

“TissueEngineering” in urologia. Stato dell’arte ed esperienza personale.

Andrea Fandella, *Sergio De Angeli, *Laura del Pup

Divisione Urologia Treviso Italia,

Laboratorio di Colture Cellulari – Centro ImmunoTrasfusionale, Ospedale Regionale di Treviso - Italia

“Così il Signore Iddio procurò all’uomo un profondo sonno, e mentre dormiva, prese parte di una costola dell’uomo e chiuse la ferita con carne. Poi il Signore Iddio dalla parte che aveva estratto dall’uomo creò la donna, ed Egli la portò all’uomo. (Genesis 2:21)”. Questo brano della Bibbia delinea alcuni aspetti della moderna Medicina: viene effettuata l’anestesia, la successiva chirurgia, viene attuata una clonazione e successivamente una pratica di “tissue engineering”. Con questa citazione, di cui siamo debitori ad Antony Atala (1), può essere sottolineato come il concetto di ingegneria tissutale è insito nella storia dell’uomo, anche se solo oggi, vengono manifestate appieno le possibilità di questa metodica. Nella definizione di “Tissue Engineering” viene precisato che si tratta di un campo interdisciplinare che applica i principi della biologia e della ingegneria nello sviluppo di sostituti biologici destinati a mantenere, restaurare o migliorare le funzioni dei tessuti e degli organi vitali. Si tratta di una tecnica in cui il tessuto “donatore” viene dissociato nelle singole cellule che possono essere impiantate direttamente nell’ospite o meglio espanse in coltura, attaccate a una matrice di supporto, e re-impiantate dopo la coltivazione. Il tessuto utilizzato deve essere “preferibilmente” autologo per evitare fenomeni di rigetto, quindi viene ottenuto per biopsia dal paziente da trattare e reimpiantato nello stesso. I progressi in questa disciplina sono stati enormi, solo 10 anni fa era difficile ottenere e mantenere per più di qualche settimana cellule uroteliali in vitro, oggi queste metodiche non sono più solo da considerarsi sperimentali, ma sono state ottenute applicazioni cliniche pratiche e stati effettuate interventi chirurgici anche nell’uomo nel campo della patologia urologica. La storia sperimentale del “tissue engineering” è sicuramente più antica, ma le prime applicazioni urologiche pratiche nell’uomo sono state effettuate nel 1990 a Genova. L’iniziativa, pionieristica, ma impeccabilmente efficace, del gruppo di Genova è stata incentrata sulla ricostruzione dell’uretra nei pazienti pediatrici con ipospadia. In questa città all’inizio degli anni 90 grazie alla collaborazione di un gruppo di biologi e di operatori della Clinica di Chirurgia Pediatrica si è avuta l’intuizione per la prima volta al mondo, di utilizzare le stesse cellule uretrali del paziente con una ipospadia complessa coltivate in vitro per ottenere la ricostruzione dell’uretra. Nel primo modello di lavoro la crescita tissutale avveniva in parte in vivo sulla parte distale del letto uretrale che poi veniva tubulizzata. Furono così operati 2 pazienti che però svilupparono delle fistole uretrocutanee (2). La metodica fu perciò perfezionata e l’uretroplastica ingegnerizzata fu effettuata dopo una fase di completa coltura in vitro, tubulizzando il segmento prima dell’impianto su un tubo di teflon che veniva rimosso dopo 20 giorni, furono così operati 8 pazienti, tutti svilupparono stenosi del neo meato uretrale, trattate con dilatazione, ed 1 una fistola uretro-cutanea (3). Purtroppo l’esperienza genovese fu interrotta per motivi dovuti alla mancanza di permessi legislativi, negati dopo l’azione di protesta del paziente in cui si era sviluppata una fistola uretrale. L’esperienza genovese permise di dimostrare come l’ingegneria tissutale in campo urologico presentasse numerosi vantaggi non solo teorici ma specialmente pratici rispetto all’utilizzo delle metodiche tradizionali di uretroplastica.

La seconda efficace applicazione delle metodiche di "tissue engineering" nell'uomo è stata rappresentata dal rinforzo o dalla sostituzione dei meccanismi sfinteriali. Per prima è stata effettuata l'iniezione di condrociti (ottenuti dall'orecchio del paziente e coltivati in un idrogel di alginato) sotto l'ostio ureterale come tecnica antireflusso (4-Atala e Coll. J Urol 150: 745 1993) poi la stessa tecnica è stata con successo applicata per il deficit sfinterico nell'incontinenza urinaria (5 Cilento e Atala Dialogues Pediatr Urol 18: 11 1995), le procedure sono state effettuate con successo e oggi si pongono in alternativa ai vari agenti iniettivi.

Nel campo della ricostruzione vescicale le esperienze sono iniziate con la cistoplastica di ampliamento prima nell'animale da esperimento e poi nell'uomo, utilizzando tecniche di ricostruzione in vitro su uno scheletro di sottomucosa vescicale purificata (6 - Yoo e Coll. Urology 51: 221 1998)

Per quanto riguarda la più completa sostituzione vescicale per il momento è segnalata in Letteratura la possibilità dell' "engineering" di una vescica funzionante nel cane, questa è stata ottenuta partendo da urotelio e muscolo liscio detrusoriale coltivato su una struttura polimerica sferica, la vescica ingegnerizzata è stata impiantata e, dopo il periodo di adattamento, risultò normale alle varie indagini, sia nelle sue proprietà funzionali elastiche di serbatoio a bassa pressione, e persino nell'istologia (7 - Oberpenning e Coll. Nat Biotechnol 17: 149- 155 1999).

Le possibilità dell'ingegneria tissutale si estendono anche alla ricostruzione del pene. Questa è stata dimostrata possibile grazie alla coltura di tessuto muscolare liscio proveniente dal corpo cavernoso dell'uomo (8 -J. Urol 159: 156 1998).

Una ricostruzione funzionale è stata eseguita con risultati brillanti utilizzando la cartilagine come tessuto portante, la ricostruzione del pene con la cartilagine è stata effettuata con pieno successo nel topo, gli animali sottoposti all'intervento erano infatti in grado di accoppiarsi naturalmente con possibilità di procreazione (9 -J. Urol 162: 1119 1999).

