



**Università degli Studi di Padova  
Scuola di Dottorato In Medicina Dello Sviluppo E  
Scienze Della Programmazione Sanitaria  
XXIX°ciclo**



***Indirizzo: Emato-oncologia, Genetica, Malattie Rare e Medicina Predittiva***

**BANDO DI CONCORSO N. 2523 del 27 settembre 2013 pubblicato in Gazzetta Ufficiale  
4<sup>a</sup> serie speciale - Concorsi n. 80 dell'8 ottobre 2013**

**Presentazione del Progetto Di Ricerca a Tema  
Vincolato:  
“ Short Bowel Syndrome:  
dall’eziopatogenesi al trattamento”**

***Dottoranda: Dr.ssa F. Grandi\*  
Tutor: Prof. PG. Gamba\****

**\*Chirurgia Pediatrica, Dipartimento della Salute della Donna e del Bambino**

# Dove eravamo rimasti?

## ***Short bowel syndrome (SBS)***

Condizione di malassorbimento intestinale legata a chirurgia resettiva che determina:

- lunghezza intestinale residua < 25% della lunghezza attesa  
e/o
- necessità di NPT per > 6 settimane

*Grant D, Canadian Association Of Paediatric Surgeons Transplantation 1999*

*Guarino et al. J Ped Gastroenterol Nutr 2003*



# Cause di SBS

**Età infantile**

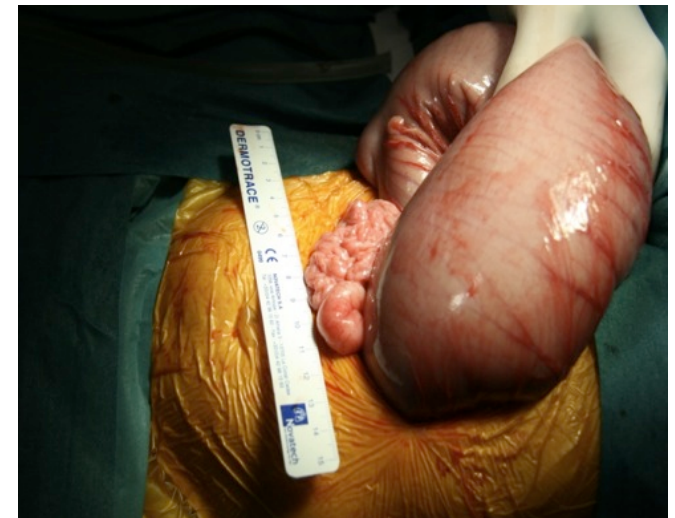
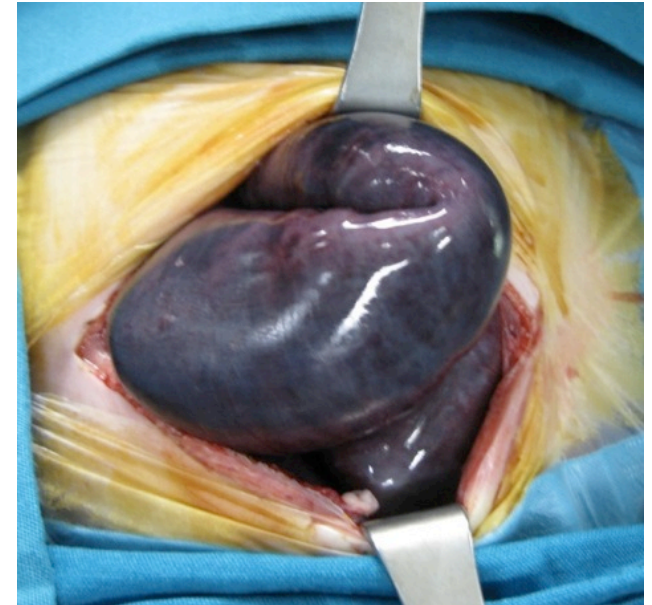
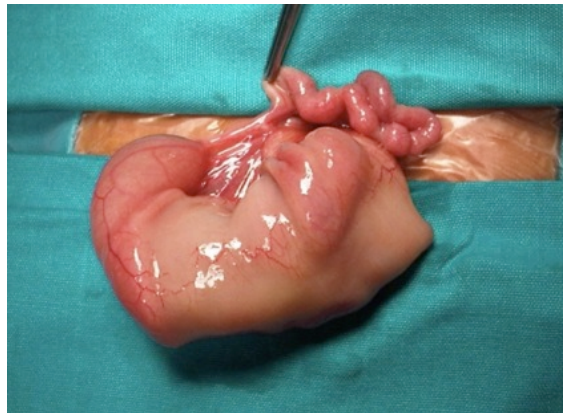
*NEC*

*Difetti di parete addominale*

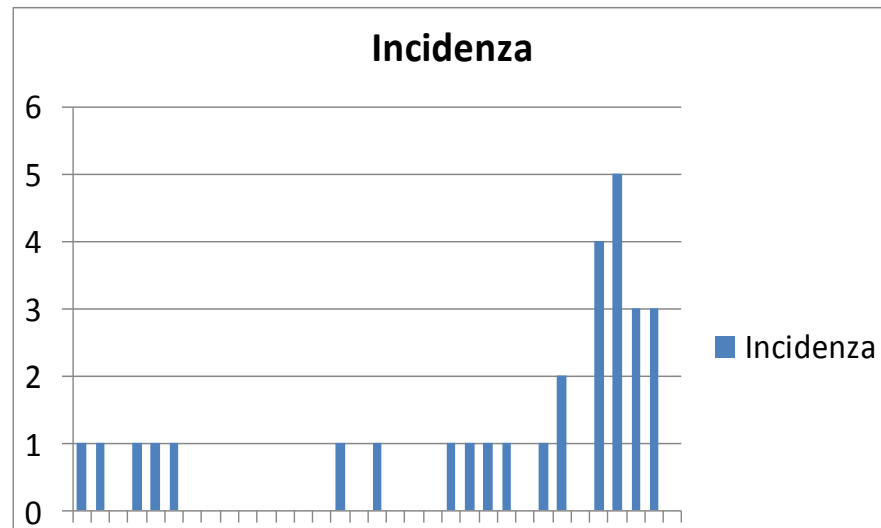
*Atresia intestinale*

*Volvolo*

*Hirschsprung*



# La nostra casistica



Incidenza stimata di SBS= **1** nuovo caso/anno.

La mediana di follow-up dei nostri pazienti è stata di **4** anni, la media di **7.7** anni.

