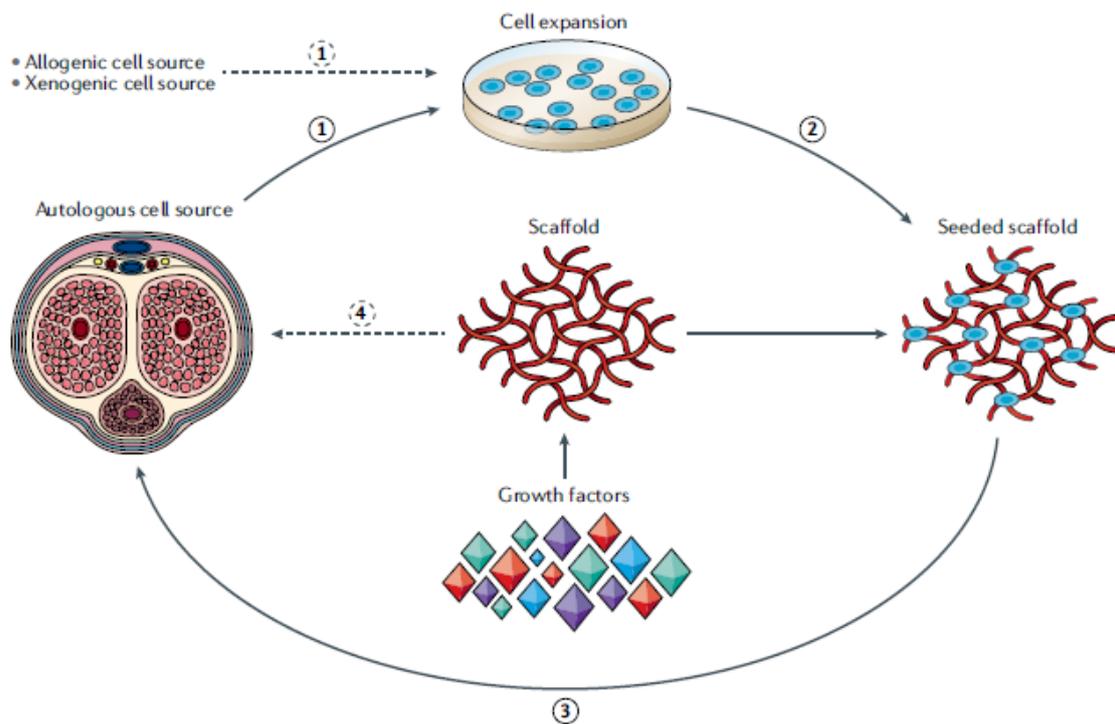


Figura 2.2 Processi dell'ingegneria tissutale. (1) Raccolta delle cellule, (2) semina su scaffold, (3) impianto dello scaffold seminato, (4) impianto dello scaffold non seminato [28].

Attualmente, malattie come la malattia di La Peyronie vengono trattate con l'escissione o incisione della placca e l'innesto nella tunica albuginea di materiali come la sottomucosa, la fascia e il pericardio dell'intestino tenue. Tutti questi materiali hanno degli svantaggi, tra cui disponibilità limitata, morbilità del sito donatore ed efficacia limitata. L'uso di un tessuto bioingegnerizzato sarebbe in grado di superare la maggior parte dei limiti delle tecniche attuali pur consentendo risultati duraturi [27].

Ci sono studi in letteratura sull'uso di innesti fasciali, venosi o sintetici per riparare i difetti della tunica albuginea nel contesto di traumi penieni per il trattamento della malattia di La Peyronie. I vari materiali di innesto possono essere classificati in due classi principali. I prossimi paragrafi riportano gli studi comparativi più di interesse tratti dalla letteratura.

2.3.1 Materiali autologhi

Sono stati utilizzati vari materiali di innesto autologhi, come materiale dal derma, lembi di tunica vaginale, fascia lata autologa, fascia temporale, aponeurosi muscolare, mucosa buccale, tunica albuginea e vene, con diversi esiti.

Nel 1950 Lowsley e Boyce [29] applicarono per la prima volta innesti autologhi nella tunica albuginea. Successivamente nel 1974 Devine e Horton [30] utilizzarono una procedura di innesto dermico dopo l'escissione della placca di Peyronie per coprire il difetto corporale. Numerosi studi pubblicati hanno riportato tassi di successo fino al 70% negli uomini trattati. Tuttavia, è stato riscontrato che l'innesto dermico dopo l'escissione della placca di Peyronie è associato a potenza ridotta nel postoperatorio. Un altro inconveniente della patch dermica era la difficoltà nel raccogliere il tessuto, causa di notevole morbilità.

La patch venosa è il materiale da innesto più comunemente utilizzato nelle procedure ricostruttive [26]. Ha una serie di vantaggi, come una maggiore elasticità attribuibile al mantello muscolare e alle fibre elastiche, costo contenuto e nessun rischio di reazione da corpo estraneo. Inoltre, è stato dimostrato che la tunica albuginea si riforma sopra il sito della patch venosa. Il tessuto dell'innesto viene solitamente prelevato dalla vena safena prossimale o distale. Molti autori [31]–[38] hanno riportato che le percentuali di successo complessive per il raddrizzamento del pene con l'uso dell'innesto della vena safena sono comprese tra il 66,6% e il 96%. Sebbene i risultati a breve termine dell'incisione della placca con innesto di vena safena siano soddisfacenti, Montorsi et al. [32] ha riportato un risultato a lungo termine meno soddisfacente. Infatti, solo il 60% dei pazienti era soddisfatto dei risultati del trattamento.

In generale gli innesti autologhi si sono dimostrati non immunogenici e anche associati a un basso tasso di infezione.

Tuttavia, la raccolta di innesti autologhi potrebbe contribuire a prolungare il tempo operatorio, e questi innesti potrebbero non avere la resistenza alla trazione e la distensibilità pari ai materiali sintetici [39].

Authors	No. of pts	Graft material	Mean follow-up (mo)	Penile straightening (%)	Postop ED (%)	Penile shortening (%)	Patient satisfaction (%)
Wild et al.	50	Dermal graft	17	80	12	NA	70
Melman and Holland	7	Dermal graft	>12	100	100	NA	0
Levine and Lenting	48	Dermal graft	19.6	94	25	19	NA
O'Donnell	25	Tunica vaginalis graft	42.2	88	68	96	NA
Das	15	Tunica vaginalis graft	4-16	87.5	0	NA	100
Kargi et al.	12	Facia lata graft	10	100	0	0	100
Gelbard and Hayden	12	Temporal fascia graft	NA	100	0	NA	100
Bruschini and Mitre	4	Muscular aponeurosis	NA	100	0	NA	100
Shioshvili et al.	26	Buccal mucosa graft	38.4	92.3	7.7	15.4	NA
Teloken et al.	7	Crural tunica albuginea graft	6	85.7	0	0	85.7
Schwarzer	31	Proximal tunica albuginea graft	NA	83.8	19.3	0	93.5
Da Ros et al.	27	Crural tunica albuginea graft	NA	96.2	3.7	NA	70.4
Kim and McVary	6	Deep dorsal vein graft	31	66.6	0	100	83.3
Hsu et al.	24	Deep dorsal vein graft	31.2	96	4	NA	100
Craatz et al.	12	Rectus sheath	4-10	83.3	NA	NA	58.3

ED = erectile dysfunction; NA: not available; postop = postoperative; pts = patients.

Authors	No. of pts	Mean follow-up (mo)	Straightening of penis (%)	Postop ED (%)	Shortening of penis (%)	Additional plication suture (%)	Patient satisfaction (%)
El-Sakka and Lue	112	≤18	96	12	17	33	92
Kalsi et al.	113	12	86	15	25	38	96
Akman et al.	56	37.1	73	8	NA	20.9	NA
Adeniyi et al.	51	16	82	8	35	22	92
Aklus et al.	50	32	80	6	40	12	88
De Stefani et al.	8	13	87.5	0	0	0	100
Yurkanin et al.	22	13.4	66.6	46	0	41.6	NA
Montorsi et al.	50	>60	72	22	100	12	60

ED = erectile dysfunction; NA: not available; postop = postoperative; pts = patients.

Tabella 2.2 In alto risultati dei principali studi clinici con innesti autologhi per difetti della tunica albuginea. In basso risultati con innesti autologhi di vena safena. I riferimenti bibliografici ai diversi studi possono essere trovati per esteso in [26].

2.3.2 Materiali allogenici, xenogenici e sintetici

In letteratura è stato descritto l'uso di molti tessuti allogenici per l'innesto con esiti soddisfacenti. Tra questi materiali, il pericardio bovino o da cadavere è il più utilizzato. I principali vantaggi del pericardio da cadavere sono una matrice acellulare che consente al tessuto ospite di crescere e occupare la matrice con una risposta infiammatoria minima [26].

Chun et al. [40] hanno confrontato l'innesto dermico con l'innesto pericardico e hanno riportato risultati funzionali simili e soddisfazione del paziente, ma il tempo dell'operazione è stato più breve con l'innesto del pericardio.

Materiali sintetici

Tra i materiali sintetici, sono stati utilizzati principalmente il Dacron[®], il politetrafluoroetilene (Teflon[®] Gore-Tex) e il Marlex[®]. Questi materiali sono prontamente disponibili, resilienti e inerti. Tuttavia, all'uso di questi materiali sono state associate complicazioni, inclusa l'anelasticità dell'innesto e le infezioni. Infatti, i materiali sintetici causano significativa infiammazione postoperatoria, che porta alla fibrosi intorno al sito dell'innesto e potrebbe aumentare il tasso di infezione. In compenso, i polimeri sintetici potrebbero potenzialmente essere ulteriormente ingegnerizzati per rilasciare fattori di crescita per una migliore rigenerazione tissutale [26], [39].

In uno studio del 2012, Ferretti et al. [41] hanno trattato delle sezioni di tunica albuginea di ratto, con scaffold di acido poliglicolico (PGA). L'innesto è stato prodotto in vitro seminando cellule autologhe di fibroblasti ed è stato poi trapiantato con e senza cellule. A 4 mesi, la ricomparsa della malattia di La Peyronie era inferiore nel gruppo con scaffold seminato dai fibroblasti, rispetto agli scaffold non seminati. Questo studio sperimentale fornisce prove preliminari in conferma dell'ipotesi secondo cui lo scaffold seminato di cellule sia più efficiente di quello non seminato per la sostituzione della tunica albuginea. Infatti, secondo la valutazione istologica l'innesto di solo scaffold di PGA è associato a più fibrosi rispetto a quello seminato dalle cellule. Ciò potrebbe spiegare il più alto tasso di retrazione dell'innesto e la funzione erettile più bassa osservata nel gruppo con solo scaffold.

Tuttavia, l'uso di PGA come scaffold presenta alcune difficoltà. In caso di necessità di una coltura di cellule a lungo termine, il PGA viene parzialmente degradato in vitro dopo due settimane di coltura cellulare. Un periodo più lungo di coltura ha portato alla distruzione dello scaffold, divenuto inutilizzabile. Inoltre, scaffold di questi tipi sono ancora responsabili della reazione immunitaria e dell'insorgenza di fibrosi.

Di conseguenza è necessario duplicare questi esperimenti in animali più grandi al fine di aumentare le dimensioni dell'innesto per ottenere dati più accurati.

Sottomucosa dell'intestino tenue (SIS)

Le prime sperimentazioni di ingegneria tissutale della tunica albuginea sono iniziate nel 2004. Lo studio di Schultheiss et al. [42] ha dimostrato che i fibroblasti suini seminati su

matrici di collagene decellularizzate formavano un multistrato omogeneo con infiltrazione della matrice e allineamento regolare delle cellule dopo 7 giorni. Oltre alla produzione di nuove proteine della matrice extracellulare, come il collagene, importante per la rigenerazione della tunica albuginea. Sono stati notati miglioramenti nella proliferazione cellulare e nella sintesi della matrice extracellulare di fibroblasti, quando coltivati in un bioreattore sotto stress multiassiale, rispetto alle culture statiche. Lo scopo del presente studio era di generare un tipo di innesto di ingegneria tissutale meccanicamente stabile, non solo costituito da un'adeguata quantità di matrice extracellulare, principalmente collagene ed elastina, ma anche da cellule funzionali, cioè i fibroblasti. Al fine di consentire la risemina cellulare fisiologica e la generazione di matrici vitali. Sfortunatamente, i risultati di questo studio sono stati presentati esclusivamente come immagini istologiche senza quantificazione dei dati.

Gli innesti di sottomucosa dell'intestino tenue (SIS) sono stati ampiamente utilizzati nella ricostruzione di vari tessuti e organi, perché è un biomateriale che ha dimostrato di indurre la rigenerazione specifica del tessuto in numerosi sistemi di organi. Studi preliminari hanno suggerito che la SIS potrebbe essere estremamente utile per molti tipi di applicazioni di chirurgia urologica in cui è necessario nuovo tessuto o si desidera rafforzare le strutture native. La SIS è anche stata utilizzata con successo nei pazienti con curvatura del pene.

La SIS ha un netto vantaggio rispetto ai materiali autologhi, in quanto è prontamente disponibile. La SIS è un materiale da innesto che viene prodotto dalla lavorazione meccanica dell'intestino tenue del suino. La tunica mucosa viene rimossa meccanicamente dalla superficie interna e le tuniche sierosa e muscolare vengono rimosse dalla superficie esterna. Il materiale di innesto risultante è composto principalmente dallo strato sottomucoso dell'intestino tenue, dello spessore di circa 0.1 mm. Risulta una matrice acellulare composta principalmente da collagene di tipo I. È commercializzato come 1 strato e come 4 strati.

La SIS suina è ricca di diversi tipi di collagene, fibronectina, i fattori di crescita FGF e TGF- β , che contribuiscono alla guarigione delle ferite, alla segnalazione cellulare e al rimodellamento dei tessuti. La crescita interna del tessuto nativo si verifica nell'innesto in circa 4 settimane. Essendo acellulare e immunocompatibile, provoca solo risposte antigeniche minori o assenti e sembra avere una maggiore resistenza alle infezioni rispetto agli innesti sintetici. La SIS, a differenza di altri innesti di matrici decellularizzate

disponibili, come il pericardio bovino trattato con gluteraldeide e il pericardio da cadavere, è riassorbibile perché non è reticolata [43].

Studi sugli animali hanno mostrato risultati promettenti. Non c'era contrazione dell'innesto, espansione o rigonfiamento. Gli esami istologici hanno rivelato il verificarsi di una risposta infiammatoria iniziale seguita da neovascolarizzazione dell'innesto e incorporazione nel tessuto corporeo nativo. Tutti gli innesti sono stati completamente incorporati con la tunica albuginea normale [21], [44].

Questi risultati incoraggianti hanno portato a studi clinici. Un primo studio ha utilizzato la SIS come innesto per la tunica albuginea in bambini con grave incurvamento del pene. I risultati del follow-up a breve termine sono stati eccellenti. La SIS è risultata essere tecnicamente facile da lavorare, forniva un innesto a tenuta stagna e produceva un'eccellente correzione della curvatura. Il follow-up clinico a breve termine non ha mostrato evidenza clinica di fibrosi, contrazione o curvatura ricorrente. Non ci sono state complicanze intraoperatorie o postoperatorie[21].

Altri studi clinici sono stati effettuati su pazienti adulti affetti dalla malattia di La Peyronie e trattati con incisione o escissione della placca e innesto di SIS. Lo studio di Breyer et al. [45] aveva un follow-up medio di 15 mesi. Il tasso di complicanze è risultato del 37%, superiore al previsto. Le complicanze includevano ematoma al sito del trapianto (26%), infezione del trapianto (6%) e malattia di La Peyronie recidiva che richiedeva plicatura (6%). Knoll et al. [46] ha riportato risultati migliori in uno studio con follow-up medio di 11 mesi. Non ci sono stati casi di infezione, ematoma, separazione dell'innesto o accorciamento del pene.

Tuttavia, un altro studio ha messo in dubbio l'efficacia dell'innesto con SIS, perché è stata osservata la ricomparsa della curvatura in tre dei quattro pazienti [44].

Knoll ha utilizzato la SIS in un ulteriore studio con follow-up a lungo termine, che includeva 162 pazienti [47]. Nessun paziente ha avuto infezione, rigonfiamento permanente nel sito del trapianto o reazione di rigetto immunogenico locale. L'innesto ha mostrato caratteristiche di riparazione e rimodellamento dei tessuti senza formazione di tessuto fibrotico generalizzato quando posizionato in vivo. C'è stata una recidiva della curvatura nel 9%, con il 5% che richiedeva un'ulteriore correzione chirurgica. I dati ottenuti sono

risultati in accordo con altri studi che hanno utilizzato l'innesto di SIS e hanno riportato complicazioni minime e un successo compreso tra l'80% e il 95%. La sottomucosa dell'intestino tenue ha il potenziale per applicazioni di innesto perché è facile da usare e prontamente disponibile. L'assenza di comorbidità associate alle tecniche di prelievo e l'assenza di reazioni avverse rendono questo materiale un buon sostituto anatomico e funzionale della tunica albuginea.

Le cellule staminali derivate dal tessuto adiposo (ADSCs) hanno mostrato risultati promettenti nella ricostruzione della tunica albuginea quando seminati su scaffold biologici. Le ADSCs possono riparare il tessuto danneggiato, aumentare la differenziazione cellulare e stimolare il rilascio di molteplici fattori di crescita. È stato dimostrato che le ADSCs seminate sulla sottomucosa dell'intestino tenue (SIS) suino e innestate su difetti della tunica albuginea nei ratti aumentano i livelli di espressione della proteina TGF- β 1 e FGF-2, mantenendo la funzione erettile. Gli innesti di SIS seminati hanno ottenuto una significativa conservazione del tessuto cavernoso, fibrosi minima e risposte erettile mantenute, rispetto a modelli di ratti operati in modo simulato con solo innesto di SIS. I risultati ottenuti suggeriscono che le ADSCs accelerano la ricostruzione della tunica albuginea e del tessuto cavernoso dei corpi sottostanti, inibendo la fibrosi e migliorando l'angiogenesi. Questo risultato è coerente con il fatto che le ADSC secernono fattori angiogenici e fattori di crescita [43].