L'ingegneria tissutale si è anche cimentata nella terapia insufficienza renale attraverso le prime coltivazioni in vitro di cellule renali su supporti biodegradabili (10 - Atala e Coll. J Urol 153: 4 1995).

Da qui lo sviluppo di un tubulo renale bioartificiale per il trattamento della insufficienza renale acuta (11- Nikolovski e Coll J Am Soc Nephrol 7: 1376 1996), quindi una apparecchiatura di emodialisi biologica, per il momento esterna e utilizzabile solo per poche sedute ma che apre molte e solide prospettive di sviluppi futuri.

Il campo delle applicazioni sul rene è più vasto di questo, sono state effettuate sperimentazioni in cui effettuare la prevenzione o la cura delle malattie renali ereditarie con terapia genica applicata a colture cellulari. Sappiamo che il principale ostacolo all'applicazione delle metodiche di terapia genica è rappresentato dalla difficoltà di veicolare in vivo l'informazione genetica corretta. In vitro con una popolazione selezionata di cellule l'introduzione dell'acido nucleico contenente il DNA corretto è più agevole e le cellule, autologhe, dopo l'acquisizione del genoma giusto possono essere reimpiantate con semplice iniezione (12- Yoo e Coll J Urol 162: 1115 1999)

Infine sono state dimostrate efficaci alcune applicazioni nel settore endocrinologico della nostra specialità. Nel caso infatti di deficit androgenico sono state impiantate con successo delle cellule di Leydig incapsulate in alginato/ poly-l-lisina. Queste microsfeere di alginato solo capaci di secernere testosterone in vivo ed in vitro (13 - Chang : Eur J Pharm Biopharm 45: 3 1998).

Il campo di sviluppo più affascinante è rappresentato dalla ricostruzione vescicale ed è qui che le possibilità dell'ingegneria tissutale sono potenzialmente più necessarie.

La sostituzione vescicale dopo cistectomia viene effettuata mediante l'utilizzo di segmenti gastrointestinali, questo ha comportato l'insorgenza di alcuni conosciuti inconvenienti quali i ben noti disturbi metabolici (ipokaliemia, ipocalcemia, acidosi, ipovitaminosi), l'insorgenza di infezioni, di urolitiasi, la possibilità di iperproduzione di muco con ritenzione, problemi di serbatoio (incontinenza – ipercontinenza) ed infine lo sviluppo neoplasie secondarie.

Da qui la ricerca di migliori alternative per la sostituzione vescicale quindi l'utilizzo di materiali naturali come i graft fascio muscolari, la fascia muscolare, l'epitelio di varia origine, la sottomucosa vescicale, l'omento, la dura madre, il peritoneo, la placenta ed infine la sottomucosa intestinale. E di materiali sintetici quali le spugne di polivinile, il teflon (tetrafluoroetilene), le spugne di gelatina, la matrice di collagene, le matrici di Vicryl, la carta resinata, il silicone.

L'esperienza clinico biologica della sostituzione vescicale con i materiali sopraelencati è stata fallimentare. Le cause sono state: per il materiale naturale, degradabile, comparsa ed accumulo anormale di fibroblasti con fenomeni di cicatrizzazione che hanno comportato la contrattura del graft con conseguente riduzione progressiva del volume del serbatoio nel tempo.

Il materiale permanente ha sempre manifestato fenomeni di cedimento meccanico con possibilità di formazione di calcoli, comunque si manifestano sempre fenomeni di pseudo rigetto dovuti a mancanza biocompatibilità.

Quando si pensi ad un sostituto della vescica bisogna tenere presente che la vescica possiede specifiche proprietà elastiche di compliance difficilmente riproducibili. L'ingegneria tissutale utilizzando le cellule dello stesso organo con la qualità omologa riproduce più fedelmente il modello naturale di qualsiasi sostituto oggi conosciuto.

Nell'attuare le metodiche di ingegneria tissutale vanno seguiti scrupolosamente alcuni "principi basilari" che prevedono di eseguire una fase di espansione cellulare e la scelta di un coerente veicolo di sostegno cellulare.

La fase di espansione cellulare oggi è ben codificata, il tessuto si ottiene mediante l'acquisizione di un frammento bioptico, da questo le cellule uroteliali possono replicarsi fino a ottenere l'estensione voluta in poche settimane (4202 m² in 8 settimane)

Analogamente cellule di muscolo liscio detrusoriale possono essere trattate nello stesso modo (14 -Cilento e Coll J.Urol 152: 655 1994, 15 Prost e Coll Br J Urol 79: 505 1997 , 16 -Fauza e Coll. J Pediatr Surg 33: 7 1998)

Il perno basilare è rappresentato dai veicoli di sostegno cellulare (Cell Delivery Vehicles), in teoria qualsiasi struttura che rispetti la cosiddetta "Legge" di Judah Folkman:

"Cellule o tessuti non possono essere impiantati in volumi più grandi di 3 mm³"

Infatti è stato ampiamente dimostrato come la nutrizione e gli scambi di gas siano limitati da questa massima distanza di diffusione, se si supera questo limite solo le cellule superficiali sopravvivono e si manifesterà necrosi diffusa per mancanza di vascolarizzazione. (17 -Folkman e Hochberg J Exp Med 138: 745 1973)

La natura risolve il problema della diffusione dei nutrienti nei volumi organici con "la ramificazione" che permette la diffusione dei nutrienti, così per ottenere un successo nel trapiantare un largo volume di cellule dovremo imitare la natura utilizzando un veicolo di sostegno cellulare che dovrà essere disegnato con un pattern di ramificazioni che permetta alle cellule di attecchire ai "rami", consentendo poi l'infiltrazione

capillare negli spazi interstiziali dopo l'impianto in vivo. (18-Atala A: Tissue Engineering in the genitourinary system in Atala A, Mooney D (eds) Tissue Engineering. Birkhauser Boston p 149).

Quindi andranno utilizzate strutture stereotassicamente molto ramificate che vengano a costituire l'interstizio e servano di supporto alle cellule.

