



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Scienze Farmaceutiche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE

INDIRIZZO: Scienze epatologiche e gastroenterologiche
CICLO: XXII° ciclo

Titolo

**Utilizzo di precursori muscolari scheletrici e precursori derivati da
sistema neuroenterico nella correzione di difetti sfinteriali.**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Pier Paolo Parnigotto

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giacomo Carlo Sturniolo

Supervisori: Dr. Andrea Buda

Ch.mo Prof. Pier Giorgio Gamba

Dottorando: Francesco Fascetti Leon

Sommario	1
Capitolo 1: Introduzione	5
1.A Il reflusso gastroesofageo	5
1.A.1 Fisiopatologia	6
1.A.2 Il paziente con compromissione neurologica	8
1.A.3 La terapia	10
1.B Incontinenza dello sfintere anale	13
1.C Terapia cellulare	15
1.C.1 Le cellule staminali	15
1.C.2 Le cellule satelliti	17
1.C.3 Altri precursori muscolari	20
1.C.4 Terapia cellulare nelle miopatie	21
1.C.5 Terapie cellulari in strutture muscolari viscerali	22
1.C.6 Lavoro preliminare	24
1.C.7 Precursori del sistema nervoso enterico	26
Capitolo 2: Scopi della tesi	30
Capitolo 3: Materiali e metodi	31
3.1 Colture cellulari	31
3.2 Caratterizzazione	32
3.3 Impianto	32
3.4 Analisi funzionale: contrastografia esofago-gastrica	34
3.5 Impianto nello sfintere anale	34
3.5 Istologia e immunoistochimica	35
3.6 Esperimenti in vitro	36
Co-culture di MPCs e cellule muscolari lisce	36
Co-culture di MPCs e neurosfere da ENS	37

Capitolo 4: Risultati		
4.1	Colture cellulari e caratterizzazione	40
4.2	Impianto nella GEJ	41
4.3	Contrastografia esofago-gastrica	41
4.4	Istologia e immunoistochimica	42
4.5	Iniezione nello sfintere anale	43
4.6	Co-culture di MPCs e cellule muscolari lisce	43
4.7	Co-culture di MPCs e precursori del ENS	45
	Figure	46
Capitolo 5: Discussione		55
Conclusioni		65
Bibliografia		67

Sommario

Il progetto di ricerca nasce dall'ipotesi dell'utilizzo di approcci di terapia cellulare ed ingegneria tissutale nel tratto digerente. L'ambiente clinico da cui nasce lo spunto per questo progetto di ricerca è la Chirurgia Pediatrica. Tuttavia le tematiche affrontate abbracciano trasversalmente ogni fascia di età. Ci si è interessati in particolare alla possibilità di correggere difetti "sfinteriali" tramite l'utilizzo di precursori derivati dal muscolo scheletrico.

In tale ottica sono state esplorate le capacità di integrazione nel tessuto contrattile del tubo digerente di precursori cellulari del muscolo scheletrico (cellule staminali *committed*). Sono stati eseguiti esperimenti in vivo e in vitro. La maggior parte dei dati sono stati ottenuti utilizzando un modello di danno da congelamento a carico della giunzione gastro-esofagea di topo. Sono state esplorate le possibilità di rigenerazione dopo iniezione di cellule satellite coltivate o a fresco ottenute con la tecnica della singola fibra.

Il candidato ha personalmente utilizzato diverse tecniche per l'ottenimento di precursori staminali da muscolo scheletrico, colture cellulari primarie, coculture tra vari tipi cellulari, nonché varie tecniche di analisi (istologia convenzionale, analisi d'immunofluorescenza delle criosezioni, western-blotting, citofluorimetria, analisi statistica e d'immagine microscopica). Per gli esperimenti in vivo, inoltre, sono state utilizzate tecniche di microchirurgia sul piccolo animale.

Risultati del lavoro svolto sono stati oggetto di presentazioni in congressi nazionali ed internazionali:

- Murine Muscle Precursor Cells survived and integrated in a Cryoinjured Gastroesophageal Junction.

Fascetti Leon F, Malerba A, Boldrin L, Leone E, Betalli P, Pasut A, Zanon GF, Gamba PG, Vitiello L, DeCoppi P. J Surg Res. Epub 2007 Jun 19

- Muscle precursors injection in the gastroesophageal junction: further experience.

Fascetti Leon F, Malerba A, Boldrin L, Zanon GF, Gamba PG, Pierro A, De Coppi P. Oral presentation at the 8th European Congress of Paediatric Surgery (EUPSA) Turin, Italy 2007

In vitro enhancement of muscle precursors cells differentiation enhanced by co-cultures with neurogenic cells. A Malerba, F Fascetti Leon, L Boldrin, C Caldwell, N, Thapar, A Pierro, P De Coppi British Association of Paediatric Surgeons (BAPS) annual meeting Edimburgh, UK 2007

- Further experience with the injection of muscle precursors in the gastroesophageal junction

Fascetti Leon F, Malerba A, Boldrin L, Vitello L, Talenti E, Zanon GF, Gamba PG, Pierro A, De Coppi P. presentation at the American Paediatric Surgeons Association (APSA) Orlando, Florida 2007

- Long term integration of muscle precursor cells injected in the lower esophageal sphincter.

Fascetti Leon F, Malerba A, Boldrin L, Betalli P, Gamba PG, Vitiello L, A. Pierro, DeCoppi P. submitted.

Gli esperimenti “in vivo” e ‘analisi istologica sono stati condotti presso il Centro inter-dipartimentale Vallisneri dell’Unioversità di Padova.

Le colture cellulari sono state eseguite presso il Laboratorio di Medicina Rigenerativa Della Città della Speranza (c/o Dipartimento di Pediatria e Istituto VIMM).

Parte dell’analisi e delle co-culture sono state eseguite presso l’Institute of Child Health - Great Ormond Street Hospital di Londra.