Le ADSCs sono facilmente ottenibili e possono essere coltivate ed espanse rapidamente e sono in grado di formare una moltitudine di tessuti. Inoltre, le ADSCs coltivate a lungo termine mantengono la loro pluripotenza mesenchimale. Nonostante alcune osservazioni promettenti, l'uso di ADSC nella rigenerazione del pene ha ancora varie limitazioni, come bassa sopravvivenza cellulare e attecchimento.

Il tipo cellulare ottimale per la ricostruzione della tunica albuginea rimane sconosciuto. La tunica albuginea rigenerata deve agire come un robusto strato fibroso di tessuto connettivo, prevenendo il drenaggio venoso del pene e sostenendo lo stato eretto. Ad oggi, i fibroblasti e le ADSCs umane sembrano fornire le fonti cellulari più promettenti grazie alla loro capacità di formare collagene extracellulare nativo e provocare un'erezione del pene sostenuta [28].

Mucosa vescicale

Un altro studio è stato eseguito utilizzando un innesto di mucosa vescicale decellularizzata (BAM). Le matrici decellularizzate sono state realizzate mediante lisi cellulare dalle vesciche dei suini. È stato asportato un segmento della tunica albuginea di nove conigli e il difetto è stato poi ricoperto dalla matrice decellularizzata. L'istologia della matrice mostrava fibre di collagene intatte e abbondanti, con molti pori. L'innesto è stato gradualmente sostituito dal tessuto normale. Due mesi dopo l'impianto, l'infiammazione nel sito dell'innesto è gradualmente diminuita. I siti dell'innesto hanno mostrato un'eccellente guarigione senza contratture e la fusione tra l'innesto e la tunica albuginea normale vicina sembrava essere ben riuscita. Non sono state rilevate differenze istologiche significative tra la tunica albuginea impiantata e quella di controllo a sei mesi dall'impianto. È stato dimostrato quindi, che gli innesti BAM formano una struttura adeguata, simile a quella della tunica albuginea normale e non sono state riportate complicazioni in combinazione con questa tecnica. Sono tuttavia necessarie ulteriori indagini cliniche per verificare l'applicabilità della mucosa vescicale decellularizzata per la ricostruzione della tunica albuginea [39].

Tunica albuginea

Sono stati riportati risultati positivi per quanto riguarda l'utilizzo di scaffold di tunica albuginea decellularizzata nel trattamento dei difetti della tunica albuginea in modelli animali. Il vantaggio di questo biomateriale è la sua rapida integrazione, senza rigetto. Nello studio di Wefer et al. [48] hanno impiantato l'innesto di tessuto allogeneico in 18 conigli. Il tasso di successo dopo la riparazione del tessuto variava, con buoni risultati a 6 mesi e buoni e insoddisfacenti a 1 mese. Questi insuccessi sono stati probabilmente causati da ematomi postoperatori che non sono stati sufficientemente riassorbiti dal tessuto circostante, risultando in tessuto cicatriziale sul sito dell'innesto. Shokeir et al. [49] hanno utilizzato un innesto di matrice decellularizzata della tunica albuginea per coprire un difetto tunicale in nove cani meticci. Tutti gli animali sono sopravvissuti all'intervento chirurgico e nessuno ha sviluppato ematomi o infezioni delle ferite. L'ispezione del sito dell'innesto e la misurazione della sua lunghezza e larghezza hanno mostrato una guarigione senza contrattura. Questi risultati hanno suggerito la fattibilità della ricostruzione della tunica albuginea in condizioni come traumi o malattia di La Peyronie. Sulla base dei buoni risultati

sperimentali ottenuti, è necessario un attento studio clinico prima dell'uso clinico diffuso di tale innesto nell'uomo.

La matrice decellularizzata, derivata dalle vie urinarie e dal SIS, è stata utilizzata anche come scaffold per la stimolazione della crescita dei componenti cellulari di una varietà di componenti del tratto urinario. La matrice decellularizzata è stata riconosciuta come un candidato promettente per la ricostruzione delle vie urinarie. Hanno dimostrato di essere in grado di raggiungere parametri strutturali e funzionali adeguati, senza complicazioni, in una varietà di studi di ricostruzione del tratto urogenitale [39].

Authors	No. of pts	Graft material	Mean follow-up (mo)	Straightening of penis (%)	Postop ED (%)	Shortening of the penis (%)	Satisfaction rate (%)
Eggido et al.	78	Bovine pericardium	17.5	88.4	0	0	NA
Chun et al.	9	Cadaveric Pericardium	6	55.5	66.7	NA	88.8
	15	Dermal graft	11	73.3	55.6 (preop in 56.5)		73.3
Usta et al.	19	Cadaveric pericardium	21.9	79.9	15.7	0	73.7
Levine and Estrada	40	Cadaveric pericardium	22	98	30	33	98
Knoll	97	Intestinal submucosa	20	90	16	0	NA
Sampaio et al.	40	Dura mater	12-72	95	15	0	95

ED = erectile dysfunction; NA: not available; postop = postoperative; preop = preoperative; pts = patients.

Tabella 2.3 Risultati di impianti con materiali allogenici o xenogenici di tessuto cadaverico. I riferimenti bibliografici ai diversi studi possono essere trovati per esteso in [26].

Tuttavia, nessuno di questi materiali biologici o sintetici si è dimostrato ideale, né è stato adottato come standard stabilito.

Diversi modelli di mammiferi vengono utilizzati per studiare l'ingegneria tissutale nella rigenerazione del corpo cavernoso e della tunica albuginea, più frequentemente conigli, ratti e topi. I modelli di piccoli animali hanno diverse limitazioni. In primo luogo, le differenze di dimensioni tra esseri umani e roditori limitano l'utilità dei dati della densità cellulare e della pressione intracavernosa quando si traducono in uno studio sull'uomo. In secondo luogo, gli esiti estetici della rigenerazione del pene nei roditori non sono stati riportati nella letteratura attuale. Infine, la composizione dei corpi cavernosi dei roditori è

diversa da quella degli esseri umani, poiché i corpi dei roditori contengono meno tessuto muscolare liscio e più collagene rispetto ai corpi umani.

Un modello animale di grandi dimensioni, come scimmie o cani, che ha un'anatomia che si avvicina maggiormente a quella di un essere umano, dovrebbe essere studiato per migliorare la traduzione clinica, ponendo l'accento sui risultati estetici e mantenendo la pressione intracorporea in un volume simile a quello degli esseri umani [28].

2.4 Decellularizzazione della tunica albuginea

2.4.1 Decellularizzazione

Il processo di decellularizzazione prevede una combinazione di processi chimici, fisici ed enzimatici per la rimozione del materiale cellulare presente all'interno dei tessuti. Il processo elimina ogni rischio di eventuale risposta immunitaria sulla matrice da parte dell'organismo ospite e ogni forma di rigetto.

Le matrici tissutali decellularizzate sono matrici ricche di collagene. Si degradano lentamente dopo l'impianto e vengono sostituite e rimodellate dalle proteine sintetizzate e secrete dalle cellule trapiantate. È stato dimostrato che le matrici decellularizzate supportano la crescita cellulare e la rigenerazione dei tessuti urogenitali, come l'uretra e la vescica, senza reazioni di rigetto immunogenico. Poiché le strutture delle proteine (collagene ed elastina) sono ben conservate nelle matrici decellularizzate, le proprietà meccaniche delle matrici decellularizzate non differiscono significativamente da quelle del tessuto nativo [27].

Durante la decellularizzazione, i trattamenti fisici, chimici ed enzimatici possono influenzare la composizione biochimica dello scaffold [50]. La composizione biochimica svolge un ruolo importante nella regolazione della funzione cellulare e nella rigenerazione dei tessuti, poiché la matrice extracellulare fornisce i segnali necessari per la proliferazione e organizzazione delle cellule.

I GAG sono responsabili dell'organizzazione strutturale, della regolazione delle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice e della modulazione dell'effetto delle citochine. Pertanto, la conservazione dei GAG ha un ruolo chiave nella guarigione delle ferite e può influenzare la crescita, la migrazione, l'adesione e la differenziazione cellulare [51].

In considerazione al fatto che il materiale ideale per la sostituzione della tunica albuginea non è ancora stato trovato, è stato quindi ipotizzato che una matrice acellulare organo-specifica e omologa possa essere un valido materiale di innesto. Si tratta pertanto di utilizzare la tunica albuginea umana decellularizzata [52].

2.4.2 Decellularizzazione della tunica albuginea umana

Lo studio di Da Silva et al. [52] è stato il primo studio a decellularizzare la tunica albuginea umana.

Sono stati analizzati due diversi protocolli di decellularizzazione: polietilene glicole modificato (PEG 1000) e Triton X-100 modificato, risultati efficienti nel preservare le proprietà strutturali e biochimiche.

Protocolli di decellularizzazione:

- **PEG 1000:** I campioni sono stati immersi in 200 mL 80% PEG 1000 per 7 giorni con un agitatore a 22° C. La soluzione di PEG è stata cambiata completamente ogni 48 ore. In seguito, i campioni sono stati lavati con tampone fosfato (PBS) pH 7.4 contenente ceftriaxone e amfotericina B. Successivamente, i campioni sono stati immersi in una soluzione salina sterile e ciascuna faccia è stata esposta alla radiazione ultravioletta-C (254 nm) per 10 minuti. Infine, i campioni sono stati immersi in 100 mL di 70 U:1 U/mL di DNAsi I e MRAsi a 22°C per 7 giorni e lavati con 500 mL di PBS, pH 7.4, per altre 24 ore.
- **Triton X-100:** I campioni sono stati immersi in 100 mL di acqua distillata sterile con un agitatore a 22° C per 24 ore. In seguito, sono stati immersi in 100 mL di soluzione Triton X-100 all'1%, contenente lo 0.1% di idrossido di ammonio e 35 µL di fenilmetilsulfonile fluoruro in acqua distillata sterile per 14 giorni. I campioni sono stati lavati con 500 mL di acqua distillata per 48 ore, cambiando la soluzione dopo 24 ore e con 500 mL di PBS, pH 7.4, per 24 ore. Successivamente. I campioni sono stati immersi in 100 mL di 70 U:1 U/mL di DNAsi I e MRAsi a 22°C per 24 ore e lavati con 500 mL di PBS, pH 7.4, per ulteriori 24 ore. Tutti i campioni di tunica albuginea decellularizzata sono stati conservati in glicerolo >99% a 4°C.

La decellularizzazione della tunica albuginea non è un processo difficile, in conseguenza della scarsità di cellule presenti nel tessuto, tuttavia, la conservazione della struttura

tridimensionale può essere complicata. I metodi di ottenimento del tessuto possono modificare la struttura tridimensionale nativa, fondamentale per dare elasticità e forza alla matrice.

Entrambi i metodi di decellularizzazione sono risultati ugualmente efficienti nel preservare i fasci di collagene (orientamento longitudinale e circolare degli strati) e il reticolo di fibre elastiche. Inoltre, entrambe le matrici acellulari ottenute hanno presentato un comportamento biomeccanico simile in vitro.

Tutti i campioni di tunica albuginea decellularizzata non presentavano residui nucleari o cellulari, e il modello strutturale della matrice extracellulare è stato preservato.

La concentrazione proteica totale era significativamente maggiore nel tessuto decellularizzato. Invece la concentrazione totale di GAGs era significativamente minore nel tessuto decellularizzato, il protocollo con il Triton X-100 ha conservato una maggiore concentrazione di GAGs totali rispetto a quello con il PEG 1000. I due metodi di decellularizzazione hanno presentato una simile efficacia nel rimuovere gli acidi nucleici. Il DNA è stato completamente rimosso con entrambi i metodi di decellularizzazione e la concentrazione di RNA è diminuita significativamente.

I campioni di tunica albuginea nativa e decellularizzata sono stati sottoposti a prove di trazione monoassiale con una velocità di deformazione di 3 mm/min. La media del massimo punto di rottura non presentava differenze significative tra il tessuto nativo (0.67 ± 0.99 KgF/mm²) e decellularizzato (1.57 ± 1.54 KgF/mm²).

In conclusione, questo studio ha dimostrato che i metodi di decellularizzazione con Triton X-100 e PEG 1000 per la tunica albuginea sono ugualmente efficaci. Questi risultati provano che la tunica albuginea decellularizzata è un innesto promettente per la riparazione del tessuto, sebbene siano necessari test di biocompatibilità prima dell'esecuzione degli studi clinici.

2.4.3 Decellularizzazione della tunica albuginea animale

Il processo di decellularizzazione è stato precedentemente descritto in modelli animali.

Lo studio di Wefer et al. [48] ha decellularizzato la tunica albuginea del coniglio. I campioni di tessuto raccolti sono stati incubati in 50 mL di 10 mmol/L PBS e sodio azide allo 0.1% per 6 ore fino alla parziale lisi cellulare. Dopo il lavaggio nel PBS, i campioni sono stati incubati in 50 mL 1 mol/L di cloruro di sodio contenente 2000 KU DNasi. In seguito a questo passaggio la lisi cellulare era completa e i componenti intracellulari sono stati rilasciati. Dopo il lavaggio nel PBS, i campioni sono stati trattati con 50 mL di desossicolato di sodio al 4% per solubilizzare le membrane a doppio strato lipidico e i lipidi intracellulari. In seguito, sono stati risciacquati in soluzione salina e conservati a 4°C in una soluzione di gentamicina al 10%. La mancanza della componente cellulare dei campioni è stata verificata mediante colorazione con ematossilina ed eosina e tricromia, seguita da microscopia ottica.

L'analisi istologica non ha mostrato differenze significative nel numero di cellule e nel contenuto di collagene tra la tunica albuginea nativa e decellularizzata impiantata. Invece, per quanto riguarda le fibre elastiche si trovavano in numero minore nei campioni decellularizzati non impiantati e in quelli dopo un mese dall'impianto. A tre e sei mesi dopo l'impianto il numero di fibre elastiche era uguale a quello nel tessuto nativo, sembra probabile che i fibrociti dell'ospite siano migrati e abbiano sostituito le fibre elastiche mancanti.

L'innesto di tunica albuginea decellularizzata risulta un materiale facile da lavorare e maneggiare durante l'intervento chirurgico e fornisce un'impalcatura per la rigenerazione naturale. Inoltre, il tessuto decellularizzato fornisce un buon modello per valutare l'autorigenerazione promossa di componenti cellulari e non nello scaffold.

Un altro studio condotto da Shokeir et al. [49] ha decellularizzato la tunica albuginea del cane. Per la decellularizzazione la tunica albuginea raccolta è stata posta in un becher con 50 mL di soluzione tampone fosfato salino (PBS), pH 7.0, e sodio azide allo 0.1%. Il contenuto del becher è stato agitato per 24 ore per consentire la lisi cellulare parziale. In seguito, il tessuto è stato trattato con 50 mL di DNasi 1M e agitato per 24 ore. Di conseguenza si è verificata una lisi cellulare completa e tutti i componenti intracellulari

sono stati rilasciati. Il campione è stato poi trattato con 50 mL di sodio al 4% contenente lo 0.1% di sodio azide e agitato per 24 ore per solubilizzare la membrana cellulare lipidica e i lipidi intracellulari. Questo passaggio è stato ripetuto. La matrice extracellulare risultante è stata lavata tre volte con 50 mL di PBS e conservata in solfato di neomicina al 10% a 4°C fino al trapianto.

Istologicamente, la matrice decellularizzata dopo un mese dal trapianto appariva più spessa della vicina tunica albuginea. L'orientamento graduale dei fibrociti, dei capillari e delle fibre di collagene è stato dimostrato a un mese dall'impianto e a tre e sei mesi era completo. Infine, il confronto tra la tunica albuginea a 6 mesi dopo l'impianto e una nativa non ha mostrato significative differenze istologiche.

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1 Decellularizzazione della tunica albuginea

I campioni di tunica albuginea umani testati nel presente studio sono stati forniti dal gruppo di ricerca della Sezione di Anatomia Umana del Dipartimento di Neuroscienze dell'Università di Padova. Le porzioni di tessuto sono state estratte da cadaveri umani, gestiti dal Programma di Donazione del Corpo della Sezione di Anatomia Umana dell'Università di Padova, secondo le linee guida europee, italiane e regionali [53], [54]. Ai fini dello studio, sono stati ricavati campioni di tessuto di 30 x 50 mm², i quali sono stati poi conservati in freezer ad una temperatura di -20°C fino ad ulteriore lavorazione.

Per la decellularizzazione, in particolare, i campioni sono stati scongelati a temperatura ambiente, e manipolati in condizioni sterili per evitare la contaminazione batterica. Successivamente, i campioni sono stati puliti dai residui di tessuto circostante e lavati abbondantemente con una soluzione antibiotica al 3% in tampone fosfato salino (PBS, *Phosphate Buffered Saline*), al fine di rimuovere qualsiasi contaminante. Ulteriori lavaggi sono stati effettuati con soluzione antibiotica a concentrazione decrescente, fino all'ultimo lavaggio solamente con PBS per eliminare ogni residuo antibiotico.

Il protocollo di decellularizzazione prevede un lavaggio iniziale del tessuto in acqua distillata (dH₂O) per 24 ore a 4°C, a cui segue il trattamento con DNasi in soluzione di cloruro di sodio (NaCl) 1 molare per altre tre ore a temperatura ambiente; successivamente, il tessuto viene prima immerso in una soluzione di PBS con Tripsina ed EDTA (per un'ora a 37°C), e poi trattato con una soluzione di TergitolTM allo 0.5%, in combinazione con idrossido d'ammonio (NH₄OH) allo 0.8%, in PBS per 72 h a 4°C; infine, il tessuto viene immerso nuovamente in dH₂O per 48 ore a 4°C.