I polimeri riassorbibili biodegradabili sono preferibili evitando le complicanze dei prodotti permanenti come Teflon e Silicone (infezioni – calcificazioni – sfavorevoli reazioni del connettivo).

Utilizzati i polimeri dell'acido poliglicolico o da soli o con co-polimeri di acido poli-L-lattico o di poli-DL-lattide-coglicolide che sono compatibili e processabili, la degradazione avviene per idrolisi, la struttura di sostegno viene quindi sostituita dal prodotto interstiziale naturale. Il tempo di permanenza del tessuto di supporto può essere programmato, infatti, la degradazione può essere modulata, in un tempo che può variare da poche settimane a circa un anno, modificando la struttura polimerica e la percentuale delle componenti presenti. (19-Atala e Coll J Urol 48: 658 1992).

Al posto dei polimeri biodegradabili artificiali si possono utilizzare anche materiali biologici come la struttura collagene della sottomucosa intestinale o vescicale, comunque anche questi materiali saranno biodegradati e sostituiti da collagene naturale in vivo (20- Yoo e Coll J Urol 51:221 1998).

Anche le matrici biodegradabili naturali come le artificiali possono essere modificate secondo la loro applicazione in una varietà di forme e strutture con diversi livelli di rigidità ed elasticità e differenti tempi di degradazione.

Una volta decisa quale struttura di sostegno utilizzare nello specifico paziente, su questi polimeri possono essere seminati contemporaneamente o a tempi diversi cellule uroteliali e cellule detrusoriali.

Una fondamentale sperimentazione del gruppo di Atala, pubblicato del 1993, ha dimostrato come le cellule impiantate sul polimero ramificato si orientano correttamente da un punto di vista spaziale con l'urotelio disposto in multistrato da una parte e ben definiti strati muscolari dall'altra con mantenimento di normale istomorfologia. Atala e Collaboratori hanno coltivato le cellule uroteliali e quelle detrusoriali in vitro sul polimero e poi hanno trapiantato questa struttura nel dorso di topi atimici, il successivo controllo istomorfologico ha evidenziato una struttura istologica sorprendentemente simile a quella vescicale naturale (21 - Atala e Coll J Urol 150 : 608 1993).

Il ruolo che ha avuto questa sperimentazione nel campo della "tissue engineering" è stata quella di una pietra miliare, infatti, si è trattato della prima dimostrazione di come si potessero creare strutture complesse (organi) composte di più tipi cellulari, prima si era convinti che le culture d'organo fossero impossibili da ottenere con le metodiche di coltura disponibili e ci si dovesse limitare a coltivare solo monostrati a singolo tipo cellulare.

Il percorso sperimentale verso la sostituzione della vescica con metodiche di bio ingegneria è proseguito con l'approntamento di cistoplastiche d'ampliamento nel cane. Lo studio è stato condotto in questo modo: 10 cani sono stati sottoposti a cistectomia parziale con abolizione del 50% della vescica. Le vesciche così ridotte erano studiate radiologicamente e urodinamicamente.

In 5 casi l'urotelio ed il detrusore sono stati coltivati, seminati su sottomucosa vescicale allogenica e alla maturazione della crescita veniva effettuata la cistoplastica di ampliamento. Gli altri 5 venivano sottoposti a cistoplastica utilizzando la stessa superficie di ampliamento ma costituita dalla sola sottomucosa vescicale allogenica.

I risultati venivano analizzati radiologicamente, urodinamicamente ed infine istologicamente.

Le vesciche ricostruite con le cellule coltivate avevano una capacità incrementata del 99% contro una del 30% in quelle ricostruite con semplice matrice acellulare.

Istologicamente le strutture bio ingegnerizzate erano simili alle naturali con un marcato incremento della componente muscolare.

I graft acellulari erano stati colonizzati adeguatamente dall'urotelio ma erano carenti di tessuto muscolare. Erano presenti fenomeni di contrattura e infiammazione.

La base scientifica della necessità di utilizzo delle strutture bio-ingegnerizzate sta nella guida del processo di ripresa della funzione dell'organo da parte delle cellule coltivate in vitro. Gli Autori, infatti, ipotizzano che la costruzione di una struttura tridimensionale in vitro prima dell'impianto provvederà a facilitare la definitiva differenziazione delle cellule dopo l'impianto e minimizzerà la risposta infiammatoria contro la matrice evitando i fenomeni di contrattura e cicatrizzazione. (22-Yoo e Coll Urology 51: 221 1998, 23 -Atala J Urol 159: 1998)

Le sperimentazioni sono proseguite con una sostituzione vescicale più radicale. Nello studio successivo 14 cani sono stati sottoposti a cistectomia sopratrigonale, in 2 di questi è stata effettuata poi una chiusura immediata del trigono, in 6 la vescica è stata ricostruita con una struttura polimerica acellulare, in 6 utilizzando lo stesso tipo di polimero ma bioingegnerizzato con cellule uroteliali e detrusoriale.

Anche in questo caso i risultati erano analizzati a sei mesi dalla chirurgia, radiologicamente, urodinamicamente ed infine istologicamente.

Per quanto riguarda i parametri presi in considerazione la capacità delle vesciche sottoposte a chiusura sopratrigonale è risultata del 22%, le vesciche polimeriche una capacità 46% e quelle bioingegnerizzate una capacità del 95%.

La compliance è risultata rispettivamente del 10%, del 42% ed infine del 106% per le vesciche coltivate in vitro.

Istologicamente, a distanza di 6 mesi dall'intervento, nelle vesciche ottenute dal polimero acellulare era possibile il riscontro di urotelio normale ma lo strato muscolo era poco rappresentato con componente sottomucosa ispessita ed anelastica. Viceversa l'istologia e l'immunoistochimica del tessuto bio ingegnerizzato era perfettamente normale (24-Atala: Urol Clin North Am 26: 235 1999)

NOSTRE ESPERIENZE

Le nostre ricerche sulla crescita in vitro dei tessuti urologici sono iniziati nel 1988 con lo studio del Tumor Colony Assay nei tumori uroteliali, si sono concentrati nell'eziopatogenesi dell'iperplasia prostatica benigna negli anni '90 (De Angeli et al., 1994; De Angeli et al. 1995; De Angeli et al., 1997), e sono tornati parallelamente all'urotelio dal '97 per studi di "uptake" dei chemioterapici topici nei tumori e nelle cellule normali (De Angeli et al., 1997).