Periodo: **1981-2014**

**30** pazienti

M:F = 1:1

**8/30** pazienti (26.7%) provenienti da altro Centro

**3 / 8** (37.5%) già trattati chirurgicamente



# Outcome dei pazienti

2 (6.6%) decesso

30 pazienti

2 (6.6%) trapianto d'intestino

1 (3%) ancora portatore di  
ileostomia

28 (93.3%) sopravvissuti

18 (64.3%) dimessi  
con NP domiciliare

10 (35.7%)  
svezzati da NPT

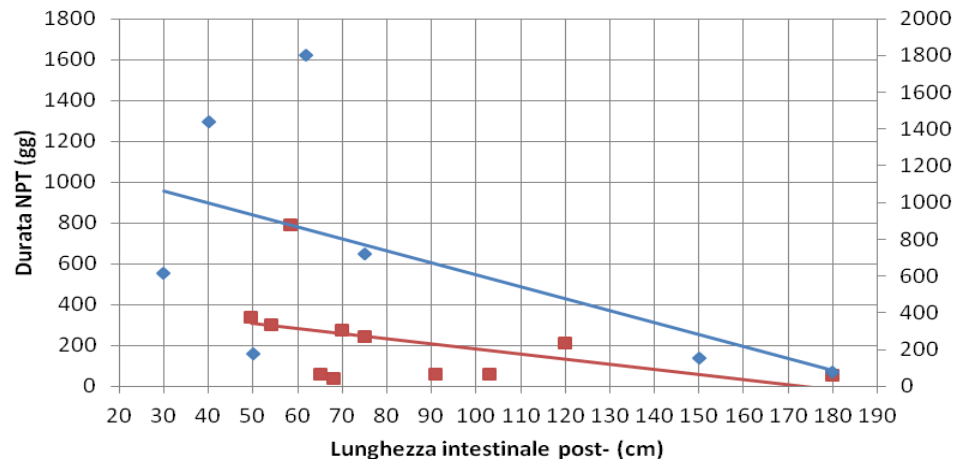
14 (77.7%) dimessi  
in NP ciclizzata

5/28 (17.8%) tuttora  
in NPT domiciliare

3 adulti

2 pediatrici

# Conclusioni

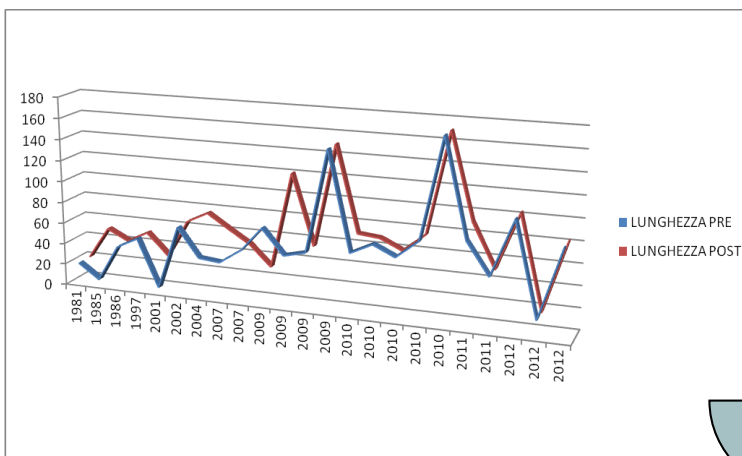


**Lunghezza media intestinale iniziale: 58 +/- 36.7 cm**

$p=0.014$

**Lunghezza media intestinale finale: 70 +/- 14.14 cm**

$p=0.016$



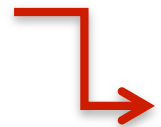
**Cambiamento nell' atteggiamento chirurgico, dagli anni '80 ad oggi: progressiva riduzione, nel tempo, del divario tra lunghezza intestinale iniziale e finale**

*sparing surgery*

# Obiettivi triennio 2014-2016

2 filoni di ricerca paralleli : **clinica** e **sperimentale**

- 1) **Scopo:** miglioramento della gestione multidisciplinare dei pazienti mediante individuazione di possibili *markers* bioumorali predittivi dell'*outcome* a breve e lungo termine di tali pazienti,



**citrullina,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL-8$ ,  
TNF alfa**

→ tempo di svezzamento da NPT  
→ tolleranza della nutrizione enterale

- 2) **Scopo:** ricerca di possibili future terapie alternative alla chirurgia di allungamento intestinale ed al trapianto intestinale

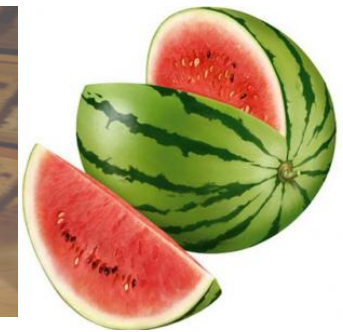


**studio *in vitro* ed *in vivo*** (con utilizzo di modelli animali)  
di sostituti tissutali bio-ingegnerizzati intestinali





# Citrullina



$\alpha$ -amminoacido sintetizzato esclusivamente dall'enterocita a partire da glutamina e prolina

Deriva il suo nome dal nome del cocomero (*Citrullus vulgaris*), dalla cui buccia fu isolata per la prima volta

Collins, J.K. et al. *Watermelon Consumption Increases Plasma Arginine Concentrations in Adults*. Nutrition. (2007), 23:261-266

Livelli plasmatici dipendenti dalla quantità di enterociti funzionali → dalla lunghezza intestinale residua

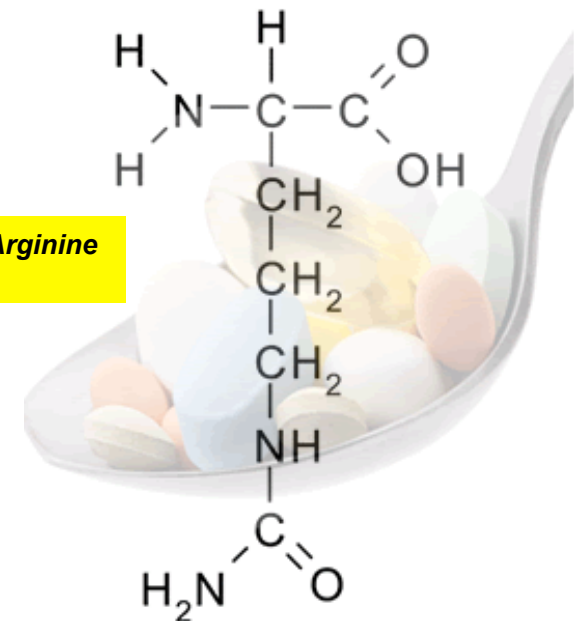
La citrullina si dosa nel sangue di pazienti che hanno già iniziato un programma di nutrizione enterale.

3 prelievi seriati con soggetto a digiuno da almeno 6 ore.

Valori normali: range 15-40  $\mu\text{mol/L}$ .

Citrullinemia < 12  $\mu\text{mol/L}$  nessun paziente è svezzabile dalla NPT

Citrullina > 15  $\mu\text{mol/L}$  paziente candidabile alla ciclizzazione della NPT

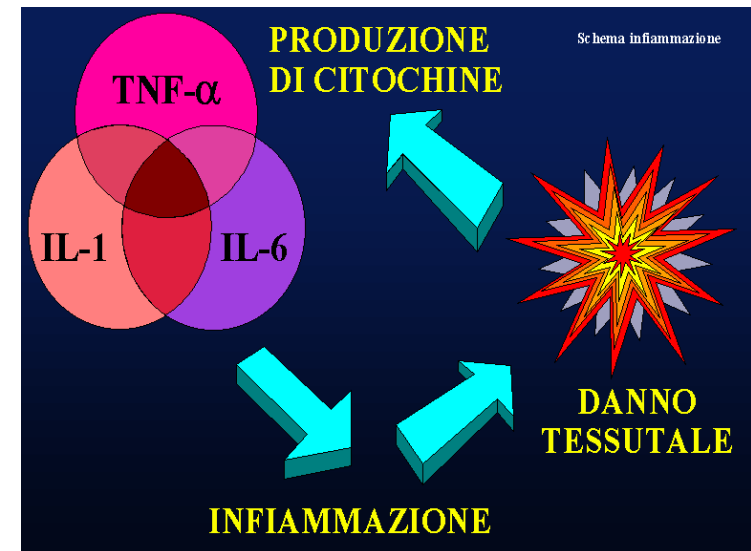


La determinazione plasmatica della citrullinemia si serve della cromatografia ad alta risoluzione (HPLC).

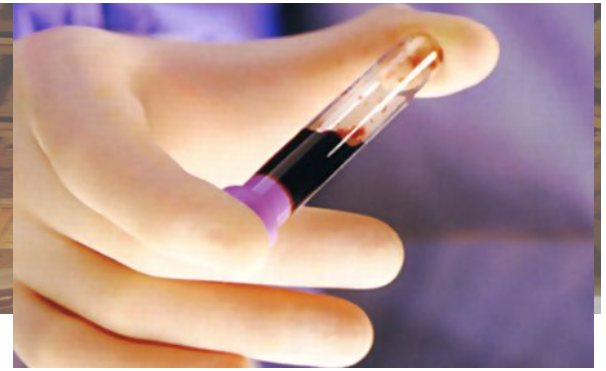
# Citochine infiammatorie

***IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$***

- Dosabili a livello sierico mediante saggi ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*)
- Studi fino ad ora in pazienti adulti affetti da sindrome dell'intestino irritabile ed in modelli murini (ratti Sprague-Dawley e cavie WRY)
- Correlazione inversa tra livelli di citochine IL-1 $\beta$  e IL-6 e tolleranza della nutrizione enterale
  - effetto neuroeccitatorio, sui neuroni dei plessi sottomucosi
  - riduzione la permeabilità di membrana dell'enterocita e la capacità di riassorbimento dell'acqua.
- Pazienti affetti da SBS possiedono costitutivamente livelli basali di TNF- $\alpha$  molto più elevati rispetto ai controlli sani



# Metodi ricerca clinica



Prelievi ematici seriati (almeno 3/paziente)  
Concentrazione sierica di citrullina e delle citochine infiammatorie (Il-1  $\beta$ , Il-6, Il-8, TNF alfa).