Il lavoro svolto porta alla conclusione che cellule precursori muscolari derivati da tessuto muscolare scheletrico adulto sono potenzialmente utilizzabili nella rigenerazione delle strutture contrattili del tubo digerente. In particolare la buona capacità di integrazione e dati sulla possibile trans-differenziazione verso la linea cellulare muscolare liscia stimolano a proseguire nella direzione di una terapia cellulare dei difetti sfinteriali. Pochi dati sono derivati dagli esperimenti condotti sullo sfintere anale interno, che vanno pertanto considerati preliminari. Inoltre la capacità di integrazione e interazione in vitro tra cellule nervose gangliari e muscolari derivate da muscolo scheletrico fanno pensare ad un più ampio utilizzo nei difetti di contrattilità gastro-intestinali.

Summary

This project rises from the hypothesis of using cell therapy and tissue engineering in the gastrointestinal system. The clinical environment the project borne is the Pediatric Surgery. However the faced topics embrace all age population. In particular we explored the possible correction of sphincter defect by using skeletal muscle precursors. In this view we studied the capability of skeletal muscle precursors (committed stem cells) of integrating into contractile tissue of gut. In vitro and in vivo experiments have been done. The most data have been obtained from the murine model of cryo-injury of gastroesophageal junction. We studied the regeneration after injection of cultured or freshly isolated satellite cell (obtained by the single fibre technique) compared with other cell populations. The candidate personally managed several technique to obtain skeletal muscle precursors, primary cell culture, co-culture between various cell-type; analysis techniques (conventional histology, immunofluorescent analysis of cryo-sections, western-blotting, cytofluorimetric anlysis, statistical analysis, microscopy imaging). Further micro-surgery techniques have been used in the in vivo experiments on small animals. Results have been presented in international meetings or publications:

- Murine Muscle Precursor Cells survived and integrated in a Cryoinjured Gastroesophageal Junction.

Fascetti Leon F, Malerba A, Boldrin L, Leone E, Betalli P, Pasut A, Zanon GF, Gamba PG, Vitiello L, DeCoppi P. J Surg Res. Epub 2007 Jun 19

- Muscle precursors injection in the gastroesophageal junction: further experience.

Fascetti Leon F, Malerba A, Boldrin L, Zanon GF, Gamba PG, Pierro A, De Coppi P. Oral presentation at the 8th European Congress of Paediatric Surgery (EUPSA) Turin, Italy 2007

In vitro enhancement of muscle precursors cells differentiation enhanced by co-cultures with neurogenic cells. A Malerba, F Fascetti Leon, L Boldrin, C Caldwell, N, Thapar, A Pierro, P De Coppi British Association of Paediatric Surgeons (BAPS) annual meeting Edimburgh, UK 2007

- Further experience with the injection of muscle precursors in the gastroesophageal junction

Fascetti Leon F, Malerba A, Boldrin L, Vitello L, Talenti E, Zanon GF, Gamba PG, Pierro A, De Coppi P.
presentation at the American Paediatric Surgeons Association (APSA) Orlando, Florida 2007

- Long term integration of muscle precursor cells injected in the lower esophageal sphincter.

Fascetti Leon F, Malerba A, Boldrin L, Betalli P, Gamba PG, Vitiello L, A. Pierro, DeCoppi P. submitted.

Cell culture have been conducted at the Regenerative Medicine Lab of Della Città della Speranza (c/o Dipartimento di Pediatria e Istituto VIMM). Part of the analyses and the co-culture have been conducted at the Institute of Child Health - Great Ormond Street Hospital of London. The in vivo section have been done at The work allows the conclusion that adult skeletal muscle precursors could be used in the regeneration of digestive tract contractile tissue. In particular good engrafting and data regarding the possible trans-differentiation through smooth muscle lineage led to follow this approach (correction of sphincter defect). Few data have been obtained from the preliminary experiments on anal sphincter. Furthermore, the capability of integrating and interacting in vitro between ganglion derived cells and muscle cells, let us think to the possible wilder application to gastro-intestinal contraction defects.

Capitolo 1: Introduzione

1.A Il reflusso gastroesofageo

La malattia da reflusso gastroesofageo (GERD) è il disturbo più comune del tratto digerente riscontrato nella pratica clinica (1).

Il GER è il passaggio involontario di contenuto gastrico nell'esofago, è l'espressione dell'imaturità dei meccanismi di coordinazione esofago-gastrica, della bassa capacità dell'esofago e della dieta prevalentemente liquida nel lattante. Si può quindi parlare di GER fisiologico nei primi mesi di vita in assenza di rifiuto del cibo, crescita insoddisfacente o altri sintomi (2).

1.A.2 Epidemiologia

La manifestazione più evidente del GER, il rigurgito, è presente in circa il 50 % dei bambini fino ai 4 mesi di età e questa percentuale scende al 5% entro l'anno, rispecchiando la normale maturazione dei meccanismi fisiologici antireflusso. La prevalenza del GERD in questa fascia di età, invece, va dal 5 al 9%. Nella popolazione adulta occidentale l'incidenza della malattia, è stimata intorno al 25% (3).

Non è possibile creare un'adeguata stratificazione per età dell'incidenza di questa patologia a causa dei diversi criteri d'inclusione dei pazienti nelle casistiche. Sembra ormai assodato che si debba parlare di entità distinte per caratteristiche cliniche e fisiopatologiche. Il GERD dell'adulto e del paziente pediatrico adolescente, infatti, vede come principale caratteristica la sintomatologia soggettiva. Fino al 60% dei pazienti adulti in trattamento per GERD non ha lesioni della mucosa esofagea (Non Erosive Reflux Disease)(4). Al contrario, in epoche precedenti l'attenzione clinica è stata da oggettivi segni di complicanze che usualmente compromettono la normale crescita. In particolare i

principali sintomi nel neonato e nel lattante sono, a differenza dell'adulto, sopraesofagei (rigurgito, apnea, stridore). L'esofagite è presente nel 15-60% dei pazienti pediatrici valutati per la presenza di altri sintomi di GERD. Inoltre nella prevalenza della patologia in epoca pediatrica occupa un posto senz'altro di rilievo una popolazione, numericamente in crescita, per la quale sarebbe necessario parlare di un'ulteriore entità: il paziente con compromissione neurologica. La malattia da reflusso gastroesofageo interessa dal 15 al 75% di questi pazienti come risultato dell'azione di diversi fattori di rischio legati alla condizione di base (5-10).

