

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PAVIA

Dottorato di Ricerca in Medicina Sperimentale

*An hybrid approach to the repair of esophageal defects:  
from bioscaffolds engineering to in vivo validation in the  
porcine model*

Relatore: Chiar.mo Prof. Marco Benazzo

Dottorando: Simone Mauramati

# Sommario

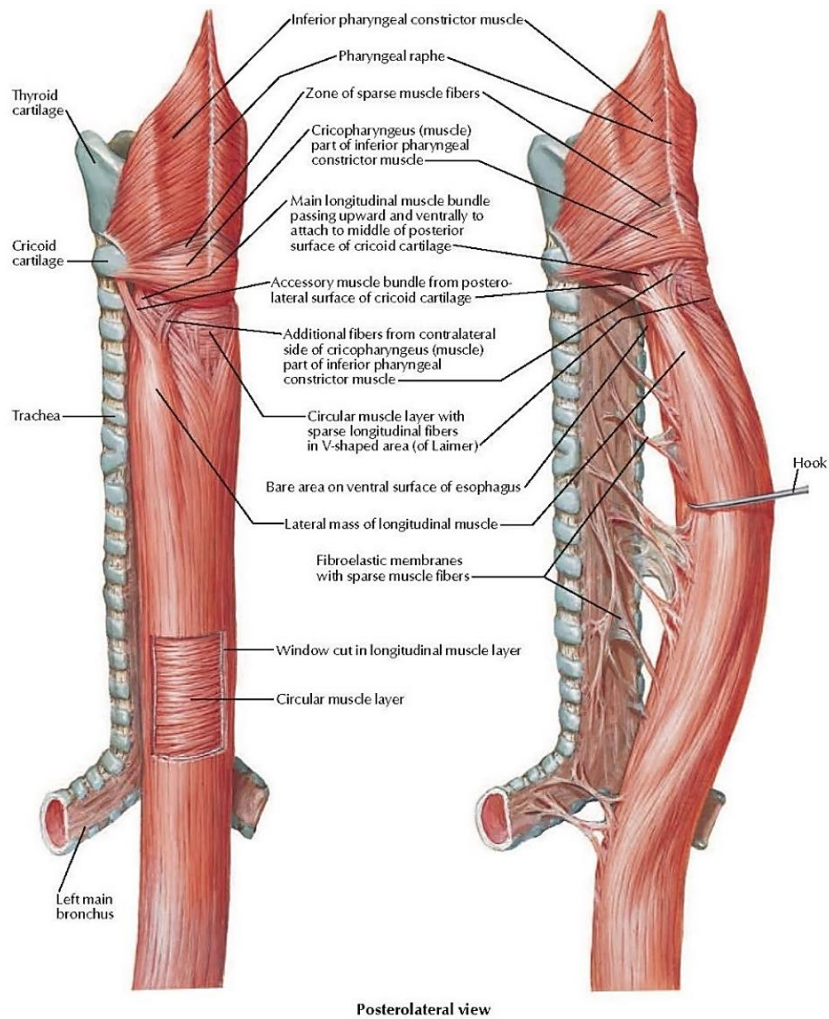
<b>1. L'esofago</b> .....	4
1.1. Anatomia e struttura dell'esofago .....	4
1.1.1 Esofago cervicale .....	5
1.1.2 Esofago toracico .....	6
1.1.3. Esofago diaframmatico ed addominale .....	8
1.2 Vascolarizzazione ed innervazione.....	9
1.3 Istologia dell'esofago.....	10
1.4 Capacità rigenerativa dell'esofago.....	12
1.5 Resistenza ed elasticità .....	13
<b>2. Patologie esofagee di interesse chirurgico</b> .....	14
2.1 Atresia esofagea .....	14
2.2 Tumori dell'esofago .....	15
2.2.1 Epidemiologia .....	15
2.2.2 Adenocarcinoma esofageo .....	16
2.2.3 Carcinoma squamocellulare dell'esofago .....	17
2.2.4 Diagnosi e stadiazione .....	18
2.2.5 Il ruolo della chirurgia nelle patologie esofagee.....	20
2.2 La ricostruzione dei difetti esofagei.....	22
<b>3. Introduzione alla bioingegneria esofagea</b> .....	24
3.1 Scaffolds acellularizzati .....	25
3.1.1 Scaffolds sintetici .....	26
3.1.2 Scaffold acellularizzati in componente sintetica e collagene .....	27
3.1.3 Scaffolds di matrice decellularizzata .....	29
3.2 Scaffolds cellularizzati.....	33
3.2.1 Lo studio Aikawa <i>et al.</i> .....	37
3.3 Il ruolo delle cellule staminali mesenchimali .....	39
3.3.1 Caratteristiche e potenzialità delle MSCs .....	40
3.3.2 Profilo fenotipico delle MSCs .....	44
3.3.3 MSCs in studi clinici e preclinici.....	45
<b>4. Il prototipo dell'Università di Pavia</b> .....	47
4.1 Obiettivi dell'esperimento.....	47
4.2 Preparazione dei patches polimerici .....	48
4.2.1 La tecnica di Temperature Induced Precipitation .....	49
4.2.2 La tecnica di elettrospinning .....	50
4.2.3 Caratterizzazione fisico-chimica dei patches.....	51

4.3 Isolamento di pig-MSCs .....	53
4.3.1 Caratterizzazione delle pig-MSCs .....	53
4.3.2 Semina delle pig-MSCs su patch.....	55
4.3.3 Caratterizzazione biologica dei prototipi ottenuti.....	55
<b>5. La tecnica chirurgica su modello animale .....</b>	<b>59</b>
5.1 Materiali e metodi.....	59
5.2 Risultati.....	67
5.3 Discussione .....	69
5.4 Conclusioni .....	73
<b>6. Bibliografia .....</b>	<b>75</b>

# 1. L'esofago

## 1.1. Anatomia e struttura dell'esofago

L'esofago umano è un organo tubulare muscolomembranoso diretto longitudinalmente, il cui ruolo è quello di convogliare gli alimenti dalla faringe, di cui è continuazione, allo stomaco, terminando così il processo di deglutizione [figura 1.1].



**Figura 1.1** - muscolatura dell'esofago in visione posterolaterale. L'esofago è composto da due strati muscolari: uno circolare interno ed uno longitudinale esterno. La maggior parte dei fasci muscolari longitudinali origina dal legamento di Gillette, localizzato sulla faccia posteriore della laringe; tali fasci decorrono posteriormente ed inferiormente, lasciando scoperto un triangolo di muscolatura circolare sulla faccia posteriore dell'esofago, definito **triangolo di Laimer**. Si evidenzia inoltre il **muscolo cricofaringeo**, parte del muscolo costrittore inferiore della faringe, esteso dalla cartilagine cricoide al rafe faringeo longitudinale. Nella figura a destra si evidenziano le fibre del **muscolo tracheoesofageo**.

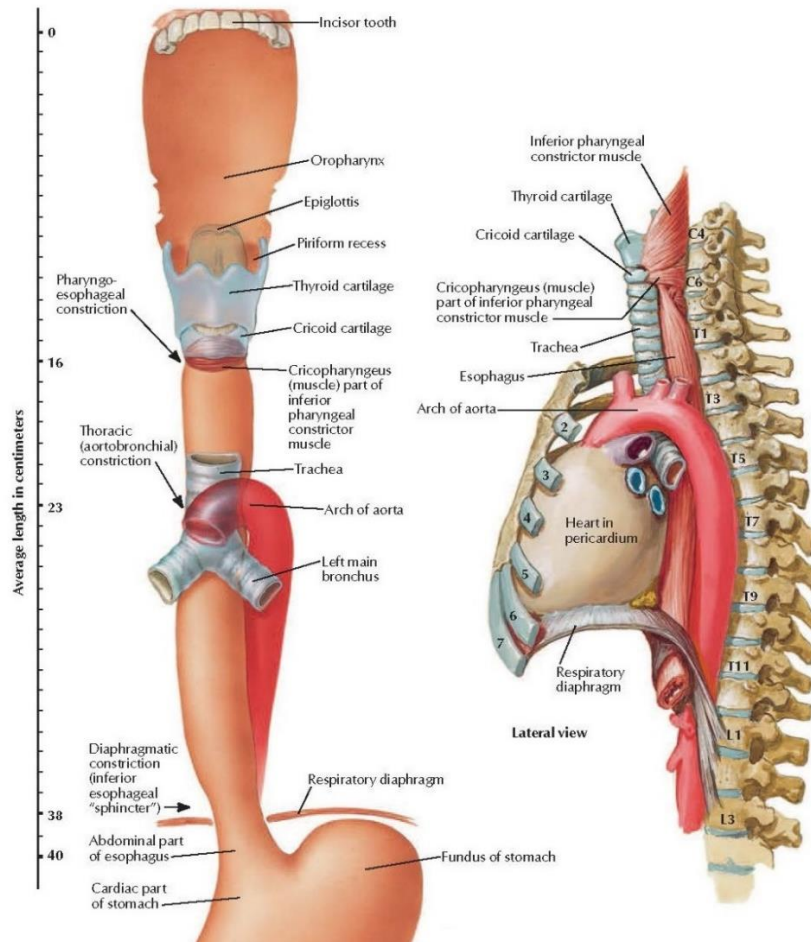
Il condotto esofageo si estende dal piano orizzontale che sfiora il margine inferiore della cartilagine cricoide, all'orifizio circolare, chiamato *cardias*, per mezzo del quale si apre nello stomaco; considerando quindi un uomo in posizione eretta tali limiti corrispondono, in alto, al corpo della VI o VII vertebra cervicale e, in basso, alla X o XI vertebra toracica. L'esofago misura, in media, 25 cm ed è possibile suddividerlo, dal punto di vista topografico, in quattro porzioni: una porzione cervicale, della lunghezza di 5 cm, estesa dalla cricoide al piano orizzontale definito dalla forchetta sternale; una porzione toracica, lunga da 16 a 20 cm, che termina a contatto con il diaframma; una porzione diaframmatica di 1-1,5 cm, passante per l'orifizio esofageo, e una porzione addominale lunga da 2,5 a 3 cm terminante in corrispondenza dello stomaco [figura 1.2].

Lungo il suo tragitto discendente, l'esofago presenta, sul piano sagittale, una curvatura a concavità anteriore che segue l'andamento della colonna vertebrale dalla VI vertebra cervicale alla IV o V vertebra toracica; si discosta, in seguito, dai corpi vertebrali portandosi progressivamente e gradualmente in avanti. Il canale presenta anche delle inflessioni sul piano trasversale, descrive infatti una curva a concavità sinistra nella porzione cervicale per poi spostarsi in posizione mediana in corrispondenza dell'arco aortico e infine progressivamente definisce una curva a concavità destra per far posto all'aorta discendente, che si porta sul lato sinistro della colonna vertebrale.

#### 1.1.1 Esofago cervicale

La parte cervicale è in rapporto anteriormente con la trachea, da cui è separato per mezzo del sottile muscolo tracheoesofageo; nel descrivere la curva a concavità sinistra, una porzione della faccia anteriore dell'esofago sborda dalla trachea e, rimanendo scoperta, e prende contatto con il lobo sinistro della ghiandola tiroide, con il muscolo sternotiroideo, con lo sternioideo e con il nervo laringeo ricorrente di sinistra che si interpone nell'angolo dietro localizzato tra trachea ed esofago. Il nervo ricorrente destro costeggia invece la parete laterale destra dell'organo. Posteriormente, l'esofago è separato dalla colonna vertebrale dallo spazio retroesofageo, continuazione inferiore dello spazio retrofaringeo. Due lamine fibrose, dette setti sagittali dell'esofago, delimitano i margini laterali dell'esofago portandosi posteriormente a terminare nell'aponeurosi prevertebrale; sul versante esterno, le lamine prendono contatti con i lobi tiroidei, le arterie tiroidee inferiori, le vene tiroidee medie ed inferiori ed i nervi laringei. Più lateralmente, sullo stesso piano, si trovano le carotidi comuni e, posteriormente a queste, il simpatico

cervicale. Anteriormente, i piani di copertura dell'esofago cervicale sono formati dai muscoli sternoioideo e sternocleidoioideo, lateralmente il muscolo omoioideo separa la loggia del condotto laringotracheale dal muscolo sternocleidomastoideo.



**Figura 1.2** - a sinistra: rappresentazione della lunghezza dei segmenti esofagei. Si evidenziano: l'esofago cervicale (cm 16-23); l'esofago toracico (cm 23-38) che termina al di sopra dello stretto diaframmatico; l'esofago diaframmatico (cm 38-40) e l'esofago addominale, esteso dal piano diaframmatico allo stomaco.

A destra: visione laterale dell'esofago toracico. Dopo la biforcazione tracheale, l'esofago incrocia il bronco sinistro per poi interpersi tra pericardio e colonna vertebrale.

### 1.1.2 Esofago toracico

La parte toracica dell'esofago è posizionata nel mediastino posteriore e può essere suddivisa in due tratti, superiore ed inferiore, il cui limite è rappresentato dal passaggio dell'esofago tra due archi: l'arco dell'aorta a sinistra e l'arco della vena azygos a destra. L'esofago toracico è circondato da organi che lo costeggiano ed è difeso da pareti ossee difficili da attraversare, per cui non è risultato aggredibile, dal punto di vista chirurgico, fino a quando non è entrato nella pratica l'impiego della via transpleurale. Il muscolo

tracheoesofageo continua ad interporsi anteriormente tra trachea e esofago anche nel segmento toracico di quest'ultimo. Anteriormente alla trachea si trova il piano vascolare, costituito, procedendo verso l'esterno, dalle vene brachiocefaliche e dal tratto ascendente dell'aorta, dalla prima parte dell'arco e dai vasi secondari che vi originano: il tronco brachiocefalico a destra, la carotide comune sinistra e la succlavia sinistra. Tra la carotide e l'arteria succlavia passa il nervo vago sinistro che, incrociando la faccia anteriore dell'aorta, cede il nervo laringeo ricorrente che si colloca nell'angolo diedro, tra trachea ed esofago, e mantiene questa posizione. Il nervo vago destro, dopo essere passato tra l'arteria e la vena succlavia destre, cede il nervo laringeo destro che, quindi, in un primo tratto è distanziato dall'esofago. Posteriormente, il tratto superiore dell'esofago toracico decorre a contatto con la colonna vertebrale fino alla IV o V vertebra toracica da cui poi progressivamente si distanzia proseguendo la sua discesa.

Differenti sono invece i rapporti del tratto inferiore, definito anche segmento retrocardiaco, in cui l'esofago si pone tra il pericardio e la colonna vertebrale; anteriormente, dopo la biforcazione tracheale, l'esofago incrocia il bronco sinistro e prende contatto con i linfonodi intertracheobronchiali e con la faccia posteriore del pericardio, che lo separa dapprima dall'auricola sinistra e inferiormente dalla faccia posteriore del ventricolo sinistro. Posteriormente si trovano il dotto toracico, l'aorta discendente, le vene azygos ed emiazygos; quest'ultima, a livello della VII-VIII vertebra toracica, incrocia posteriormente l'esofago per congiungersi alla vena azygos. A destra l'esofago è a contatto con la pleura mediastinica e con la vena azygos, che a livello della IV vertebra toracica descrive un arco per congiungersi alla vena cava superiore. A sinistra, oltre che con la pleura mediastinica, il condotto è in rapporto con l'arco aortico e il primo tratto di aorta discendente. Le due pleure, a questo livello, sono lasse e molli, hanno quindi sufficiente stoffa per potersi deprimere e sollevare; a destra la pleura si deprime tra vena azygos e esofago, formando il cul di sacco interazygoesofageo, mentre a sinistra, la pleura si approfonda tra aorta discendente ed esofago formando il sacco interaorticoesofageo. Talvolta la pleura forma, al davanti dell'esofago, i cul di sacco preesofagei. È quindi possibile notare come la pleura sia poco aderente agli organi mediastinici ma ben fissata all'ilo polmonare ed alla colonna vertebrale. Le aderenze costovertebrali devono necessariamente essere recise se si vuole esporre l'esofago senza aprire la cavità pleurica.

Dopo aver incrociato posteriormente la faccia posteriore dei peduncoli polmonari, i nervi vaghi si accostano alle pareti laterali dell'esofago e si dividono in due rami: uno anteriore e uno posteriore, che si uniscono anteriormente nel tronco comune anteriore e posteriormente nel tronco comune posteriore. I due tronchi si scambiano tra loro anastomosi oblique, che allacciano l'esofago con una rete nervosa a maglie molto larghe. Durante questo tragitto, l'esofago è circondato dal tessuto celluloadiposo che occupa buona parte del mediastino posteriore e contrae delle connessioni per mezzo di fibre muscolari lisce con gli organi vicini; sono stati infatti descritti il muscolo pericardioesofageo, il muscolo aorticoesofageo ed i muscoli pleuroesofagei.

### 1.1.3. Esofago diaframmatico ed addominale

La parte diaframmatica dell'esofago corrisponde al limitato segmento di passaggio nell'orifizio esofageo del diaframma. A questo livello, l'esofago, accompagnato dai nervi vaghi, si impegna nell'anello muscolare che costituisce l'orifizio e che opera come un vero e proprio sfintere. Ciascuno dei pilastri del diaframma, che costituiscono il passaggio, emette delle fibre muscolari che vanno a mescolarsi con la muscolatura esofagea. L'aderenza tra diaframma ed esofago non è comunque particolarmente intima ed è quindi possibile isolare l'organo dal canale o trazionarlo nell'addome.

La parte addominale è in rapporto anteriormente con il lobo sinistro del fegato, sul lato destro con il lobo caudato, posteriormente con l'aorta addominale ed i pilastri mediali del diaframma, a questo livello l'esofago si immerge nel tessuto cellulare retroperitoneale e incrocia anteriormente l'arteria frenica sinistra e i vasi surrenali superiori sinistri. Sul lato sinistro il condotto entra in contatto con il fondo dello stomaco, che di solito si innalza sopra al cardias, sollevando il diaframma verso la cavità toracica. La faccia anteriore dell'organo è ricoperta dal peritoneo che poi prosegue, superiormente, sulla faccia inferiore del diaframma, inferiormente e a sinistra sulla faccia anteriore dello stomaco e a destra sul fegato, costituendo il foglietto anteriore del legamento epatogastrico. I due margini dell'esofago costituiscono così delle pliche peritoneali che, andando a fissarsi sugli organi vicini, costituiscono per l'esofago altrettanti mezzi di fissità.



## 1.2 Vascolarizzazione ed innervazione

Le arterie coinvolte nella vascolarizzazione dell'esofago provengono da varie sorgenti. Il tratto cervicale è irrorato dai rami esofagei dell'arteria tiroidea inferiore; nel torace, dai rami esofagei provenienti dall'aorta toracica direttamente o tramite le arterie bronchiali e le intercostali; nell'addome, l'irrorazione è a carico dei rami esofagei delle arterie freniche e dell'arteria gastrica sinistra. I rami coinvolti sono quindi piccoli ma numerosi e, dopo essere penetrati nella parete dell'organo, formano delle reti, tra loro più o meno distinguibili, nella muscolare, nella sottomucosa e nella lamina propria; i capillari generatisi in quest'ultima rete irrorano lo spessore delle papille e le ghiandole cardiache [figura 1.3].

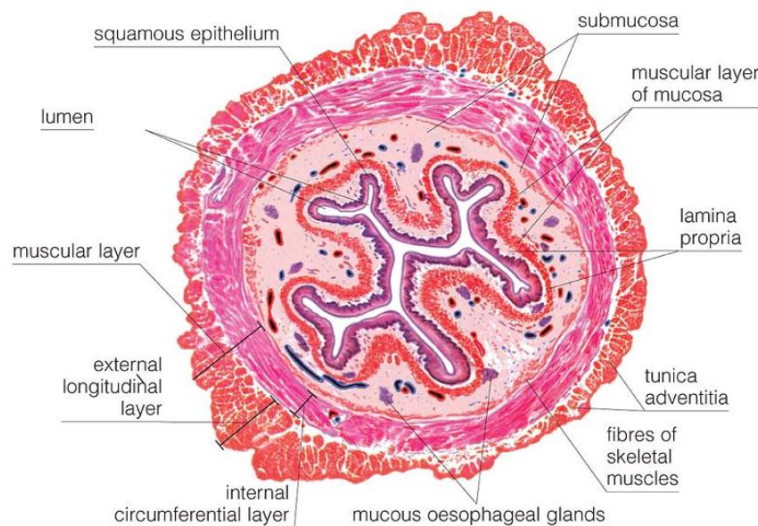
Le vene originano dalla rete capillare della lamina propria e si uniscono a formare, nella sottomucosa, il plesso venoso sottomucoso che si estende per tutta la lunghezza dell'organo ma che è più sviluppato nella sua parte inferiore. I rami efferenti, provenienti dal plesso, attraversano lo strato muscolare, continuando ad accogliere collaterali, per formare sulla superficie esterna un secondo plesso, il plesso venoso periesofageo. Alla fine il sangue refluo viene riversato in vasi diversi a seconda del tratto considerato: superiormente nelle vene tiroidee inferiori, a livello toracico nelle vene freniche, bronchiali, pericardiche e nella vena azygos, a loro volta tutte tributarie della vena cava superiore, inferiormente nella vena gastrica sinistra, tributaria della vena porta.

Nell'esofago si sviluppano due reti linfatiche: una rete sottomucosa, particolarmente ricca, e una rete muscolare. Il drenaggio della linfa del distretto cervicale è a carico dei linfonodi sottostanti il muscolo sternocleidomastoideo e a quelli appartenenti alla catena dei linfonodi ricorrenti. La porzione toracica fa capo ai linfonodi periesofagei, situati sulla faccia anteriore dell'esofago, che a loro volta fanno parte del gruppo dei linfonodi mediastinici posteriori. Nel tratto addominale i linfonodi coinvolti sono i gastrici superiori, situati in prossimità del cardias.

L'innervazione dell'esofago è a carico del nervo vago e del sistema simpatico spinale; i filuzzi nervosi a cui danno origine formano, tra i due piani della tonaca muscolare, un plesso di fibre mieliniche ed amieliniche [figura 1.4]. Le fibre mieliniche terminano con placche motrici nelle fibre muscolari. Un secondo plesso, formato da fibre amieliniche,

adibite all'innervazione della *muscularis mucosae* e delle ghiandole, è localizzato nella sottomucosa.

### 1.3 Istologia dell'esofago



**Figura 1.5** - sezione trasversale del primo terzo dell'esofago. Sono visibili i quattro strati concentrici: mucosa, sottomucosa, muscolare ed avventizia. La **mucosa**, internamente, è composta da lamina propria ed epitelio squamoso, è separata dalla tonaca sottomucosa dalla *muscularis mucosae*, sottile componente muscolare liscia. Nella **sottomucosa** sono presenti ghiandole a secrezione mucosa o mista, vasi e formazioni linfoidi. La tonaca **muscolare** è composta da due strati concentrici: longitudinale e circolare; essendo questa sezione rappresentativa del primo terzo dell'organo, la componente muscolare è striata e, pertanto, a controllo volontario.

Dal punto di vista strutturale, l'esofago comprende quattro tonache concentriche: mucosa, sottomucosa, muscolare esterna ed avventizia [figura 1.5-1.6].

La tonaca avventizia non costituisce una formazione ben distinta, essendo continuazione del tessuto perifaringeo, consiste infatti in un addensamento connettivale infiltrato di fibre elastiche.

La tonaca muscolare è molto robusta e conferisce all'esofago il suo colorito roseo. Le fibre muscolari sono connesse tra loro da tessuto connettivo che, addensandosi sul versante esterno dell'organo, dà origine alla tonaca avventizia. La tonaca muscolare comprende inoltre due distinti strati muscolari organizzati in direzione circonferenziale e longitudinale, che si attivano in tandem per generare la peristalsi esofagea. La maggior parte dei fasci longitudinali si distacca dalla faccia posteriore della laringe e, in

particolare, dal legamento sospenditore dell'esofago di Gillette; si tratta di un fascio fibrocartilagineo di forma triangolare esteso dalla mucosa esofagea alla cresta mediana localizzata posteriormente alla cartilagine cricoidea, tra i due muscoli cricoaritenoidi posteriori. Il margine inferiore del legamento di Gillette dà origine a fasci muscolari discendenti che si dividono in due fasci laterali che, aprendosi a ventaglio, arrivano ad abbracciare la metà corrispondente dell'esofago, destra e sinistra. I fasci che, decorrendo in maniera obliqua, arrivano sulla faccia posteriore dell'esofago lasciano scoperto un spazio triangolare a forma di V, della lunghezza di 3-4 cm, che è riempito da fibre circolari che si continuano in alto con il muscolo costrittore inferiore della faringe. Oltre ai fasci laterali descritti, prendono parte alla struttura dello strato muscolare longitudinale anche altri fasci ad inserzione sulla cartilagine cricoide e sull'aponeurosi faringea, infine rinforzano ulteriormente la struttura fasci a origine tracheale, bronchiale e diaframmatica. Giunto al cardias, lo strato longitudinale si continua con lo strato esterno della tonaca muscolare dello stomaco. Le fibre interne, o circolari, dello strato muscolare esofageo sono disposte ad anelli orizzontali e sono incrociate ad angolo retto dai fasci longitudinali. Anteriormente questi primi anelli aderiscono al legamento di Gillette, più in basso non vi sono altri elementi di sostegno se non la tela sottomucosa stessa. Giunte al cardias, queste fibre si continuano con le fibrocellule muscolari dello strato circolare dello stomaco. [1-2]

La muscolatura è composta sia da muscolatura liscia che striata con una peculiare disposizione. Nel terzo superiore dell'organo non esistono che fibre striate sia nello strato longitudinale che nello strato circolare, nel terzo medio compaiono le fibrocellule lisce, dapprima scarse poi progressivamente più numerose fino a che, nel terzo inferiore dell'organo, non si sostituiscono interamente alla componente muscolare striata. [3]

I due terzi distali dello strato muscolare, composti quindi da muscolatura liscia, sono innervati da fibre aventi origine dal tronco simpatico e dal nervo vago. Una volta che il processo di deglutizione è volontariamente iniziato, la peristalsi esofagea è mediata dall'innervazione simpatica e parasimpatica attraverso una serie di contrazioni muscolari orchestrate, che comprendono l'apertura e la chiusura dello sfintere esofageo inferiore. [4]

La tonaca sottomucosa si continua in alto con la lamina propria della faringe e in basso con la tonaca omonima dello stomaco; essa è particolarmente aderente allo strato mucoso e prende parte quindi alla formazione delle pliche che protrudono nel lume dell'organo. La sottomucosa è composta da tessuto connettivo lasso, lobuli di adipe e fibre elastiche. Sono comprese nella sottomucosa anche le ghiandole esofagee; si tratta di ghiandole acinose ramificate a secrezione mucosa o mista [figura 1.7].