Tali valori verranno messi in relazione, mediante analisi statistica con:

- lunghezza intestinale residua dei pazienti
- durata della dipendenza da NPT
- presenza o assenza di svezzamento dalla NP

**Target: pazienti con meno di 5 anni e meno di 100 cm di intestino residuo funzionante**



**11 pazienti, 6 M, 5 F**

**Età media: 2.9 anni**

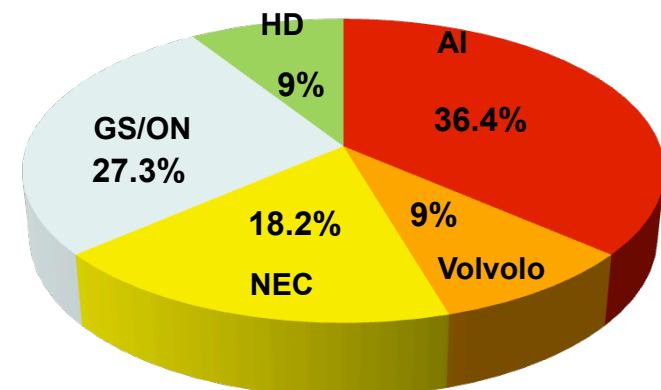
**Lunghezza intestinale media: 56.55 cm (16 cm-100 cm)**

**VIC conservata: 8/11 (72.7%)**

**Ancora dipendenti da NP: 3/11 (27.3%) → 1 seguito in altra sede**

**Tempo di svezzamento dalla NPT: 311.5 gg (39-791 gg)**

**Cause di SBS**





# Ricerca sperimentale: un po' di storia...

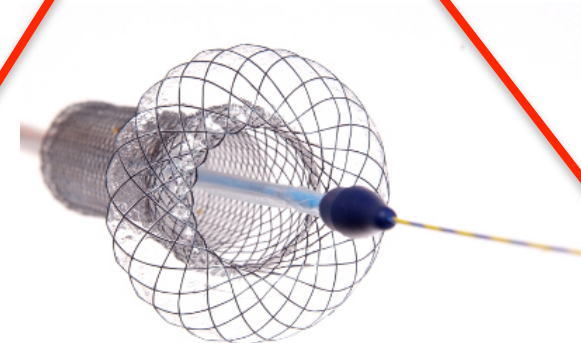
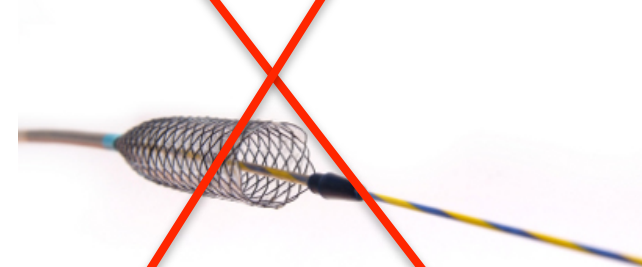
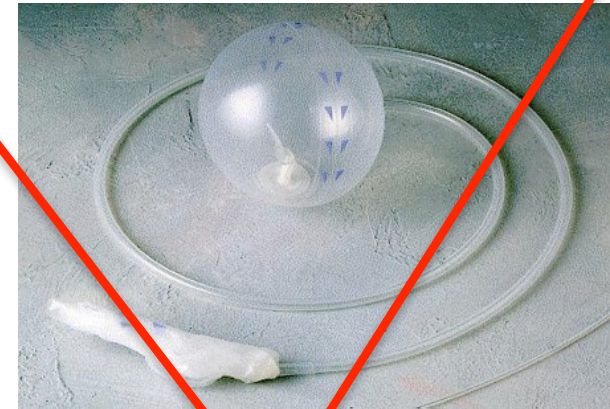
**Scopo della ricerca per SBS:**  
guadagnare cm!

- 1990: dispositivi meccanici allungabili → palloni in silicone, gonfiabili che agissero come espansori intestinali
- 2009-10: Shekherdimian testa sull'intestino protesi in Nitinolo, foggiate a forma di molla autoespansibile
- 2012: Stark sperimenta protesi foggiate a capsula auto-dissolventesi da impiantare nel ratto

**MA**

1) *aumento non solo della **lunghezza**, ma anche del **diametro** dell' intestino residuo*

2) *problemi di facile dislocazione*

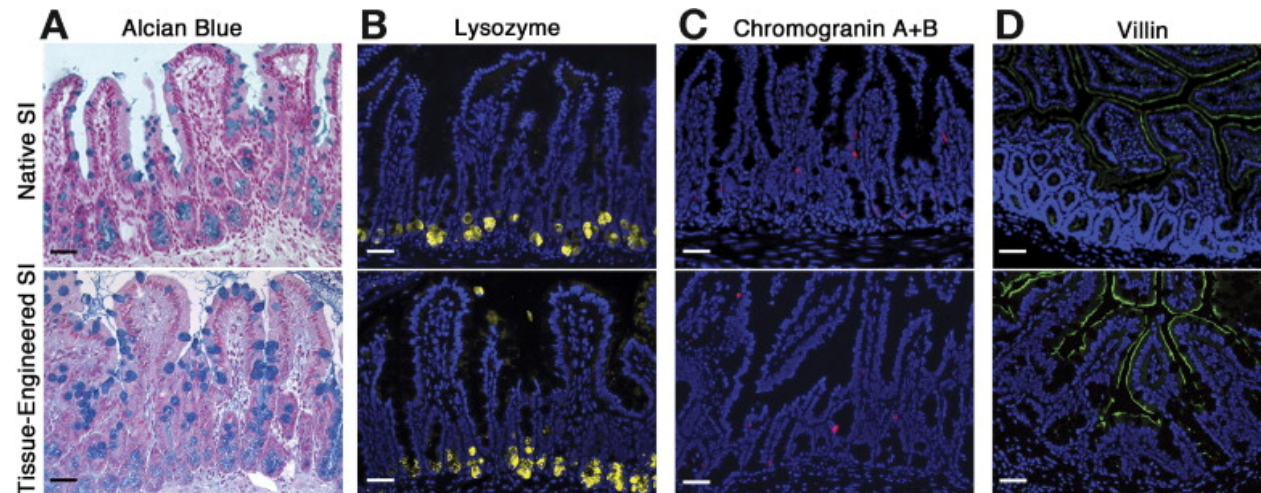
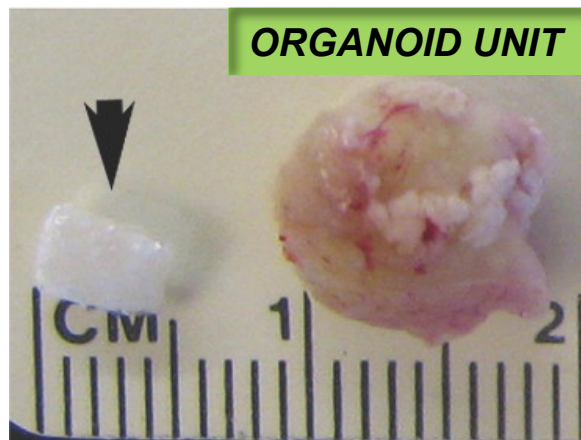


# Guadagnare cm con la bioingegneria tissutale

Markel 2008  
Sala 2011  
Orlando e De Coppi 2012  
Levin 2013  
Schwartz 2013  
Weih 2013  
Spurrier e Grikscheit 2013

Enterociti umani ottenuti da prelievi biotici di piccolo intestino di pazienti affetti da SBS, possono essere seminati su *scaffolds* costituiti da polimeri naturali o sintetici biodegradabili ed impiantati nell'omento di topi adulti ospiti (tipo NOD/SCID irradiati)

**TESI: tissue engineered small intestine**



Sala FG, Matthews JA, Speer AL, et al. A multicellular approach forms a significant amount of tissue-engineered small intestine in the mouse. *Tissue Eng Part A* 2011;17:1841–1850.



