



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN BIOINGEGNERIA

CURRICULUM INDUSTRIALE

Studio sulla criopreservazione di tessuti biologici: confronto delle caratteristiche istologiche e delle proprietà biomeccaniche prima e dopo il trattamento

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Laureando: Giovanni Morgese

Correlatore: Dott.ssa Martina Casarin

Dott.ssa Martina Todesco

ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023

Data di laurea 13/07/2023

Indice

Indice.....	1
Abstract	3
1 Introduzione.....	5
1.1 Le banche dei tessuti.....	5
1.2 La donazione di un organo	5
1.2.1 La scarsa disponibilità di tessuti.....	7
1.3 L'ingegneria tissutale.....	8
1.3.1 Le proprietà di uno scaffold per TE/RM.....	10
1.4 La matrice extracellulare.....	11
1.4.1 Il collagene	11
1.4.2 L'elastina.....	13
1.4.3 Comportamento meccanico delle proteine fibrose della ECM	14
1.5 La crioconservazione di tessuti biologici	16
1.5.1 La decellularizzazione nella crioconservazione	20
1.6 I tessuti porcini esaminati.....	21
1.6.1 Pericardio	21
1.6.2 Uretere.....	22
1.6.3 Aorta discendente	23
1.6.4 Sottomucosa dell'intestino	25
2 Materiali e metodi	26
2.1 Crioconservazione	26
2.2 Analisi istologiche	27
2.2.1 Le colorazioni.....	27
2.2.1.1 Ematossilina e eosina (HE)	27
2.2.1.2 Masson Tricromica con blu di anilina (MT)	28
2.2.1.3 Alcian blu (AB)	29
2.3 Analisi biomeccaniche	29
2.3.1 Prove di trazione monoassiale	32
2.3.2 Analisi dei dati.....	34
2.3.3 Analisi statistiche.....	35
3 Risultati.....	37

3.1	Istologie.....	37
3.2	Caratterizzazione meccanica	40
3.2.1	Spessori	40
3.2.2	Prove di trazione monoassiale	41
3.2.2.1	Prove a rottura.....	41
3.2.2.2	Prove cicliche.....	48
3.2.2.3	Confronto prove a rottura vs prove cicliche	53
3.2.2.4	Prove di stress relaxation	63
4	Discussione	70
5	Bibliografia	74

Abstract

Le banche dei tessuti rappresentano una soluzione per la conservazione di tessuti e organi destinati all'utilizzo clinico, anche in risposta alla limitata disponibilità di sostituti biologici da donatore vivente, che genera un evidente divario fra il numero di pazienti in lista d'attesa per il trapianto e gli organi disponibili. Il trattamento di crioconservazione viene applicato per conservare i tessuti e gli organi in ambienti sterili e a bassissime temperature fino al momento del loro impiego. La letteratura scientifica manca però di studi che siano in grado di valutare i possibili effetti della crioconservazione. Pertanto, il presente lavoro di tesi ha come obiettivo la caratterizzazione di alcuni tessuti/organi porcini (pericardio, uretere, sottomucosa intestinale e aorta), prima e dopo il processo di crioconservazione. A questo scopo, sono state effettuate analisi istologiche e valutazioni biomeccaniche.

1 Introduzione

1.1 Le banche dei tessuti

Le banche dei tessuti sono strutture specializzate che si occupano del prelievo, trattamento, conservazione e distribuzione di tessuti umani secondo quanto previsto dal Decreto Legislativo 191 del 6 novembre 2007. I tessuti sono prelevati da donatori consenzienti *post-mortem* e vengono poi resi disponibili per una serie di applicazioni mediche, principalmente per trapianti o per scopi di ricerca. Il processo di gestione di una banca dei tessuti deve seguire rigidi protocolli, e comporta severi test di screening, meticolosi controlli di qualità e il rigoroso rispetto di standard etici e legali [1].

1.2 La donazione di un organo

Il trapianto rappresenta attualmente la terapia d'elezione per il trattamento di molte condizioni patologiche nel loro stadio più grave: a seguito di scrupolose valutazioni cliniche e in riferimento a linee guida precise, il paziente viene pertanto inserito nella lista d'attesa nazionale per il trapianto di organo o tessuto.

L'Italia si configura al terzo posto in Europa per numero di donazioni dopo Spagna e Francia; nell'ultimo anno le donazioni hanno superato quota 1.800 (i donatori sono 1459, Figura 1.1), per un totale di 3.887 trapianti annui. Dal grafico riportato in Figura 1.2, invece, si può notare come la richiesta di ricevere un trapianto aumenti nel tempo [2].

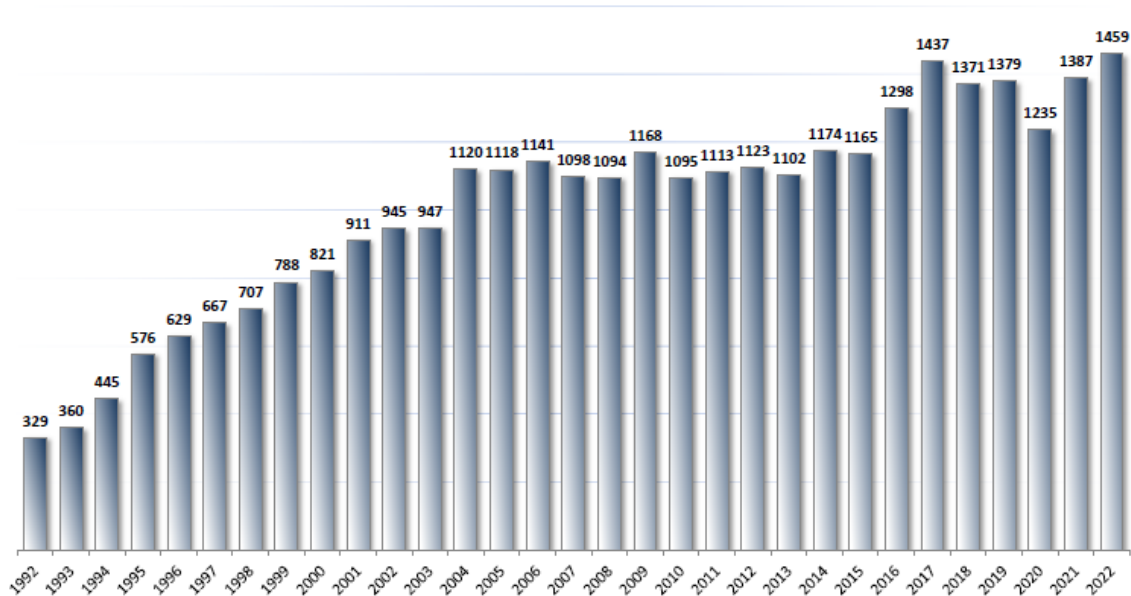


Figura 1.1: Numero di donazioni di organo dal 1992 al 2022 in Italia. Tratto da: SIT – Sistema Informativo Trapianti. Fonte dati: CRT. Dati preliminari al 30/11/2022 [2].

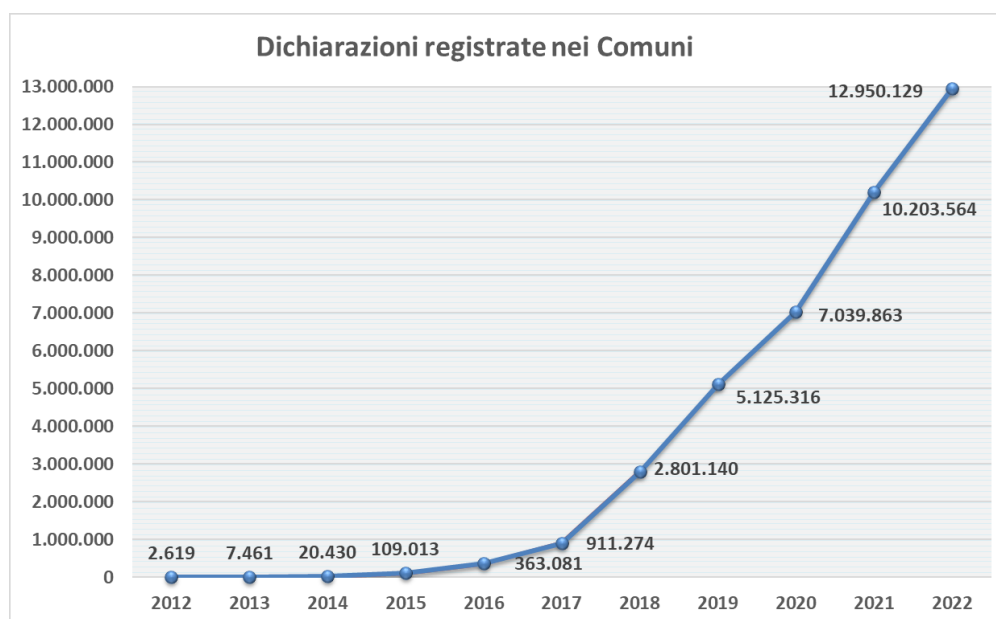


Figura 1.2: Dichiarazioni di volontà di ricevere una donazione d’organo registrate al Comune di provenienza in Italia dal 2012 al 2022. Tratto da: SIT – Sistema Informativo Trapianti. Fonte dati: CRT. Dati al 31/12/2022 [2].

L’aumento del divario fra domanda e offerta genera lunghe liste d’attesa per ricevere un organo da donatore e questo è dovuto a diversi motivi quali, ad esempio:

1. invecchiamento della popolazione: una delle conseguenze della migliore qualità di vita, anche in seguito ad un più facile e diffuso accesso alle cure mediche, è proprio l’invecchiamento della popolazione; ciò comporta che l’età media dei donatori aumenta e la qualità degli organi donati peggiora; d’altra parte, aumenta anche il numero di persone che, nel tempo, potrebbero necessitare di trapianto d’organo;

2. crescente presenza di patologie croniche: diabete, ipertensione, malattie cardiocircolatorie sono sempre più frequenti e portano a complicanze e disfunzionalità ai principali organi;
3. trattamenti alternativi limitati: farmaci e dispositivi medici non offrono una soluzione a lungo termine;

Nonostante ciò, il numero di donazioni d'organo è in progressiva crescita: come detto, la qualità degli organi donati peggiora per effetto dell'aumento dell'età dei donatori. I medici cercano di applicare protocolli di selezione degli organi da donatore che, pur garantendone una adeguata qualità, possano risultare meno restrittivi [3,4].

1.2.1 La scarsa disponibilità di tessuti

Una banca di tessuti funge da intermediario tra donatore e ricevente, fornendo tessuti umani sicuri ed affidabili. Ad oggi si deve affrontare un grave problema che consiste nella scarsa disponibilità di adeguati campioni biologici [5]. I problemi concernenti la scarsa reperibilità di tessuti riguardano:

1. carenza di donatori: la domanda di tessuti spesso supera l'offerta disponibile, portando a lunghe liste d'attesa per pazienti che necessitano trapianti.
2. motivi etici e legali: le procedure di prelievo/conservazione di tessuti e organi sono sottoposte a rigide normative, stante anche le importanti implicazioni di carattere etico e legale;
3. controllo qualità: mantenere la qualità e la messa in sicurezza dei tessuti è fondamentale. Tuttavia, vari fattori possono influenzare la loro vitalità, come tecniche di conservazione inadeguate, manipolazione impropria durante il trasporto o condizioni di conservazione non ottimali. Se i tessuti non soddisfano gli standard richiesti, possono diventare inutilizzabili sia per trapianti che per scopi di ricerca;
4. cultura e religione: le credenze culturali e religiose possono influenzare la disponibilità di un individuo a donare o ricevere tessuti non autologhi [6].

L'attività di donazione è costituita di pochi processi di donazione completi, ovvero eseguiti con successo. In Figura 1.3 si può vedere come le principali donazioni effettuate sul territorio italiano siano primariamente quelle provenienti da donatori che hanno subito un arresto cardiaco, seguono i donatori a cuore battente e i donatori viventi. Dal grafico si nota, inoltre, che il numero di donazioni effettuate e terminate (in blu) è leggermente inferiore al numero di donazioni ancora completate in attesa di chiusura (in rosso) [2].

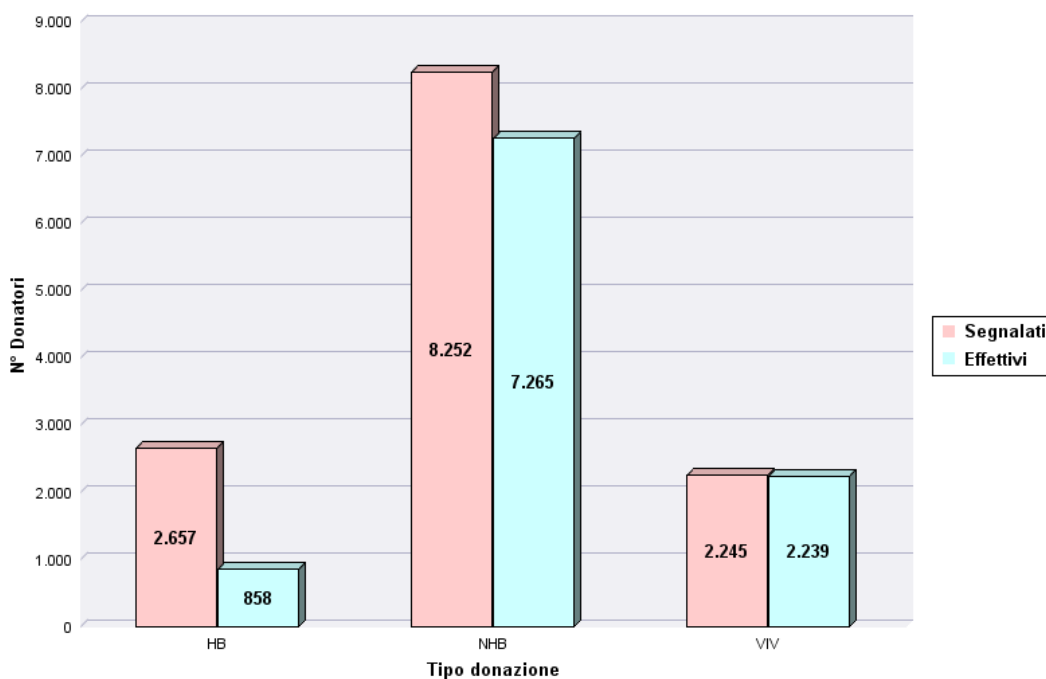


Figura 1.3: Attività di donazione registrata nel SIT in Italia. Le donazioni complete in rosso sono quelle “CHIUSE”, in blu quelle “IN ATTESA DI CHIUSURA”, raggruppate per tipo di donazione (HB=donatore a cuore battente, la cui morte è stata accertata con criteri neurologici; NHB=donatore con arresto cardiaco; VIV=donatori viventi, tessuti prelevati durante un innesto chirurgico (Periodo dal 01/01/2022 al 31/12/2022. Tratto da: SIT – Sistema Informativo Trapianti. Fonte dati: CRT. [2]

I progressi nella ricerca scientifica in ambito dell’ingegneria tissutale hanno cercato di arginare le diverse problematiche correlate alla scarsa disponibilità di tessuti. Negli ultimi anni infatti, l’ingegneria tissutale ha suscitato grande interesse soprattutto nell’ambito della medicina rigenerativa [6,7].

1.3L’ingegneria tissutale

L’ingegneria tissutale è un campo multidisciplinare che combina principi di biologia, ingegneria e medicina per creare sostituti biologici. Sfruttando le naturali capacità rigenerative del corpo, ricercatori e medici stanno sviluppando strategie per sostituire e/o riparare i tessuti danneggiati, come ossa, cartilagine, pelle e interi organi. Questi tessuti ingegnerizzati sono progettati per imitare la complessa architettura e funzione dei tessuti nativi, fornendo così un’impalcatura, o *scaffold*, per il ripopolamento e la crescita delle cellule [8,9].

Nel 2005 Mac Arthur e Oreffo hanno definito l’ingegneria tissutale come "la comprensione dei principi della crescita dei tessuti e come applicarli per produrre tessuti sostitutivi funzionali per uso clinico sviluppando strategie terapeutiche mirate alla sostituzione, alla riparazione, al mantenimento e/o al potenziamento della funzione dei tessuti" [10].

L’ingegneria tissutale e la medicina rigenerativa (TE/RM) condividono lo stesso obiettivo, ovvero quello di creare tessuti funzionali o interi organi che possano essere utilizzati nell’uomo.

La creazione di questi sostituti biologici può concretamente fornire una soluzione alla carenza critica di organi in Italia e in tutto il mondo. Un tessuto bioingegnerizzato che imiti accuratamente le proprietà biomeccaniche e biologiche dell'organo nativo deve supportare le cellule del ricevente e creare un nuovo tessuto/organo autologo [11,12].

Le 3 componenti cardine su cui si basa l'Ingegneria Tissutale sono:

- *scaffold*, caratterizzati da:
 - supporto fisico e chimico per l'adesione delle cellule;
 - presenza di fattori biochimici per la proliferazione cellulare;
 - ambiente poroso e tridimensionale per un'adeguata diffusione di nutrienti e proliferazione cellulare;
 - adeguate proprietà meccaniche in funzione del tessuto da ricreare/sostituire [10].

Lo *scaffold* è la componente fondamentale che deve mimare il ruolo naturale della matrice extracellulare (ECM) [13,14].

- Cellule: sono impiegate per popolare lo *scaffold* e proliferano su di esso interagendo con le cellule circostanti il sito biologico di interesse. Ad oggi, l'ingegneria tissutale si avvale anche di cellule staminali (pluripotenti o multipotenti indotte) che sono in grado di differenziarsi, ovvero specializzarsi nella cellula tipica di un dato tessuto [3, 15].
- Fattori di crescita: si tratta di molecole di origine proteica in grado di influenzare il differenziamento e la proliferazione cellulare e, non per ultimo, la vascolarizzazione, che è essenziale per il supporto trofico e la vitalità del tessuto [2,11] [Figura 1.4]

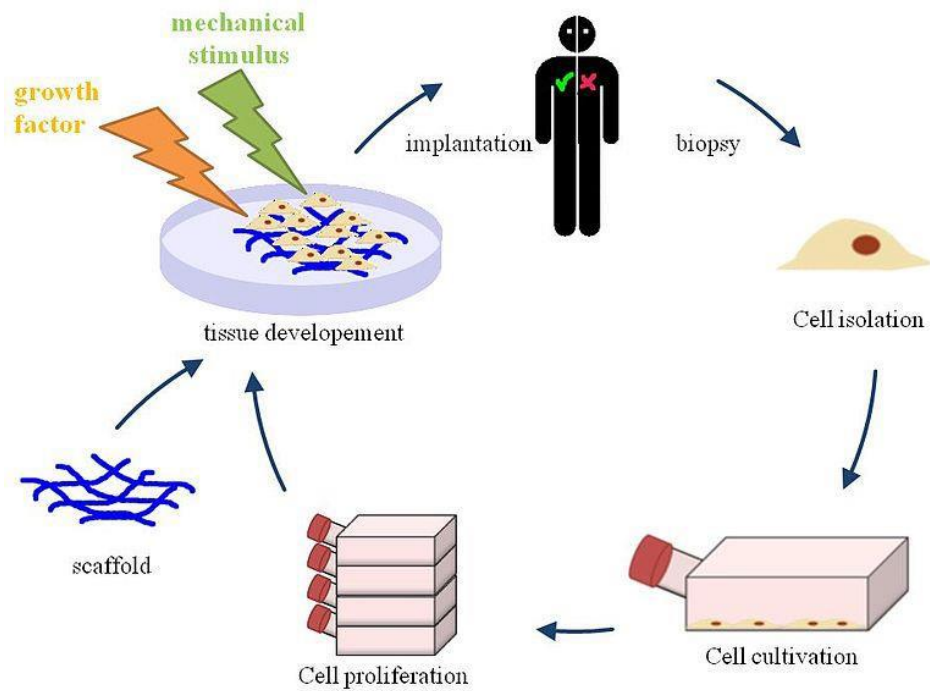


Figura 1.4: componenti su cui si basa l'Ingegneria Tissutale: *scaffold*, cellule e fattori di crescita [10].

1.3.1 Le proprietà di uno scaffold per TE/RM

Per essere in grado di fornire supporto strutturale, un tessuto bioingegnerizzato deve potersi integrare perfettamente nel distretto di destinazione: questo implica che esso sia in grado di stimolare il corretto comportamento cellulare per guidare la crescita di nuovo tessuto. [14]. Per questo lo *scaffold* deve:

- essere biocompatibile: non deve indurre reazioni avverse a contatto con l'ambiente biologico [3];
- essere biodegradabile: è necessario conoscere la cinetica di degradazione, perché sia contestuale alla formazione di nuovo tessuto in vivo [3,15];
- presentare adeguate proprietà meccaniche: che diano risultati coerenti con la funzione che il biomateriale deve ricoprire, cioè svolgere le funzioni proprie del sito anatomico in cui verrà impiantato [16];
- possedere adeguata porosità: le cellule devono penetrare all'interno dello scaffold per poterlo popolare in modo uniforme [17].

Conferendo tali proprietà allo *scaffold*, questo si integra nel sito biologico d'intervento e interscambia i segnali biologici che rendono le cellule in grado di aderire, differenziarsi e proliferare: riescono a scambiare i nutrienti necessari grazie ad una buona rimozione dei rifiuti metabolici, producendo la matrice extracellulare e promuovendo la vascolarizzazione del tessuto.

1.4 La matrice extracellulare

La matrice extracellulare (ECM) è la struttura tridimensionale che ospita e sostiene le cellule di un tessuto o di un organo. La ECM è una entità molto complessa e dinamica e influenza il comportamento delle cellule svolgendo diversi ruoli vitali:

- fornisce supporto strutturale e resistenza meccanica;
- fornisce siti di interazioni per recettori cellulari;
- modula i processi di adesione, migrazione e di angiogenesi [14].

Le componenti principali della ECM sono collagene ed elastina.

1.4.1 Il collagene

Il collagene è la proteina più abbondante della ECM dei mammiferi. Negli esseri umani, il collagene comprende circa il 25% delle proteine totali del corpo umano. Questa proteina fibrosa e strutturale, oltre a svolgere il ruolo di mantenimento e di collegamento, possiede un'elevata resistenza alla trazione ed è incomprimibile. Esistono diversi tipi di collagene presenti all'interno dei tessuti e diverse modalità con cui si aggregano, questo perché varia la presenza degli amminoacidi costituenti e le interazioni fra di loro [18].

Il collagene è costituito da 3 catene polipeptidiche, le catene *alpha*, intrecciate fra di loro in modo da creare una tripla elica. Ogni singola catena ha un *backbone* (struttura primaria) costituito da oltre 1400 amminoacidi, fra i quali spesso sono presenti le triplette Gly-Pro-Hyp (glicina, prolina e idrossiprolina). Mentre la glicina si colloca stabilmente all'interno della tripla elica, le altre due favoriscono l'avvolgimento a spirale delle catene. In questa particolare conformazione, i gruppi -NH dei residui di glicina di una catena formano legami ad idrogeno con i gruppi -OH dell'idrossiprolina disposti perpendicolarmente all'asse longitudinale della tripla elica. Ogni singolo filamento di collagene assume un particolare tipo di struttura terziaria: elicoidale sinistrorsa [Figura 1.5] [19,20].

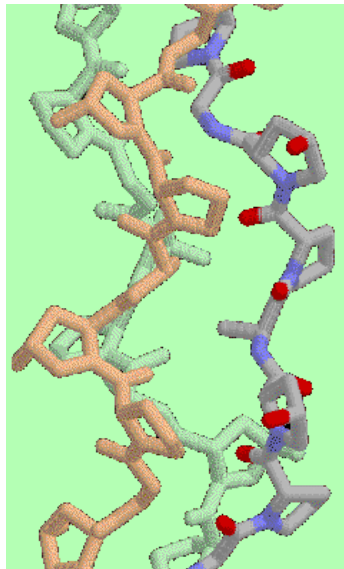


Figura 1.5: Tre catene polipeptidiche formano la tripla elica sinistrorsa di collagene [3].

Il tropocollagene, precursore del collagene, rappresenta la struttura quaternaria ed è costituito da 3 filamenti elicoidali di collagene che si organizzano in una superelica destrorsa.

A livello microscopico, le molecole di tropocollagene si associano formando file parallele sfalsate, che costituiscono le microfibrille. Se si osserva del collagene al microscopio elettronico, si notano delle striature orizzontali date da questa particolare disposizione.

A loro volta, le fibrille formano legami crociati fra di loro, e ciò attribuisce alle fibre di collagene elevata la resistenza meccanica a trazione. La quantità di questo tipo di legami varia con la funzione fisiologica del tessuto e con la sua età [Figura 1.6].

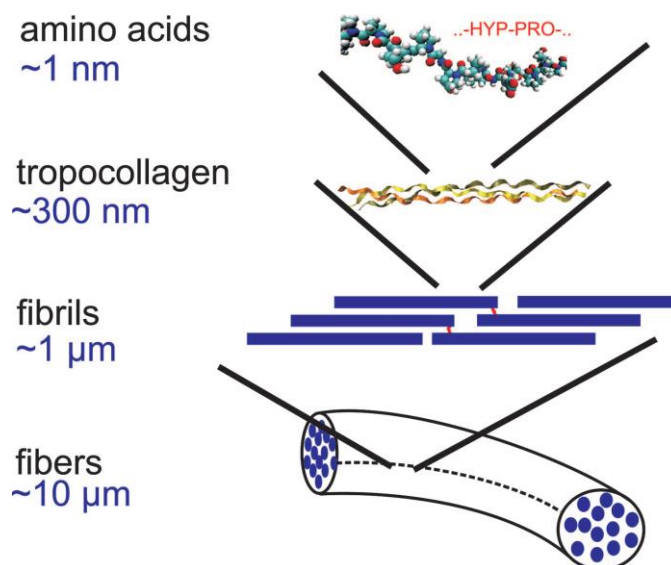


Figura 1.6: Schematizzazione della caratteristica gerarchia strutturale del collagene, che va dal livello di sequenza di amminoacidi su scala nanometrica alla fibra di collagene di 10 micrometri [19].

Di tipi di collagene, nel corpo umano, ne sono stati individuati 25 ed ognuno ricopre una funzione biologica ben precisa. Fra i più importanti:

- 1) Collagene di tipo I: è il più semplice ed il più abbondante, costituisce infatti il 90% circa dell'intero collagene. Nella ECM forma fibre che reticolano gli interspazi intercellulari. Per questo motivo fornisce capacità di resistere alla trazione in una o più direzioni. Si trovano in concomitanza con fibroblasti, osteoblasti, nel derma, nei tendini e nei legamenti, nelle ossa e nei denti;
- 2) Collagene di tipo II: fornisce resistenza alla compressione, è prodotto dai condroblasti e compone la cartilagine ialina ed elastica;
- 3) Collagene di tipo III: si trova in tutti i tessuti in cui è richiesta una buona elasticità per assicurare anche una buona connessione strutturale. Quindi, oltre che nei fibroblasti, il collagene di III tipo viene prodotto anche dalle cellule del muscolo liscio, dagli epatociti e si trova negli strati di sottomucosa, nel sistema linfatico, nella milza, nel fegato, nel sistema cardiovascolare, nei polmoni e nella pelle;
- 4) Collagene di tipo IV: costituisce l'impalcatura della lamina basale nella membrana basale e viene prodotto dalle cellule epiteliali, muscolari e di Schwann. È caratterizzato da una testa globulare a cui sono legate 4 molecole di tropocollagene che si associano strettamente fra di loro formando complessi incrociati. Il collagene di IV tipo ha essenzialmente il ruolo di sostegno e supporto [3,18,19].

1.4.2 L'elastina

Anche l'elastina, come il collagene, è una proteina fibrosa che si trova in grande quantità nei tessuti molli. Nel suo *backbone* sono presenti numerosi amminoacidi idrofobici (rendendo così l'elastina una proteina insolubile) ed in particolare alcuni specifici che consentono la reticolazione. La conformazione adottata dell'elastina è spiraliforme e disordinata (*random coil*), ma le singole catene sono legate fra di loro tramite i legami reticolari. Di conseguenza, la sua macrostruttura è alla base delle tipiche caratteristiche elastiche di questa proteina strutturale: essa le consente di estendersi se sottoposta a trazione e ritornare nuovamente alla configurazione iniziale al cessare della sollecitazione [21] [Figura 1.7].

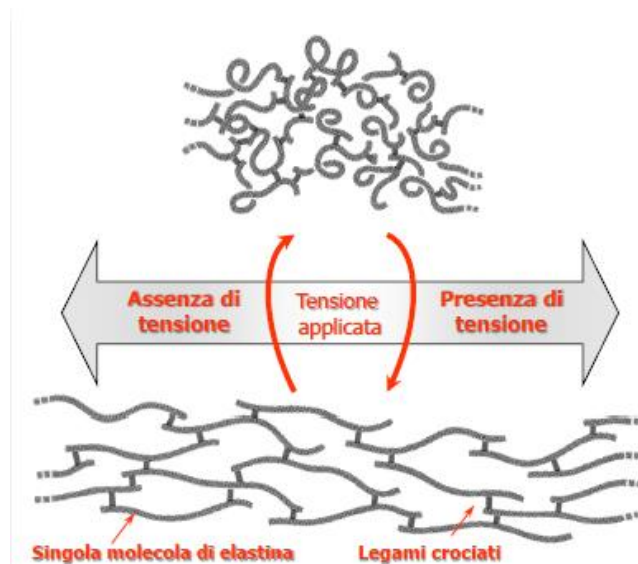


Figura 1.7: Configurazione dell'elastina a riposo e a trazione in presenza di tensione [3].

1.4.3 Comportamento meccanico delle proteine fibrose della ECM

Le proteine fibrose sono inframmezzate agli enormi aggregati extracellulari costituiti dai proteoglicani e formano un reticolo che conferisce consistenza e resistenza a tutta la ECM. Le fibre di elastina sono letteralmente inframmezzate fra le fibre di collagene: le prime conferiscono al tessuto proprietà di elasticità e adattabilità, le seconde ne limitano la eccessiva deformazione. È possibile la valutazione delle proprietà meccaniche del collagene tenendo conto della sua complessa organizzazione strutturale. Il collagene è capace di supportare carichi di trazione di tipo monoassiale e di tipo pluriassiale, rispettivamente effettuati lungo la direzione preferenziale delle fibre oppure lungo più direzioni [18].

Le misure più dirette delle proprietà meccaniche del collagene sono state ottenute studiando il tropocollagene e le fibrille di collagene. Nel 2006, Buehler ha stimato che la resistenza alla frattura di una singola molecola di tropocollagene fosse di circa 11 GPa, che è significativamente maggiore di quello delle fibrille di collagene (0.5 GPa) [20]. Questa differenza è ragionevole, dato che la frattura del tropocollagene richiede la rottura dei legami che mantengono la struttura a tripla elica stabile, mentre la frattura di una singola fibrilla no. Inoltre, il modulo di Young, cioè il rapporto fra tensione e deformazione, di una singola molecola di tropocollagene è di circa 7 GPa, mentre quello delle fibrille 5 GPa [22]. Da ciò si deduce che la resistenza meccanica di una fibra di collagene dipende maggiormente dai legami intercatena della struttura terziaria della molecola di tropocollagene.

Se si sottopone una fibra di collagene a trazione lungo la direzione preferenziale di sviluppo della fibra, si può osservare un comportamento tipicamente non lineare, dovuto alla configurazione microstrutturale [21].