La mucosa delinea il lume dell'esofago ed è tipicamente di colore bianco opaco. Si compone di due strati sovrapposti: uno superficiale, epiteliale, e uno profondo connettivale, la lamina propria [figura 1.8]. Lo strato epiteliale è formato da epitelio pavimentoso stratificato non cheratinizzato, continuazione dell'epitelio analogo presente in faringe, e si interrompe bruscamente a livello del cardias per convertirsi in epitelio della mucosa gastrica. La lamina propria è sollevata in numerose papille coniche che si spingono nell'epitelio, è costituita da connettivo denso con fibre elastiche e formazioni linfoidi sia follicolari, sia come infiltrazione diffusa. Nello strato più profondo, al confine con la sottomucosa, è presente la *muscularis mucosae*, costituita da fasci longitudinali di fibrocellule muscolari, questi fasci sono scarsi nella prima parte dell'organo ma si sviluppano e si organizzano progressivamente scendendo verso la seconda metà dell'esofago. La mucosa comprende anche le ghiandole cardiache, a struttura tubolare ramificata e secrezione prevalentemente mucosa, localizzate immediatamente al di sopra del cardias per un'estensione di 3-4 mm e nella porzione superiore dell'esofago, compresa tra la cartilagine cricoide e il quinto anello tracheale. [1-2]

#### 1.4 Capacità rigenerativa dell'esofago

Diversi studi hanno caratterizzato l'epitelio esofageo per quanto riguarda le capacità rigenerative; in particolare si è evidenziato come la mucosa sia un tessuto ad alto turnover e comprenda due strati: uno strato basale, a contatto con la membrana basale, composto da un singolo strato di cellule capaci di rigenerarsi, e uno strato soprabasale che contiene cellule progressivamente più differenziate procedendo verso il lume dell'organo. Lo strato basale comprende due zone distinte: uno strato papillare basale, esteso al di sopra

delle papille che dalla sottomucosa si invaginano nell'epitelio, e uno strato basale interpapillare, localizzato all'interfaccia mucosa-sottomucosa lineare tra le varie papille. [5] Lo strato interpapillare costituisce la nicchia delle cellule staminali esofagee; tali cellule sono capaci di proliferare ma lo fanno in modo asimmetrico ed infrequente. Studi effettuati sui topi hanno dimostrato come le cellule con alto potenziale staminale sono CD73+. [6] Si è inoltre ipotizzato che l'epitelio cubico che connette le ghiandole tubuloalveolari della sottomucosa con il lume dell'organo possa essere sede di altre cellule staminali, da queste infatti avrebbe origine la metaplasia intestinale caratteristica dell'esofago di Barrett. [7]

### 1.5 Resistenza ed elasticità

L'esofago è caratterizzato da una considerevole resistenza alla pressione ed alla trazione, è necessaria infatti una pressione di almeno un metro di mercurio per portare alla rottura dell'organo sano. Tra le varie tonache, la mucosa è quella caratterizzata da minor capacità di estensione, la muscolare, se sottoposta ad una tensione importante può fessurarsi in senso longitudinale. L'elasticità dell'organo non è pari alla sua resistenza, infatti, se traziato, non si allunga se non in piccola misura; se una porzione ne viene resecata tuttavia, i due monconi risultanti sono in grado di ritrarsi di parecchi centimetri, allontanandosi l'uno dall'altro. Questa particolarità dell'esofago rende conto dell'impossibilità di resecare frammenti di dimensioni importanti, a cui infatti consegue la difficoltà chirurgica di far affrontare in modo opportuno le due superfici di sezione; tale difficoltà è massima se il segmento resecato supera i 4 cm. [1]

## 2. Patologie esofagee di interesse chirurgico

Le patologie esofagee che compromettono la struttura e la funzione dell'esofago sono numerose e spesso *life-threatening*, pertanto non è infrequente che il loro trattamento comprenda la ricostruzione o sostituzione dell'organo. Nella popolazione pediatrica la condizione che più frequentemente ha indicazione alla sostituzione esofagea è l'atresia esofagea del tipo "*long-gap*", mentre, per gli adulti, tale patologia è il cancro dell'esofago. [8]

### 2.1 Atresia esofagea

Ogni anno le patologie esofagee congenite si presentano in un caso su 3000 nascite; le anomalie possono comprendere tutti gli strati dell'esofago e includono atresia esofagea, fistole tracheoesofagee e agenesia esofagea. Senza eccezioni si tratta di condizioni incompatibili con la vita. L'agenesia esofagea è caratterizzata dalla sostituzione di un segmento esofageo sano con un tratto non dilatabile, che, di conseguenza, comporta ostruzione meccanica del lume dell'organo. Tale segmento è nella maggior parte dei casi situato adiacente o vicino la carena ed è spesso associato ad una fistola che connette l'esofago, superiore o inferiore la stenosi, alla trachea. [9] Nonostante il miglioramento delle tecniche chirurgiche e delle cure pre- e postchirurgiche, che hanno permesso un ridimensionamento della prognosi, i pazienti nati con tali patologie continuano a presentare tuttora gravi morbilità sia nel breve che nel lungo termine. A seconda della situazione sottostante specifica, le anomalie congenite possono essere trattate chirurgicamente con gastrotomia, protesi sintetiche, lembi o trapianti di tessuto autologo. Il tasso di mortalità è stimato ad oggi all'11%; tra i pazienti trattati è comunque alto il tasso di complicanze nell'immediato post-operatorio, riscontrate nel 39% dei casi e che comprendono: pneumotorace, polmoniti, lesioni pleuriche e *leakage* dell'anastomosi. Le morbilità a lungo termine, tra i pazienti sopravvissuti, variano a seconda della popolazione considerata e riguardano invece l'instaurarsi di reflusso gastroesofageo nel 40% dei casi, curve crescita per altezza e peso sotto il quinto percentile per il 7%, tracheomalacia nel 13% dei casi. Il tasso di ricorrenza di fistole è compreso tra il 4 e il 9%, il *leakage* si verifica nel 11-16% dei casi e l'incidenza di stenosi si attesta per il 38% dei casi. [10-11] Uno dei problemi maggiori nel trattamento mediante protesi di tali

patologie è dovuto alla crescita del paziente, che, chiaramente, non è accompagnata da quella dei supporti protesici, con conseguente necessità di frequenti reinterventi. [12] Patologie meno frequenti, ma che possono portare alla necessità di sostituzione chirurgica dell'organo in età infantile sono: stenosi non responsive alla dilatazione a seguito di interventi per la risoluzione dell'atresia, ingestione di caustici e malattie più rare quali teratomi, leiomiomi e pseudotumori infiammatori. [13]

## 2.2 Tumori dell'esofago

### 2.2.1 Epidemiologia

Negli adulti la condizione che più frequentemente richiede la ricostruzione o sostituzione esofagea è il cancro dell'esofago, seguita dall'esofago di Barrett, alterazione con caratteristiche di premalignità [14]. Il cancro esofageo è l'ottavo tumore globalmente più frequente e corrisponde alla quinta causa di morte per patologia neoplastica nella fascia di età compresa tra i 40 e i 50 anni; l'80% delle morti per tumore dell'esofago avvengono in paesi sviluppati dal punto di vista socioeconomico. Secondo il *National Cancer Institute*, nel 2019 negli USA vi sono stati 17.600 nuovi casi di tumore dell'esofago e 16.000 morti per questa patologia. Si ritiene che l'incidenza di molti tipi di cancro diminuirà nei prossimi 10 anni, al contrario, è attesa una crescita di incidenza del tumore esofageo del 140% [15]. L'incidenza del cancro esofageo è in effetti aumentata considerevolmente negli ultimi anni, in concomitanza con cambiamenti nell'epidemiologia dei due maggiori istotipi di tumore: adenocarcinoma e carcinoma squamocellulare [16-17]. Fino a 30 anni fa il sottotipo squamocellulare causava fino al 90% dei tumori dell'esofago negli USA, nell'Europa occidentale e nell'Europa del Nord; al contrario, oggi, nelle stesse regioni menzionate, l'adenocarcinoma riguarda più dell'80% dei casi. Il carcinoma squamocellulare rimane la forma tumorale prevalente nel resto del mondo.

Nonostante gli avanzamenti nel campo della diagnosi e del trattamento il tasso di sopravvivenza a 5 anni per tutti i pazienti con cancro esofageo è compreso tra il 15 e il 20% e gli *outcomes* migliori sono associati a diagnosi di malattia in fase precoce [18].

### 2.2.2 Adenocarcinoma esofageo

L'adenocarcinoma dell'esofago ha uno dei più alti tassi di incidenza tra le varie patologie neoplastiche, contando circa 52.000 nuovi casi all'anno nel mondo [15]; non solo questo istotipo è diventato il più frequente negli USA e nell'Europa occidentale ma l'aumento della sua incidenza sembra strettamente correlato all'aumento dell'obesità; dato rilevante è che tra il 1975 e il 2004 l'incidenza di adenocarcinoma dell'esofago sia aumentata da 5,76 a 8,34/100.000 persone l'anno [19]. La crescita registrata non è dovuta né ad overdiagnosi né a riclassificazioni successive sulla base dell'istologia o della localizzazione [20]. Oltre l'obesità, tra i fattori di rischio per adenocarcinoma si annoverano il reflusso gastroesofageo, il fumo di sigaretta, l'acalasia esofagea e l'assenza di infezione gastrica da *Helicobacter pylori*. [21-22] Questo istotipo di tumore è più frequente nel sesso maschile, con un rapporto M:F=4.4:1, e si manifesta tendenzialmente dopo i 40 anni, il picco di incidenza si registra nella settima decade di vita. L'adenocarcinoma si sviluppa primariamente nel terzo distale dell'organo in cui è compresa la giunzione gastroesofagea.

La patogenesi dell'adenocarcinoma è spesso correlata all'esofago di Barrett, processo patologico che è conseguenza diretta della malattia da reflusso gastroesofageo [figura 2.1]. La causa più comune di MRGE è l'insufficienza o il rilascio dello sfintere esofageo inferiore, condizione che può essere causata da diversi fattori meccanici, quali obesità, gravidanza o aumento del volume gastrico, o da fattori non meccanici, tra cui l'abuso di alcol e tabacco. L'esofago di Barrett si sviluppa approssimativamente nel 10% di pazienti con MRGE come conseguenza della cronica esposizione al contenuto acido dello stomaco, a cui l'epitelio squamoso pluristratificato risponde con metaplasia colonnare. Anche il reflusso biliare può avere un ruolo nell'instaurarsi di questa condizione [23]. Si stima che la prevalenza dell'esofago di Barrett sia dell'1,6% nella popolazione generale e che venga riscontrato nel 10-15% dei pazienti che si sottopongono ad un esame di gastroscopia per sintomi tipici del reflusso [figura 2.2].

Una volta che tale processo è avvenuto, se l'aggressione acida non viene arrestata, può verificarsi la progressione in displasia ad alto grado e in adenocarcinoma. [18] Il rischio di sviluppo di cancro in pazienti con metaplasia è stimato allo 0,5% per anno, al contrario



il rischio è molto più alto in pazienti con displasia epiteliale ad alto grado, per i quali il rischio di progressione è compreso tra il 16 e il 59% l'anno [24-25].

### 2.2.3 Carcinoma squamocellulare dell'esofago

L'incidenza del carcinoma squamocellulare (SCC) varia da regione a regione; l'area che comprende Turchia, nordest dell'Iran, Kazakistan e Cina centrale e settentrionale, definita *Asian belt*, è caratterizzata da alta incidenza per questa neoplasia, si contano infatti più di 100 casi su 100.000 persone l'anno. L'incidenza è alta anche nell'Africa meridionale e orientale, nel sud del Brasile e in Uruguay. Il carcinoma squamocellulare si presenta tipicamente in pazienti di età inferiore ai 45 anni e, nella maggior parte delle regioni citate, il rapporto di incidenza tra uomini e donne è pari a 1:1 [26-29].

Come per molti altri tipi di cancro, tra i fattori di rischio principali si contano il fumo e l'alcol che agiscono in modo sinergico e che sembrerebbero essere la principale causa di sviluppo di SCC in America ed in Europa; l'alta incidenza in Africa e Asia è più complessa da spiegare ed è probabilmente dovuta a meccanismi multifattoriali e fattori di rischio locali ancora da identificare [30-31]. Altri agenti nocivi, ad oggi noti, sono: danno da ingestione di caustici, acalasia, consumo di bevande calde ed esposizione a composti mutageni, tra cui nitrosamine e idrocarburi policiclici aromatici derivati dalla combustione incompleta di tabacco, legno e carbone. Anche la povertà, influenzando sulla mancanza di specifici nutrienti nella dieta, è stata associata al maggior rischio di SCC; al contrario l'infezione da HPV, un tempo considerata un possibile inducente per lo sviluppo di questa neoplasia, oggi si ritiene abbia un ruolo solo marginale [21; 32-38].

Il carcinoma squamocellulare tende a presentarsi nel terzo medio dell'esofago e il suo precursore principale è la displasia epiteliale, il SCC origina infatti dalle cellule che delineano il lume dell'esofago. Inizialmente si sviluppa in forma di ispessimenti o placche, costituiti da cellule atipiche che degenerano progressivamente da displasia moderata a severa, fino ad arrivare allo stato di carcinoma *in situ* e di carcinoma invasivo [figura 2.3]. Il tumore spesso evolve in polipi o neoformazioni esofitiche, arrivando a

ostruire il lume dell'organo, o in lesioni infiltranti che progressivamente invadono tutti gli strati della parete fino a raggiungere, eventualmente, organi adiacenti [39-40].

I segni e sintomi del cancro all'esofago solitamente riflettono il livello di estensione locale e tipicamente si presentano quando la malattia è già in stadio avanzato; il quadro di presentazione classico è quello di un paziente uso a fumare tabacco e ad assumere alcol, che arriva all'attenzione medica per disfagia e perdita di peso. Tuttavia il binomio tipico, disfagia e perdita di peso, è più correlato al SSC e pertanto le modalità di presentazione, soprattutto in Europa e America dove l'adenocarcinoma è prevalente, sono oggi più variegate. La maggior parte dei pazienti diagnosticati per tumore in assenza di disfagia ha infatti un adenocarcinoma esofageo; tra i sintomi più comuni si riportano: dolore addominale, MRGE e sanguinamento gastrointestinale. Una minima parte dei tumori dell'esofago viene diagnosticata dopo il rilievo di una metastasi a primitività sconosciuta e durante il follow-up per esofago di Barrett [41].

#### 2.2.4 Diagnosi e stadiazione

La diagnosi di tumore esofageo è quindi solitamente effettuata mediante esofagogastroduodenoscopia e biopsia del tessuto interessato, metodiche che stanno di fatto soppiantando l'uso dell'esofagografia al bario, in passato sfruttata come primo esame strumentale in pazienti disfagici [42]. Una volta effettuata la diagnosi, si procede a *staging* accurato della patologia, al fine di assicurare l'applicazione corretta dei protocolli terapeutici. La stadiazione più utilizzata è quella secondo il sistema TNM che prende in considerazione la profondità del tumore, l'interessamento linfonodale e la presenza eventuale di metastasi. L'ottava edizione dell'*American Joint Committee on Cancer* (AJCC), riguardante la stadiazione del tumore all'esofago e della giunzione gastroesofagea, presenta classificazioni separate per quanto riguarda la stadiazione clinica (cTNM), patologica (pTNM) e post terapia neoadiuvante (ypTNM). La prognosi basata sulle categorie cliniche, ottenute mediante imaging e, in minima parte, con informazioni istologiche, differisce in modo sostanziale da quella basata su pTNM, cioè sulla classificazione patologica che segue la rimozione chirurgica della massa tumorale; tale fatto suggerisce come oggi siano ancora inaccurate le nozioni fornite dalla sola stadiazione clinica. La classificazione patologica è infatti rilevante ed accurata per i tumori di basso grado e per la loro correlazione con la sopravvivenza, sta però perdendo

importanza per i tumori di alto grado, in quanto l'uso di terapia neoadiuvante sta soppiantando il ricorso all'esofagectomia [43-44].

Gli esami effettuati per definire lo stadio della patologia comprendono: esofagoscopia, ecografia endoscopica, TC torace e addome e tomografia a emissione di positroni con fluorodeossiglucosio. La valutazione dell'estensione superficiale del tumore è effettuata durante l'esofagoscopia ed è di fondamentale importanza per verificare l'interessamento dell'esofago cervicale e della giunzione esofagogastrica e per effettuare prese biotiche. Il grado di differenziazione del tumore (G), valutabile all'esame istologico, è rilevante come predittore di sopravvivenza soprattutto per i tumori di basso grado, tuttavia si tratta di un fattore che è raramente riportato nei referti biotici per via della scarsità di materiale raccolto nei campioni, che non ne permette un'adeguata definizione. L'elemento T è solitamente fornito dal referto dell'ecografia endoscopica (EUS); l'interessamento della tonaca muscolare propria deve essere indagato in modo rigoroso durante l'EUS, si definisce infatti T1 un tumore che non giunge a questo strato, T2 un tumore che arriva fino alla muscolare e T3 un tumore che la supera. L'invasione delle strutture adiacenti all'esofago definisce un tumore T4.

L'interessamento linfonodale è indagato con EUS, tomografia computerizzata (CT) e tomografia a emissione di positroni con fluorodeossiglucosio (FDG-PET). Il possibile coinvolgimento di una stazione linfonodale è definito con EUS e TC dalla dimensione dei linfonodi; tuttavia la probabilità che cN possa essere confermato solo da un fattore dimensionale è scarsa, è infatti possibile che vi siano depositi metastatici in linfonodi di dimensioni normali o che linfonodi a contatto con la massa tumorale non possano essere distinti da quest'ultima. La FDG-PET sopperisce a queste mancanze, indagando non solo la dimensione, ma anche il metabolismo del glucosio nei singoli linfonodi; data la sua specificità, pari all'85%, relativamente superiore alla sua sensibilità, 57%, questo esame è soprattutto utilizzato per la conferma dei gradi cN0 [45]. Quando possibile, la conferma istologica dell'N è fondamentale per uno *staging* clinico accurato; questa può essere effettuata con *fine needle aspiration biopsy* guidata dall'ecoendoscopia o con campionamenti più invasivi effettuati mediante toracosopia, laparoscopia o mediastinosopia. La possibilità di definire con accuratezza il numero dei linfonodi coinvolti permette di predire in modo più preciso la sopravvivenza [46-47].

Per quanto riguarda la ricerca di metastasi, l'EUS può rivelarsi utile nella rilevazione di ascite sospetta per metastasi intraperitoneali; per le altre localizzazioni, l'esame solitamente effettuato è CT torace e addome con mezzo di contrasto intravenoso e orale. L'accuratezza di FDG-PET si è rivelata comunque superiore a quella della CT, ma questo dato deve essere pesato con la possibilità elevata di riscontri di falsi positivi che risultano in ulteriori indagini fondamentalmente inutili [48-49]. La conferma di cM1 mediante indagine istologica o citologica è raccomandata dall'AJCC [figura 2.4].

### 2.2.5 Il ruolo della chirurgia nelle patologie esofagee

La chirurgia ha sicuramente un ruolo fondamentale nel trattamento delle neoplasie resecabili. Il miglioramento delle metodiche di *staging*, della selezione dei pazienti e delle tecniche chirurgiche ha permesso una riduzione della mortalità e della morbidità intra e post chirurgica. L'associazione di chemioterapia pre e postoperatoria ha portato ad un ulteriore significativo aumento della sopravvivenza dei pazienti con tumori dell'esofago resecabili [50-51]. Dato il grande impatto di un intervento di esofagectomia, tutti i pazienti sono inizialmente esaminati per quanto riguarda il loro *performance status*; solitamente, pazienti con tumori di basso grado riescono a tollerare la resezione, mentre i pazienti con malattia di grado avanzato devono sottoporsi ad indagini più approfondite per valutare l'effettiva possibilità di essere trattati chirurgicamente. Si è dimostrato che l'entità dell'interessamento linfonodale correla con la sopravvivenza dopo chirurgia, pertanto pazienti con tumore resecabile e con un elevato numero di linfonodi interessati sono inizialmente indirizzati ad una terapia preoperatoria [52].

Secondo le linee guida NCCN l'esofagectomia deve essere considerata per tutti quei pazienti con buon *performance status* con neoplasia localizzata, resecabile e situata nell'esofago toracico, a più di 5 cm di distanza dal muscolo costrittore inferiore della faringe, o nell'esofago addominale. L'esofagectomia deve essere eseguita in centri ad alto volume e da chirurghi con buona esperienza nel campo. Il tipo di resezione è definito da dimensione, grado e localizzazione del tumore primario ma anche dall'esperienza del chirurgo e dalla preferenza del paziente. I tumori dell'esofago cervicale o cervicotoracico devono invece essere preferibilmente trattati con chemioradioterapia, l'esofagectomia palliativa può però essere considerata per quei pazienti con tumore dell'esofago cervicale

che sviluppano una recidiva localizzata o una stenosi non diversamente trattabile senza ricorrenza di malattia [51-53]. Per quanto riguarda gli adenocarcinomi, l'esofagectomia è in prima istanza considerata per tumori T1b, N+ e T2-T4, N0-N+ per i quali la lesione abbia diametro inferiore ai 2 cm ed abbia un buon grado di differenziazione istologica; gli altri casi sono invece indirizzati a chemioradioterapia preoperatoria o definitiva. Sono considerati resecabili anche tumori T4 con coinvolgimento di pericardio, pleura o diaframma. La chirurgia può poi essere considerata per i pazienti che hanno effettuato chemioradioterapia preoperatoria in cui, alla TC o PET di controllo, non vi sia più evidenza di malattia o vi sia permanenza locale di malattia resecabile e non metastatizzata.

Il tasso di complicanze post esofagectomia è migliorato negli ultimi anni per via della centralizzazione di chirurgia ad alto rischio presso istituti di eccellenza e per via del coinvolgimento di team multidisciplinari in grado di decidere la strategia migliore con cui affrontare il caso [53-54]. Le due tecniche open più utilizzate sono la transiatale e la transtoracica, detta anche esofagectomia secondo Ivor-Lewis; la tecnica transiatale prevede laparotomia, dissezione per via smussa dell'esofago toracico e anastomosi gastroesofagea sul lato sinistro del collo. La tecnica transtoracica combina la laparotomia con la toracotomia destra e termina con anastomosi intratoracica. Quale, tra le due tecniche, sia la migliore in termini di morbilità e sopravvivenza è ad oggi controverso [55-58].

Negli ultimi anni si stanno diffondendo gli approcci mininvasivi che comprendono laparotomia, o laparoscopia, associata a toracosopia; un'operazione mininvasiva offre i potenziali vantaggi di riduzione del dolore, recupero postoperatorio e conseguente ritorno alla normalità più veloci. Queste tecniche sono state fino ad ora utilizzate solo per tumori di basso grado e per i pazienti con displasia grave insorta su esofago di Barrett e non vi sono ancora trials che ne abbiano dimostrato la superiorità rispetto alle tecniche open [59-61].

Pazienti con tumori Tis o T1a possono essere sottoposti a trattamenti più conservativi, come la resezione mucosale endoscopica (EMR), o altre tecniche ablativo, che devono comunque essere effettuate in centri ad alto volume e da chirurghi endoscopisti esperti.

Pazienti con tumori che giungono alla sottomucosa (T1b) o oltre, devono comunque essere indirizzati all'esofagectomia [60].

## 2.2 La ricostruzione dei difetti esofagei

Le metodiche sopracitate, quali esofagectomia o resezione mucosale endoscopica, portano a difetti parziali o totali dello spessore della parete esofagea che non possono essere lasciati non trattati; il problema maggiore quindi, correlato ai trattamenti per le patologie dell'esofago, non è tanto la resezione in sé quanto la ricostruzione a posteriori dell'organo [62]. La ricostruzione dell'esofago nativo è spesso resa impossibile dal difetto risultante la terapia chirurgica; solitamente la lunghezza della resezione preclude infatti il riparo per via anastomotica termino-terminale, sia a causa delle caratteristiche elastiche dell'esofago che, come già menzionato, tende a retrarsi quando sezionato, sia per via della sua vascolarizzazione. La mobilizzazione dell'organo, infatti, rischia di comprometterne la vascolarizzazione, dato che i vasi che ne provvedono derivano, in buona parte, dalla parete toracica posteriore. Di conseguenza, secondo la corrente pratica chirurgica la ricostruzione è effettuata utilizzando tessuto autologo alternativo come condotto a sostituzione dell'esofago. Gli organi frequentemente utilizzati a questo scopo sono: lo stomaco, l'intestino tenue, in particolare l'ileo, ed il colon [63-66]. Le operazioni ricostruttive dell'esofago sono però associate ad alta mortalità e morbilità: la mortalità post esofagectomia è, nei centri ad alto volume, quali quelli con 20 operazioni di esofagectomia l'anno, ancora oggi del 4,9% [67]. In centri non ad alto volume, la mortalità invece varia dal 5 al 10% nei primi 30 giorni post-operatori [68-69]. Anche le complicanze post-operatorie variano a seconda dell'esperienza dei singoli centri e aumentano con l'età del paziente; tra queste si contano *leakage* dell'anastomosi e complicanze respiratorie [70].

Nuove tecniche chirurgiche e novità strumentali, come gli stents, hanno permesso lo sviluppo di altri procedimenti efficaci nel ricostituire la continuità e la funzionalità esofagea. Tali tecniche includono l'*omental wrapping* dell'anastomosi esofagogastrica [71-73], il *pull-up* gastrico [74-76] e lembi miocutanei di muscolo deltopettorale [77-78] e grande pettorale [79-81]. In tutte le tecniche menzionate si riscontrano complicanze quali *leakage* e stenosi dell'anastomosi, infezioni di ferita, polmoniti e mortalità per varie

cause. Per l'*omental wrapping*, la sopravvivenza a 2 anni si attesta attorno al 50% per poi scendere al 30% in 5 anni, il *pull up* gastrico porta ad una sopravvivenza media di 19 mesi, con una mortalità nei primi 30 giorni compresa tra il 5 e il 10%.

Per quanto riguarda la riparazione di difetti esofagei non circolari, le metodiche più diffuse includono sutura diretta, lembo peduncolato di muscolo intercostale, patch di tessuto pericardico e lembo peduncolato di diaframma; tuttavia, tali procedure non possono essere applicate a tutti i casi e frequentemente comportano complicanze quali rottura della sutura o stenosi dell'organo ed abbassamento della qualità della vita per insorgenza di sintomi invalidanti [82].