# Scaffolds sintetici: caratteristiche

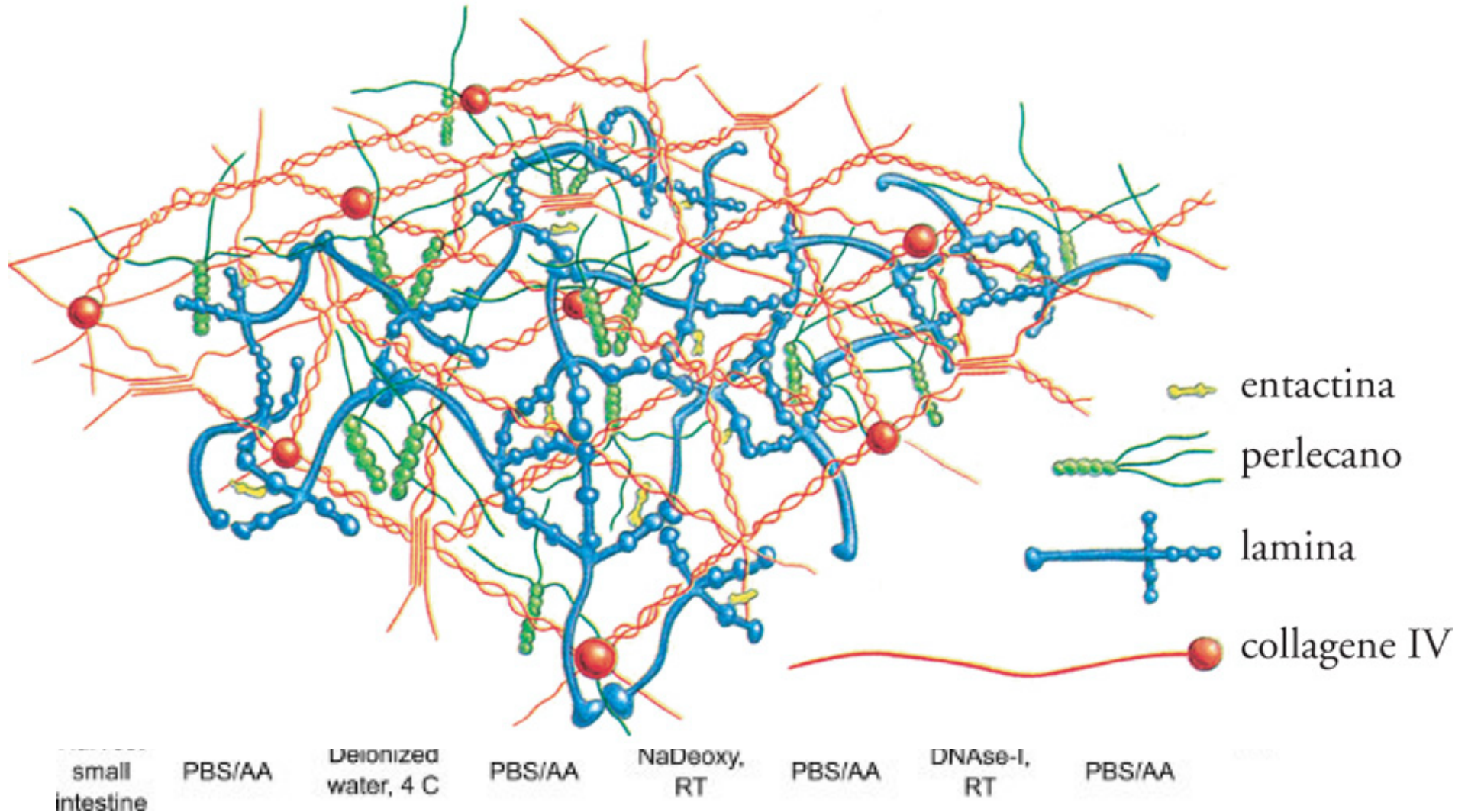
## Materiali comunemente usati:

*acido poli-lattico*  
*acido poli-glicolico*  
*poli- $\epsilon$ -caprolattone*  
*poli-vinil-alcool*

- ✓ Versatili
- ✓ Biodegradabili
- ✓ Elastici
- ✓ Resistenti/suturabili
- ✓ Microporosi
- ✓ Sistema riserva per proteine e GF

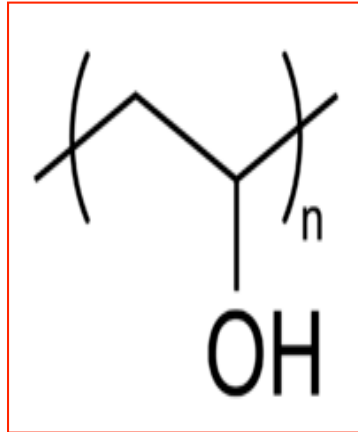


# Scaffold di matrice intestinale decellularizzata



Conconi MT, Coppi PD, et al. Tracheal matrices, obtained by a detergent-enzymatic method, support in vitro the adhesion of chondrocytes and tracheal epithelial cells. *Transpl. Int.* 2005;18(6):727-734.

# Il nostro scaffold sintetico: PVA



Polyvinyl  
alcol

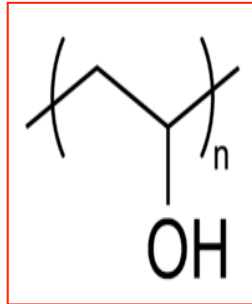


1. *approvato dalla Food and Drug Administration*
2. **innovativo:** 1° utilizzo per sostituzione di intestino
3. *nella sua variante ossidata, mostra degradazione controllata*
4. *capacità di rilascio di fattori di crescita/ differenziazione*
5. *proprietà meccaniche/elasticità adatte alla sostituzione dell'intestino*

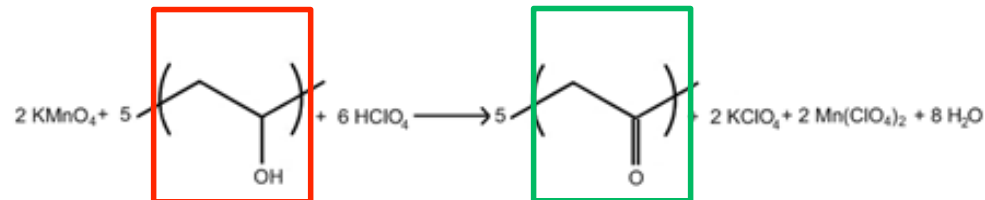
il materiale si presenta in forma di un 3D-idrogel e si presta per essere foggato in forma di scaffolds tubolari o a foglietto



# Il nostro scaffold sintetico: PVA



Polyvinyl  
alcool



Polyvinyl  
alcool

Polyvinyl  
alcool  
OSSIDATO

**Non  
biodegradabile**

**+++ Idrofilico**

**Biodegradabile**

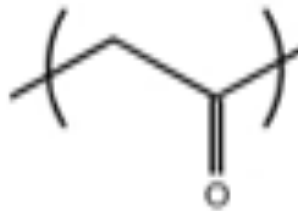
**+ Idrofilico**

**Ossidazione** aumenta la biodegradabilità in quanto facilita i processi di adesione cellulare per formazione di legami covalenti con proteine di adesione (laminina, collagene) e GF



# PVA e MATRICI BIOLOGICHE

Polyvinyl alcohol OSSIDATO

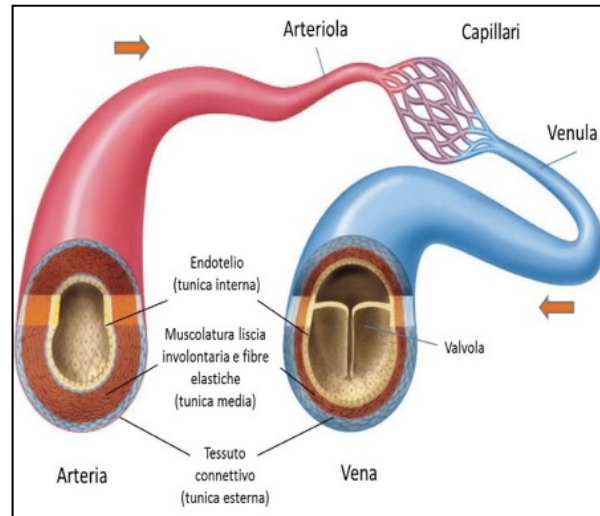


Può essere utilizzato  
*"tailored"*

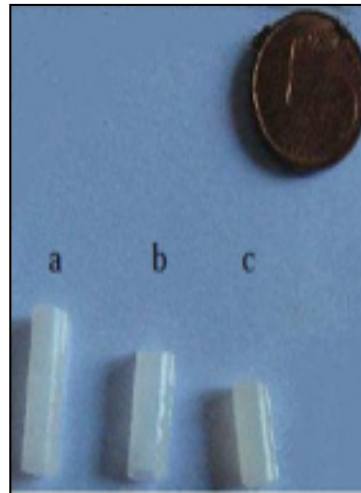
**Come  
matrice  
sintetica**

**In combinazione  
a matrici  
biologiche**

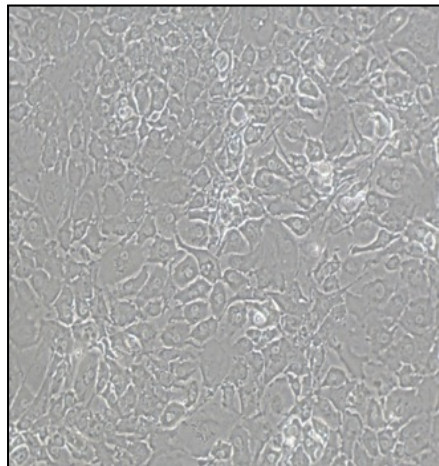
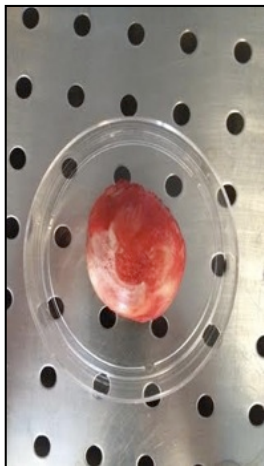
# PVA e RIGENERAZIONE di VASI