Il comportamento meccanico del collagene è distinguibile in 3 fasi:

- 1) Fase di *uncrimping*: in assenza di sollecitazione esterna, per alcuni tessuti, le fibre di collagene si trovano in configurazione “ondulata” quando i legami crociati fra le fibrille non sono ancora tensionati e non esibiscono capacità resistente. La pendenza della curva di tensione-deformazione è bassa;
- 2) Zona di incremento: le fibre iniziano a variare la propria configurazione iniziale di *uncrimping* e si ha un progressivo tensionamento dei legami inter- e intra- fibrillari. Questo determina un incremento della rigidità;
- 3) Regione di trazione: quasi la totalità dei legami sono sottoposti a trazione e la fibra di collagene esibisce la sua massima capacità resistente. Il profilo tenso-deformativo è lineare [23] [Figura 1.8].

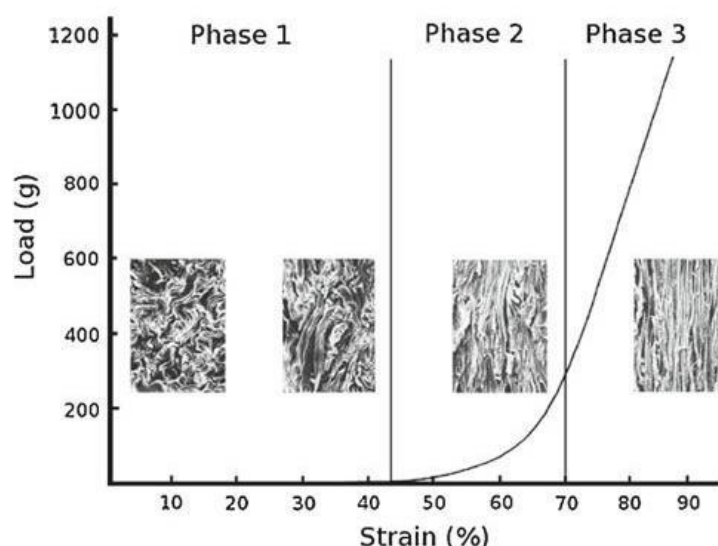


Figura 1.8: Configurazione di una fibra di collagene durante una prova a trazione [23].

L’elastina dispone di una configurazione a riposo “a gomitolo” disordinato e in presenza di una trazione iniziale non esibisce resistenza alla trazione in nessuna direzione in particolare. Durante l’applicazione del carico, le catene macromolecolari si allineano lungo la direzione della sollecitazione, mentre le reticolazioni intercatena impediscono lo scorrimento reciproco ed irreversibile, quindi, evitano fenomeni di deformazione permanente [Figura 1.9]. Tuttavia, una volta tolto il carico, l’elastina è molto più veloce del collagene a ritornare alla posizione di partenza “trascinando” a sé tutti gli altri elementi del tessuto (compreso il collagene) [23].

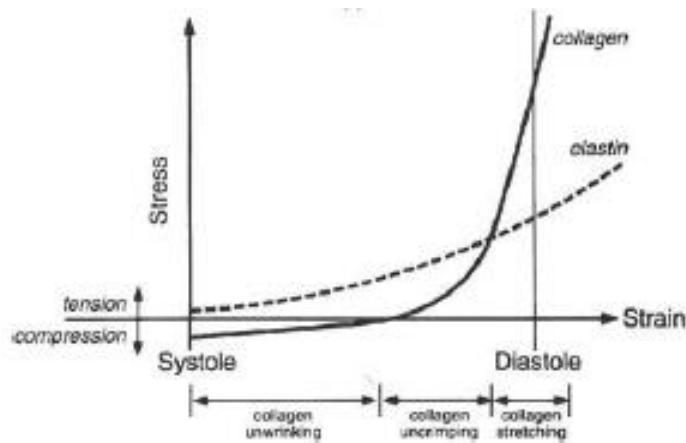


Figura 1.9: Comportamento meccanico del collagene e dell'elastina a confronto [22].

1.5 La crioconservazione di tessuti biologici

La crioconservazione è una procedura che permette di trattare e conservare tessuti e (alcuni) organi rendendoli poi disponibili su richiesta. In generale, non può essere concepita come una alternativa al trapianto di organo biologico, ma in taluni casi offre al medico la possibilità di disporre di sostituti tissutali pronti all'uso [24].

La crioconservazione, nota anche come criopreservazione, è il processo di conservazione di cellule, tessuti o di organi viventi a temperature estremamente basse e all'interno di soluzioni create *ad hoc* per prevenire l'eventuale danno cellulare, al fine di prolungarne la durata e, soprattutto, mantenerne le funzionalità. Approfondendo le tecniche e le sfide associate alla crioconservazione, si può comprendere meglio il potenziale impatto di questo approccio.

La criopreservazione è una delle tecniche più efficaci ed ampiamente utilizzate per preservare cellule e tessuti e il suo utilizzo è utile per preservare le proprietà native del tessuto per periodi di tempo prolungati arrestando o rallentando notevolmente tutti i processi biochimici. Tuttavia, alcune sperimentazioni riportano comprovate degenerazioni di tessuti crioconservati entro 15 anni dopo il loro impianto negli adulti e anche meno nei bambini a causa delle reazioni immunitarie [24].

I protocolli di crioconservazione consistono nel mantenimento di tessuti permeati da agenti crioprotettivi (Cryo-Protective Agents, CPA) ad una temperatura di $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un processo di lenta e/o graduale riduzione della temperatura: il principio della conservazione è quello di proteggere i tessuti prevenendo la formazione di cristalli di ghiaccio e mantenendone l'integrità strutturale. Col tempo, esperimenti sempre più approfonditi, sia *in vitro* che *in vivo*, hanno evidenziato alcune limitazioni all'utilizzo dei CPA: non sempre è possibile prevenire la formazione di cristalli di ghiaccio dentro e fuori le cellule. Ad esempio, i danni causati dalla formazione di questi cristalli possono influire sul *crimping* e/o su una maggiore mobilità delle fibre di collagene, che è stata a sua volta associata a una maggiore rigidità nei tessuti [11].

Le tecniche di conservazione dei tessuti non riescono del tutto a non intaccare l'architettura della ECM dei tessuti che subiscono il trattamento e questo può compromettere l'integrità del tessuto. D'altra parte, il progresso scientifico mette a disposizione nuove tecniche per preservare la qualità e la funzionalità di tessuti destinati ad un trapianto, in modo da rendere più efficace e più sicuro l'innesto. Queste possono essere combinate con la crioconservazione [25]. Diversi protocolli di congelamento e scongelamento sono stati proposti per ogni singolo tessuto da crioconservare. Il protocollo dipende dal tipo di tessuto utilizzato ed in particolare dalla cellularità, dalla densità, dallo spessore e dal contenuto lipidico, ma anche da quali sono gli scopi e i risultati che si vogliono ottenere nel particolare ambito di ricerca.

La crioconservazione può avvenire anche a contatto con vapori di azoto liquido, che normalmente si trova ad una temperatura variabile fra i -190°C e i -210°C . Come spiegato da Gerson et al. [26], la temperatura è gestita in ambiente controllato, ovvero in una macchina frigorifera apposita capace di controllare l'abbassamento di temperatura a circa $-1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. Preventivamente, i tessuti possono essere trattati con DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), una soluzione a basso livello di glucosio, talvolta arricchito da cocktail antibiotici (contenente fluconazolo, amfotericina B, imipenem, vancomicina, e amikacina solfato). Questa soluzione contiene una concentrazione elevata di amminoacidi e vitamine, glicina, serina e nitrato ferrico. Il DMEM è utilizzato per lo più come terreno per supportare il metabolismo di diversi tipi di cellule di mammifero [26].

Esistono molte differenze fra i vari protocolli in termini di medium di coltura sterili, reagenti crioprotettivi, cocktail antibiotici/antimicotici. In aggiunta o in alternativa al DMSO (dimetilsolfossido), ad esempio, può essere utilizzato RPMI 1640 (utilizzato maggiormente per colture in sospensione), con l'aggiunta di 0.3 g/L di L-glutammina, 10% di DMSO e 20% di albumina umana [27,28]. Il DMSO è un solvente organico appartenente alla categoria dei solfossidi ed è un agente di crioprotezione; venne scoperto nel 1963 da un gruppo di ricercatori dell'Università dell'Oregon con a capo Stanley Jacob che si accorse che tale sostanza era in grado di penetrare in profondità la pelle senza danneggiarla. Oltre a questo, funge anche da agente induttore del differenziamento cellulare [27].

Alla soluzione DMEM vengono addizionati, su volume totale di soluzione crioprotettore, 10% v/v di siero bovino fetale (FBS) e 10% v/v DMSO. Il siero fetale bovino (FBS) è di vitale importanza come fonte di fattori di crescita e adesione, ormoni, lipidi e minerali per la coltura delle cellule. Inoltre, il siero regola anche la permeabilità della membrana cellulare e funge da vettore per lipidi, enzimi, micronutrienti e oligoelementi nella cellula. Il DMSO è uno dei crioprotettori convenzionali ed è utilizzato per ridurre o rallentare la formazione di ghiaccio, per lo stoccaggio a lungo termine ed evita lo shock cellulare per osmolarità [24,25,28]

Allo stato dell'arte, non si è in grado di stabilire con certezza il metodo più appropriato e che sia in grado di provocare il minor danno al tessuto, anche perché il protocollo di crioconservazione varia a seconda del tipo di tessuto da trattare e dell'esigenza che ha il sostituto biologico. A titolo esemplificativo, un gruppo di ricerca ha provato a cambiare mezzo di coltura e metodi e tempistiche di congelamento-scongelo rifacendosi ad una particolare pratica di conservazione di reni vascolarizzati [29]. Permeando con 80 mL di VS83 EuroCollins-based (farmaco a base di sodio e potassio) 12,6 molare che contiene 4,65 mol/L di formammide, 4,65 mol/L di DMSO e 3,31 mol/L di 1,2-propanediolo (glicole propilenico) delle valvole aorte cardiache porcine, queste sono poi messe in un contenitore di polietilene che contiene VS83 e mantenute per massimo 1 h a temperatura ambiente prima del raffreddamento. Quest'ultimo viene fatto in temperatura ambiente per 1-2 min, seguito da 5 lavaggi in 4°C di EuroCollins per 5 minuti ognuno [29] [Figura 1.10].

I risultati ottenuti dall'analisi metabolica condotta sulle valvole cardiache porcine crioconservate stabiliscono che la formula VS83 si è rivelata citotossica per le cellule.

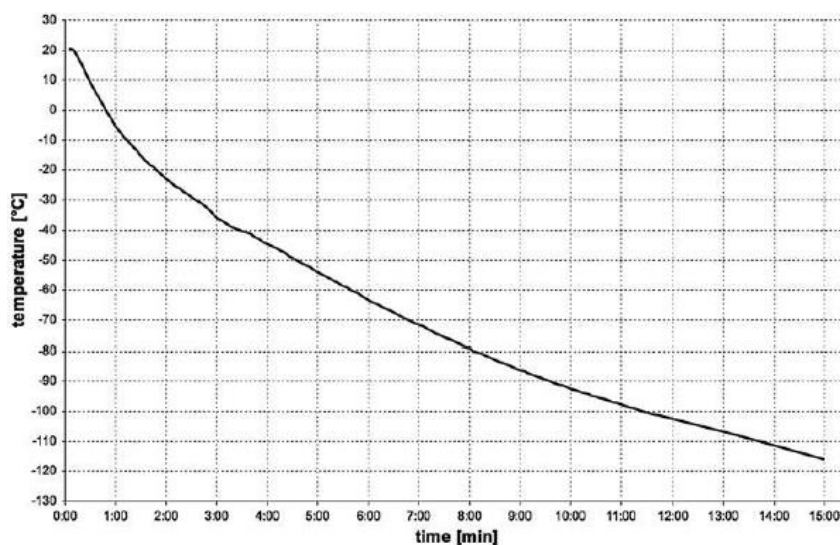


Figura 1.10: curva di raffreddamento di un campione di tessuto contenente 80 ml di VS83 EuroCollins-based, un farmaco a base di sodio e potassio, dopo una crioconservazione attuata con immersione in metilbutano a -140°C [29].

Un altro particolare esperimento è stato condotto utilizzando una catena di polidimetilsilossano (PDMS) nello studio di Lauk-Dubitski et al. [30]. Esso è idrofobico, con angolo di contatto di 90-120°, alto grado di evaporazione, bassa temperatura di transizione vetrosa (-123°C) e bassa viscosità e in precedenza è stato già utilizzato come refrigerante. È non tossico ed è un composto primario per biochip microfluidici. Controllando la temperatura di transizione vetrosa e l'agitazione meccanica, il risultato è che non si riscontrano particolari differenze morfologiche dei tessuti crioconservati, nemmeno fratture o danneggiamenti. Questo risulta in un processo di

crioconservazione che preserva bene il tessuto a livello istologico [30]. I vantaggi derivano dal fatto che si riducono le concentrazioni di soluzione crioprotettive tossiche: l'uso del PDMS di per sé permette la crioconservazione mettendo i tessuti a diretto contatto con la soluzione, grazie alle sue proprietà idrofobiche. Inoltre, questo studio riesce a stabilire una potenziale compatibilità con agenti crioprotettivi che riescono a penetrare nella soluzione, quindi rendendo possibili successive modificazioni in base al tipo di tessuto (nativo o ingegnerizzato). In ogni caso questo studio, condotto su valvola aortica e frammenti di aorta e trachea, è da prendere in considerazione solamente per campioni con spessore consistente [30] [Figura 1.11].

Anche la fase di scongelamento è estremamente importante. Nello studio dove si è utilizzato il PBS come soluzione crioconservante, per lo scongelamento, i campioni vengono rimossi dal PBS e, ancora all'interno di sacchetti adibiti al congelamento, lasciati a scongelare all'aria a temperatura ambiente per una serie arbitraria di minuti. Successivamente vengono immersi in un bagno di acqua alla temperatura controllata di 37°C, solitamente con agitazione intermittente. Il campione viene prelevato dal contenitore e posto in soluzione fisiologica. Il tessuto infine viene risciacquato prima di essere trasferito in DMEM [3,30] [Figura 1.12].

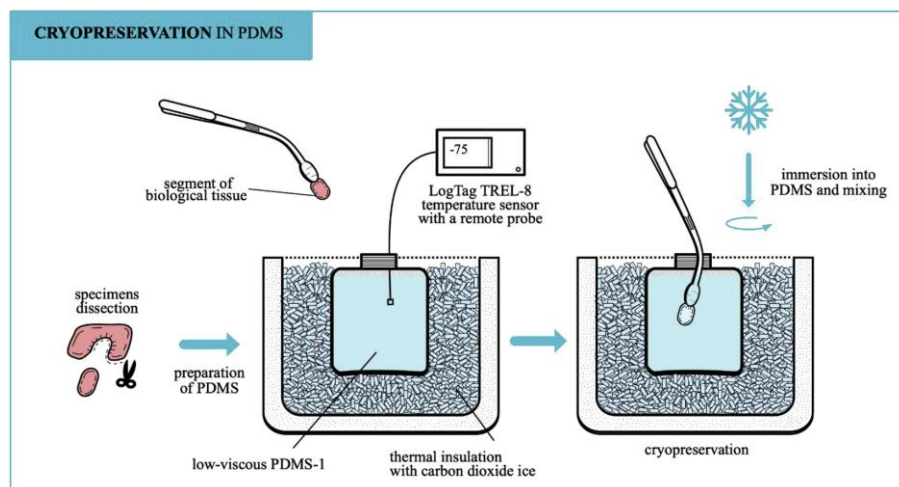
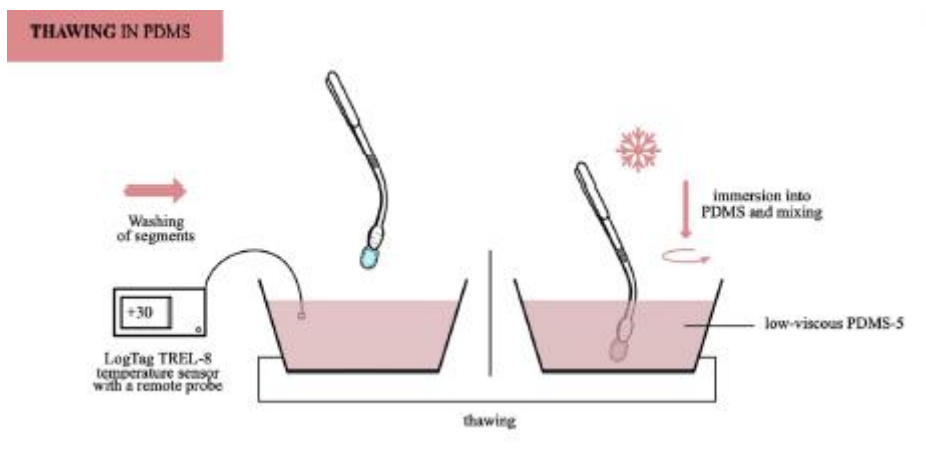


Figura 1.11: Crioconservazione in PDMS [30].



1.5.1 La decellularizzazione nella crioconservazione

Con il termine decellularizzazione si intende l'insieme delle tecniche utili a rimuovere da un tessuto/organo le componenti cellulari e i frammenti di acidi nucleici, che potrebbero evocare una reazione immunitaria nel ricevente. Infatti, tali componenti, se presenti sullo *scaffold* una volta impiantato, sono riconosciuti come estranei dall'organismo del ricevente innescando una risposta immunitaria acuta, causa di rigetto [31]. Per decellularizzare un tessuto/organo si utilizzano metodi fisici che portano alla lisi della membrana cellulare, metodi enzimatici che separano le componenti cellulari dalla ECM, e detergenti che solubilizzano le molecole lipidiche [32].

L'obiettivo della decellularizzazione non è solo quello di rimuovere la componente cellulare, ma anche di mantenere il più possibile integre la struttura e la composizione della ECM: in particolare, vanno preservate le proteine fibrose, i glicosamminoglicani e i proteoglicani oltre alle molecole bioattive, che supportano l'adesione, la proliferazione e la differenziazione cellulare [33].

Al fine di garantire una maggiore disponibilità di tessuti pronti all'uso, la decellularizzazione può essere associata alla crioconservazione.

Sono stati testati numerosi protocolli di decellularizzazione efficaci per preservare la ECM eliminando la componente cellulare che renderebbe uno xeno- o allo-trapianto esposti alla reazione avversa esercitata dal sistema immunitario del ricevente. Per questo motivo, decellularizzare il tessuto prima di crioconservarlo è possibile e può condurre a ottimi risultati perché vengono accoppiati i seguenti vantaggi:

- 1) eliminare il problema legato alla presenza di cellule mantenendo un buono stato biochimico e fisico delle componenti della ECM e la sua architettura;
- 2) conservare in ambiente sterile l'innesto per periodi di tempo prolungati aumentando così la disponibilità di tessuti nelle criobanche [34].

In particolare, nel lavoro di Iop et al. [24], le analisi istologiche condotte su un tessuto umano decellularizzato-crioconservato mostrano la completa assenza di componenti cellulari e la conservazione delle proteine strutturali della ECM. Questi risultati appaiono promettenti ai fini di garantire un'adeguata struttura della matrice e un comportamento meccanico simile ad un tessuto nativo [24].

Da test statistici condotti sui tessuti decellularizzati-crioconservati si dimostra che le cellule post-trattamento sono significativamente non vitali: è possibile allora ottenere così degli *scaffold* che non causino rigetto [29].

In futuro saranno necessari studi preclinici *in vivo* per verificare che il trattamento sia stato effettivamente in grado di ottenere un tessuto capace di essere adeguatamente ripopolato. Oltre a questo, in futuro questi studi si renderanno necessari per prevedere la funzionalità e la durata degli innesti: dopo la crioconservazione la biomeccanica dell'innesto potrebbe essere compromessa e influire negativamente sulla funzione meccanica e fisiologica dello *scaffold*. Se le prestazioni meccaniche di uno scaffold cambiano, comportamenti cellulari come il ripopolamento, il rimodellamento e la rigenerazione cellulare potrebbero non avere luogo [35]. Con il presente lavoro di tesi si vogliono caratterizzare le proprietà istologiche e meccaniche di alcuni tessuti porcini freschi e crioconservati. In particolare, sono stati presi in esame i tessuti che trovano applicazione in campo biomedico e nell'ingegneria tissutale: il pericardio, l'uretere, la sottomucosa dell'intestino e l'aorta. I risultati delle prove di trazione uniassiale relativi ai diversi tessuti analizzati sono stati comparati, permettendo di formulare ipotesi sul comportamento meccanico dei componenti della ECM. Le analisi istologiche permettono di evidenziare lo stato della ECM prima e dopo il trattamento di crioconservazione.

1.6 I tessuti porcini esaminati

1.6.1 Pericardio

Il pericardio è costituito da 2 componenti: pericardio fibroso e pericardio sieroso, per uno spessore totale di 1-2 mm. Il pericardio fibroso è costituito da tessuto connettivo fibroso denso che avvolge completamente il cuore senza aderirvi. Il pericardio sieroso, oggetto di analisi, è formato da due foglietti: il foglietto interno (viscerale) e il foglietto esterno (parietale), che riveste la superficie interna del pericardio fibroso. Il primo, che aderisce al cuore, è un singolo foglietto composto da cellule mesoteliali ciliate posto su un sottile strato sottosieroso di tessuto connettivo ricco di fibre elastiche. Lo strato sottosieroso contiene tessuto adiposo. Il foglietto fibroso (più esterno) è quello composto maggiormente da collagene ed elastina e, in particolare, da circa il 70% da collagene in prevalenza di tipo I e in secondo luogo di tipo III, il restante 30% di elastina [36,37] [Figura 1.13].

Il tessuto pericardico, di origine porcina e bovina, è ampiamente utilizzato in cardiocirurgia sia per la sostituzione di valvole cardiache che per il trattamento di disturbi congeniti. La sua microstruttura ricca di fibre elastiche e fasci di collagene, conferisce un'elevata resistenza alle sollecitazioni meccaniche, e tale resistenza, unita alla capacità di ritenzione dei punti di sutura, rappresentano in generale caratteristiche essenziali per l'applicazione in chirurgia cardiovascolare. La preparazione del tessuto pericardico consiste nel trattamento con aldeidi

che ne riducono l'immunogenicità, stabilizza la matrice proteica e agisce come sterilizzante e conservante per la conservazione [38,39].

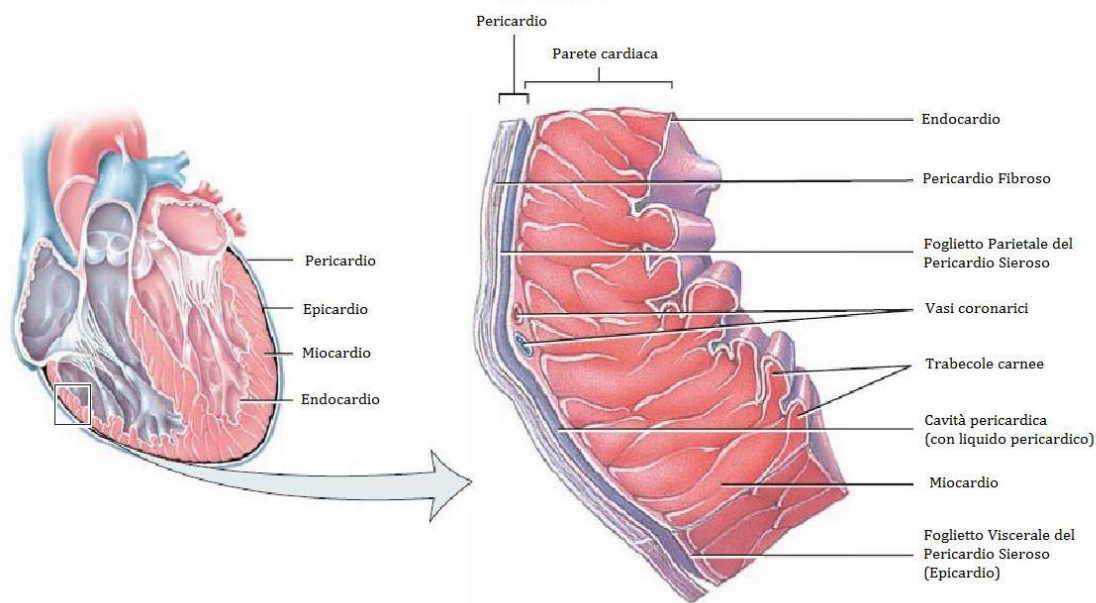


Figura 1.13: Gli strati del pericardio.

1.6.2 Uretere

La parete dell'uretere è costituita da una tonaca avventizia esterna, una tonaca muscolare liscia intermedia e una tonaca mucosa interna:

- Tonaca mucosa: consta di un urotelio (epitelio di transizione) che riveste una lamina propria connettivale densa. Nella parte più esterna, confinante con la tonaca muscolare, il connettivo diventa più lasso permettendo, così, la distensione;
- Tonaca muscolare: composta prevalentemente da cellule muscolari inserite in abbondante connettivo. I fasci muscolari sono separati fra di loro da abbondante tessuto connettivo e sono comunque presenti ramificazioni che li collegano tra di loro e/o con fasci adiacenti. Questo strato, essendo dotato di tali ramificazioni, è ricco di fibre elastiche. Si possono distinguere uno strato prevalentemente longitudinale, internamente, e uno circolare od obliquo esterno. Questa tonaca contrendosi permette il movimento fisiologico dell'uretere (la peristalsi) che spinge l'urina verso la vescica;
- Tonaca avventizia: costituita principalmente da tessuto connettivo lasso ricco di elastina che favorisce integrità strutturale e mantiene l'elasticità delle pareti dell'uretere [37] [Figura 1.14];

Nel complesso è presente collagene al 60-70% (prevalentemente di tipo III, reticolare e fibrillare), elastina al 10-15 %, ma varia molto dalla provenienza del tessuto [40].

La necessità di una ricostruzione uretrale viene dal fatto che esistono diversi casi di traumi all'uretra causati da infiammazione, stenosi ischemiche, difetti congeniti o da lesioni iatrogene come il mal posizionamento del palloncino di ancoraggio del catetere urinario. Inoltre, il cancro alla vescica, che si configura al decimo posto come incidenza fra tutti i tipi di cancro in tutto il mondo, può richiedere la diversione urinaria con un condotto uretrale ingegnerizzato [41]. Attualmente, gli scaffold che derivano da tessuti bioingegnerizzati di ureteri sono diventati un'opzione terapeutica, ma spesso la procedura chirurgica fallisce per via di stenosi e infiammazioni uretrali [42].

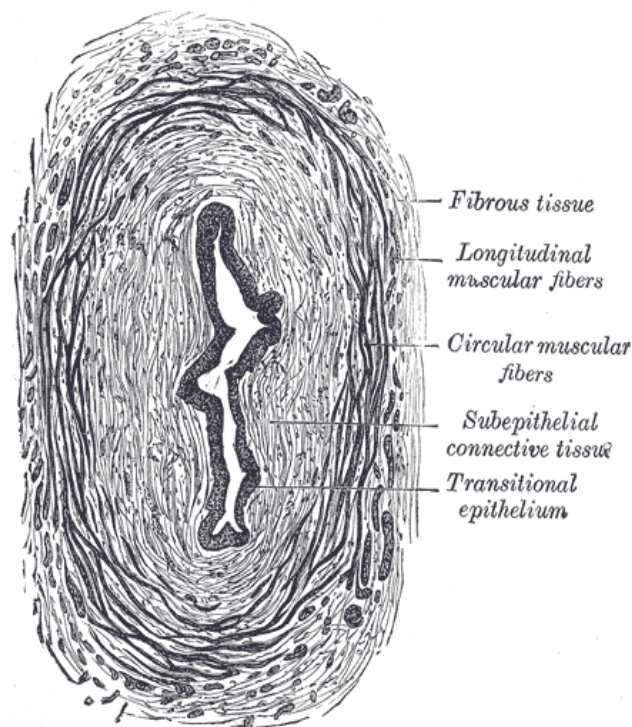


Figura 1.14: Sezione trasversale dell'uretere.

1.6.3 Aorta discendente

Le pareti dell'aorta discendente consistono di tre tonache:

- Tonaca intima: lo strato più interno. La sua componente principale è l'endotelio pavimentoso di rivestimento accompagnato da un sottile strato di connettivo elastico;
- Tonaca media: costituita da tessuto muscolare liscio, fibre elastiche e collagene rappresenta lo strato più spesso;
- Tonaca avventizia: il rivestimento esterno dei vasi ed è formata da tessuto connettivo lasso, nervi e vasi capillari [37] [Figura 1.15].

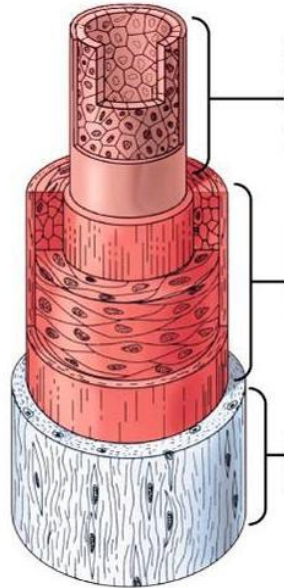


Figura 1.15: Struttura di un'arteria generica.

Nei vasi sanguigni è particolarmente presente il tessuto connettivo lasso, in tutte e 3 le tonache. L'elastina è particolarmente abbondante: le singole fibre si anastomizzano fra loro e si dispongono prevalentemente in direzione circonferenziale. Uno strato più interno di questa lo si può trovare fra intima e media e consente al vaso di ritirarsi dopo la distensione. Uno strato più esterno, sempre di elastina, molto meno sviluppato e compatto di quello interno, si trova sulla superficie esterna della tonaca media al suo confine con l'avventizia. Le fibre di collagene si ritrovano presenti in tutti e tre gli strati vasali. Il collagene di tipo I si raggruppa in grandi fasci ed è abbondante nell'avventizia, esternamente una guaina la riveste per dare un importante ruolo strutturale. In generale, il collagene e le fibre elastiche della media decorrono paralleli agli assi maggiori delle cellule muscolari nella media e sono quindi orientati prevalentemente in senso circolare. Al contrario, la disposizione preminente delle fibre collagene nell'avventizia è longitudinale [3,37].

L'interesse per questo tessuto è motivato dal fatto che nella chirurgia cardiovascolare è necessario spesso intervenire con la sostituzione di tessuto aortico a causa di difetti congeniti, malattie infiammatorie (vasculiti) o deterioramento delle pareti. Queste patologie comprendono disturbi che influenzano la struttura e la funzionalità dell'aorta, inclusi aneurismi e dissezioni. Ad esempio, uno stress meccanico dell'endotelio è causato da ipertensione arteriosa cronica o da un flusso aortico patologico a valle della valvola aortica quando questa è in disfunzione (congenita o patologica). In un'arteria si possono formare anche stenosi vascolari, che a loro volta rischiano di generare a valle dei vasi sanguigni dei trombi [43].