1.A.1 Fisiopatologia

Lo squilibrio tra meccanismi di protezione ed elementi che agiscono contro questi ultimi, risulta nella malattia da reflusso gastro-esofageo. Possiamo schematicamente parlare di tre linee di difesa che minimizzano il GER ed i suoi potenziali danni sulle strutture sovra-cardiali: 1) la barriera antireflusso; 2) la clearance esofagea; 3) la difesa mucosa. La prima è costituita dalla regione ad alta pressione dello sfintere esofageo inferiore (LES), dall'angolo di Hiss, dall'azione "a pinza" del muscolo diaframmatico ("pinchcock") e dall'esofago intra-addominale. Queste componenti limitano il volume e la frequenza degli episodi di GER. Quando la barriera antireflusso consente il passaggio di contenuto gastrico in esofago, la clearance esofagea diventa fondamentale nell'evitare il danno alla mucosa. Vi partecipano la peristalsi, la gravità e l'azione tampone della saliva. Le difese proprie della mucosa (secreti delle ghiandole esofagee, tight junctions e glicoproteine intercellulari dell'epitelio, terminazioni sensitive) entrano in gioco in terza battuta, per evitare l'estensione trans-parietale del danno.

Il ruolo dei TLESRs (transient lower esophageal sphincter relaxations), come elemento fondamentale nella genesi del GERD, è stato confermato anche in recenti esperienze

sperimentali (11). I TLESRs sono l'effetto di un arco riflesso vagale organizzato a livello del tronco encefalico in risposta alla distensione dello stomaco prossimale. Gli effettori del riflesso sono neuroni intramurali inibitori (NO-ergici) che rilasciano la muscolatura del LES. Nel lattante questi episodi sono più frequenti in conseguenza di pasti frequenti che hanno un volume doppio a quelli di un adulto rapportati al peso. Nell'adulto sano, sottoposto a manometria esofagea in posizione supina, la frequenza dei TLESRs è uguale a quella del paziente affetto da GERD. In individui sani solo il 30% dei TLESRs si associa a GER, mentre la percentuale sale a 65% nei pazienti affetti da GERD.

Nel lattante e nel paziente con compromissione neurologica la posizione distesa giustifica alcuni elementi patogenetici. Infatti, in tale posizione il contenuto gastrico è più prossimo al cardias e l'eventuale refluito raggiunge più facilmente il faringe. Tuttavia la fisiopatologia del GERD nel neonato e nel lattante differisce meno di quanto si pensava da quella dell'adolescente e dell'adulto (12), riconoscendo come punti cardine il tono del LES, i TLESRs e la natura acida del refluito. Infatti, la secrezione gastrica raggiunge un pH <2 poco dopo la nascita e il tono del LES è ben sviluppato anche nel prematuro (13). È comunque difficile la valutazione dell'esposizione totale dell'esofago al contenuto gastrico nei lattanti, essendo tipicamente basica la composizione del loro pasto. In tal senso molto potrebbe venire, nella comprensione della fisiopatologia del reflusso del neonato e del lattante, dall'introduzione dell'impedenziometria esofagea nella diagnostica clinica. Questo esame si basa sulla registrazione dei cambiamenti della conducibilità elettrica tra due elettrodi separati da un catetere non conduttore. In tali condizioni la conducibilità è direttamente correlata con la conducibilità del medium (fluido o gas intra-luminale). Questo dà la possibilità di registrare il movimento di gas e fluidi indipendentemente dal loro pH (14). Il fatto che nel lattante la distensione gastrica porti più frequentemente all'attivazione dei TLESRs associati a GER è motivata in particolare dalla quasi assenza di

una porzione di esofago sotto-diaframmatico. In tale condizione, fisiologica per il neonato, la pressione intra-gastrica si somma a quella intra-addominale senza che quest'ultima possa agire sull'esofago terminale determinandone un collabimento protettivo. Il fenomeno si verifica nel paziente con esofago corto (post-correzione di atresia esofagea, esiti di lesioni da caustici) indipendentemente dall'età. E' stato dimostrato che l'infiammazione dell'esofago porta ad un'alterazione a livello neuromuscolare dell'esofago distale e della giunzione gastroesofagea, che ne riduce la contrattilità, quindi la clearance e il tono basale. Ciò porta ad un circolo vizioso che sostiene la malattia da reflusso (15).

Lo stretto legame del GERD con disturbi della motilità viscerale è provato anche dal ruolo, nella sua genesi, del ritardo nello svuotamento gastrico. Questo si associa ad una maggiore frequenza di TLESRs postprandiali dovuti alla protratta distensione del fondo gastrico. Questo fenomeno nei pazienti neurolesi è ben noto (1). Inoltre recenti studi hanno mostrato come anche l'azione di mescolamento dello stomaco può essere deficitaria e portare ad una maggiore esposizione della regione cardiaca alla componente acida del contenuto gastrico (16).

1.A.2 Il paziente con compromissione neurologica

Il sistema nervoso enterico contiene più neuroni del midollo spinale (18). Risulta pertanto intuibile che un insulto a livello del SNC possa portare a disordini del tratto digerente che possono esprimersi come dismotilità orofaringea, GER, ritardato svuotamento gastrico, stipsi. La malattia da reflusso gastroesofageo interessa dal 15 al 75 % dei pazienti pediatrici con compromissione neurologica e circa il 50% degli individui con disabilità mentale istituzionalizzati (5-10). In questi pazienti è necessario più frequentemente il trattamento chirurgico rispetto ai pazienti non neurolesi a causa della refrattarietà al trattamento medico e dell'impossibilità di condurre una terapia posturale. Inoltre, tali pazienti si presentano spesso alla diagnosi con complicanze legate alla esofagite ed alle