Il trattamento dell'atresia esofagea varia a seconda del tipo di malformazione ma generalmente comprende legatura della fistola e anastomosi dei monconi esofagei prossimale e distale mediante accesso toracotomico o toracoscopico; nonostante l'avanzamento delle odierne tecniche chirurgiche la mortalità intraoperatoria è del 10% [83-84]. I pazienti trattati per atresia esofagea sono ad alto rischio di sviluppo di reflusso gastroesofageo, stenosi e delle loro conseguenze quali esofago di Barrett, disfagia, esofagite eosinofila, problemi nutrizionali, infezioni ricorrenti del tratto respiratorio e tosse persistente [85-86]. Tra i sintomi menzionati dai pazienti adulti dopo correzione di atresia esofagea la dispepsia è tra i più frequenti, seguita da pirosi dovuta a malattia da reflusso gastroesofageo [87]. L'alta incidenza di metaplasia gastrica nell'esofago e di infiammazione di trachea, esofago e stomaco indica il bisogno, in tutti questi pazienti, di uno stretto follow-up [88].

Le limitazioni delle correnti tecniche chirurgiche sottolineano il nuovo bisogno di trapianti di tessuti ingegnerizzati per la ricostruzione esofagea, negli anni più recenti la medicina rigenerativa ha infatti destato grande interesse per la possibilità di rimpiazzo, riparo e rigenerazione di tessuti ed organi. Il processo di rigenerazione di componenti corporee può essere effettuato *in vivo* o *ex vivo* e può richiedere cellule, scaffolds naturali o sintetici di sostegno alle cellule, molecole bioattive, manipolazione genica o una combinazione dei suddetti fattori [89].

### 3. Introduzione alla bioingegneria esofagea

L'esofago è un organo complesso, composto da tessuti non ridondanti che hanno limitata capacità di autorigenerarsi; di conseguenza la ricostruzione chirurgica o la sostituzione dell'esofago sono le uniche possibilità di trattamento valide a seguito di danni strutturali estesi. Le patologie esofagee che richiedono un trattamento chirurgico demolitivo sono numerose e possono coinvolgere diversi segmenti e tessuti. In questo ambito la medicina rigenerativa offre alternative valide ai trattamenti attuali. La medicina rigenerativa si concentrerà, quindi, sulla riparazione della mucosa, in patologie superficiali e sulla ricostruzione di tutto l'organo in patologie neoplastiche invasive, necrosi massive da caustici e anomalie congenite, obiettivo, quest'ultimo, sicuramente di più difficile raggiungimento [12]. Nonostante gli avanzamenti nella capacità di far differenziare le cellule staminali e nella bioingegneria dei tessuti muscolari, non si è, ad oggi, in grado di dirigere la crescita cellulare in tessuti tridimensionali e pluristratificati al fine di replicare un organo viscerale [90-91]. La difficoltà che comporta l'utilizzo clinico di tessuti ingegnerizzati realizzati *in vitro* è dovuta alla mancata capacità di produrre scaffolds che vengano perfusi e che quindi possano permettere la diffusione di ossigeno e nutrienti e la rimozione di prodotti di scarto. Queste difficoltà sono ulteriormente accentuate se l'organo da rigenerare ha caratteristiche tridimensionali specifiche [92].

Gli studi *in vitro* e gli studi preclinici su modello animale sono steps necessari allo sviluppo di nuove strategie per la rigenerazione tissutale. Gli aspetti indagati negli studi preliminari riguardano la composizione cellulare e l'architettura dei tessuti e degli organi target, nonché le proprietà meccaniche degli *scaffolds* e dei biomateriali, la valutazione di citotossicità, citocompatibilità delle nuove tecnologie e proprietà biochimiche *of novel construct*. Gli studi preclinici permettono di valutare gli effetti *in situ* dovuti all'impianto dei prototipi, in particolare la risposta immunitaria dell'*host* e importanti processi cellulari, quali proliferazione, migrazione e differenziazione delle cellule staminali. Altri fattori che devono essere presi in considerazione sono infine la neoangiogenesi, la formazione di tessuto cicatriziale, la resistenza alle infezioni e il rimodellamento tissutale [12].

Nel 1993 Langer *at al.* hanno fornito una prima definizione di bioingegneria, intesa come un campo multidisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e della scienza per



sviluppare sostituti biologici che ricostituiscano, mantengano o migliorino la funzione tissutale. Da allora, le scoperte sui principi biologici della neoformazione tissutale sono sempre state accompagnate da nuovi approcci chimici per la produzione di *scaffolds* in grado di dirigere eventi cellulari quali la proliferazione, l'adesione e l'interazione cellulare, così come l'aumento dell'angiogenesi, al fine di riprodurre tessuti normali. Le moderne tecnologie hanno portato anche allo sviluppo di materiali biocompatibili e riassorbibili, tali da poter essere utilizzati nell'ambito della bioingegneria, e alla conoscenza della potenzialità di popolazioni cellulari, quali le cellule staminali, in grado di proliferare e differenziarsi verso tipi cellulari specifici [93]. Quasi ogni tessuto del corpo umano è stato studiato per la possibilità di sostituzione *in vivo* con strutture ingegnerizzate e ogni anno nuovi trials clinici ne mostrano i progressivi successi dell'applicazione clinica [94].

Generalmente, i tre fattori che influenzano la rigenerazione tissutale sono: scaffold, cellule e fattori di crescita [95]. Nel corso degli anni due categorie di approccio alla bioingegneria esofagea si sono delineate: l'uso di scaffolds singoli e l'uso di una combinazione di scaffolds e cellule.

### 3.1 Scaffolds acellularizzati

La maggior parte degli studi fino ad oggi condotti sulla bioingegneria esofagea ha previsto il trapianto di soli scaffold acellularizzati con lo scopo di condurre la migrazione di cellule epiteliali e muscolari lisce dell'ospite a ripopolare il nuovo condotto. Gli scaffolds acellularizzati si conformano a una di tre categorie: sintetici, sintetici associati a collagene o di matrice decellularizzata [8]. Gli scaffolds sintetici possono essere caratterizzati con precisione e le loro proprietà meccaniche possono essere definite per determinate applicazioni, tendono, tuttavia, a causare reazioni da corpo estraneo talora importanti. Al contrario, i tessuti biologici sono soggetti a una quota di variabilità intrinseca naturale e le loro proprietà non possono essere adattate alla specifica applicazione, riescono però ad indurre una risposta più favorevole nel sito di impianto e promuovono la neoformazione di tessuto [96].

### 3.1.1 Scaffolds sintetici

Scaffolds sintetici acellulari in plastiche di polietilene [97] e silicone [98-99] sono stati usati per la sostituzione di tratti esofagei nei primi approcci a questo argomento, ma la natura di tali materiali non consente la migrazione cellulare e porta a scarsi risultati nel modello animale. Ad esempio, lo studio di Freud *et al.* ha comparato la riparazione nel modello canino utilizzando dura madre liofilizzata (*Lyodura*), polietilene tereftalato (*Dacron*) e politetrafluoroetilene espanso (PTFE) sottolineando come, solo con l'utilizzo di *Lyodura*, nell'arco di 12 mesi si ottenesse una parziale riepitelizzazione dell'area con deposito sottile di fibre collagene, risultando in una riparazione, seppur duttile, del difetto d'organo [97].

Tabella 3.1 - Scaffolds acellularizzati sintetici

<b>Biomateriali</b>	<b>Modello animale</b>	<b>Rigenerazione tissutale</b>	<b>Decorso clinico</b>	<b>Riferimento</b>
Dacron - PTFE	Cane	In 3 mesi rigenerazione mucosa nel gruppo Dacron, in 4 mesi nel gruppo PTFE	Stenosi in entrambi i gruppi	97
Silicone - Dacron	Cane	Assente	Stenosi	98
Silastic	Cane	Assente	Assenza di guarigione e mancata aderenza dell'impianto	99
PVGF - Vicryl	Coniglio	In 3 mesi rigenerazione mucosa	Leakage nel gruppo Vicryl	100
Poli-ε-caprolattone	Coniglio	In un mese crescita di cellule epiteliali e muscolo liscio	Formazione di pseudodiverticoli	101

Risultati più favorevoli sono stati ottenuti da Lynen Jansen *et al.* [100]; in questo studio, infatti, sono stati effettuati in conigli impianti di fluoruro di polivinilidene (PVGF) non riassorbibile e impianti assorbibili di poliglastin-910 (Vicryl® chirurgico) per riparare difetti semicircolari di dimensioni comprese tra 1 e 2 cm. Si è ottenuta la rigenerazione della mucosa mancante dopo tre mesi, senza formazione di stenosi e un'iniziale

rigenerazione della tonaca muscolare nel gruppo trattato con impianto di PVGF. Tuttavia, si sono registrati tre casi di mancata tenuta del patch con conseguente *leakage* dell'anastomosi sul totale di cinque animali trattati con impianto di Vicryl. In uno studio simile, sempre sul coniglio, si è utilizzato poli- $\epsilon$ -caprolattone per riparare aperture di 0,6-1 cm nell'esofago addominale. Dopo un mese dall'operazione si è osservata la crescita di cellule epiteliali e cellule muscolari lisce, insieme a una quasi completa degradazione del patch. Il tasso di sopravvivenza registrato è comunque stato del 75% e più della metà degli animali sopravvissuti ha sviluppato diverticoli nella sede di impianto [101].

Più recentemente la ricerca si è orientata verso lo sviluppo di materiali biodegradabili con l'obiettivo di produrre impianti di matrice standardizzata che inducessero una risposta riproducibile nel tessuto ospite; idealmente si dovrebbe arrivare alla formulazione di uno scaffold dinamico, la cui degradazione avviene in maniera sincrona alla rigenerazione tissutale. Tra i polimeri sintetici biodegradabili vi sono acido poliglicolico, polilattide (PLA), e copolimeri polilattide – policaprolattone (PLA-PCL), che sono stati testati per la ricostruzione di vari organi, tra cui l'esofago, con buoni risultati. [102-104] Inoltre, gli scaffolds polimerici possono essere integrati con componenti della matrice extracellulare al fine di migliorare l'adesione cellulare.

### 3.1.2 Scaffold acellularizzati in componente sintetica e collagene

Una svolta, in questo senso, si è ottenuta con l'utilizzo di costrutti ibridi che, quindi, mirano a combinare le proprietà biomeccaniche di materiali sintetici con la biocompatibilità dei materiali biologici, solitamente usati come *coating* dell'impianto. Purushotham *et al.* [105] hanno sperimentato l'utilizzo di tubi di Vicryl® ricoperti in collagene per la sostituzione di segmenti di esofago toracico in maiali. Gli studi preliminari hanno portato a mediastiniti nel giro di pochi giorni dall'operazione per *leakage* dalla protesi dovuto al reflusso acido e alla conseguente digestione dell'impianto. Le complicanze sono state affrontate effettuando *crosslinks* del collagene con glutaraldeide, che aumenta la resistenza del materiale. Gli animali, tuttavia, hanno sviluppato stenosi del segmento operato entro 11 giorni dall'operazione e all'analisi istologica si è potuta rilevare una quota considerevole di tessuto di granulazione e tessuto cicatriziale, a testimonianza di un iniziale tentativo di riepitelizzazione. La combinazione di Vicryl® e collagene è stata indagata anche in studi sul cane che hanno portato a risultati positivi sia nella riparazione di difetti parziali che in sezioni circolari, con una mortalità

registrata del 8,3% senza evidenza di disfagia e stenosi nei modelli sopravvissuti. [106] Il collagene è anche stato utilizzato negli studi di Natsume *et al.* [107] e Takimoto *et al.* [108], che hanno prodotto tubi bistratificati composti da una matrice di collagene e uno stent in silicone, nel primo caso non removibile, nel secondo caso removibile. I prototipi sono stati posizionati a riparare difetti segmentali di 5 cm nell'esofago di modelli canini e, nel caso di Takimoto *et al.*, l'operazione era seguita da rimozione per via endoscopica del tubo di silicone alla seconda o alla quarta settimana post operatoria. Si è dimostrata la formazione di stenosi e disfagia a seguito della rimozione dello stent a 2-3 settimane, al contrario, con la rimozione dello stesso a 4 settimane si è osservata la formazione di epitelio piatto pluristratificato, muscolo striato e ghiandole esocrine. La stessa tecnica è poi stata testata su difetti esofagei di 10 cm, tuttavia, in questi casi si è verificata la scarsa migrazione di cellule nello strato muscolare, suggerendo che possano esserci delle limitazioni all'utilizzo di tale metodo, dipendenti dalla dimensione del tratto da rimpiazzare. Inoltre, quando si è tentato di sostituire con il tubo in collagene dei tratti di esofago toracico, si è documentata la totale assenza della rigenerazione dello strato muscolare, fatto che gli autori hanno attribuito all'assenza di apporto vascolare adeguato nella regione toracica. [109]

Pertanto una notevole quantità di materiali sintetici è stata testata, si è tuttavia dimostrata l'insorgenza di ricorrenti problemi quali stenosi, infiammazione, reazione da corpo estraneo e *leakage*. [12]

Tabella 3.2 Scaffolds Acellularizzati Ibridi

<b>Biomateriali</b>	<b>Modello animale</b>	<b>Rigenerazione tissutale</b>	<b>Decorso clinico</b>	<b>Riferimento</b>
Vicryl e collagene	Maiale	Tessuto di granulazione nel gruppo con crosslink con glutaraldeide	Mortalità 0%, stenosi nel gruppo con crosslink con glutaraldeide	105
Vicryl e collagene	Cane	Rigenerazione epiteliale ma non muscolare	Mortalità 8,3%, assenza disfagia o stenosi nei sopravvissuti	106
Silicone e collagene	Cane	Rigenerazione epiteliale parziale	Mortalità 26%	107
Collagene e stent in silicone	Cane	Rigenerazione epiteliale e muscolare	Mortalità 0% con stent rimosso a 4 settimane, assenza di stenosi	108
Collagene e stent in silicone	Cane	Rigenerazione epiteliale ma non muscolare	Mortalità 11%, stenosi nel terzo medio dell'esofago	109

### 3.1.3 Scaffolds di matrice decellularizzata

Le matrici decellularizzate sono materiali derivati da organi e tessuti animali o umani, trattati per rimuovere cellule e materiale immunogenico; tali matrici preservano però la macro e micro-architettura del tessuto di origine e le componenti molecolari della sua matrice extracellulare, ciò è stato dimostrato con studi effettuati sulla trachea, sulla laringe e sull'intestino tenue, da quest'ultimo è stato infatti possibile ottenere uno scaffold che mantenesse la struttura dei villi intestinali. Un altro ipotetico vantaggio delle matrici decellularizzate è quello di non degradarsi a componenti potenzialmente tossiche e non indurre una risposta infiammatoria tale da portare alla formazione di stenosi dell'organo cavo trattato. Scaffolds decellularizzati, sia da tessuti di origine esofagea, sia da altri organi, sono stati usati per la riparazione di difetti esofagei. [110]

Esiste una notevole eterogeneità di studi, dipendenti dal tipo di scaffold, dall'estensione del tratto operato, dalla specie animale considerata, a cui necessariamente consegue un'eterogeneità di risultati altrettanto importante. Un esempio riguarda la rigenerazione della *muscularis mucosae* che si è infatti verificata in alcuni casi, ma non in altri. Una tra

le matrici più frequentemente utilizzate nella bioingegneria tissutale è sicuramente la sottomucosa dell'intestino tenue decellularizzata (SIS). Studi che hanno effettuato la riparazione dell'esofago utilizzando SIS sono stati condotti su modello porcino da Badylak *et al.* [111]; le sperimentazioni hanno portato a buoni risultati nella sostituzione mediante patch: si è infatti dimostrata l'abilità di questo materiale nel riparare difetti di 5 cm in lunghezza e occupanti fino al 50% di circonferenza esofagea, portando, entro 30-60 giorni, a riepitelizzazione completa e formazione di muscolatura scheletrica correttamente orientata senza segni clinici di disfunzione. Lo stesso materiale, tuttavia, ha condotto a stenosi ed aumento della mortalità nel caso di sostituzione segmentale esofagea. In uno studio analogo effettuato su modello murino, Lopes *et al.* [112] hanno sostituito difetti circonferenziali e segmentali dell'esofago con patch di SIS e impianti tubulari di SIS di derivazione porcina; tutti gli animali trattati per il difetto segmentale sono morti nel primo mese post operatorio, gli animali con il difetto semicirferenziale non hanno mostrato segni di disfunzione esofagea e sono tornati ad avere un peso normale. Non si è assistito inoltre alla formazione di fistole, stenosi o diverticoli e, dopo 5 mesi dall'operazione, il patch in SIS è stato rimpiazzato da tessuto esofageo.

Uno studio simile è stato effettuato da Urita *et al.* [113] sempre sul modello murino: sono stati utilizzati patch di matrice extracellulare gastrica per riparare difetti dell'esofago addominale. Gli animali sono stati sacrificati in tempi diversi compresi tra una settimana e 18 mesi dopo l'operazione; si è dimostrato che il sito di impianto era sempre privo di stenosi o dilatazioni. L'epitelio squamoso cheratinizzato pluristratificato era completamente rigenerato dopo 2 settimane dall'impianto, tuttavia non si è mai osservata rigenerazione della *muscularis mucosae* né della tonaca muscolare.

Dati i risultati ottenuti, studi successivi di Badylak *et al.* [114] hanno indagato la possibilità di utilizzare tessuti autologhi per l'adeguata riparazione esofagea nel cane, evitando la formazione di stenosi; in tali esperimenti, difetti esofagei riguardanti varie percentuali di circonferenza sono stati riparati con scaffolds di mucosa vescicale (UBM-ECM *Urinary Bladder Matrix – ExtraCellular Matrix*) ricoperti con tessuto muscolare autologo. I gruppi trattati comprendevano animali trattati solo con UBM-ECM, solo con tubi di tessuto muscolare autologo o tubi di UBM ricoperti per il 30 o 100% da tessuto muscolare autologo. Lo studio ha concluso che lo scaffold UBM-ECM in aggiunta a tessuto muscolare era in grado di condurre il rimodellamento tissutale di difetti segmentali

dell'esofago in maniera efficace, al contrario, scaffold di sola UBM-ECM o di solo tessuto muscolare non davano risultati soddisfacenti.

Si citano poi due studi rilevanti effettuati su maiali; nel primo si è utilizzata come matrice sostitutiva dell'esofago un patch di elastina ricavato da parete aortica decellularizzata, ottenendo rigenerazione della tonaca mucosa e muscolare su difetti circolari, nel secondo la sostituzione di tratti segmentali dell'esofago con prototipi tubulari di SIS ha portato alla formazione di stenosi gravi e morte in tutti i modelli trattati. [115-116]

Di rilievo, per quanto riguarda le matrici decellularizzate, sono gli studi effettuati sulla riparazione di resezioni mucosali endoscopiche. In uno studio effettuato da Nieponice *et al.* [117] si è dimostrato che il posizionamento, per via endoscopica, di scaffolds biologici dopo resezione mucosale endoscopica preveniva, nel cane, la formazione di stenosi. Una tecnica analoga è poi stata sfruttata nello studio di Badylak *et al.* effettuato su 5 pazienti con cancro superficiale; fogli di SIS sono stati depositati sulla superficie esofagea dopo la resezione della mucosa. Mediante follow-up della durata compresa tra 4 e 24 mesi, si è potuto constatare, sia mediante endoscopia, sia mediante esame istologico effettuato dopo biopsia, come lo scaffold promuovesse il fisiologico rimodellamento del tessuto. Le stenosi, che si sono formate, erano localizzate solo in aree esterne a quelle delineate dalla SIS; tale fatto suggerisce che miglioramenti nella tecnica dell'operazione potrebbero portare alla risoluzione di tale problematica. [118] Un *case report* di rilievo è quello del gruppo di Clough *et al.* che ha utilizzato SIS porcina per ricoprire un difetto mucosale di 5 x 3 cm dell'esofago cervicale di un paziente con perforazione esofagea traumatica: a distanza di 4 settimane dall'operazione non si sono rilevate stenosi all'endoscopia nonostante lo scaffold fosse ben integrato. [119]

Tabella 3.3 – Scaffolds di matrice decellularizzata

<b>Biomateriali</b>	<b>Modello animale</b>	<b>Rigenerazione tissutale</b>	<b>Decorso clinico</b>	<b>Riferimento</b>
SIS	Cane	Rigenerazione mucosa e muscolare per sostituzione con patch	Mortalità 0% per sostituzione con patch; mortalità 100% con sostituzione segmentale	111
SIS	Topo	Rigenerazione mucosa e muscolare in 5 mesi	Mortalità 6% a 5 mesi; mortalità 100% con sostituzione segmentale	112
ECM gastrica	Topo	Rigenerazione mucosa in 2 settimane, assenza di <i>muscularis mucosae</i> e tonaca muscolare a 3 mesi	Mortalità 0%; stenosi o dilatazioni 11%	113
UBM-ECM con tessuto muscolare autologo	Cane	Rigenerazione mucosa e muscolare in 7 mesi	Mortalità 10% a 7 mesi	114
Elastina (da aorta porcina)	Maiale	Rigenerazione mucosa e muscolare	Mortalità 0%, assenza di complicanze	115
SIS	Maiale	Protesi non ritrovata né macroscopicamente né all'esame istologico	Mortalità 92% in 4 settimane	116
UBM-ECM	Cane (EMR)		Assenza di stenosi	117
SIS	Uomo (EMR)	Rigenerazione di mucosa normale in 4 mesi	Stenosi esterne alla zona di impianto	118
SIS	Uomo (difetto segmentale 5 x 3 cm)	Ricostituzione dell'esofago con calibro normale	Assenza di complicanze	119



### 3.2 Scaffolds cellularizzati

Al fine di ridurre le complicanze derivate dagli approcci acellularizzati visti finora, alcuni autori hanno seminato cellule negli scaffold prima del loro impianto nell'organismo ospite. Come menzionato prima, i due più importanti tipi cellulari per l'ingegneria tissutale dell'esofago sono quelle costituenti l'epitelio squamoso pluristratificato e lo strato muscolare. Fondamentale è sicuramente anche il ruolo delle cellule vascolari e neuronali, tuttavia ad oggi non vi sono studi riguardanti la bioingegneria dell'esofago incentrati su questi tipi cellulari [8].

In un gran numero di studi *in vitro* si è testata la semina e la coltura di cellule epiteliali esofagee (EEC) su differenti tipi di scaffold, al fine di trovare la combinazione più soddisfacente. Lo studio effettuato da Beckstead *et al.* [120] ha comparato la crescita di cellule epiteliali esofagee di ratto su Alloderm, matrice composta di cute umana decellularizzata, e su scaffold sintetici; diversi fattori, inclusi la concentrazione di calcio, la composizione dello scaffold e la dimensione dei pori, sono stati misurati per valutarne l'influenza sulla crescita e sulla differenziazione epiteliale. I risultati di questo studio hanno dimostrato migliore organizzazione e stratificazione cellulare su Alloderm, che non su materiali di natura sintetica, tra cui acido poli lattico-co-glicolico (PLGA), acido poli-L-lattico (PLLA) e policaprolattone (PCL); dalla coltura su Alloderm era infatti possibile isolare e caratterizzare le singole cellule epiteliali. Gli autori di tale studio sono quindi stati in grado di concludere che la modifica delle proprietà di superficie degli scaffold sintetici e la dimensione delle porosità sono fattori che necessariamente devono essere migliorati per ottimizzare il comportamento cellulare in tali costrutti, l'elevata dimensione dei pori, infatti, limita la formazione di uno strato epiteliale continuo. Un altro studio ha comparato la crescita di cellule epiteliali squamose umane su esofago umano decellularizzato, esofago porcino decellularizzato, derma umano decellularizzato e collagene. I risultati della sperimentazione sono peculiari in quanto si è dimostrato come la matrice di origine porcina ed il collagene portassero a risultati migliori, con la formazione di un epitelio maturo e pluristratificato [121].

Risultati differenti sono però stati ottenuti dal gruppo di Saxena *et al.* con la semina di cellule epiteliali di ratto su una matrice tridimensionale di collagene [122]: le cellule infatti, seppur sopravvissute fino a 8 settimane, sono rimaste localizzate sulla superficie dello scaffold, individualmente o in piccoli clusters, senza integrarsi completamente.

Anche la semina di cellule epiteliali di pecora sullo stesso scaffold 3D ha portato a risultati scadenti, non si è infatti assistito alla formazione di uno strato epiteliale, fatto attribuito all'eccessiva penetrazione delle cellule all'interno dello scaffold e alla perdita del contatto intercellulare. Le stesse cellule, seminate su uno scaffold 2D di collagene, hanno portato invece alla formazione di un singolo strato di epitelio dopo 3 settimane di coltura in vitro, rimasto poi visibile fino a 6 settimane. Il medesimo gruppo ha inoltre effettuato studi *in vivo* sulla vascolarizzazione dello scaffold di collagene bovino popolato da EEC di agnello preseminato con fibroblasti; lo scaffold è stato tubulizzato usando uno stent come sostegno e successivamente impiantato nell'omento di agnello per un periodo compreso tra 8 e 12 settimane [123]. Il *wrapping* con tessuto omentale ha provveduto alla crescita della componente vascolare internamente e attorno al costruito, la cui superficie esterna risultava quindi integrata con il tessuto circostante; dopo la rimozione dello stent, il condotto ingegnerizzato presentava una struttura simile all'esofago. L'analisi istologica mostrava l'organizzazione di epitelio esofageo in *patches* sul versante luminale e crescita vascolare sul perimetro esterno del costruito.

Gli studi *in vivo* hanno dimostrato che, come è accaduto per i patch acellularizzati, risposte più promettenti si ottengono con la riparazione di difetti parziali e non segmentali, sia nel modello canino che in quello murino [8].