1.6.4 Sottomucosa dell'intestino

La sottomucosa intestinale è situata fra la mucosa (internamente) e la muscolare esterna dell'intestino ed in particolare della zona dell'ileo. La parete intestinale è costituita da 4 tonache: mucosa, sottomucosa, muscolare e avventizia. La tonaca sottomucosa è costituita da connettivo lasso contenente vasi e nervi. Le sue creste in rilievo formano il connettivo delle pliche circolari. La disposizione delle fibre di collagene ed elastina consentono notevoli variazioni dimensionali in senso trasversale e longitudinale associate alla peristalsi, assicurando un adeguato supporto di resistenza ed elasticità. Nel complesso la sottomucosa dell'intestino è molto eterogenea e la percentuale di composizione della microstruttura è variegata: il collagene può arrivare a comporre il tessuto connettivo fino al 90% (nel tratto duodenale) e principalmente è di tipo III (comparato con l'aorta risulta più sottile e flessibile del tipo I). L'elastina ricopre un ruolo fondamentale per la deformazione e lo *stretching* sulle pareti dell'intestino durante la digestione e la peristalsi [37,44].

La SIS presenta eccezionali vantaggi biologici, come buone proprietà meccaniche, compatibilità tissutale e bassa immunogenicità. La SIS è stata utilizzata per riparare e ricostruire vari tipi di difetti tissutali in modelli animali e applicazioni cliniche e, in particolare, nel trattamento di ernie, malattie del sistema urinario e traumi cutanei refrattari. La ECM della SIS costituisce un ottimo microambiente tridimensionale per segnalare alle cellule ospiti di migrare, crescere, formare nuovi vasi e favorire la differenziazione. Tuttavia, l'effetto a lungo termine della SIS nella riparazione e ricostruzione dei tessuti deve ancora essere ulteriormente indagato [45].

2 Materiali e metodi

Per eseguire le analisi sono stati presi i tessuti di interesse (pericardio, uretere, aorta longitudinale e sottomucosa dell'intestino) al macello di zona da scarti di macellazione di maiali di età massima 1 anno. I tessuti sono stati riposti in contenitori riempiti di soluzione fisiologica, prima di essere portati nel laboratorio situato in Torre della Ricerca Istituto di Ricerca Pediatrica Città della Speranza, Padova). In laboratorio i tessuti sono stati isolati mediante l'uso di pinzette e forbici, facendo attenzione a non danneggiarli: il pericardio è stato separato dal tessuto adiposo; dall'uretere è stato scartato il tessuto adiposo che lo contorna; l'aorta è stata privata del tessuto connettivo che la riveste esternamente; l'interno del digiuno è stato introflesso e da lì si sono rimosse le membrane sierosa e mucosa interna, per prelevare la membrana sottomucosa dell'intestino; successivamente, tutti i tessuti sono stati immersi in PBS (*Phosphate buffered saline*).

2.1 Crioconservazione

Per crioconservare i tessuti si sono presi come riferimento i protocolli riportati nelle pubblicazioni di Gerosa et al. [24,43] che a loro volta recepiscono le linee guida della Fondazione Banca dei Tessuti del Veneto [46].

Nell'esperimento del prof. Gerosa, il metodo di crioconservazione utilizzato viene applicato a tessuti allo- e xeno-genici porcini. Prima di essere congelati, i tessuti vengono posti in una soluzione di RPMI 1640 con 0.3 g/L di L-Glutamina alla quale viene aggiunto 10% di dimetilsolfossido (DMSO) e il 10% di una soluzione di albumina umana. Il terreno di coltura cellulare RPMI 1640 è utilizzato per la coltura di cellule e tessuti; il DMSO è un composto organico, appartenente alla famiglia dei solfossidi ed evita la formazione di cristalli di ghiaccio dovuti al congelamento; l'albumina umana è una proteina che funge da agente protettore.

Il protocollo adattato nell'ambito del presente lavoro prevede l'utilizzo di un terreno di coltura alternativo al RPMI 1640: il DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*). Il DMEM ricopre le stesse funzioni del RPMI 1640, ed è adatto a diversi fenotipi di cellule, contiene amminoacidi e vitamine concentrati, glucosio ed L-Glutamina. L'albumina umana è stata sostituita da FBS (*Fetal Bovine Serum*), cioè siero fetale bovino.

In estrema sintesi, il protocollo di criopreservazione prevede che i tessuti vengano posti in contenitori di polipropilene nella soluzione crioconservante così composta:

- 80% v/v DMEM;
- 10% v/v DMSO;
- 10% v/v FBS.

Le soluzioni crioconservanti contenenti i campioni vengono riposte in un freezer ad una temperatura controllata di -80°C . Al momento dell'utilizzo, i tessuti vengono scongelati in un bagnetto termostato a temperatura costante di 37°C dopo almeno 15 giorni di congelamento.

2.2 Analisi istologiche

Le analisi istologiche sono state eseguite sui campioni di tessuto nativo fresco e di tessuto nativo crioconservato per valutare lo stato di conservazione della struttura della ECM e la presenza di nuclei cellulari.

Tutti i tessuti, che abbiano subito o meno il trattamento di crioconservazione, vengono ricoperti con OCT (*Optimal Cutting Compound*), ovvero un composto che congela rapidamente il tessuto evitando la formazione di cristalli di ghiaccio: l'OCT non penetra il tessuto e previene così possibili danneggiamenti al campione. Inoltre, l'OCT viene utilizzato perché è facilmente rimovibile dai vetrini prima di effettuare una colorazione.

Per la preparazione dei vetrini, i campioni di tessuto congelati sono stati sezionati al criostato Leica CM1850 UV (Leica, Wetzlar, Germany) settato ad una temperatura di -26°C e ad uno spessore di taglio di $6\ \mu\text{m}$. Le sezioni di tessuto sono state poi raccolte su dei vetrini porta-oggetto polarizzati; e per consentire al tessuto di aderire bene alla superficie tramite attrazione elettrostatica, lo si lascia asciugare orizzontalmente per almeno 10 minuti; successivamente, i vetrini sono conservati a -20°C finché non viene effettuata la colorazione.

2.2.1 Le colorazioni

Per le analisi istologiche sono state effettuate 3 colorazioni differenti: Ematossilina ed Eosina (HE), Masson Tricromica con blu di anilina (MT), Alcian Blue (AB).

2.2.1.1 Ematossilina e eosina (HE)

L'HE è una colorazione istologica che permette di visualizzare il citoplasma e le componenti del tessuto connettivo con varie intensità di rosa, mentre i nuclei vengono evidenziati in blu/violetto. Il protocollo previsto dal kit (Bio-Optica, codice kit 04-061010) prevede i seguenti passaggi:

- immersione in H_2O distillata per 1 minuto;
- immersione nel reagente A (ematossilina);
- 5 immersioni in H_2O di fonte;

- immersione nel reagente B (soluzione di viraggio, 5 gocce diluite precedentemente in 50 ml di H₂O distillata) per 1 minuto;
- 5 immersioni in H₂O di fonte;
- immersione nel reagente C (eosina);
- 5 immersioni in etanolo al 95% per due volte;
- 5 immersioni in etanolo al 100% per due volte;
- immersione in Xilene per 1 minuto;
- montaggio con montante non acquoso.

Il vetrino deve essere attentamente asciugato dopo ogni immersione in H₂O e in etanolo per togliere l'eccesso e per non diluire troppo le soluzioni successive facendo attenzione a non danneggiare le sezioni di tessuto. I vetrini al termine del procedimento vengono lasciati ad asciugare sotto cappa chimica aspirante per una notte.

2.2.1.2 Masson Tricromica con blu di anilina (MT)

La MT è una colorazione istologica che colora i nuclei in nero, il citoplasma e il tessuto muscolare in rosso e il tessuto connettivo in blu. Anche in questa colorazione, i vetrini seguono un procedimento descritto nel kit fornito da Bio-Optica (codice kit: 04-010802), nel dettaglio:

- immergere in H₂O distillata per 1 minuto;
- ricoprire il vetrino con 10 gocce di reagente A (Ematossilina ferrica secondo Weigert) e 10 gocce di reagente B (Ematossilina ferrica secondo Weigert) e si attendono 10 minuti;
- senza lavare, sgocciolare ed asciugare il vetrino;
- ricoprire il vetrino con 10 gocce di reagente C (acido picrico soluzione alcolica) e si attendono 4 minuti;
- lavare rapidamente (3-4) immersioni in acqua distillata e lasciare la sezione di colore giallo;
- ricoprire il vetrino con 10 gocce di reagente D (soluzione Ponceau B) e attendere 4 minuti
- lavare bene in H₂O distillata e ricoprire il vetrino con 10 gocce di reagente E (Acido fosfomolibdico soluzione) attendendo 10 minuti;
- ricoprire direttamente il vetrino con 10 gocce di reagente F (blu di Anilina secondo Masson) attendendo 5 minuti;
- lavare in H₂O distillata e disidratare rapidamente con la seguente serie ascendente dell'alcol:
 - 1 immersione in etanolo al 30%;
 - 1 immersione in etanolo al 100%;

- immersione in Xilene per 1 minuto;
- montaggio con montante viscoso.

2.2.1.3 Alcian blu (AB)

L'AB a pH 2.5 è una colorazione istologica che principalmente evidenzia le sialomucine, cioè glicoproteine, in azzurro/blu e i nuclei delle cellule in rosso. Nel kit di colorazione (Abcam, codice kit: ab150662) sono forniti i reagenti *Nuclear Fast Red Solution* e *Acetic Acid Solution*.

Il procedimento eseguito prevede:

- immersione in H₂O distillata per 3 min;
- immersione in Acido Acetico per 3 minuti tenendo il contenitore sigillato per non far evaporare la soluzione;
- immersione in Alcian Blue per 30 minuti;
- risciacquo in H₂O corrente per 4 minuti facendo attenzione a non rivolgere il getto dalla parte del vetrino sulla quale sono poste le sezioni;
- 2 immersioni in H₂O distillata;
- immersioni in Fast Red Solution per 5 minuti;
- risciacquo in H₂O corrente per 4 minuti;
- 2 immersioni in H₂O distillata;
- immersione in 30% etanolo;
- immersione in 100% etanolo;
- immersione in Xilene per 1 minuto;
- montaggio con montante viscoso.

Le immagini delle sezioni di tessuto colorato sono state acquisite con il microscopio ottico EVOS XL CORE e processate con il software Invitrogen System ottenendo ingrandimenti di 10x o 20x. Le immagini ottenute sono state modificate con il programma ImageJ (National Institutes of Health, USA) per Windows.

2.3 Analisi biomeccaniche

Per eseguire le prove di trazione si è adoperato il sistema TRAMA (*TRAction Machine*), prodotto dall'azienda padovana IRS (Ingegneria Ricerca Sistemi). Tale dispositivo è predisposto per eseguire prove di trazioni meccaniche mono e bi-assiali e permette la caratterizzazione biomeccanica dei tessuti biologici: imponendo una deformazione al provino ad osso di cane, viene registrata l'evoluzione della tensione nel tempo. Con il sistema TRAMA

si possono impostare diverse prove meccaniche per valutare le proprietà caratteristiche di un materiale, come l'anisotropia, la viscoelasticità e il comportamento non lineare.

TRAMA è costituito di una base d'appoggio a cui sono ancorati 4 motori attuatori disposti a 90° l'un l'altro, dotati di bracci meccanici e 4 slitte che scorrono per permettere la deformazione del provino [Figura 2.1]. L'allungamento massimo totale che possono misurare le slitte è di 70 mm. I bracci meccanici sono dotati anche di celle di carico della capacità massima di 50 N per la registrazione della forza applicata al provino durante la prova. Al termine dei bracci meccanici, sono presenti degli aggrappaggi dotati di viti per poter ancorare il campione e permettere la trazione. Su tali ganasce i tessuti vengono ancorati per mezzo di spilli e/o di carta vetrata per fissare stabilmente il campione [Figura 2.2].

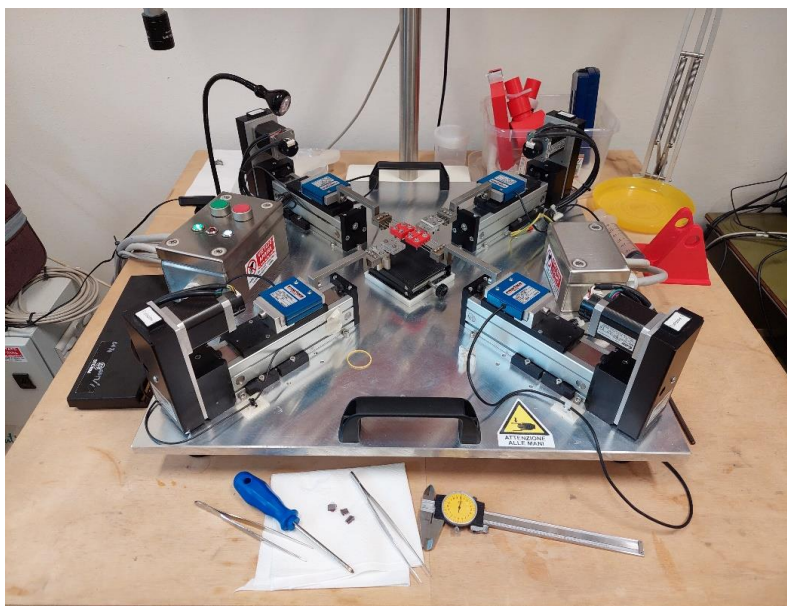


Figura 2.1: Il sistema TRAMA (IRS, Padova) per le prove meccaniche sperimentali.

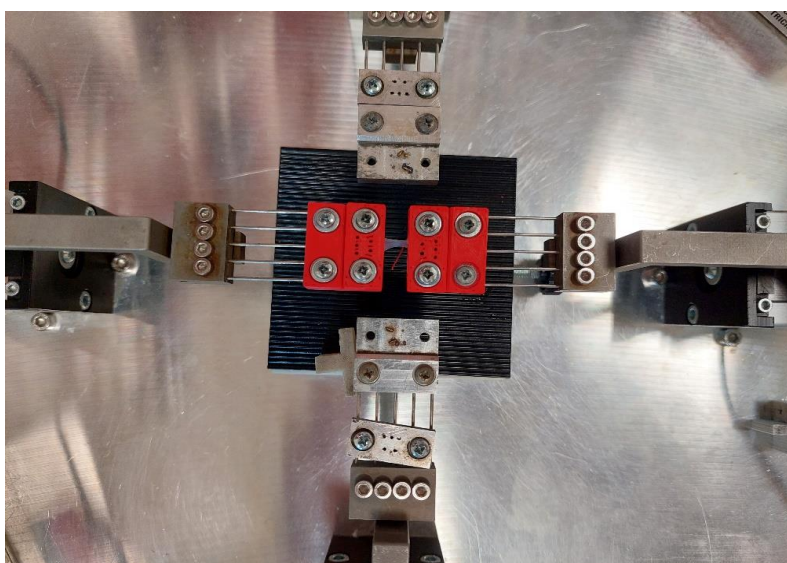


Figura 2.2: Dettaglio del campione di tessuto (pericardio porcino nativo crioconservato) fissato tra le ganasce.

Il sistema TRAMA è dotato di un'interfaccia grafica, sviluppata in ambiente *Labview*, attraverso la quale fornisce i dati raccolti delle prove sperimentali. I dati vengono elaborati e i risultati inseriti in un file excel, in formato “.csv”, che contiene le seguenti specifiche:

1. **ID**: numero dei campioni;
2. **Seq**: sequenza associata al tipo di movimento che sta eseguendo la macchina;
3. **Cycle**: indica il numero di cicli di carico-scarico eseguiti;
4. **Sub**: indica il tipo di movimento eseguito dagli attuatori (sub = 4 si allontanano, sub=6 si avvicinano);
5. **Picture**: numero dell'immagine acquisita;
6. **Dt**: istante di tempo;
7. **F1**: forza registrata dalla cella di carico 1 espressa in [N];
8. **F2**: forza registrata dalla cella di carico 2 espressa in [N];
9. **F3**: forza registrata dalla cella di carico 3 espressa in [N];
10. **F4**: forza registrata dalla cella di carico 4 espressa in [N];
11. **d1**: spostamento registrato dall'attuatore 1 espresso in [mm];
12. **d2**: spostamento registrato dall'attuatore 2 espresso in [mm];
13. **d3**: spostamento registrato dall'attuatore 3 espresso in [mm];
14. **d4**: spostamento registrato dall'attuatore 4 espresso in [mm];
15. **Temp**: temperatura a cui è stata effettuata la prova.

In ogni prova meccanica e per ogni tessuto, sono stati abilitati i motori M1 ed M3, in altri termini sono state impostate deformazioni in elongazione lunga la direzione degli assi 1 e 3 in modo da registrare le forze registrate F1 ed F3. Il provino viene montato sugli aggrappaggi appartenenti agli attuatori 1 e 3. Dalla somma degli spostamenti dei due attuatori si ottiene l'elongazione totale del provino, mentre dalla media delle due forze registrate, la forza agente sul campione.

Inizialmente, il tessuto viene steso su una superficie di lavoro, dopodiché viene effettuato un taglio longitudinale per l'uretere, l'aorta discendente e per la sottomucosa dell'intestino. Per quanto riguarda il pericardio, non avendo una forma tubulare e una distribuzione delle fibre uniforme, il campione di interesse viene scelto dopo un'ispezione visiva.

Per eseguire le prove di trazione monoassiale, dai diversi tessuti si ricava un provino a forma di “osso di cane” per mezzo di una fustella, che misura 30 mm di lunghezza e 10 mm di larghezza. Una volta montato il provino sugli aggrappaggi, la lunghezza iniziale è $L_0=5$ mm e la larghezza iniziale $w=2$ mm [Figura 2.3]. La forma del provino viene ricavata tramite l'utilizzo di una fustella e con l'aiuto di bisturi. Con il calibro digitale (*Mitutoyo*, modello ID-C112XB,

Aurora, Illinois, USA) si ricava lo spessore di due coprivetrini, si ripone il provino tra di essi e si ricava lo spessore totale (provino + coprivetrini): sottraendo da quest'ultima misura gli spessori dei due vetrini, si ricava quello del solo provino [Figura 2.4].



Figura 2.3: Provino a forma di osso di cane di lunghezza $L_0=5$ mm e di larghezza 2 mm ottenuto da uretere nativo fresco.

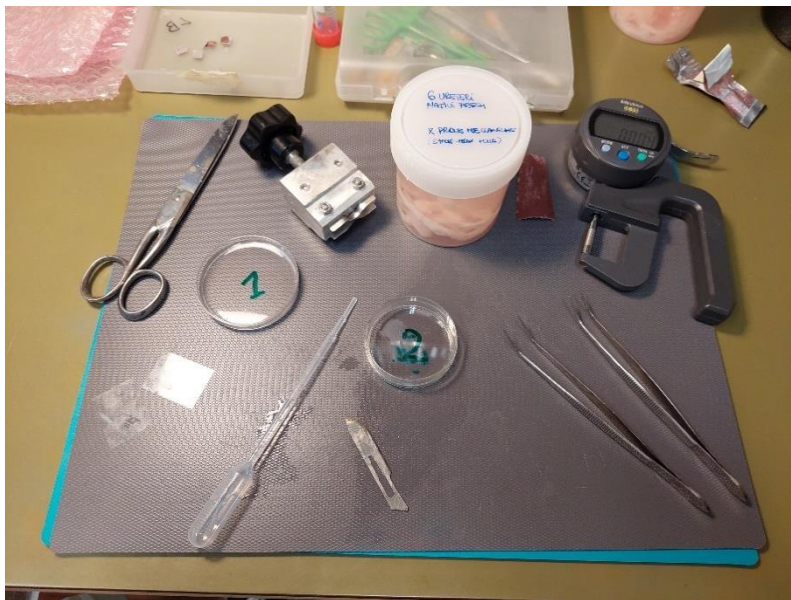


Figura 2.4: La strumentazione utilizzata per ottenere i provini per le prove meccaniche di trazione monoassiale, da sx: forbici, vetrini, piastre, pipetta, bisturi, fustella, carta vetrata, pinzette, calibro digitale.

2.3.1 Prove di trazione monoassiale

Prima di iniziare le prove meccaniche a trazione monoassiale, i campioni subiscono un pretensionamento di 0.1 N. La velocità impostata per la deformazione dei campioni di tessuto

è stata mantenuta a 0.1 mm/s per ogni attuatore (0.2 mm/s totale). Per ogni prova e per ogni tessuto sono stati analizzati 9 campioni provenienti da 3 animali differenti.

Sono state eseguite 3 tipologie di prove di trazione monoassiale:

1. **A ROTTURA**: il campione viene deformato fino a raggiungere la rottura [Figura 2.5].

L'unico step è il seguente:

- i. Spostamento di 20 mm.

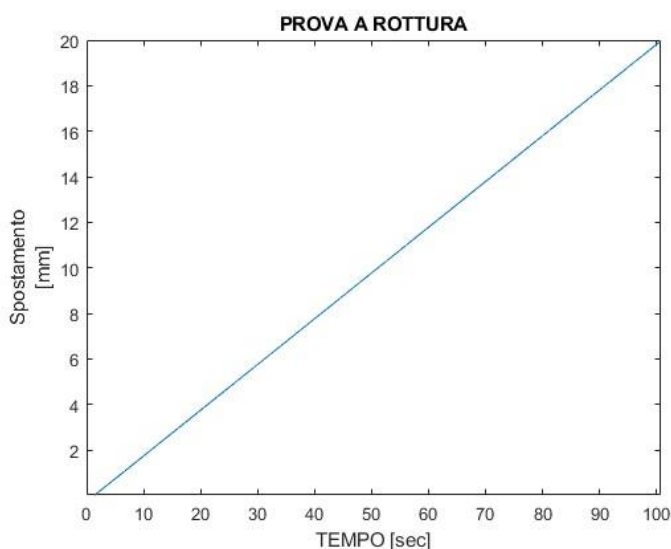


Figura 2.5: Esempio di grafico dello spostamento registrato nel tempo in una prova di trazione monoassiale a rottura.

2. **CICLI**: in una prova ciclica il campione prima di subire una deformazione a rottura viene preconditionato, cioè subisce 5 cicli di carico-scarico a deformazioni crescenti pari al 10%, 20%, 30% e 40% della lunghezza iniziale:

- i. spostamento di 0.5 mm ripetuto per 5 volte;
- ii. pausa di 20 secondi;
- iii. spostamento di 1 mm ripetuto per 5 volte;
- iv. pausa di 20 secondi;
- v. spostamento di 1.5 mm ripetuto per 5 volte;
- vi. pausa di 20 secondi;
- vii. spostamento di 2 mm ripetuto per 5 volte;
- viii. pausa di 20 secondi;
- ix. spostamento di 20 mm.

3. **STRESS RELAXATION**: nelle prove di stress relaxation, durante le quali si misura il rilassamento delle tensioni, il provino viene mantenuto ad una deformazione costante del 10%, 20%, 30% e 40%:

- i. spostamento di 0.5 mm;

- ii. pausa di 300 secondi;
- iii. spostamento di 1 mm;
- iv. pausa di 300 secondi;
- v. spostamento di 1.5 mm;
- vi. pausa di 300 secondi;
- vii. spostamento di 2 mm;
- viii. pausa di 300 secondi;

2.3.2 Analisi dei dati

I risultati dei test eseguiti sono stati elaborati con l'utilizzo del software Matlab R2022b (MathWorks, Massachusetts, USA). Si riassumono di seguito le misure effettuate in fase sperimentale:

- L_0 è la lunghezza longitudinale utile del provino e corrisponde alla distanza iniziale dei due aggrappaggi su cui viene posto; $L_0=5$ mm;
- w è la larghezza utile del campione; $w=2$ mm (assunta costante nel tempo);
- d è lo spessore del provino; la sua misura cambia per ogni singolo provino;

E come sono state elaborate in fase di progetto:

- F è la forza esercitata lungo la direzione di trazione ed è data, punto per punto, dalla media delle due forze registrate dalle celle di carico 1 e 3; $F=(F_1+F_3)/2$;
- ΔL è lo spostamento totale nella direzione di trazione ed è data, punto per punto, dalla somma dei due spostamenti registrati dagli attuatori 1 e 3; $\Delta L =d_1+d_3$;

La tensione esercitata dal provino durante le prove, espressa in MPa, è ottenuta dal rapporto fra la forza esercitata sull'area della sezione trasversale del campione, ovvero $A=w*d$. I valori di tensione si misurano come:

$$\sigma=F/A$$

La deformazione, espressa in percentuale, è il rapporto fra l'allungamento che viene imposto al campione e la lunghezza iniziale di quest'ultimo:

$$\epsilon=\Delta L/L_0*100$$

Per valutare e confrontare le caratteristiche meccaniche di ogni singolo provino si sono ricavati dai grafici ottenuti con Matlab i parametri caratteristici:

- **Ultimate Tensile Strength UTS** [MPa]: rappresenta il massimo valore di tensione raggiunto dal campione durante la prova, misurato in corrispondenza della sua rottura;
- **Failure strain FS** [%]: è il massimo valore di deformazione raggiunto dal campione durante la prova, che viene raggiunto anch'esso in corrispondenza della sua rottura.

Il punto di rottura, in un grafico di tensione vs. deformazione avrà quindi coordinate (FS, UTS). Il modulo di Young viene calcolato come rapporto fra la tensione e la deformazione nel tratto lineare della curva ed è misurato in MPa. Questo parametro caratterizza la rigidità del tessuto e, di conseguenza, il suo comportamento meccanico. Osservando la curva tenso-deformativa che si ottiene da ogni provino posto a trazione, si può notare come essa sia lineare in due tratti diversi caratterizzati da pendenze diverse. Di conseguenza, si possono misurare due diversi valori di rigidità:

- E_1 [MPa]: modulo di Young iniziale; calcolato fra 1% e il 10% di deformazione (nei cicli viene calcolato dopo il condizionamento);
- E_2 [MPa]: modulo di Young finale; calcolato in un intervallo del 10% di deformazione prima della FS.

La prova di *stress relaxation* fornisce un grafico dove in ascissa si trova il tempo di rilassamento ($t_{max}=300$ s) e in ordinata il valore della tensione normalizzato σ/σ_{max} . La curva che deriva dalla media di tutti i campioni di un tipo di tessuto parte al primo istante $t_0=0$ dal valore normalizzato di tensione $\sigma/\sigma_{max}=1$ e, decrescendo nel tempo, arriva ad un valore minimo normalizzato di tensione alla fine del rilassamento, ovvero all'istante finale t_{max} . Il rilassamento è la differenza percentuale fra il valore massimo iniziale e il valore minimo finale.

2.3.3 Analisi statistiche

Per tutte le prove effettuate sono stati calcolati la media e la deviazione standard utilizzando Microsoft Excel 2018:

- ROTTURA → UTS, FS, E_1 , E_2
- CICLI → UTS, FS, E_1
- STRESS RELAXATION → RELAX
- SPESSORI

I dati ottenuti sono stati sottoposti a test statistici per valutare la significatività delle eventuali differenze fra i valori dei parametri misurati. Il test statistico utilizzato è il test T di Student o T-test. La formula utilizzata è quella di Excel e tiene conto delle due serie di valori da mettere a confronto, della loro media e della deviazione standard. In particolare, il rapporto fra la differenza delle medie delle due popolazioni e la variabilità dei dati (deviazione standard) è direttamente proporzionale alla probabilità che la differenza fra le due popolazioni sia significativa. I set di parametri che si mettono a confronto sono considerati indipendenti e il tipo di test è a due vie.

I risultati ottenuti si ritengono statisticamente significativi quando il p-value è minore di 0.05.

3 Risultati

In questo capitolo sono mostrati i risultati ottenuti dalle analisi istologiche, ovvero le colorazioni con Ematossilina ed Eosina (HE), Masson Tricromica (MT) e Alcian Blue (AB), che sono servite per verificare le eventuali differenze tra tessuto nativo fresco e tessuto nativo crioconservato. Vengono poi riportati i risultati delle prove meccaniche di trazione uniassiale (a rottura, prove cicliche e di stress relaxation). Nel dettaglio si sono calcolati i seguenti parametri: Ultimate Tensile Strength (UTS), Failure Strain (FS), Modulo di Young iniziale (E_1), Modulo di Young finale (E_2) per le prove a rottura; UTS, FS, E_1 per le prove cicliche; il rilassamento percentuale del tessuto per le prove di stress relaxation. Infine, si riportano i parametri di UTS, FS, ed E_1 comparati tra le prove a rottura e le prove cicliche. Tutti i parametri esaminati vengono riportati mettendo a confronto il tessuto nativo crioconservato con il corrispondente tessuto nativo fresco, applicando il test T di Student per valutare le possibili differenze.

3.1 Istologie

Per esaminare la struttura della ECM di tutti i tessuti considerati e per valutare se il protocollo di crioconservazione possa averne modificato le caratteristiche, sono state effettuate le colorazioni con Ematossilina ed Eosina (HE), Masson Tricromica (MT) e Alcian Blue (AB). In Figura 3.1 si vedono le istologie relative al pericardio porcino. Dalle immagini si può notare la presenza del tessuto connettivo (HE ed MT), delle cellule mesoteliali (HE) e dei glicosamminoglicani (AB). Nella Figura 3.2 sono stati confrontati i campioni di tessuto nativo fresco e crioconservato relativi all'uretere porcino. È facilmente distinguibile l'endotelio a forma stellata tipica dell'uretere; procedendo dal lume verso l'esterno, si identificano anche la parte restante della tonaca mucosa, cioè la lamina propria connettivale, e la tonaca muscolare (colorata di rosso nella MT). Nei tessuti crioconservati si può notare come l'endotelio si sia ridotto.

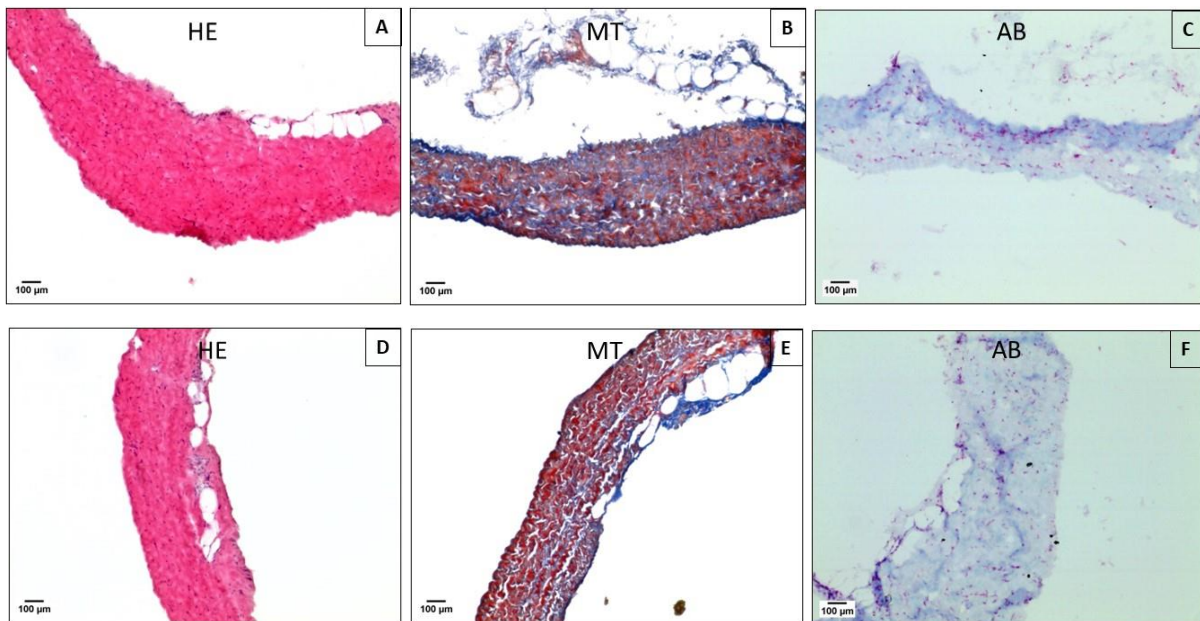


Figura 3.1: Pannello del pericardio porcino nativo. Sopra il tessuto nativo fresco (A-B-C) e sotto il nativo crioconservato (D-E-F): colorazioni di Ematossilina ed Eosina (A-D), Masson Tricromica (B-E) e Alcian Blue (C-F). Ingrandimento al microscopio Invitrogen: 20x.