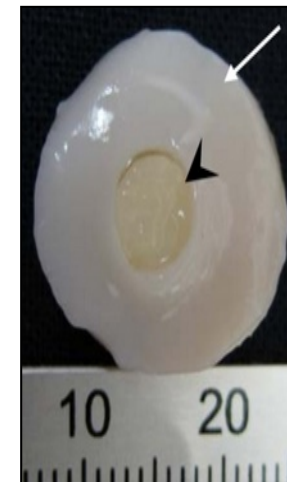
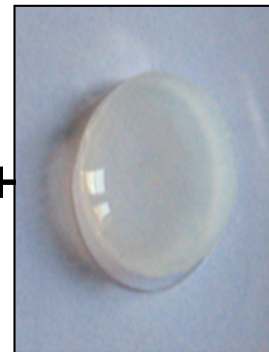
Graft tubulari in PVA nativo di varia dimensione e diverso calibro per la rigenerazione vasale



# PVA e RIGENERAZIONE di CARTILAGINE

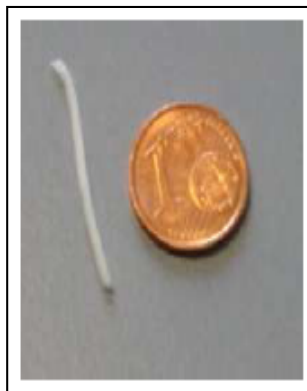
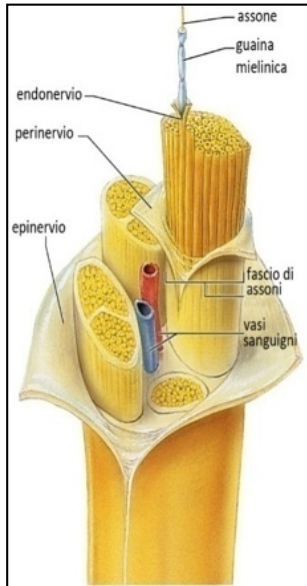


+





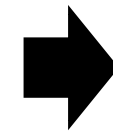
# PVA e RIGENERAZIONE di NERVI PERIFERICI



In figura, graft tubulare di piccolo calibro in PVA nativo per la rigenerazione nervosa

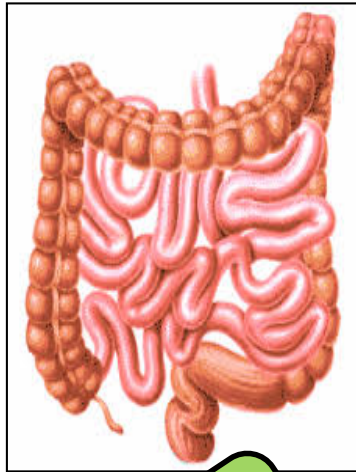


In figura, impianto graft tubulare in PVA di piccolo calibro per la rigenerazione nervosa

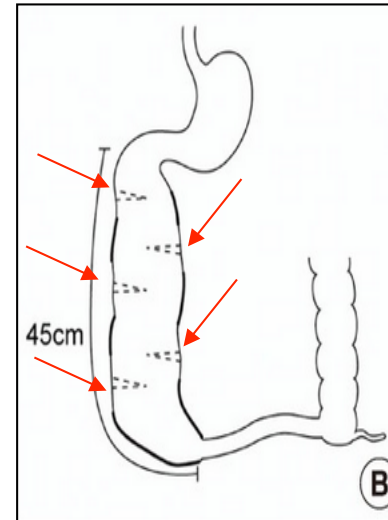
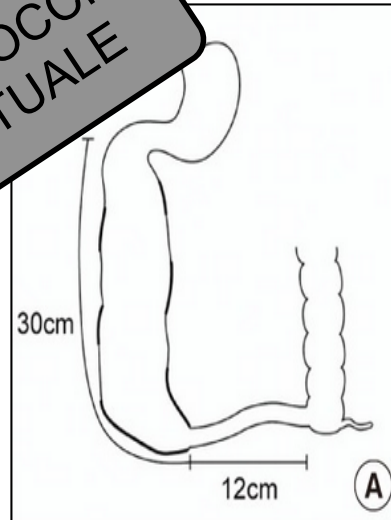


**Sperimentazione  
*in vivo***

# RIGENERAZIONE dell'INTESTINO nella SBS

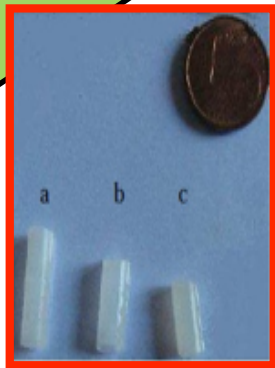


APPROCCIO  
ATTUALE

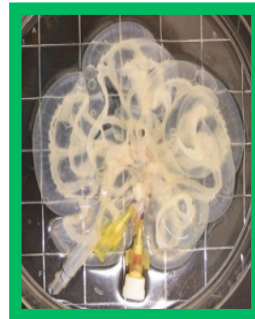
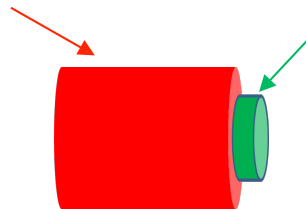


Intestino corto prima (A) e dopo (B) intervento chirurgico tradizionale

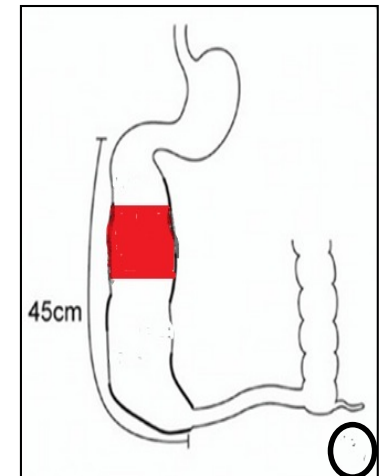
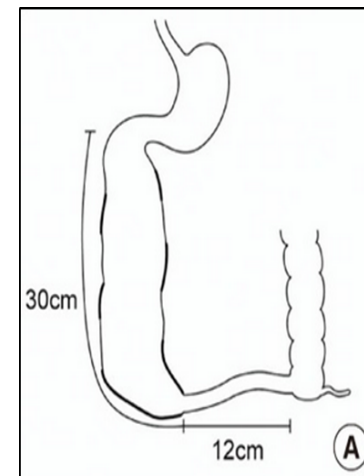
APPROCCIO  
IDEALE



Graft tubulare  
in PVA



Intestino  
DECELLULA  
RIZZATO



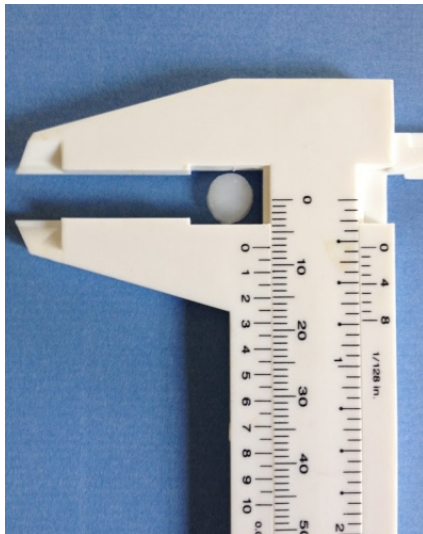
Intestino corto prima (A) e dopo (C) graft



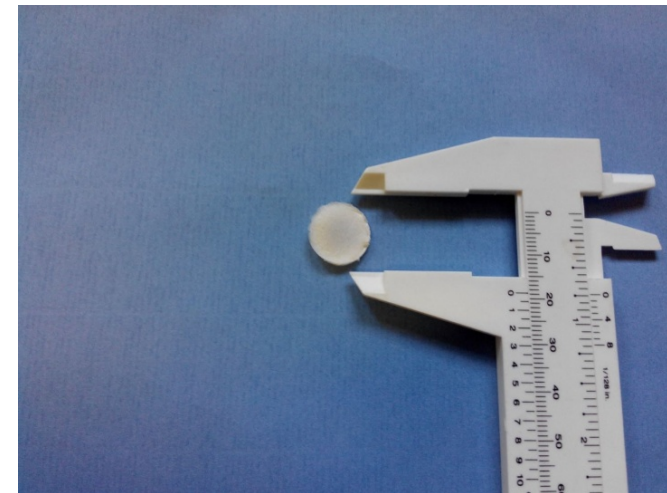
# Cosa abbiamo realizzato fino ad ora?