Dal '99, grazie al Progetto di Ricerca Sanitaria Finalizzata n° 844/02/1999 finanziato della Regione Veneto, abbiamo sviluppato alcune tecniche per la costruzione in vitro di strutture (neo-vesciche) che riproducono, anche se in forma semplificata, l'organizzazione della mucosa e sottomucosa della parete vescicale umana neoplastica e normale. Obiettivo di tali studi era l'ottimizzazione di come modello sperimentale tridimensionale per lo sviluppo di nuovi farmaci fotodinamici e per il "tissue engineering" della vescica umana. Le tecniche proposte prevedono la coltura di cellule uroteliali e stromali su "scaffold" di tipo sintetico (filtri di tipo dialitico, di acetato di cellulosa e di PTFE, tessuti di Prolene, Vicryl, Mersilene e Dexon) e di tipo

biologico quali le matrici tridimensionali di collagene (Fujiyama et al., 1995) ed i gel piastrino-fibrinico (Landesberg et al., 2000).

ISOLAMENTO DELLE LINEE

Quale fase preliminare di questo progetto si è proceduto all'allestimento di linee uroteliali umane mediante la tecnica dell'espianto primario descritta da Freshney (1987). Sono stati poste in coltura primaria 23 biopsie neoplastiche e 10 frammenti biotici di mucosa uroteliale normale. Il rate di attecchimento in coltura primaria dei campioni neoplastici è stato di 15 su 23, quello dei campioni normali di 5 su 10. Le colture secondarie sono state stabilizzate mediante Green Medium (Green, 1980), Reznikoff Medium (Reznikoff et al. 1987) o KGM-2 Medium. Alcune linee di origine sia neoplastica che normale sono state clonate mediante la tecnica della diluizione limite. Tutte le linee uroteliali allestite, prima del loro impiego, sono state sottoposte a caratterizzazione genotipica e fenotipica.

CARATTERIZZAZIONE GENOTIPICA

I risultati delle indagini citogenetiche condotte con la tecnica del G banding (Freshney, 1987) hanno mostrato in ciascuna linea peculiari modificazioni della normale morfologia dei singoli cromosomi e del loro numero, con assunzione di cariotipi aneuploidi/poliploidi.

CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA

La caratterizzazione fenotipica è stata condotta con metodi immunocitochimici. Le cellule sono state coltivate per 72h in DMEM/F-12 completo, citocentrifugate e fissate con una soluzione 1:1 di acetone-metanolo. La colorazione dei preparati è stata eseguita mediante la tecnica della immuno-perossidasi (IP) in accordo con Making et al. (1984). Gli anticorpi monoclonali primari usati e le loro diluizioni ottimali sono riportati in Tabella I. Come anticorpo secondario è stato impiegato il kit di marcatura avidina/biotina Large Volume DAKO LSAB+Kit, Peroxidase (Dako). Per tutti gli anticorpi primari utilizzati sono stati eseguiti controlli positivi su sezioni di tessuto vescicale. I controlli negativi senza anticorpi primari (blanks) sono stati eseguiti su preparati delle stesse cellule in esame per verificare la disattivazione delle perossidasi endogene e per controllare il grado di specificità dell'anticorpo secondario. I preparati sono stati definiti omogenei, eterogenei e con rare cellule positive quando il numero di cellule positive era rispettivamente del 80-100%, 20-80% ed inferiore al 20%. L'intensità della positività è stata valutata assegnando uno score compreso tra 1+ e 3+ alle sole cellule colorate. I risultati di questo studio evidenziano che tutte le linee isolate dalle biopsie neoplastiche sono citocheratina 7+. Quattro linee sono positive anche alla citocheratina 10+, mentre altre due sono positive all'anticorpo anti citocheratina 8+18+19+. Tutte le linee, inoltre, sono caratterizzate dalla presenza di rare cellule positive per l' α -actina e tre anche per un ridotto numero di elementi prolina-4-idrossilasi positivi. Infine, due linee neoplastiche sono positive per la cheratina umana. Le linee isolate dai frammenti biotici di mucosa sana esprimono tutte la citocheratina 10; tre sono positive all'anticorpo anti citocheratina 8+18+19+, mentre la citocheratina 7 è espressa in una sola. Incostante è anche la positività all'anticorpo 5+6+18+ (2 linee su 5) e l'espressione della prolina-4-idrossilasi (2 linee su 5), mentre in un numero esiguo di cellule di tutte le linee è presente l' α -actina. Questi risultati, pertanto, sono in accordo con le osservazioni di Rheinwald ed O'Connell (1985) e di Liebert et al. (1993).

TECNICA COSTRUTTIVA SU SCAFFOLD SINTETICI

Per l'allestimento delle neo strutture vescicali su scaffold sintetici sono stati utilizzati filtri di acetato di cellulosa da 47 mm di diametro (Nalgene), filtri da dialisi Cuprophan MP185, AN69 MP185 e B3 da 35 mm di diametro e reti protesiche di Vicryl, Mersilene, Prolene, Vicryl/Mersilene, Dexon e Ercylene. Sia i filtri che le reti di tessuto protesico sono stati preliminarmente sottoposti a screening per verificare le loro capacità di favorire l'attecchimento e la proliferazione cellulare delle linee uroteliali e stromali studiate.