3.2 Caratterizzazione meccanica della tunica albuginea

3.2.1 Il sistema Bose® ElectroForce

Le prove meccaniche sono state effettuate tramite l'utilizzo della strumentazione Bose® ElectroForce Planar Biaxial Test_Bench (TA Instruments), presente nei laboratori del

Dipartimento di Ingegneria Industriale dell'Università di Padova. Questo è un sistema appositamente sviluppato per effettuare test meccanici con ordini di accuratezza elevati, al fine di caratterizzare le proprietà meccaniche di materiali e tessuti molli. Utilizzando questo strumento è possibile valutare l'anisotropia meccanica e le relazioni sforzo-deformazione in campioni che vanno da dispositivi ingegnerizzati, inclusi sensori indossabili e reti di riparazione delle ferite, a tessuti come pelle, pericardio e lembi di valvole cardiache. In particolare, l'impiego di questo sistema è finalizzato allo studio di materiali che presentano solitamente caratteristiche quali anisotropia, relazioni di tensione-deformazione non lineari, grandi deformazioni e comportamenti viscoelastici, allo scopo di poter sviluppare opportuni modelli costitutivi [67].



Figura 3.1 Sistema Bose® ElectroForce Planar Biaxial TestBench.

Questo strumento può essere configurato con due o quattro motori elettromagnetici lineari montati su una base metallica orizzontale traforata e quattro diverse celle di carico, le quali consentono la rilevazione delle forze sviluppate durante le prove. I motori sono disposti a croce e hanno spostamento massimo di ± 6 mm. Tale configurazione consente di effettuare sia prove mono-assiali, utilizzando solo due dei quattro motori, sia prove bi-assiali tramite

l'utilizzo di tutti i motori. I motori possono essere spostati con una certa facilità sul banco di prova, in modo da creare la configurazione più adatta all'esperimento.

I motori e le celle di carico sono interfacciati mediante il software di controllo *WinTest*. Questo software consente il controllo totale dei motori durante la prova, l'acquisizione temporale delle grandezze fisiche di interesse e il settaggio informatizzato di tutti i parametri e modalità di lavoro dei motori. I motori possono imporre uno spostamento oppure una forza, se si controlla lo spostamento, il sistema misura la forza sviluppata nel tempo; al contrario, se si controlla la forza, il sistema registra lo spostamento che questa genera nel tempo. Con l'ausilio di questo software è possibile programmare il protocollo sperimentale desiderato, in questo studio gli spostamenti vengono imposti dai motori con velocità e ampiezza impostate dallo sperimentatore. È incluso anche un processo di 'tuning' attraverso il quale è possibile calibrare il sistema in base alla configurazione della massa del sistema e del livello di spostamenti che si intende raggiungere nel corso delle prove sperimentali [68].

3.2.2 Set up sperimentale

Le prove meccaniche svolte in questo studio sono test mono-assiali di trazione e di rilassamento delle tensioni. Essendo prove mono-assiali, per la loro esecuzione sono stati utilizzati solo due motori contrapposti tra loro. In corrispondenza di entrambi i motori è stata posta una cella di carico, in grado di rilevare una forza massima applicata di 22 N. La cella viene avvitata su un perno che attraversa trasversalmente la piastra di contenimento del motore e che può scorrere. La cella presenta a sua volta una piccola sporgenza su cui può essere avvitata la pinza con cui afferrare il provino (grip).

In tutte le prove sono state usate delle grip metalliche con vite a serraggio poste a una distanza di 10 mm, nelle quali sono stati fissati i campioni da testare.

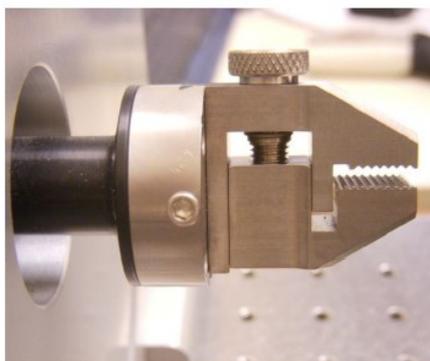


Figura 3.2 Dettaglio della grip.

Le prove meccaniche sono state tutte effettuate con spostamento imposto. Il sistema è in grado di misurare la forza che si sviluppa in seguito a uno spostamento imposto, tramite le celle di carico.

Per evitare la disidratazione del tessuto, il provino è stato sottoposto a idratazione costante per mezzo di una flebo di soluzione fisiologica.

3.2.3 Preparazione dei campioni

I campioni di tessuto sono stati forniti in sezioni rettangolari di dimensioni di circa 30 x 50 mm² e spessore di circa 3 mm. Complessivamente sono state fornite due porzioni di tali dimensioni sia di TA nativa che di TA decellularizzata. Ogni campione di tessuto era contrassegnato da un lato da un punto di filo di sutura per poter distinguere la direzione longitudinale da quella circonferenziale (Figura 3.3). I campioni sono stati conservati in congelatore e poco prima dell'esperimento il tessuto è stato lasciato a scongelare all'interno di una soluzione fisiologica a temperatura ambiente.

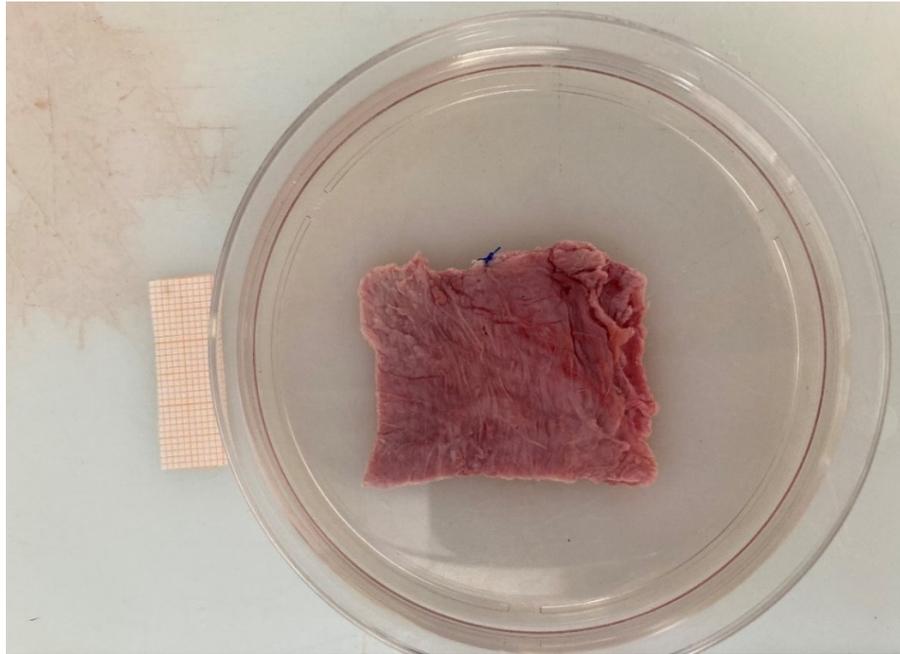


Figura 3.3 Campione di tunica albuginea nativa.

Il tessuto è stato tagliato con un bisturi in modo tale da ottenere dei provini di dimensioni medie di circa 20 mm di lunghezza e 5 mm di larghezza (Figura 3.4). I campioni di tessuto sono stati tagliati lungo la direzione longitudinale e circonferenziale rispetto alla struttura uretrale. Questa suddivisione serve a confrontare le proprietà del tessuto tra le direzioni longitudinale e circonferenziale. Infatti, nella tunica albuginea i fasci di collagene e elastina sono orientati circolarmente nello strato interno e longitudinalmente nello strato esterno [16]. La struttura della matrice potrebbe conferire al tessuto proprietà anisotrope, per validare questa ipotesi bisogna confrontare i risultati ottenuti dalle prove nelle due direzioni. Nella tabella sono riportate le misure di larghezza e spessore di tutti i provini utilizzati nelle prove di trazione e rilassamento, divisi per tipo di trattamento e direzione di prova.

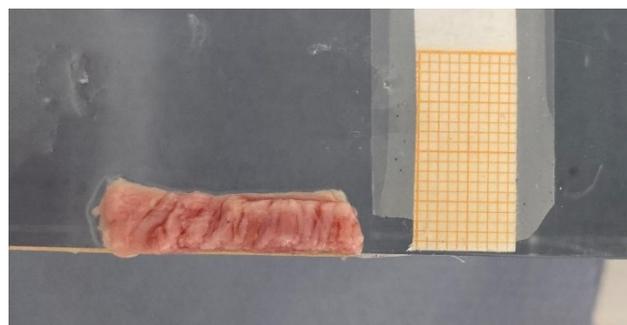


Figura 3.4 Immagine di un campione trasversale di TA nativa.

Sono stati ricavati in totale 45 provini, suddivisi per tipologia di prova, di trattamento e di direzione di prova, come mostrato in tabella 3.1.

prove di trazione			prove di rilassamento		
	C	L		C	L
NATIVO	6	6	NATIVO	7	7
DECELL	5	4	DECELL	5	5

Tabella 3.1 Numero di provini per le prove di trazione e di rilassamento delle tensioni della tunica albuginea nativa e decellularizzata. T=trasversale, C=circonfrenziale.

La lunghezza libera su cui vengono fatti i test di interesse è quella compresa tra le due grip, pari a 10 mm. Per quanto riguarda, invece, la dimensione della sezione del provino utilizzata per il calcolo della tensione (come descritto nel paragrafo 3.2.6), questa è stata determinata a partire dai valori di larghezza (w) e spessore (t) ottenuti mediante analisi d'immagine di ogni provino visto dall'alto e dal lato (tabella 3.2). Tutti i provini, infatti, essendo tagliati manualmente, possono presentare delle irregolarità e leggere variazioni di dimensioni: per questo motivo sono stati fotografati prima del test e ogni immagine è stata analizzata tramite l'utilizzo del software *ImageJ*. Per avere una misura precisa di spessore e larghezza sono state prese tre misure per ogni grandezza in diverse posizioni del provino con *ImageJ*, e calcolata la media delle misure.

I campioni ottenuti sono stati destinati a due diverse tipologie di prove sperimentali, trazione e rilassamento delle tensioni, come descritto nei Paragrafi 3.2.4 e 3.2.5

	PRO-VINO	TA NATIVA				TA DECELL			
	n.	C		L		C		L	
		w (mm)	t (mm)	w (mm)	t (mm)	w (mm)	t (mm)	w (mm)	t (mm)
TRAZIONE	1	5.4	2.7	4.4	2.7	4.9	3.2	6.3	5.3
	2	5.3	3.8	6.0	3.3	4.8	3.1	4.8	4.4
	3	5.4	3.7	5.7	3.3	4.9	3.2	5.0	3.1
	4	6.3	3.9	6.0	3.9	3.7	2.6	5.8	4.5
	5	5.4	3.1	7.6	2.8	5.2	2.5		
	6	5.4	3.2	6.8	3.8				
RILASSAMENTO	1	5.5	3.9	4.3	2.3	6.2	3.5	4.8	3.6
	2	5.8	3.4	4.7	2.8	4.3	2.3	4.1	3.5
	3	7.2	3.9	4.2	2.8	4.5	3.2	4.9	3.3
	4	5.6	4.1	5.7	2.2	5.3	3.1	5.1	3.4
	5	6.3	3.9	5.0	2.4	5.8	2.9	5.6	3.7
	6	5.1	4.0	4.2	3.3				
	7	4.9	3.5	5.0	3.6				
media		5.7	3.6	5.3	3.0	4.9	2.9	5.2	3.9
SD		0.6	0.4	1.1	0.5	0.7	0.4	0.6	0.7

Tabella 3.2 Larghezza (w) e spessore (t) dei diversi campioni di tunica albuginea.

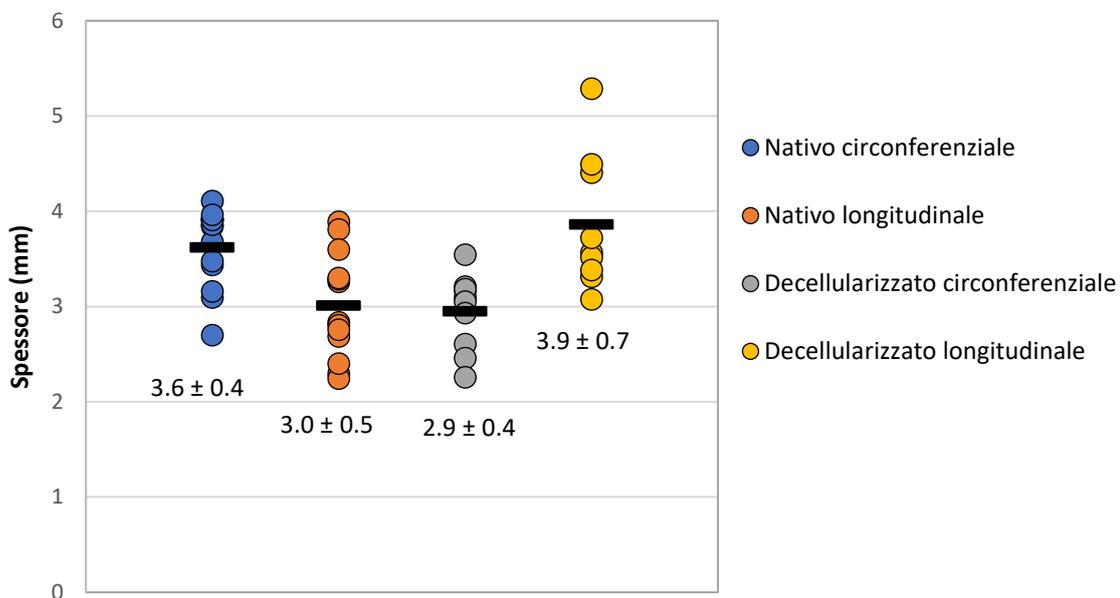


Figura 3.5 Valori di spessore per tipologia di campione di tunica albuginea.

Il tessuto biologico essendo molto sottile e viscido, tenderebbe a scivolare dalle grip metalliche durante le prove. Per questo motivo sono necessari dei supporti in legno per evitare lo scorrimento del tessuto sul metallo delle grip e migliorare l'ancoraggio del provino. Si utilizzano dei sottili pezzi di legno di balsa che vengono attaccati superiormente e inferiormente alle estremità del provino. Il provino, con le estremità fissate alla balsa, viene poi fissato tra le grip, strette mediante le apposite viti, per garantire un fissaggio efficace (Figure 3.6, 3.7).

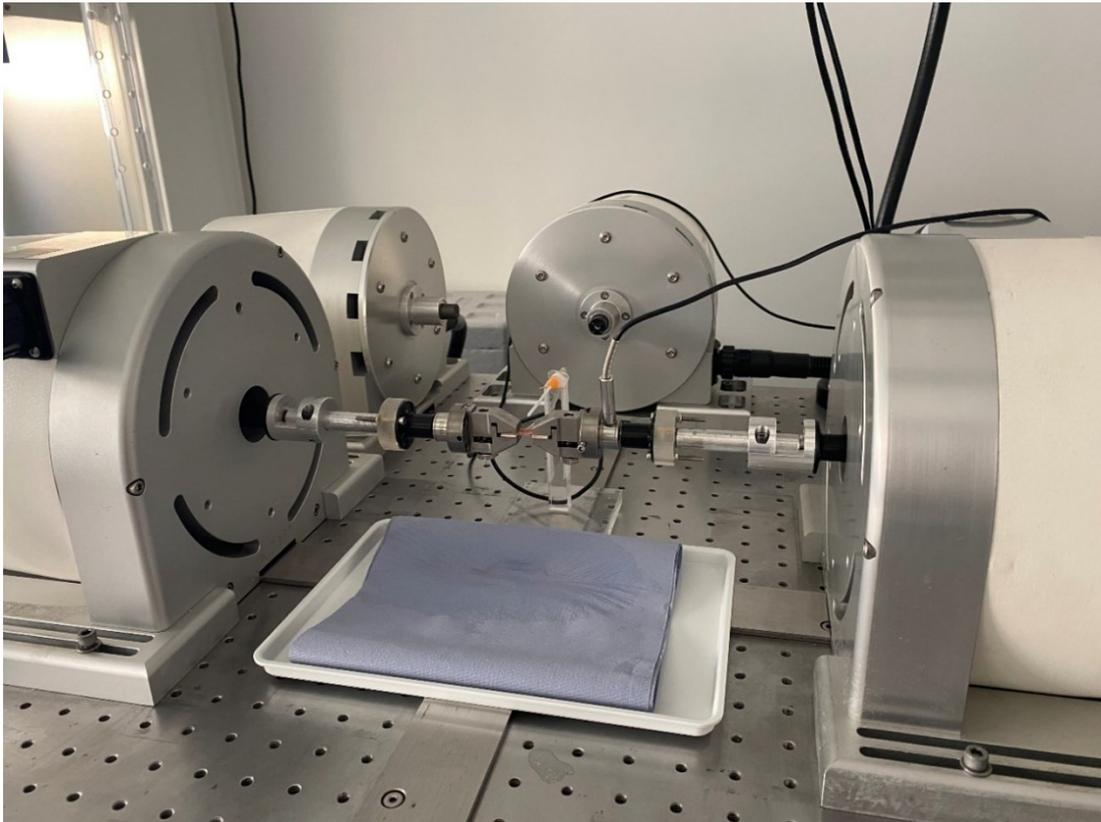


Figura 3.6 Sistema Bose ElectroForce Planar Biaxial TestBench con grip e provino di TA inseriti.