frequenti inalazioni di materiale gastrico (19-24). L'elevata associazione è dovuta principalmente all'alterazione primaria del SNC che porta ad una disfunzione generalizzata dell'apparato digerente. Effetti diretti sono la perdita della funzione antireflusso della giunzione gastroesofagea e la dismotilità dell'esofago (9). Nella genesi della malattia da reflusso in questi pazienti, si devono includere quelle alterazioni anatomiche e neuromuscolari che comportano l'aumento della pressione intra-addominale (Fig1.1). L'origine prevalentemente "centrale" del reflusso è ulteriormente supportata dagli studi in cui sono stati dimostrati migliori risultati da parte di farmaci che agiscono a livello del SNC. Gli inibitori dei recettori del GABA tipo B (Baclofen) inibiscono in particolare le afferenze provenienti dai plessi mioenterici e che scatenano i TLESRs. Questa azione è risultata efficace in pazienti pediatrici neurolesi non responsivi ad altre terapie farmacologiche (25). Il controllo della malattia con presidi conservativi sarebbe particolarmente auspicabile in questa popolazione. Infatti, anche dopo l'estesa diffusione delle tecniche laparoscopiche, la chirurgia del reflusso nel paziente neuroleso è gravata da un alto rischio di esiti postoperatori sfavorevoli, avendo maggior tasso di complicanze, di recidive dei sintomi e di decessi (26-28). Sfortunatamente le terapie mediche attualmente a disposizione non raggiungono un controllo dei sintomi sufficiente, in particolare dopo il ritiro dal mercato della Cisapride per i suoi potenziali gravi effetti avversi.

L'elevato tasso di recidiva, che si attesta tra il 25 e il 50% anche nelle casistiche recenti, ha spinto a trovare soluzioni alternative all'approccio chirurgico tradizionale. Sono state quindi proposte soluzioni radicali quali la deconnessione esofagogastrica e faringo tracheale (20;29) nei pazienti con sintomi intrattabili e recidive multiple dopo plastica antireflusso. Le casistiche attualmente pubblicate sono ancora modeste, sebbene i risultati sembrino incoraggianti. Tuttavia questo approccio va contro il concetto di limitare manovre aggressive in pazienti a rischio di complicanze chirurgiche. Non esistono

attualmente reports che riguardino le emergenti terapie endoscopiche nel gruppo di pazienti neurolesi. Molto di recente è stato sottolineato come la proporzione di bambini con deficit neurologico nelle casistiche chirurgiche sia in riduzione (30). Il fenomeno sembra in contraddizione con l'aumento numerico degli individui con disabilità neurologica importante e con il maggior ricorso, nella popolazione generale, al trattamento chirurgico con la diffusione della laparoscopia. Si può trovare ragione di ciò nella maggiore attenzione diagnostica, nella rivalutazione del ruolo profilattico della chirurgia antireflusso nei portatori di gastrostomia, nell'utilizzo della nutrizione gastro-digiunale, nella diffusione della terapia con inibitori di pompa protonica. Può contribuire anche l'aumento delle indicazioni nei pazienti neurologicamente normali (26-28).

La complessità della sintomatologia nei pazienti neurolesi rende l'approccio diagnostico particolarmente difficile. In particolare la correlazione di sintomi atipici, respiratori in particolare, con il GER è difficilmente oggettivabile anche con i tradizionali strumenti diagnostici. È stato evidenziato che circa il 50% degli episodi di GER in questi pazienti è "non acido" e che di questi ben il 70% raggiunge il faringe. Questo dato spinge alla conclusione che una quota maggiore di sintomi respiratori è da attribuire al GER rispetto a quella dimostrata con l'utilizzo della pHmetria (14). Il paziente neuroleso con sospetto GERD è oggi la maggiore sfida diagnostica e terapeutica per il chirurgo pediatrico.

1.A.3 La terapia

Terapia medica

Tralasciando i primi elementi della lista, gli inibitori della pompa protonica (PPI) hanno rivoluzionato la terapia del GERD nella popolazione adulta e pediatrica. Sebbene nella patogenesi del GERD non trovi posto l'iper-produzione di secreti acidi, la soppressione della produzione di H^+ può interrompere l'azione lesiva sull'esofago distale che ne

compromette ulteriormente la motilità (vedi 1.3). Inoltre sono state introdotte nel mercato nuove molecole appartenenti a questa famiglia di farmaci, come l'esomeprazolo, con comprovata maggiore efficacia nell'adulto e buone prospettive nel paziente pediatrico (31;32). L'uso sempre più esteso di questi farmaci ha sollevato l'attenzione sugli effetti secondari di una somministrazione a lungo termine nell'età evolutiva. In particolare l'ipocloridria prolungata può portare ad una eccessiva crescita batterica nello stomaco. Questo sembra correlato con una maggiore suscettibilità alle infezioni respiratorie e gastrointestinali (2;33). Questo elemento è da tenere particolarmente presente proprio nel paziente pediatrico di maggiore interesse, il neuroleso, già soggetto ad un rischio aumentato di gravi infezioni respiratorie. Inoltre alcuni prodotti del metabolismo batterico, N-nitrosamine, sono considerati cancerogeni a livello della mucosa gastrica (2).

Terapia Chirurgica

In caso di fallimento del trattamento conservativo, la chirurgia antireflusso è una ben consolidata entità con la quale si ottengono buoni risultati a breve e medio termine in mani esperte (34;35). La plastica antireflusso secondo Nissen è uno dei tre interventi maggiori più comuni nei pazienti pediatrici negli USA e nei pazienti normali raggiunge il controllo dei sintomi nel 90% dei casi. Anche nel paziente pediatrico neuroleso, questo intervento è quello più largamente accettato sebbene sia gravato da un tasso di recidiva fino al 50% (36). Inoltre, il dato di un peggior outcome postoperatorio nei pazienti è stato confermato anche da recenti studi su ampie coorti, dimostrando che il dato non è sostanzialmente influenzato dalla chirurgia mini-invasiva (30). I principi secondo i quali tale tecnica e le sue varianti (plastiche parziali anteriori o posteriori) agiscono, risiedono nell'incremento di alcuni degli elementi della barriera antireflusso fisiologica: la lunghezza dell'esofago intra-addominale; l'angolo di Hiss; e soprattutto il tono della "area ad alta pressione" della

giunzione gastro-esofagea. Quest'ultimo punto è molto importante per la capacità, attualmente non eguagliata da altre tecniche, di modulare tale incremento di pressione con il riempimento gastrico, aumentando l'effetto valvola nella fase post prandiale quando è più richiesta. Molto meno diffuse sono altre tecniche come la gastropessi anteriore e la tecnica di Boix Ochoa. Come già accennato per i pazienti neurolesi la tecnica di Bianchi (deconnessione esofagogastrica) è da ritenersi una tecnica di "salvataggio" dopo ripetuto fallimento di altre tecniche (37).