## ✓ Fase di studio *in vitro*

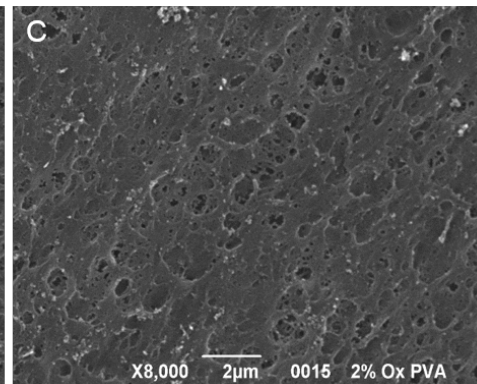
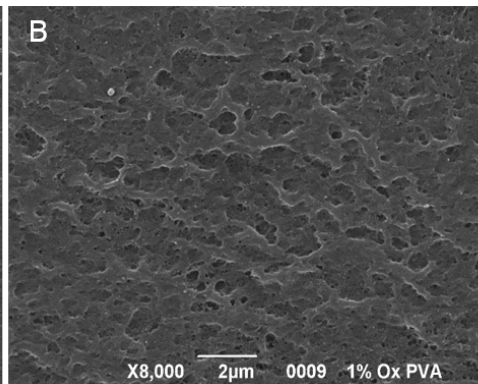
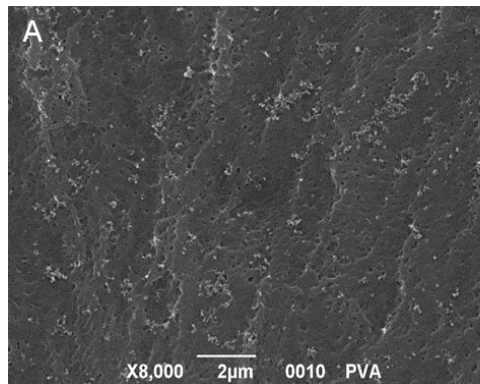
preparazione di 3 tipi di scaffold di PVA: nativo, ossidato all' 1% ed al 2%



**Scaffold**  
(spessore 0.2 cm, diametro 0.8 cm)



## ✓ Caratterizzazione al SEM



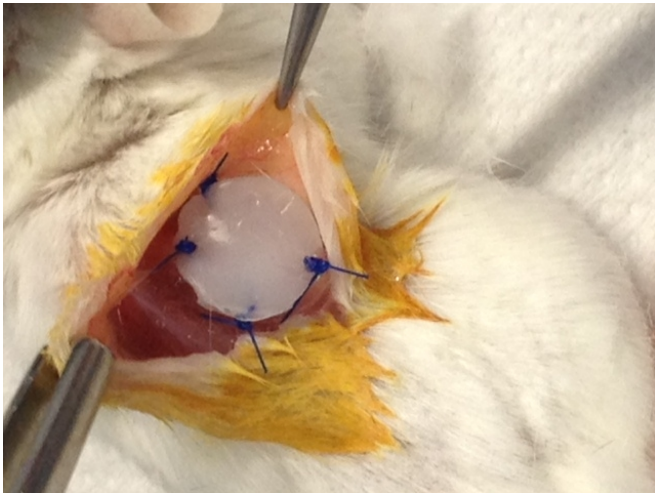
**Porosità**



# Cosa abbiamo realizzato fino ad ora?

## ✓ Prima fase di Studio *in vivo*

- testare biocompatibilità, biodegradabilità e tollerabilità in vivo
- impianto di 3 tipi di *scaffold* (nativo, Ox 1% ed OX 2%) in 12 topi BALB/c



- espianto ad unico *end-point* (12 settimane)



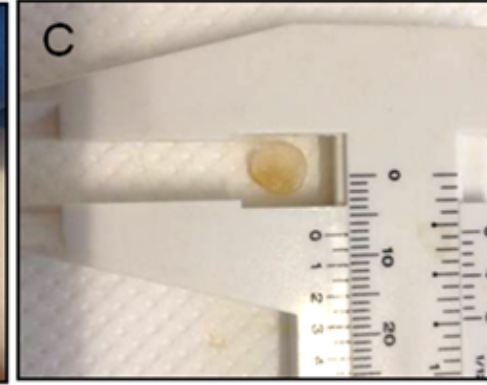
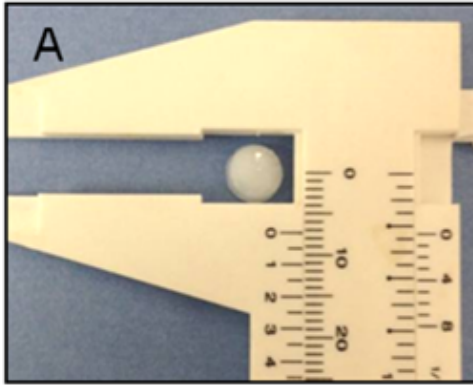
**PVA nativo non mostra alterazioni della struttura né degradazione**



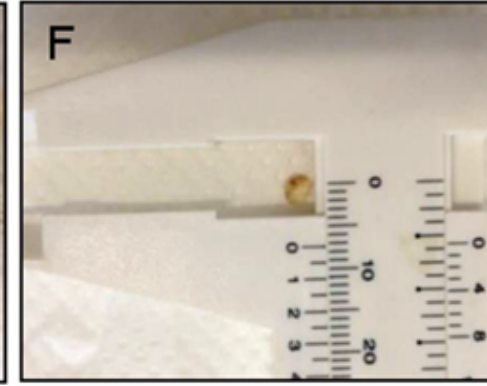
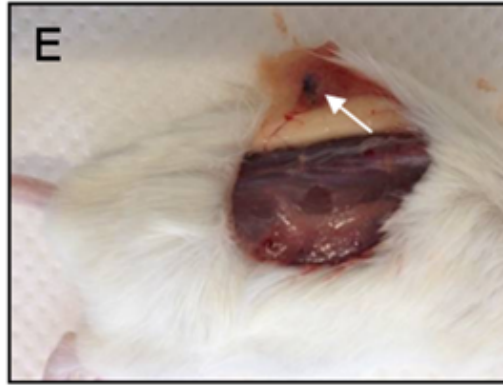
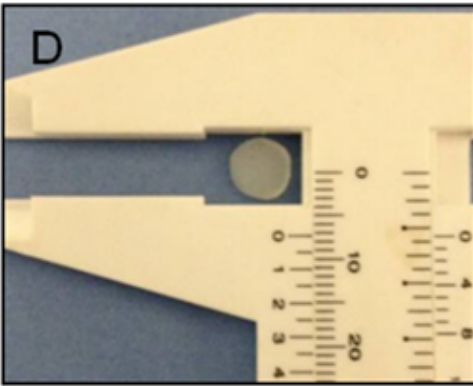
**PVA OX 2% presenta maggior tasso di degradazione**

# Studio *in vivo*

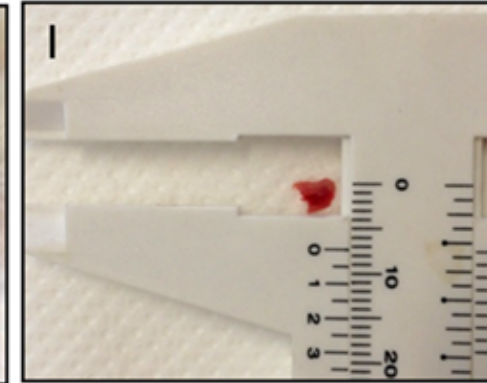
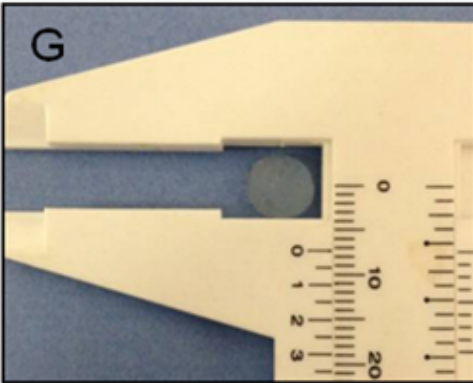
PVA