Per ovviare alla limitazione dovuta all'uso di EEC isolate, si è provato, in vari studi successivi, ad associare la crescita di questa linea cellulare con altre, come fibroblasti o cellule muscolari. Ad esempio, scaffolds in collagene e acido glicolico, seminati con EEC umane sono stati posizionati sul *latissimus dorsi* di topi privi del timo con l'intenzione poi di tubulizzare il muscolo una volta cresciuto lo strato epiteliale; si è dimostrato che 8 giorni dopo l'impianto, i fibroblasti murini, derivanti dal muscolo, avevano infiltrato lo scaffold e vi era stata neovascolarizzazione sullo strato di collagene [124]. Nello studio di Miki *et al.* [125] si è dimostrato che la crescita stratificata di cellule epiteliali, in coltura su fogli di collagene, aumentava notevolmente se le EEC venivano seminate insieme a fibroblasti, dopo 3 settimane. Hayashi *et al.* [126] hanno unito i due risultati decidendo di mettere in coltura cellule epiteliali e fibroblasti sopra uno strato di cellule muscolari lisce, tenute insieme da un gel di collagene, per poi trapiantarle sul *latissimus dorsi* di topi privati del timo; l'esame istologico dei trapianti, una e due settimane dopo l'intervento, ha mostrato che lo strato mucoso, sottomucoso e muscolare erano stati

ricostituiti. Nello studio di Nakase *et al.* [127] si è provato a combinare differenti linee cellulari e scaffolds all'interno della stessa struttura tubulare poi impiantata in modelli canini; cheratinociti e fibroblasti sono stati seminati su membrana amniotica umana, mentre SMCs sono state cresciute su acido poli-glicolico. I due scaffolds sono poi stati arrotolati insieme e impiantati nell'omento di cani per tre settimane, a seguito delle quali sono stati esportati e reimpiantati, negli stessi animali, su difetti di esofago toracico della dimensione di 3 cm. Dopo un follow-up di 420 giorni, erano presenti nella zona di impianto sia lo strato muscolare che lo strato epiteliale, sebbene non fosse possibile osservare alcuna attività peristaltica.

Nel 2002, Grikscheit *et al.* hanno prodotto un prototipo costituito da tubi di polimero biodegradabile, composto da acido poliglicolico e acido poli-L-lattico ricoperti da uno strato di collagene, su cui sono state impiantate “*organoid units*” esofagee di topo, ovvero entità tridimensionali composte da un *core* centrale di cellule mesenchimali circondate da cellule epiteliali. L'esofago bioingegnerizzato così ottenuto, interposto in un difetto della parete esofagea di animali singenici, ha determinato un'adeguata rigenerazione dell'esofago nativo ma con un'elevata incidenza di infezioni post-operatorie e complicanze, quali stenosi e dilatazioni a livello dei siti di sutura [128]. Altro esempio recente di utilizzo di uno scaffold in matrice sintetica è lo studio di Jensen *et al* [129], in cui EEC e SMC sono state seminate su uno scaffold composto di PLGA e PCL/PLGA e tenute successivamente in coltura per due settimane; i prototipi ottenuti sono stati in seguito impiantati nell'esofago di topi e, a distanza di 3 settimane, è stato possibile ritrovare nella sede di impianto cellule epiteliali, muscolari e gliali, in quantità tuttavia incostante.

Tabella 3.4 - Scaffolds Cellularizzati

<b>Biomateriali</b>	<b>Tipo cellulare coltivato</b>	<b>Modello animale</b>	<b>Tipo di studio</b>	<b>Rigenerazione tissutale</b>	<b>Rif.</b>
Alloderm – PLGA – PLLA - PCL	EEC	/	In vitro	Ricostituzione epiteliale su Alloderm	120
ECM esofago umano – ECM esofago suino – Alloderm – collagene	EEC	/	In vitro	Ricostituzione epiteliale su Alloderm e su collagene	121
Collagene 3D – Collagene 2D	EEC	/	In vitro	Ricostituzione epiteliale su collagene 2D	122
Collagene	EEC + Fibroblasti	/	Impianto in omento di agnello per 2 settimane	Ricostituzione epiteliale, neovascolarizzazione	123
Collagene e acido glicolico	EEC	/	Impianto su muscolo scheletrico di topo	Ricostituzione epiteliale, infiltrazione di fibroblasti, neovascolarizzazione	124
Collagene	EEC + Fibroblasti	/	In vitro	Ricostituzione epiteliale	125
SMCs in gel di collagene	EEC + Fibroblasti	/	Impianto su muscolo scheletrico di topo	Ricostituzione mucosa, sottomucosa e muscolare	126
a) Membrana amniotica umana b) Acido poliglicolico	a) EEC + Fibroblasti b) SMC	Cane	Impianto in omento di cane e in vivo su cane	Ricostituzione mucosa e muscolare in 14 mesi	127
Acido poliglicolico + PLLA + collagene	Organoid Units	Topo	In vivo	Ricostituzione mucosa, sottomucosa muscolare, stenosi e dilatazioni	128
PLGA + PCL/PLGA	EEC + SMC	Topo	In vivo	A 3 settimane presenza di EEC, SMC e cellule gliali	129

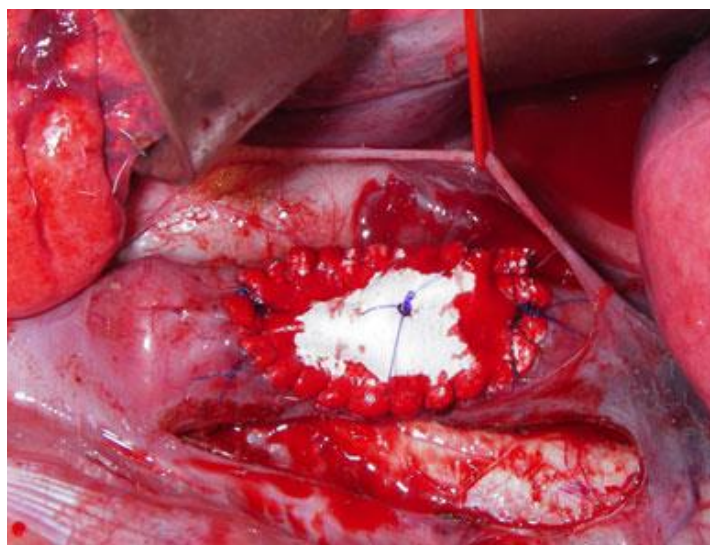
Basandosi sulla letteratura citata finora è evidente che non esista una soluzione proposta efficace per la riparazione dei difetti esofagei; i problemi che rimangono irrisolti riguardano la scelta di uno scaffold ottimale, le fonti cellulari per la ricostituzione delle componenti epiteliali e muscolari, il recupero della peristalsi e la neovascolarizzazione. I difetti stenotici, complicanza tra le più frequenti riscontrate, sono probabilmente dovuti alla scarsa rigenerazione dell'architettura fisiologica. Il consenso generale indica che è possibile ottenere dei vantaggi inseminando gli scaffold con colture cellulari prima di impiantarli; studi in cui sono state seminate EEC hanno avuto esito positivo nel ripopolare lo strato epiteliale, sia che l'impianto riguardasse un patch o una sostituzione a tutto spessore. Tuttavia, così come è accaduto con i patch acellularizzati, nei casi in cui si è proceduto alla sola semina sullo strato rivolto verso il lume, vi è stata una scarsa rigenerazione dello strato muscolare, ad indicare la necessità di integrare la coltura cellulare con SMCs [8].

### 3.2.1 Lo studio Aikawa *et al.*

Un approccio innovativo è stato quello di Aikawa *et al* [130]; osservando gli scarsi risultati ottenuti con gli studi precedenti sia con scaffolds artificiali, che implicano la permanenza di tessuto estraneo all'interno dell'organismo, sia con tessuti biologici, che comportano la scarsa ricostituzione dello strato muscolare, il gruppo giapponese ha deciso di usare scaffolds artificiali riassorbibili. L'utilizzo di un materiale biocompatibile risolverebbe infatti sia le complicanze dovute a reazione da corpo estraneo nel tessuto ospite, sia le problematiche, etiche e procedurali, dovute all'utilizzo di materiali biologici alloigenici. Il patch di polimero riassorbibile (BAPP, *bioabsorbable polymer patch*) utilizzato dal gruppo è costituito da un materiale fibroso e poroso composto di un copolimero di acido polilattico e policaprolattone in un rapporto pari a 50:50 ed è rinforzato con fibre di acido poliglicolico. Le caratteristiche di tale materiale lo rendono adatto all'infiltrazione e alla colonizzazione da parte delle cellule dell'ospite. Il materiale è sviluppato in modo da degradarsi in 8 settimane, ridotte a 3 settimane in presenza di succhi gastrici.

Dato che il BAPP è composto di materiale sintetico, forza, forma e tempo di degradazione possono essere modificati a seconda delle esigenze e non sussiste il rischio di zoonosi o altre malattie infettive. Lo stesso materiale, seppur modificato, è stato utilizzato in ambito clinico per sostituire tratti di arteria polmonare nei bambini, ma non vi sono, ad oggi, altri

casi riportati di un suo utilizzo nella pratica clinica [131]. Nello studio, Aikawa *et al.* oltre a verificare se il patch potesse riparare i difetti senza portare a stenosi dell'esofago, si sono impegnati anche a esaminare il processo di rigenerazione nel sito di impianto e a valutare la biocompatibilità del BAPP. Il modello animale scelto per l'esperimento è stato il maiale, in quanto ritenuto più simile al *setting* di fase clinica. Sono stati operati 9 maiali, è stata effettuata una resezione ovalare di 4 x 2 cm di tutta la parete esofagea poi sostituita con patch su misura del prototipo [figura 3.1]. Data la necessità, nelle operazioni di rigenerazioni degli organi, di mantenere la forma fisiologica dell'organo in questione, si è inserito uno stent temporaneo all'interno dell'esofago nel sito d'impianto; questa procedura è particolarmente importante nel caso dell'esofago toracico, che è infatti sottoposto a numerosi stress meccanici, quali la peristalsi, la pressione intratoracica e il movimento polmonare.



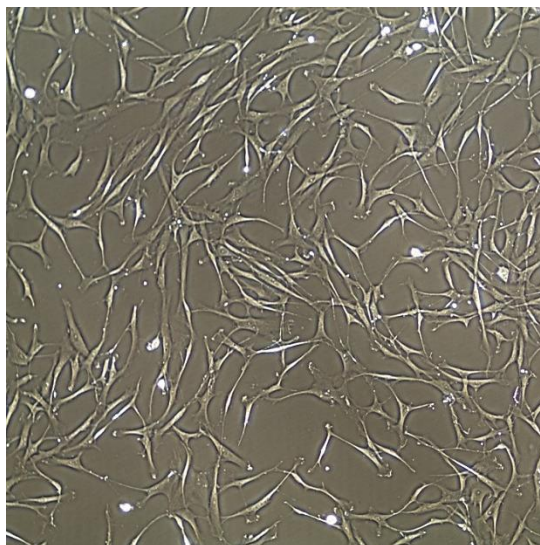
**Figura 3.1** - studio Aikawa *et al.* Impianto di BAPP (bioabsorbable polymer patch) con sutura continua su difetto esofageo di 2 x 4 cm, riguardante le tre tonache dell'organo.

Le sezioni impiantate sono successivamente state osservate a 4, 8 e 12 settimane dopo l'operazione; analisi micro e macroscopiche, quali endoscopia con prese biotiche e fluoroscopia esofagea, hanno testimoniato come dopo 4 settimane dall'operazione il patch non fosse distinguibile dal tessuto circostante, con avvenuta rigenerazione di epitelio squamoso ma senza rigenerazione dello strato muscolare, cosa che conferiva alla sezione operata uno spessore di parete minore rispetto a quella del resto dell'organo.

L'analisi istologica a 8 settimane ha mostrato una scarsa quantità di fibrocellule muscolari e la mancanza di un loro allineamento adeguato; nel corso delle ultime settimane di osservazione, lo strato muscolare ha sviluppato una struttura normale, simile a quella dell'organo nativo. Lo studio ha concluso quindi che, nonostante per la rigenerazione degli organi siano coinvolti tre fattori, quali scaffold, cellule e fattori di crescita, il solo uso di un patch riassorbibile non cellularizzato può essere sufficiente per la ricostituzione di tratti dell'apparato gastrointestinale. L'area impiantata, infatti, era in grado di dirigere la moltiplicazione cellulare e la produzione di fattori di crescita, se l'apporto ematico era sufficiente.

### 3.3 Il ruolo delle cellule staminali mesenchimali

Un'altra svolta innovativa è stata quella di Bo Tan *et al.* data dalla scelta di utilizzare cellule staminali mesenchimali per seminare scaffolds sostitutivi di difetti esofagei. Il tipo cellulare ideale per la ricostituzione di organi complessi dovrebbe essere facile da coltivare, con alta capacità proliferativa e con l'abilità di potersi differenziare in più tipi cellulari specializzati, alla luce della difficoltà, come è stato descritto finora, di garantire un recupero ottimale dello strato muscolare e della vascolarizzazione del tessuto esofageo [8]. Il fisiologico turnover cellulare prevede che vi siano, negli adulti, cellule progenitrici che diano vita ai diversi fenotipi maturi, che è possibile poi riconoscere nei tessuti e negli organi complessi; questo ruolo è ricoperto dalle cellule staminali, che provvedono al rimpiazzo di cellule, non funzionanti o che contengono mutazioni, con cellule nuove, lievemente diverse da quelle rimosse, secondo i fisiologici principi dell'invecchiamento [132].



**Figura 3.2** - Cellule staminali mesenchimali umane derivate da midollo osseo. Le cellule in coltura presentano tipicamente una morfologia affusolata e tendono a formare ponti intercellulari, permettendo l'adesione plastica tra i singoli componenti.

### 3.3.1 Caratteristiche e potenzialità delle MSCs

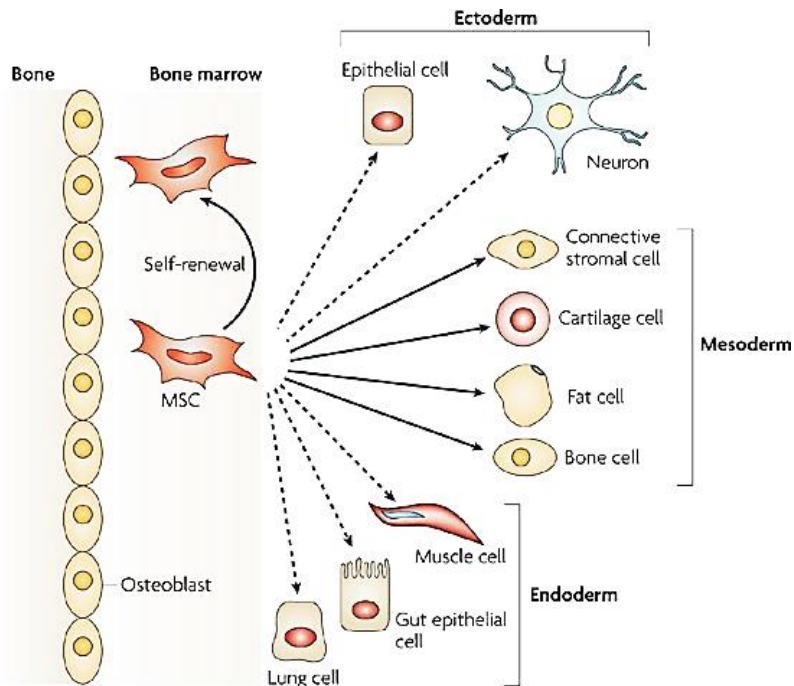
Le cellule staminali mesenchimali (MSCs) sono progenitori cellulari multipotenti che possono essere individuati in vari tessuti adulti. Sebbene all'epoca della sua scoperta (alla fine degli anni '70) questo tipo cellulare sia stato isolato a partire dal midollo osseo, è possibile individuarlo e coltivarlo da diverse risorse autologhe e allogene, inclusi tessuto adiposo, sangue periferico, polmoni, liquidi sinoviali, legamenti parodontali e muscolo [figura 3.3]. Le MSCs sono state inoltre ottenute a partire da placenta, cordone ombelicale e polpa dentale. Le nicchie sono microambienti tissutali perivascolari che mantengono e regolano le cellule staminali [133-134].

Le MSCs detengono due importanti capacità. In primo luogo, sono in grado di differenziarsi in tipi cellulari specializzati, *end-stage*, come quelli che compongono tessuti mesenchimali specifici quali cartilagine, muscolo, stroma del midollo osseo, tendini e legamenti, adipe, derma ed altri tessuti connettivi. È inoltre possibile, in condizioni sperimentali e sotto stimolazione di determinati fattori, indirizzare queste cellule a differenziarsi in cellule endoteliali e neuronali, è dimostrata quindi anche la loro capacità di convertirsi in tessuti di derivazione endodermica e neuroectodermica [135]. Di conseguenza, un solo tipo cellulare può idealmente essere utilizzato per ricreare numerosi tessuti mesenchimali avvalendosi dei principi e delle pratiche dell'ingegneria tissutale [figura 3.4]. In secondo luogo, le MSCs sono in grado di secernere un ampio



spettro di macromolecole bioattive sia con funzione immunomodulatoria che pro-rigenerativa, qualora i tessuti siano danneggiati. Le cellule sono infatti in grado di raggiungere sedi lesionate e partecipare alla risposta al danno producendo fattori paracrini finalizzati a promuovere il trofismo dei tessuti circostanti, inibendo la formazione di tessuto cicatriziale e l'apoptosi e stimolando l'angiogenesi e la proliferazione mitotica di cellule progenitrici o staminali intrinseche nel tessuto stesso. Queste proprietà permettono di generare un microambiente che induce il tessuto danneggiato a montare una risposta rigenerativa autonoma. Storicamente le MSCs hanno destato l'attenzione della ricerca internazionale, oltre che per via della loro capacità differenziativa, per le prospettive terapeutiche dovute all'impianto di queste cellule in tessuti danneggiati [132-133].

Grazie alle tecniche laboratoristiche moderne, la capacità proliferativa delle MSCs, espansive in coltura, è indipendente dall'età del donatore di tali cellule, che incide solo sulla loro quantità e quindi disponibilità [132]. Le cellule staminali mesenchimali ottenute da diversi tessuti differiscono per quanto riguarda le loro caratteristiche biologiche, sono state evidenziate infatti profili di proteoma e trascrittoma specifici per la loro nicchia di origine; altre differenze riguardano le capacità differenziative e di proliferazione che chiaramente influenzano la loro diversa potenzialità in ambito clinico e sperimentale. Le MSCs originate da midollo osseo sono ad oggi le più diffusamente studiate e utilizzate per creare terapie funzionali, sono pertanto il tipo di cellula staminale mesenchimale la cui capacità differenziativa e la cui efficacia e sicurezza sono state confermate mediante vari trials clinici. Le BM-MSCs sono caratterizzate da un periodo di duplicazione più lungo rispetto alle altre staminali, raggiungono velocemente la senescenza e costituiscono solo lo 0.01-0.001% delle cellule nucleate del midollo [136-137]. Il potenziale differenziativo delle BM-MSCs è il più ampio tra le cellule multipotenti, i possibili fenotipi di differenziazione comprendono infatti adipociti, astrociti, cardiomiociti, condrociti, epatociti, cellule mesangiali, cellule muscolari, neuroni, ostoblasti, cellule stromali e tessuto embrionale [135].



**Figura 3.3** - capacità differenziativa delle cellule staminali mesenchimali derivate da midollo osseo. Le MSC riescono, sotto opportuni stimoli, a differenziarsi in cellule derivate da tutti e tre i foglietti embrionali; dall'**ectoderma**: cellule endoteliali e neuroni; dal **mesoderma**: cartilagine, adipe, osteoblasti e fibroblasti; dall'**endoderma**: cellule muscolari, pneumociti e cellule endoteliali dell'apparato gastroenterico.

I meccanismi con cui le MSCs esercitano le loro capacità immunoregatorie non sono del tutto note ma implicano il contatto intercellulare e la produzione di componenti secretive [figura 3.5]; *in vitro*, queste cellule sono in grado di inibire la proliferazione B e T cellulare e la differenziazione dendritica, possono inoltre modulare la risposta infiammatoria stimolando linfociti T regolatori che sopprimono le funzioni di linfociti T effettori [138-139]. Tra i fattori immunomodulatori secreti si nominano interleuchina 10 (IL-10), interleuchina 6 (IL-6), *transforming growth factor  $\beta$ -1* (TGF $\beta$ -1), indoleamina 2,3-diossigenasi, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *C-C Motif Chemokine Ligand 5* (CCL-5), prostaglandina E2 (PGE2) e ossido nitrico [140]. *In vivo*, la somministrazione di MSCs facilita l'immunosoppressione in modelli animali di *graft versus host disease* (GvHD), sclerosi multipla, malattie infiammatorie croniche intestinali, diabete e cardiomiopatie. In seguito agli esiti positivi ottenuti con studi sugli animali, sono stati condotti trials clinici per valutarne l'efficacia terapeutica sul morbo di Crohn, per GvHD e l'osteogenesi imperfetta; sono ad oggi in corso ulteriori trials in fase

Il sull'infarto del miocardio, anemia aplastica, osteoartrite, lupus eritematoso sistemico, diabete e altre condizioni morbose [133; 141].

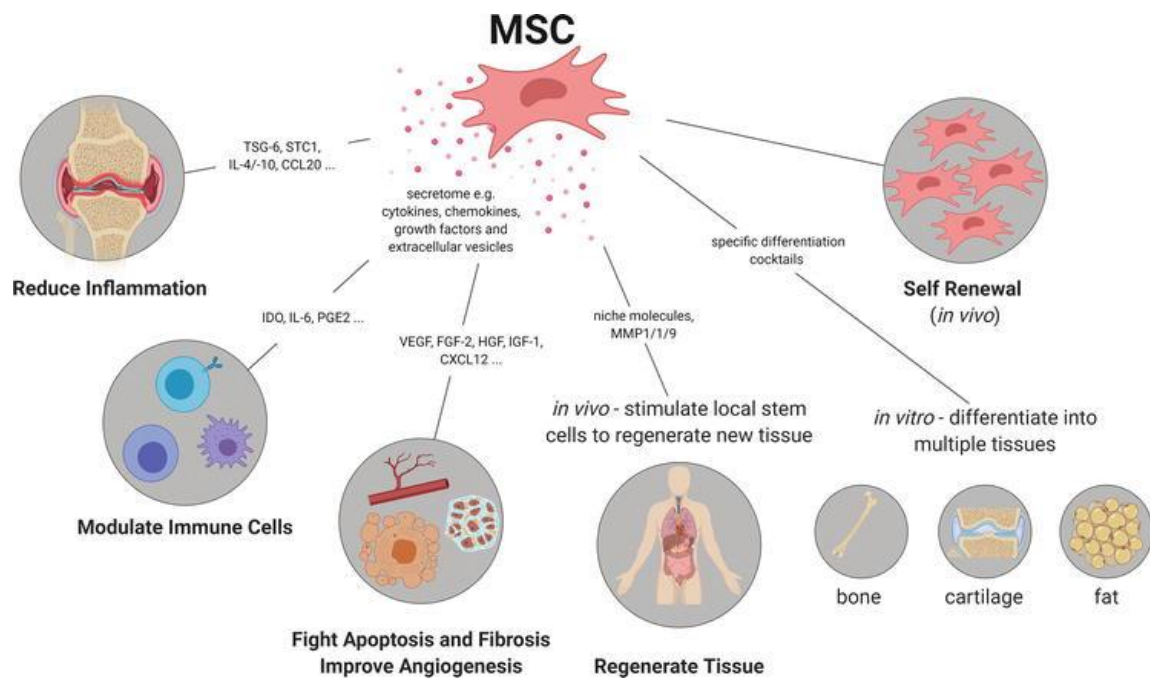
La facilità con cui queste cellule possono essere isolate, insieme alla loro capacità di autorigenazione e alla loro multipotenzialità, le rende un'opzione terapeutica valida per diverse condizioni cliniche che richiedono la riparazione di tessuti ed organi; sebbene la somministrazione di MSCs mediante iniezione diretta abbia dato finora scarsi risultati per via della ridotta sopravvivenza in circolo, i miglioramenti clinici che comunque si verificano hanno condotto all'idea che questa linea cellulare esprima le sue capacità trofiche mediante meccanismi che non necessariamente implicano l'impianto nell'ospite [142]. Liu et al. [143] hanno dimostrato la capacità delle MSCs di produrre i fattori di crescita necessari durante i processi di guarigione misurandone l'espressione con RT-PCR e tecnica ELISA. La prima metodica ha dimostrato che le MSCs sono capaci di esprimere fattori di crescita costitutivamente o in seguito a stimolazione con lipopolisaccaride (LPS), interleuchina 1 (IL-1), *tumor necrosis factor*  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); i fattori prodotti risultano essere: *transforming growth factor*  $\beta$ -1 (TGF- $\beta$ 1), *epidermal growth factor* (EGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) *platelet-derived growth factor* (PDGF), *keratinocyte growth factor* (KGF), *fibroblast growth factor* (FGF) ed *hepatocyte growth factor* (HGF). Con la tecnica ELISA, si è mostrato come la produzione di tali fattori sia aumentata in modo significativo quando le cellule sono stimulate con soluzione ottenuta da tessuto cicatriziale. Un approfondimento interessante, riguardante il tratto gastrointestinale, è stato fatto da Tarnawski *et al.* [144] nel 2012; il gruppo ha infatti studiato i meccanismi molecolari in gioco durante i processi di riparazione di ulcere esofagee e gastriche, dimostrando che EGF, HGF, IGF-1, i loro recettori e l'enzima ciclossigenasi 2 (Cox2) sono coinvolti nella proliferazione e migrazione delle cellule epiteliali e nella rigenerazione delle ghiandole del tessuto gastrico, *serum response factor* (SRF) è essenziale per la riepitelizzazione e la ricostituzione dello strato muscolare, VEGF, bFGF, angiopoietine, ossido nitrico, endotelina, prostaglandine e metalloproteinasi sono importanti per l'angiogenesi, il rimodellamento dei vasi e la rigenerazione della mucosa. SFR è inoltre un fattore che gioca un ruolo critico, promuovendo la neoangiogenesi indotta da VEGF. Una differenza tra la rigenerazione esofagea e quella gastrica è stata riconosciuta nell'importanza che KGF e il suo recettore sembrano avere nella rigenerazione esofagea, al contrario di quella gastrica. Lo stesso

gruppo è stato inoltre in grado verificare che MSCs circolanti, derivate da midollo osseo, contribuiscono alla rigenerazione del tessuto epiteliale e connettivo e alla neovascolarizzazione delle zone ulcerate.