Alcuni reports hanno indicato il ruolo della gastrostomia nell'azione di protezione dal reflusso gastroesofageo nei pazienti neurolesi. In particolare la gastrostomia laparoassistita sulla piccola curvatura dello stomaco sembra avere azione antireflusso (38).

Terapia endoscopica

Nell'ultimo decennio diverse strade sono state esplorate per migliorare i risultati del trattamento conservativo nei pazienti non responsivi alla terapia medica. Questo ha portato all'introduzione di procedure endoscopiche. Queste proposte innovative includono suture endoscopiche, radio-ablazione (tecnica Stretta) ed iniezione di sostanze inerti non riassorbibili. Tra queste le prime due sono state applicate anche in epoca pediatrica (39). Tutte queste tecniche hanno lo scopo di ispessire o irrigidire la parete dell'esofago a livello del LES. Il restringimento ottenuto dovrebbe essere sufficiente ad impedire il reflusso senza impedire la progressione del bolo nello stomaco. Esse sono teoricamente facili da eseguire, ripetibili e scevre da importanti rischi (40;41). L'iniezione di "bulking agents", tecnicamente simile all'iniezione di sclerosanti per varici esofagee, è stata dimostrata in grado di controllare a breve e medio termine i sintomi e di migliorare il riscontro manometrico del LES (42). Analogamente a quanto riportato per il trattamento del

reflusso vescicoureterale, diverse sostanze sono state iniettate nel LES [collagene bovino, polymethylmethacrylate (Plexiglas), ethylene vinyl alcohol polymer (ENTERIX®), polyacrylonitrile-based hydrogel rod (GATEKEEPER™)] nell'ambito di studi clinici (43-47). L'iniezione di materiale non autologo può causare una risposta infiammatoria e lesioni ischemiche della mucosa esofagea. Questi meccanismi sono stati descritti come causa dell'estrusione della sostanza nel lume o la perforazione dell'esofago (48;49).

1.B Incontinenza sfintere anale

L'incontinenza fecale è un handicap sociale che affligge fino al 1% della popolazione adulta. Il problema è prevalente nelle donne nella maggiorparte dei casi secondario a trauma ostetrico associato a degenerazione neuro-muscolare legato all'età. Fino al 46% dei pazienti istituzionalizzati soffre d'incontinenza fecale con conseguenti ripercussioni socio-economiche.

Le lesioni del nervo pudendo sono implicate nel trauma da parto e nelle incontinenze post-traumatiche che non implicano lesioni spinali.

La maggiorparte dei pazienti che hanno subito la correzione di una malformazione anorettale soffrono di vari gradi di disturbi della continenza. Approssimativamente il 25% dei pazienti è deficitario nei meccanismi che portano alla continenza, non hanno evacuazioni volontarie e sono quindi incontinenti. Questi pazienti necessitano di vie artificiali per mantenersi puliti come vari regimi di "*bowel management*" che vanno da enemi di pulizia a ciecostomie per clismi "anterogradi". Sono inoltre stati proposti con dubbi risultati interventi chirurgici di correzione mediante l'impianto di neo-sfinteri creati con lembi di muscolo scheletrico (es.m. gracilis) (130-136).

Modelli animali

Esistono modelli di danno meccanico, farmacologico e da congelamento dello sfintere anale esterno in topo e ratto. Modelli invasivi di danno dello sfintere anale in ratto prevedono la miotomia in più punti e successiva sutura dello sfintere stesso. In tali modelli è stata dimostrata una tempestiva ripresa delle normali caratteristiche dell'alvo e l'assenza di distress post operatorio degli animali. In letteratura è anche riportato il modello di danno sullo sfintere anale di ratto mediante dilatazione forzata o stretching. Nella pratica clinica, la dilatazione forzata dello sfintere anale rappresenta una tecnica con cui si ottiene la transitoria riduzione del tono sfinteriale, utilizzata nei casi di stipsi grave idiopatica o neurgena.

Tutti i modelli di danno dello sfintere anale, incluso il congelamento e lo stretching provocano un danno istologico e funzionale transitorio. La valutazione della funzionalità dello sfintere a distanza dal trattamento o dal solo danno può essere eseguita agevolmente con la manometria ano-rettale come già riportato.

1.C Terapia cellulare

1.C.1 Le cellule staminali

Le conoscenze della biologia delle cellule staminali e del loro ruolo nella rigenerazione dei tessuti hanno visto enormi progressi nell'ultimo decennio. Ciò ha fatto sì che la medicina rigenerativa rivolgesse un'attenzione crescente su questo campo di ricerca. Enormi risorse umane ed economiche vi sono state riversate orientando presto gli sforzi su quesiti terapeutici specifici, riguardo patologie acute, croniche e degenerative.

Si definisce *cellula staminale* una cellula che:

- si replica mediante divisioni simmetriche originando cellule figlie identiche a sé e prolifera per un tempo illimitato (*self-renewal*), conservando un cariotipo stabile e normale
- genera una progenie di cellule differenziate e mature attraverso divisioni asimmetriche
- ricostituisce tessuti funzionali in vivo (50).

Le cellule staminali rappresentano teoricamente una fonte illimitata per la rigenerazione di tessuti danneggiati o non funzionali.

Riguardo al loro potenziale differenziativo si distinguono cellule staminali (51):

- Cellule staminali totipotenti.

La cellula che possiede il maggiore potenziale differenziativo è rappresentata dall'ovocita fecondato (lo zigote) e dalle cellule che da questa derivano entro le prime

due divisioni cellulari. Queste cellule sono capaci di formare l'embrione e gli annessi embrionali.

- Cellule staminali pluripotenti.