1% Ox PVA

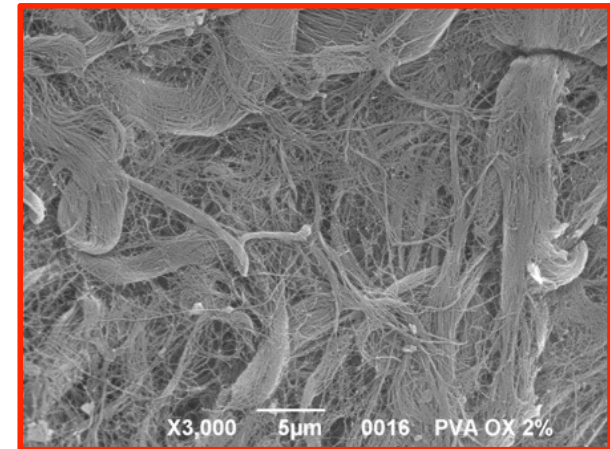
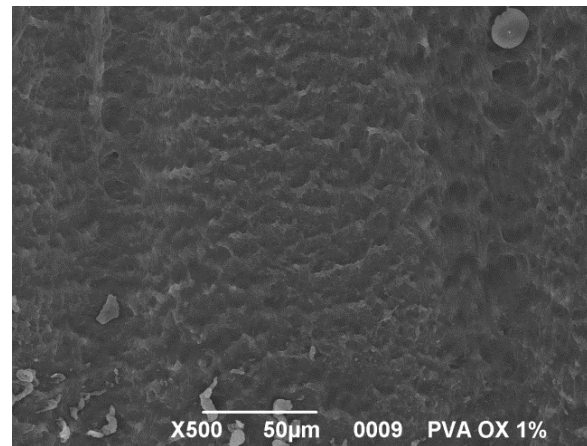
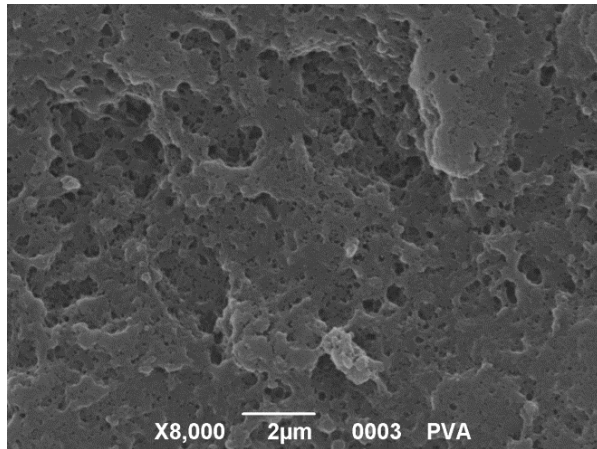


2% Ox PVA





# Caratterizzazione al SEM degli espianti di PVA



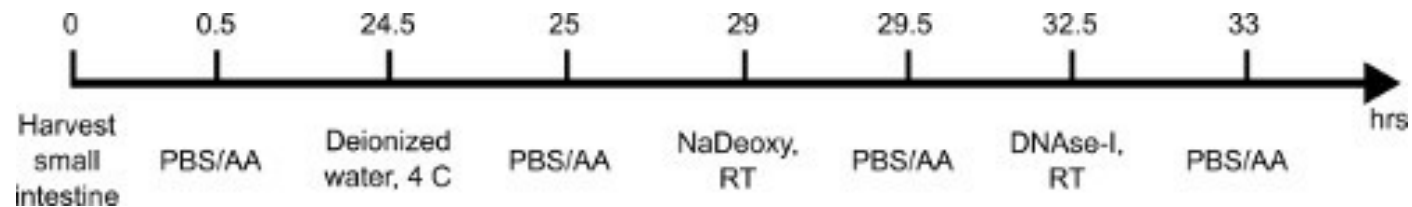
## Biodegradabilità

***L'analisi al SEM mostra che gli scaffold espiantati a 12 settimane, presentano una superficie parzialmente degradata.***

***In particolare gli scaffold di PVA OX 2%, vengono completamente sostituiti da fibre collagene di tipo II e la caratteristica struttura del polimero non risulta più visibile.***



# Realizzazione di matrice intestinale decellularizzata

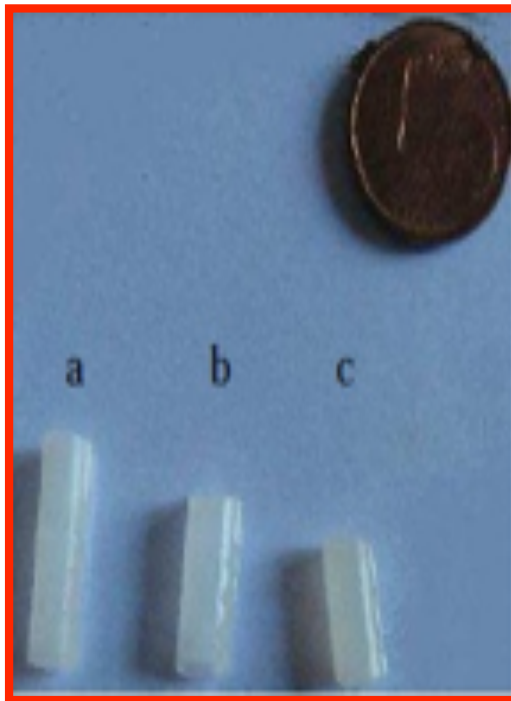


## *Protocollo di decellularizzazione*

Conconi MT, Coppi PD, et al. Tracheal matrices, obtained by a detergent-enzymatic method, support in vitro the adhesion of chondrocytes and tracheal epithelial cells. Transpl. Int. 2005;18(6):727-734.

# Sviluppi futuri

- 1) *Determinazione delle proprietà meccaniche (resistenza, elasticità) del PVA rispetto a quelle dell'intestino nativo*
- 2) *Studio della tubulizzazione del PVA, mediante sutura con colla di fibrina*

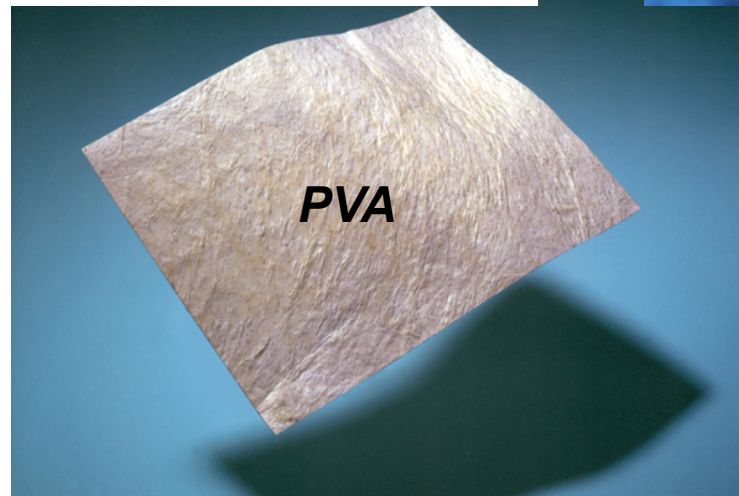
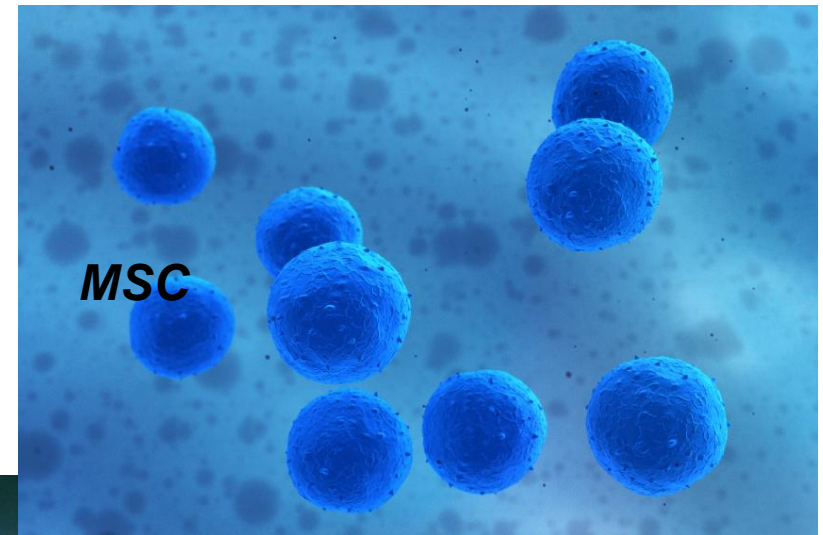
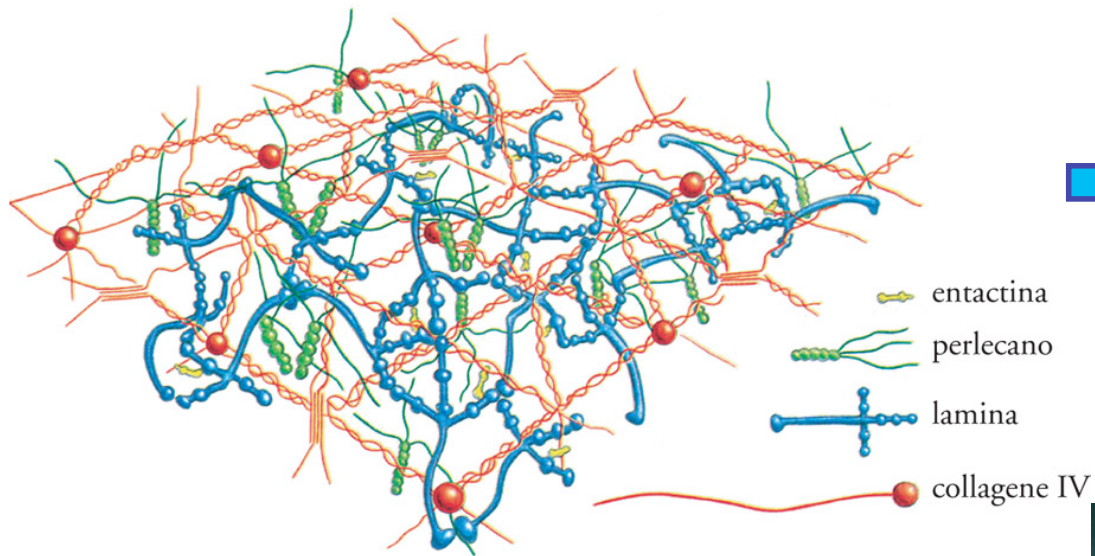