Per i filtri sono stati adottati i seguenti modelli sperimentali:

- **Mod. A1:** i filtri sono stati posti a diretto contatto con la superficie del recipiente di coltura saldandone i margini mediante una soluzione di Agar in terreno Ham's F12. Le aliquote di cellule uroteliali e stromali sono state seminate su ogni singolo filtro ed incubate per 72h prima di essere sottoposte ad indagini per determinare l'attecchimento e la crescita delle cellule.
- **Mod. A2:** i filtri sono stati posti a contatto di un feeder layer costituito da Agar in terreno Ham's F12 saldandone i margini con la stessa soluzione. Si è proceduto, quindi, alla coltura delle cellule uroteliali e stromali come descritto per il Mod. A1.
- **Mod. A3:** i filtri sono stati posti a contatto di un feeder layer costituito da Agar in terreno Ham's F12 contenente aliquote cellulari delle linee stromali. I margini dei filtri sono stati saldati al feeder layer con la soluzione di Agar sopra descritta. Le cellule uroteliali sono state seminate sulla superficie superiore del filtro. Si è proceduto, quindi, alla coltura come descritto per il Mod. A1.
- **Mod. A4:** i filtri sono stati saldati su un feeder layer di Agar in terreno Ham's F12. Su ciascun filtro si è proceduto alla semina delle sole cellule stromali come descritto per il Mod. A1. Al termine delle 72h di coltura i filtri venivano staccati dal feeder layer, rimontati capovolti su nuovo feeder layer, seminati con cellule uroteliali e coltivati per altre 72h.

Le indagini per determinare l'attecchimento e la crescita delle cellule sono state condotte mediante osservazione in microscopia ottica ed elettronica a scansione. La determinazione dell'attecchimento e del rate di crescita è stata eseguita mediante valutazione semi-quantitativa definendo l'attecchimento come elevato, buono e scarso quando il numero di cellule aderenti al substrato era rispettivamente del 80-100%, 20-80% ed inferiore al 20%. Il rate di crescita è stato valutato assegnando uno score compreso tra 1+ e 3+ al grado di sub-confluenza delle cellule in monostrato.

Le reti di tessuto protesico sono state sottoposte a screening ritagliando da queste patch tissutali delle dimensioni di circa 25x25 mm che venivano posti a diretto contatto con la superficie di una capsula Petri da 90 mm di diametro, saldandone i margini mediante una soluzione di Agar in terreno Ham's F12. Su tali patch venivano seminate le cellule uroteliali e stromali risospese in terreno completo addizionato a collagene G. Dopo 72h di incubazione, le colture venivano esaminate a fresco in microscopia ottica per determinare il grado di crescita.

Lo screening per accertare la capacità dei differenti tipi di filtro di far attecchire e crescere sulla propria superficie le linee uroteliali e stromali è stato eseguito con i modelli sperimentali A1 ed A2. Il modello A3 è stato utilizzato per verificare, in queste condizioni sperimentali, le capacità induttive delle cellule stromali, mentre il modello A4 rappresenta un tentativo di ricostruzione estremamente semplificato di neovescica. Le osservazioni microscopiche dei Mod. A1 e Mod. A2 indicano come il filtro da dialisi in Cuprophan MP185 sia inadatto per questa sperimentazione: la maggior parte delle cellule uroteliali e stromali seminate sulla sua superficie non riescono ad ancorarsi e rimangono in sospensione. I rari elementi cellulari osservabili sulla superficie del filtro conservano una morfologia sferoidale e si ancorano ad essa attraverso un ridotto piede di

adesione. Al contrario, nei filtri dialitici AN69 MP185 e B3 l'attecchimento e la crescita di tutte le linee uroteliali e stromali appare ottimale. Alle 24h di coltura l'adesione cellulare era elevata (80-100%) e, similmente a quanto è osservabile nei comuni recipienti di coltura (capsule Petri, Flask da coltura), la maggior parte delle cellule era appiattita sulla superficie del filtro e tendeva a confluire per organizzarsi in monostrato. Erano rilevabili, inoltre, numerose mitosi. Le osservazioni microscopiche dei filtri di acetato di cellulosa hanno evidenziato una buona adesione cellulare alle fibre di questi filtri (50-80%) per tutte le linee cellulari. Tuttavia la maggior parte delle cellule tendevano a riunirsi e formare grosse colonie. Queste presentavano un'organizzazione cellulare pluristratificata con elementi cellulari sferoidali o poligonali e risultavano fra loro connesse da fimbrie e cordoni cellulari composti in prevalenza da cellule fusate. L'accrescimento delle colonie appariva avvenire in altezza e sul filtro ampie aree non erano colonizzate. In queste aree potevano essere osservate rare cellule isolate e completamente appiattite sulla superficie di coltura. Le prove con il Mod. A3 e Mod. A4 hanno confermato i quadri morfologici descritti per i precedenti modelli. Inoltre, il modello sperimentale A4 ha dimostrato la fattibilità della costruzione di sandwich costituiti da monostrati di cellule uroteliali adesi sulla superficie superiore dei filtri dialitici AN69 MP185 e B3 e da monostrati di fibroblasti 3T3-J2 sulla superficie inferiore degli stessi.

Lo screening delle reti protesiche non ha evidenziato alcuna differenziazione nelle modalità di attecchimento e crescita delle cellule uroteliali e stromali correlabile ai differenti tipi di tessuto. Infatti, indipendentemente dal tipo di patch usato, le cellule uroteliali all'interno della matrice di collagene tendevano ad assumere una forma fibroblastica ed a disporsi in fasci ordinati secondo la direzione di polimerizzazione delle fibrille di collagene. In prossimità della trama del tessuto il loro numero aumentava. Quelle ancorate alle sue fibre avevano forma fusata o sferoidale e davano origine a piccoli cluster. Comunque, anche dopo periodi di coltura prolungati, le cellule non riuscivano a colonizzare completamente la struttura di supporto costituita da patch protesico/matrice di collagene.

TECNICA COSTRUTTIVA SU MATRICE DI COLLAGENE

La ricostruzione della mucosa vescicale su matrice tridimensionale di collagene è stata condotta mediante la tecnica di Fujiyama et al. (1995). In breve, le neo strutture sono state ottenute distribuendo il gel di collagene su filtri PTFE Millicell-CM da 12mm di diametro (Millipore) e seminando i fibroblasti murini 3T3-J2 e le cellule uroteliali normali e neoplastiche secondo il piano sotto riportato.