### 3.3.2 Profilo fenotipico delle MSCs

L'isolamento di una popolazione omogenea di MSCs è, ad oggi, un obiettivo non completamente raggiunto, data la naturale plasticità fenotipica di queste cellule nell'espressione di vari markers cellulari; ci sono infatti un numero limitato di markers utili per l'individuazione di questa linea cellulare ma nessuno di questi è per essa specifico in senso stretto. È comunque assodato che le colture di staminali mesenchimali esprimano CD105, CD73 e CD90, ma non CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD19 e HLA-DR. Altre strategie, mediante cui le cellule sono state isolate con successo, hanno previsto l'aggiunta di altri markers come STRO-1, CD146, SSEA-4, CD271 e MSCA-1; non si è tuttavia raggiunto un accordo universalmente riconosciuto sui markers che potrebbero costituire un pannello base per l'isolamento di MSCs, sia da midollo osseo che da altri tessuti. [145-146] *L'International Society for Cellular Therapy (ICTS)* ha preso in considerazione tre markers, CD105, CD73 e CD90, che sono espressi insieme dal 95% di MSCs in coltura, e che costituiscono quindi un possibile profilo identificativo di tali cellule, bisogna comunque considerare come questi clusters di differenziazione non siano assolutamente specifici per le staminali multipotenti, in quanto espressi anche dalla popolazione cellulare vascolare, fibrocellule muscolari lisce e cellule stromali mature, quali i fibroblasti [133].

I criteri minimi per la definizione di cellule staminali mesenchimali secondo la *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy* possono essere riassunti come segue: il mantenere l'adesione plastica in condizioni standard di coltura, l'espressione di CD105, CD73 e CD90 e la mancata espressione di CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 e HLA-DR e la capacità differenziativa in vitro verso osteoblasti, adipociti e condrociti [145].



**Figura 3.4** - potenzialità delle MSC. Le MSC, mediante la secrezione di opportuni fattori, dirigono la rigenerazione tissutale, riducendo l'infiammazione, l'apoptosi e la fibrosi in sede di lesione. La funzione immunoregolatoria è attiva su diverse cellule: viene bloccata la proliferazione di linfociti T, linfociti B e cellule dendritiche, mentre è indotta l'attività del linfociti T regolatori ad attività immunosoppressiva, i fattori immunomodulatori prodotti dalle MSC sono: **IDO** (indoleamina ossigenasi), **IL-6**, **IL-10**, **CCL-5**, **NO** e **PGE2**. Si sottolinea l'importanza dei fattori secretivi che agiscono promuovendo l'angiogenesi e sopprimendo i processi di fibrosi ed apoptosi: **VEGF**, **FGF-2**, **HGF**, **IGF-1**.

### 3.3.3 MSCs in studi clinici e preclinici

L'utilizzo delle MSCs nel campo della bioingegneria è già stato esplorato; ad esempio, cellule autologhe di pecora, sono state condotte, mediante l'utilizzo di ceramiche porose, su siti di riparazione di danni in ossa lunghe, con la finalità di ottenere ossa morfologicamente e biologicamente riparate [147]. Allo stesso modo cellule autologhe da midollo osseo di coniglio sono state utilizzate per favorire la riparazione di tessuti cartilaginei mediante la semina cellulare di scaffolds polimerici (poli acido-DL-lattico-co-glicolico e acido poli-L-lattico) di ialuronato [148]. Altri studi hanno esplorato le potenzialità delle MSCs nel promuovere la rigenerazione di menischi, il recupero funzionale e il neurotropismo dopo uno stroke e la rigenerazione di tessuto cardiaco, soprattutto sfruttando la nota capacità di queste cellule di creare un *milieu* riparativo attraverso il contatto cellulare e la produzione di un ampio spettro di fattori paracrini. Fondamentalmente, in letteratura è possibile riconoscere tre possibili vie mediante cui MSCs e scaffolds sono stati associati per la riparazione di tessuti ed organi. Secondo la

prima tipologia, le cellule sono state seminate sugli scaffolds *in vitro* e, dopo un periodo di incubazione finalizzato ad assicurare l'adesione cellulare al supporto, i composti ottenuti sono stati impiantati. Secondo la seconda modalità, gli scaffolds popolati dalle cellule sono stati incubati con diversi mezzi di coltura in grado di stimolare la progressione delle staminali verso una specifica linea cellulare; gli scaffolds sono poi stati impiantati in sede ortotopica solo a differenziazione ottenuta. È infine stato possibile impiantare scaffolds a cui le cellule target avrebbero potuto aderire *in vivo*, oppure scaffolds contenenti le cellule, incluse in materiali protettivi, la cui maturazione potesse essere permessa *in vivo*. Tutte le suddette tecniche hanno condotto alla ricostituzione e all'integrazione di tessuti sani e differenziati come, per l'appunto, il tessuto osseo. Sebbene siano numerosi i casi sperimentali su modelli animali, questi approcci innovativi sono stati applicati ancora poco sull'uomo [132].

Il gruppo di Tan *et al.* [149] ha studiato gli effetti di tessuto esofageo ingegnerizzato, ottenuto seminando MSCs derivate da midollo osseo su uno scaffold in SIS, nel modello canino. I composti ibridi ottenuti sono stati utilizzati per riparare difetti esofagei di 2,5 x 5 cm in estensione che quindi riguardavano il 50% della circonferenza dell'organo; gli animali sono stati sacrificati a 4 e 12 settimane dopo l'intervento, tutti sono sopravvissuti fino al sacrificio, senza evidenza di infezione o formazione di fistole. Alla quarta settimana postoperatoria, l'esofagogramma al bario non ha rilevato perdite, né formazione di diverticoli o stenosi. I campioni prelevati sono stati analizzati al microscopio in ematossilina-eosina e la presenza di cellule muscolari è stata indagata utilizzando anticorpi anti  $\alpha$ -SMA all'immunofluorescenza. A 4 settimane si è osservato un buon grado di riepitelizzazione e scarsa infiammazione in prossimità dello scaffold impiantato, l'immunofluorescenza inoltre ha mostrato che cellule positive per PKH-26 (marker delle MSC-BM) erano anche positive per  $\alpha$ -SMA, fatto che suggerisce la capacità delle staminali impiantate di differenziarsi in cellule analoghe a miociti. A 12 settimane uno strato di mucosa ha ricoperto la superficie luminale dell'esofago rigenerato, il tessuto della sottomucosa si è organizzato con presenza di microvasi e con numerosi fasci di muscolo scheletrico che si estendevano dal tessuto muscolare adiacente dentro l'impianto.

## **4. Il prototipo dell'Università di Pavia**

Il nostro progetto si inserisce in un filone di ricerca più ampio nell'ambito della ricostruzione del distretto faringo-esofageo, argomento di interesse e di approfondimento da parte della Scuola di Otorinolaringoiatria da diversi anni.

L'obiettivo è quello produrre e testare in vivo scaffolds bioassorbibili popolati o meno da cellule staminali da utilizzare nella ricostruzione di difetti parziali e circolarziali del distretto faringo-esofageo. Tale proposito richiede un approccio multidisciplinare, integrando conoscenze e capacità di diversi dipartimenti: dall'ingegneria tissutale alle tecniche chirurgiche di impianto; per tale motivo il progetto coinvolge diverse Unità:

1. Divisione di Otorinolaringoiatria, Fondazione IRCCS, Policlinico San Matteo;
2. Dipartimento di Chimica del Farmaco, Università di Pavia;
3. Divisione di Oncoematologia pediatrica, Laboratorio di Immunologia e dei Trapianti;
4. Divisione di Anatomia Patologica, Fondazione IRCCS, Policlinico San Matteo.

Il dipartimento di Chimica del Farmaco si è occupato della formulazione di differenti tipi di patches per la sostituzione di tessuto esofageo; il reparto di Oncoematologia pediatrica si è impegnato nell'uso di strategie proprie dell'ingegneria tissutale per coltivare cellule staminali mesenchimali derivate da midollo osseo e seminarle nei bioscaffold al fine di garantire la ripopolazione cellulare dei patches. Il compito della divisione di Otorinolaringoiatria è stato quello di effettuare la valutazione in vivo dei preparati sintetizzati, impiantandoli in modelli suini per riparare difetti dell'esofago. Infine, l'unità di Anatomia Patologica è stata responsabile dell'analisi dei tessuti, dopo il sacrificio del modello animale, al fine di verificare l'avvenuto processo di riparazione e la risposta tissutale al patch impiantato.

### **4.1 Obiettivi dell'esperimento**

La ricerca combinata dei vari dipartimenti mira a tre fondamentali obiettivi. Il primo fine riguarda determinare se un patch multistrato bioassorbibile, costituito in copolimeri di polilattide-co-policaprolattone (PLA-PLC), sia in grado di riparare un difetto circolarziale dell'esofago cervicale nel modello animale, senza il conseguente

formarsi di stenosi o altre complicanze. Il patch polimerico è stato impiantato su difetti esofagei realizzati in maiali e il processo di riparazione tissutale è stato indagato, al fine di valutare la biocompatibilità del prototipo, mediante analisi istologica dell'esofago degli animali sacrificati a una settimana dall'operazione.

Il secondo obiettivo del progetto consiste nel verificare la capacità delle BM-MSCs suine di crescere *in vitro* sui patches bioassorbibili, costituiti di copolimeri di PLA-PLC, e definire il protocollo ottimale per la preparazione di patches cellularizzati con staminali. L'impatto dei patches cellularizzati nella riparazione dei difetti esofagei è stato testato nel modello animale secondo gli stessi principi del primo obiettivo.

Infine, il progetto mira a ideare, produrre e caratterizzare *in vitro* e *in vivo* matrici multistrato elettrofilate (MEMs) per la ricostruzione circonferenziale dell'esofago. L'elettrofilatura è una tecnica di produzione versatile che permette la formazione di matrici composte di nanofibre intrecciate di polimeri. Dopo l'accurata selezione della composizione dei polimeri e delle condizioni dei processi di elettrofilatura, è possibile ottenere matrici con una peculiare struttura tridimensionale in grado di mimare il tessuto esofageo. Le MEMs possono inoltre essere prodotte con la forma desiderata e di dimensioni che soddisfino le richieste chirurgiche; tra le varie forme possibili vi è chiaramente quella tubulare, adatta alla riparazione dei difetti circolari dell'esofago. Le matrici elettrofilate sono state caratterizzate *in vitro*, definendo le loro qualità fisico-chimiche e biologiche, in accordo con metodologie precedentemente standardizzate, e successivamente seminate con BM-MSCs suine. L'obiettivo finale è quindi quello di ottenere un prototipo adatto ai test *in vivo* e standardizzarne il metodo di preparazione.

## 4.2 Preparazione dei patches polimerici

Dato il suo ruolo fisiologico, l'esofago è un organo altamente elastico in grado di sopportare la frizione, dovuta al passaggio di cibo, e pressioni comprese tra 3 e 5 kPa. Di conseguenza, il biomateriale selezionato come componente dello scaffold deve possedere un'elasticità adeguata, oppure lo scaffold deve essere composto da biomateriali differenti che, combinati, permettono di ottenere le caratteristiche richieste. Polimeri sintetici biodegradabili come l'acido poliglicolico, il polilattide (PLA), il poli lattide-co-acido



glicolico, il policaprolattone (PCL) e copolimeri di PLA-PCL sono stati testati negli ultimi anni per la ricostruzione di vari organi, tra cui l'esofago. Inoltre, scaffold sintetici polimerici, composti con i materiali sopracitati, possono essere arricchiti con l'impianto di proteine proprie della ECM al fine di promuovere l'adesione cellulare. [104]

I patches polimerici di interesse dello studio sono stati creati utilizzando copolimeri di PLA-PCL con un rapporto molare di 85:15 e 70:30. Tali copolimeri sono stati selezionati per la loro biocompatibilità, biodegradabilità e per le loro proprietà meccaniche. I polimeri di PLA presentano un tempo di degradazione adeguato al caso in esame, considerata la quantità di tempo richiesto per la cellularizzazione del patch e il successivo impianto in vivo, mentre la componente di PCL presenta le caratteristiche ottimali di plasticità e flessibilità richieste dalla sperimentazione. I patches sono stati preparati sfruttando due differenti tecniche: *Temperature Induced Precipitation* (TIP) e *electrospinning* (EL); questo, con la finalità di ottenere prototipi che presentassero caratteristiche strutturali specifiche ma differenziate, quali livello di porosità, dimensione, orientamento e distribuzione dei pori, e per investigare l'impatto delle diverse tecniche di sintesi sulla cellularizzazione con cellule staminali mesenchimali.

#### 4.2.1 La tecnica di Temperature Induced Precipitation

La TIP è una tecnica versatile e semplice che permette di produrre *films* altamente porosi, modulando le caratteristiche dei pori stessi.

I patches sono costituiti da due strati di differente composizione polimerica: il primo strato è formato dal copolimero PLA-PCL (Polilattide-co-policaprolattone) in rapporto 85:15; il secondo dal copolimero PLA-PCL (Polilattide-co-policaprolattone) in rapporto 70:30.

La preparazione dei patches con la tecnica TIP è stata standardizzata secondo il seguente protocollo.

Il primo strato è stato preparato a partire da una soluzione al 15% p/V del co-polimero PLA-PCL 85:15 in 1,4 - diossano; il secondo strato da una soluzione al 10% p/V del co-polimero PLA-PCL 70:30. Le soluzioni polimeriche sono state gocciolate singolarmente, in stampo di teflon di 8 x 3 cm, a diverse temperature. Alla gocciolatura di ogni soluzione polimerica seguiva una fase di congelamento e liofilizzazione dello strato gocciolato, e successiva gocciolatura dello strato successivo sopra allo strato precedentemente

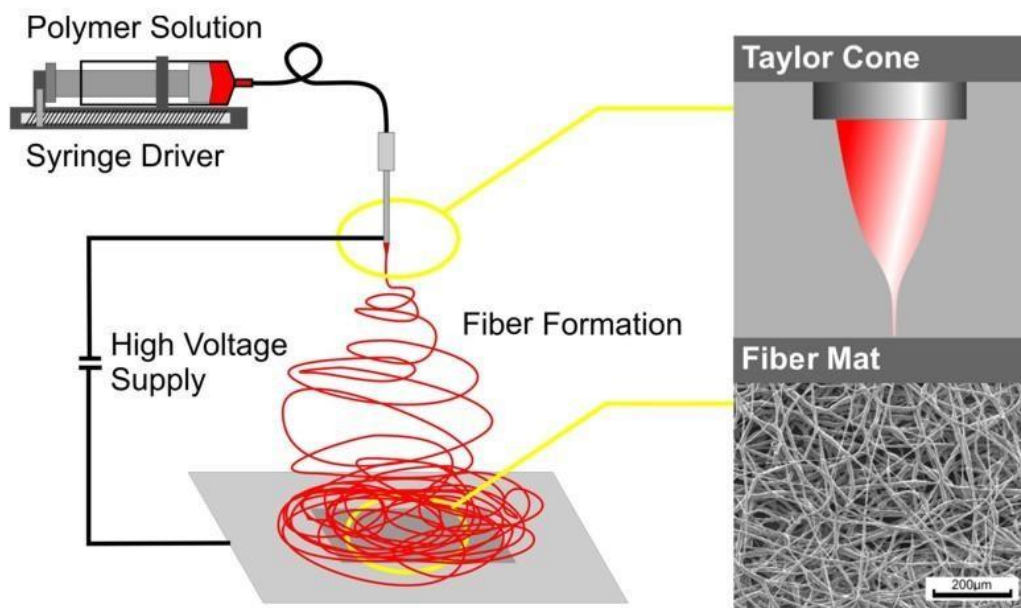
liofilizzato. Tale processo permette di ottenere patches a 2 strati perfettamente formati ed adesi uno all'altro, pur mantenendo le caratteristiche degli stessi. I campioni liofilizzati sono stati rimossi dallo stampo di teflon e conservati a 4°C in ambiente ad umidità controllata (RH, 40%).

I patches sono stati sterilizzati sottoponendoli ad irraggiamento  $\gamma$  con una dose sterilizzante di 25 kGy.

#### 4.2.2 La tecnica di elettrospinning

L'elettrospinning è una nota tecnologia di fabbricazione, basata su campi elettrici ad elevato potenziale realizzati tra una siringa, terminante con un ago e contenente la soluzione polimerica, e un collettore per il deposito di nanofibre; quando la carica elettrica della soluzione supera la tensione del liquido, si crea un getto di polimero che procede dall'ago al collettore e il solvente evapora durante la caduta [figura 4.1]. Tale tecnica permette di produrre scaffolds di nanofibre polimeriche con un alto rapporto superficie-volume, elevata porosità, ridotta dimensione dei pori e struttura simile alla matrice extracellulare [150-151].

Le matrici bistrato elettrofilate sono state ottenute usando Electrospinning Apparatus NANON-01 (MEEC Instruments, Ogori-shi, Fukuoka, Japan). Il primo strato è stato prodotto elettrofilando una soluzione al 20% di PLA-PCL 85:15. Una soluzione di polimeri PLA-PCL 70:30 è stata in seguito elettrofilata sopra il primo strato polimerico usando gli stessi parametri procedurali. I parametri del processo di elettrospinning sono state sperimentati e standardizzati con uno studio precedente, sempre a carico del dipartimento di Chimica del Farmaco dell'Università di Pavia [152]. Le matrici a due strati ottenute sono state poste sotto cappa a flusso laminare per facilitare l'evaporazione del solvente; i prototipi asciutti sono poi stati conservati a  $5 \pm 2^\circ\text{C}$  in ambiente ad umidità controllata (RH, 40%). I patches terminati avevano forma circolare con diametro di  $80 \pm 5$  mm.



**Figura 4.1** - elettrospinning. La tecnica di elettrospinning prevede la formazione di un campo elettrico ad alto potenziale tra l'ago della siringa [**taylor cone**], contenente la soluzione di polimero, ed il collettore metallico. Al termine della procedura si ottiene una matrice di nanofibre polimeriche stratificate [**fiber mat**].

#### 4.2.3 Caratterizzazione fisico-chimica dei patches

La disposizione delle fibre all'interno dei vari patches è stata osservata mediante microscopio elettronico a scansione. I due strati di matrice ottenuta con *Temperature Induces Precipitation technique* hanno mostrato differenze morfologiche significative: lo strato PLA:PCL 85:15 è infatti risultato più regolare, liscio e meno poroso, al contrario, lo strato PLA:PCL 70:30 presentava porosità di dimensioni significative su tutta la superficie. Questo risultato ha portato a decidere di orientare la semina del patch sul lato più poroso, con un significativo miglioramento sia dell'entità che della velocità di proliferazione cellulare. All'osservazione con microscopio elettronico a scansione (SEM) della sezione longitudinale dei due strati TIP-Fs, è stato possibile apprezzarne la struttura porosa altamente intrecciata e misurarne lo spessore, che è risultato pari a circa 660 µm.

I due strati ottenuti con tecnica elettrospinnig, osservati con SEM, non hanno mostrato differenze morfologiche significative, presentavano entrambi una morfologia nanofibrosa con fibre di dimensioni regolari (700-800 nm) e disposte in modo casuale. Anche in questo caso il focus sulla sezione trasversale del patch bilayer ha permesso di evidenziare

la struttura porosa costituita da fibre altamente intrecciate. Lo spessore del campione EL-M bilayer era di 41-81  $\mu\text{m}$

I test di degradazione in vitro sono stati effettuati in due set sperimentali differenti: su prototipi di TIP-Fs e EL-Ms incubati con mezzo di coltura *Modified Eagle Medium Low Glucose p-MSCs* (DMEM-LG) a 37°C e su prototipi di TIP-Fs e EL-Ms incubati in *Artificial Simulated Saliva* (ASS) a 37°C dopo incubazione con MSCs-pig di 30 giorni; al termine dei 30 giorni le cellule sono state rimosse da ogni campione utilizzando una soluzione di tripsina e solo successivamente si è proceduto all'incubazione in ASS. I test di degradazione sono stati effettuati per valutare se e in che modo i differenti mezzi di coltura potessero influenzare la stabilità degli scaffolds. A intervalli prestabiliti, di 30, 45 e 60 giorni, l'ASS è stata raccolta per valutare eventuali variazioni del pH, mentre le variazioni di uptake di acqua (WU), perdita di massa (ML), peso molecolare medio ponderale (Mw), peso molecolare medio numerico (Mn) e indice di polidispersità (PI) sono state valutate direttamente sui campioni di TIP-Fs e EL-Ms mediante GPC (*Gel Permeation Chromatography*).

In tutti i campioni, il pH del mezzo di coltura, dopo un iniziale incremento che lo ha portato da 8.0 a 9.0 in 7 giorni di incubazione, non ha subito ulteriori variazioni.

Per quanto riguarda i risultati ottenuti con analisi GPC, la degradazione del prototipo TIP-Fs è risultata procedere molto più velocemente di quella dei campioni EL-Ms; il primo ha infatti subito una riduzione di Mw del 57% dopo 45 giorni di incubazione, quella del secondo, nello stesso tempo, si era ridotta del 31%. Tale comportamento potrebbe essere spiegato dal rilascio di oligomeri solubili per scissione dalla catena polimerica.

La degradazione della coltura in ASS è stata più lenta e graduale, si è potuto quindi concludere che le modalità di degradazione di TIP-Fs e EL-Ms non sono influenzate dall'incubazione con p-MSCs.

### 4.3 Isolamento di pig-MSCs

Le MSC sono state ottenute da aspirato midollare di 4 maiali, razza Large White, del peso compreso tra i 20 e i 30 Kg: il prelievo di 20 mL, è stato effettuato a livello delle creste iliache superiori previa anestesia generale con isoflurano 3%. I campioni sono stati diluiti e sottoposti a separazione per centrifugazione, le cellule mononucleate sono poi state seminate in piastre per colture cellulari alla concentrazione di 160.000/cm<sup>2</sup> in terreno Low-Glucose-D-MEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) supplementato con 50 µg/ml di gentamicina e 10% di MesenCult MSC Stimulatory Supplement. Le flasks sono state mantenute in coltura a 37°C in atmosfera umidificata arricchita di CO<sub>2</sub> al 5%. Dopo 48h le cellule non aderenti sono state rimosse sostituendo il medium di coltura che, successivamente, è stato cambiato due volte alla settimana. Quando le MSCs di maiale (pig-MSCs) raggiungevano una confluenza ≥80%, venivano staccate con Tripsina EDTA e ripiastrate alla densità di 4.000 cells/cm<sup>2</sup>. Le pig-MSCs sono state staccate ed espanse per 4 volte.

#### 4.3.1 Caratterizzazione delle pig-MSCs

Per valutare la capacità proliferativa delle MSC è stata utilizzata la formula della *cumulative population doubling* (cPD):

$$PD = \log (n. \text{ cellule recuperate} / n. \text{ cellule piastrate}) / \log 2.$$

La cPD è stata calcolata sommando i PD relativi ai 4 diversi passaggi di espansione effettuati.

Le pig-MSCs sono state caratterizzate immunofenotipicamente durante i passaggi di espansione mediante citofluorimetria a flusso utilizzando anticorpi monoclonali specifici per antigeni di superficie quali: CD45, CD11b, CD90, CD105 e CD29. La fenotipizzazione delle pig-MSCs è stata effettuata anche dopo 30 giorni di coltura su patch, previa rimozione delle stesse dal patch con tripsina EDTA. La coltura di pig-MSCs da tutti gli aspirati midollari è stata tale da risultare in un numero adeguato di cellule per la sperimentazione. All'osservazione con microscopio ottico, le cellule presentavano tutte la tipica morfologia lanceolata e l'analisi citometrica a flusso, che ha indagato l'espressione degli antigeni di superficie, ha mostrato come le cellule fossero positive per CD90, CD29 e CD105 e negative per CD45 e CD11b, coincidendo quindi con il profilo di markers tipico cellule staminali mesenchimali [146].



#### 4.3.2 Semina delle pig-MSCs su patch

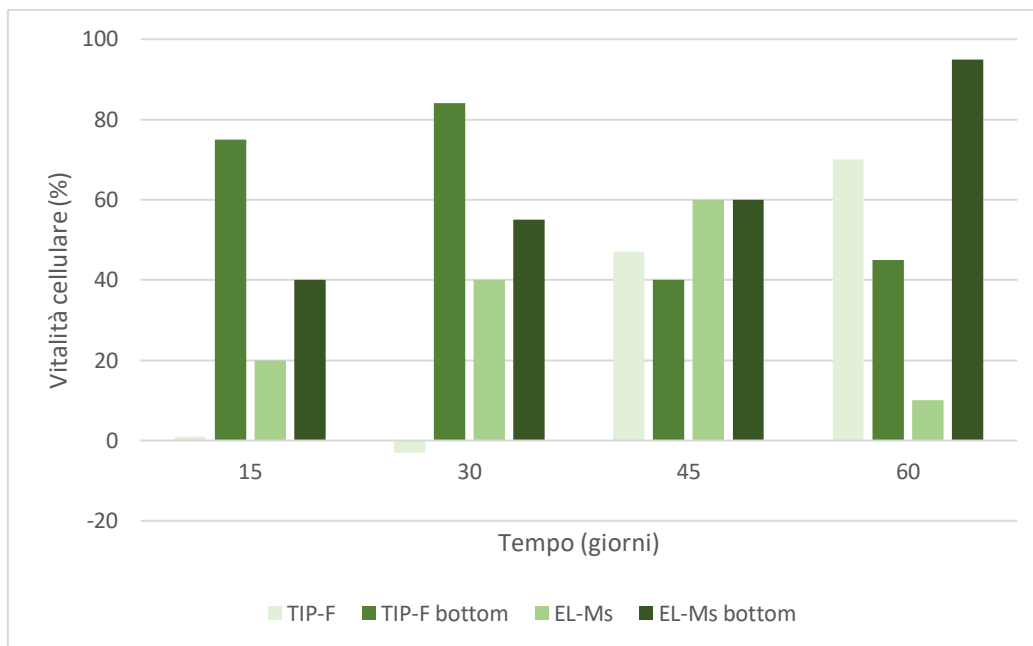
Le cellule sono state seminate sullo scaffold con due modalità: semina su patches in sospensione non fissati e semina con CellCrown™ System. Nel primo caso i campioni di TIP-Fs e EL-Ms non sono stati fissati sul fondo dei pozzetti dove è avvenuta la semina, sfruttando CellCrown™ System è invece possibile immobilizzare i patch ed impedirne la fluttuazione. Tutti i campioni sono stati seminati sul lato PLA:PCL 70:30 poiché più poroso, come risultato dall'analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM).

L'avvenuta cellularizzazione è stata determinata quantitativamente con MTT test, effettuato a tempi crescenti di incubazione dei patches con pig-MSCs: 15, 30, 45 e 60 giorni. Il MTT test è un saggio colorimetrico che sfrutta la capacità delle deidrogenasi mitocondriali di scindere l'anello tetrazolico della molecola di MTT (bromuri di 3-4,5-dimetiltiazol-difeniltetrazolio) di colore giallo per dare un sale di formazano di colore blu-violaceo; la quantità di formazano prodotta viene misurata allo spettrofotometro ed è proporzionale al numero di cellule vive. Sono inoltre stati eseguite analisi morfologiche utilizzando il microscopio elettronico a scansione e il microscopio confocale, previa colorazione con DAPI, di modo da valutare l'adesione al patch, l'organizzazione tridimensionale e l'aggregazione delle cellule. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato per ogni tempo di incubazione e sono stati ripetuti 3 volte con aspirati midollari diversi.