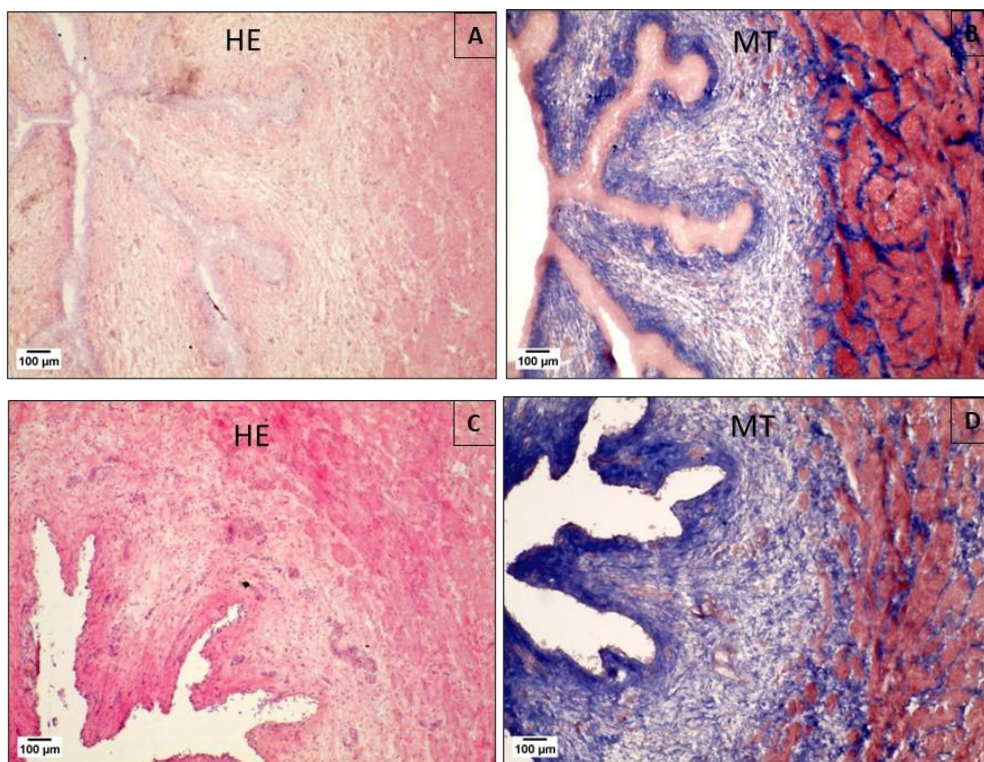


Figura 3.2: Pannello dell'uretere porcino. Sopra il tessuto nativo fresco (A-B) e sotto il nativo crioconservato (C-D): colorazioni di Ematossilina ed Eosina (A-D) e Masson Tricromica (B-E). Ingrandimento al microscopio Invitrogen: 10x.

Nella Figura 3.3 sono riportate le colorazioni dei campioni di aorta discendente e della SIS delle quali si è eseguita la colorazione di HE. Anche in questo pannello, i tessuti nativi freschi e crioconservati sono messi a paragone. Nell'aorta discendente si distinguono la tonaca intima e

la tonaca media, nella SIS si apprezza la struttura variegata e composta dalle 4 tonache: mucosa, sottomucosa, muscolare e avventizia.

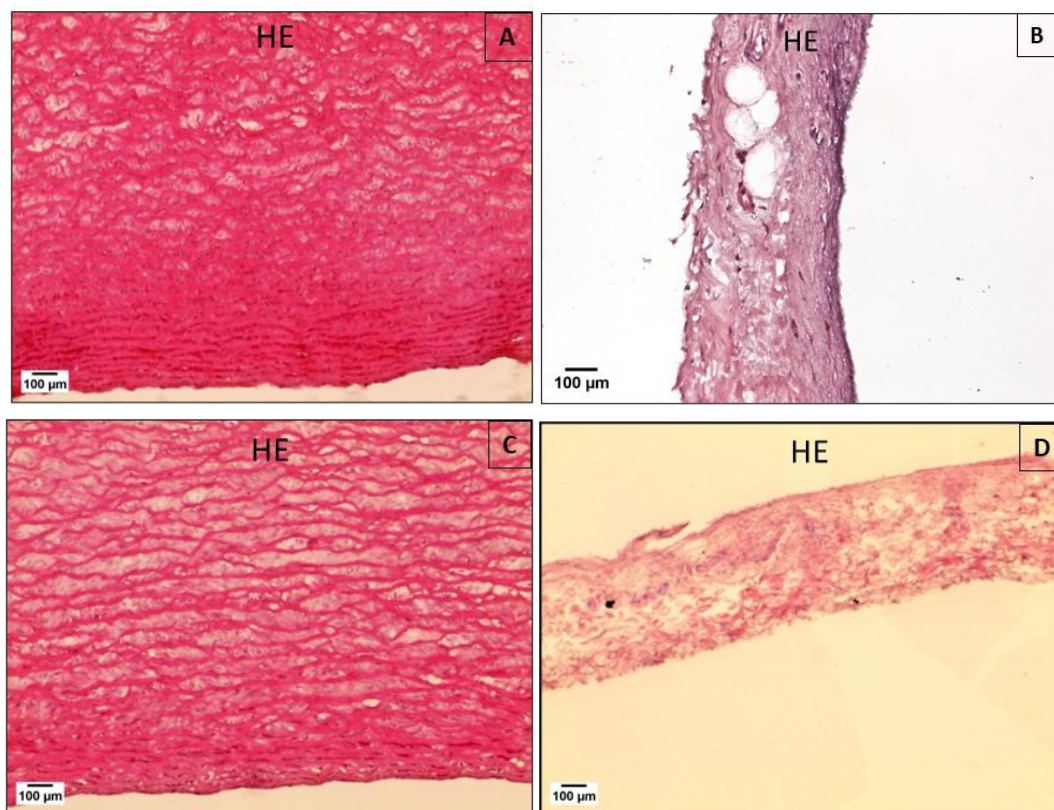


Figura 3.3: Pannello dell'aorta discendente porcina a sinistra (A e C) e della SIS porcina a destra (B e D). Sopra il nativo fresco (A-B) e sotto il nativo crioconservato (C-D): colorazioni con Ematossilina ed Eosina. Ingrandimento al microscopio Invitrogen: 20x

Le immagini riportate nelle Figure 3.1, 3.2 e 3.3 mostrano chiaramente la presenza dei nuclei che sono colorati in viola nella HE, in nero nella MT, e in rosso nell'AB. In generale, in tutte le colorazioni, è evidente come la presenza dei nuclei sia inferiore nelle immagini relative ai tessuti nativi crioconservati. Alcune aggregazioni di cellule sono facilmente distinguibili in HE ed AB e si nota come queste siano meno identificabili nei tessuti nativi crioconservati. Dalle istologie si possono anche fare delle considerazioni sull'ECM, la cui architettura rimane omogenea e ben conservata. Il congelamento del tessuto non provoca particolari alterazioni alle fibre perché non si notano evidenti lacune all'interno della matrice, né variazioni della disposizione delle fibre.

3.2 Caratterizzazione meccanica

3.2.1 Spessori

Prima di eseguire le prove meccaniche, sono stati misurati gli spessori di tutti i campioni utilizzando un calibro digitale come descritto nel capitolo precedente. Per ogni tessuto è stata calcolata la media e la deviazione standard su un totale di 27 campioni che vengono riportate nella Tabella 3.1 per il pericardio, nella Tabella 3.2 per l'uretere, nella Tabella 3.3 per l'aorta discendente e nella Tabella 3.4 per la SIS. Si mettono a confronto il tessuto nativo fresco con il crioconservato e, dunque, viene riportato il p-value calcolato con il test T di Student. Si noti come per i tessuti di aorta discendente e SIS non si sia presa in considerazione la direzionalità del tessuto perché questa non ha alcuna influenza sullo spessore del provino.

PERICARDIO	SPESSORE [mm]	P-VALUE
NATIVO FRESCO	0.1595 +/- 0.0356	0.7456
NATIVO CRIOCONSERVATO	0.1618 +/- 0.0406	

Tabella 3.1: Valori di media e deviazione standard per gli spessori del pericardio porcino e p-value.

URETERE	SPESSORE [mm]	P-VALUE
NATIVO FRESCO	0.9169 +/- 0.2190	0.3411
NATIVO CRIOCONSERVATO	0.9684 +/- 0.2155	

Tabella 3.2: Valori di media e deviazione standard per gli spessori dell'uretere porcino e p-value.

AORTA DISCENDENTE	SPESSORE [mm]	P-VALUE
NATIVO FRESCO	1.6749 +/- 0.3651	0.0056
NATIVO CRIOCONSERVATO	1.4858 +/- 0.005495	

Tabella 3.3: Valori di media e deviazione standard per gli spessori dell'aorta discendente porcina e p-value.

SIS	SPESSORE [mm]	P-VALUE
NATIVO FRESCO	0.1404 +/- 0.0927	0.2247
NATIVO CRIOCONSERVATO	0.1263 +/- 0.0199	

Tabella 3.4: Valori di media e deviazione standard per gli spessori della SIS porcina e p-value.

Nella Figura 3.4, vengono riportati in *boxplot* i valori degli spessori dei tessuti porcini nativi freschi e nativi crioconservati. Nei *boxplot* si indicano le differenze statisticamente significative dovute alla crioconservazione. Il valore del test T di Student, qui come nel seguito, è riportato come:

- * per un p-value < 0.05;
- ** per un p-value < 0.01.

Confrontando i valori degli spessori di tutti i tessuti si può dire che, se sottoposti al protocollo di crioconservazione, hanno generalmente una standard deviation più bassa. Il

valor medio dello spessore non varia di molto, ma aumenta leggermente nel caso del pericardio (+0,20%), dell'uretere (+5,62%) e diminuisce nell'aorta discendente (-11,29%) e nella SIS (-10,93%). Dall'analisi statistica si deduce che il processo di crioconservazione non produce differenze statisticamente significative tranne che nel caso dell'aorta discendente.

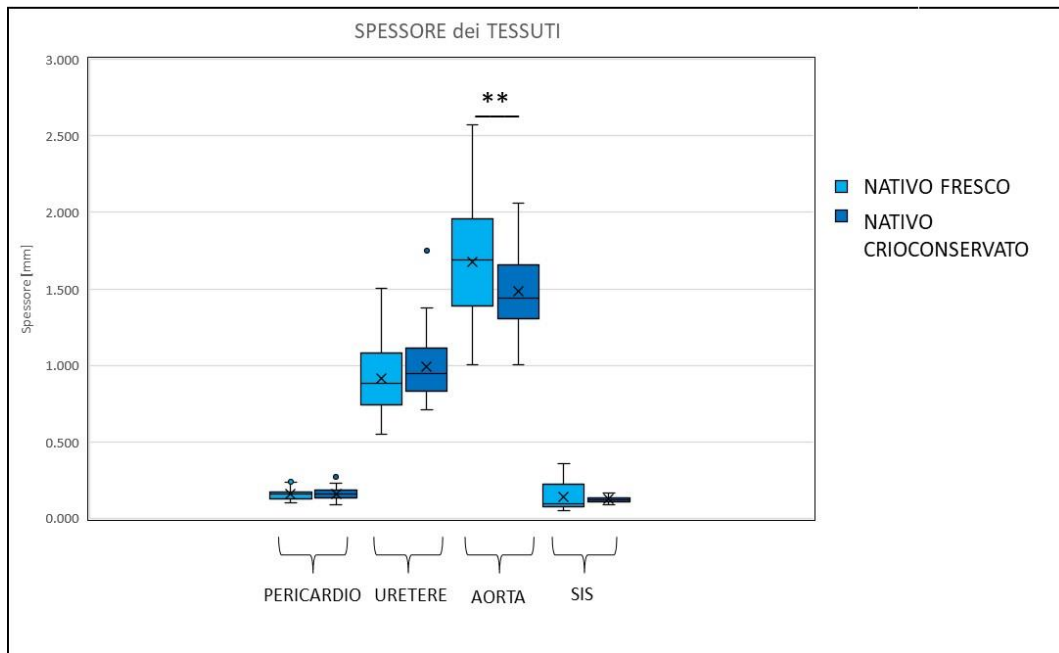


Figura 3.4: Confronto tra i valori dello spessore dei tessuti nativi freschi e criopreservati.

3.2.2 Prove di trazione monoassiale

Di seguito, si riportano i risultati ottenuti dalle prove di trazione monoassiale a rottura, cicliche e di stress relaxation eseguite su campioni di pericardio porcino, uretere porcino, aorta discendente porcina (longitudinale e circonferenziale) e SIS porcina (longitudinale e circonferenziale), nativi e crioconservati, secondo i protocolli descritti nel precedente capitolo.

3.2.2.1 Prove a rottura

In questa sezione vengono riportati i risultati delle prove a rottura e, in particolare, i valori di *Ultimate Tensile Strength* (UTS), *Failure Strain* (FS), *Modulo di Young iniziale* (E_1) e *Modulo di Young finale* (E_2).

Nelle Figure dalla 3.5 alla 3.10 sono illustrate le tipiche curve tensione-deformazione a rottura per ogni tessuto analizzato. Il tessuto nativo crioconservato è messo a confronto con il corrispondente controllo. Nei grafici è possibile notare l'andamento della tensione di una prova

a rottura. Il valore di tensione ultima UTS, dal quale si ricava l'allungamento massimo FS, è riconoscibile individuando il punto in cui il provino giunge a rottura.

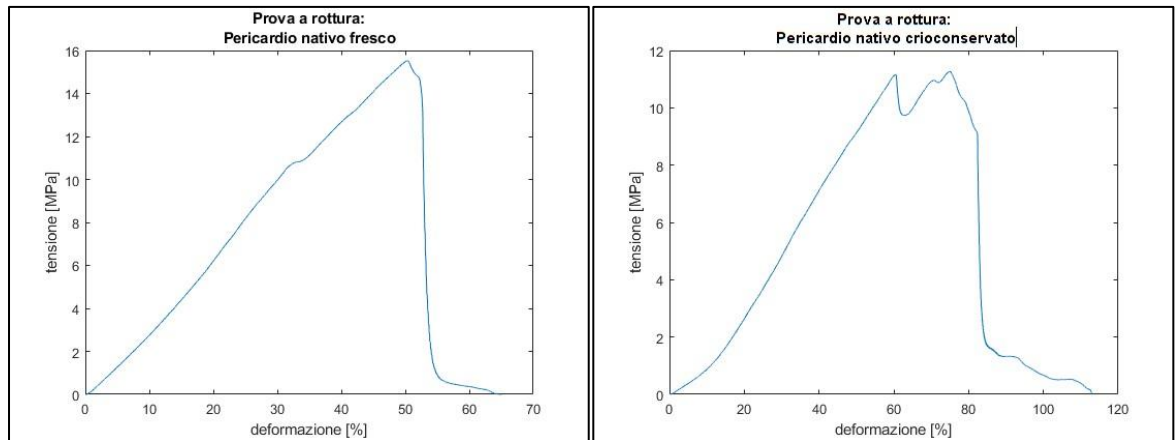


Figura 3.5: Esempio di curva tenso-deformativa ottenuta da una prova di trazione monoassiale a rottura su pericardio porcino nativo fresco (a sinistra) e crioconservato (a destra).

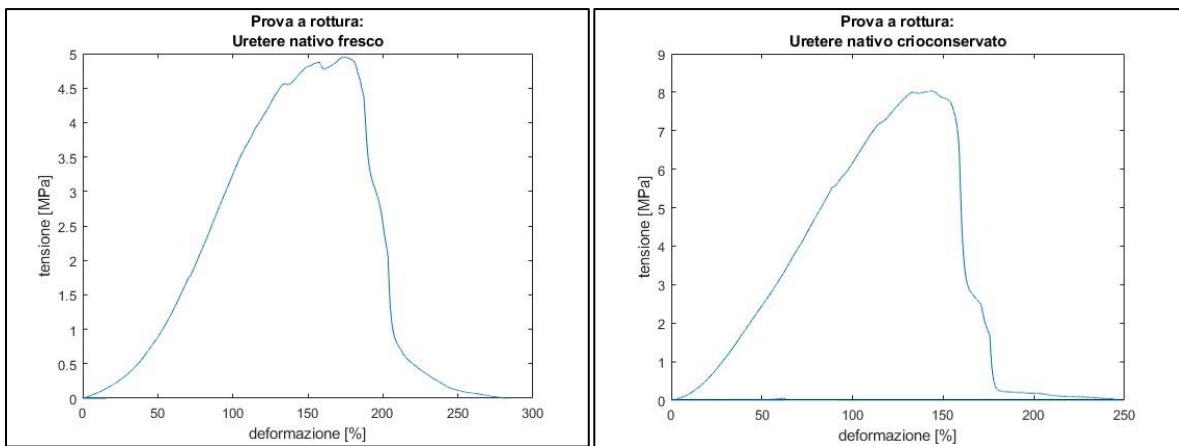


Figura 3.6: Esempio di curva tenso-deformativa ottenuta da una prova di trazione monoassiale a rottura su uretere porcino nativo fresco (a sinistra) e crioconservato (a destra).

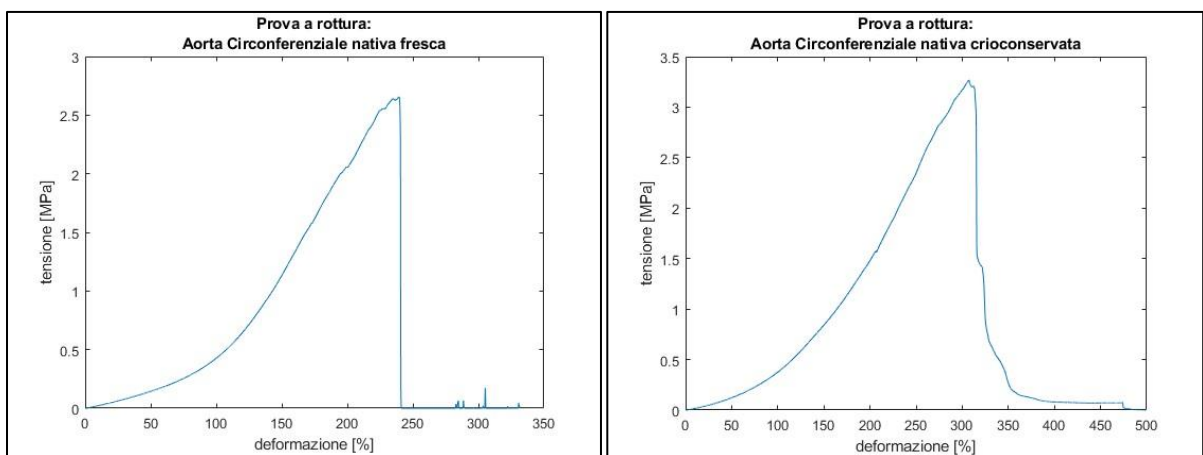


Figura 3.7: Esempio di curva tenso-deformativa ottenuta da una prova di trazione monoassiale a rottura su aorta circonferenziale porcina nativa fresca (a sinistra) e crioconservata (a destra).

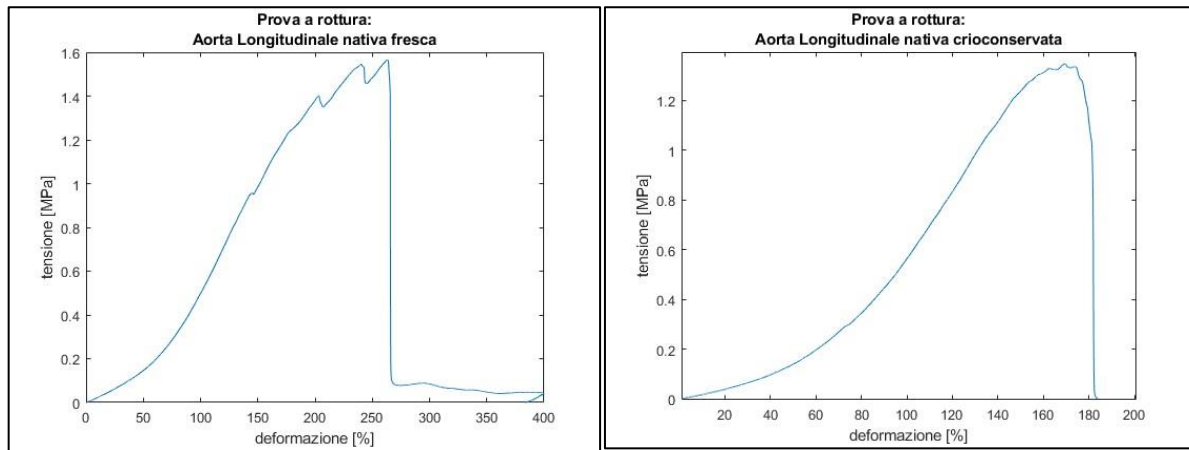


Figura 3.8: Esempio di curva tenso-deformativa ottenuta da una prova di trazione monoassiale a rottura su aorta longitudinale porcina nativa fresca (a sinistra) e crioconservata (a destra).

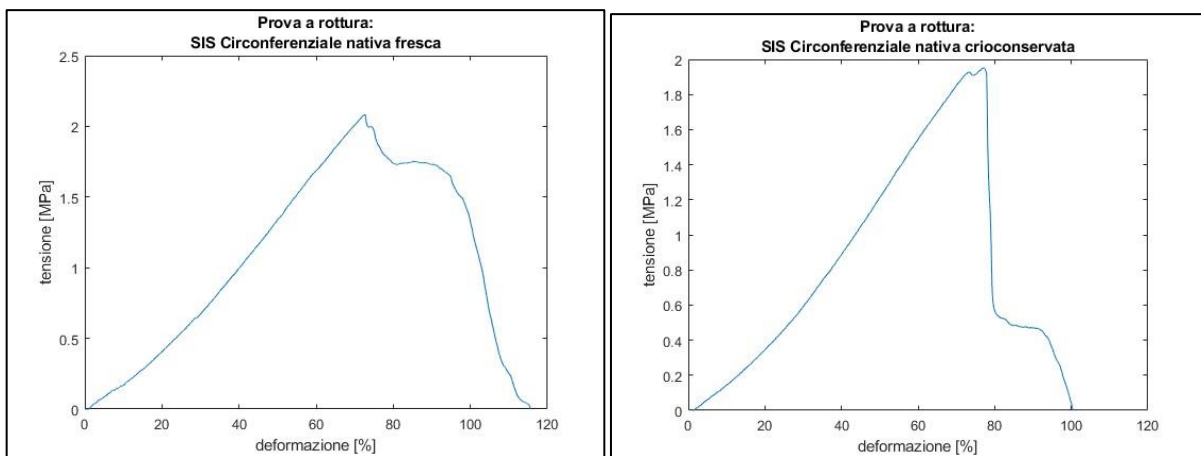


Figura 3.9: Esempio di curva tenso-deformativa ottenuta da una prova di trazione monoassiale a rottura su SIS circonferenziale porcina nativa fresca (a sinistra) e crioconservata (a destra).

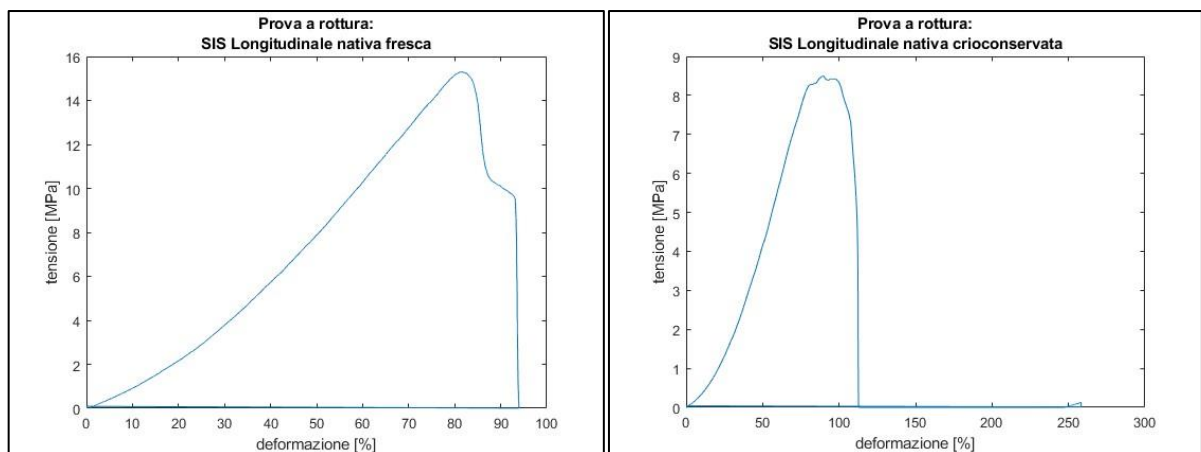


Figura 3.10: Esempio di curva tenso-deformativa ottenuta da una prova di trazione monoassiale a rottura su SIS longitudinale porcina nativa fresca (a sinistra) e crioconservata (a destra).

Nelle Tabelle dalla 3.5 alla 3.10 viene riportato il confronto dei valori medi con deviazione standard di UTS, FS, E_1 ed E_2 ricavati dalle prove a rottura dal tessuto nativo crioconservato a confronto con il controllo non crioconservato. I valori ottenuti sono stati calcolati su 3 campioni di ogni tessuto, dai quali si ricavano 3 provini per un totale di 9 misure per ogni tipo di tessuto.

PERICARDIO	UTS [MPa]	FS [%]	E₁ [MPa]	E₂ [MPa]
NATIVO FRESCO	15.9974 +/- 2.2894	79.67 +/- 18.94	13.0124 +/- 6.6030	29.7469 +/- 14.2167
CRIOCONSERVATO	16.7424 +/- 7.7864	95.01 +/- 59.61	7.7323 +/- 4.2509	21.1319 +/- 18.3508

Tabella 3.5: Media e deviazione standard dei valori di UTS, FS, E₁ ed E₂ per le prove a rottura del pericardio porcino nativo fresco e crioconservato.

URETERE	UTS [MPa]	FS [%]	E₁ [MPa]	E₂ [MPa]
NATIVO FRESCO	7.3379 +/- 1.2988	158.61 +/- 23.93	6.5722 +/- 2.8603	6.4796 +/- 1.6011
CRIOCONSERVATO	3.7258 +/- 0.7541	283.9 +/- 107.25	2.9322 +/- 1.0924	2.4537 +/- 0.8817

Tabella 3.6: Media e deviazione standard dei valori di UTS, FS, E₁ ed E₂ per le prove a rottura dell'uretere porcino nativo fresco e crioconservato.

AORTA LONGITUDINALE	UTS [MPa]	FS [%]	E₁ [MPa]	E₂ [MPa]
NATIVO FRESCO	1.8118 +/- 0.5760	226.15 +/- 39.09	0.2032 +/- 0.0343	1.2268 +/- 0.6534
CRIOCONSERVATO	1.7073 +/- 0.4965	188.86 +/- 26.89	0.1989 +/- 0.0667	1.4300 +/- 0.4586

Tabella 3.7: Media e deviazione standard dei valori di UTS, FS, E₁ ed E₂ per le prove a rottura per aorta longitudinale porcina nativa fresca e crioconservata.

AORTA CIRCONFERENZIALE	UTS [MPa]	FS [%]	E₁ [MPa]	E₂ [MPa]
NATIVO FRESCO	2.7554 +/- 0.7377	245.44 +/- 39.28	0.2566 +/- 0.0301	1.8900 +/- 0.7540
CRIOCONSERVATO	3.5575 +/- 0.3766	249.53 +/- 34.21	0.1999 +/- 0.0580	1.8836 +/- 0.6569

Tabella 3.8: Media e deviazione standard dei valori di UTS, FS, E₁ ed E₂ per le prove a rottura dell'aorta circonfrenziale porcina nativa fresca e crioconservata.

SIS LONGITUDINALE	UTS [MPa]	FS [%]	E₁ [MPa]	E₂ [MPa]
NATIVO FRESCO	14.0612 +/- 5.8148	82.86 +/- 27.98	0.7658 +/- 0.2453	16.1216 +/- 5.9777
CRIOCONSERVATO	7.3938 +/- 2.5528	90.75 +/- 10.09	3.6763 +/- 1.2973	9.1002 +/- 4.3901

Tabella 3.9: Media e deviazione standard dei valori di UTS, FS, E₁ ed E₂ per le prove a rottura della SIS longitudinale porcina nativa fresca e crioconservata.

SIS CIRCONFERENZIALE	UTS [MPa]	FS [%]	E₁ [MPa]	E₂ [MPa]
NATIVO FRESCO	2.3448 +/- 1.2015	60.16 +/- 13.92	4.4830 +/- 1.8819	4.2477 +/- 2.8182
CRIOCONSERVATO	2.2356 +/- 0.5054	95.92 +/- 36.15	1.6800 +/- 1.3230	2.8195 +/- 0.9039

Tabella 3.10: Media e deviazione standard dei valori di UTS, FS, E₁ ed E₂ per le prove a rottura della SIS circonfrenziale porcina nativa fresca e crioconservata.

Dalle tabelle precedenti si possono ricavare informazioni riguardanti il comportamento, in generale, di un tessuto crioconservato rispetto al suo controllo per una prova a rottura. Si può infatti notare come il tessuto crioconservato porcino spesso raggiunga a rottura tensioni più basse e allo stesso tempo una deformazione maggiore, anche se questa tendenza non è confermata per i seguenti tessuti:

- pericardio crioconservato, che presenta un valore di UTS leggermente più alto, ma con una standard deviation maggiore;
- uretere crioconservato, che riporta una FS quasi due volte maggiore di quella del nativo fresco;

- aorta longitudinale, che raggiunge una UTS di poco inferiore a quella del controllo.

Prendendo in esame i tessuti testati in direzione longitudinale e circonferenziale, si può dire che l'aorta longitudinale presenta una minore UTS ed una minore FS rispetto alla circonferenziale, mentre nella SIS circonferenziale, rispetto alla longitudinale, UTS è minore e FS è maggiore.

Osservando i moduli di Young iniziale E_1 e finale E_2 si può affermare che tutti, ad eccezione della SIS longitudinale, diminuiscono. Quindi, nei tessuti crioconservati:

- la pendenza della curva di tensione-deformazione mostra un profilo con una pendenza generalmente minore;
- viene esibita una minor rigidità durante una prova di trazione monoassiale.

Osservando i risultati di tutte le misure, si può notare come la SD sia mediamente più contenuta nel tessuto crioconservato, con una maggior riproducibilità delle misure. Fa eccezione il pericardio, che mostra una SD maggiore in UTS, FS ed E_2 .

Vengono riportati di seguito i risultati dell'analisi statistica del confronto fra il tessuto nativo fresco e il crioconservato sui parametri di interesse. I p-value ottenuti mediante Test di Student sono stati riportati nelle Tabelle 3.11-3.16.