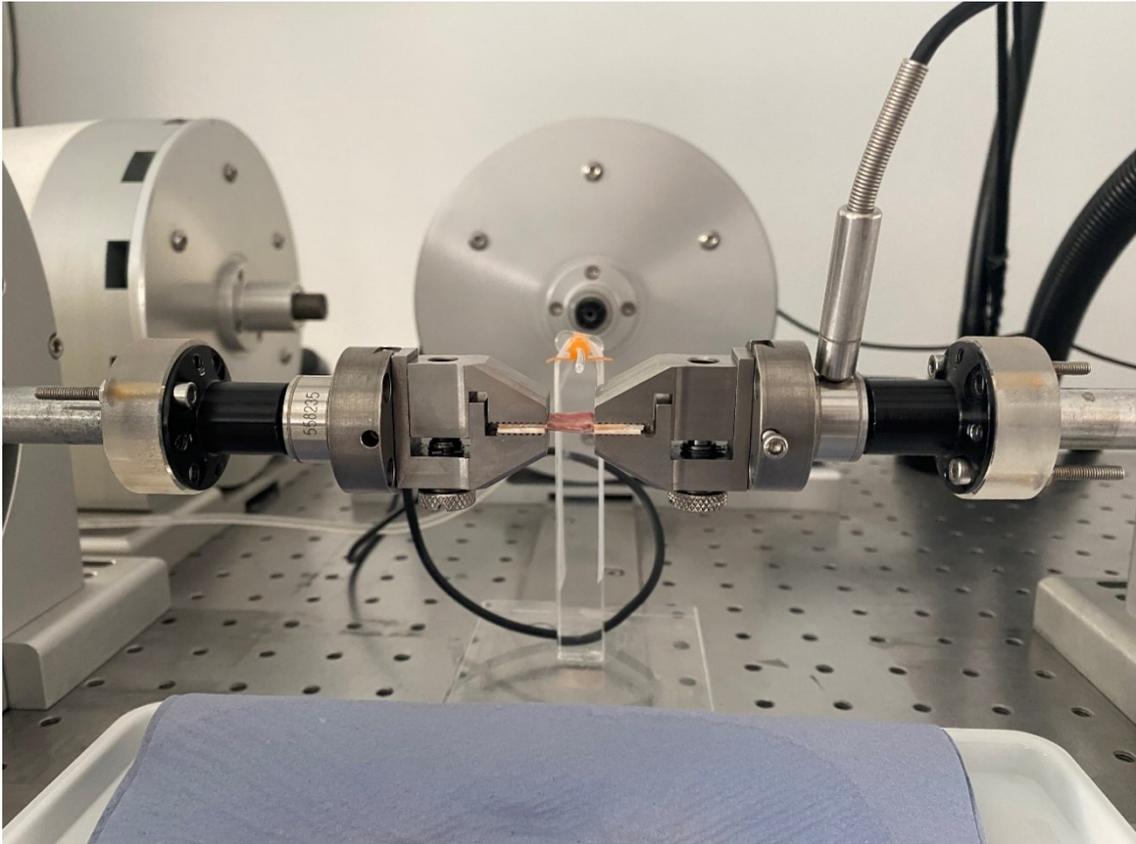


Figura 3.7 Provino di tunica albuginea nativa con idratazione costante.

3.2.4 Prove di trazione

Mediante le prove di trazione vengono determinati il comportamento elastico e la resistenza di un materiale. La risposta dei tessuti biologici molli è di tipo non lineare, si ha una prima regione iniziale a bassa rigidità, seguita da un progressivo aumento del modulo elastico. Nella prima regione si ha bassa rigidità poiché le fibre hanno configurazione ondulata e i legami inter e intra-fibrillari non sono completamente tensionati. La regione lineare è associata alla completa distensione dei legami interfibrillari e allo stiramento delle fibre di collagene. Il modulo elastico viene spesso ricavato considerando la pendenza di questo tratto di curva. Raggiunto il valore di tensione limite si assiste alla rottura dei legami interfibrillari (Figura 3.8) [55].

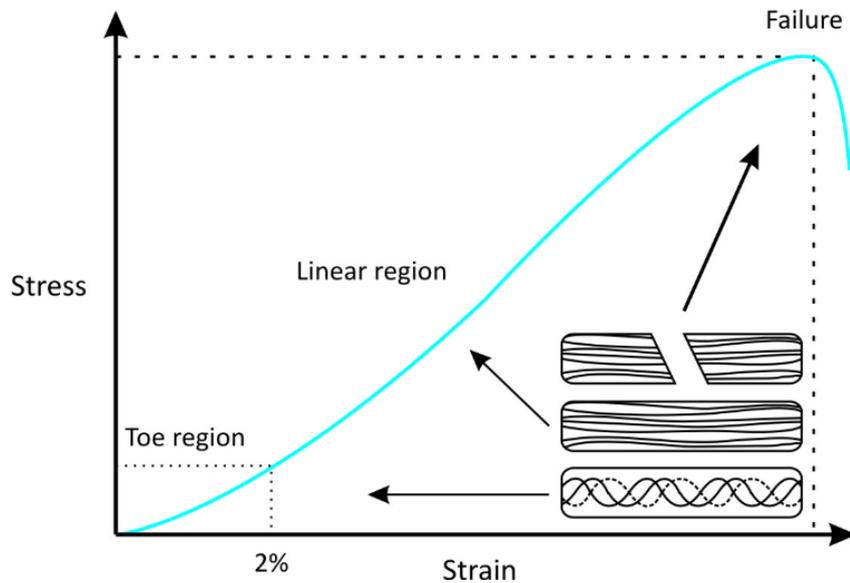


Figura 3.8 Tipica curva sforzo-deformazione di un tessuto biologico molle [55].

In condizioni di carico ciclico, la deformazione acquisita durante la fase di carico viene recuperata completamente durante la fase di scarico.

Durante le prove il sistema acquisisce istante per istante il carico che si sviluppa in seguito all'applicazione dello spostamento. Le prove di trazione mono-assiale sono state eseguite a spostamenti imposti.

Le prove di trazione erano composte da 5 cicli di carico/scarico al 10% di deformazione e in seguito da 5 cicli al 20%, a una velocità dello $0.1\% \text{ s}^{-1}$. Questa parte ciclica era seguita da una trazione fino a rottura, fino a uno spostamento massimo di 6 mm (spostamento massimo del motore, corrispondente ad una deformazione del 60%), anche se generalmente la rottura del tessuto avviene a livelli deformativi inferiori (Figura 3.9).

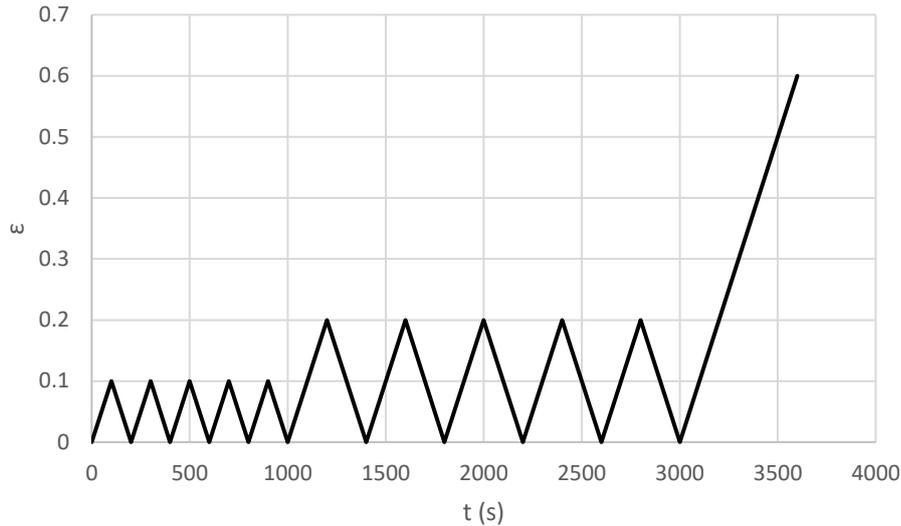


Figura 3.9 Cicli di carico scarico fino a rottura.

3.2.5 Prove di rilassamento delle tensioni

Le prove di rilassamento delle tensioni consentono di valutare il comportamento viscoelastico del campione sottoposto all'applicazione di una deformazione costante nel tempo. Si tende ad applicare la deformazione il più velocemente possibile in modo da poter essere considerata istantanea. Se il materiale è viscoelastico la tensione ha andamento esponenziale decrescente, e con il tempo si stabilizza a un valore asintotico pressoché costante. Questa diminuzione nel tempo è dovuta a fenomeni di ri-arrangiamento microstrutturale che richiedono un certo tempo per svilupparsi. Le prove di rilassamento delle tensioni consentono di osservare la perdita di rigidità del tessuto per sollecitazioni perduranti nel tempo.

Sono state eseguite prove di rilassamento delle tensioni a un livello deformativo del 20%. Inizialmente è stata imposta una trazione pressoché istantanea con una velocità pari al $200\% \text{ s}^{-1}$ fino a un livello di deformazione del 20%, poi mantenuta costante per un tempo di 1800 secondi. Inizialmente si registra un picco di tensione, con il tempo la tensione diminuisce progressivamente.

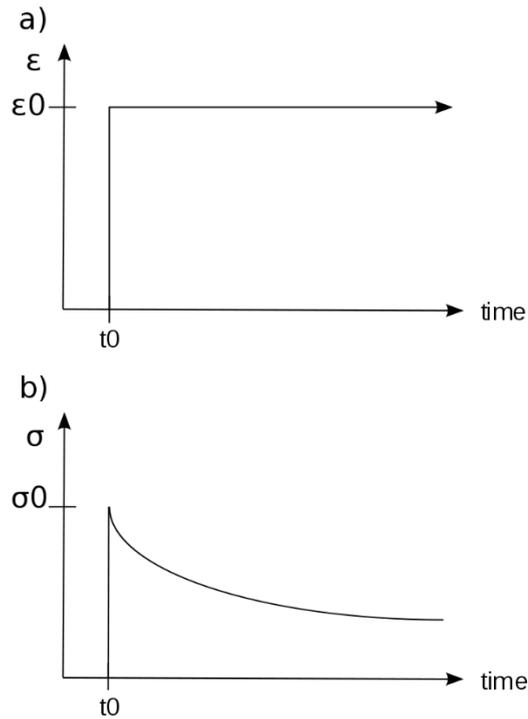


Figura 3.10 Curva di rilassamento delle tensioni. (a) Valore di deformazione imposta e mantenuta costante dall'istante t_0 . (b) Andamento della tensione in funzione del tempo [69].

3.2.6 Analisi dei dati

Il sistema utilizzato in queste prove sperimentali restituisce la misura delle forze, espresse in Newton, che agiscono sul materiale in relazione all'applicazione dello spostamento imposto, con i protocolli di carico precedentemente descritti. Questi dati vengono memorizzati come file di testo e in seguito sono stati analizzati con Microsoft Excel. Noti i valori delle forze e le sezioni dei provini, si possono ricavare i valori delle deformazioni, delle tensioni nominali generate e delle tensioni normalizzate.

Nella tabella 3.3 sono riportati i simboli e le unità di misura delle grandezze meccaniche di interesse.

Grandezza	Simbolo	Unità di misura	Formula
Forza	F	[N]	
Spostamento	d	[mm]	
Larghezza	w	[mm]	
Lunghezza iniziale	L ₀	[mm]	
Spessore	t	[mm]	
Area sezione trasversale	A	[mm ²]	A = t · w
Deformazione	ε	[]	$\varepsilon = \frac{d}{L_0}$
Forza iniziale	F ₀	[N]	
Tensione nominale	σ _{nominale}	[MPa] = [N/mm ²]	$\sigma_{nominale} = \frac{F-F_0}{A}$
Forza massima	F _{max}	[N]	
Tensione normalizzata	σ _{norm}	[]	$\sigma_{norm} = \frac{F}{F_{max}}$
Modulo secante	E	[MPa] = [N/mm ²]	$E = \frac{\sigma_{nominale}}{\varepsilon}$

Tabella 3.3 Grandezze fisiche di interesse.

Nelle prove a trazione è possibile ottenere per ogni campione la curva sforzo-deformazione. Per fare questo è necessario convertire la forza agente istante per istante sulla sezione, in tensione (σ) e lo spostamento in deformazione (ϵ). Dalle curve sforzo-deformazione è possibile ricavare alcune grandezze come la resistenza meccanica a rottura, corrispondente al valore massimo della tensione nominale (Figura 3.11), e il modulo secante, uguale al rapporto tra la tensione nominale e il corrispondente livello deformativo. Queste grandezze sono importanti per caratterizzare il comportamento meccanico del tessuto.

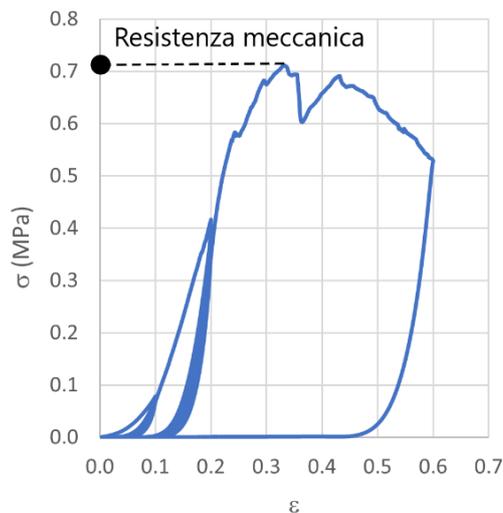


Figura 3.11 Resistenza meccanica in una curva sforzo-deformazione.

In ogni prova è stato analizzato il comportamento meccanico dell'ultimo ciclo di trazione alla deformazione massima del 20%, infatti, durante le prove cicliche il comportamento meccanico più stabile è quello dell'ultimo ciclo.

Nelle prove di rilassamento delle tensioni sono state ricavate le curve di rilassamento al 20% di deformazione, una per ogni prova. Per ottenere una curva media per ogni tipologia di campione (nativo, decellularizzato, longitudinale, trasversale), è stato usato il software Scilab. Questo software è un linguaggio di programmazione ad alto livello, che consente di calcolare i parametri di rigidità relativa e tempo di rilassamento dalla serie di Prony per ogni curva di rilassamento.

$$\sigma(t) = 1 - \sum_{i=1}^5 \gamma_i \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_i}}\right) \quad (1)$$

con $n=5$ numero di rami viscosi.

Per calcolare i valori di tensione dall'equazione (1) è stato scelto come tempo di campionamento un intervallo di tempo da 0 fino a 1800 secondi, più ravvicinato per i primi secondi e dilatato gradualmente fino arrivare a 1800 secondi.

3.2.7 Analisi statistica

Per fare un'analisi statistica dei dati ottenuti è stato utilizzato il test non parametrico di Kruskal-Wallis, confrontando i valori di tensione massima, di deformazione a rottura, dei moduli secanti e di tensione normalizzata a fine rilassamento.

Il test di Kruskal-Wallis è detto anche analisi non parametrica della varianza per un criterio di classificazione e è un test che si basa sui ranghi. È l'equivalente non parametrico dell'analisi della varianza ad un criterio di classificazione (ANOVA a una via). È utile utilizzare questo tipo di test quando si utilizzano misure rilevate con una scala continua; quindi, quando tutti i dati possono essere disposti in ranghi con un numero nullo o molto ridotto di valori uguali. A differenza dell'ANOVA, in cui vengono confrontate le medie, questo test verifica se i diversi campioni sono equidistribuiti e quindi appartengono alla stessa popolazione. Se il test di Kruskal-Wallis è significativo, si procede con l'analisi post hoc per capire quali gruppi sono significativamente diversi [56].

CAPITOLO 4

RISULTATI

4.1 Prove di trazione

Sono state realizzate un totale di 21 prove sperimentali di trazione monoassiale, da cui sono state ricavate le curve sforzo-deformazione, una per ogni provino di tunica albuginea. Dalle curve sforzo-deformazione è stato analizzato il comportamento meccanico dell'ultimo ciclo di trazione fino a un basso livello deformativo (10%). È stato calcolato il modulo secante per ogni provino, per avere una misura della rigidità del materiale. In seguito, è stato analizzato il comportamento meccanico a rottura dei campioni.

4.1.1 Tunica albuginea nativa

Sono state eseguite sei prove sperimentali con i campioni di tunica albuginea nativa circonferenziali (figura 4.1), di queste prove è stata trovata la media e l'errore standard visibili in figura 4.2.

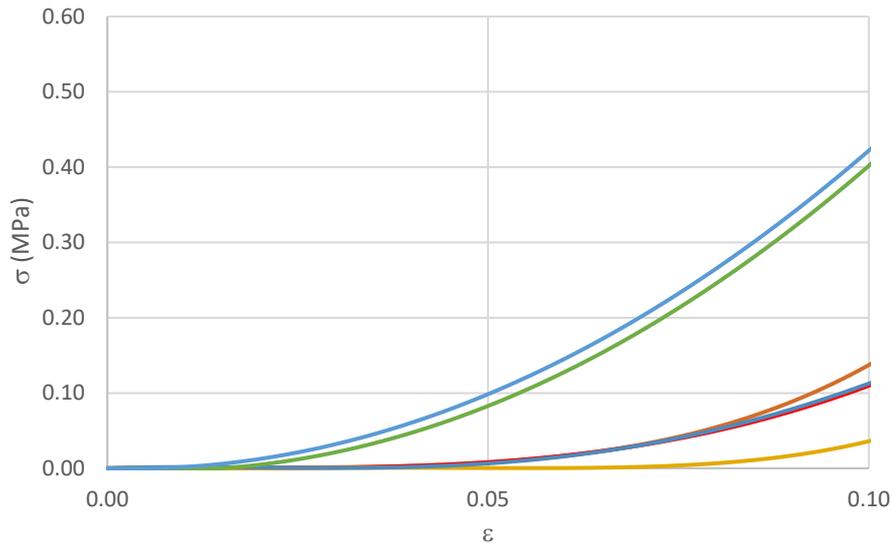


Figura 4.1 Curve sperimentali sforzo-deformazione dei campioni circonferenziali di tunica albuginea nativa

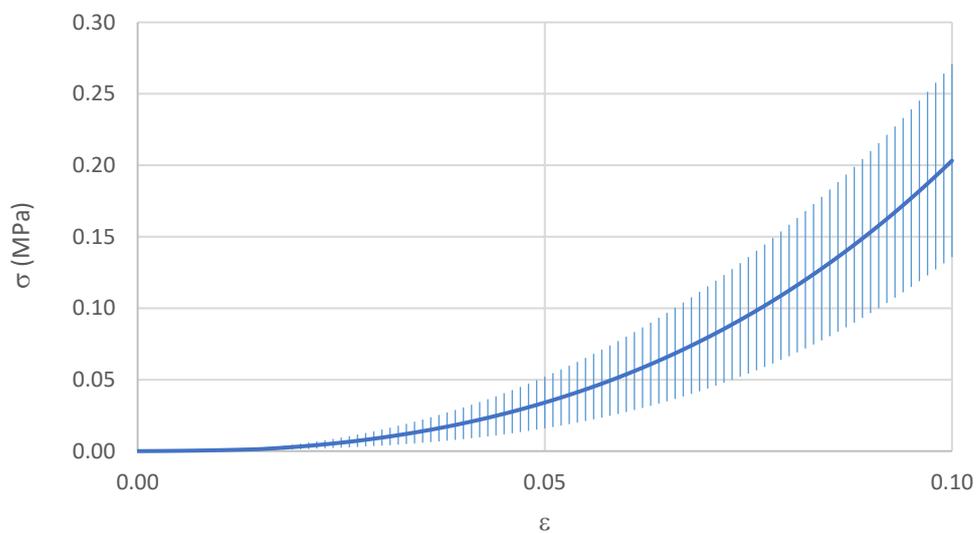


Figura 4.2 Media delle curve di sforzo-deformazione con relativo errore standard per i campioni circonferenziali di tunica albuginea nativa

Sono state eseguite sei prove sperimentali con i campioni di tunica albuginea nativa longitudinali (figura 4.3), di queste prove è stata trovata la media e l'errore standard visibili in figura 4.4.