#### 4.3.3 Caratterizzazione biologica dei prototipi ottenuti

La vitalità e la proliferazione cellulare sulle matrici non fissate, indagate con tecnica MTT, sono risultate scarse dopo 13 giorni dalla semina, la proliferazione era infatti di 0,7% per il prototipo TIP-Fs e 10,6% per il prototipo EL-Ms. Un aumento è stato registrato fino al 45esimo giorno per il patch EL-Ms e al 60esimo giorno per TIP-Fs, la proliferazione nelle due tempistiche è infatti risultata in un range compreso tra il 27,9% e il 59,9%.

Al giorno 60 si è registrata una caduta di vitalità sul patch EL-Ms, che è stata ricondotta alla mancanza di ulteriore superficie libera che potesse permettere il procedere della proliferazione [figura 4.4].



**Figura 4.3** - Risultati dell'MTT test condotto sui patches TIP-F e EL-Ms seminati in sospensione con cellule mesenchimali a tempi crescenti, fino a 60 giorni. La componente "bottom" corrisponde alla % di cellule vive rinvenute sul fondo dei pozzetti.

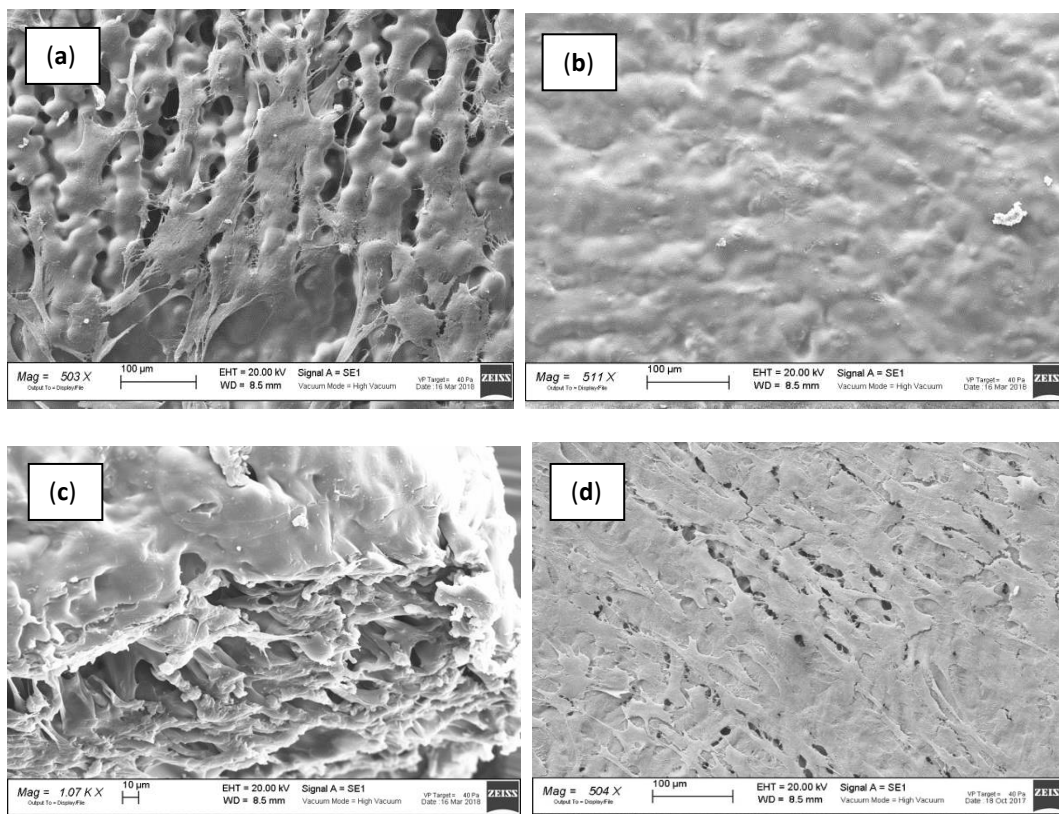
Le immagini ottenute con microscopio elettronico a scansione e all'analisi confocale con colorazione DAPI corroborano quanto ottenuto con il test MTT; su TIP-Fs, a 15 e 30 giorni dalla semina, sebbene il patch fosse ben popolato, vi era una quantità scarsa di cellule adese alla superficie, aumentate poi notevolmente all'osservazione della coltura a 45 e 60 giorni dalla semina. Sul prototipo EL-Ms è stato possibile evidenziare come le cellule siano state in grado di proliferare in modo omogeneo sulla superficie dopo 15 e 30 giorni di coltura, si presentavano infatti distese e ben interconnesse tra loro. La proliferazione è proseguita in modo uniforme fino al 45esimo giorno, per poi calare fino al 60esimo giorno.

Il sistema CellCrown™ ha permesso di ridurre il galleggiamento dei patches durante l'incubazione, la libera motilità dei prototipi è risultata essere un fattore in grado di incidere in maniera importante sulla crescita e sulla proliferazione cellulare. A 30 giorni la vitalità sul campione TIP-Fs era del 360%, contro il 47% riscontrato con la matrice cellularizzata non fissa. L'immobilizzazione ha inoltre permesso di ridurre lo *sliding* delle cellule dalla superficie della matrice al fondo del pozzetto. Le immagini ottenute con SEM e all'analisi confocale con colorazione DAPI a 30 giorni mostrano come le cellule siano state in grado di proliferare creando delle connessioni intercellulari.



Sul prototipo EL-Ms la crescita cellulare è stata notevolmente meno uniforme di quella verificatasi su TIP-Fs, all'osservazione microscopica è stato possibile evidenziare come aree di matrice libera, non ricoperta da cellule, fossero ancora visibili a 30 giorni dopo la semina. L'uso di CellCrown™ System ha infatti portato a il campione a piegarsi, interferendo quindi con l'adesione e la vitalità cellulare; quest'ultima è comunque risultata >100%, un valore notevolmente superiore rispetto a quello ottenuto con coltura su matrice libera nel pozzetto.

In conclusione, l'uso del CellCrown™ System ha permesso di incrementare l'adesione e la crescita cellulare, minimizzando lo scivolamento delle cellule al di fuori della superficie del prototipo. Si è inoltre definito come sia l'adesione che la crescita cellulare siano state migliori sui campioni TIP-Fs rispetto alle EL-Ms. 30 giorni dopo la semina sono stati fissati come tempo necessario affinché venisse raggiunta la completa cellularizzazione dei patches fissati.



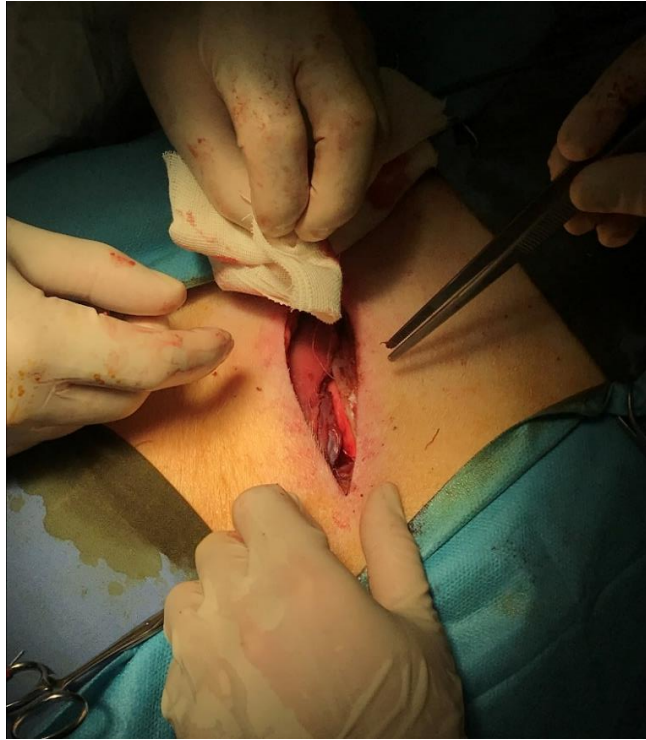
**Figura 4.4** - caratterizzazione mediante SEM della crescita cellulare di MSCs seminate su matrici TIP-Fs libere nel pozzetto (a) cellularizzazione a 15 giorni di incubazione, si evidenzia la presenza di connessioni intercellulari tra le MSCs in proliferazione; (b) cellularizzazione a 30 giorni di incubazione, si evidenzia aumento della cellularità con riduzione della superficie libera dello scaffold; (c) ingrandimento della sezione a 30 giorni di incubazione; (d) cellularizzazione a 45 giorni di incubazione, si evidenzia la pluristratificazione delle MSCs con tendenza delle cellule superficiali a staccarsi dalla coltura.

## **5. La tecnica chirurgica su modello animale**

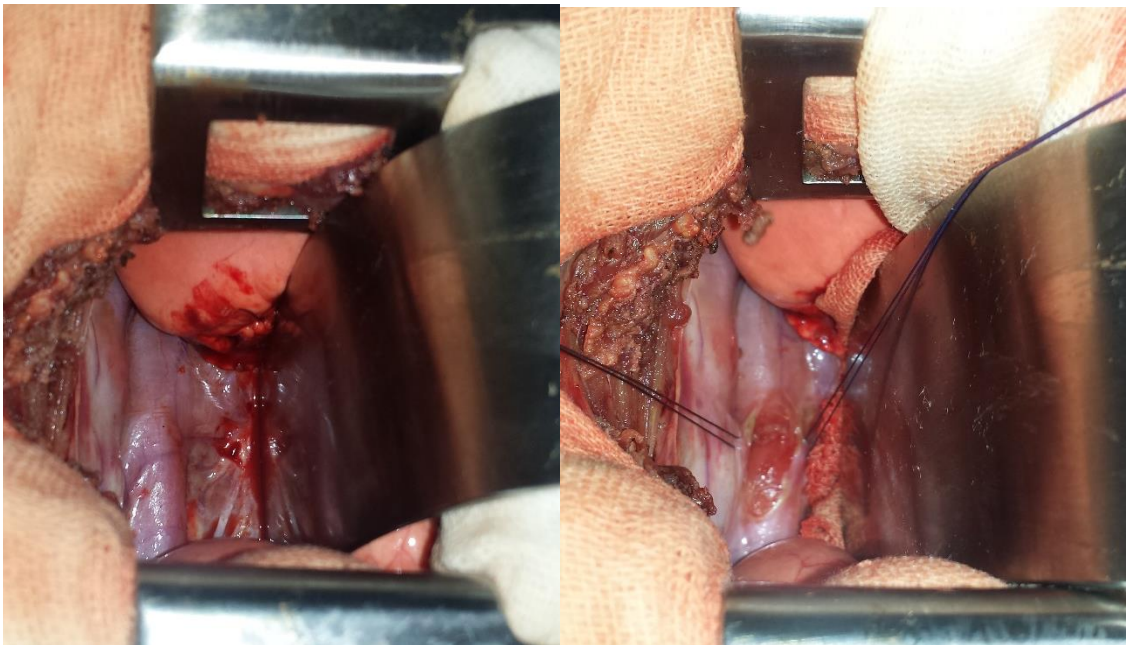
### **5.1 Materiali e metodi**

Nell'ultima fase del Progetto di Ricerca si è proceduto, infine, a perfezionare ed applicare sul modello animale la tecnica chirurgica di posizionamento del patch esofageo; i modelli suini utilizzati appartengono al ceppo *Landrace/Large White* ed erano del peso compreso tra 29 e 34 kg. Gli animali sono stati mantenuti presso lo stabulario dell'Università degli Studi di Pavia, previa approvazione, per uso sperimentale, del peso e della salute. In totale, sono stati sottoposti ad intervento 11 animali; tutte le procedure chirurgiche sono state effettuate presso il Laboratorio di Medicina Sperimentale dell'Università di Pavia.

In ogni animale è stata eseguita una premedicazione intramuscolo con 10 mg/kg di zolazepam-tiletamina con conseguente induzione dell'anestesia con 0,2 mg/kg di propofol, mediante la vena marginale dell'orecchio. Successivamente è stata garantita l'intubazione oro-tracheale con ventilazione meccanica artificiale e miscela di aria-ossigeno a  $FiO_2$  di 0,5, dal volume di 10 ml/kg e frequenza respiratoria di 14 atti/minuto; la miorsoluzione è stata ottenuta con cis-atracurium iniettato come bolo iniziale di 0,13 mg/kg EV e a cui sono seguite dosi successive di 0,03 mg/kg EV e di diazepam 1 fl EV. Durante l'operazione si è mantenuta l'anestesia mediante infusione continua di propofol in pompa alla velocità di 10 mg/kg/h.



**Figura 5.1** - sperimentazione n.1, previo posizionamento dell'animale in decubito laterale sinistro, si procede all'esecuzione di toracotomia laterale destra della lunghezza di circa 10 cm.



**Figura 5.2** - sperimentazione n.1, esposizione dell'esofago dopo toracotomia laterale destra ed isolamento dell'organo dai tessuti circostanti. A destra, in entrambe le immagini, è visibile la valva mediante cui è stato anteriorizzato il polmone destro.

A 45 minuti dall'induzione dell'anestesia è stata introdotta una sonda endo-esofagea. Con l'animale posizionato in decubito laterale sinistro, si è proceduto ad esecuzione di toracotomia laterale destra, di 10 cm di estensione, con conseguente apertura del cavo pleurico mediante divaricazione costale [figura 5.1]. Anteriorizzato il polmone destro su valva, è stata eseguita l'incisione della pleura parietale, 1-2 cm al di sopra della vena azygos, per una lunghezza di circa 5 cm con conseguente esposizione della parete esofagea. Raggiunto l'organo è stata resecata una porzione della parete, individuando il lume dell'esofago mediante la sonda precedentemente posizionata [figura 5.2]. A questo punto è stato posizionato il patch delle dimensioni corrispondenti a quelle del difetto esofageo. In particolare, negli ultimi 2 animali è stata eseguita una resezione circonferenziale con posizionamento di un patche cilindrico sintetizzato mediante tecnica elettrospinning; in uno degli ultimi 2 casi il patche è stato popolato con cellule staminali. I patches utilizzati sono stati costituiti da scaffold semplici TIP-Fs nelle prime 7 sperimentazioni, in uno di questi primi 7 casi il patche è stato popolato con cellule staminali; negli altri 3 animali è stato utilizzato un patche circolare, in due casi cellularizzato con pig-MSCs.

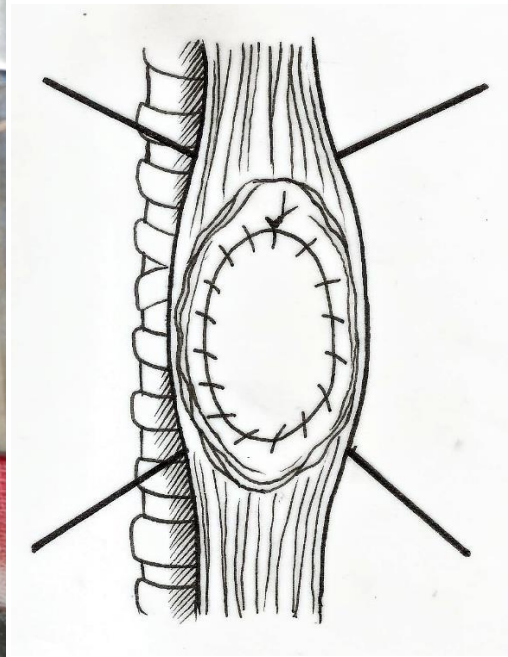
*Tabella 5.1 – caratteristiche delle sperimentazioni*

<b>N. Modello</b>	<b>Età</b>	<b>Peso</b>	<b>Patch</b>	<b>Resezione</b>	<b>Sutura</b>
<b>1</b>	3 mesi	30	TIP-Fs semplice	Bidimensionale	Sutura continua
<b>2</b>	3 mesi	30	TIP-Fs semplice	Bidimensionale	Sutura continua
<b>3</b>	3 mesi	32	TIP-Fs semplice	Bidimensionale	Sutura continua
<b>4</b>	3 mesi	30	TIP-Fs semplice	Bidimensionale	Punti staccati, sovrapposizione con mucosa
<b>5</b>	3 mesi	29,5	TIP-Fs semplice immerso in fisiologica per 1 minuto	Bidimensionale	Punti staccati, sovrapposizione con mucosa
<b>6</b>	3 mesi	31	TIP-Fs semplice immerso in fisiologica per 2 minuti	Bidimensionale	Punti staccati, sovrapposizione con mucosa
<b>7</b>	3 mesi	30	TIP-Fs cellularizzato	Bidimensionale	Punti staccati, sovrapposizione con mucosa e muscolare

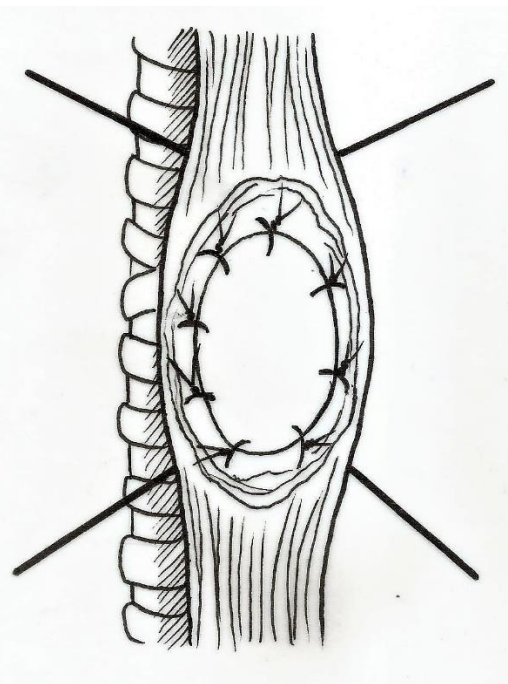
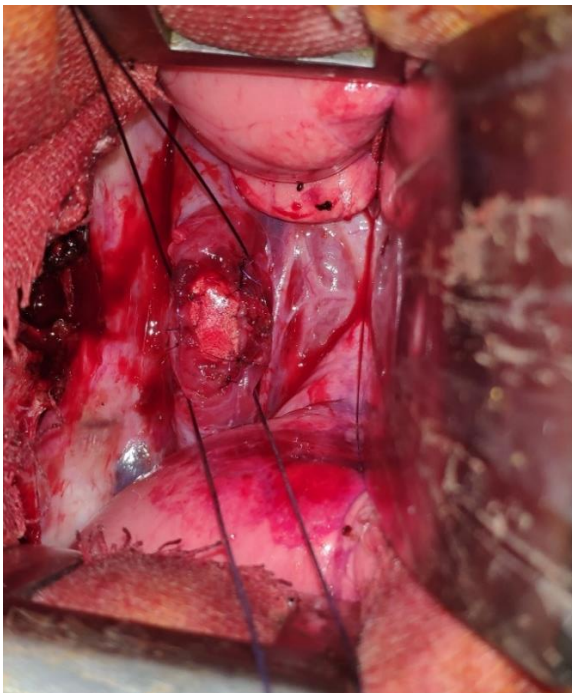
<b>8</b>	3 mesi	30	TIP-Fs semplice tubulare	bidimensionale	Sutura prossimale a punti staccati, distale con due suture continue
<b>9</b>	3 mesi	31	Electrospinning	Bidimensionale	Punti staccati, sovrapposizione con mucosa
<b>10</b>	3 mesi	30	Electrospinning	Circonfrenziale	Punti staccati, sovrapposizione con mucosa e muscolare
<b>11</b>	3 mesi	30	Electrospinning cellularizzato	Circonfrenziale	Punti staccati, sovrapposizione con mucosa e muscolare

Nei primi 3 animali si è proceduto a resecare di un difetto bidimensionale circolare del diametro di circa 1,5 cm, i patches successivamente posizionati quindi avevano forma e dimensioni compatibili con la resezione. La sintesi tra patch e mucosa esofagea è stata eseguita mediante sutura di tipo continuo con materiale a lento riassorbimento, Monosyn 5.0, ristabilendo accuratamente la continuità anatomica dell'organo [figura 5.3].

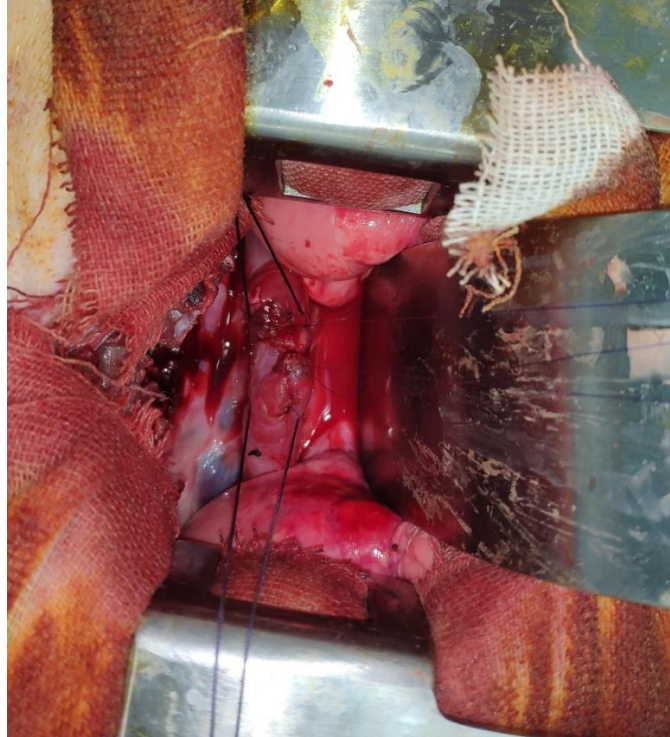
Nei 2 animali successivi, la sutura è stata invece effettuata mediante punti staccati in Monosyn 5.0 garantendo una parziale sovrapposizione tra mucosa esofagea e patch [figura 5.4-5.5].



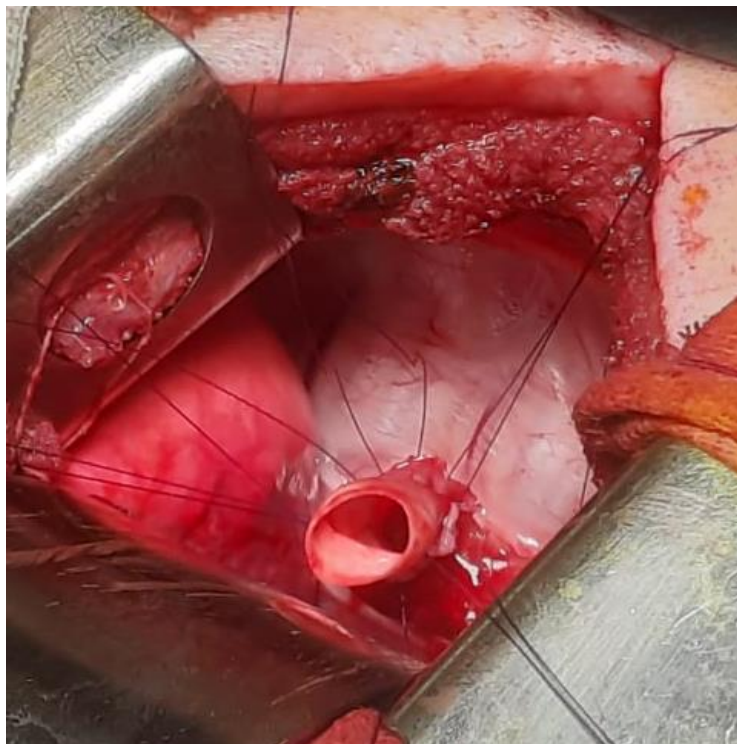
**Figura 5.3** - Sperimentazione n. 3, impianto del patch non cellularizzato sintetizzato mediante TIP con sutura continua su difetto esofageo di 1,5 cm di diametro.



**Figura 5.4** - sperimentazione n. 4, impianto del patch non cellularizzato sintetizzato mediante TIP con sutura a punti staccati su difetto esofageo di 1,5 cm di diametro.



**Figura 5.5A-** sperimentazione n.4, sovrapposizione dell'impianto con mucosa esofagea.



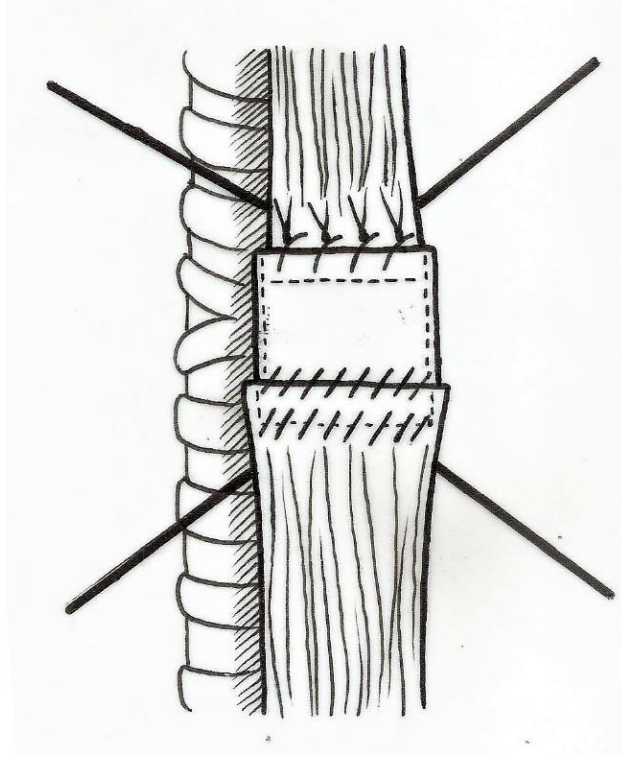


**Figura 5.6B-** sperimentazione n.10, posizionamento dell'impianto circonferenziale.

La sesta sperimentazione è stata condotta in maniera analoga ma, dati gli esiti delle precedenti, il patch di TIP-Fs è stato lasciato immerso in soluzione fisiologica per due minuti prima dell'impianto, nel tentativo di ridurre la rigidità.