PERICARDIO	UTS [MPa]	FS [%]	E_1 [MPa]	E_2 [MPa]
p-value	0.2459	0.6132	0.0996	0.8008

Tabella 3.11: Test di Student applicato ai parametri UTS, FS, E_1 ed E_2 per le prove a rottura del pericardio porcino nativo fresco e crioconservato.

URETERE	UTS [MPa]	FS [%]	E_1 [MPa]	E_2 [MPa]
p-value	0.4647	0.6689	0.0001	0.0001

Tabella 3.12: Test di Student applicato ai parametri UTS, FS, E_1 ed E_2 per le prove a rottura dell'uretere porcino nativo fresco e crioconservato.

AORTA LONGITUDINALE	UTS [MPa]	FS [%]	E_1 [MPa]	E_2 [MPa]
p-value	0.6851	0.0180	0.8281	0.4826

Tabella 3.13: Test di Student applicato ai parametri UTS, FS, E_1 ed E_2 per le prove a rottura dell'aorta longitudinale porcina nativa fresca e crioconservata.

AORTA CIRCONFERENZIALE	UTS [MPa]	FS [%]	E_1 [MPa]	E_2 [MPa]
p-value	0.0339	0.8168	0.0233	0.9850

Tabella 3.14: Test di Student applicato ai parametri UTS, FS, E_1 ed E_2 per le prove a rottura dell'aorta circonferenziale porcina nativa fresca e crioconservata.

SIS LONGITUDINALE	UTS [MPa]	FS [%]	E_1 [MPa]	E_2 [MPa]
p-value	0.0361	0.2878	0.0004	0.0120

Tabella 3.15: Test di Student applicato ai parametri UTS, FS, E_1 ed E_2 per le prove a rottura della SIS longitudinale porcina nativa fresca e crioconservata.

SIS CIRCONFERENZIALE	UTS [MPa]	FS [%]	E ₁ [MPa]	E ₂ [MPa]
p-value	0.7901	0.0506	0.0002	0.0850

Tabella 3.16: Test di Student applicato ai parametri UTS, FS, E₁ ed E₂ per le prove a rottura della SIS circonferenziale porcina nativa fresca e crioconservata.

Negli istogrammi delle Figure dalla 3.11 alla 3.14, che riproducono i valori medi di UTS, FS, E₁ ed E₂ di tutti i tessuti analizzati con prova a rottura, si indicano le differenze statisticamente significative dovute alla crioconservazione.

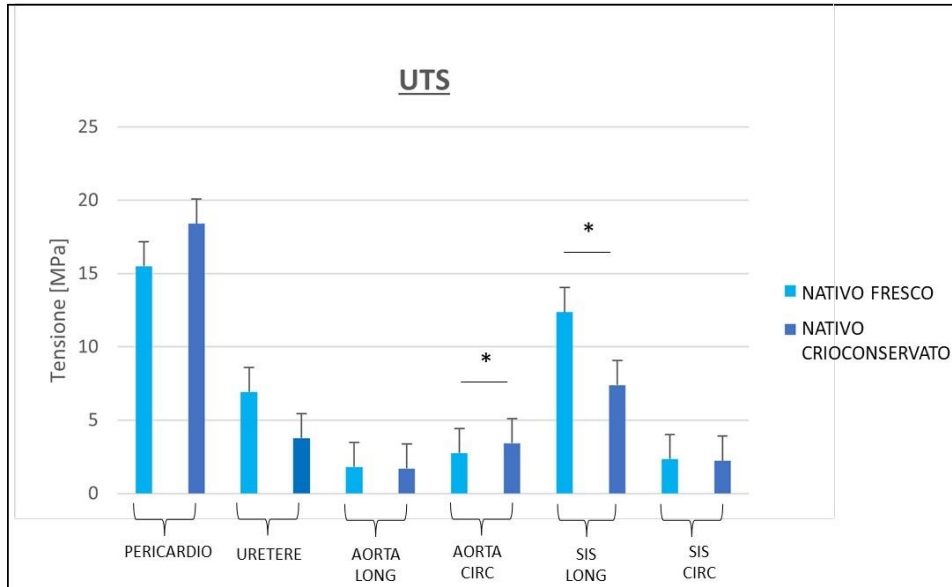


Figura 3.11: Confronto tra i valori medi di UTS nelle prove a rottura per tutti i tessuti analizzati.

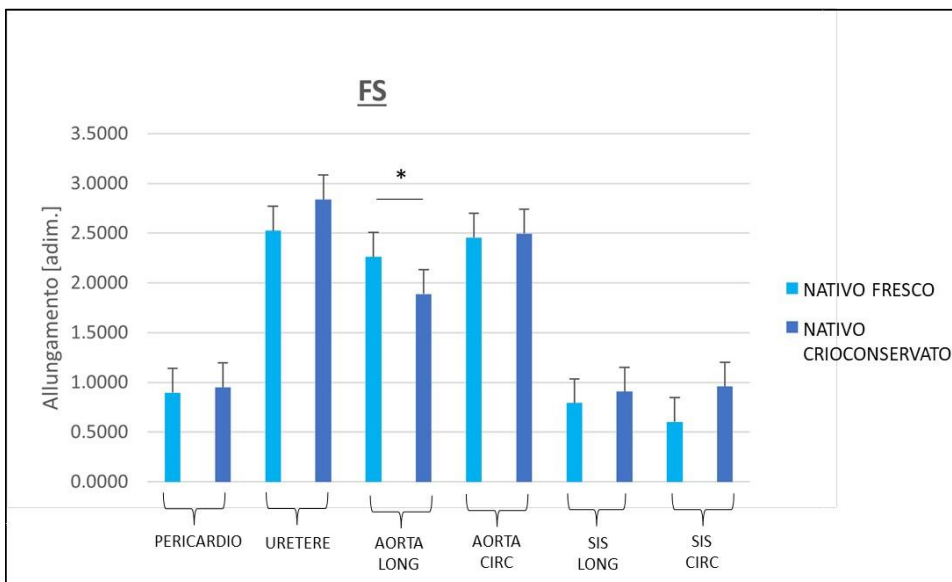


Figura 3.12: Confronto tra i valori di FS nelle prove a rottura per tutti i tessuti analizzati.

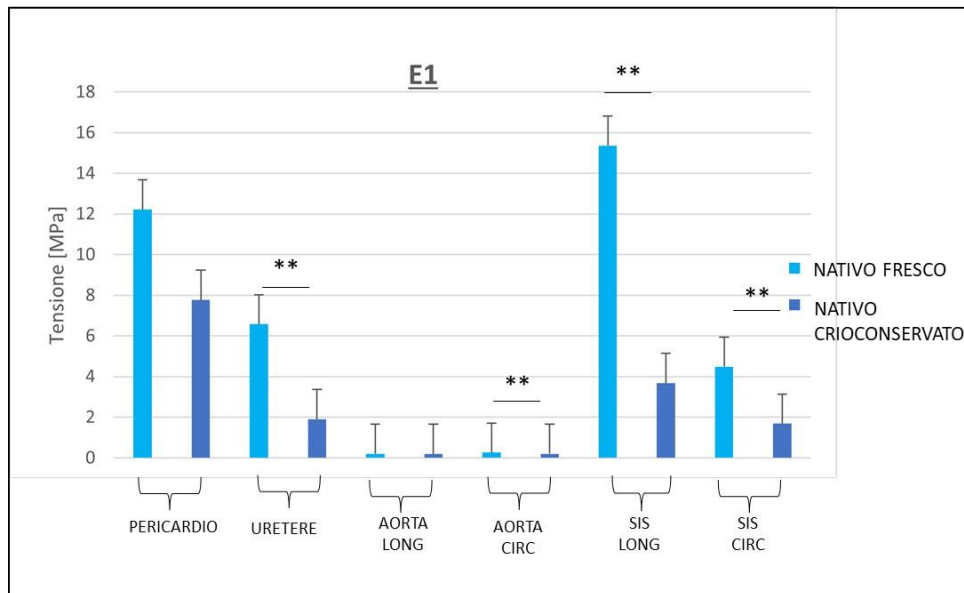


Figura 3.13: Confronto tra i valori di E_1 nelle prove a rottura per tutti i tessuti analizzati.

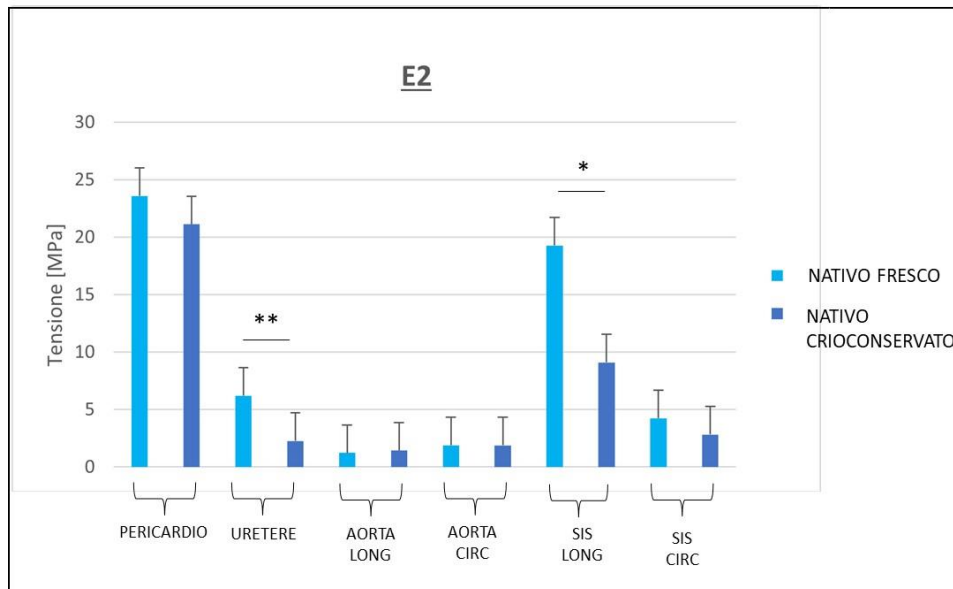


Figura 3.14: Confronto tra i valori di E_2 nelle prove a rottura per tutti i tessuti analizzati.

Dai p-value ottenuti con il Test di Student non si riscontrano differenze significative tra pericardio nativo fresco e pericardio nativo crioconservato, in quanto per tutti i valori ottenuti il p-value è sempre maggiore di 0.05. Nell'uretere è presente una differenza significativa accentuata per quanto riguarda entrambi i moduli elastici E_1 ed E_2 . Dai risultati, inoltre, si può notare una differenza statisticamente significativa nel valore di FS lungo la direzione longitudinale dell'aorta discendente e di UTS ed E_1 in direzione circonferenziale. La SIS longitudinale presenta un p-value minore di 0.05 per i valori di UTS ed E_2 , mentre in entrambe le direzioni presenta un p-value molto minore della soglia di significatività di E_1 .

3.2.2.2 Prove cicliche

In questa sezione vengono riportati i risultati delle prove cicliche e, in particolare, i valori di *Ultimate Tensile Strength* (UTS), *Failure Strain* (FS), *Modulo di Young iniziale* (E_1) ricavati da tutti i tessuti analizzati.

Nelle Figure dalla 3.15 alla 3.20 viene fornito un esempio di diagramma di tensione-deformazione delle prove di trazione monoassiale cicliche per ogni tessuto analizzato. Il tessuto nativo crioconservato è messo a confronto con il rispettivo controllo non crioconservato. Nei grafici è possibile notare i cicli di pretensionamento effettuati su ogni provino prima di portare quest'ultimo a rottura.

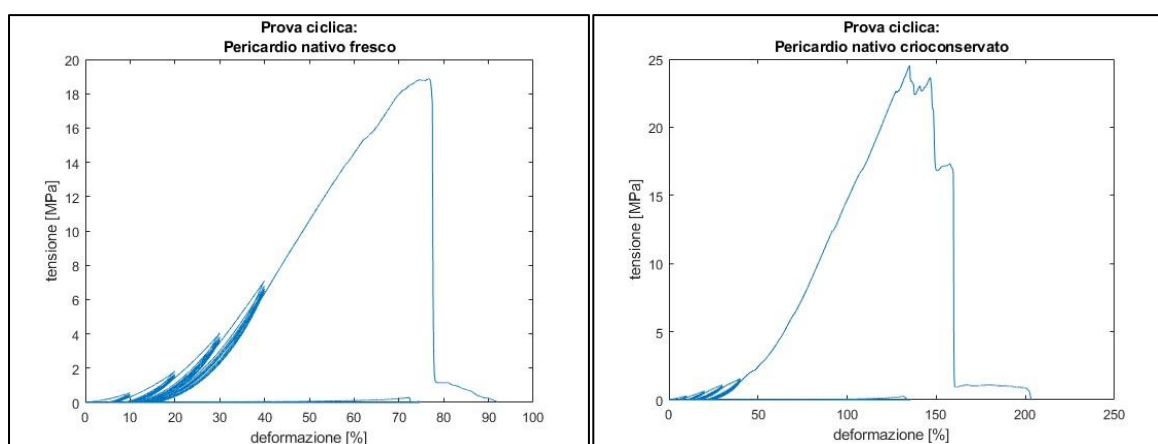


Figura 3.15: Esempio di curva tenso-deformativa ottenuta da una prova di trazione monoassiale ciclica su pericardio porcino nativo fresco (a sinistra) e crioconservato (a destra).

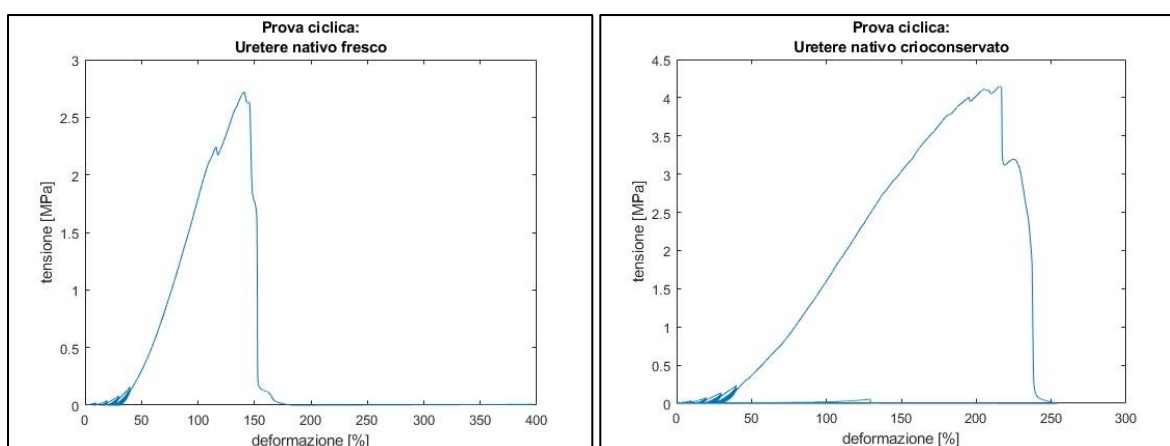


Figura 3.16: Esempio di curva tenso-deformativa ottenuta da una prova di trazione monoassiale ciclica su uretere porcino nativo fresco (a sinistra) e crioconservato (a destra).

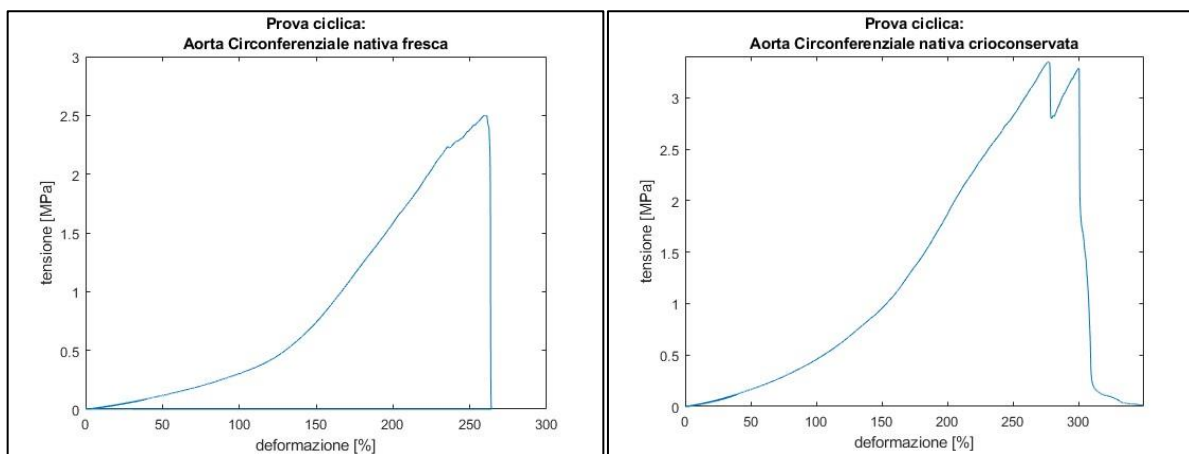


Figura 3.17: Esempio di curva tenso-deformativa ottenuta da una prova di trazione monoassiale ciclica su aorta circonfrenziale porcina nativa fresca (a sinistra) e crioconservata (a destra).

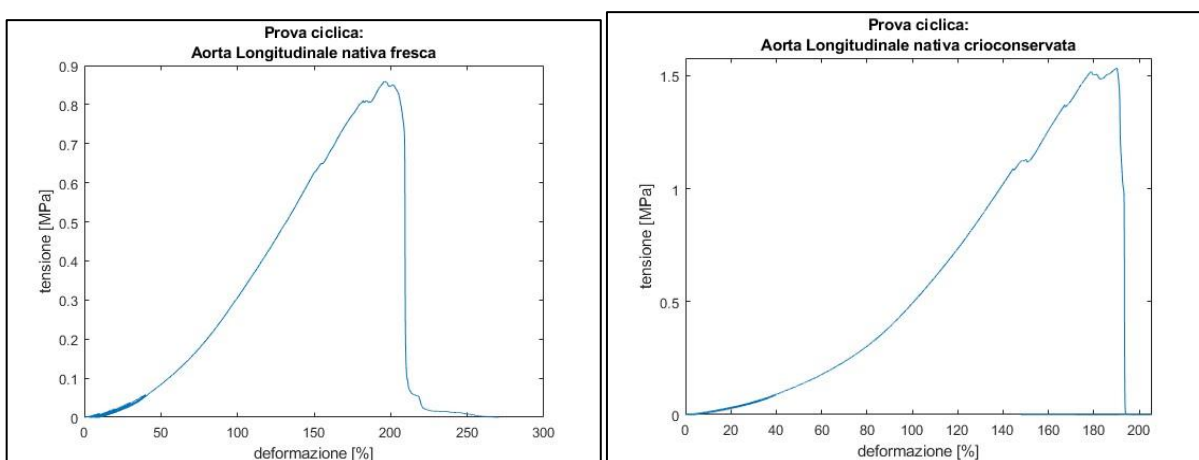


Figura 3.18: Esempio di curva tenso-deformativa ottenuta da una prova di trazione monoassiale ciclica su aorta longitudinale porcina nativa fresca (a sinistra) e crioconservata (a destra).

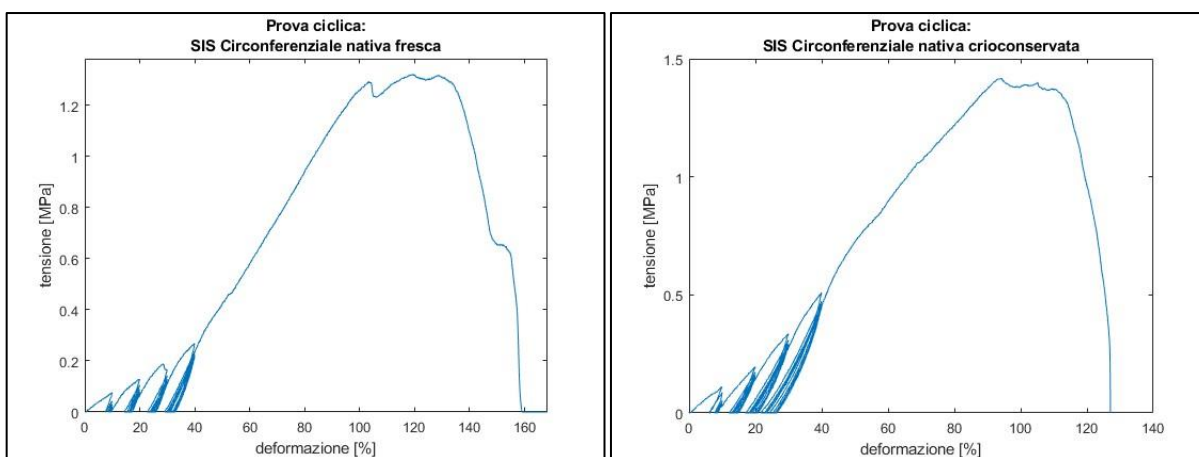


Figura 3.19: Esempio di curva tenso-deformativa ottenuta da una prova di trazione monoassiale ciclica su SIS circonfrenziale porcina nativa fresca (a sinistra) e crioconservata (a destra).

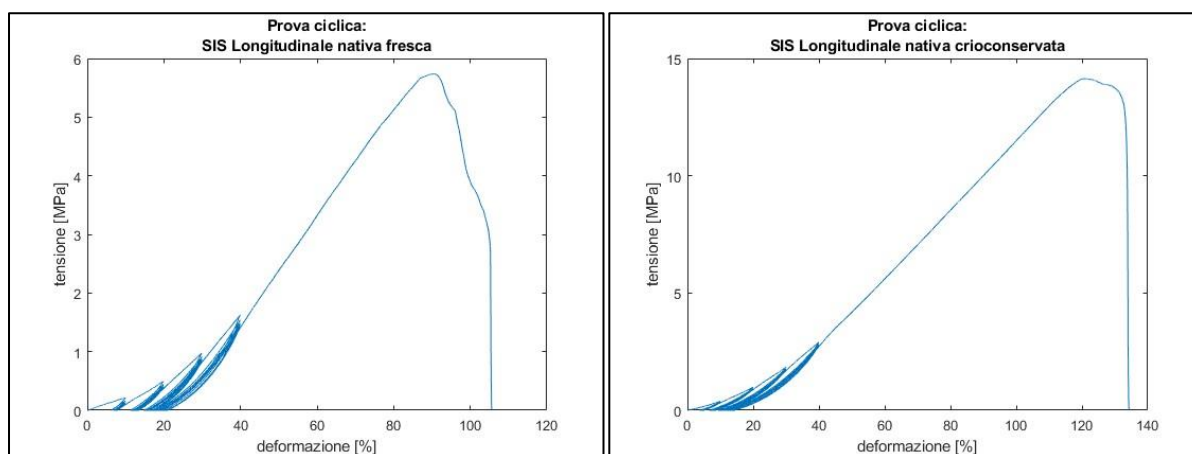


Figura 3.20: Esempio di curva tenso-deformativa ottenuta da una prova di trazione monoassiale ciclica su SIS longitudinale porcina nativa fresca (a sinistra) e crioconservata (a destra).

Nelle Tabelle dalla 3.17 alla 3.22 viene riportato il confronto dei valori medi con deviazione standard delle misure ricavate dalle prove cicliche dal tessuto nativo crioconservato rispetto al corrispondente tessuto nativo fresco. I valori ottenuti sono stati calcolati su 3 campioni di ogni tessuto, dai quali si ricavano 3 provini per un totale di 9 misure per ogni tipo di tessuto.

PERICARDIO	UTS [MPa]	FS [%]	E₁ [MPa]
NATIVO FRESCO	16.475 +/- 7.18736	83.34 +/- 20.15	25.2581 +/- 8.5364
CRIOCONSERVATO	15.8302 +/- 6.2905	76.80 +/- 24.71	34.6823 +/- 12.4167

Tabella 3.17: Media e deviazione standard dei valori di UTS, FS ed E₁ per le prove cicliche del pericardio porcino nativo fresco e crioconservato.

URETERE	UTS [MPa]	FS [%]	E₁ [MPa]
NATIVO FRESCO	4.0532 +/- 1.089	201.65 +/- 49.13	2.8735 +/- 0.7896
CRIOCONSERVATO	4.1878 +/- 1.7814	223.63 +/- 25.62	3.0513 +/- 0.5981

Tabella 3.18: Media e deviazione standard dei valori di UTS, FS ed E₁ per le prove cicliche dell'uretere porcino nativo fresco e crioconservato.

AORTA CIRCONFERENZIALE	UTS [MPa]	FS [%]	E₁ [MPa]
NATIVO FRESCO	2.0122 +/- 0.2915	269.93 +/- 27.02	0.9849 +/- 0.3071
CRIOCONSERVATO	2.2739 +/- 0.8555	263.17 +/- 57.43	1.4107 +/- 1.0064

Tabella 3.20: Valori di media e deviazione standard dei valori di UTS, FS ed E₁ per le prove cicliche dell'aorta circonfrenziale porcina nativa fresca e crioconservata.

AORTA LONGITUDINALE	UTS [MPa]	FS [%]	E₁ [MPa]
NATIVO FRESCO	1.1664 +/- 0.5239	202.92 +/- 26.61	0.8960 +/- 0.4662
CRIOCONSERVATO	2.3546 +/- 1.3927	243.34 +/- 85.08	1.1377 +/- 0.4741

Tabella 3.19: Media e deviazione standard dei valori di UTS, FS ed E₁ per le prove cicliche dell'aorta longitudinale porcina nativa fresca e crioconservata.

SIS CIRCONFERENZIALE	UTS [MPa]	FS [%]	E₁ [MPa]
NATIVO FRESCO	1.9326 +/- 0.6939	99.99 +/- 39.11	5.0021 +/- 3.4258
CRIOCONSERVATO	1.9413 +/- 0.0168	79.93 +/- 10.95	3.3305 +/- 0.5632

Tabella 3.22: Media e deviazione standard dei valori di UTS, FS ed E₁ per le prove cicliche della SIS circonferenziale porcina nativa fresca e crioconservata.

SIS LONGITUDINALE	UTS [MPa]	FS [%]	E₁ [MPa]
NATIVO FRESCO	6.4283 +/- 2.6264	95.07 +/- 59.17	13.3869 +/- 5.0124
CRIOCONSERVATO	10.0679 +/- 3.0593	97.04 +/- 17.44	13.6564 +/- 2.3464

Tabella 3.21: Media e deviazione standard dei valori di UTS, FS ed E₁ per le prove cicliche della SIS longitudinale porcina nativa fresca e crioconservata.

Dalle tabelle precedenti si può notare come il tessuto crioconservato porcino, dopo i cicli di pretensionamento, raggiunga a rottura tensioni più alte e allo stesso tempo una deformazione maggiore. Questa tendenza non è condivisa dal pericardio crioconservato, che presenta un valore di UTS leggermente più basso. Il valore di FS dei tessuti aumenta se questi sono sottoposti a crioconservazione. I valori, però, sono comparabili nell'aorta circonferenziale, mentre FS presenta una tendenza inversa nella SIS circonferenziale.

Il Modulo E₁ aumenta nei tessuti crioconservati, maggiormente nel pericardio se confrontato con gli altri tessuti, diversamente da quanto osservato nelle prove di trazione a rottura. Nella SIS circonferenziale E₁ diminuisce.

Circa i tessuti esaminati nelle direzioni circonferenziale e longitudinale, si può dire che l'aorta longitudinale presenta una minore UTS ed una minore FS rispetto all'aorta circonferenziale. Nella SIS, UTS aumenta sia nel tessuto nativo che nel tessuto crioconservato. FS aumenta sensibilmente solo nel crioconservato.

Osservando i valori di SD dei tessuti, si può notare come la SD relativa a UTS aumenti in tutti i tessuti tranne che nel pericardio porcino crioconservato e nella SIS circonferenziale porcina. Per i valori di FS la standard deviation diminuisce in generale, ma nel pericardio aumenta leggermente; aumenta drasticamente in entrambe le direzioni dell'aorta.

Vengono riportati di seguito i risultati dell'analisi statistica del confronto fra il tessuto nativo fresco e il crioconservato per i valori dei parametri di interesse. I p-value calcolati mediante Test di Student sono stati riportati nelle Tabelle 3.23-3.28.

PERICARDIO	UTS [MPa]	FS [%]	E₁ [MPa]
p-value	0.8509	0.5614	0.0934

Tabella 3.23: Test di Student applicato ai parametri UTS, FS ed E₁ per le prove cicliche del pericardio porcino nativo fresco e crioconservato.

URETERE	UTS [MPa]	FS [%]	E₁ [MPa]
p-value	0.7733	0.2600	0.6053

Tabella 3.24: Test di Student applicato ai parametri UTS, FS ed E₁ per le prove cicliche dell'uretere nativo fresco e crioconservato.

AORTA LONGITUDINALE	UTS [MPa]	FS [%]	E ₁ [MPa]
p-value	0.0470	0.2300	0.3192

Tabella 3.25: Test di Student applicato ai parametri UTS, FS ed E₁ per le prove cicliche dell'aorta longitudinale nativa fresca e dell'aorta longitudinale porcina nativa crioconservata.

AORTA CIRCONFERENZIALE	UTS [MPa]	FS [%]	E ₁ [MPa]
p-value	0.4350	0.7666	0.2826

Tabella 3.26: Test di Student applicato ai parametri UTS, FS ed E₁ per le prove cicliche dell'aorta circonfrenziale nativa fresca e crioconservata.

SIS LONGITUDINALE	UTS [MPa]	FS [%]	E ₁ [MPa]
p-value	0.2268	0.936	0.9148

Tabella 3.27: Test di Student applicato ai parametri UTS, FS ed E₁ per le prove cicliche della SIS longitudinale nativa fresca e crioconservata.

SIS CIRCONFERENZIALE	UTS [MPa]	FS [%]	E ₁ [MPa]
p-value	0.9726	0.2344	0.2210

Tabella 3.28: Test di Student applicato ai parametri UTS, FS ed E₁ per le prove cicliche della SIS circonfrenziale nativa fresca e crioconservata.

Negli istogrammi delle Figure 3.21, 3.22 e 3.23, che illustrano i valori medi di UTS, FS ed E₁ di tutti i tessuti nativi analizzati tramite prova ciclica a trazione, si indicano le differenze statisticamente significative dovute alla crioconservazione.

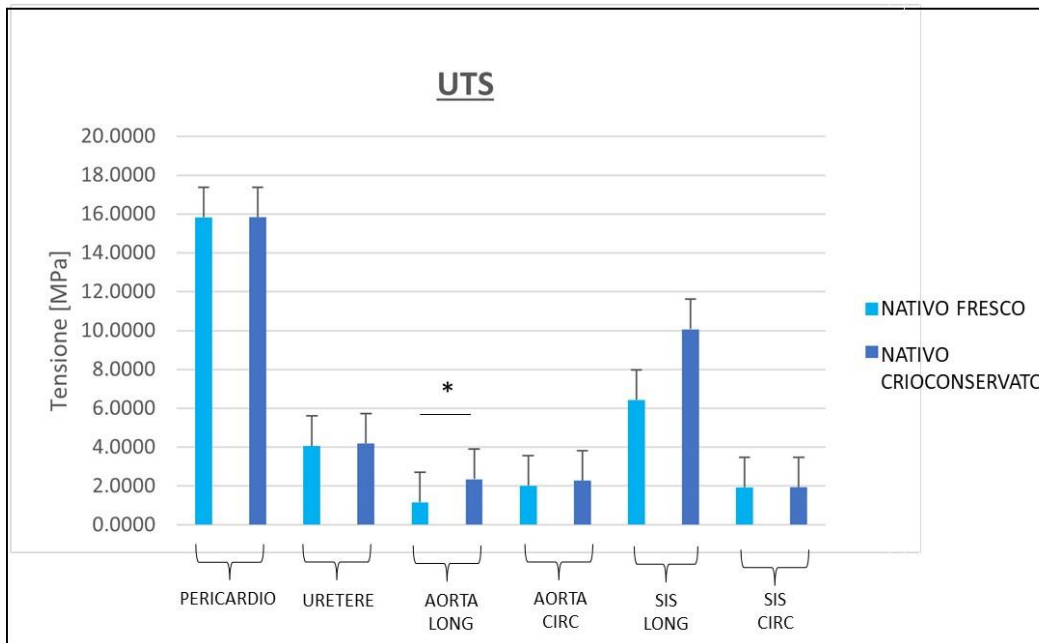


Figura 3.21: Confronto tra i valori medi di UTS nelle prove cicliche per tutti i tessuti analizzati.