Le cellule totipotenti dell'embrione iniziano a specializzarsi, formando una sfera cava, la blastocisti, dentro cui si forma un cluster di cellule compatte, definite massa cellulare interna (ICM), che darà origine all'embrione vero e proprio. Le cellule formanti l'ICM sono considerate *pluripotenti*, in grado cioè di differenziare in tutti i tipi cellulari che derivano dai tre foglietti germinativi (ectoderma, mesoderma, endoderma), esclusi quindi gli annessi extraembrionali.

- Cellule staminali multipotenti.

Le cellule staminali *multipotenti* sono riscontrabili in diversi tessuti dell'organismo adulto e sono in grado di produrre un limitato spettro di cellule differenziate, in funzione del contesto in cui si trovano (ad esempio, cellule staminali del piccolo intestino possono produrre tutti e quattro i tipi cellulari propri di questo tessuto, come le cellule di Paneth, Goblet, cellule adsorbenti e del sistema enteroendocrino; le cellule staminali del sistema nervoso centrale hanno un potenziale in grado di generare neuroni, oligodendrociti e astrociti). Il termine "multipotente" viene anche impiegato per descrivere la capacità di certe cellule staminali del tessuto adulto di transdifferenziare in tipi cellulari diversi dall'originale, qualora rimosse dal loro contesto tissutale usuale e sottoposte ad opportuni stimoli .

- Cellule staminali unipotenti.

Le cellule staminali *unipotenti* sono in grado di generare un unico specifico tipo cellulare, come ad esempio le cellule staminali della lamina basale dell'epidermide. Questa definizione viene solitamente usata per indicare le cellule staminali tessuto-specifiche dell'organismo adulto il cui compito è quello di mantenere l'omeostasi tissutale e di replicarsi in caso di danno e perdita cellulare. Le cellule staminali unipotenti vengono anche indicate da molti con il termine di “progenitori” o “committed progenitors”.

In base allo stadio evolutivo in cui le cellule staminali vengono isolate si può parlare quindi di cellule staminali:

- embrionali, derivate dalla blastocisti
- fetali, isolate dal liquido amniotico, dalla placenta e dal cordone ombelicale, che possiedono caratteristiche intermedie fra quelle embrionali e quelle adulte. In particolare, il liquido amniotico e la placenta sembrano contenere diverse popolazioni di cellule staminali (mesenchimali, ematopoietiche, trofoblastiche e forse anche cellule staminali più primitive).
- adulte, rappresentano una piccola percentuale sul totale delle cellule di un tessuto adulto e un tempo si credeva potessero dare origine solo ad un unico tipo di nuove cellule (52); in realtà anche le cellule staminali adulte sono dotate di plasticità, potendo dare origine, in presenza di opportuni stimoli differenziativi, a diversi tessuti (53).

1.C.2 Cellule satelliti

Le cellule satelliti sono le staminali adulte del muscolo scheletrico. Sono localizzate tra sarcolemma (membrana plasmatica) e lamina basale delle fibre muscolari, dove si trovano

in uno stato quiescente. In caso di danno dovuto a traumi, esercizio fisico intenso, strappi o denervazione, le cellule satelliti si attivano e proliferano, generando cellule muscolari, dette *mioblasti*, che fondono tra loro e con le fibre danneggiate rigenerando il tessuto muscolare (54). È stato inoltre recentemente mostrato che le cellule satelliti, sembrano in grado di riparare un danno senza l'intervento di altre cellule staminali del muscolo (55). Nonostante il loro ruolo nella rigenerazione, nell'ipertrofia, e nella crescita post-natale muscolare sia ben documentato, rimangono ancora da chiarire i meccanismi molecolari che regolano l'attivazione e la funzione delle cellule satelliti (56). Il passaggio da cellula quiescente mononucleata a miotubo richiede l'attivazione di una serie di fattori di trascrizione muscolo-specifici (MRFs). Secondo un recente modello (57), le satelliti quiescenti sarebbero in grado di autorinnovarsi seguendo lo schema in figura 2.1. Secondo questa ipotesi la cellula quiescente esprime il marker *pax 7* e la coespressione di *MyoD* è indice di attivazione a seguito di un danno. Dalla divisione di questa cellula derivano una nuova quiescente e una cellula che intraprende la differenziazione. In seguito la cellula che ha iniziato il cammino verso il fenotipo maturo, esprime nell'ordine *Miogenina* e *MRF4*. È stato di recente osservato come le cellule satelliti rappresentino in realtà una famiglia di cellule caratterizzata da eterogeneità e che la capacità di self-renewal sia ristretta ad un subset di queste cellule (58).

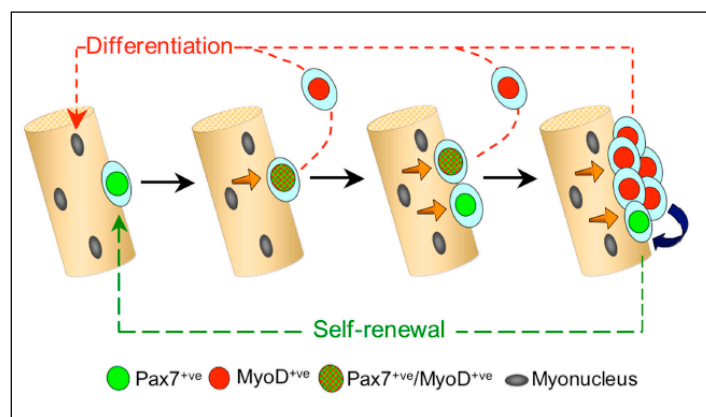


Fig. 1.1. *Modello ipotizzato per l'autorigenerazione delle cellule satelliti [Tratto da Zammit]*