La settima operazione ha previsto l'utilizzo del patch cellularizzato; l'incubazione, sotto indicazione dei risultati ottenuti in vitro, ha avuto una durata di 30 giorni e la semina è stata effettuata utilizzando CellCrown™ System. Lo strato cellularizzato, costituito quindi da PLA-PCL 70:30, è stato rivolto sul versante parietale, con conseguente esposizione dello strato PLA-PCL 85:15 sul versante endoluminale dell'organo. A protezione del patch, l'area operata è stata rivestita di mucosa e parte di strato muscolare esofageo.

Le ultime 3 sperimentazioni sono state eseguite impiantando un patch tridimensionale di forma tubulare, del diametro di 12 mm e di 4,3 cm di altezza, sintetizzati mediante electrospinning . Al fine di evitare la stasi di materiale ingerito o saliva nei punti di contatto tra prototipo ed organo, il versante prossimale del patch è stato posto a circondare il moncone prossimale dell'esofago (con tecnica *underlay*) a cui è stato fissato con sutura a punti staccati, mentre il moncone distale dell'esofago è stato suturato esternamente al margine distale del patch (con tecnica *overlay*) mediante due suture continue; tutte le suture sono state effettuate con materiale riassorbibile Monosyn 4.0.



**Figura 5.7** – sperimentazione n. 8. Rappresentazione di impianto di patch tubolare non cellularizzato sintetizzato mediante TIP con sutura a punti staccati del versante prossimale e doppia sutura continua del versante distale.

In tutti i casi, dopo l'inserzione del patch, è stata eseguita la sintesi accurata dell'incisione pleurica con sutura continua mediante Monosyn 5.0. La procedura termina con sintesi della toracotomia per i piani costale, muscolare e cutaneo, previo posizionamento di drenaggio pleurico del diametro di 24 Fr in aspirazione. Il catetere venoso centrale è stato tunnellizzato al dorso al termine di ogni operazione [figura 5.7]. Durante il periodo post-operatorio, è stata garantita una terapia antibiotica, antalgica e gastroprotettiva endovena nel corso dei primi 7 giorni post-operatori. La nutrizione degli animali è stata mantenuta per sola via parenterale. In ottava giornata è stato eseguito il sacrificio del suino con prelievo autoptico dell'esofago in toto, per la valutazione anatomopatologica macro e microscopica della sede dell'impianto. I segmenti esofagei contenenti i patches sono stati valutati macroscopicamente immediatamente dopo il prelievo autoptico.



*Figura 5.8 - sperimentazione n.1, esiti operatori della toracotomia laterale destra.*

## 5.2 Risultati

I primi 3 patches, costituiti in TIP-Fs semplice e fissati mediante sutura continua, si sono parzialmente staccati dalla parete esofagea circostante, portando quindi alla discontinuità della stessa ed inevitabilmente all'instaurarsi di una reazione infiammatoria dei tessuti limitrofi.

Nei successivi due casi, caratterizzati da sutura del prototipo con punti staccati e parziale sovrapposizione della mucosa esofagea, è stato possibile ottenere una buona tenuta dell'impianto senza il verificarsi di *leakage* ai margini della sutura. Tuttavia non si è verificata una soddisfacente integrazione tra il patch e la parete esofagea, fatto che è stato ricondotto all'inadeguata rigidità del patch stesso.

L'esito della sesta sperimentazione, in cui si è immerso il patch in soluzione fisiologica per due minuti prima dell'impianto, è stato sostanzialmente analogo ai casi precedenti: non si è infatti verificata un'adeguata adesione e conseguente integrazione tra patch e tessuto esofageo.

Il settimo modello è stato impiantato con patch TIP-Fs cellularizzato con pig-MSCs, dopo incubazione della durata di 30 giorni. Già durante la procedura operatoria è stato possibile verificare come il patch cellularizzato si presentasse sostanzialmente più rigido rispetto ai prototipi usati nelle operazioni precedenti, le cui caratteristiche meccaniche, come

precedentemente detto, si erano già dimostrate sostanzialmente inadatte all'integrazione con l'organo. Il risultato è stato, quindi, sostanzialmente analogo ai casi precedenti: la limitazione dovuta alle proprietà meccaniche del patch non ha permesso la fusione tra parete e prototipo impiantato.

Nei casi 9 e 10 è stato utilizzato un patch tubulare non cellularizzato: si è riscontrata una maggiore tenuta delle suture, in assenza di soluzioni di continuo ed in assenza di segni di infiammazione dei tessuti contigui all'esofago. Inoltre, si è documentata un'integrazione uniforme dei margini mucosi con le superfici del patch, il quale risulta meno rigido e più vantaggioso rispetto a quelli utilizzati precedentemente.

Nell'ultimo modello animale è stato utilizzato un patch tubulare cellularizzato con un buona tenuta delle suture e un'ottimale integrazione dei margini mucosi con la superficie dello scaffold. Sono in corso ulteriori valutazioni istologiche dei campioni presso l'Istituto di Anatomia Patologica.

La seconda fase della sperimentazione, che prevede l'utilizzo di soli patch cellularizzati e di patch elettrofilati, maggiormente flessibili, si propone di superare le limitazioni incontrate fino ad ora.

### 5.3 Discussione

La presente ricerca, ad oggi in corso, ha indagato la possibilità di rigenerare tessuto esofageo sfruttando patches polimerici biodegradabili e biocompatibili, cellularizzati con cellule staminali mesenchimali, per la ricostruzione di difetti circolari e circonferenziali in un modello animale. Lo scaffold, oltre a riparare in prima istanza soluzioni di continuità dell'organo, deve condurre la crescita e la diffusione delle cellule impiantate. L'uso di una matrice bioassorbibile si propone di ovviare alle complicanze dovute alla permanenza di materiale esogeno impiantato nella parete esofagea e l'approccio a nuove metodiche di sintesi delle matrici biocompatibili mira a presentare una soluzione al problema, tuttora non risolto, di permettere la rigenerazione di tessuto in tempi sincroni alla degradazione dello scaffold.

La resezione esofagea è un intervento ad esito non sicuro, la mortalità a 90 giorni si attesta infatti al 13% ed è considerata ad oggi una delle più alte a seguito di una procedura elettiva. I metodi correntemente utilizzati per la riparazione dell'organo includono sutura diretta, lembo peduncolato di muscolo intercostale, patch di tessuto pericardico e lembo peduncolato di diaframma; tuttavia, tali procedure non possono essere applicate a tutti i casi e frequentemente comportano complicanze quali rottura della sutura, stenosi [15] o abbassamento della qualità della vita per insorgenza di sintomi invalidanti. Queste complicanze sono state risolte in modo solo marginale nel corso degli ultimi anni nonostante i moderni avanzamenti delle tecniche chirurgiche. Eliminare il bisogno di utilizzare condotti di tessuto autologo, sfruttando prototipi bioingegnerizzati potrebbe ovviare alle problematiche menzionate.

Finora nessun prototipo bioingegnerizzato è stato approvato da organismi regolatori per la rigenerazione di organi costituiti da diversi tessuti stratificati. Di conseguenza, la ricerca si muove unicamente nel traslare specifici approcci dalla fase laboratoristica ai test clinici, in quanto modo esclusivo di provarne l'efficacia e la sicurezza. Utilizzare modelli animali di grossa taglia per la sperimentazione *in vivo* permette di avvicinare quanto più la tecnica chirurgica ad un'eventuale approccio clinico sull'uomo.

Un vasto numero di materiali è stato utilizzato per costruire condotti adatti alla riparazione di difetti esofagei, sono stati testati sia prototipi biologici che sintetici. La complicità maggiore, relativa ai materiali sintetici, tra cui il silicone è sicuramente uno di quelli più largamente adoperati, è la formazione di stenosi in grado di ostruire il lume dell'organo. Materiali scarsamente porosi o con pori di piccole dimensioni tendono infatti a indurre reazioni fibrotiche e conseguentemente stenosi. Numerosi materiali polimerici sono stati testati, caratterizzati da diverse proprietà meccaniche e fisiche, dovute alle diverse tecniche di sintesi; strutture polimeriche velocemente degradabili invece, come Vicryl, esitano spesso in deiscenze anastomotiche e *leakage*. Sebbene molti studi siano stati basati sull'impianto di scaffold acellularizzati, sono stati diversi gli esiti positivi ottenuti con semina di cellule su scaffold e successivo impianto; in particolare i tentativi hanno riguardato cellule muscolari lisce miste a epitelioцитi e fibroblasti, popolazioni miste di cellule epiteliali e mesenchimali oppure cellule della mucosa orale [120-127]. Sono comunque pochi gli studi che hanno esplorato un possibile utilizzo di cellule staminali associate a materiali di sintesi artificiale.

I patches, prodotti dal dipartimento di Chimica del Farmaco dell'Università di Pavia e studiati *in vitro*, sono stati preparati con due tecniche differenti: la tecnica di *Temperature Induced Precipitation* e la tecnica di *Electrospinning*, questo con il fine di metterne in evidenza le differenze di stabilità e architetturali. Il polimero sfruttato per la sintesi dei patches è il polilattide-*co*-policaprolattone (PLA:PCL), presente nei due strati, che compongono i prototipi, in proporzioni differenti. I protocolli ottimali per le condizioni di TIP e di *Electrospinning* sono già state definite da precedenti studi a carico dello stesso dipartimento. [79; 81-82].

La scelta dei materiali per la composizione dello scaffold è seguita a numerosi precedenti casi in letteratura basati sull'uso di impianti in silicone, acido polilattico, policaprolattone, poli(acido glicolico), policarbonato e matrici elettrofilate in poliuretano [40; 43-46; 67-71].

I risultati ottenuti hanno dimostrato come sia l'*electrospinning* che la TIP *technique* permettano di ottenere matrici porose, adatte alla semina cellulare, in grado di degradarsi *in vivo* in maniera sincrona alla rigenerazione tissutale.

Le pig-MSCs sono state scelte come cellule protagoniste della sperimentazione per via della loro nota capacità di moltiplicarsi e differenziarsi. Le cellule sono state isolate e caratterizzate da tutti gli aspirati midollari effettuati, hanno dimostrato, inoltre, di avere una capacità proliferativa tale da poter essere utilizzate per la semina su patch nelle indagini future. A seguito di un danno tissutale, la riparazione della ferita richiede l'instaurarsi di un dialogo coordinato tra cellule, matrice extracellulare e fattori di crescita. Le cellule mesenchimali possono essere ritrovate in nicchie all'interno del tessuto esofageo e si pensa che, *in vivo*, queste linee cellulari siano in grado di differenziarsi nelle cellule proprie della parete esofagea, è inoltre possibile che intervengano, qualora necessario, nel regolare la risposta infiammatoria e indurre la guarigione di una ferita. Le MSCs endogene possono essere implementate artificialmente per facilitare la riparazione del danno, dato che possono facilmente essere isolate da altri tessuti autologhi come l'adipe, il midollo osseo, tendini, muscoli e cute. I processi inducibili dalle MSCs che possono essere utili nel contesto dei danni all'esofago sono vari e comprendono: neovascolarizzazione, stimolazione della neoangiogenesi e inibizione della fibrosi, quest'ultima fondamentale per assicurare non solo una ricostituzione anatomica ma anche funzionale dell'organo. Le cellule mesenchimali potrebbero quindi agire in due sensi: stimolare l'attività delle mesenchimali autologhe già presenti all'interno del tessuto esofageo e contribuire, sia direttamente sia mediante la secrezione di fattori di crescita, ad attivare multipli processi rigenerativi, tra cui la neovascolarizzazione.

Le pig-MSCs sono state in grado di aderire e crescere su entrambe le matrici, TIP-Fs e EL-MS; la semina con CellCrown™ System ha permesso di ottenere, in 30 giorni di coltura, una crescita cellulare nettamente superiore a quella valutata dopo semina su matrici libere nei pozzetti. Si è dimostrato, inoltre, che le matrici TIP-Fs siano un substrato più adatto all'adesione e alla crescita cellulare rispetto alle EL-MS. Sulla base dei risultati ottenuti dalla caratterizzazione morfologica dei patches stessi, è stata orientata la semina sul lato più poroso (PLA:PCL 70:30) del patch, che sarà poi orientato, in fase operatoria, sul versante parietale del difetto esofageo.

I due scaffolds hanno tempi e modalità di degradazione differenti, fatto probabilmente da riferire alla loro diversa struttura nanofibrosa, tuttavia per nessuno dei due il profilo di degradazione è risultato alterato dopo la semina con MSCs. La simulazione *in vitro*

effettuata con incubazione in ASS ha permesso di verificare come i prototipi siano stabili in condizioni fisiologiche fino ad una durata di due mesi.

In particolare, nelle ultime sperimentazioni in vitro è stata approfondita la caratterizzazione chimico-fisica e morfologica su matrici polimeriche ottenute con tecnica di elettrofilatura o comunemente chiamata Electrospinning (ES). L'ES è nota per essere una tecnica efficace e robusta per fabbricazione di matrici polimeriche costituite da un network interno di fibre di dimensioni nanometriche. La morfologia micro-modellata delle matrici elettrospun risulta essere estremamente vantaggiosa in campo biomedico, poiché è in grado di imitare la matrice extracellulare (ECM) e favorisce l'adesione e la proliferazione cellulare. Il controllo dell'allineamento delle fibre elettrofilate è cruciale per gli scopi rigenerativi di alcuni tessuti tra cui il tessuto esofageo. Nello specifico ho indagato l'impatto dei parametri del processo di ES sull'allineamento delle fibre di matrici tubolari fatte di Poly (L-lattide-co- $\epsilon$ -caprolattone) (PLA-PCL 70:30); un approccio di Design of Experiment (DoE) è stato condotto al fine di indagare in maniera statisticamente valida i parametri di processo che più influenzano l'allineamento delle fibre. Il DoE è stato studiato mantenendo costanti i parametri inerenti ai materiali usati e ambientali di temperatura e umidità'. Voltaggio (kV), flusso (mL/h) e velocità di rotazione (rpm) del collettore cilindrico di raccolta sono stati i parametri di processo studiati come variabili. L'analisi dell'orientamento delle fibre è stata condotta tramite Scanning Electron Microscopy (SEM) e le immagini processate con il software ImageJ (plugin DiameterJ e OrientationJ). I risultati mostrano che il voltaggio combinato con il flusso hanno un impatto significativo sull'orientamento della fibre elettrofilate e l'orientamento maggiore (espresso in gradi) si ottiene quando tutti e tre i parametri di input (voltaggio, flusso e velocità di rotazione del mandrino) sono al loro massimo valore. Sulle matrici elettrofilate PLA:PCL che hanno mostrato i migliori risultati di orientamento sono stati condotti preliminari studi di vitalità cellulare usando linee cellulari MSCs e fibroblasti.

La messa a punto della tecnica chirurgica ha permesso di individuare la metodica che garantisce la miglior continuità tra patch e parete esofagea mediante sovrapposizione della mucosa e fissazione a punti staccati, per quanto riguarda i difetti di parete



bidimensionali, e la costruzione di un'adeguata canalizzazione, per quanto riguarda i difetti circolari. Nelle successive fasi della sperimentazione ci si pone l'obiettivo di superare il limite costituito dall'eccessiva rigidità del materiale di composizione dello scaffold che sembra ostacolare l'adeguata integrazione con la parete esofagea.

Abbiamo osservato una buona tenuta della sutura se eseguita mediante punti staccati; tuttavia, in alcuni casi risulta ancora limitata l'integrazione tra la mucosa esofagea ed il patch stesso. La prossima fase della sperimentazione prevede l'utilizzo di soli patch tubulari elettrofilati popolati, maggiormente flessibili.

Per le operazioni *in vivo* future ci si propone, inoltre, di adoperare metodiche che permettano un'adeguata protezione del patch impiantato anche sul versante luminale. Di particolare interesse risultano infatti i risultati positivi ottenuti dai gruppi di La Francesca *et al.* e Aikawa *et al.* accumulati dall'aver utilizzato uno stent endoluminale a protezione della zona operata, rimosso successivamente per via endoscopica.

## 5.4 Conclusioni

Da quanto emerso dai risultati preliminari, è possibile affermare che la sostituzione di segmenti dell'esofago mediante patches riassorbibili popolati con cellule staminali mesenchimali sia una frontiera promettente nell'ambito della bioingegneria tissutale e nella ricostruzione del distretto ipofaringo-esofageo..

Le pig-MSCs possono essere efficacemente isolate ed espanse in coltura fino ad ottenerne un numero adeguato alla sperimentazione. Gli scaffolds di PLA-PCL, sia sintetizzati mediante TIP che mediante elettrospinning, sono adeguati alla coltura delle pig-MSCs senza che subiscano modificazioni delle loro caratteristiche strutturali o biochimiche. La coltura risulta più efficace se la semina avviene sul versante più poroso del patch, ovvero sullo strato PLA-PCL 70:30, e se è effettuata fissando il substrato sul fondo dei pozzetti di coltura sfruttando il sistema CellCrown™ System. 30 giorni è risultato il tempo di incubazione ottimale di coltura per le MSCs seminate mediante CellCrown™ System su scaffolds TIP-Fs; indagini future si ripromettono di approfondire la crescita sugli scaffolds EL-MS.

Le sperimentazioni sul modello suino hanno permesso di individuare la metodica migliore di impianto del patch sia bidimensionale che circolar, che consiste quindi nell'eseguire una sutura a punti staccati tra prototipo e tessuto circostante. Le

prospettive future implicano l'utilizzo di patches tubulari con proprietà meccaniche più vantaggiose, i quali saranno popolati con cellule al fine di migliorare l'integrazione tra patch e mucosa esofagea e guidare la rigenerazione dei tessuti.

Inoltre, i risultati ottenuti in questa prima fase della sperimentazione con la tecnica di electrospinning hanno permesso di ottimizzare il metodo di produzione e la composizione polimerica dei patches ottenendo delle matrici elettrofilate nanofibrose riproducibili in tempi molto ridotti.

La messa a punto della tecnica chirurgica ha permesso di individuare la metodica che garantisce la miglior continuità tra patch e parete esofagea mediante sovrapposizione della mucosa e fissazione con punti staccati; nelle successive fasi della sperimentazione ci si pone l'obiettivo di superare il limite costituito dalla eccessiva rigidità del materiale di cui è composto il patch, che sembra ostacolare un'adeguata integrazione tra la mucosa esofagea ed il patch stesso, modificando la tecnica di sintesi del patch, e favorendo l'integrazione biologica con cellule staminali autologhe.

## 6. Bibliografia

- [1] *Trattato di anatomia umana*. **Testut L, Latarjet A**. Volume V, apparato della respirazione e della fonazione, apparato della digestione. 5th ed. Edra S.p.A., 2017.
- [2] *Trattato di anatomia umana*. **Anastasi G**. Volume II, splancnologia. 4th ed. Edi.Ermes s.r.l., 2010.
- [3] *Embryologic and anatomic basis of esophageal surgery*. **Skandalakis JE, Ellis H**. Feb 2000, Surgical Clinic of North America, Vol. 80 p. 80-85.
- [4] *Central control of lower esophageal sphincter relaxation*. **Hornby PJ, Abrahams TP**. Mar 2000. Am J Med, Vol. 108, Suppl 4a, p. 90-99
- [5] *Stem cells of the oesophageal epithelium*. **Seery JP**. 2002, J Cell Sci, Vol. 115 p. 1783-1789.
- [6] *Asymmetric stem-cell divisions define the architecture of human oesophageal epithelium..* **Seery JP, Watt FM**. Nov 2000, Current Biology, Vol. 10, p. 1447-1450.
- [7] *Experimental columnar metaplasia in the canine oesophagus*. **Gillen P, Keeling PB**. Br. J. Surg. Feb 1988, Vol. 75, p. 113-115.
- [8] *Esophageal tissue engineering: A new approach for esophageal replacement*. **Totonelli, G**. World J Gastroenterol. Dec 2012. Vol. 18(47), p. 6900-6907.
- [9] *Etiology of esophageal atresia and tracheoesophageal fistula: "mind the gap"*. **de Jong EM, Felix JF**. Jun 2010, Curr Gastroenterol Rep, Vol. 12, p. 215-222.

- [10] *Esophageal atresia: historical evolution of management and results in 371 patients.* **Deurloo JA, Ekkelkamp S.** 2002, *Ann Thorac Surg*, Vol. 73, p. 267-272.
- [11] *State of Play: Eight Decades of Surgery for Esophageal Atresia.* **Zimmer J, Eaton S, Murchison LE.** 2019, *Eur J Pediatr Surg*, Vol. 29, p. 39-48.
- [12] *Regenerative Medicine Strategies for Esophageal Repair.* **Londono R, Stephen F, Badylak DVM.** 2015, *Tissue Eng Part B Rev*, Vol. 21(4), p. 393-410.
- [13] *Gastric transposition in children - a 21 year experience.* **Spitz L, Kiely E, Pierro A.** Feb 2004, *J Pediatr Surg*, Vol. 39, p. 276-281.
- [14] *Guidelines for the management of oesophageal and gastric cancer.* **Allum WH, Blazeby JM, Griffin SM, Cunningham D, Jankowski JA, Wong R.** Jun 2011, *Gut*, Vol. 60, p. 1449-1472.
- [15] *Esophageal cancer, A Review of epidemiology, pathogenesis, staging workup and treatment modalities.* **Napier KJ, Scheerer M, Misra S.** May 2014, *World J Gastrointest Oncol*, Vol. 6, p. 112-120.
- [16] *Global incidence of oesophageal cancer by histological subtype in 2012.* **Arnold M, Soerjomataram I, Ferlay J, Forman D.** Oct 2015, *Gut*, Vol. 64, p. 381-388.
- [17] *Cancer statistics.* **Siegel RL, Miller KD, Jemal A.** 2019. *CA A Cancer J Clin*, Vol. 69, p. 7-34.
- [18] *Oesophageal carcinoma.* **Pennathur A, Gibson MK, Jobe BA, Luketich JD.** 2013, *Lancet*, Vol. 381, p. 400-412.
- [19] *Prognostic impact of body mass index stratified by smoking status in patients with esophageal adenocarcinoma.* **Yoon HH, Lewis MA, Shi Q, Khan M, Cassivi SD, Diasio RB, Sinicrope FA.** Oct 2011, *J Clin Oncol*, Vol 29, p. 4561-4568.
- [20] *The role of overdiagnosis and reclassification in the marked increase of esophageal adenocarcinoma incidence.* **Pohl H, Welch HG.** 2005, *J Natl Cancer Inst*, Vol. 97, p. 142-46.
- [21] *Environmental causes of esophageal cancer.* **Kamangar F, Chow WH, Abnet CC, Dawsey SM.** Mar 2009, *Gastroenterol Clin North Am*, Vol 38, p. 27-58.

- [22] *Helicobacter pylori* and esophageal cancer risk: a meta-analysis. **Islami F, Kamangar F.** Oct 2008, *Cancer Prev Res*, Vol. 1, p. 329–338.
- [23] *Role of acid and duodenogastroesophageal reflux in gastroesophageal reflux disease.* **Vaezi MF, Richter JE.** Jun 1999 *Gastroenterology*, Vol. 111, p. 1192–1199.
- [24] *Surgical aspects of the patient with high-grade dysplasia.* **Pennathur A, Landreneau RJ, Luketich JD.** 2005 *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, Vol. 17, p. 326–332.
- [25] *Incidence of esophageal adenocarcinoma in patients with Barrett's esophagus and high-grade dysplasia: a meta-analysis.* **Rastogi A, Puli S, El-Serag HB, Bansal A, Wani S, Sharma P.** Mar 2008, *Gastrointest Endosc*, Vol. 67, p. 394–98.
- [26] *International cancer seminars: a focus on esophageal squamous cell carcinoma.* **Murphy G, McCormack V, Abedi-Ardekani B.** Jun 2017, *Ann Oncol*, Vol. 28, p. 2086–2093.
- [27] *Epidemiology of esophageal cancer.* **Eslick GD.** Mar 2009, *Gastroenterol Clin North Am*, Vol. 38, p. 17-25
- [28] *The changing profile of esophageal cancer presentation and its implication for diagnosis.* **Gibbs, JF, Rajput A, Chadha KS, Douglas WG, Hill H, Nwogu C, Nava HR, Sabel MS.** Jun 2007, *J Natl Med Assoc*, Vol. 99, p. 620.
- [29] *Incidence trend of esophageal squamous cell carcinoma: an analysis of Surveillance Epidemiology, and End Results (SEER) database.* **Giri S, Pathak R, Aryal MR, Karmacharya P, Bhatt VR, Martin MG.** 2016, *Cancer Causes Control*, Vol. 26, p. 159–161.
- [30] *Oesophageal cancer in non-smoking drinkers and in nondrinkingsmokers.* **Tuyns AJ.** Oct 1983, *Int J Cancer*, Vol. 32, p. 443–444.
- [31] *Informing etiologic research priorities for squamous cell esophageal cancer in Africa: a review of setting-specific exposures to known and putative risk factors.* **McCormack VA, Menya D, Munishi MO.** Jan 2017, *Int J Cancer*, Vol. 140, p. 259–271.

- [32] *Epidemiologic Risk Factors for Esophageal Cancer Development*. **Mao WM**. 2011, Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, vol. 12, p. 2461-2466.
- [33] *Carcinogenicity of drinking coffee, mate, and very hot beverages*. **Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y**. Jun 2016, Lancet Oncol, Vol. 17, p. 877–878.
- [34] *Africa's oesophageal cancer corridor: do hot beverages contribute?* **Munishi MO, Hanisch R, Mapunda O**. Oct 2015, Cancer Causes Control, Vol. 26, p. 1477–1486.
- [35] *Index-based dietary patterns and risk of esophageal and gastric cancer in a large cohort study*. **Li WQ, Park Y, Wu JW**. 2013, Clin Gastroenterol Hepatol, Vol. 11, p. 1130–1136.
- [36] *High exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons may contribute to high risk of esophageal cancer in northeastern Iran*. **Kamangar F, Strickland PT, Pourshams A**. 2005, Anticancer Res, Vol. 25, p. 425–428.
- [37] *No role for human papillomavirus in esophageal squamous cell carcinoma in China*. **Koshiol J, Wei WQ, Kreimer AR**. Jul 2010, Int J Cancer, Vol. 127, p. 93–100.
- [38] *Mucosal alpha-papillomaviruses are not associated with esophageal squamous cell carcinomas: Lack of mechanistic evidence from South Africa, China and Iran and from a world-wide meta-analysis*. **Halec G, Schmitt M, Egger S**. Jul 2016, Int J Cancer, Vol. 139, p. 85–98.
- [39] *Peculiar histopathologic features of esophageal cancer*. **Kuwano H**. 1998, Surg Today, Vol. 28, p. 573-575.
- [40] *Genetic alterations in esophageal cancer*. **Kuwano H, Kato H, Miyazaki T**. Jan 2005, Surg Today, Vol. 35, p. 7-18.
- [41] *Increasing incidence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction*. **Pera M, Cameron AJ, Trastek VF**. 1993, Gastroenterology, Vol. 104, p. 510-513.
- [42] *Biopsy-negative malignant esophageal stricture: diagnosis by endoscopic ultrasound*. **Faigel DO, Deveney C, Phillips D, Fennerty MB**. Nov 1998, Am J Gastroenterol, Vol. 93, p. 2257–2260.