- **C0:** semina della linea 3T3-J2 sulla superficie del filtro Millicell-CM;
- **C1:** semina delle cellule uroteliali normali o neoplastiche sulla superficie del filtro Millicell-CM;
- **C2:** semina del mix fibroblasti 3T3-J2/cellule uroteliali normali o neoplastiche sulla superficie del filtro Millicell-CM;
- **C3:** semina dei fibroblasti 3T3-J2 incorporati nel collagene;
- **C4:** semina delle cellule uroteliali normali o neoplastiche sulla superficie del collagene;
- **E:** semina delle cellule uroteliali normali o neoplastiche sulla superficie del collagene, semina dei fibroblasti 3T3-J2 incorporati nel collagene.

La matrice di collagene per la prova **E** è stata preparata miscelando a 8 volumi di collagene G (Biochrom Seromed) un volume di terreno di Click's 10x ed un volume di tampone di ricostituzione Hepes/NaOH 0.2M. A questa soluzione sono stati miscelati i fibroblasti murini 3T3-J2 in modo da ottenere una concentrazione finale di 5×10^5 cell/ml. Si è proceduto, quindi, alla sua gelificazione a 37°C per 2h (200 µl/filtro). Al termine della gelificazione sui dischetti di collagene formati, sono stati seminati 200µl di cellule uroteliali alla

concentrazione di 5×10^5 cell/ml. Il risultato più significativo che emerge da questo studio è rappresentato dalla capacità delle cellule uroteliali normali di generare su matrici tridimensionali di collagene contenenti fibroblasti murini, colonie con struttura papilliforme caratterizzate da una organizzazione ed una morfologia superficiale correlabili a quelle della mucosa vescicale normale osservabile in vivo. Anche le linee uroteliali neoplastiche in queste condizioni di coltura originano colonie papilliformi (Figura 1). Tali colonie, tuttavia, si differenziano dalle precedenti per organizzazione e morfologia superficiale delle cellule. Questi quadri microscopici si diversificano notevolmente da quelli osservati nelle colture su filtro Millicell-CM non trattato dove le cellule uroteliali assumono aspetto fibroblastoide che le rende indistinguibili anche dai fibroblasti 3T3-J2. Nelle colture dove le cellule uroteliali di entrambe le origini sono seminate su collagene, ma in assenza di fibroblasti 3T3-J2, i quadri microscopici sono intermedi essendo rappresentati da colonie costituite da cellule monomorfe. Queste osservazioni sperimentali, in accordo con quanto riportato in Letteratura (Ki Dong Park, 2000), indicano che la morfologia finale assunta dalle cellule uroteliali in coltura bidimensionale e tridimensionale dipende principalmente dalle interazioni cellula/substrato e cellula/cellula oltre che dalla differente origine delle linee. Nelle nostre colture, la matrice tridimensionale di collagene sembra svolgere un ruolo determinante nella organizzazione delle colonie. Comunque, per la morfologia finale delle cellule uroteliali in tali colonie è rilevante anche la presenza delle cellule 3T3-J2.

TECNICA COSTRUTTIVA SU MATRICE DI GEL PIASTRINO FIBRINICO

L'impiego dei gel piastrino-fibrinici aveva come obiettivo di verificare il loro utilizzo quali scaffold per la crescita ed il differenziamento dell'urotelio vescicale. I gel sono costituiti da colla di fibrina e da concentrati piastrinici preparati in accordo con Landesberg e Glickman (2000). La prima si ottiene sottoponendo del plasma fresco a congelamento rapido raffreddandolo di $1^\circ\text{C}/\text{minuto}$ fino a -90°C e scongelandolo lentamente a 4°C per ottenere il fibrinogeno crioprecipitato. Questo, recuperato per centrifugazione, è nuovamente portato in soluzione in un volume fisso di 40 ml di plasma. I concentrati piastrinici sono ottenuti da un prelievo venoso periferico frazionando le piastrine e risospingendole in plasma defibrinato alla concentrazione di 700.000-1.000.000 elementi/ μl . Miscelando fra loro in differenti rapporti il fibrinogeno ed i concentrati piastrinici ed attivandoli con gluconato di calcio e/o botropase è possibile polimerizzarli in un gel di varia consistenza, di aspetto colloso, adesivo e sigillante, facilmente manipolabile in sede chirurgica. In questa sperimentazione, il gel tridimensionale è stato ottenuto miscelando in parti uguali il crioprecipitato ed il concentrato piastrinico su filtri Millicell-CM (Millipore) ed attivandoli con calcio gluconato. La semina dei fibroblasti murini 3T3-J2 e delle cellule uroteliali normali e neoplastiche è stata condotta secondo il piano sotto riportato.

- **C0:** semina della linea 3T3-J2 sulla superficie del filtro gelatinata;
- **C1:** semina delle cellule uroteliali neoplastiche o normali sulla superficie del filtro gelatinata;
- **C2:** semina del mix linea 3T3-J2/urotelio normale o neoplastico sulla superficie del filtro gelatinata;
- **C3:** semina della linea 3T3-J2 incorporata nel gel;
- **C4:** semina dell'urotelio normale o neoplastico sulla superficie del gel;
- **E:** semina dell'urotelio normale o neoplastico sulla superficie del gel, semina della linea 3T3-J2 incorporata nel gel;

I risultati ottenuti hanno evidenziato che solo la linea uroteliale di origine normale ha la capacità di formare sulla superficie dei gel contenenti i fibroblasti 3T3-J2, lembi cellulari stratificati che successivamente evolvono in strutture coloniali di cospicue dimensioni. Queste, tuttavia, hanno morfologia e organizzazione

completamente diverse rispetto alle colonie ottenute con la tecnica Fujiyama. In queste condizioni sperimentali la crescita cellulare dell'urotelio neoplastico viene completamente inibita. Ulteriori indagini condotte per analizzare questo fenomeno hanno evidenziato come l'inibizione della crescita uroteliale neoplastica sia imputabile alla marcata attività citotossica espletata dalla colla di fibrina attraverso l'attivazione aspecifica del complemento presente come contaminante nel fibrinogeno crioprecipitato (dati non mostrati). Anche i fattori induttivi contenuti nelle piastrine sembrano rallentare la crescita delle cellule neoplastiche, mentre il gluconato di calcio utilizzato per polimerizzare i gel ha un'azione favorente (dati non mostrati).