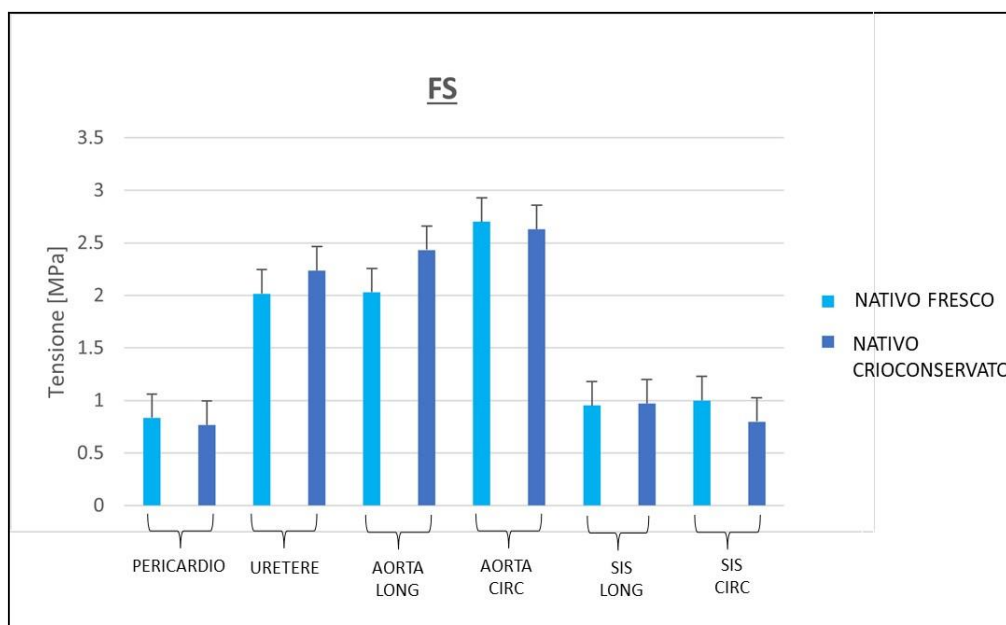


Figura 3.22: Confronto tra i valori di FS nelle prove cicliche per tutti i tessuti analizzati.

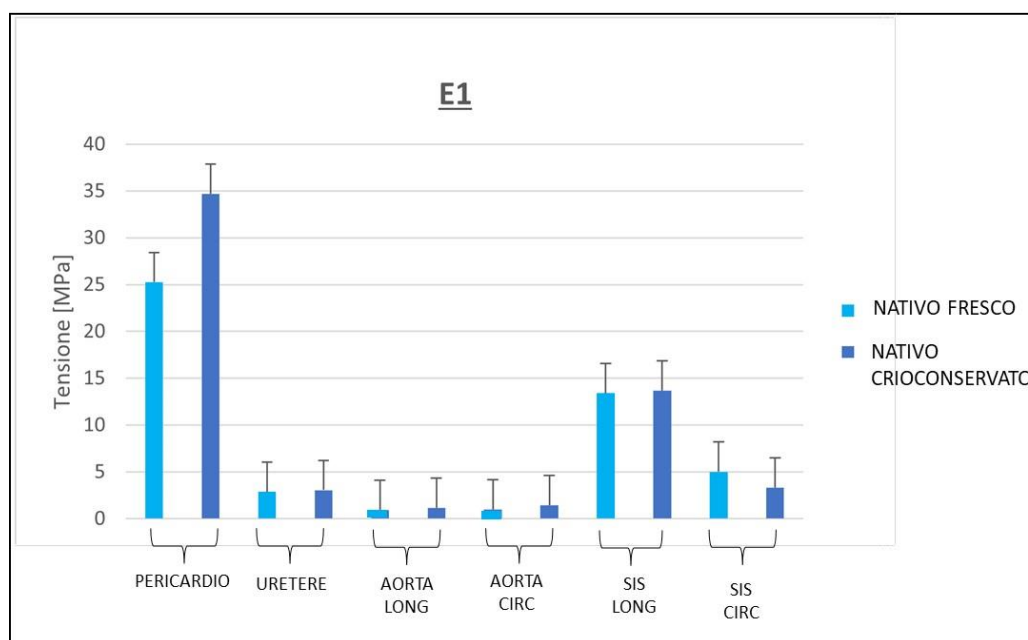


Figura 3.23: Confronto tra i valori di E_1 nelle prove cicliche per tutti i tessuti analizzati.

Dai p-value calcolati con il Test di Student non si riscontrano differenze significative tra i tessuti nativi freschi e crioconservati, in quanto il p-value è sempre maggiore di 0.05, ad eccezione dell'aorta longitudinale.

3.2.2.3 Confronto prove a rottura vs prove cicliche

In questo paragrafo vengono confrontati i valori di *Ultimate Tensile Strength* (UTS), *Failure Strain* (FS), *Modulo di Young iniziale* (E_1) relativi alle prove meccaniche di trazione monoassiale a rottura e alle prove meccaniche di trazione monoassiale cicliche.

Questi risultati sono già stati esposti nei paragrafi precedenti e vengono qui messi a paragone per poter fare delle ipotesi per quanto concerne il ruolo dello stress ciclico delle tensioni nelle prove meccaniche cicliche sui provini di tessuto nativo crioconservato e nativo fresco.

Di seguito, vengono riportati gli istogrammi relativi ai valori medi con standard deviation dei parametri appena descritti, un tipo di tessuto alla volta. Per ogni set di istogrammi viene riportata una tabella dei p-value che valuta la possibile presenza di differenze statisticamente significative nei valori dei parametri misurati sul tessuto nativo fresco e crioconservato, confrontando il risultato ottenuto con prova a rottura e con prova ciclica.

Negli istogrammi delle Figure dalla 3.24 alla 3.41, relative ai valori di UTS, FS ed E_1 dei tessuti nativi freschi e dei tessuti nativi crioconservati, si indicano le differenze statisticamente significative fra prova a rottura e prova ciclica.

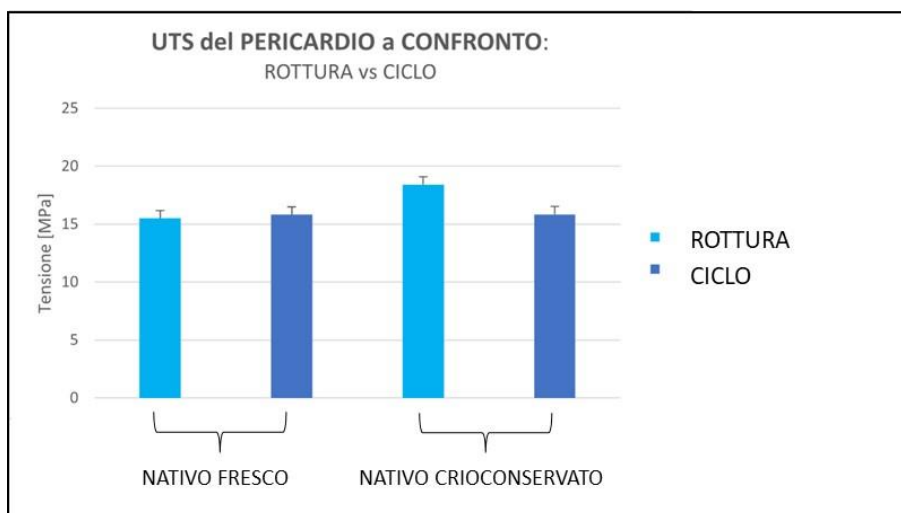


Figura 3.24: Confronto tra i valori di UTS del pericardio porcino nativo fresco e crioconservato.

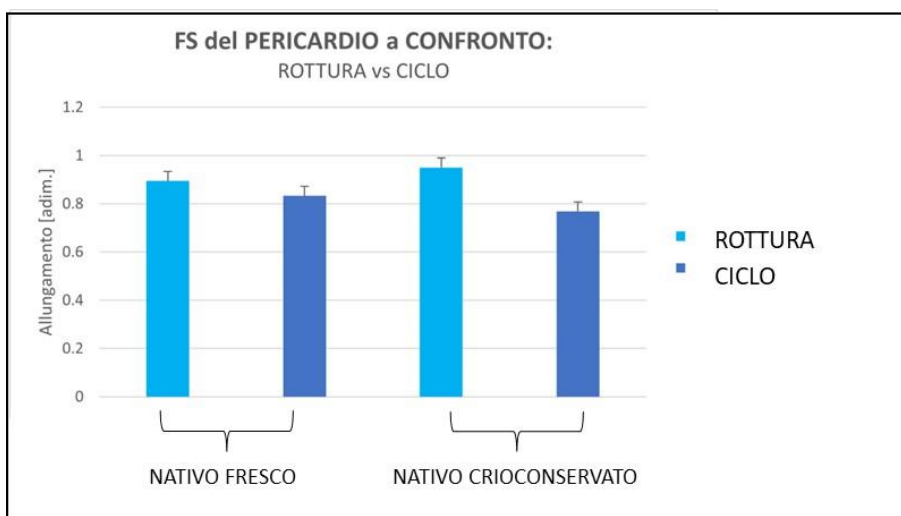


Figura 3.25: Confronto tra i valori di FS del pericardio porcino nativo fresco crioconservato.

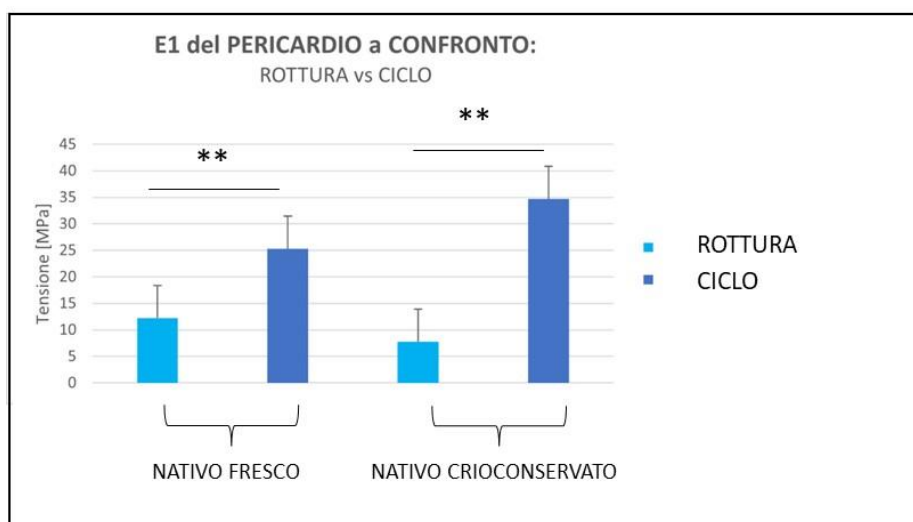


Figura 3.26: Confronto tra i valori di E_1 del pericardio porcino nativo fresco e crioconservato.

Vengono riportati di seguito i risultati dell'analisi statistica del confronto fra prove meccaniche a rottura e prove cicliche per il pericardio porcino nativo fresco crioconservato per i parametri di interesse. I p-value ottenuti mediante Test di Student sono stati riportati in Tabella 3.29.

p-value	UTS [Mpa]	FS [%]	E_1 [MPa]
NATIVO FRESCO	0.8972	0.1529	0.0017
CRIOCONSERVATO	0.4236	0.6606	0.0002

Tabella 3.29: Test di Student applicato ai parametri UTS, FS ed E_1 per il pericardio porcino nativo fresco crioconservato: confronto fra prova meccanica a rottura e prova meccanica ciclica.

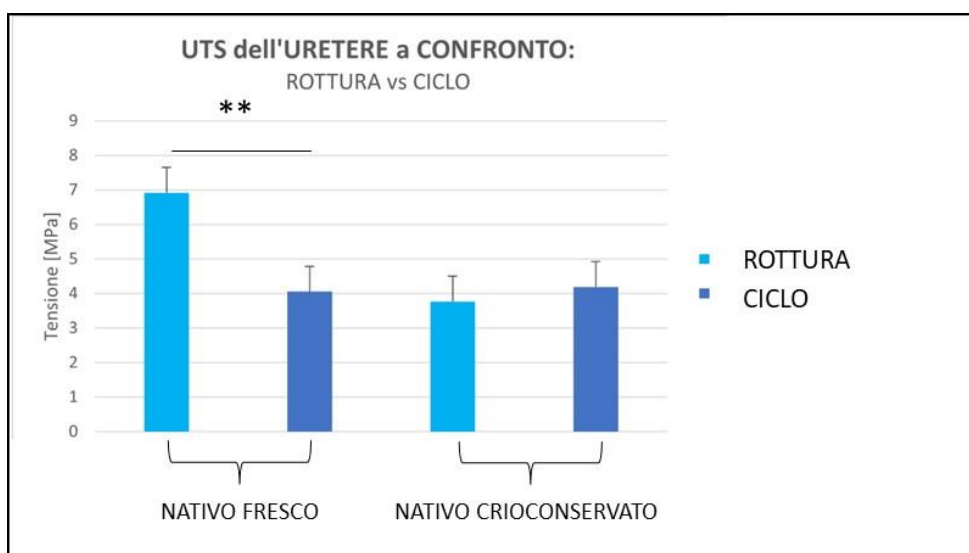


Figura 3.27: Confronto tra i valori di UTS dell'uretere porcino nativo fresco e crioconservato.

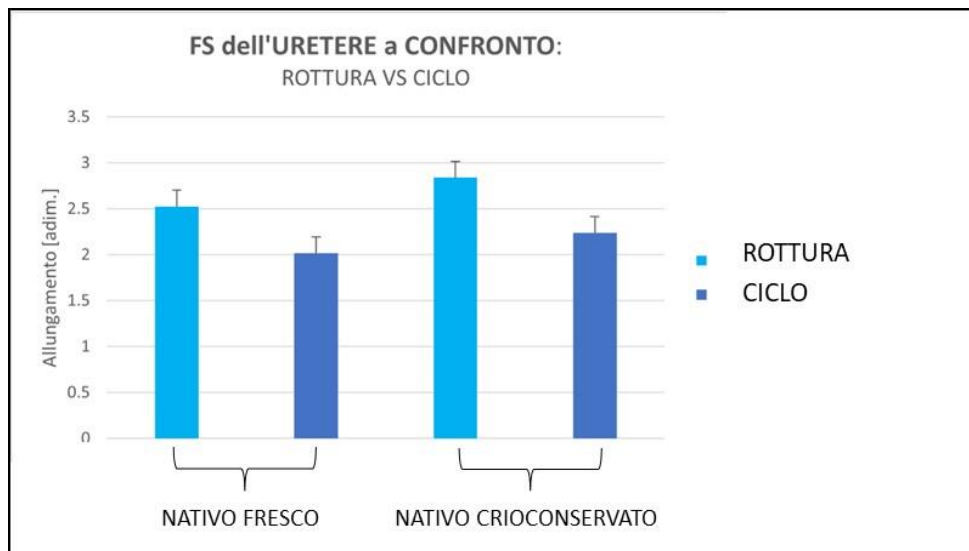


Figura 3.28: Confronto tra i valori di FS dell'uretere porcino nativo fresco e crioconservato.

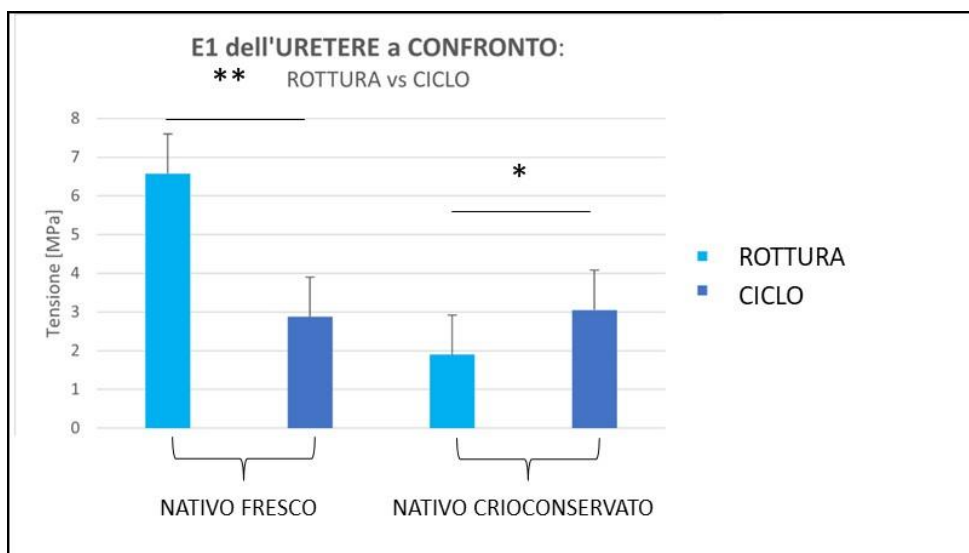


Figura 3.29: Confronto tra i valori di E₁ dell'uretere porcino nativo fresco e crioconservato.

Vengono riportati di seguito i risultati dell'analisi statistica del confronto fra prove meccaniche a rottura e prove meccaniche cicliche per l'uretere porcino nativo fresco e crioconservato per i parametri di interesse. I p-value ottenuti mediante Test di Student sono stati riportati nella Tabella 3.30.

p-value	UTS [MPa]	FS [%]	E ₁ [MPa]
NATIVO FRESCO	0.0005	0.0968	0.0009
CRIOCONSERVATO	0.2651	0.6020	0.0308

Tabella 3.30: Test di Student applicato ai parametri UTS, FS ed E₁ per l'uretere porcino nativo fresco e: confronto fra prova meccanica a rottura e prova meccanica ciclica.

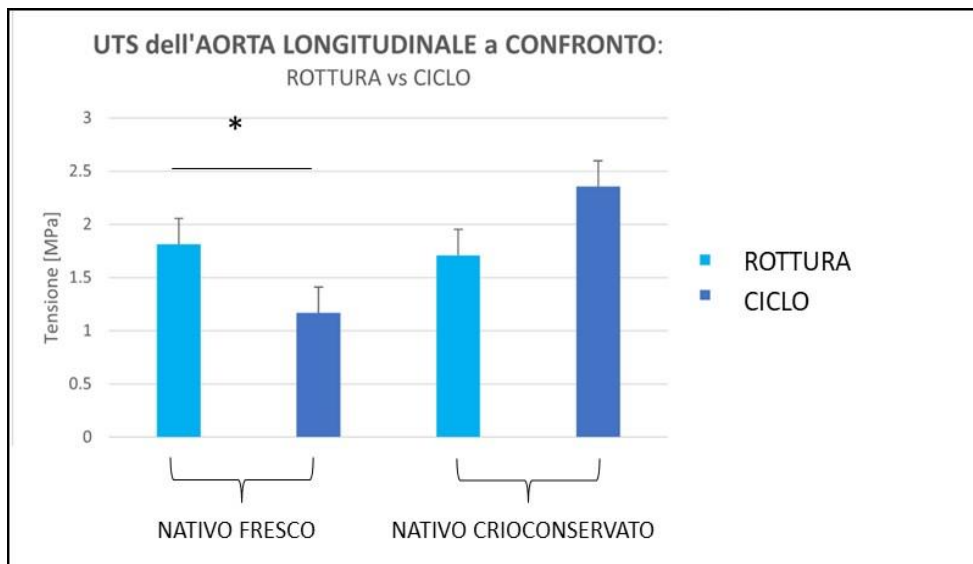


Figura 3.30: Confronto tra i valori di UTS dell'aorta longitudinale nativa fresca e crioconservata.

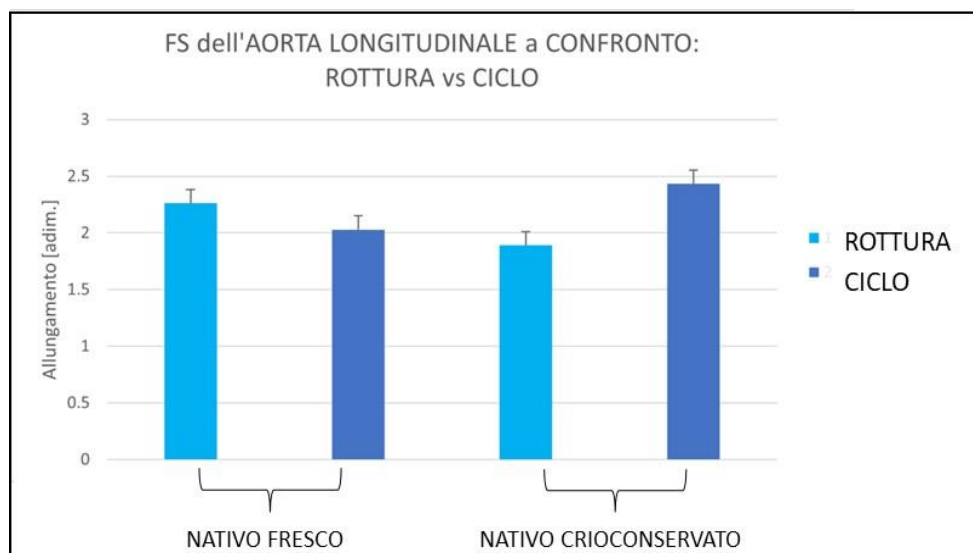


Figura 3.31: Confronto tra i valori di FS dell'aorta longitudinale nativa fresca e crioconservata.

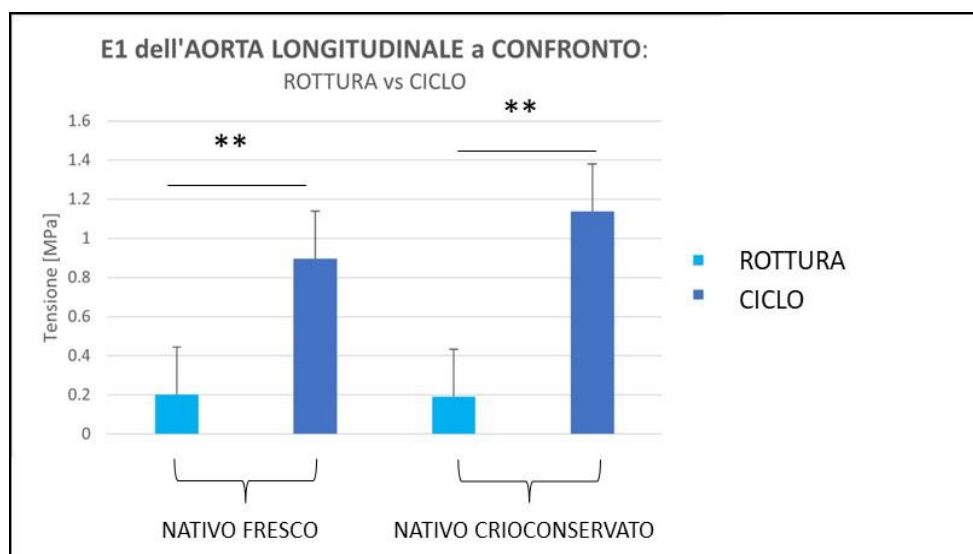


Figura 3.32: Confronto tra i valori di E_1 dell'aorta longitudinale nativa fresca e crioconservata.

Vengono riportati di seguito i risultati dell'analisi statistica del confronto fra prove meccaniche a rottura e cicliche per l'aorta longitudinale porcina nativa fresca e crioconservata per i parametri di interesse. I p-value ottenuti mediante Test di Student sono stati riportati nella Tabella 3.31.

p-value	UTS [MPa]	FS [%]	E ₁ [MPa]
NATIVO FRESCO	0.0279	0.7109	0.0029
CRIOCONSERVATO	0.2416	0.3353	0.0005

Tabella 3.31: Test di Student applicato ai parametri UTS, FS ed E₁ per l'aorta longitudinale porcina nativa fresca e crioconservata: confronto fra prova meccanica a rottura e prova meccanica ciclica.

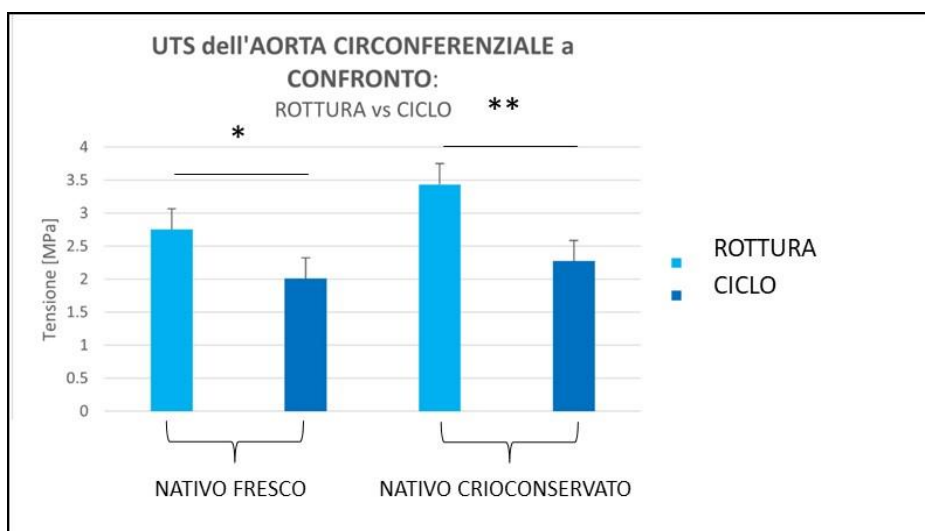


Figura 3.33: Confronto tra i valori di UTS dell'aorta circonfrenziale nativa fresca e crioconservata.

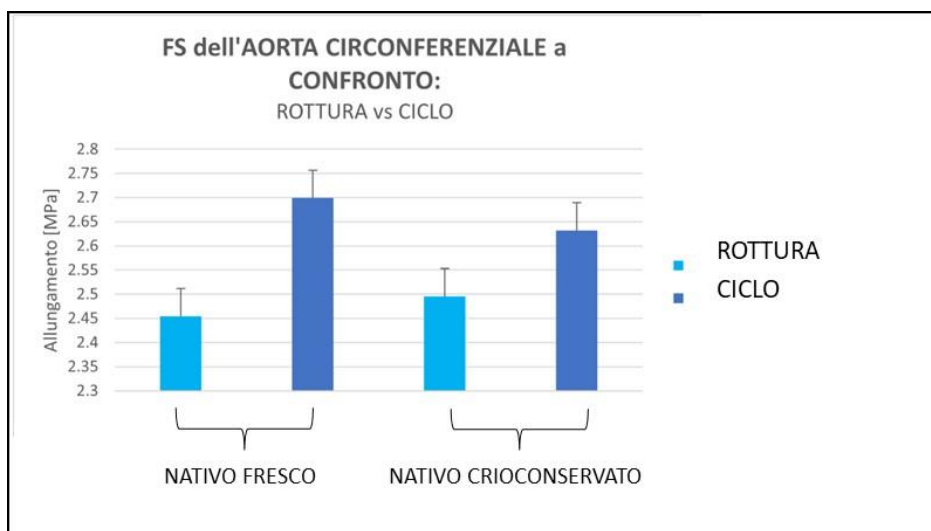


Figura 3.34: Confronto tra i valori di FS dell'aorta circonfrenziale nativa fresca e crioconservata.

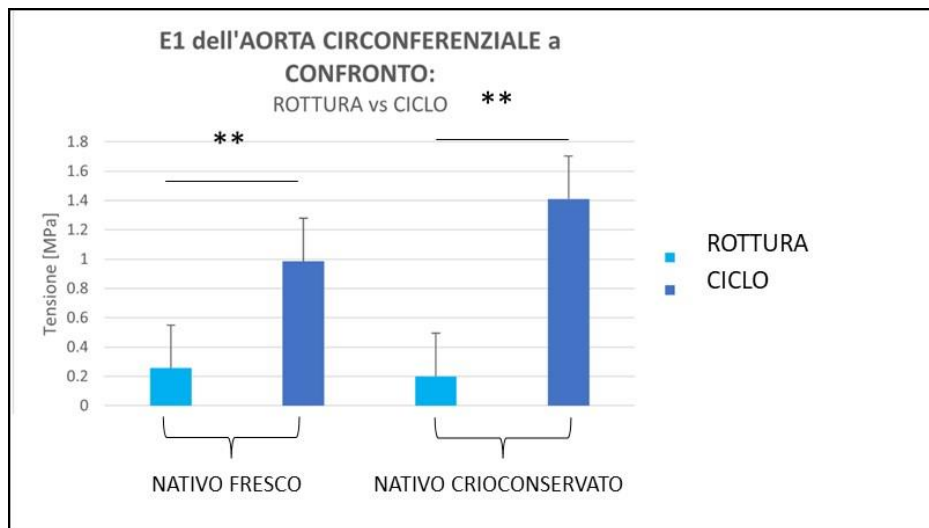


Figura 3.35: Confronto tra i valori di E_1 dell'aorta circonfrenziale nativa fresca crioconservata.

Vengono riportati di seguito i risultati dell'analisi statistica del confronto fra prove meccaniche a rottura e cicliche per l'aorta circonfrenziale porcina nativa fresca e crioconservata sui parametri di interesse. I p-value ottenuti mediante Test di Student sono stati riportati nella Tabella 3.32.

p-value	UTS [MPa]	FS [%]	E_1 [MPa]
NATIVO FRESCO	0.0186	0.1853	0.0004
CRIOCONSERVATO	0.0058	0.2211	0.0009

Tabella 3.32: Test di Student applicato ai parametri UTS, FS ed E_1 per l'aorta circonfrenziale porcina nativa fresca e crioconservata: confronto fra prova meccanica a rottura e prova meccanica ciclica.