- [43] *8th edition AJCC/UICC staging of cancers of the esophagus and esophagogastric junction: application to clinical practice.* **Rice TW, Patil DT, Blackstone EH.** Mar 2017, *Annals of cardiothoracic surgery*, Vol. 6, p. 119–130.
- [44] *Esophagus and esophagogastric junction.* **Rice TW, Kelsen DP, Blackstone EH.** 2017, *AJCC Cancer Staging Manual*, 8th ed. New York, Springer, p. 185-202.
- [45] *Utility of positron emission tomography for the staging of patients with potentially operable esophageal carcinoma.* **Flamen P, Lerut A, Van Cutsem E.** Sep 2000, *J Clin Oncol*, Vol. 18, p. 3202-3210.
- [46] *Number of lymph node metastases determined by presurgical ultrasound and endoscopic ultrasound is related to prognosis in patients with esophageal carcinoma.* **Natsugoe S, Yoshinaka H, Shimada M.** Nov 2001, *Ann Surg*, Vol. 234, p. 613-618.
- [47] *Prognostic significance of the endoscopic ultrasound defined lymphnode metastasis count in esophageal cancer.* **Twine CP, Roberts SA, Rawlinson CE.** Nov 2010, *Dis Esophagus*, Vol. 23, p. 652-659.
- [48] *Diagnosis and staging of cancer of the esophagus and esophagogastric junction.* **Li Z, Rice TW.** Oct 2012, *Surg Clin North Am*, Vol. 92, p. 1105-1126.
- [49] *Evaluation of distant metastases in esophageal cancer: 100 consecutive positron emission tomography scans.* **Luketich JD, Friedman DM, Weigel TL.** 1999, *Ann Thorac Surg*, Vol. 68, p. 1133-1137.
- [50] *Preoperative chemoradiotherapy for esophageal or junctional cancer.* **van Hagen P, Hulshof MC, van Lanschot JJ.** May 2012, *N Engl J Med*, Vol. 366, p. 2074–2084.
- [51] *Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer.* **Cunningham D, Allum WH, Stenning SP.** Jul 2006, *N Engl J Med*, Vol. 355, p. 11–20.
- [52] *Surgical mortality in patients with esophageal cancer: development and validation of a simple risk score.* **Steyerberg EW, Neville BA, Koppert LB.** Sep 2006, *J Clin Oncol*, Vol. 24, p. 4277–4284.
- [53] *Esophageal and Esophagogastric Junction Cancers.* **Ajani JA, D’Amico TA, Almhanna K.** Feb 2015, *J Natl Compr Canc Netw*, Vol. 13, p. 194-227.

- [54] *Emerging Multimodality Approaches to Treat Localized Esophageal Cancer*. **Kelly RJ**. 2019, J Natl Compr Canc Netw, Vol. 17, p. 1009-1014.
- [55] *Minimally Invasive Surgery for Esophageal Cancer*. **Santillan, AA, Farma, JM, Meredith KL, Shah NR, Kelley ST**. 2008, J Natl Compr Canc Netw, Vol. 6, p. 879-884.
- [56] *The role of surgery in the management of oesophageal cancer*. **Wu PC, Posner MC**. Aug 2003, Lancet Oncol, Vol. 4, p. 481-488.
- [57] *Transthoracic esophagectomy: a safe approach to carcinoma of the esophagus*. **Mathisen DJ, Grillo HC, Wilkins EW Jr**. 1988, Ann Thorac Surg, Vol. 45, p. 137-143.
- [58] *Extended transthoracic resection compared with limited transhiatal resection for adenocarcinoma of the esophagus*. **Hulscher JB, van Sandick JW, de Boer AG**. 2002, N Engl J Med, Vol. 347, p. 1662-1669.
- [59] *Minimally invasive esophagectomy: outcomes in 222 patients*. **Luketich JD, Alvelo-Rivera M, Buenaventura PO**. Apr 2003, Ann Surg, Vol. 238, p. 486-494.
- [60] *Esophageal and Esophagogastric Junction Cancers*. **Ajani JA, Barthel JS, Bentrem DJ**. Aug 2011, J Natl Compr Canc Netw, Vol. 9, p. 830-887.
- [61] *Minimally Invasive Surgery for Esophageal Cancer*. **Santillan AA, Farma JM, Meredith KL**. Oct 2008, J Natl Compr Canc Netw, Vol. 6, p. 879-884.
- [62] *Long-term regeneration and remodeling of the pig esophagus after circumferential resection using a retrievable synthetic scaffold carrying autologous cells*. **La Francesca S, Aho JM, Barron MR**. Mar 2018, Sci Rep, Vol. 8, p. 4123-4139.
- [63] *Failed gastric pull up after esophagectomy managed by colonic interposition*. **Vijay K, Godara R, Vijayvergia V**. Jun 2013, Indian J Surg, Vol. 75, p. 347-349.
- [64] *Colon interposition following esophagectomy*. **DeMeester SR**. 2001, Dis Esophagus, Vol. 14, p. 169-172.
- [65] *Colonic interposition after esophagectomy for cancer*. **Davis PA, Law S, Wong J**. Mar 2003, Arch Surg, Vol. 138, p. 303-308.
- [66] *The supercharged microvascular jejunal interposition*. **Swisher SG, Hofstetter WL, Miller MJ**. 2007, Semin Thorac Cardiovasc Surg, Vol. 19, p. 56-65.



- [67] *High volume centers for esophagectomy: what is the number needed to achieve low postoperative mortality?* **Metzger R.** Dec 2004, *Dis. Esophagus*, Vol. 17, p. 310-314.
- [68] *Outcomes after esophagectomy: a ten-year prospective cohort.* **Bailey SH.** 2003, *Ann Thorac Surg*, Vol. 75, p. 217-222.
- [69] *Hospital volume and surgical mortality in the United States.* **Birkmeyer JD, Siewers AE, Finlayson EV.** 2002, *N Engl J Med*, Vol. 346, p. 1128-1137.
- [70] *Risk factors for complications after esophageal cancer resection: a prospective population-based study in Sweden.* **Viklund P, Lindblad M, Lu M, Ye W, Johansson J, Lagergren J.** 2006, *Ann Surg*, Vol. 243, p. 204-211.
- [71] *Omental wrapping of perforated esophagus.* **Dicks JR, Majeed AW, Stoddard CJ.** 1998, *Dis Esophagus*, Vol. 11, p. 276-278.
- [72] *Wrapping of the omental pedicle flap around esophagogastric anastomosis after esophagectomy for esophageal cancer.* **Dai JG, Zhang ZY, Min JX, Huang XB, Wang JS.** Mar 2011, *Surgery*, Vol. 149, p. 404
- [73] *Use of pedicled omentum in esophagogastric anastomosis for prevention of anastomotic leak.* **Bhat MA, Dar MA, Lone GN, Dar AM.** 2006, *Ann Thorac Surg*, Vol. 82, p. 1857-1862.
- [74] *Partial gastric pull-up in the treatment of patients with long-gap esophageal atresia.* **Reismann M, Granholm T, Ehren H.** 2014, *World J Pediatr*, Vol. 11, p. 267-271.
- [75] *Gastric pull up reconstruction after pharyngo laryngo esophagectomy for advanced hypopharyngeal cancer.* **Sreehariprasad, AV, Krishnappa R, Chikaraddi BS, Veerendrakumar K.** Mar 2012, *Indian J Surg Oncol*, Vol. 3, p. 4-7.
- [76] *Gastric pull-up operation for replacement of the cervical portion of the esophagus.* **Silver CE.** 1976, *Surg Gynecol Obstet*, Vol. 142, p. 243.
- [77] *Closure of tracheoesophageal fistula with prefabricated deltopectoral flap.* **Murono S, Ishikawa E, Nakanishi Y, Endo K, Kondo S, Wakisaka N, Yoshizaki T.** Mar 2014, *Asian J Surg*, Vol. 39, p. 243-246.
- [78] *Reconstruction after pharyngolaryngo-oesophagectomy using delto-pectoral flap.* **Ramadan MF, Stell PM.** Feb 1979, *Clin Otolaryngol Allied Sci*, Vol. 4, p. 5-11.

- [79] *Esophageal reconstruction with a skin-grafted pectoralis major muscle flap.* **Murakami Y, Saito S, Ikari T, Haraguchi S, Okada K, Maruyama T.** Nov 1982, Arch Otolaryngol, Vol. 108, p. 719-722.
- [80] *Reconstruction of the hypopharynx with U-shaped pectoralis major myocutaneous flap after total pharyngo-laryngectomy.* **Morshed K, Szymański M, Gołabek W.** Apr 2005, Eur Arch Otorhinolaryngol, Vol. 262, p. 259-262.
- [81] *Pectoralis major myocutaneous flap for hypopharyngeal reconstruction.* **Spriano G, Pellini R, Roselli R.** Nov 2002, Plast Reconstr Surg, Vol. 110, p. 1408-1413.
- [82] *Quality of life after gastric transposition for oesophageal atresia.* **Ludman L, Spitz L.** Jan 2003, J Pediatr Surg, Vol. 38, p. 53-57.
- [83] *A new approach on treatment of esophageal atresia.* **Fortes L, González M, Mata N.** Apr 2018, Annals of Pediatric Surgery, Vol. 14, Issue 2, p. 95-97.
- [84] *Clinical characteristics and treatment of esophageal atresia: a single institutional experience.* **Chang EY, Chang HK, Han SJ, Choi SH, Hwang EH, Oh JT.** May 2012, J Korean Surg Soc, Vol. 83, p. 43-49.
- [85] *Quality of life in adult survivors of correction of esophageal atresia.* **Deurloo JA, Ekkelkamp S, Hartman EE, Sprangers MA, Aronson DC.** Oct 2005, Arch Surg, Vol. 140, p. 976-980.
- [86] *How to Care for Patients with EA-TEF: The Known and the Unknown.* **Mousa H, Krishnan U, Hassan M.** Nov 2017, Curr Gastroenterol Rep, Vol. 19, p. 65-93.
- [87] *Health-related quality of life and its determinants in children and adolescents born with oesophageal atresia.* **Peetsold M, Heij H, Deurloo J, Gemke R.** Feb 2010, Acta Pædiatrica, Vol. 99, p. 411-417.
- [88] *Outcome of patients operated on for esophageal atresia: 30 years' experience.* **Somppi E, Tammela O, Ruuska T, Rahnasto J, Laitinen J, Turjanmaa V, Järnberg J.** Sep 1998, J Pediatr Surg, Vol. 33, p. 1341-1346.
- [89] *Introduction: History of Regenerative Medicine.* **Badylak SF, Russell AJ, Santin M.** In: Santin, M., editor. Strategies in Regenerative Medicine. Integrating biology with material design. New York: Springer Science-Business Media, LLC; 2009. p. 1-13.

- [90] *Engineered composite tissue as a bioartificial limb graft.* **Jank BJ.** Aug 2015, *Biomaterials*, Vol. 61, p. 246–256.
- [92] *Decellularization of tissues and organs.* **Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF.** Jul 2006, *Biomaterials*, Vol. 27, p. 3675–3683.
- [92] *An overview of tissue and whole organ decellularization processes.* **Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF.** 2011, *Biomaterials*, Vol. 32, p. 3233–3243.
- [93] *Advances in tissue engineering.* **Langer R, Vacanti J.** Jan 2016, *J Pediatr Surg*, Vol. 51, p. 8–12.
- [94] *Progress in tissue engineering and stem cell industry “Are we there yet?”.* **Jaklenec A, Stamp A, Deweerd E.** 2012, *Tissue Eng*, Vol. 18, p. 155–166.
- [95] *Tissue engineering.* **R Langer, JP Vacanti.** May 1993, Vol. 260, Issue 5110, p. 920-926.
- [96] *Esophageal tissue engineering: A new approach for esophageal replacement.* **Totonelli G, Maghsoudlou P, Fishman JM, Orlando G.** Dec 2012, *World J Gastroenterol*, Vol. 18, p. 6900-6907.
- [97] *Comparative experimental study of esophageal wall regeneration after prosthetic replacement.* **Freud E, Efrati I, Kidron D, Finally R, Mares AJ.** May 1999, *J Biomed Mater Res*, Vol. 45, p. 84-91.
- [98] *Replacement of the middle third of the esophagus with a silicone rubber prosthesis. An experiment and clinical study.* **Fryfogle JD, Cyrowski GA, Rothwell D, Rheault G, Clark T.** May 1963, *Dis Chest*, Vol. 43, p. 464-475.
- [99] *Segmental replacement of the thoracic esophagus with a Silastic prosthesis.* **Watanabe K, Mark JB.** Mar 1971, *Am J Surg*, Vol. 121, p. 238-240.
- [100] *Surgical mesh as a scaffold for tissue regeneration in the esophagus.* **Lynen Jansen P, Klinge U, Anurov M, Titkova S, Mertens PR, Jansen M.** 2004, *Eur Surg Res*, Vol. 36, p.104-111.

- [101] *Polyepsilon-caprolactone mesh as a scaffold for in vivo tissue engineering in rabbit esophagus.* **Diemer P, Markoew S, Le DQ, Qvist N.** Apr 2015, Dis Esophagus, Vol. 28, p. 240-245.
- [102] *Starch–poly(ε-caprolactone) and starch–poly(lactic acid) fibre-mesh scaffolds for bone tissue engineering applications: structure, mechanical properties and degradation behaviour.* **Gomes ME, Azevedo HS, Moreira AR, Ellä V, Kellomäki M, Reis RL.** 2008, J Tissue Eng Regen Med, Vol. 2, p. 243-252. 9
- [103] *A highly flexible paclitaxel-loaded poly(ε-caprolactone) electrospun fibrous-membrane-covered stent for benign cardia stricture.* **ueqi Zhu, Changmin Hu, Bin Li, Huilin Yang, Yingsheng Cheng, Wenguo Cui.** 2013, Acta Biomat, Vol. 9, Issue 9, p. 8328-8336.
- [104] *Design of a Bioabsorbable Multilayered Patch for Esophagus Tissue Engineering.* **Dorati R, De Trizio A, Marconi S, Ferrara A, Auricchio F, Genta I, Modena T, Benazzo M, Benazzo A, Volpato G, Conti B.** Jun 2017, Macromol Biosci, Vol. 17, p. 1600426-1600437.
- [105] *Use of a collagen coated vicryl tube in reconstruction of the porcine esophagus.* **Purushotham AD, Carachi R, Gorham SD, French DA, Shivas AA.** Apr 1991, Eur J Pediatr Surg, Vol. 1, p. 80-84.
- [106] *The use of collagen coated vicryl mesh for reconstruction of the canine cervical esophagus.* **Shinhar D, Finaly R, Niska A, Mares AJ.** Mar 1998, Pediatr Surg Int, Vol. 13, p. 84-87.
- [107] *Porous collagen sponge for esophageal replacement.* **Natsume T, Ike O, Okada T, Takimoto N, Shimizu Y, Ikada Y.** Jul 1993, J Biomed Mater Res, Vol. 27, p. 867-875.
- [108] *The experimental replacement of a cervical esophageal segment with an artificial prosthesis with the use of collagen matrix and a silicone stent.* **Takimoto Y, Nakamura T, Yamamoto Y, Kiyotani T, Teramachi M, Shimizu Y.** 1998, J Thorac Cardiovasc Surg, Vol. 116, p. 98-107.

[109] *Intrathoracic esophageal replacement in the dog with the use of an artificial esophagus composed of a collagen sponge with a double-layered silicone tube.* **Yamamoto Y, Nakamura T, Shimizu Y, Matsumoto K, Takimoto Y, Kiyotani T, Sekine T, Ueda H, Liu Y, Tamura N.** Apr 1999, *J Thorac Cardiovasc Surg*, Vol. 118, p. 276-286.

[110] *Engineered whole organs and complex tissues.* **Badylak SF, Weiss DJ, Caplan A, Macchiarini P.** Mar 2012, *Lancet*, Vol. 379, p. 943-952.

[111] *Resorbable bioscaffold for esophageal repair in a dog model.* **Badylak S, Meurling S, Chen M, Spievack A, Simmons-Byrd A.** Jul 2000, *J Pediatr Surg*, Vol. 35, p. 1097-1103.

[112] *Esophageal replacement in rat using porcine intestinal submucosa as a patch or a tubeshaped graft.* **Lopes MF, Cabrita A, Ilharco J, Pessa P, Paiva-Carvalho J, Pires A, Patricio J.** Aug 2006, *Dis Esophagus*, Vol. 19, p. 254-263.

[113] *Regeneration of the esophagus using gastric acellular matrix: an experimental study in a rat model.* **Urita Y, Komuro H, Chen G, Shinya M, Kaneko S, Kaneko M, Ushida T.** Sep 2007, *Pediatr Surg Int*, Vol. 23, p. 21-26.

[114] *Esophageal reconstruction with ECM and muscle tissue in a dog model.* **Badylak SF, Vorp DA, Spievack AR, Simmons-Byrd A, Hanke J, Freytes DO, Thapa A, Gilbert TW, Nieponice A.** Sep 2005, *J Surg Res*, Vol. 128, p. 87-97.

[115] *Successful repair of esophageal injury using an elastin based biomaterial patch.* **Kajitani M, Wadia Y, Hinds MT, Teach J, Swartz KR, Gregory KW.** Aug 2001, *ASAIO J*, Vol. 47, p. 342-345.

[116] *Unsuccessful alloplastic esophageal replacement with porcine small intestinal submucosa.* **Doede T, Bondartschuk M, Joerck C, Schulze E, Goernig M.** Mar 2009, *Artif Organs*, Vol. 33, p. 328-333

- [117] *An extracellular matrix scaffold for esophageal stricture prevention after circumferential EMR.* **Nieponice A, McGrath K, Qureshi I, Beckman EJ, Luketich JD, Gilbert TW, Badylak SF.** Jul 2009, *Gastrointest Endoscopy*, Vol. 69, p. 289.
- [118] *Esophageal preservation in five male patients after endoscopic inner-layer circumferential resection in the setting of superficial cancer: a regenerative medicine approach with a biologic scaffold.* **Badylak SF, Hoppo T, Nieponice A, Gilbert TW, Davison JM, Jobe BA.** Mar 2011, *Tissue Eng Part A*, Vol. 17, p. 1643-1650.
- [119] *Porcine small intestine submucosa matrix (Surgisis) for esophageal perforation.* **Clough A, Ball J, Smith GS, Leibman S.** Oct 2011, *Ann Thorac Surg*, Vol. 91, p. 99-100.
- [120] *Esophageal epithelial cell interaction with synthetic and natural scaffolds for tissue engineering.* **Beckstead BL, Pan S, Bhrany AD, Bratt-Leal AM, Ratner BD, Giachelli CM.** Nov 2005, *Biomaterials*, Vol. 26, p. 6217-6228.
- [121] *Esophagus tissue engineering: in vitro generation of esophageal epithelial cell sheets and viability on scaffold.* **Saxena AK, Ainoedhofer H, Höllwarth ME.** May 2009, *J Pediatr Surg*, Vol. 44, p. 896-901.
- [122] *Culture of ovine esophageal epithelial cells and in vitro esophagus tissue engineering.* **Saxena AK, Ainoedhofer H, Höllwarth ME.** Jun 2010, *Tissue Eng Part C Methods*, Vol.16, p. 109-114.
- [123] *Esophagus tissue engineering: in situ generation of rudimentary tubular vascularized esophageal conduit using the ovine model.* **Saxena AK, Baumgart H, Komann C, Ainoedhofer H, Soltysiak P, Kofler K, Höllwarth ME.** May 2010, *J Pediatr Surg*, Vol. 45, p. 859-864.
- [124] *An artificial esophagus consisting of cultured human esophageal epithelial cells, polyglycolic acid mesh, and collagen.* **Sato M, Ando N, Ozawa S, Miki H, Kitajima M.** 1994, *ASAIO J*, Vol. 40, p. 389-392.

- [125] *An artificial esophagus constructed of cultured human esophageal epithelial cells, fibroblasts, polyglycolic acid mesh, and collagen.* **Miki H, Ando N, Ozawa S, Sato M, Hayashi K, Kitajima M.** 1999, *ASAIO J*, Vol. 45, p. 502-508.
- [126] *A neo-esophagus reconstructed by cultured human esophageal epithelial cells, smooth muscle cells, fibroblasts, and collagen.* **Hayashi K, Ando N, Ozawa S, Kitagawa Y, Miki H, Sato M, Kitajima M.** Jan 2004, *ASAIO J*, Vol. 50, p. 261-266.
- [127] *Intrathoracic esophageal replacement by in situ tissue-engineered esophagus.* **Nakase Y, Nakamura T, Kin S, Nakashima S, Yoshikawa T, Kuriu Y, Sakakura C.** Oct 2008, *J Thorac Cardiovasc Surg*, Vol. 136, p. 850-859.
- [128] *Tissue-engineered oesophagus: experimental substitution by onlay patch or interposition.* **Grikscheit T, Ochoa ER, Srinivasan A.** Aug 2003, *J Thorac Cardio vas Surg*, Vol. 126, p. 537-544.
- [129] *Biomimetic and synthetic esophageal tissue engineering.* **Jensen T, Blanchette A, Vadasz S, Dave A, Canfarotta M.** Jul 2015, *Biomaterials*, Vol. 57, p. 133-141.
- [130] *A bioabsorbable polymer patch for the treatment of esophageal defect in a porcine model.* **Aikawa M, Miyazawa M, Okamoto K, Okada K, Akimoto N, Sato H, Koyama I, Yamaguchi S, Ikada Y.** Jan 2013, *J Gastroenterol*, Vol. 48, p. 822–829.
- [131] *Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery.* **Shin’oka T, Imai Y, Ikada Y.** Feb 2001, *N Engl J Med*, Vol. 344, p. 532–533.
- [132] *Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine.* **Caplan AI.** Jun 2007, *J Cell Physiol*, Vol. 213, p. 341–347.
- [133] *Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine.* **Samsonraj RM, Raghunath M, Nurcombe V, Hui JH, van Wijnen AJ, Cool SM.** Oct 2017, *Stem Cells Transl Med*, Vol. 6, p. 2173-2185.
- [134] *The bone marrow niche for haematopoietic stem cells.* **Morrison SJ, Scadden DT.** Jan 2014, *Nature*, Vol. 505, p. 327-334.

- [135] *Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells: State-of-the-art review.* **Berebichez-Fridman R, Montero-Olvera PR.** May 2018, Sultan Qaboos Univ Med J, Vol.18, p. 264-277.
- [136] *The impact of mesenchymal stem cell source on proliferation, differentiation, immunomodulation and therapeutic efficacy.* **Cheng HY, Ghetu N, Wallace CG, Wei FC, Liao SK.** Sep 2014, J Stem Cell Res Ther, Vol. 4, p. 237.
- [137] *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue.* **Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K.** Jan 2006, Stem Cells, Vol. 24, p. 1294-1301.
- [138] *Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells.* **Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ.** Apr 2005, Blood, Vol. 105, p. 2821–2827.
- [139] *Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions.* **Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E.** Jan 2006, Blood, Vol. 107, p. 367-372.
- [140] *Adhesion molecules: Key players in mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression.* **Ren G, Roberts AI, Shi Y.** Feb 2011, Cell Adh Migr, Vol. 5, p. 20-22.
- [141] *Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine.* **Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F, Ding J.** Aug 2019, Cells, Vol. 8, p. 886-897.
- [142] *The MSC: An injury drugstore.* **Caplan AI, Correa D.** Jul 2011, Cell Stem Cell, Vol. 9, p. 11-15.
- [143] *Wound repair by bone marrow stromal cells through growth factor production.* **Liu Y, Dulchavsky DS, Gao X, Kwon D, Chopp M, Dulchavsky S, Gautam SC.** Oct 2006, J Surg Res, Vol. 136, p. 336-341.
- [144] *Molecular Mechanisms of Epithelial Regeneration and Neovascularization During Healing of Gastric and Esophageal Ulcers.* **Liu Y, Dulchavsky DS, Gao X, Kwon D, Chopp M, Dulchavsky S, Gautam SC.** 2012, Current Medicinal Chemistry, Vol. 19, p. 16-27.



- [145] *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.* **Dominici M, Le Blanc K, Mueller I.** 2006, *Cytotherapy*, Vol. 8, p. 315–317.
- [146] *Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells.* **Lu F, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY.** Feb 2014, *Stem Cells*, Vol. 32, p. 1408-1419.
- [147] *Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerated bone repair in critical-size defects of sheep long bones.* **Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, Boyde A, Ruspantini I, Chistolini P, Rocca M, Giardino R, Cancedda R, Quarto R.** Mar 2000, *J Biomed Mater Res*, Vol. 49, p. 328–337.
- [148] *Repair of osteochondral defects with hyaluronan- and polyester-based scaffolds.* **Solchaga LA, Temenoff JS, Gao J, Mikos AG, Caplan AI, Goldberg VM.** Feb 2005, *Osteoarthritis Cartilage*, Vol. 13, p. 297-309.
- [149] *Tissue engineered oesophagus by mesenchymal stem cell seeding for oesophageal repair in a canine model.* **Tan B, Wei RQ, Tan MY, Luo JC, Deng L, Chen XH, Hou JL, Li XQ, Yang ZM, Xie HQ.** Aug 2012, *J Surg Res*, Vol. 8, p. 40-48.
- [150] *Electrospun Poly Lactic Acid (PLA) Fibres: Effect of Different Solvent Systems on Fibre Morphology and Diameter.* **Casasola R, Thomas NL, Trybala A, Georgiadou S.** Sep 2014, *Polymer*, Vol. 55, p. 4728-4737.
- [151] *Study on hydrophilicity and degradability of chitosan/polylactide-copoly-caprolactone nanofibre blend electrospun membrane.* **Dorati R, Pisani S, Maffei G, Conti B, Modena T, Chiesa E, Bruni G, Musazzi UM, Genta I.** Nov 2018, *Carbohydr Polym*, Vol. 199, p. 150–160.
- [152] *Design of copolymer PLA-PCL electrospun matrix for biomedical applications.* **Pisani S, Dorati R, Conti B, Modena T, Bruni G, Genta I.** Mar 2018, *React Funct Polym*, Vol. 124, p. 77–89.