CONCLUSIONI

In sintesi, le sperimentazioni fino ad oggi condotte indicano la possibilità di utilizzare neo-vesciche realizzate con la tecnica di Fujiamma come modello sperimentale per ricerche di tipo farmacologico e per lo studio del carcinoma superficiale della vescica. In questo ultimo ambito, particolarmente utile potrebbe risultare la costruzione di neovesciche con urotelio normale insemenate con urotelio neoplastico marcato per mimare il fenomeno della recidivazione così comune in queste forme tumorali. Al contrario, i gel piastrino fibrinici e gli scaffold sintetici non sembrano idonei per realizzare questi modelli: i primi per i fenomeni citotossici evidenziati a carico dell'urotelio neoplastico, ma anche di quello normale, i secondi per la impossibilità di indurre le cellule uroteliali e stromali ad organizzarsi in strutture più complesse delle lamine cellulari osservate. I dati sui gel piastrinici, comunque, offrono lo spunto per ulteriori future sperimentazioni atte a chiarire il fenomeno della citotossicità fibrinica. Infatti, se fosse dimostrato che tale fenomeno è dovuto all'attivazione del sistema complementare mediata da immunoglobuline che reagiscono con antigeni cellulari di membrana, si potrebbe tentare di potenziare e dirigere questa reazione immunitaria esclusivamente verso le cellule neoplastiche. Ciò sarebbe di grande utilità per il tissue engineering della vescica in sede di ricostruzione chirurgica di tale organo. Pertanto un prossimo obiettivo di questo progetto sarà il tentativo di potenziare l'attivazione del sistema complementare e di dirigere questa reazione immunitaria esclusivamente verso le cellule neoplastiche.

Bibliografia

1. Atala , A., Guzman , L. and Retik , A. B.: A novel inert collagen matrix for hypospadias repair. J Urol, 162: 1148, 1999
2. Romagnoli G., De Luca M, Faranda F: Treatment of posterior hypospadias by the autologous graft of cultured urethral epithelium N Engl J Med 223: 527-530, 1990
3. Romagnoli G– De Luca M– Faranda F: One step treatment of proximal hypospadias by the autologous graft of cultured urethral epithelium J Urol 150: 1204-1207 , 1993
4. Chen , F., Yoo , J. J. and Atala , A.: Experimental and clinical experience using tissue regeneration for urethral reconstruction. World J Urol, 18: 67, 2000
5. Cilento , B., Retik , A. and Atala , A.: Urethral reconstruction using polymer scaffolds seeded with urothelial and smooth muscle cells. J Urol, suppl., 155: 371A, abstract 571, 1996
6. Yoo , J. J., Meng , J., Oberpenning , F. et al: Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells. Urology, 51: 221, 1998
5. Iselin , C. E. and Webster , G. D.: Dorsal onlay graft urethroplasty for repair of bulbar urethral stricture. J Urol, 161: 815, 1999

- 6.Caldamone , A. A., Edstrom , L. E., Koyle , M. A. et al: Buccal mucosal grafts for urethral reconstruction. *Urology*, 51: 15, 1998
- 7.Koshima , I., Inagawa , K., Okuyama , N. et al: Free vascularized appendix transfer for reconstruction of penile urethras with severe fibrosis. *Plast Reconstr Surg*, 103: 964, 1999
- 8.Kropfl , D., Tucak , A., Prlic , D. et al: Using buccal mucosa for urethral reconstruction in primary and re-operative surgery. *Eur Urol*, 34: 216, 1998
- 9.Ehrlich , R. M. and Alter , G.: Split-thickness skin graft urethroplasty and tunica vaginalis flaps for failed hypospadias repairs. *J Urol*, 155: 131, 1996
- 10.Court , B., Auvert , J., Sausse , A. et al: [Replacement of a urethral segment with a silicone elastomer tube in the male dog (preliminary note).] *J Urol Nephrol*, 77: 562, 1971
- 11.Da Silva , E. A. and Zungri , Telo E.: [Urethral substitution with synthetic material.] *Actas Urol Esp*, 24: 235, 2000
- 12.Hakky , S. I.: The use of fine double siliconised dacron in urethral replacement. *Br J Urol*, 49: 167, 1977
- 13.Olsen , L., Bowald , S., Busch , C. et al: Urethral reconstruction with a new synthetic absorbable device. An experimental study. *Scand J Urol Nephrol*, 26: 323, 1992
- 14.Palleschi , J. R. and Tanagho , E. A.: Urethral tube graft in dogs: prosthesis of dacron lined silicone. *Invest Urol*, 15: 408, 1978
- 15.Bazeed , M. A., Thuroff , J. W., Schmidt , R. A. et al: New treatment for urethral strictures. *Urology*, 21: 53, 1983
- 16.Court , B., Xerri , A. and Auvert , J.: [Replacement of the urethra in man using a silicone elastomer prosthesis. 3 cases. Preliminary results.] *J Urol Nephrol*, 79: 643, 1973
- 17.Gaschignard , N., Prunet , D., Vasse , N. et al: [Skin graft urethroplasty.] *Prog Urol*, 9: 112, 1999
- 18.Barbagli , G., Selli , C., Tosto , A. et al: Dorsal free graft urethroplasty. *J Urol*, 155: 123, 1996
- 19.Gearhart , J. P., Peppas , D. S. and Jeffs , R. D.: Complications of paraexstrophy skin flaps in the reconstruction of classical bladder exstrophy. *J Urol*, 150: 627, 1993
- 20.Vincent , M. P., Horton , C. E. and Devine , C. J., Jr.: An evaluation of skin grafts for reconstruction of the penis and scrotum. *Clin Plast Surg*, 15: 411, 1988
- 21.Vyas , P. R., Roth , D. R. and Perlmutter , A. D.: Experience with free grafts in urethral reconstruction. *J Urol*, 137: 471, 1987
- 22.Pansadoro , V., Emiliozzi , P., Gaffi , M. et al: Buccal mucosa urethroplasty for the treatment of bulbar urethral strictures. *J Urol*, 161: 1501, 1999
- 23.Riccabona , M.: Reconstruction or substitution of the pediatric urethra with buccal mucosa: indications, technical aspects, and results. *Tech Urol*, 5: 133, 1999
- 24.Yerkes , E. B., Adams , M. C., Miller , D. A. et al: Coronal cuff: a problem site for buccal mucosal grafts. *J Urol*, 162: 1442, 1999
- 25.Szulczewski , D. H., Kleinheinz , J., Werkmeister , R. et al: [Regeneration of mouth mucosa in the buccal plane following graft procurement for reconstruction of bulbar urethral stenoses]. *Mund Kiefer Gesichtshir*, 3: 34, 1999
- 26.Kinthead , T. M., Borzi , P. A., Duffy , P. G. et al: Long-term followup of bladder mucosa graft for male urethral reconstruction. *J Urol*, 151: 1056, 1994