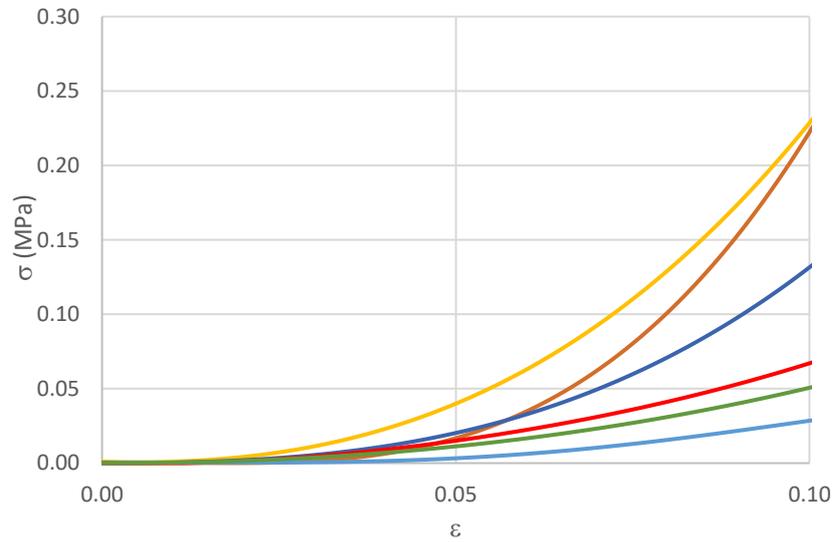


Figura 4.3 Curve sperimentali sforzo-deformazione dei campioni longitudinali di tunica albuginea nativa

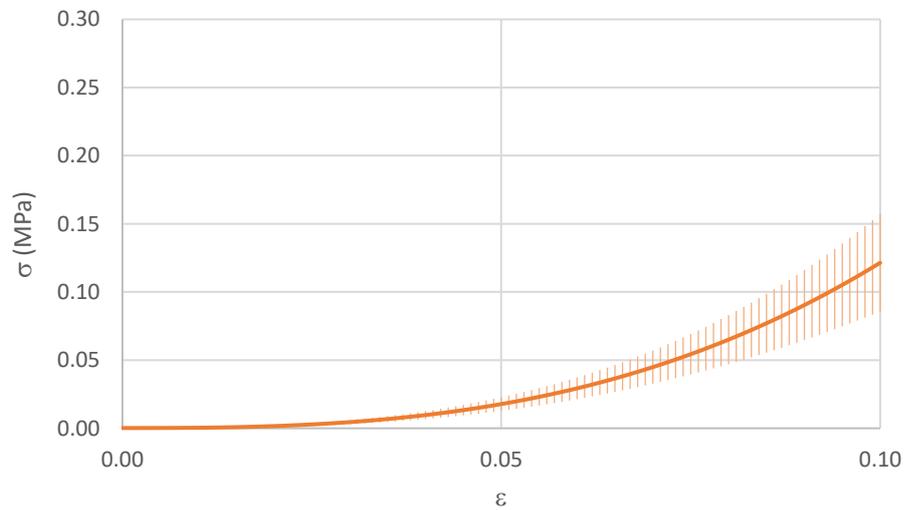


Figura 4.4 Media delle curve sforzo-deformazione con relativo errore standard per i campioni longitudinali di tunica albuginea nativa

Dalle curve sperimentali ottenute si vede inizialmente una rigidità molto bassa e poi un incremento di rigidità all'aumentare del livello deformativo. In generale i dati sperimentali ottenuti confermano la grande variabilità intra e interindividuale, caratteristica dei tessuti biologici.

Nella figura sottostante sono state comparate le medie delle curve di trazione con il relativo errore standard per i provini tangenziali e longitudinali. La pendenza dei campioni circolarziali risulta maggiore rispetto a quella dei longitudinali, questo significa che la direzione trasversale delle fibre sembra presentare una maggiore rigidità. Da un'analisi qualitativa sembra esserci differenza tra le due direzioni di prova, anche se la variabilità è elevata.

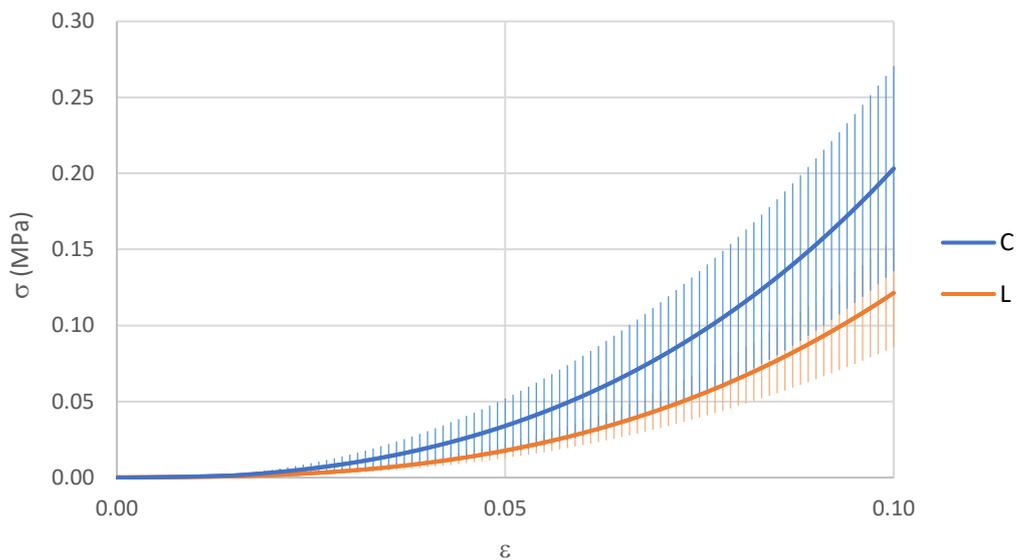


Figura 4.5 Medie delle curve sforzo-deformazione con relativo errore standard per i campioni circolarziali (blu) e longitudinali (arancione) di tunica albuginea nativa

4.1.2 Tunica albuginea decellularizzata

Sono state eseguite cinque prove sperimentali con i campioni di tunica albuginea decellularizzata circonferenziali (figura 4.6), di queste prove è stata trovata la media e l'errore standard visibili in figura 4.7.

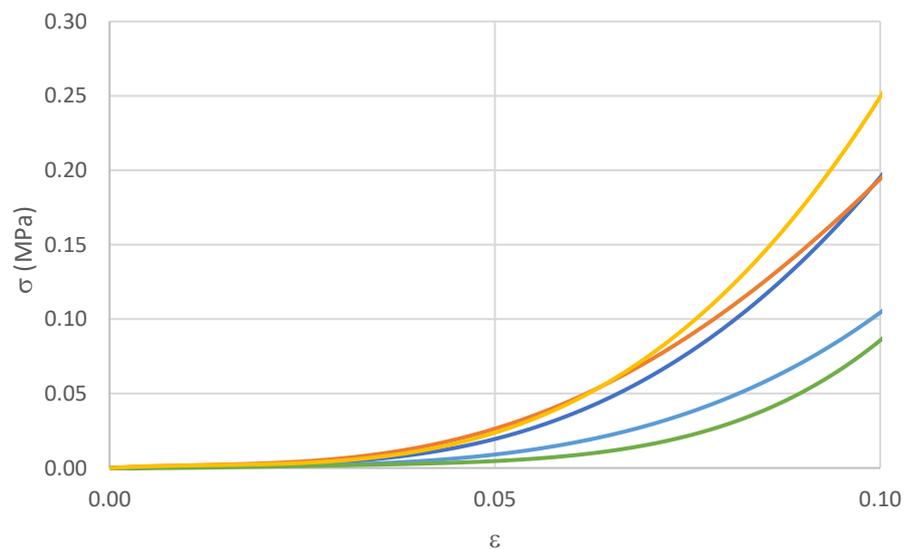


Figura 4.6 Curve sperimentali sforzo-deformazione dei campioni circonferenziali di tunica albuginea decellularizzata

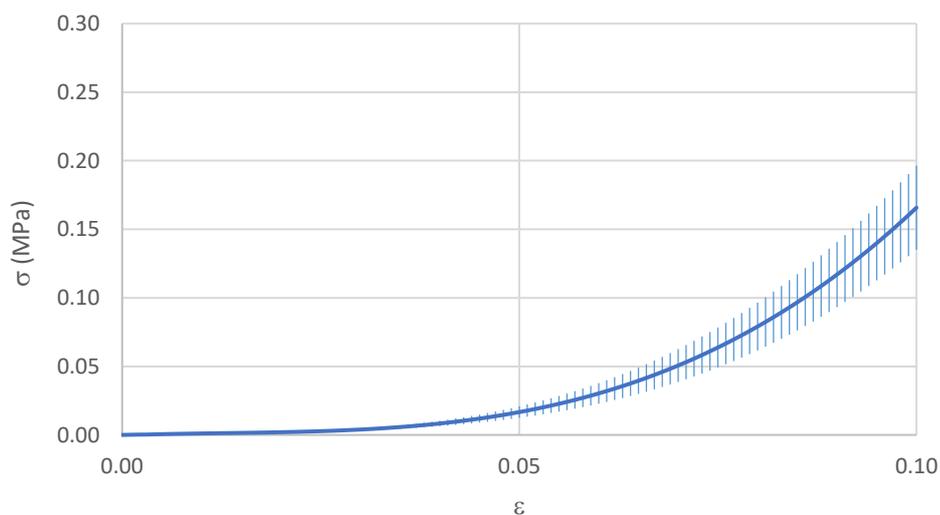


Figura 4.7 Media delle curve sforzo-deformazione con relativo errore standard per i campioni circonferenziali di tunica albuginea nativa.

Sono state eseguite quattro prove sperimentali con i campioni di tunica albuginea decellularizzata longitudinali (figura 4.8), di queste prove è stata trovata la media e l'errore standard visibili in figura 4.9.

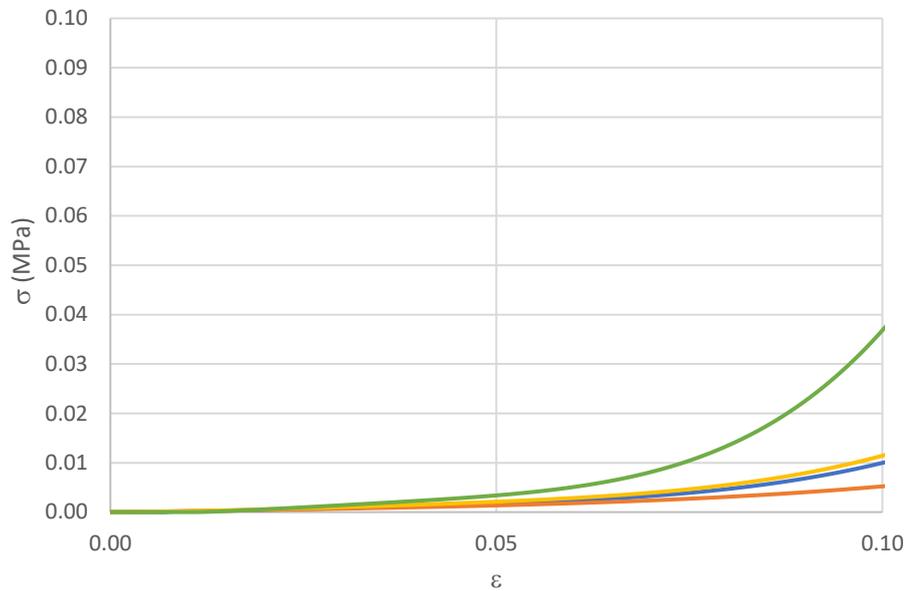


Figura 4.8 curve sperimentali sforzo-deformazione dei campioni longitudinali di tunica albuginea decellularizzata.

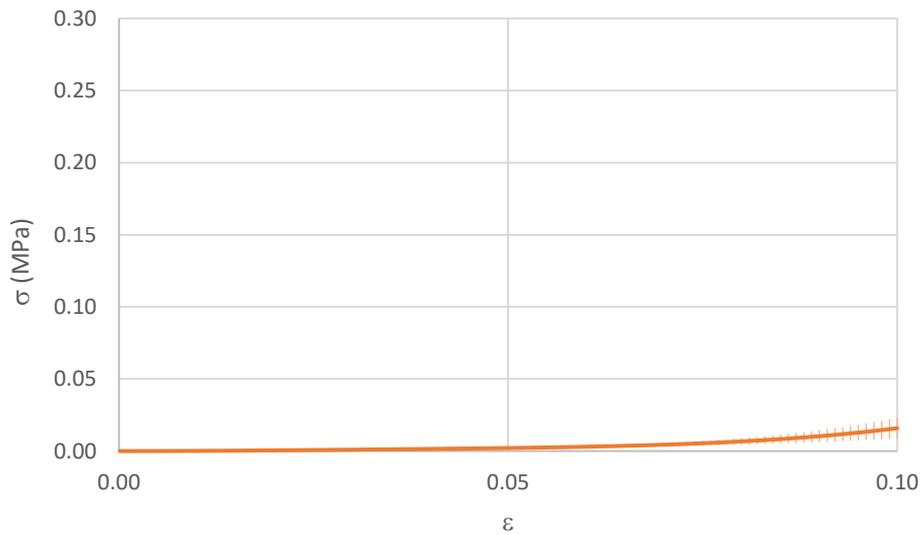


Figura 4.9 Media delle curve sforzo-deformazione con relativo errore standard per i campioni longitudinali di tunica albuginea decellularizzata.

Nella figura sottostante sono state comparate le medie delle curve di trazione con il relativo errore standard per i provini tangenziali e longitudinali. La pendenza dei campioni circolferenziali risulta visibilmente maggiore rispetto a quella dei longitudinali, questo sembra suggerire che la direzione trasversale delle fibre presenti una maggiore rigidezza.

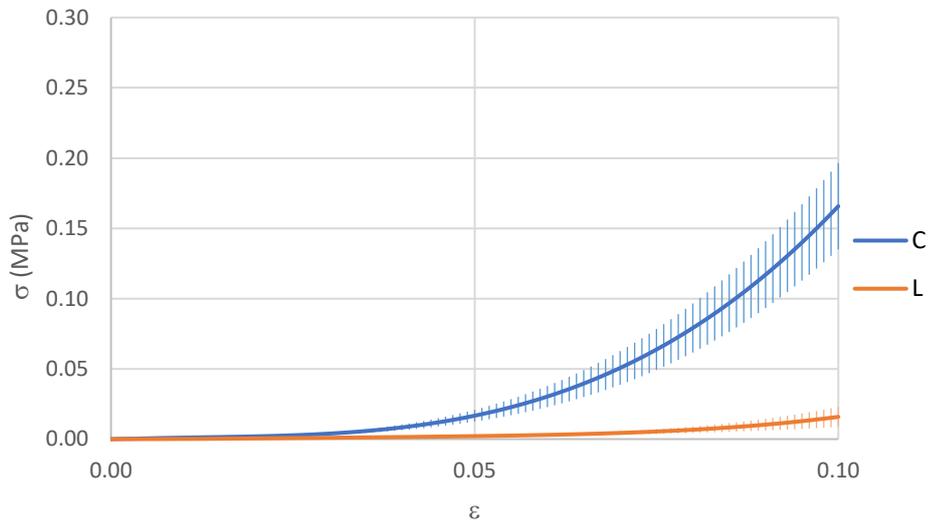


Figura 4.10 Medie delle curve sforzo-deformazione con relativo errore standard per i campioni circolferenziali (blu) e longitudinali (arancione) di tunica albuginea decellularizzata.

4.1.3 Confronto

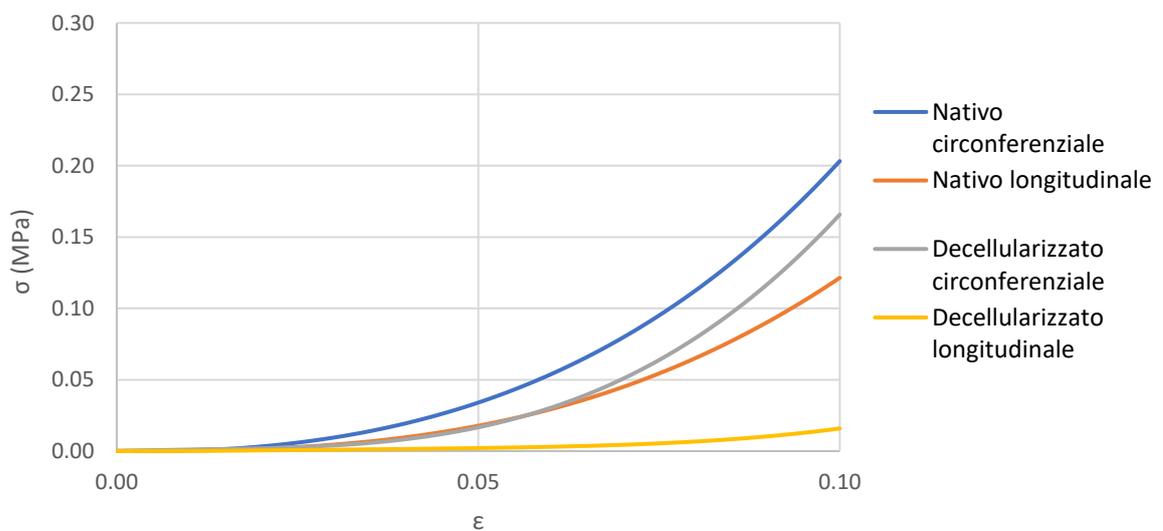


Figura 4.11 Medie delle curve sforzo-deformazione dei campioni circolferenziali e longitudinali di tunica albuginea nativa e decellularizzata.