Anche il meccanismo che permette l'attivazione delle cellule in risposta al danno non è ancora del tutto chiaro: risposta infiammatoria e rilascio di fattori di crescita svolgono sicuramente un ruolo chiave. Un ruolo dei linfociti è stato proposto osservando che cellule satelliti quiescenti presentano molecole di adesione vascolari VCAM1, un'integrina, mentre leucociti infiltrati esprimono uno specifico corecettore VLA4, un'integrina $\alpha 4\beta 1$ (59). È stato proposto un modello nel quale le interazioni cellula-cellula, mediate dal legame tra VCAM1 e VLA4, potrebbero scatenare la risposta genetica nelle cellule satelliti e nelle cellule immunitarie per promuovere la rigenerazione (60). I polimorfonucleati migrerebbero nella sede del tessuto danneggiato entro poche ore dal trauma. In particolare i macrofagi, oltre a fagocitare le cellule necrotiche produrrebbero dei fattori di crescita solubili, non ancora identificati, con effetto fitogeno specifico per i mioblasti (61;62). Inoltre, è stato ipotizzato in diversi lavori (63;64), che l'attivazione delle cellule satelliti dallo stato di quiescenza alla differenziazione in miotubi sia mediato anche dall'ossido nitrico, con un meccanismo ancora non chiaro. Le fibre muscolari sono sempre soggette a stress meccanici dovuti alla loro normale attività; se questi superano un livello soglia oltre il quale le fibre vengano danneggiate, viene attivata la NO sintetasi che rilascia l'ossido nitrico nelle zone circostanti. Per tale motivo si utilizza il profilo di rilascio di tale sostanza da parte delle cellule in coltura come tecnica di analisi del grado di attivazione, e quindi di crescita e differenziazione delle stesse. Una volta attivate dal danno, queste cellule migrano verso l'area danneggiata e, dopo alcuni cicli di proliferazione, fondono tra di loro o con fibre pre-esistenti per formare cellule muscolari multinucleate, i miotubi, che dopo vascolarizzazione e innervazione maturano in miofibre (65;66). Tale attivazione non

avviene solo nella zona di danno, ma anche nelle fibre muscolari circostanti, le cui cellule satelliti migrano verso la fibra danneggiata (Fig.1.2).

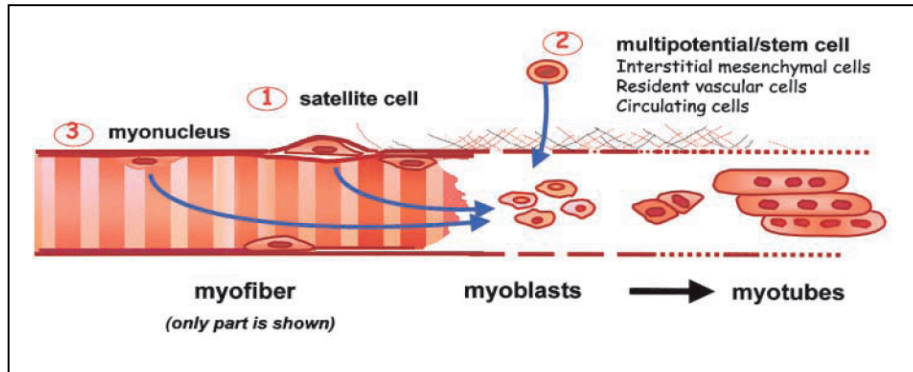


Fig. 1.2. Le cellule satelliti (1), in corso di danno muscolare si attivano, proliferano e si differenziano in mioblasti, che fondendosi tra loro e con i mionuclei preesistenti (3) formano i nuovi miotubi. Popolazioni di cellule staminali multipotenti, mesenchimali interstiziali, vascolari residenti e circolanti (2) contribuiscono alla rigenerazione del muscolo scheletrico.

1.C.3 Altri precursori muscolari

Recentemente sono state isolate diverse popolazioni cellulari con caratteristiche diverse dalle satelliti che sono in grado però di partecipare alla rigenerazione di un muscolo danneggiato. Alcuni studi hanno identificato nel muscolo adulto due diverse popolazioni cellulari, una costituita da cellule determinate a diventare precursori miogenici e a differenziare in miotubi con facilità *in vitro*, **Main Population** e una popolazione meno numerosa di staminali pluripotenti, **Side Population**, che esprime i *markers* tipici delle cellule staminali Sca-1 e CD45 (quest'ultimo espresso da cellule ematopoietiche) ma non quelli delle cellule miogeniche Desmina e Pax7; questa popolazione possiede una scarsa capacità di differenziare *in vitro* ma mantiene un notevole potenziale miogenico *in vivo*

(67;68), tanto da essere considerata come una valida indicazione terapeutica per la cura della distrofia muscolare (69). L'identificazione di queste popolazioni cellulari è stata resa possibile dall'avvento di nuove tecniche di isolamento e caratterizzazione delle cellule, come il FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*); la Side Population infatti è stata identificata in base alla caratteristica di avere dei trasportatori di membrana in grado di espellere l'Hoechst 33342(70). Si è visto inoltre che anche alcune cellule di midollo osseo possono differenziare in cellule muscolari (67;71-75), ma sembra che non partecipino alla formazione della Side Population (75). Altri laboratori hanno separato le cellule ottenute da digestione enzimatica di muscolo in base alle caratteristiche di adesione ottenendo tre popolazioni cellulari:

- Early Preplate; aderisce rapidamente in vitro, è inizialmente quiescente per qualche giorno e con scarsa capacità proliferativa ma con ottime caratteristiche di fusione;
- Late Preplate che aderisce più tardi, prolifera poco e non fonde in miotubi;
- Muscle-Derived Stem Cells, più rara, che deriva da quest'ultima e possiede notevoli capacità proliferative, oltre alla capacità di fondere con le miofibre una volta iniettata in un muscolo danneggiato (76).

Non è ancora del tutto chiaro in quale proporzione le diverse popolazioni cellulari sono implicate nel ripristino del muscolo dopo un danno né le loro vie di attivazione e di proliferazione.

1.C.4 Terapie cellulari nelle miopatie

Con il termine “trapianto di mioblasti” si intende l'impianto in un muscolo di precursori cellulari capaci di differenziare in tessuto striato. La maggior parte degli studi su questo tipo di trapianto sono improntati, quindi, sul trattamento delle miopatie del muscolo

scheletrico (soprattutto di origine genetica) e cardiaco (cardiomiopatie da eziologia ischemica). Nel 1978 Partridge e colleghi posero le basi del trapianto di mioblasti: proposero che l'iniezione intra-muscolo di precursori cellulari muscolari potesse essere una potenziale terapia per le miopatie a trasmissione genetica, le quali comportano una diminuita capacità del muscolo scheletrico di contrarsi. Come il successo nel trapianto d'organi dipende da una corretta preparazione e conservazione dell'organo trapiantato, nella buona procedura chirurgica e nella sopravvivenza una volta impiantato nell'ospite, allo stesso modo per il successo dell'impianto di cellule sono importanti tre fattori:

- 1) Le cellule utilizzate;
- 2) La procedura di *delivery*;
- 3) La sopravvivenza delle cellule impiantate nell'ospite.