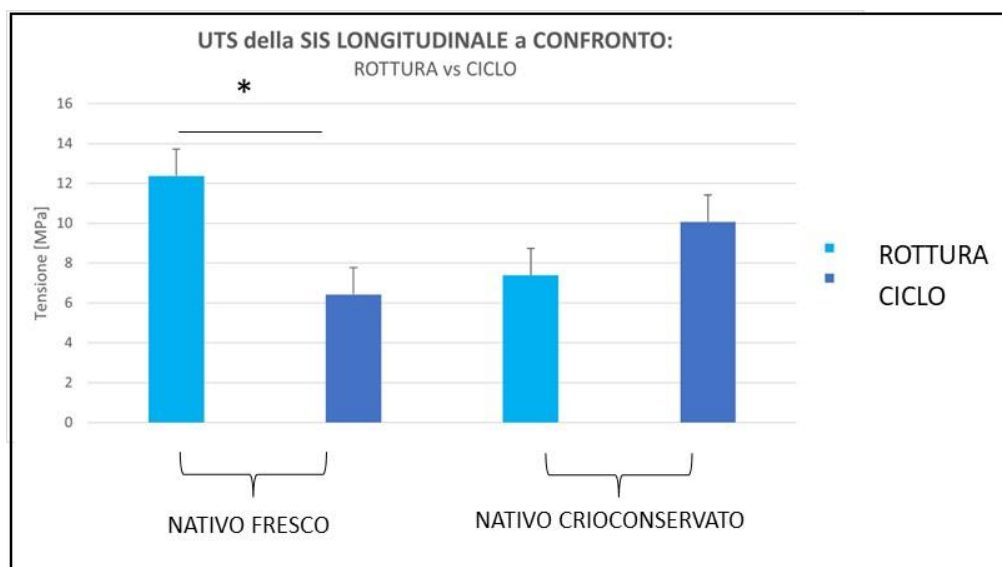


Figura 3.36: Confronto tra i valori di UTS della SIS longitudinale nativa fresca e crioconservata.

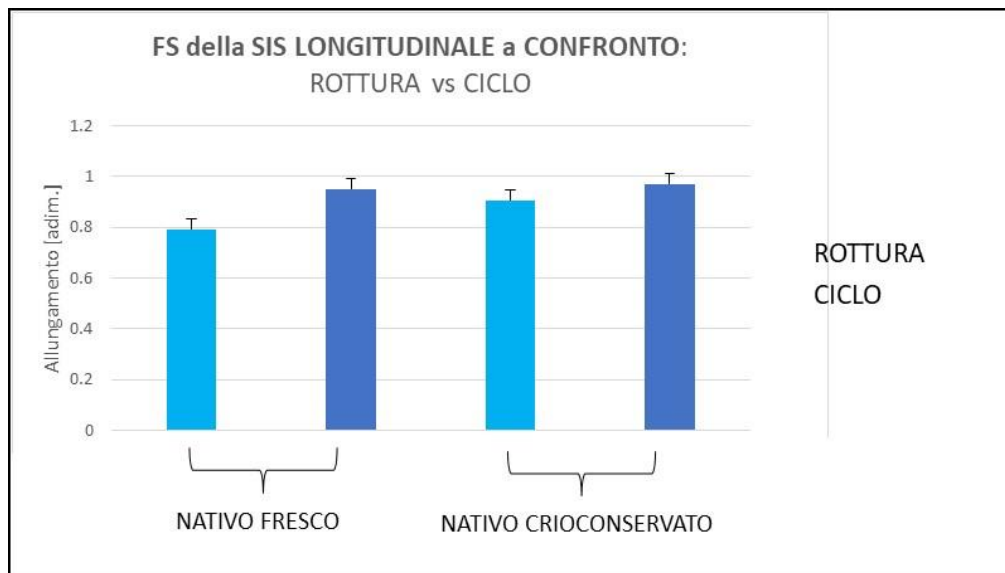


Figura 3.37: Confronto tra i valori di FS della SIS longitudinale nativa fresca e crioconservata.

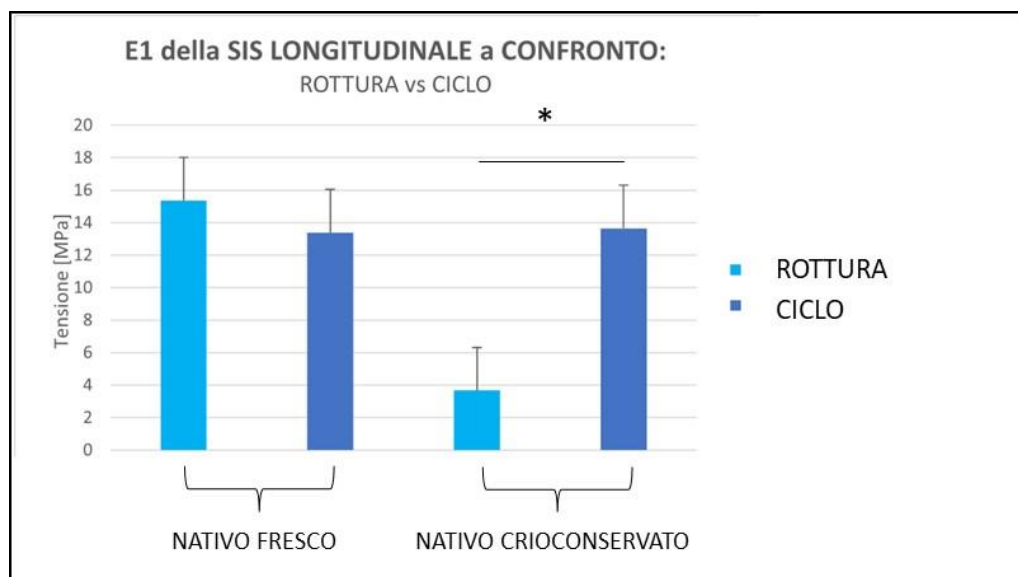


Figura 3.38: Confronto tra i valori di E₁ della SIS longitudinale nativa fresca e crioconservata.

Vengono riportati di seguito i risultati dell'analisi statistica del confronto fra prove meccaniche a rottura e cicliche per la SIS longitudinale porcina nativa fresca e crioconservata per i parametri di interesse. I p-value ottenuti mediante Test di Student sono stati riportati nella Tabella 3.33.

p-value	UTS [MPa]	FS [%]	E ₁ [MPa]
NATIVO FRESCO	0.0129	0.7772	0.515
CRIOCONSERVATO	0.3473	0.4527	0.019

Tabella 3.33: Test di Student applicato ai parametri UTS, FS ed E₁ per la SIS longitudinale porcina nativa fresca e crioconservata: confronto fra prova meccanica a rottura e prova meccanica ciclica.

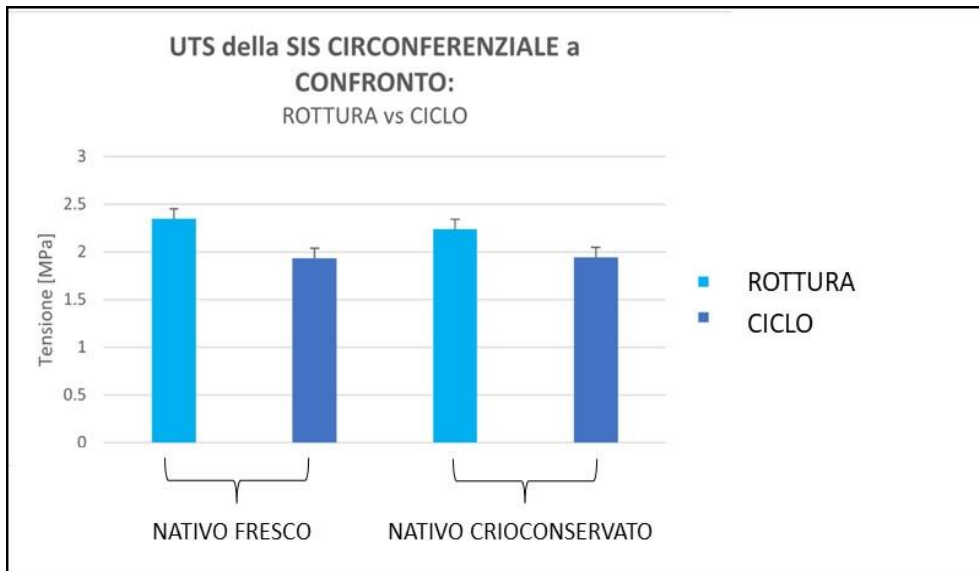


Figura 3.39: Confronto tra i valori di UTS della SIS circonferenziale nativa fresca e crioconservata.

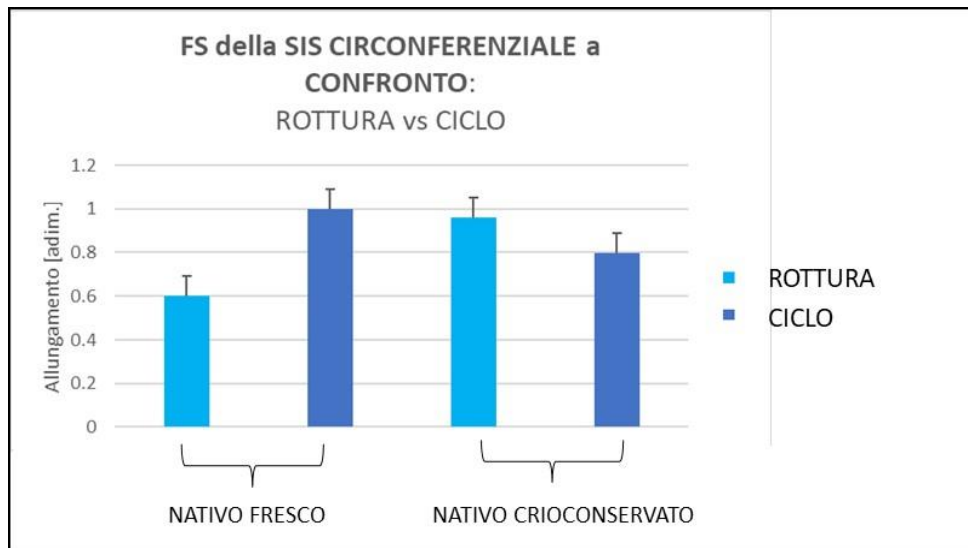


Figura 3.40: Confronto tra i valori di FS della SIS circonferenziale nativa fresca e crioconservata.

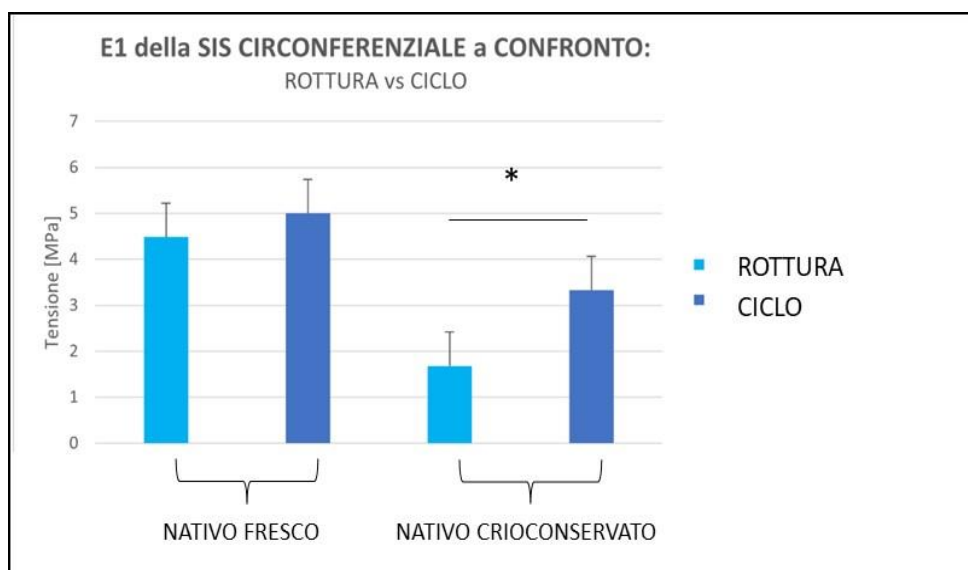


Figura 3.41: Confronto tra i valori di E_1 della SIS circonferenziale nativa fresca e crioconservata.

Vengono riportati di seguito i risultati dell'analisi statistica del confronto fra prove meccaniche a rottura e cicliche per la SIS circonferenziale porcina nativa fresca e crioconservata sui parametri di interesse. I p-value ottenuti mediante Test di Student sono stati riportati nella Tabella 3.34.

p-value	UTS [MPa]	FS [%]	E ₁ [MPa]
NATIVO FRESCO	0.3445	0.0765	0.7023
CRIOCONSERVATO	0.2135	0.5870	0.0333

Tabella 3.34: Test di Student applicato ai parametri UTS, FS ed E₁ per la SIS circonferenziale porcina nativa fresca e crioconservata: confronto fra prova meccanica a rottura e prova meccanica ciclica.

Il pericardio nativo fresco, se sottoposto a rottura o ad una prova ciclica, raggiunge un valore di UTS confrontabile. Nel rispettivo tessuto crioconservato, invece, l'UTS diminuisce nei cicli, ma in modo non significativo. La FS diminuisce nei cicli e la pendenza della retta nella fase iniziale della curva tenso-deformativa ciclica, invece, aumenta sensibilmente con una differenza statisticamente significativa. In modo analogo, l'uretere e l'aorta longitudinale seguono la stessa tendenza di cambiamento: nei cicli la UTS diminuisce di molto nei tessuti nativi freschi (con una differenza significativa nell'aorta longitudinale e nell'uretere) ed aumenta nei crioconservati; la deformazione raggiunta a rottura dopo la fase di stress ciclico è maggiore solo nell'aorta longitudinale crioconservata, nei rimanenti tessuti diminuisce; E₁ aumenta nei tessuti nativi crioconservati sottoposti a prova ciclica con una differenza significativa. Nel nativo fresco (con p-value<0.01), invece, E₁ diminuisce nell'uretere e aumenta nell'aorta longitudinale.

Anche il Modulo di Young iniziale dell'aorta in direzione circonferenziale, come il longitudinale, presenta un forte incremento nella prova ciclica con una differenza statisticamente significativa. In entrambi i tessuti presi in considerazione, UTS diminuisce significativamente e FS aumenta.

La sottomucosa dell'intestino ha un comportamento che si può riassumere come segue: UTS diminuisce nelle prove cicliche con differenza significativa, tranne che nel crioconservato della SIS longitudinale; FS aumenta nei cicli senza differenza statisticamente significativa, escluso il crioconservato circonferenziale, per il quale diminuisce; E₁, dopo uno stress ciclico, aumenta dando una differenza statisticamente significativa, ma nel nativo fresco longitudinale diminuisce e nel nativo fresco circonferenziale questa differenza non è presente.

In generale, confrontando una prova ciclica con la prova a rottura:

- per quanto riguarda i valori di UTS non è possibile identificare nessun andamento generale: le eventuali variazioni dipendono dal tipo di tessuto;

- per quanto riguarda i valori di FS:
 - o diminuiscono nel pericardio e nell'uretere;
 - o aumentano nell'aorta circonferenziale e nella SIS longitudinale;
 - o nell'aorta longitudinale diminuiscono nel nativo fresco e aumentano nel nativo crioconservato, mentre nella SIS circonferenziale succede il contrario;
- i valori del modulo di Young E_1 aumentano, ad esclusione dell'uretere nativo fresco, e questo effetto è più accentuato prendendo in esame i tessuti crioconservati.

Riassumendo i dati raccolti dai p-value ottenuti con il Test di Student, si possono ricavare le seguenti affermazioni di carattere generale:

- la differenza tra una prova a rottura e una prova ciclica è statisticamente significativa per i valori di UTS dell'uretere, dell'aorta longitudinale e SIS longitudinale; nei tessuti crioconservati, si può notare solo un p-value < 0.01 nell'aorta circonferenziale;
- i valori di FS dei tessuti nativi e crioconservati non presentano p-value minori della soglia nel confronto fra rotture e cicli;
- i valori di E_1 confrontati fra quelli calcolati da prova a rottura e prova ciclica, presentano generalmente differenze statisticamente significative, esclusi i tessuti nativi freschi di entrambe le orientazioni della SIS.

3.2.2.4 Prove di stress relaxation

In questa sezione, vengono riportati i risultati delle prove di stress relaxation e, in particolare, i valori di rilassamento e i relativi istogrammi ricavati per tutti i tessuti analizzati.

Nelle Figure dalla 3.42 alla 3.53 viene fornito un esempio di diagramma di tensione-deformazione delle prove di trazione monoassiale di stress relaxation per ogni tessuto analizzato. Il tessuto nativo crioconservato è messo a confronto con il rispettivo controllo. Nei grafici, dove in ascissa è riportato il tempo in secondi e in ordinata la tensione in MPa, è possibile notare gli intervalli di rilassamento da cui si ricaverà la percentuale di rilassamento media. In ogni intervallo di rilassamento, il provino inizialmente aumenta la sua risposta al carico imposto a causa della deformazione e, successivamente, la tensione decresce perché il provino rimane a deformazione costante nell'intervallo di tempo di rilassamento.

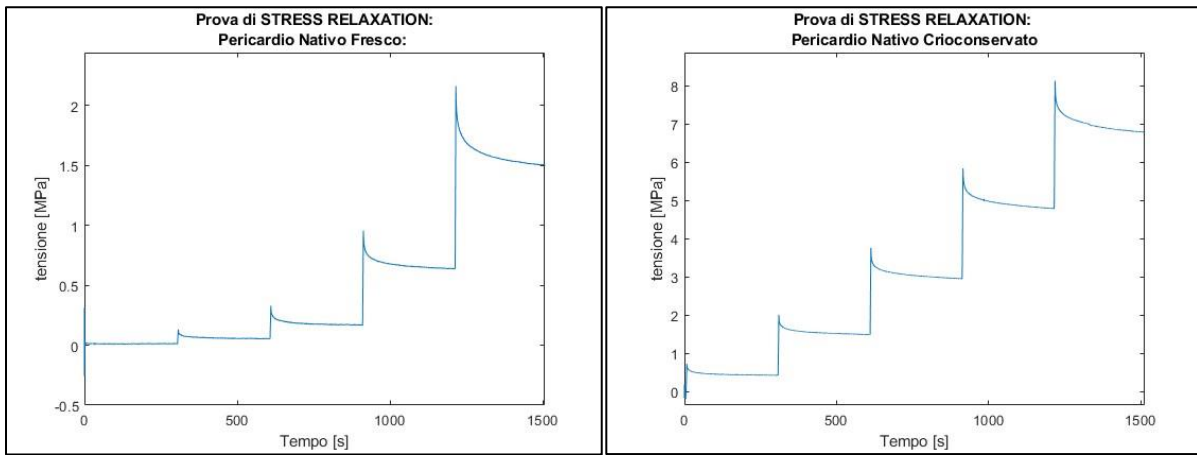


Figura 3.42: Esempio di un grafico di una prova di stress relaxation su pericardio porcino nativo fresco (a sinistra) e crioconservato (a destra).

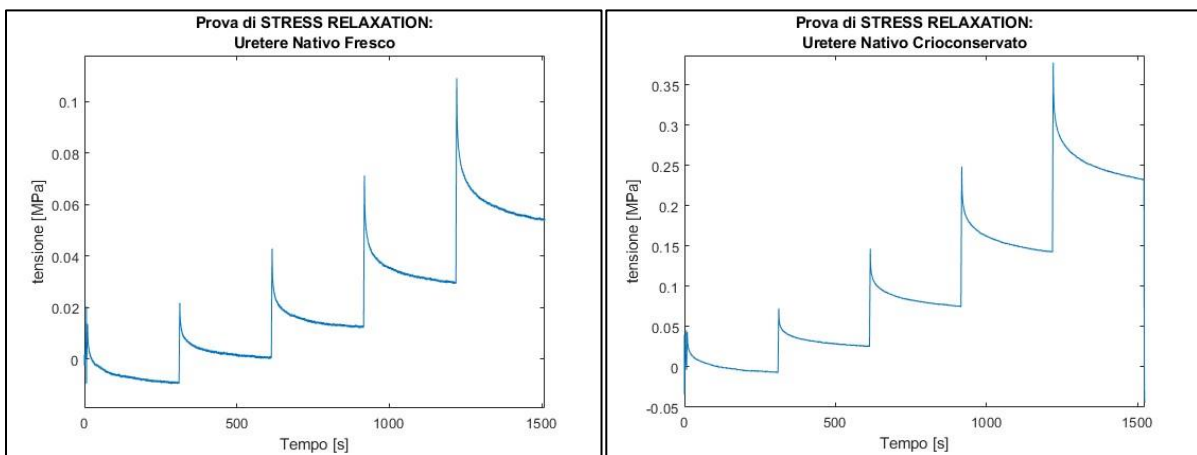


Figura 3.43: Esempio di un grafico di una prova di stress relaxation su uretere porcino nativo fresco (a sinistra) e crioconservato (a destra).

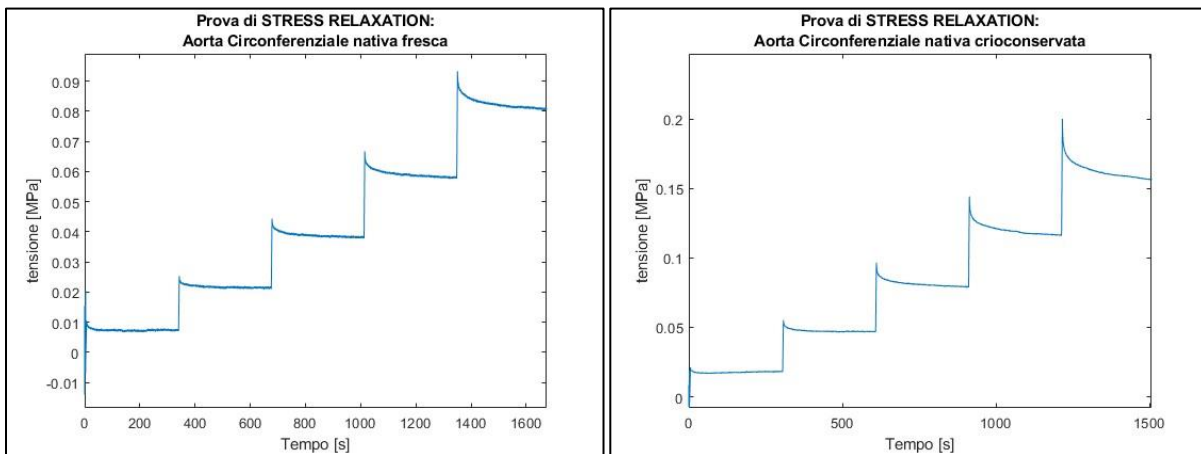


Figura 3.44: Esempio di un grafico di una prova di stress relaxation su aorta circonferenziale porcina nativa fresca (a sinistra) e crioconservata (a destra).

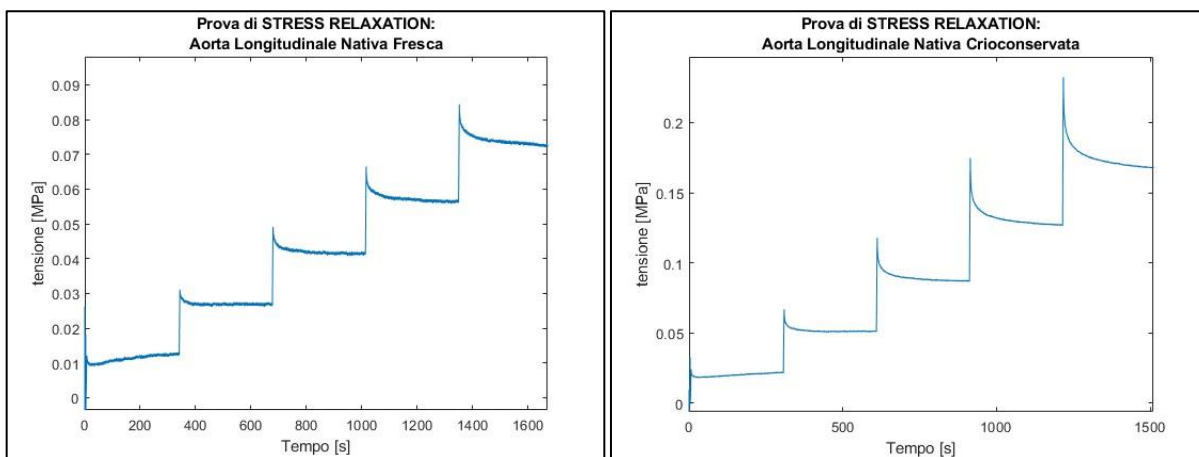


Figura 3.45: Esempio di un grafico di una prova di stress relaxation ottenuta su aorta longitudinale porcina nativa fresca (a sinistra) e crioconservata (a destra).

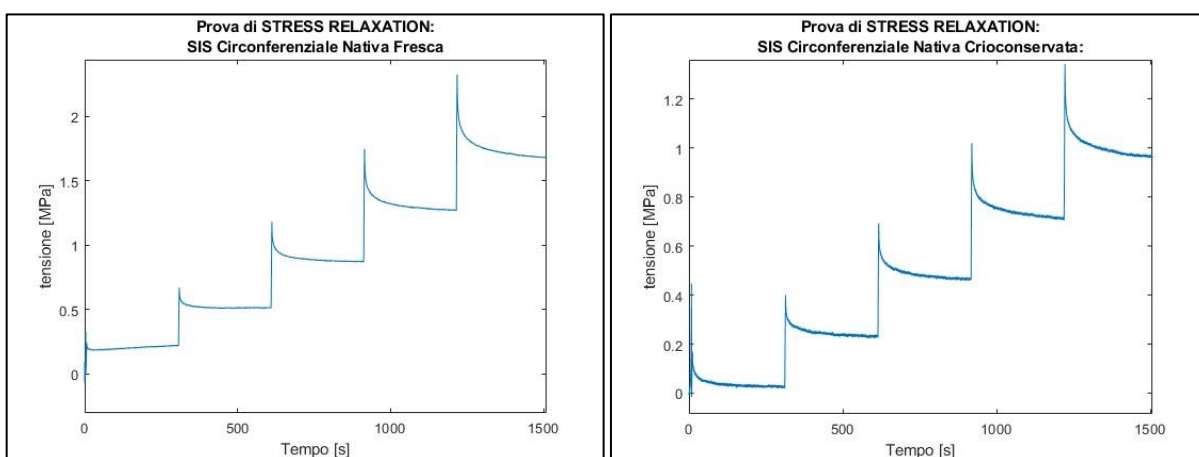


Figura 3.46: Esempio di un grafico di una prova di stress relaxation su SIS circonferenziale porcina nativa fresca (a sinistra) e crioconservata (a destra).

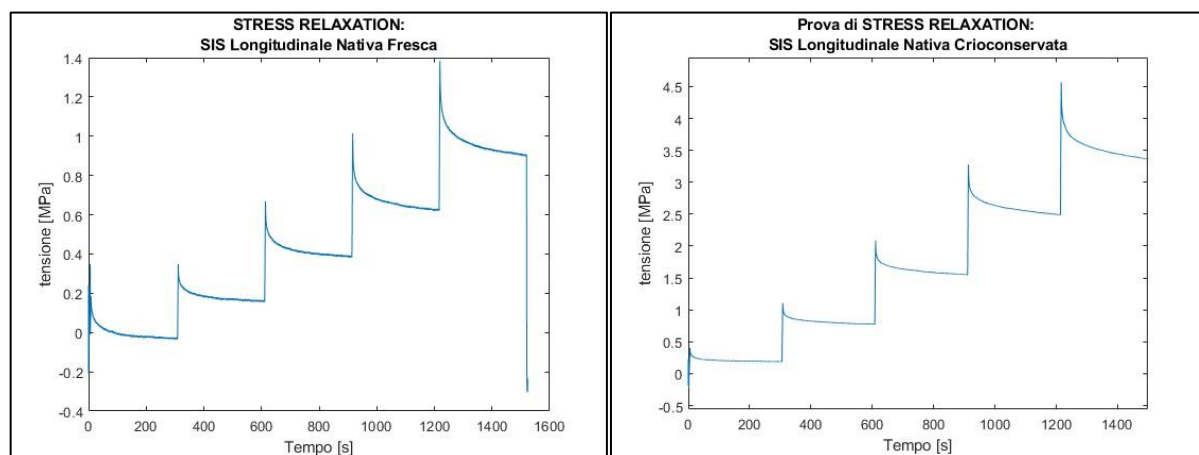


Figura 3.47: Esempio di un grafico di una prova di stress relaxation su SIS longitudinale porcina nativa fresca (a sinistra) e crioconservata (a destra).

Di seguito, nelle Figure dalla 3.48 alla 3.53, vengono riportati i grafici che rappresentano per ogni tessuto il valor medio fra tutti i valori medi dei rilassamenti a cui è sottoposto un campione durante una prova di stress relaxation, con rispettiva deviazione standard. Si mettono a

confronto i grafici ottenuti dal tessuto nativo fresco con quelli derivanti dal tessuto crioconservato. I valori ottenuti sono stati calcolati su 3 campioni di ogni tessuto, dai quali si ricavano 3 provini per un totale di 9 misure per ogni tipo di tessuto.

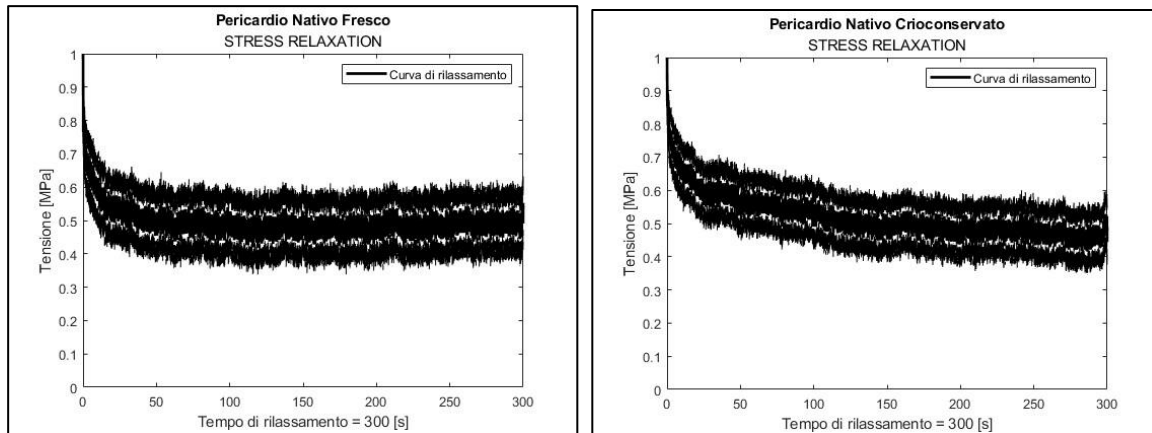


Fig. 3.48: Confronto tra le curve medie di rilassamento ottenute dalle prove meccaniche di stress relaxation del pericardio porcino nativo fresco (a sinistra) e crioconservato (a destra).

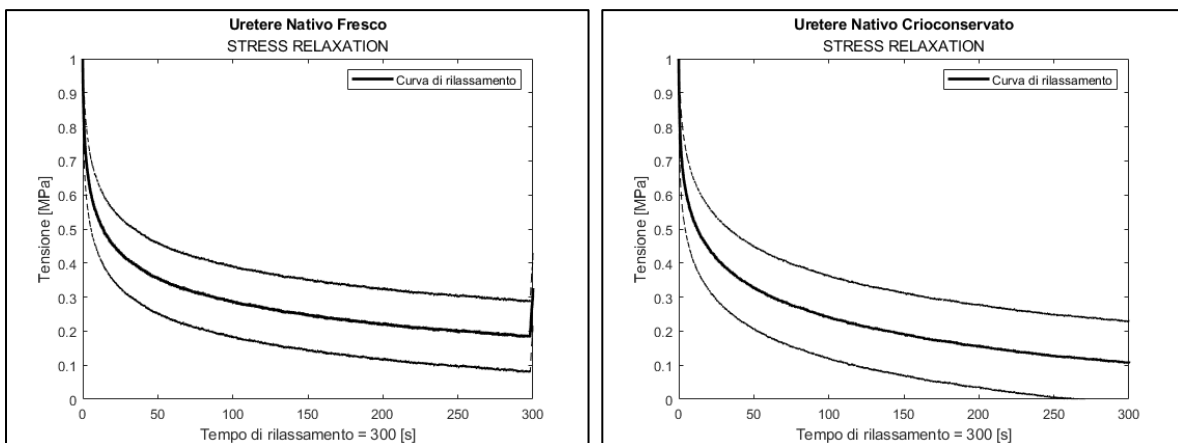


Fig. 3.49: Confronto tra le curve medie di rilassamento ottenute dalle prove meccaniche di stress relaxation dell'uretere porcino nativo fresco (a sinistra) e crioconservato (a destra).