Dal confronto con le medie delle curve di trazione emerge una maggiore rigidità per quanto riguarda la direzione trasversale, inoltre, si osserva che gli andamenti delle curve sono estremamente variabili tra le diverse tipologie di campioni di tessuto.

Per avere una misura della rigidità è stato calcolato il modulo secante al 10% di deformazione, per ogni provino. Il modulo secante è stato calcolato come il rapporto tra la tensione nominale e il corrispondente livello deformativo.

	Modulo secante (MPa)			
	NATIVA		DECELL	
	C	L	C	L
1	1.37	2.22	1.95	0.10
2	1.10	2.28	1.94	0.05
3	0.36	1.31	1.04	0.11
4	1.12	0.67	0.86	0.37
5	4.02	0.28	2.49	
6	4.22	0.51		
media	2.03	1.21	1.66	0.16
SD	1.65	0.88	0.69	0.14

Tabella 4.1 Modulo secante dei campioni di tunica albuginea nativa e decellularizzata
C=circonfrenziale, L=longitudinale.

La figura sottostante riassume la comparazione tra tipologie di campioni, mostrando la media e la deviazione standard. Sia per il tessuto nativo che per quello decellularizzato, si osservano valori di modulo secante generalmente maggiori nella direzione circonferenziale, rispetto a quella longitudinale. L'analisi di varianza tra i valori dei moduli secanti nei quattro gruppi ha mostrato una differenza significativa ($p - \text{value} = 0.030$) e, in particolare, un confronto post-hoc ha permesso di evidenziare una differenza significativa di modulo secante tra i campioni di tessuto nativo in direzione circonferenziale e quelli di tessuto decellularizzato in direzione longitudinale ($p - \text{value} = 0.034$) e tra i campioni di tessuto decellularizzato in direzione circonferenziale e longitudinale ($p - \text{value} = 0.047$). Mentre il primo confronto non fornisce informazioni particolarmente rilevanti, quest'ultimo confronto permette di ipotizzare un'anisotropia del tessuto della tunica albuginea particolarmente accentuato in seguito al trattamento di decellularizzazione. Per valutare se la stessa anisotropia sia presente nel tessuto nativo o sia un effetto indotto dal trattamento, sarà necessaria un'estensione delle prove sperimentali ad un maggior numero di provini.

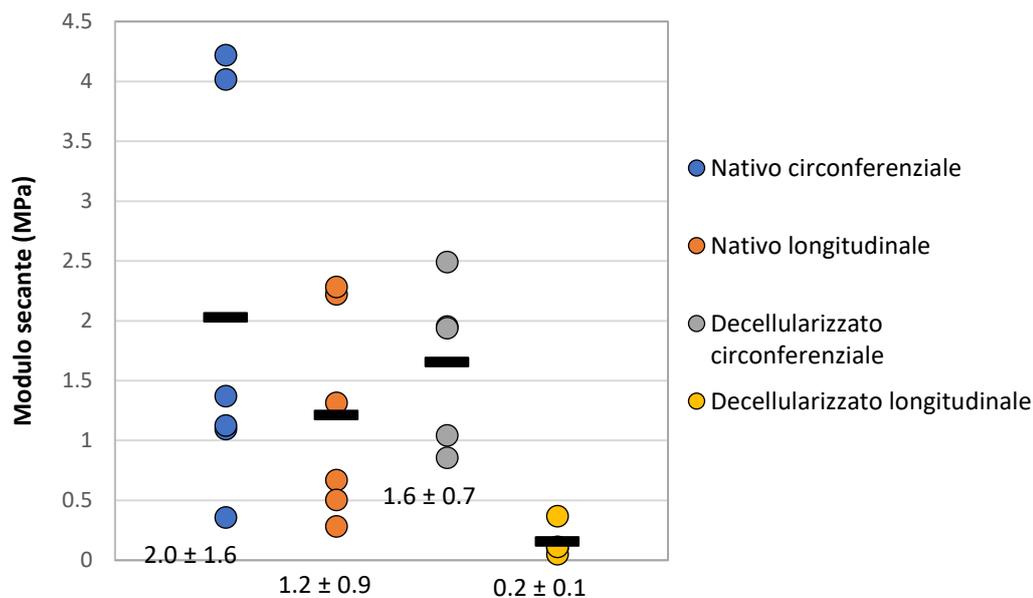


Figura 4.12 Valori del modulo secante per tipologia di campione di tunica albuginea.

È stato, inoltre, analizzato il comportamento del tessuto durante l'ultimo ciclo di trazione per ogni provino. In particolare, è stato estratto il valore della tensione nominale massima, corrispondente alla resistenza meccanica del provino e il corrispondente livello deformativo (deformazione a rottura). Nella tabella 4.2 vengono riportati i valori di tensione nominale massima in MPa e di deformazione per tutti i provini testati nelle prove di trazione.

	NATIVA				DECELL			
	C		L		C		L	
	σ_{nominale}	ϵ	σ_{nominale}	ϵ	σ_{nominale}	ϵ	σ_{nominale}	ϵ
1	0.71	0.33	1.26	0.48	0.38	0.36	0.18	0.6
2	0.41	0.43	0.21	0.23	0.75	0.35	0.59	0.57
3	0.39	0.54	0.5	0.52	0.53	0.54	0.69	0.6
4	0.23	0.36	0.66	0.57	1.63	0.53	0.47	0.53
5	0.5	0.58	0.37	0.51	1.27	0.45		
6	0.55	0.53	0.29	0.6				
media	0.46	0.46	0.55	0.48	0.91	0.45	0.49	0.58
SD	0.16	0.10	0.39	0.13	0.52	0.09	0.22	0.03

Tabella 4.2 Tensioni nominali massime (MPa) e corrispondenti deformazioni a rottura della tunica albuginea nativa e decellularizzata. C=circonfrenziale, L=longitudinale.

La tensione massima per la tunica albuginea nativa varia in un intervallo tra 0.23 e 1.26 MPa. Questi valori sono dello stesso ordine di grandezza dei valori di tensione massima misurati nello studio di Bitsch et al. [15], che misuravano delle tensioni a rottura tra 0.01 e 0.1 MPa. Il set up sperimentale di questo studio era leggermente diverso, ma la sollecitazione applicata era sempre di tipo monoassiale.

Le figure sottostanti riassumono la comparazione tra tipologie di campioni, mostrando la media e la deviazione standard per la resistenza meccanica e la deformazione a rottura.

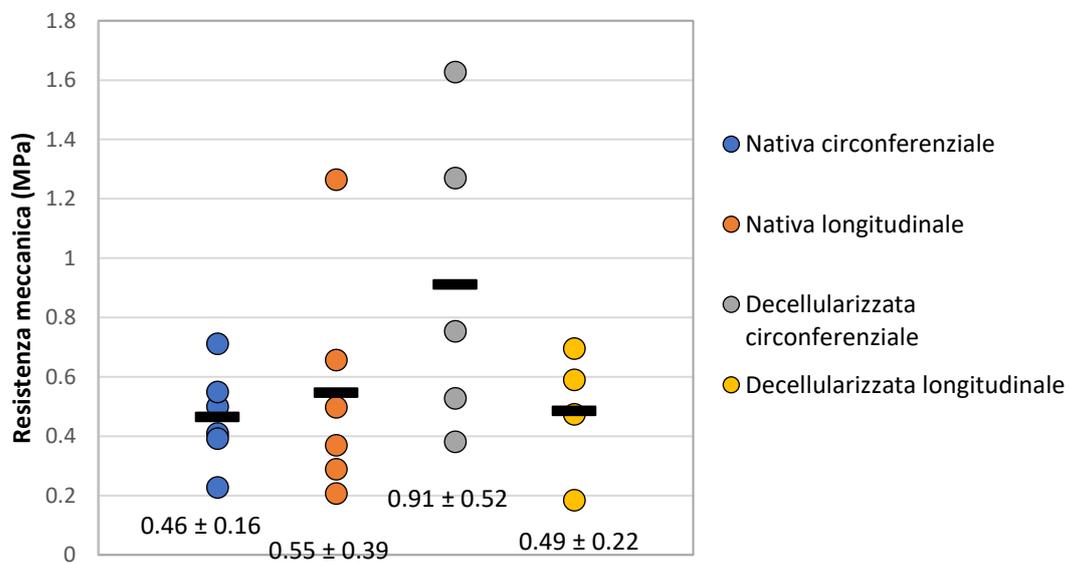


Figura 4.13 Valori della resistenza meccanica per tipologia di campione di tunica albuginea.

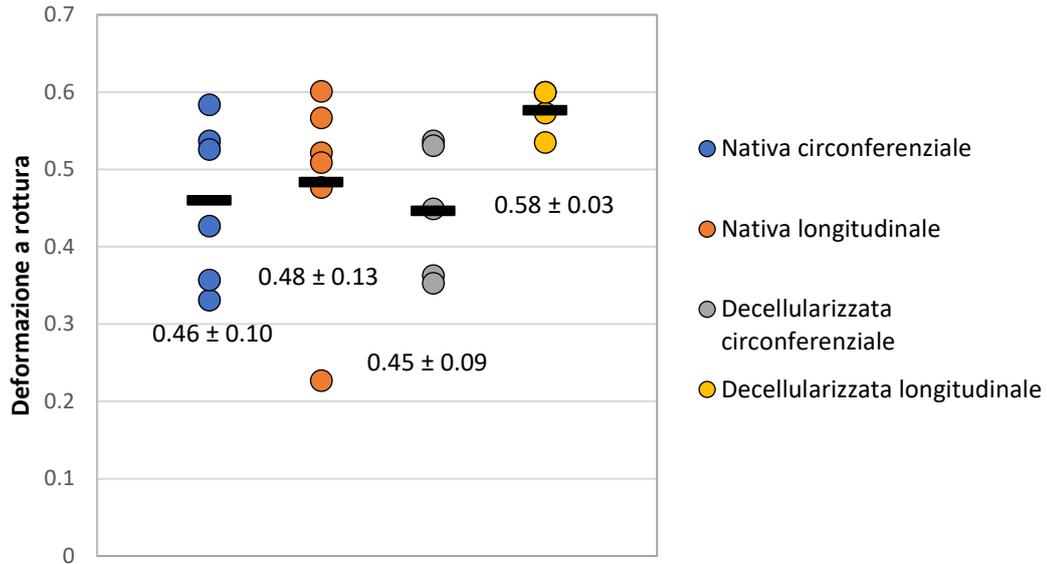


Figura 4.14 Valori della deformazione a rottura per tipologia di campione di tunica albuginea.

Dalla figura 4.13 si vede che i livelli di tensione a rottura sono estremamente variabili tra un provino e un altro, come è normale per un tessuto biologico. Inoltre, le prove sono state realizzate in giorni diversi e perciò alcuni campioni di tessuto hanno subito un maggior numero di cicli di congelamento e scongelamento. I valori medi di resistenza meccanica risultano compresi tra 0.4 e 1 MPa. I campioni circolari di tessuto decellularizzato hanno raggiunto i valori più alti di tensione. Nella figura 4.14 è possibile osservare che i livelli medi di deformazione a rottura si trovano tra il 40% e 60%.

L'analisi statistica non ha permesso di evidenziare alcuna differenza significativa né tra i valori di resistenza meccanica (p – value = 0.342), né tra quelli di deformazione a rottura dei diversi gruppi (p – value = 0.150).

4.2 Prove di rilassamento delle tensioni

Sono state realizzate un totale di 24 prove sperimentali di rilassamento delle tensioni fino a un livello deformativo del 20%, una per ogni provino di tunica albuginea. Da ogni test è stata ottenuta la curva di rilassamento delle tensioni, che rappresenta l'andamento della tensione normalizzata in funzione del tempo. Per la rappresentazione delle curve sperimentali di rilassamento si è scelto di raggruppare in uno stesso grafico i campioni testati nella stessa direzione di prova e per tipologia di trattamento.

4.2.1 Tunica albuginea nativa

Sono state eseguite sette prove sperimentali con i campioni di tunica albuginea nativa circonferenziali (Figura 4.15), di queste prove è stata trovata la media e l'errore standard visibili in Figura 4.16.

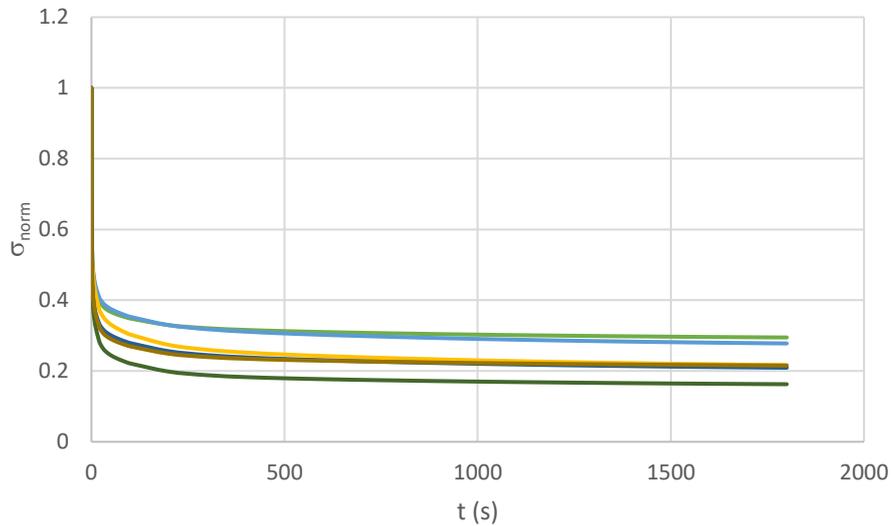


Figura 4.15 curve sperimentali di rilassamento delle tensioni dei campioni circonferenziali di tunica albuginea nativa.

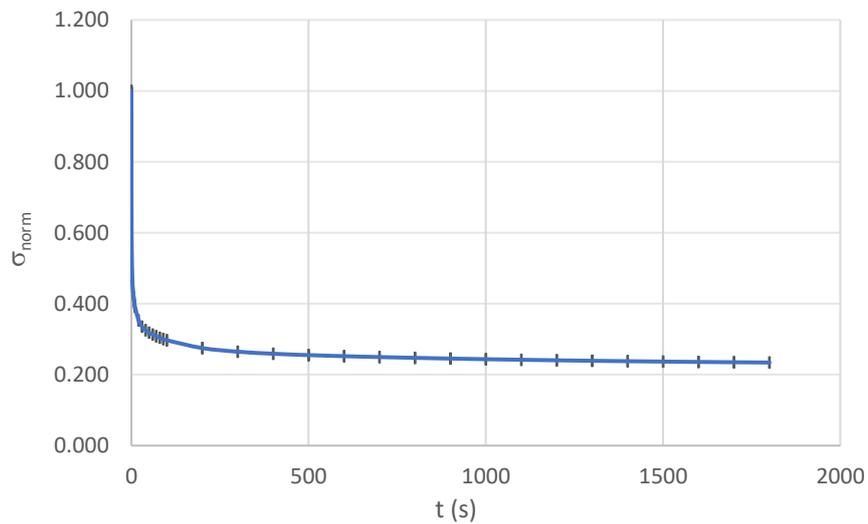


Figura 4.16 Media delle curve di rilassamento delle tensioni con errore standard dei campioni circonferenziali di tunica albuginea nativa.

Sono state eseguite sette prove sperimentali con i campioni di tunica albuginea nativa longitudinali (Figura 4.17), di queste prove è stata trovata la media e l'errore standard visibili in Figura 4.18.

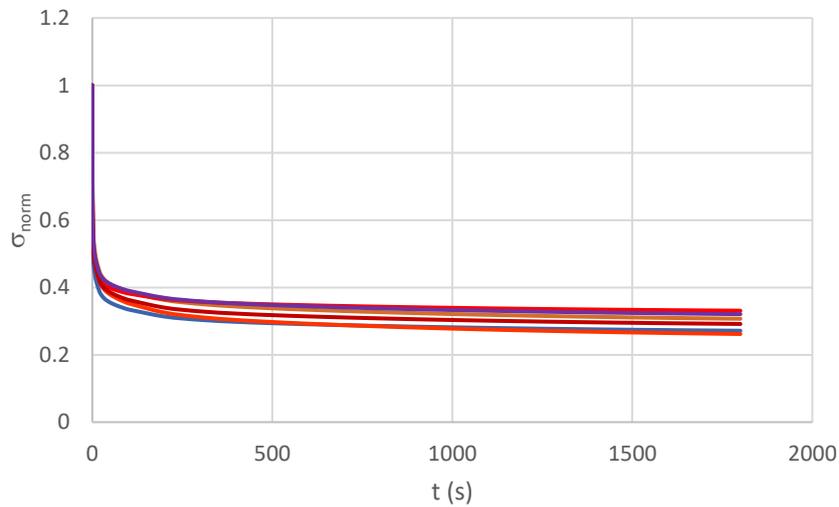


Figura 4.17 Curve sperimentali di rilassamento delle tensioni dei campioni longitudinali di tunica albuginea nativa.

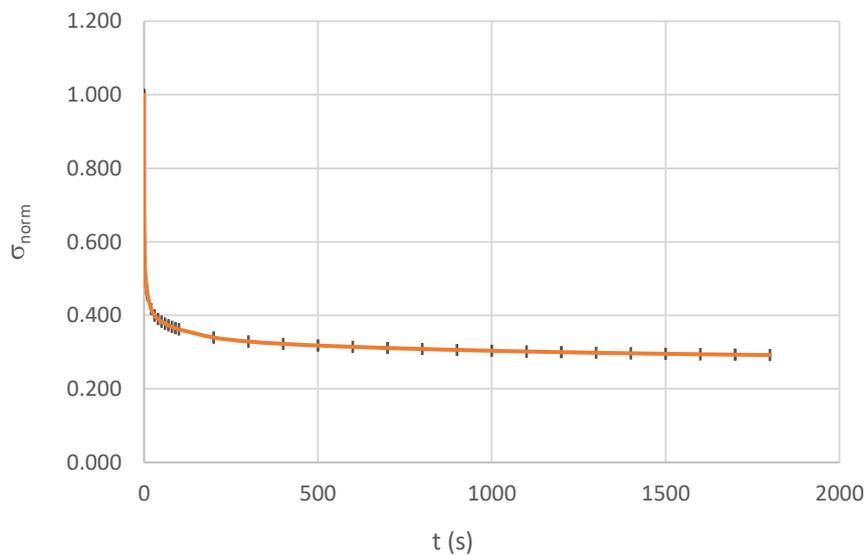


Figura 4.18 Media delle curve di rilassamento delle tensioni con errore standard dei campioni longitudinali di tunica albuginea nativa.