*Graft tubulare in PVA*



# Sviluppi futuri

## 3) Creazione di uno scaffold composito: PVA OX 2% + matrice decellularizzata

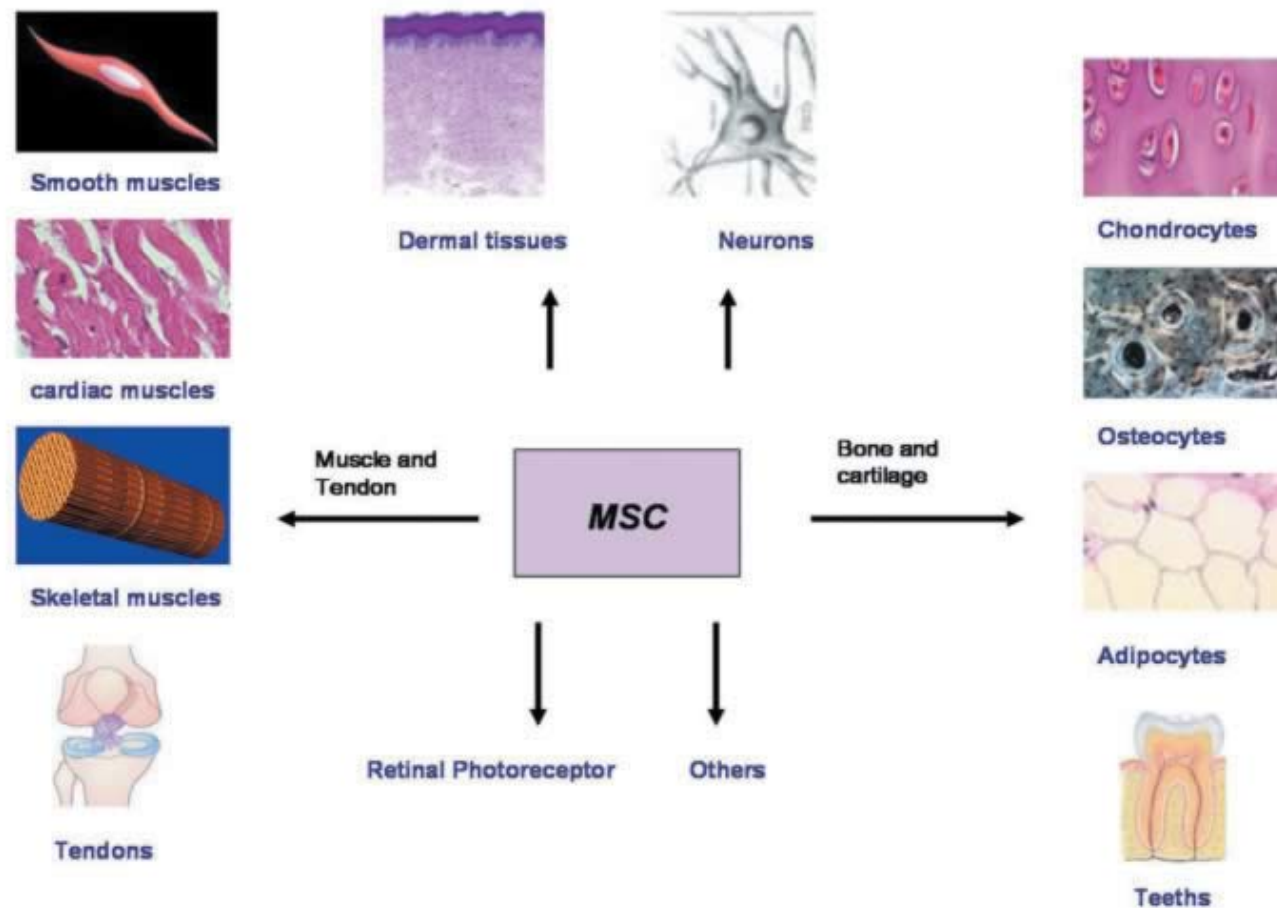




# Sviluppi futuri



- 4) *Isolamento di MSC (staminali mesenchimali) da cordone, da coltivare in terreno differenziativo per enterociti e seminare sullo scaffold composito*



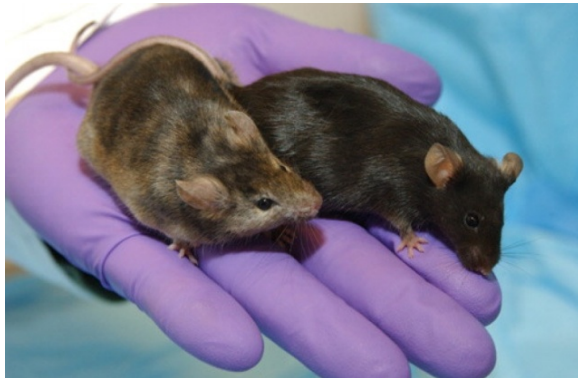
# Affiliations

Si tratta evidentemente di un lavoro multidisciplinare in cui convergono varie competenze e figure.

La collaborazione principale si svolge con:

- il gruppo dei ricercatori di biomateriali del Dipartimento di Scienze del Farmaco

- il gruppo di ricercatori di Biologia Cellulare ed Istologia della Sezione di Anatomia Umana del Dipartimento di Medicina Molecolare







grazie



# “Cosa vuol dire fare sperimentazione animale?”

L'avvio di una ricerca che coinvolga l'utilizzo di animali nelle strutture dell'Ateneo, è sempre subordinato alla verifica dei seguenti aspetti:

- la necessità della ricerca ed il contributo in termini di ricadute positive a lungo termine per la salute dell'uomo, degli altri animali o per l'ambiente (*rilevanza sociale della ricerca*);
- la necessità dell'impiego di animali rispetto a metodi alternativi; se l'impiego di animali è imprescindibile, è necessario che vengano utilizzate specie dotate del minor grado possibile di sviluppo neurologico (*sostituzione/replacement*);
- il rispetto del principio della massima riduzione possibile del numero di animali impiegati mantenendo la previsione di risultati affidabili (*riduzione/reduction*);
- la necessità di perfezionare le procedure ai fini di massimizzare la tutela del benessere degli animali impiegati (*perfezionamento/refinement*)

## Decreto legislativo n. 26 del 4 marzo 2014

entrato in vigore il 29 marzo u.s.

comporta notevoli modifiche e innovazioni rispetto alla normativa prece-dente (D.Lgs. 116/1992).

→ Ai sensi degli artt. 31 e 33 i singoli progetti devono, inoltre, essere trasmessi al Ministero non più dal singolo ricercatore, ma dall' **Organismo Preposto al Benessere Animale (OPBA)**, a cui il D. Lgs attribuisce il compito di esprimere *parere motivato sui progetti di ricerca*.

# Fasi ricerca sperimentale

## **1° anno (marzo 2014-marzo 2015):**

*individuazione di biomateriali naturali o sintetici dotati di caratteristiche, quali biocompatibilità, elasticità, porosità e biodegradabilità per permettere la crescita cellulare in vitro di cellule di linea (enterociti maturi e differenziati).*

*Creazione di matrice ECM decellularizzata da intestino di ratto.*

## **2° anno (marzo 2015-marzo 2016):**

*realizzazione di scaffolds compositi costituiti dai biomateriali individuati nella fase precedente, poi ricoperti di ECM (matrice extracellulare) purificata di intestino tenue di ratto, ottenuta da prelievi biotici.*

*Richiesta al Comitato Etico dell' approvazione per lo svolgimento delle successive fasi di ricerca in vivo.*

## **3° anno (marzo 2016-marzo 2017):**

*realizzazione di inserti tissutali di tali scaffolds in modello animale di intestino corto (ratto) onde verificare anche in vivo la crescita cellulare di enterociti autologhi all' interno dello scaffold e la funzionalità degli scaffolds precedentemente sperimentati nella fase in vitro.*

*Valutazione istologica ed immunoistochimica della rigenerazione tissutale.*

*Possibilità di eseguire impianti tissutali anche nel topo "nudo" (es. NOD /SCID).*