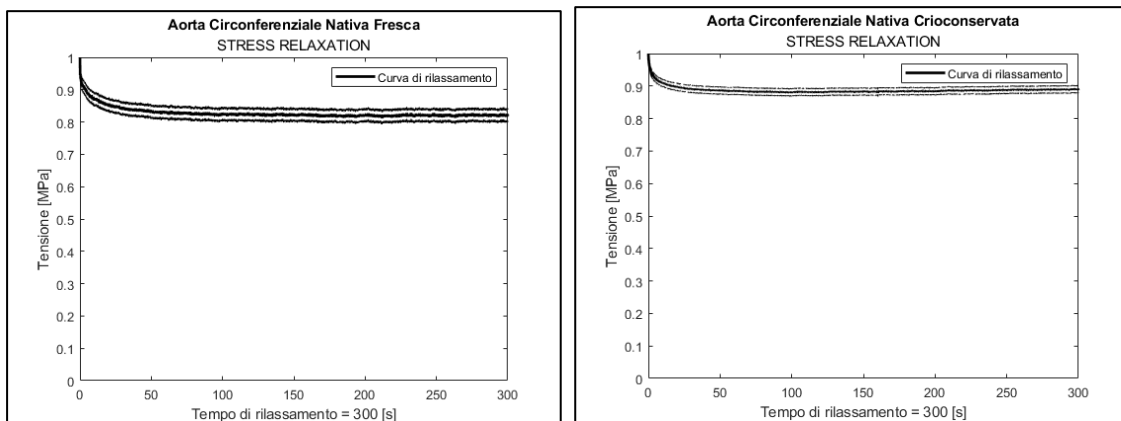


Fig. 3.50: Confronto tra le curve medie di rilassamento ottenute dalle prove meccaniche di stress relaxation dell'aorta circonfrenziale porcina nativa fresca (a sinistra) e crioconservata (a destra).

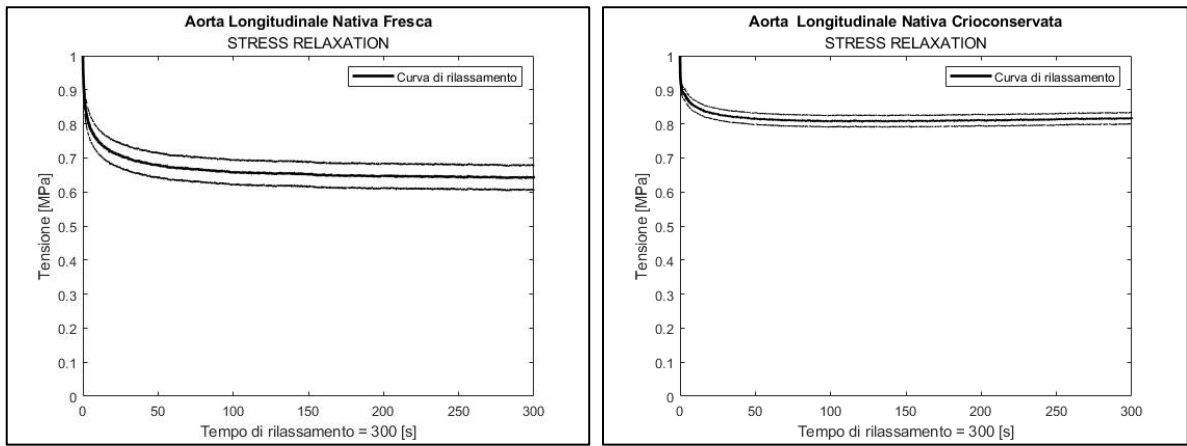


Fig. 3.51: Confronto tra le curve medie di rilassamento ottenute dalle prove meccaniche di stress relaxation dell'aorta longitudinale porcina nativa fresca (a sinistra) e crioconservata (a destra).

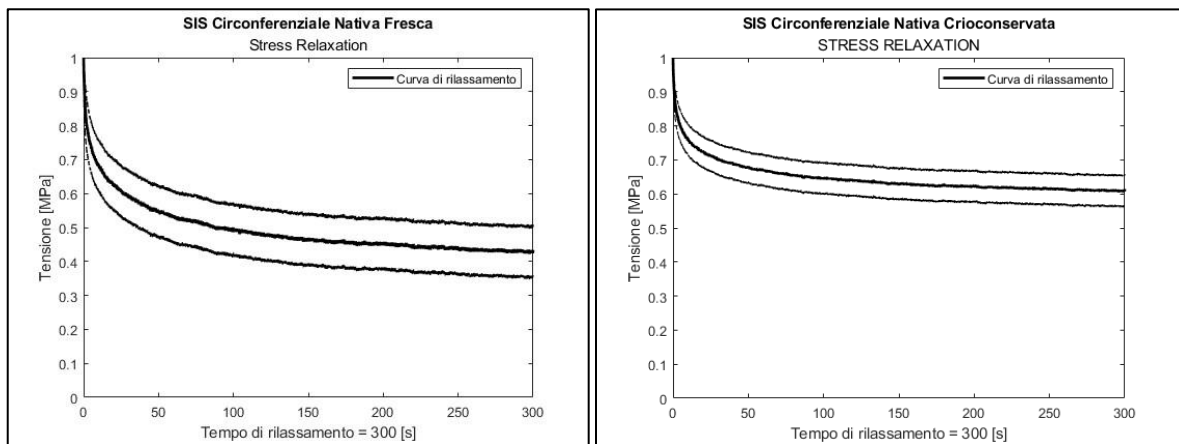


Fig. 3.52: Confronto tra le curve medie di rilassamento ottenute dalle prove meccaniche di stress relaxation della SIS circonferenziale porcina nativa crioconservata (a sinistra) e crioconservata (a sinistra)

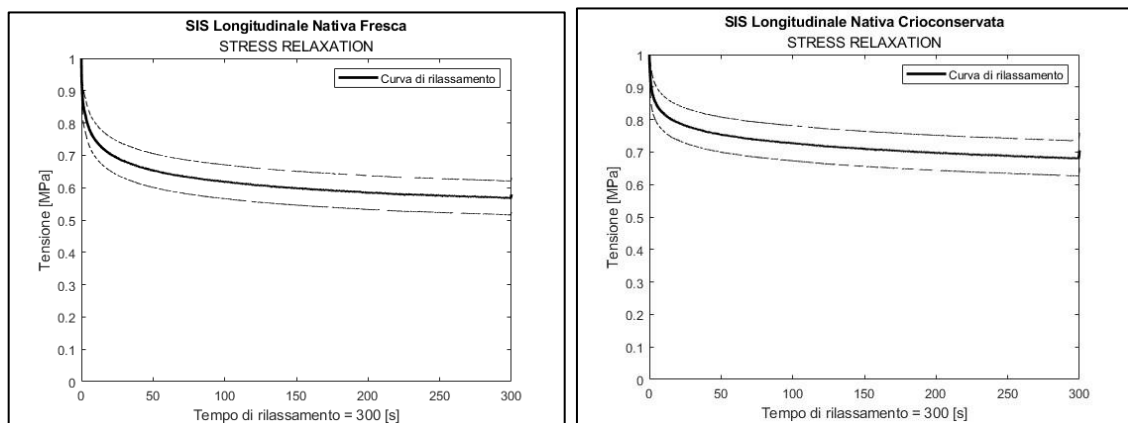


Fig. 3.53: Confronto tra le curve medie di rilassamento ottenute dalle prove meccaniche di stress relaxation della SIS longitudinale porcina nativa fresca (a sinistra) e crioconservata (a destra).

Vengono riportati nelle Tabelle dalla 3.35 alla 3.41, i valori di rilassamento per ogni singolo tessuto sottoposto a prova di stress relaxation. Vengono inseriti nelle tabelle anche i risultati ottenuti dall'analisi statistica del confronto fra tessuto nativo fresco e crioconservato.

PERICARDIO	RILASSAMENTO [%]	P-VALUE
NATIVO FRESCO	46.6361 +/- 7.9951	0.9818
NATIVO CRIOCONSERVATO	26.71 +/- 6.8757	

Tabella 3.35: Media e deviazione standard delle prove di stress relaxation del pericardio porcino, il p-value è il risultato del test T di Student realizzato confrontando tessuto nativo fresco e criopreservato.

URETERE	RILASSAMENTO [%]	P-VALUE
NATIVO FRESCO	67.4087 +/- 10.3405	0.3335
NATIVO CRIOCONSERVATO	50.6591 +/- 8.4555	

Tabella 3.36: Media e deviazione standard delle prove di stress relaxation dell'uretere porcino, il p-value è il risultato del test T di Student realizzato confrontando tessuto nativo fresco e criopreservato.

AORTA LONGITUDINALE	RILASSAMENTO [%]	P-VALUE
NATIVO FRESCO	35.7340 +/- 3.6035	0.8635
NATIVO CRIOCONSERVATO	18.2012 +/- 1.6756	

Tabella 3.37: Media e deviazione standard delle prove di stress relaxation dell'aorta longitudinale porcina, il p-value è il risultato del test T di Student realizzato confrontando tessuto nativo fresco e criopreservato.

AORTA CIRCONFERENZIALE	RILASSAMENTO [%]	P-VALUE
NATIVO FRESCO	17.7459 +/- 1.8676	0.7879
NATIVO CRIOCONSERVATO	10.9301 +/- 1.0986	

Tabella 3.38: Media e deviazione standard delle prove di stress relaxation dell'aorta circonferenziale porcina, il p-value è il risultato del test T di Student realizzato confrontando tessuto nativo fresco e criopreservato.

SIS LONGITUDINALE	RILASSAMENTO [%]	P-VALUE
NATIVO FRESCO	42.1098 +/- 5.2334	0.7120
NATIVO CRIOCONSERVATO	29.5055 +/- 5.4010	

Tabella 3.41: Media e deviazione standard delle prove di stress relaxation della SIS longitudinale porcina, il p-value è il risultato del test T di Student realizzato confrontando tessuto nativo fresco e criopreservato.

SIS CIRCONFERENZIALE	RILASSAMENTO [%]	P-VALUE
NATIVO FRESCO	51.5966 +/- 6.887	0.6210
NATIVO CRIOCONSERVATO	38.5726 +/- 4.5274	

Tabella 3.40: Media e deviazione standard delle prove di stress relaxation della SIS circonferenziale porcina, il p-value è il risultato del test T di Student realizzato confrontando tessuto nativo fresco e criopreservato.

Nell'istogramma in Figura 3.54, che riporta i valori medi di rilassamento dei tessuti nativi freschi e crioconservati, si indicano le differenze statisticamente significative dovute alla crioconservazione.

Complessivamente, dai dati di rilassamento delle tensioni, si possono ricavare alcune informazioni riguardanti il comportamento di un tessuto crioconservato rispetto al suo controllo. Si può notare come il tessuto crioconservato porcino, in media, raggiunga un valore di tensione più vicino a quello iniziale rispetto al corrispettivo nativo fresco e ciò vuol dire che tutti i tessuti crioconservati analizzati hanno un valore di rilassamento minore. Anche la standard deviation delle curve medie di rilassamento dei tessuti crioconservati sono minori. Nonostante si possa notare chiaramente una tendenza decrescente dei valori di rilassamento dovuta alla crioconservazione, dall'analisi statistica effettuata non è stata rilevata nessuna differenza statisticamente significativa.

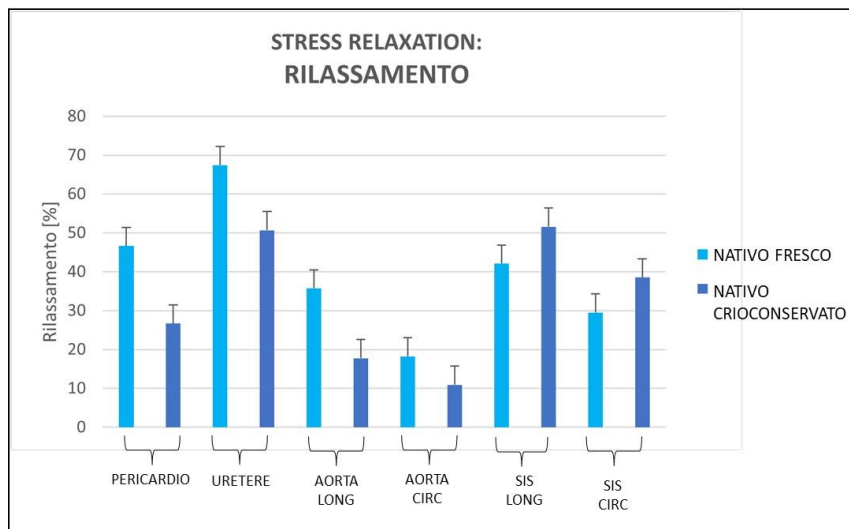


Figura 3.54: Confronto tra i valori di rilassamento in percentuale nelle prove di stress relaxation per tutti i tessuti analizzati.

4 Discussione

Obiettivo di questo lavoro di tesi è stata la valutazione dell'effetto della criopreservazione sui seguenti tessuti di derivazione porcina: pericardio, uretere, SIS e aorta. Dai risultati è emerso come il processo di crioconservazione sia in grado di mantenere sia struttura di un tessuto che le proprietà meccaniche.

Attraverso le prove istologiche è stata analizzata la struttura dei tessuti. Nelle colorazioni di HE di tutti i tessuti e di MT del pericardio e dell'uretere è visibile come il collagene con le sue fibre ondulate sia rimasto invariato tra il tessuto nativo fresco e quello crioconservato. Più nello specifico, nelle immagini di HE si riscontra la permanenza del connettivo nei tessuti nativi crioconservati ed è possibile notare la presenza di nuclei in viola. Anche le colorazioni di MT permettono di confermare quanto detto sul mantenimento dell'architettura della ECM e, inoltre, consentono di apprezzare la complessiva struttura di ogni tessuto. L'AB effettuato solo su pericardio evidenzia il fatto che anche i glicosamminoglicani si mantengono dopo la crioconservazione. In nessuno dei tessuti presi in esame è visibile, quindi, una modificazione dell'architettura dell'ECM, di conseguenza è possibile affermare che la crioconservazione non causi danni strutturali. In estrema sintesi, la microarchitettura di ciascun tessuto resta preservata dalla crioconservazione.

Per quanto riguarda la caratterizzazione biomeccanica, le prime misure effettuate sui provini dei tessuti sono state quelle sugli spessori: dai valori medi ottenuti non compare nessuna differenza significativa prima e dopo la crioconservazione. Questo risultato suggerisce che il contenuto cellulare e fibroso non è diminuito significativamente nel tessuto crioconservato e questo è in linea con quanto evidenziato tramite le istologie. La fase di scongelamento, se non fosse opportunamente controllata, potrebbe provocare la disidratazione del tessuto rendendolo meno spesso oltre che meccanicamente più rigido; quindi, in questi termini, il protocollo messa a punto per questa attività di ricerca ha prodotto buoni risultati. Per un'eventuale applicazione, è importante che la crioconservazione mantenga le dimensioni del tessuto nativo fresco. Questo è in accordo con l'articolo di Cunnane et al. [42]: durante la loro attività di ricerca eseguita su un tessuto uretrale porcino con un protocollo diverso da quello utilizzato nel presente lavoro di tesi, hanno analizzato dettagliatamente le misure prese sui campioni analizzati. Il risultato è stato che la crioconservazione non cambia le dimensioni del provino e, anzi, rende più riproducibili le caratteristiche del materiale biologico.

Per quanto riguarda i valori raccolti dai parametri misurati nelle prove meccaniche, per tutti i tessuti si ricavano conclusioni generali dal confronto fra tessuto nativo fresco e tessuto nativo crioconservato. Dall'interpretazione dei risultati ottenuti dalle prove a rottura, emerge come il

valore di tensione ultima sia minore nel tessuto crioconservato, e allo stesso tempo la FS aumenti. L'andamento dei valori di questi due parametri accoppiati suggerisce una maggior estensibilità del tessuto crioconservato e ciò viene confermato anche dalla diminuzione dei valori dei moduli di Young iniziale e finale. Da queste valutazioni si potrebbe pensare ad una compromessa stabilità meccanica del tessuto crioconservato se posto a trazione. La prima ipotesi per spiegare i risultati di questo test consiste nel fatto che la minore resistenza a trazione può essere attribuita ad un indebolimento delle fibre strutturali. Concentrandosi sull'aumento del valore di FS, si potrebbe ipotizzare che il maggior grado di deformabilità del tessuto crioconservato sia dato come conseguenza del cambiamento della configurazione del collagene. La fase a riposo del collagene coincide con la tipica conformazione di *uncrimping*: la fase di congelamento rende le fibrille meno mobili, cioè meno capaci di scivolare l'una sull'altra dando la possibilità al tessuto di allungarsi deputando maggiormente la resistenza meccanica all'elastina, che esibisce, rispetto al collagene, più elasticità se sottoposta a trazione. Questo aspetto è riscontrabile anche dalle prove di stress relaxation, dove i tessuti nativi crioconservati mostrano un rilassamento più contenuto. In conclusione, la crioconservazione irrigidisce meccanicamente il tessuto senza dare però un cambiamento statisticamente significativo.

I risultati delle prove cicliche esibiscono un aumento di UTS con un aumento di FS. Lo stress ciclico delle tensioni ha come effetto quello di distendere le fibre di collagene ed elastina allineandole maggiormente secondo la direzione di carico. Ne consegue che nell'ultimo step in cui si portano i campioni a rottura, all'inizio della curva tenso-deformativa, c'è maggiore rigidità se confrontata con la medesima situazione in una prova a rottura. Ciò è confermato dall'incremento del modulo elastico E_1 dei tessuti nativi crioconservati nelle prove cicliche. Questo incremento segnala una richiesta maggiore di energia per deformare il tessuto.

Continuando a paragonare E_1 di una prova a rottura ed E_1 di una prova ciclica, si vede come questo aumenti in una prova ciclica, soprattutto prendendo in esame i tessuti crioconservati, dove la differenza è significativa.

Precedenti studi hanno trovato risultati diversi circa l'effetto della crioconservazione sulle proprietà meccaniche dei tessuti porcini. Utilizzando test uniassiali, Venkatasubramanian et al. [47] hanno scoperto che il congelamento delle arterie a -20°C ha aumentato significativamente il modulo di Young della regione iniziale nelle curve sforzo-deformazione ottenute da prove a rottura. Tempra et al. [48] hanno studiato gli effetti di 3 tipi di crioconservazione, a 4°C , -20°C e -80°C , sempre su arterie. Essi hanno riscontrato, sempre nelle prove a rottura, una diminuzione significativa nel modulo di Young nella regione iniziale e una diminuzione di UTS per i tessuti conservati a 4°C , ma le arterie congelate a -20°C e a -80°C non mostrano nessuna di queste tendenze.

In un altro studio condotto da Vinci et al. [28] su pericardio umano decellularizzato e crioconservato con RPMI 1640, 10% di DMSO, attraverso l'uso di vapori di azoto liquido e mantenuti fra i -140°C

e i -185°C, non si sono riscontrate differenze significative né per l'integrità dei tessuti, né per le prestazioni biomeccaniche.

Le differenze in questi risultati potrebbero essere attribuite al tipo di crioconservazione, più nello specifico alla composizione della soluzione criopreservante alla temperatura di congelamento, e al processo di scongelamento. Inoltre, c'è da considerare che ogni tessuto ha composizione e microstruttura che differiscono da qualsiasi altro tessuto di provenienza autologa, ma anche allogenica.

In conclusione, non è dato sapere quale sia il protocollo di crioconservazione ottimale per tutti i tessuti e per qualsivoglia scopo.

L'obiettivo di questo lavoro di tesi era quello di validare un protocollo di crioconservazione con lo scopo di ottenere dei tessuti (pericardio, uretere, aorta discendente e SIS) in grado di conservare le principali caratteristiche e proprietà di quelli nativi freschi. Questo obiettivo è stato raggiunto dal momento che le analisi istologiche e le prove biomeccaniche hanno dimostrato un buon livello di conservazione dell'architettura e delle caratteristiche dei tessuti presi in esame. In un'ottica futura, potrebbe essere utile aggiungere uno step di decellularizzazione prima della crioconservazione. Come dimostrato da Iop et al. [24] accoppiare decellularizzazione e crioconservazione permette di unire i vantaggi di entrambe le procedure, ottenendo uno scaffold acellulare ben conservato, utile per diverse applicazioni in ambito clinico. Se si effettua una crioconservazione, soprattutto per tempi prolungati, nonostante si adoperi il DMSO, non sempre è possibile evitare totalmente lo sviluppo di questi cristalli. La conseguenza è che il cristallo va a disporsi nell'ambiente extracellulare modificando la configurazione originale del tessuto fibroso, talvolta con danni irreversibili. Come ha già riportato Pegg DE [49], il ghiaccio può formarsi anche per via intracellulare tanto che quanto più si accelera la fase di congelamento e/o scongelamento, tanto più decresce la probabilità di sopravvivenza di una cellula. La formazione di ghiaccio intracellulare causa la rottura della membrana cellulare e questa conseguenza della crioconservazione, andrebbe a enfatizzare la decellularizzazione del tessuto nativo [49]. Questo aspetto particolare della crioconservazione meriterebbe sicuramente uno studio più approfondito anche in relazione al protocollo utilizzato in questa tesi.

Per confermare i risultati fino a qui ottenuti si potrebbe ricorrere, ad esempio, all'immunoistochimica, che permetterebbe di visualizzare la presenza di componenti specifiche della membrana cellulare e la presenza delle componenti strutturali della ECM. Con il SEM si potrebbe confermare l'assenza di danni ultrastrutturali e la buona organizzazione di collagene e di elastina.

5 Bibliografia

- [1] “Linee guida per il prelievo, la processazione e la distribuzione di tessuti a scopo di trapianto” - <https://www.trapianti.salute.gov.it>
- [2] SIT: Sistema Informativo Trapianti; “Centro Nazionale Trapianti, Sistema Informativo di Sanità”; https://trapianti.sanita.it/statistiche/report_attivita.aspx - Dati consolidati al 2022
- [3] C. Di Bello and A. Bagno; “Biomateriali dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche”, Seconda Ed.; 2016.
- [4] Watson, Peter H et al. “Evolutionary concepts in biobanking - the BC BioLibrary.” *Journal of translational medicine* vol. 7 95. 12 Nov. 2009.
- [5] Vaught, Jim, and Nicole C Lockhart. “The evolution of biobanking best practices.” *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* vol. 413,19-20 (2012): 1569-75.
- [6] Schmitt, S et al. “Challenges for quality management in implementation, maintenance, and sustainability of research tissue biobanks.” *Virchows Archiv : an international journal of pathology* vol. 468,1 (2016): 93-9.
- [7] Chaudhari, Atul A et al. “Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review.” *International journal of molecular sciences* vol. 17,12 1974. 25 Nov. 2016.
- [8] Langer, R, and J P Vacanti. “Tissue engineering.” *Science (New York, N.Y.)* vol. 260,5110 (1993): 920-6.
- [9] Pearson, R G et al. “Recent Advances in Tissue Engineering.” *Journal of long-term effects of medical implants* vol. 27,2-4 (2017): 199-231.
- [10] MacArthur, Ben D, and Richard O C Oreffo. “Bridging the gap.” *Nature* vol. 433,7021 (2005): 19.
- [11] Salgado, António J et al. “Tissue engineering and regenerative medicine: past, present, and future.” *International review of neurobiology* vol. 108 (2013): 1-33.
- [12] Welman, Ted et al. “Bioengineering for Organ Transplantation: Progress and Challenges.” *Bioengineered* vol. 6,5 (2015): 257-61.
- [13] Peloso, Andrea et al. “Current achievements and future perspectives in whole-organ bioengineering.” *Stem cell research & therapy* vol. 6,1 107. 1 Jun. 2015.
- [13] Cosgriff-Hernandez, Elizabeth, and Lucas H Timmins. “Model-Directed Design of Tissue Engineering Scaffolds.” *ACS biomaterials science & engineering* vol. 8,11 (2022): 4622-4624.
- [14] Chan, B P, and K W Leong. “Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations.” *European spine journal : official publication of the European*

Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society vol. 17 Suppl 4, Suppl 4 (2008): 467-79.

[15] Correia, S I et al. "Current concepts: tissue engineering and regenerative medicine applications in the ankle joint." *Journal of the Royal Society, Interface* vol. 11,92 20130784. 18 Dec. 2013.

[16] Thomas, Anita C et al. "Advances in vascular tissue engineering." *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* vol. 12,5 (2003): 271-6.

[17] Salgado, António J et al. "Bone tissue engineering: state of the art and future trends." *Macromolecular bioscience* vol. 4,8 (2004): 743-65.

[18] Shoulders, Matthew D, and Ronald T Raines. "Collagen structure and stability." *Annual review of biochemistry* vol. 78 (2009): 929-58.

[19] Bailey, A J. "Collagen and elastin fibres." *Journal of clinical pathology. Supplement (Royal College of Pathologists)* vol. 12 (1978): 49-58.

[20] Buehler, Markus J. "Nature designs tough collagen: explaining the nanostructure of collagen fibrils." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 103,33 (2006): 12285-90.

[21] Xiao, Yuelong et al. "Structure of Elastin." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* vol. 2347 (2021): 27-33.

[22] Sasaki, N, and S Odajima. "Elongation mechanism of collagen fibrils and force-strain relations of tendon at each level of structural hierarchy." *Journal of biomechanics* vol. 29,9 (1996): 1131-6.

[23] Lezioni del corso di "Metodi Ingegneristici per la progettazione di dispositivi e procedure clinico-chirurgiche"; Bioingegneria A.A. 2021/2022, Proff. Carniel e Fontanella

[24] Iop, Laura et al. "Decellularized Cryopreserved Allografts as Off-the-Shelf Allogeneic Alternative for Heart Valve Replacement: In Vitro Assessment Before Clinical Translation." *Journal of cardiovascular translational research* vol. 10,2 (2017): 93-103.

[25] Zouhair, Sabra et al. "Preservation strategies for decellularized pericardial scaffolds for off-the-shelf availability." *Acta biomaterialia* vol. 84 (2019): 208-221.

[26] Gerson, Cindy J et al. "Retained structural integrity of collagen and elastin within cryopreserved human heart valve tissue as detected by two-photon laser scanning confocal microscopy." *Cryobiology* vol. 59,2 (2009): 171-9.

[27] Brayton, C F. "Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review." *The Cornell veterinarian* vol. 76,1 (1986): 61-90.

[28] Vinci, Maria Cristina et al. "Mechanical compliance and immunological compatibility of fixative-free decellularized/cryopreserved human pericardium." *PloS one* vol. 8,5 e64769. 21 May. 2013.

- [29] Huber, Agnes J T et al. "Development of a simplified ice-free cryopreservation method for heart valves employing VS83, an 83% cryoprotectant formulation." *Biopreservation and biobanking* vol. 10,6 (2012): 479-84.
- [30] Lauk-Dubitskiy, Stanislav E et al. "Porcine heart valve, aorta and trachea cryopreservation and thawing using polydimethylsiloxane." *Cryobiology* vol. 93 (2020): 91-101.
- [31] Badylak, Stephen F et al. "Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds." *Annual review of biomedical engineering* vol. 13 (2011): 27-53.
- [32] Gilbert, Thomas W et al. "Decellularization of tissues and organs." *Biomaterials* vol. 27,19 (2006): 3675-83.
- [33] Cramer, Madeline C, and Stephen F Badylak. "Extracellular Matrix-Based Biomaterials and Their Influence Upon Cell Behavior." *Annals of biomedical engineering* vol. 48,7 (2020): 2132-2153.
- [34] Crapo, Peter M et al. "An overview of tissue and whole organ decellularization processes." *Biomaterials* vol. 32,12 (2011): 3233-43.
- [35] Morrison, J J et al. "Surgically relevant structure on the ascending aorta." *Clinical anatomy (New York, N.Y.)* vol. 16,3 (2003): 253-5.
- [36] Rodriguez, E Rene, and Carmela D Tan. "Structure and Anatomy of the Human Pericardium." *Progress in cardiovascular diseases* vol. 59,4 (2017): 327-340.
- [37] Standring Susan; Barni T., Billi A. "Anatomia del Gray. Le basi anatomiche per la pratica clinica" vol. 2, 2016.
- [38] Lima, Estela de Oliveira et al. "Decellularization of Human Pericardium with Potential Application in Regenerative Medicine." *Arquivos brasileiros de cardiologia* vol. 113,1 18-19. 8 Aug. 2019.
- [39] Vinci, Maria Cristina et al. "Mechanical compliance and immunological compatibility of fixative-free decellularized/cryopreserved human pericardium." *PloS one* vol. 8,5 e64769. 21 May. 2013.
- [40] Simeone, C et al. "Struttura, fisiologia e fisiopatologia dell'uretere" [Structure, physiology and physiopathology of the ureter]. *Archivio italiano di urologia, nefrologia, andrologia : organo ufficiale dell'Associazione per la ricerca in urologia = Urological, nephrological, and andrological sciences* vol. 65,1 (1993): 21-5.
- [41] Casarin, Martina et al. "A Novel Hybrid Membrane for Urinary Conduit Substitutes Based on Small Intestinal Submucosa Coupled with Two Synthetic Polymers." *Journal of functional biomaterials* vol. 13,4 222. 5 Nov. 2022.
- [42] Cunnane, Connor V et al. "Cryopreservation of porcine urethral tissue: Storage at -20°C preserves the mechanical, failure and geometrical properties." *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* vol. 119 (2021): 104516.

- [43] Gallo, Michele et al. "Decellularized aortic conduits: could their cryopreservation affect post-implantation outcomes? A morpho-functional study on porcine homografts." *Heart and vessels* vol. 31,11 (2016): 1862-1873.
- [44] Casarin, Martina et al. "Porcine Small Intestinal Submucosa (SIS) as a Suitable Scaffold for the Creation of a Tissue-Engineered Urinary Conduit: Decellularization, Biomechanical and Biocompatibility Characterization Using New Approaches." *International journal of molecular sciences* vol. 23,5 2826. 4 Mar. 2022.
- [45] Yang, Kai et al. *Chinese journal of reparative and reconstructive surgery* vol. 27,9 (2013): 1138-43.
- [46] "Linee guida per il prelievo, la processazione e la distribuzione di tessuti a scopo di trapianto" approvate nella seduta del CNT il 14 settembre 2016. - <https://www.fbtv-treviso.org/normative>
- [47] Venkatasubramanian, Ramji T et al. "Effects of freezing and cryopreservation on the mechanical properties of arteries." *Annals of biomedical engineering* vol. 34,5 (2006): 823-32.
- [48] Chow, Ming-Jay, and Yanhang Zhang. "Changes in the mechanical and biochemical properties of aortic tissue due to cold storage." *The Journal of surgical research* vol. 171,2 (2011): 434-42.
- [49] Pegg, David E. "The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs." *Cryobiology* vol. 93 (2020): 3-11.