Nella figura sottostante sono state comparate le medie delle curve di rilassamento delle tensioni per i provini tangenziali e longitudinali. A livello qualitativo si può osservare che i campioni longitudinali rilassano meno rispetto a quelli circolari.

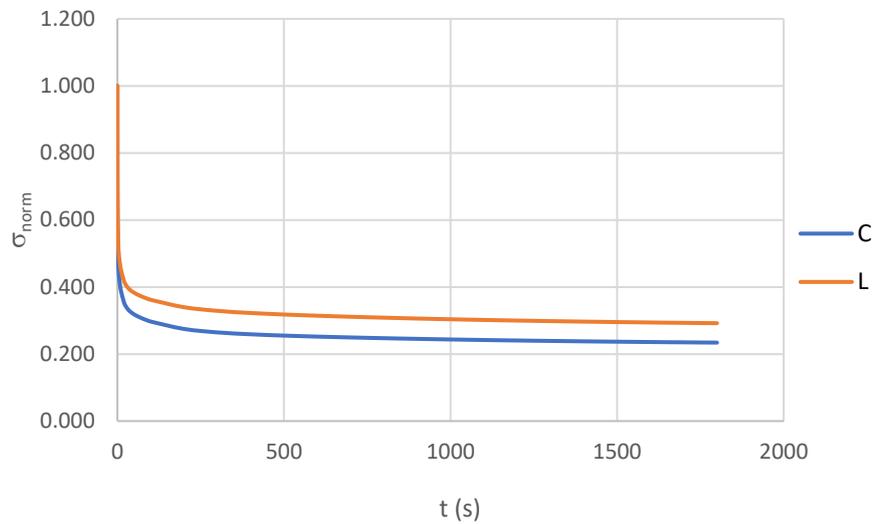


Figura 4.19 Medie delle curve di rilassamento delle tensioni con errore standard dei campioni circolari (blu) e longitudinali (arancione) di tunica albuginea nativa. Per quanto riguarda le barre di errore si faccia riferimento alle figure precedenti.

4.2.2 Tunica albuginea decellularizzata

Sono state eseguite cinque prove sperimentali con i campioni di tunica albuginea decellularizzata circonferenziali (Figura 4.20), di queste prove è stata trovata la media e l'errore standard visibili in Figura 4.21.

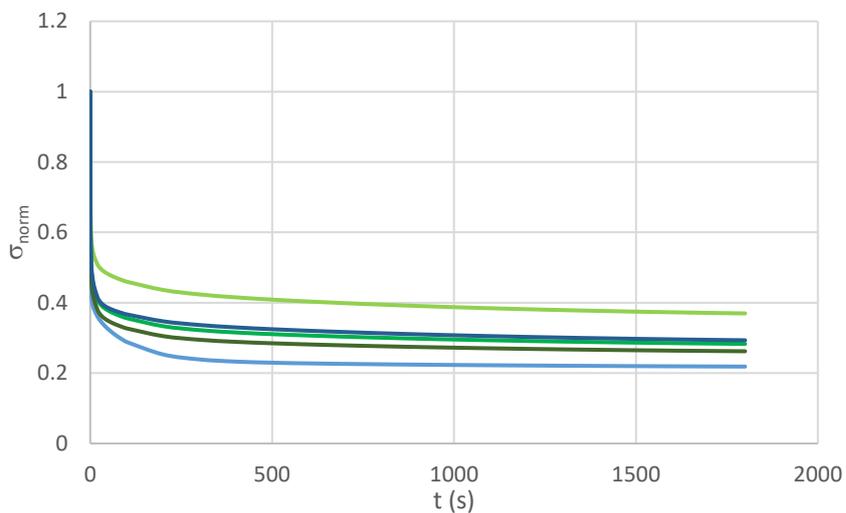


Figura 4.20 Curve sperimentali di rilassamento delle tensioni dei provini circonferenziali di tunica albuginea decellularizzata.

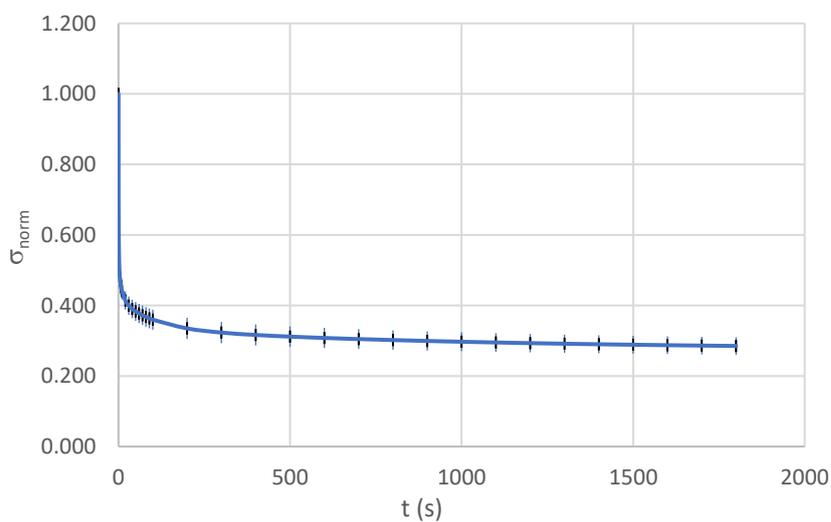


Figura 4.21 Media delle curve di rilassamento delle tensioni con errore standard dei campioni circonferenziali di tunica albuginea decellularizzata.

Sono state eseguite cinque prove sperimentali con i campioni di tunica albuginea decellularizzata longitudinali (Figura 4.22), di queste prove è stata trovata la media e l'errore standard visibili in Figura 4.23.

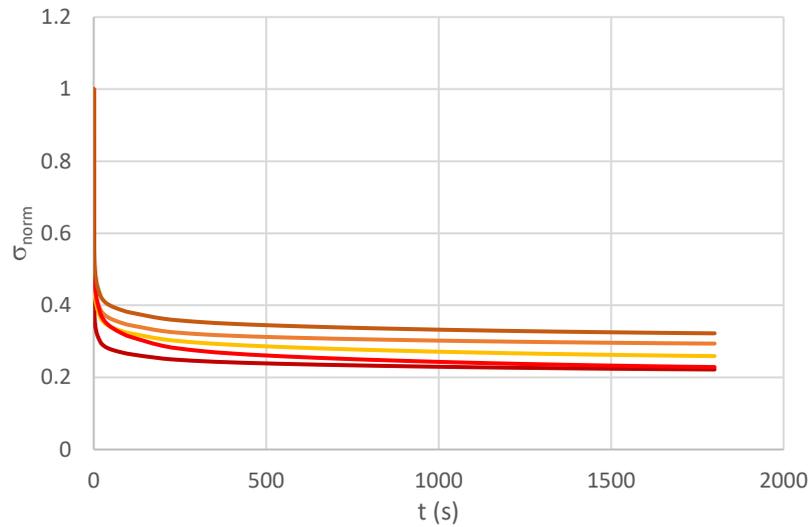


Figura 4.22 Curve sperimentali di rilassamento delle tensioni dei provini longitudinali di tunica albuginea decellularizzata.

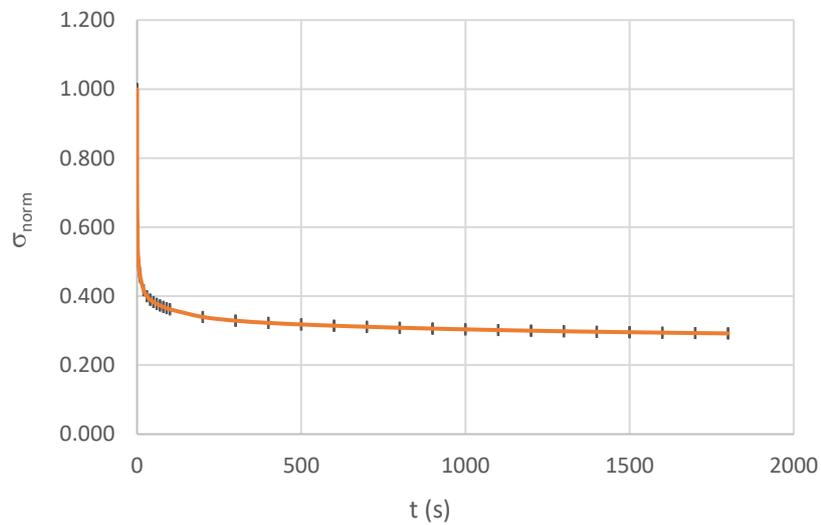


Figura 4.23 Media delle curve di rilassamento delle tensioni con errore standard dei campioni longitudinali di tunica albuginea decellularizzata.

Nella figura sottostante sono state comparate le medie delle curve di rilassamento delle tensioni per i provini tangenziali e longitudinali. A livello qualitativo si può osservare che i campioni circolferenziali mostrano un comportamento quasi identico rispetto a quelli longitudinali.

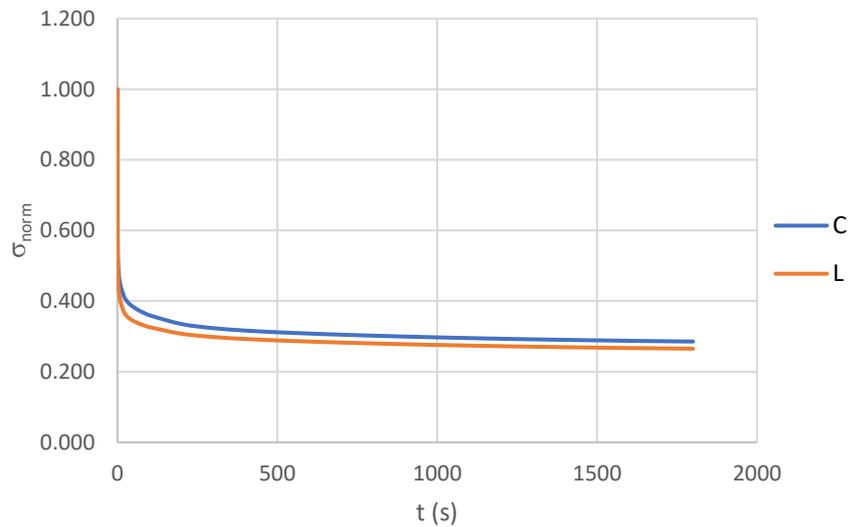


Figura 4.24 Medie delle curve di rilassamento delle tensioni con errore standard dei campioni circolferenziali (blu) e longitudinali (arancione) di tunica albuginea decellularizzata. Per quanto riguarda le barre di errore si faccia riferimento alle figure precedenti.

4.2.3 Confronto

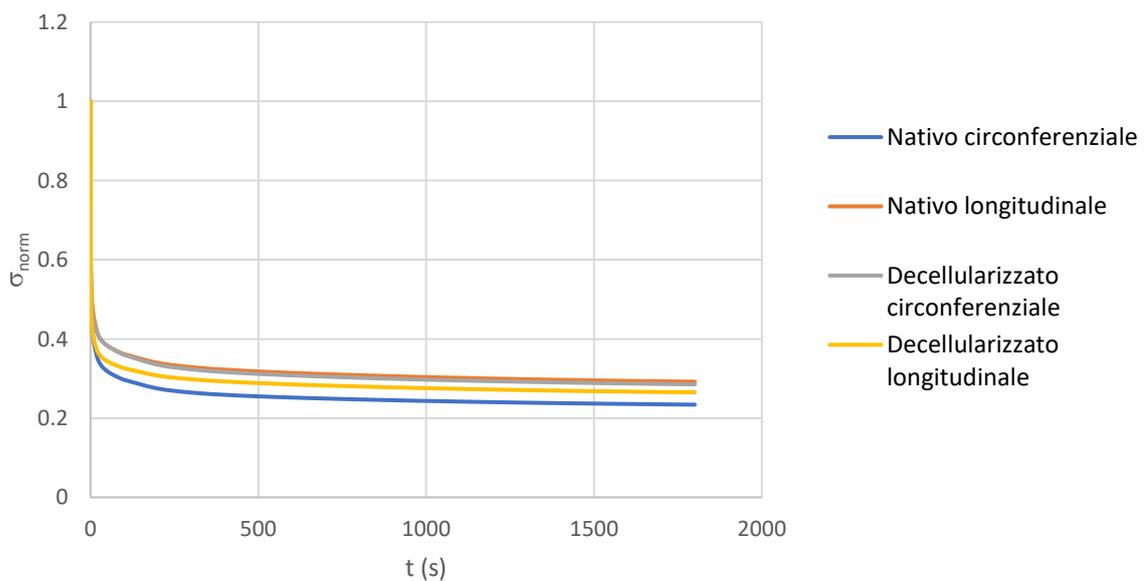


Figura 4.25 Medie delle curve di rilassamento delle tensioni con errore standard dei campioni circolferenziali e longitudinali di tunica albuginea nativa e decellularizzata.

Dal confronto con le medie delle curve di rilassamento (Figura 4.25) emerge un comportamento molto simile delle curve, che risultano quasi sovrapposte. Non sembra che i processi di rilassamento delle tensioni siano fortemente diversi in una direzione di prova o nell'altra, né tra tessuto nativo o decellularizzato.

Sono stati individuati i valori di tensione normalizzata in MPa a fine rilassamento, ($t = 1800$ secondi), per ogni provino testato nelle prove di rilassamento delle tensioni. I valori estratti sono riportati in tabella 4.3.

	σ_{norm}			
	NATIVA		DECELL	
	C	L	C	L
1	0.29	0.31	0.36	0.23
2	0.28	0.27	0.21	0.29
3	0.22	0.26	0.28	0.26
4	0.16	0.33	0.26	0.23
5	0.21	0.29	0.29	0.32
6	0.22	0.32		
7	0.26	0.26		
media	0.24	0.29	0.28	0.26
SD	0.04	0.03	0.06	0.04

Tabella 4.3 Tensioni normalizzate al tempo 1800 secondi della tunica albuginea nativa e decellularizzata. C=circonfrenziale, L=longitudinale.

La figura sottostante riassume la comparazione tra tipologie di campioni, mostrando la media e la deviazione standard. I valori di tensione normalizzata a fine rilassamento sono compresi tra 0.2 e 0.35 MPa.

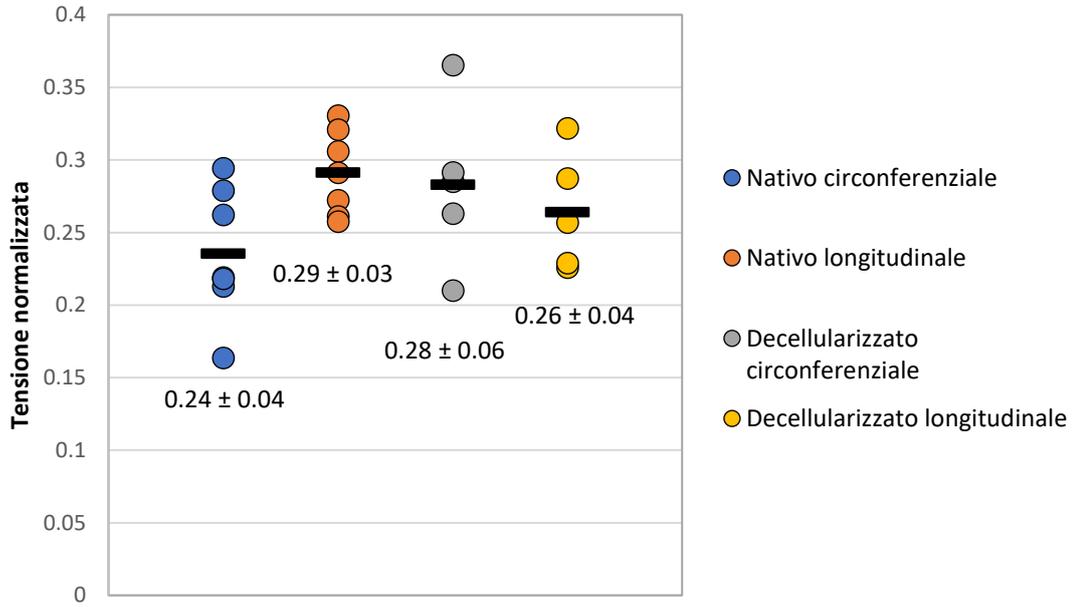


Figura 4.26 Valori della tensione normalizzata a 1800 secondi per tipologia di campione di tunica albuginea.

L'analisi statistica non ha permesso di evidenziare alcuna differenza significativa tra i valori di tensione normalizzata dei diversi gruppi ($p - \text{value} = 0.183$), di conseguenza, bisognerebbe ampliare il numero di prove sperimentali.

CONCLUSIONI

Nello studio condotto si è voluto analizzare il comportamento meccanico della tunica albuginea umana nativa e decellularizzata, tessuto che trova nuove possibili applicazioni nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti per la riparazione delle vie urinarie inferiori. Nonostante il suo recente impiego nella chirurgia ricostruttiva, gli studi che caratterizzano le proprietà meccaniche della tunica albuginea si trovano in scarsa quantità. Inoltre, la valutazione delle proprietà meccaniche della tunica albuginea a seguito di trattamenti di decellularizzazione è fondamentale per valutare se tali trattamenti consentano di preservare l'integrità strutturale del tessuto. Nell'ambito di questo lavoro di tesi sono state condotte prove sperimentali meccaniche monoassiali di trazione e di rilassamento delle tensioni. I campioni sono stati testati lungo le due direzioni anatomiche del tessuto (longitudinale e circonferenziale), per indagare le caratteristiche di anisotropia, confrontando le proprietà del tessuto tra le direzioni longitudinale e circonferenziale. Infatti, dalle analisi istologiche presenti in letteratura, è emerso che la tunica albuginea è formata da uno strato interno in cui i fasci di collagene e elastina sono orientati circolarmente, e uno strato esterno con le fibre disposte longitudinalmente. Le prove sono state condotte mantenendo costantemente i campioni di tessuto in condizioni idratate, in modo da ottenere dei risultati più vicini al reale comportamento fisiologico della tunica albuginea.