- 27.Koshima , I., Inagawa , K., Okuyama , N. et al: Free vascularized appendix transfer for reconstruction of penile urethras with severe fibrosis. *Plast Reconstr Surg*, 103: 964, 1999
- 28.Chen , F., Yoo , J. J. and Atala , A.: Acellular collagen matrix as a possible "off the shelf"; biomaterial for urethral repair. *Urology*, 54: 407, 1999
- 29.Kassaby , E. A., Yoo , J. J., Retik , A. B. et al: A novel inert collagen matrix for urethral stricture repair. *J Urol, suppl.*, 163: 70, abstract 308, 2000

- 1.Yoo , J. J., Soker , S. and Atala , A.: Methods for engineering cells and tissues: urethral tissue. In: *Methods of Tissue Engineering*. Edited by A. Atala and R. Lanza . San Diego: Academic Press, chapt. 90, pp. 1005-1010, 2002
- 2.Lai , J.-Y., Yook , J. J. and Atala , A.: Bladder augmentation using small intestinal submucosa seeded with cells. *J Urol, suppl.*, 167: 257, abstract 1009, 2002
- 3.Lanza , R., Chung , H.-Y., Yook , J. J., Wettstein , P. J., Blackwell , C. Borson , N. et al: Generation of histocompatible tissues using nuclear transplantation. *Nat Biotechnol*, 20: 689, 2002
- 1.Atala , A., Freeman , M. R., Vacanti , J. P., Shepard , J. and Retik , A. B.: Implantation in vivo and retrieval of artificial structures consisting of rabbit and human urothelium and human bladder muscle. *J Urol*, 150: 608, 1993
- 2.Atala , A.: Tissue engineering of artificial organs. *J Endourol*, 14: 49, 2000
- 3.Kropp , B. P., Sawyer , B. D., Shannon , H. E., Rippey , M. K., Badylak , S. F., Adams , M. C. et al: Characterization of small intestinal submucosa regenerated canine detrusor: assessment of reinnervation, in vitro compliance and contractility. *J Urol*, 156: 599, 1996
- 4.Vaught , J. D., Kropp , B. P., Sawyer , B. D., Rippey , M. K., Badylak , S. F., Shannon , H. E. et al: Detrusor regeneration in the rat using porcine intestinal submucosal grafts: functional innervation and receptor expression. *J Urol*, 155: 374, 1996
- 5.Reddy , P. P., Barrieras , D. J., Wilson , G., Bägli , D. J., McLorie , G. A., Khoury , A. E. et al: Regeneration of functional bladder substitutes using large segment acellular matrix allografts in a porcine model. *J Urol*, 164: 936, 2000

1. De Angeli S, Buoro S, Fandella A, Anselmo G, Belmonte P, Zucconelli R, Fiaccavento G, Parnigotto PP, Stocco F. Uptake and intracellular distribution of idarubicin in secondary cultures of normal and neoplastic urothelium. *Urol Res* 25:125-130, 1997.
2. De Angeli S, Fandella A, Conconi MT, Anselmo G, Parnigotto PP. Growth, morphology and morphometry of human hypertrophic prostate cells treated with suramin in vitro. *Prostate*, 25:117-124, 1994.
3. De Angeli S, Favretti C, Buoro S, Fandella A, Anselmo G, Conconi MT, Parnigotto PP. Effects of DHT and EGF on human hyperplastic cells cultured in vitro: growth, morphology and phenotype characterization. *Ann Anat* 179:255-264, 1997.

4. De Angeli S, Valenti F, Durante E, et al. Primary cultures of human hypertrophic prostate tissue in WAJC 404 medium: a study of cell morphology and kinetics. *Ann Anat* 177: 185-192, 1995.
5. Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. Alan R Liss Inc, New York, 1987.
6. Fujiyama C, Zenjiro M, Andhajime S. Reconstruction of the urinary bladder mucosa in three dimensional collagen gel culture: fibroblast extracellular matrix interactions on the differentiation of transitional epithelial cells. *J Urology* 153(June):2060-2067, 1995.
7. Green H. The keratinocyte as differentiated cell type. *Harvey Lect*; 74:10, 1980.
9. Ki Dong Park, Kneun Kwon, Young Ha Kim Tissue engineering of urinary organs. *Yonsey Medical Journal* 41: 780-788, 2000.
8. Landesberg RL, Ray M., Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich-plasma gel preparation *J Oral Maxillofac Surg* 58:297-300, 2000.
10. Liebert M, Wedemeyer G, Chang JHC, et al. Comparison of antigen expression on normal urothelial cells in tissue section and tissue culture. *J Urol* 144: 1288-1292, 1990.
11. Reznikoff CA, Lorenz LJ, Pesciotta DM et al. Growth kinetics and differentiation in vitro of normal uroepithelial cells on collagen gel substrates in defined medium. *J Cell Phys* 131: 285-301, 1987.
12. Rheinwald JG, O'Connell TM. Intermediate filament proteins as distinguishing markers of cell type and differentiated state in cultured human urinary tract epithelia. *Ann NY Acad Sci* 455: 259-267, 1985.
13. Makin CA, Bobrow LG, Bodmer WF. Monoclonal antibody to cytokeratin for use in routine histopathology. *J Clin Pathol* 37: 975- , 1984