Dal tessuto prelevato da donatori umani, sono stati ottenuti vari provini che sono stati testati in diverse giornate. I campioni di tessuto sono stati conservati mediante congelamento e alcuni provini hanno subito più cicli di congelamento. Sebbene alcuni gruppi di ricerca riportino delle alterazioni nelle proprietà meccaniche dei tessuti biologici con la conservazione mediante congelamento a -20 °C [57], [58], altri studi hanno riportato effetti minori o nulli sulle proprietà meccaniche con le medesime modalità di conservazione [59]–[61]. I risultati di Huang et al. [62] mostrano che un numero maggiore di cinque cicli di congelamento-scongelo alteri le proprietà meccaniche del tessuto. In questo studio è stata posta particolare attenzione a non superare cinque cicli di congelamento per ogni campione di tessuto.

Dall'analisi dei dati sperimentali ottenuti emerge una elevata variabilità inter e intraindividuale. Come testimoniano molteplici studi in letteratura, è molto frequente trovare deviazioni standard elevate nei risultati delle prove meccaniche su tessuti biologici.

Il tessuto oggetto di questo studio esibisce un comportamento meccanico non lineare a trazione. Da una prima analisi qualitativa la direzione circonferenziale delle fibre sembra essere la direzione che esibisce la maggior rigidità. Tuttavia, queste osservazioni non sono supportate dall'analisi statistica, probabilmente a causa del ridotto numero di provini analizzati. Il trattamento di decellularizzazione sembra influenzare le proprietà meccaniche a trazione, in particolare con un incremento dell'anisotropia del tessuto a seguito del trattamento. Questo effetto sembra suggerire una variazione della configurazione strutturale delle fibre che compongono il tessuto, anche se per verificare quest'ipotesi sarebbe necessario ampliare le prove sperimentali ad un maggior numero di provini e diversi soggetti.

Attraverso lo studio del fenomeno di rilassamento delle tensioni è emerso che non risultano evidenti differenze nel comportamento di rilassamento delle tensioni tra le due direzioni di prova e neppure tra i materiali nativo e decellularizzato.

Confrontando i risultati tra il tessuto nativo e quello che ha subito trattamenti di decellularizzazione, sembra che le proprietà meccaniche in dipendenza del tempo rimangano pressoché inalterate.

Lo studio condotto presenta alcune limitazioni: infatti, sono state svolte soltanto prove di tensione monoassiale nelle direzioni longitudinale e circonferenziale. Potrebbe risultare interessante, per gli sviluppi futuri della ricerca, considerare anche l'esecuzione di prove meccaniche di tipo biassiale, al fine di simulare in modo migliore gli stati di tensione fisiologici a cui è soggetto il tessuto in vivo e poter confrontare i risultati ottenuti con altri studi di letteratura.

In ogni caso, va riconosciuto il fatto che questo lavoro sperimentale, oltre a rappresentare, ad oggi, uno dei primi studi volti alla caratterizzazione del comportamento meccanico della tunica albuginea umana, è un primo passo verso lo sviluppo di scaffold derivanti dalla decellularizzazione della tunica albuginea, nell'ottica di valutarne l'utilizzo per la riparazione di difetti e patologie delle vie urinarie inferiori.

BIBLIOGRAFIA

- [1] G. Barbatelli, *Anatomia umana: fondamenti: con istituzioni di istologia*. Milano: Edi.Ermes, 2018.
- [2] F. H. Netter, *Netter: Atlante di anatomia umana*, 4. ed. Milano: Elsevier, 2011.
- [3] J. G. Betts, K. A. Young, J. A. Wise, E. Johnson, B. Poe, D. H. Kruse, O. Korol, J. E. Johnson, M. Womble, P. DeSaix, *Anatomy and Physiology 2e*, Houston: OpenStax, 2022.
- [4] M. Bentivoglio, *Anatomia umana e istologia*. Torino: Minerva medica, 2000.
- [5] H. Gray, *Grays anatomy*, 37. ed. Edinburgh Churchill Livingstone, 1989.
- [6] V. Mahadevan, «Anatomy of the lower urinary tract», *Surg. Oxf.*, vol. 34, fasc. 7, pp. 318–325, 2016.
- [7] A. Mangera, N. I. Osman, e C. R. Chapple, «Anatomy of the lower urinary tract», *Surg. Oxf.*, vol. 31, fasc. 7, pp. 319–325, 2013.
- [8] A. F. Brading, N. Teramoto, N. Dass, e R. McCoy, «Morphological and physiological characteristics of urethral circular and longitudinal smooth muscle», *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.*, fasc. 207, pp. 12–18; discussion 106-125, 2001.
- [9] S. B. Brandes e A. F. Morey, A. c. di, *Advanced Male Urethral and Genital Reconstructive Surgery*. New York, NY: Springer New York, 2014.
- [10] V. Mahadevan, «Surgical Anatomy of the Male External Genitalia», in *Atlas of Male Genitourethral Surgery*, John Wiley & Sons, Ltd, 2014, pp. 1–7.
- [11] A. L. Mescher, «The Male Reproductive System», in *Junqueira's Basic Histology Text and Atlas*, 16^a ed., New York, NY: McGraw Hill, 2021.
- [12] G. Goglia, *Anatomia umana: citologia, istologia, embriologia, organi, sistemi, apparati*. Padova: Piccin, 1998.

- [13] G.-L. Hsu, G. Brock, B. V. Heyden, L. Nunes, T. f. Lue, e E. a. Tanagho, «The distribution of elastic fibrous elements within the human penis», *Br. J. Urol.*, vol. 73, fasc. 5, pp. 566–571, 1994.
- [14] P. A. Humphrey, «Male Urethra and External Genitalia Anatomy», in *Advanced Male Urethral and Genital Reconstructive Surgery*, S. B. Brandes e A. F. Morey, A c. di New York, NY: Springer, 2014, pp. 17–23.
- [15] M. Bitsch, B. Kromann-Andersen, J. Schou, e E. Sjøntoft, «The elasticity and the tensile strength of tunica albuginea of the corpora cavernosa», *J. Urol.*, vol. 143, fasc. 3, pp. 642–645, 1990.
- [16] G. Brock, G.-L. Hsu, L. Nunes, B. von Heyden, e T. F. Lue, «The Anatomy of the Tunica Albuginea in the Normal Penis and Peyronie’s Disease», *J. Urol.*, vol. 157, fasc. 1, pp. 276–281, 1997.
- [17] A. Shafik, A. El-Sharkawy, A. Khamis, S. Zaghloul, M. Abdel Gawad, e D. Elwy, «Histologic study of the tunica albuginea of the penis and mode of cavernosus muscles’ insertion in it», *Arch. Androl.*, vol. 52, fasc. 1, pp. 1–8, 2006.
- [18] S. S. Hou, «Quantification of the Elastic and Relaxation Properties of Human Tunica Albuginea under Biaxial Loading», Thesis, Virginia Tech, 2019.
- [19] A. M. Kandabarow, E. Chuang, K. McKenna, B. Le, K. McVary, e A. Colombo, «Tensile strength of penile tunica albuginea in a human model», *J. Urol.*, vol. 207, fasc. Supplement 5, p. e622, 2022.
- [20] L. Brady *et al.*, «Mechanical characterization of fibrotic and mineralized tissue in Peyronie’s disease», *Int. J. Impot. Res.*, vol. 34, fasc. 5, pp. 477–486, 2022.
- [21] E. Y. Cheng e B. P. Kropp, «Urologic tissue engineering with small-intestinal submucosa: potential clinical applications», *World J. Urol.*, vol. 18, fasc. 1, pp. 26–30, 2000.
- [22] S. F. Badylak, D. Taylor, e K. Uygun, «Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds», *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 13, pp. 27–53, 2011.

- [23] P. M. Crapo, T. W. Gilbert, e S. F. Badylak, «An overview of tissue and whole organ decellularization processes», *Biomaterials*, vol. 32, fasc. 12, pp. 3233–3243, 2011.
- [24] R. K. Mathur, *Tunica Albuginea Urethroplasty*. IntechOpen, 2011.
- [25] E. C. Serefoglu e W. J. G. Hellstrom, «Treatment of Peyronie’s Disease: 2012 Update», *Curr. Urol. Rep.*, vol. 12, fasc. 6, pp. 444–452, 2011.
- [26] A. Kadioglu, T. Akman, O. Sanli, L. Gurkan, M. Cakan, e M. Celtik, «Surgical treatment of Peyronie’s disease: a critical analysis», *Eur. Urol.*, vol. 50, fasc. 2, pp. 235–248, 2006.
- [27] M. N. Patel e A. Atala, «Tissue Engineering of the Penis», *Sci. World J.*, vol. 11, pp. 2567–2578, 2011.
- [28] T. W. Andrew, M. Kanapathy, L. Murugesan, A. Muneer, D. Kalaskar, e A. Atala, «Towards clinical application of tissue engineering for erectile penile regeneration», *Nat. Rev. Urol.*, vol. 16, fasc. 12, pp. 734–744, 2019.
- [29] O. S. Lowsley e W. H. Boyce, «Further experiences with an operation for the cure of peyronie’s disease», *J. Urol.*, vol. 63, fasc. 5, pp. 888–902, 1950.
- [30] C. J. Devine e C. E. Horton, «Surgical treatment of Peyronie’s disease with a dermal graff», *J. Urol.*, vol. 111, fasc. 1, pp. 44–49, 1974.
- [31] G. Brock, A. Kadioglu, e T. F. Lue, «Peyronie’s disease: a modified treatment», *Urology*, vol. 42, fasc. 3, pp. 300–304, 1993.
- [32] F. Montorsi *et al.*, «Five Year Followup of Plaque Incision and Vein Grafting for Peyronie’s Disease», *J. Urol.*, vol. 171, fasc. 4S, pp. 331–331, 2004.
- [33] J. Kalsi, S. Minhas, N. Christopher, e D. Ralph, «The results of plaque incision and venous grafting (Lue procedure) to correct the penile deformity of Peyronie’s disease», *BJU Int.*, vol. 95, fasc. 7, pp. 1029–1033, 2005.

- [34] A. A. Adeniyi, S. R. Goorney, J. P. Pryor, e D. J. Ralph, «The Lue procedure: an analysis of the outcome in Peyronie's disease», *BJU Int.*, vol. 89, fasc. 4, pp. 404–408, 2002.
- [35] E. Akkus *et al.*, «Incision and venous patch graft in the surgical treatment of penile curvature in Peyronie's disease», *Eur. Urol.*, vol. 40, fasc. 5, pp. 531–536; discussion 537, 2001.
- [36] F. Montorsi *et al.*, «Evidence based assessment of long-term results of plaque incision and vein grafting for Peyronie's disease», *J. Urol.*, vol. 163, fasc. 6, pp. 1704–1708, 2000.
- [37] S. De Stefani, G. Savoca, S. Ciampalini, I. Gattuccio, F. Scieri, e E. Belgrano, «Saphenous vein harvesting by “stripping” technique and 'W'-shaped patch covering after plaque incision in treatment of Peyronie's disease», *Int. J. Impot. Res.*, vol. 12, fasc. 6, pp. 299–301, 2000.
- [38] J. P. Yurkanin, R. Dean, e H. Wessells, «Effect of incision and saphenous vein grafting for Peyronie's disease on penile length and sexual satisfaction», *J. Urol.*, vol. 166, fasc. 5, pp. 1769–1772; discussion 1772-1773, 2001.
- [39] K.-J. Joo, B.-S. Kim, J.-H. Han, C.-J. Kim, C.-H. Kwon, e H.-J. Park, «Porcine vesical acellular matrix graft of tunica albuginea for penile reconstruction», *Asian J. Androl.*, vol. 8, fasc. 5, pp. 543–548, 2006.
- [40] J. L. Chun, A. McGregor, R. Krishnan, e C. C. Carson, «A comparison of dermal and cadaveric pericardial grafts in the modified Horton-Devine procedure for Peyronie's disease», *J. Urol.*, vol. 166, fasc. 1, pp. 185–188, 2001.
- [41] L. Ferretti *et al.*, «Tissue engineering for penile surgery: comparative study of noncellular and cell-seeded synthetic grafts for tunica albuginea replacement», *J. Sex. Med.*, vol. 9, fasc. 2, pp. 625–631, 2012.
- [42] D. Schultheiss *et al.*, «Functional tissue engineering of autologous tunica albuginea: a possible graft for Peyronie's disease surgery», *Eur. Urol.*, vol. 45, fasc. 6, pp. 781–786, 2004.

- [43] L. Ma *et al.*, «Adipose tissue-derived stem cell-seeded small intestinal submucosa for tunica albuginea grafting and reconstruction», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, fasc. 6, pp. 2090–2095, 2012.
- [44] T. John, G. Bandi, e R. Santucci, «Porcine small intestinal submucosa is not an ideal graft material for Peyronie’s disease surgery», *J. Urol.*, vol. 176, fasc. 3, pp. 1025–1028; discussion 1029, 2006.
- [45] B. N. Breyer, W. O. Brant, M. M. Garcia, A. J. Bella, e T. F. Lue, «Complications of porcine small intestine submucosa graft for Peyronie’s disease», *J. Urol.*, vol. 177, fasc. 2, pp. 589–591, 2007.
- [46] L. D. Knoll, «Use of porcine small intestinal submucosal graft in the surgical management of Peyronie’s disease», *Urology*, vol. 57, fasc. 4, pp. 753–757, 2001.
- [47] L. D. Knoll, «Use of Small Intestinal Submucosa Graft for the Surgical Management of Peyronie’s Disease», *J. Urol.*, vol. 178, fasc. 6, pp. 2474–2478, 2007.
- [48] J. Wefer *et al.*, «Tunica albuginea acellular matrix graft for penile reconstruction in the rabbit: a model for treating Peyronie’s disease», *BJU Int.*, vol. 90, fasc. 3, pp. 326–331, 2002.
- [49] A. A. Shokeir, Y. Osman, M. El-Azab, M. Gabr, M. Dawaba, e M. El-Baz, «Tunica albuginea acellular matrix graft for treatment of Peyronie’s disease--an experimental study in dogs», *Scand. J. Urol. Nephrol.*, vol. 38, fasc. 6, pp. 499–503, 2004.
- [50] N. F. Davis, B. B. McGuire, A. Callanan, H. D. Flood, e T. M. McGloughlin, «Xenogenic extracellular matrices as potential biomaterials for interposition grafting in urological surgery», *J. Urol.*, vol. 184, fasc. 6, pp. 2246–2253, 2010.
- [51] E. A. Da-Silva, F. J. B. Sampaio, M. C. Dornas, R. Damiao, e L. E. M. Cardoso, «Extracellular matrix changes in urethral stricture disease», *J. Urol.*, vol. 168, fasc. 2, pp. 805–807, 2002.
- [52] F. G. da Silva, A. M. Filho, R. Damião, e E. A. da Silva, «Human Acellular Matrix Graft of Tunica Albuginea for Penile Reconstruction», *J. Sex. Med.*, vol. 8, fasc. 11, pp. 3196–3203, 2011.

- [53] R. De Caro, V. Macchi, e A. Porzionato, «Promotion of body donation and use of cadavers in anatomical education at the University of Padova», *Anat. Sci. Educ.*, vol. 2, fasc. 2, pp. 91–92, 2009.
- [54] A. Porzionato *et al.*, «Quality management of Body Donation Program at the University of Padova», *Anat. Sci. Educ.*, vol. 5, fasc. 5, pp. 264–272, 2012.
- [55] K. Robi *et al.*, *The Physiology of Sports Injuries and Repair Processes*. IntechOpen, 2013.
- [56] L. Soliani, *Manuale di statistica per la ricerca e la professione: statistica univariata e bivariata, parametrica e non-parametrica per le discipline ambientali e biologiche*. 2005.
- [57] R. W. Chan e I. R. Titze, «Effect of postmortem changes and freezing on the viscoelastic properties of vocal fold tissues», *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 31, fasc. 4, pp. 482–491, 2003.
- [58] A. Hemmasizadeh, K. Darvish, e M. Autieri, «Characterization of Changes to the Mechanical Properties of Arteries due to Cold Storage using Nanoindentation Tests», *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 40, fasc. 7, pp. 1434–1442, 2012.
- [59] A. H. Lee e D. M. Elliott, «Freezing does not alter multiscale tendon mechanics and damage mechanisms in tension», *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1409, fasc. 1, pp. 85–94, 2017.
- [60] S. L. Woo, C. A. Orlando, J. F. Camp, e W. H. Akeson, «Effects of postmortem storage by freezing on ligament tensile behavior», *J. Biomech.*, vol. 19, fasc. 5, pp. 399–404, 1986.
- [61] A. Nazarian, B. J. Hermannsson, J. Muller, D. Zurakowski, e B. D. Snyder, «Effects of tissue preservation on murine bone mechanical properties», *J. Biomech.*, vol. 42, fasc. 1, pp. 82–86, 2009.
- [62] H. Huang, J. Zhang, K. Sun, X. Zhang, e S. Tian, «Effects of repetitive multiple freeze-thaw cycles on the biomechanical properties of human flexor digitorum

superficialis and flexor pollicis longus tendons», *Clin. Biomech. Bristol Avon*, vol. 26, fasc. 4, pp. 419–423, 2011.

SITOGRAFIA

- [63] <https://geiselmed.dartmouth.edu/anatomy/courses/cto/resources/>
- [64] <https://abdominalkey.com/surgery-of-the-penis-and-urethra/>
- [65] <https://www.ouhsc.edu/histology/text%20sections/male%20reproductive.html>.
- [66] <https://abdominalkey.com/peyronies-disease/>
- [67] <http://www.cmbm.unipd.it/news/bose.html>
- [68] <https://www.tainstruments.com/planar-biaxial-2-motor/>
- [69] https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Stress_relaxation&oldid=1113146393