Le cellule devono essere precursori miogenici non ancora differenziati. Per le loro caratteristiche le cellule differenziate del muscolo scheletrico non possono essere utilizzate per il trapianto: infatti, le miofibre sono molto lunghe e altamente specializzate in sincizi che non possono entrare in mitosi. La possibilità di ottenere un donatore cellulare miogenico è quindi data dalle cellule satelliti e dai mioblasti. Per quanto riguarda invece la procedura di *delivery*, le tecniche utilizzate sono l'iniezione intra-muscolo e quella intra-vasale. La prima permette di iniettare un numero sufficiente di donatori miogenici nella zona in cui si crea un danno: le cellule, quindi, fondono solo nella sede d'iniezione e non in zone diverse. Per compensare questa limitazione in alcuni studi sono state iniettate molteplici zone parallelamente equidistanti tra loro, in modo da ottenere un'omogenea distribuzione di mioblasti (77). La sopravvivenza delle cellule impiantate nell'ospite dipende dalla risposta delle cellule immunocompetenti, che può essere precoce o tardiva.

1.C.5 Terapie cellulari in strutture muscolari viscerali

La medicina rigenerativa, nelle sue branche della terapia cellulare e dell'ingegneria tissutale, ha cercato di dare risposte a vari problemi clinici. Nell'ambito delle disfunzioni urologiche, le esperienze nel campo della ricerca sperimentale hanno portato recentemente ad interessanti applicazioni nella patologia umana (78). Per quanto riguarda in particolare la terapia cellulare, Atala per primo ha proposto l'impianto di condrociti autologhi iniettati nel meato ureterale in un modello animale di reflusso vescico-ureterale (79). In seguito l'esperienza è stata ripetuta in ambito clinico con buoni risultati a breve termine (80). I potenziali vantaggi di questa tecnica includono la persistenza dell'effetto sostenuta dai condrociti vitali e l'esclusione di rischi di non biocompatibilità grazie alla natura autologa delle cellule usate. Tuttavia persistono problemi maggiori correlati soprattutto al modesto tasso di sopravvivenza delle cellule trapiantate e inoltre, ovviamente, non è stata descritta alcuna loro attività funzionale. Nel 2001 Yokoyama e coll. Hanno mostrato per la prima volta che cellule derivate da muscolo scheletrico iniettate in un uretra normale persistevano più a lungo di collagene bovino (81). Huard e coll. hanno mostrato che il successo del trapianto di cellule può essere migliorato usando una particolare popolazione cellulare chiamata "muscle derived stem cell" (MDSC vedi sopra) (82). In particolare le MDSC sono state riconosciute capaci non solo di sopravvivere nel tratto urinario inferiore ma anche di migliorare le capacità contrattili del detrusore vescicale dopo un danno indotto sperimentalmente. Più recentemente Yiou e coll. hanno anche mostrato che precursori ottenuti con altra tecnica, Muscle Precursor Cells (MPCs) possono essere usati per ripristinare unità motorie funzionali in un modello di danno irreversibile dello sfintere ureterale (83;84). Le MPCs sono la popolazione di precursori ottenuti dalla coltura delle fibre muscolari intatte e sono quindi rappresentate principalmente dalle cellule satellite (vedi 2.2) (85). È stato inoltre dimostrato un ruolo nella rigenerazione nervosa, per opera di precursori muscolari, dopo danno sull'innervazione vescicole (86). Le premesse

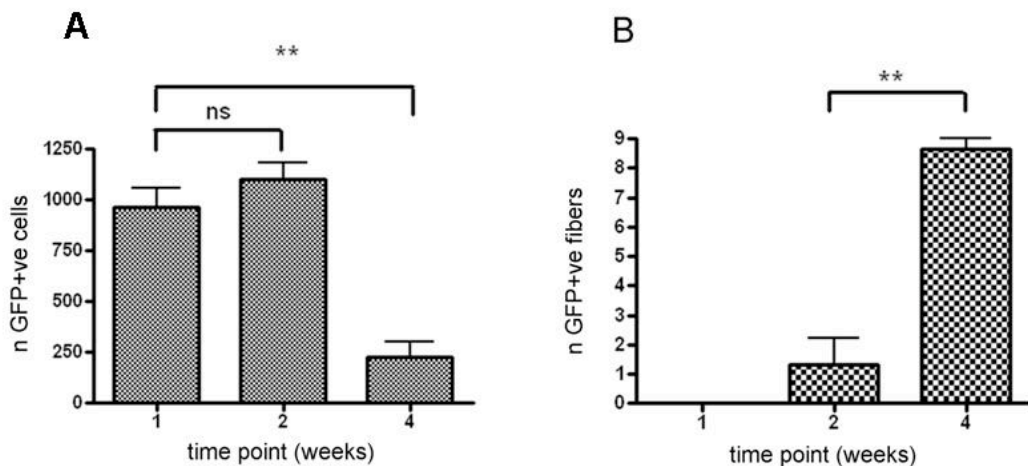
sperimentali nell'uso di precursori scheletrici nelle basse vie urinarie hanno portato alla loro applicazione in clinica. In un trial clinico in fase I/II, muscle-derived stem cells autologhe sono risultate efficaci nel trattamento dell'incontinenza urinaria. L'iniezione consisteva di tre componenti: mioblasti, fibroblasti e collagene. Le cellule erano somministrate con iniezione trans-uretrale eco-guidata in pazienti rimasti asintomatici per un anno (87).

Un interessante risvolto nello studio delle potenziali applicazioni di precursori scheletrici è la loro potenziale trans-differenziazione. Infatti, la "plasticità" (vedi 1.1) di tali precursori ne fa presupporre l'utilizzo nella strutture viscerali costituite da muscolo liscio. Huard ha mostrato come nel suo modello di riparazione del danno sul detrusore vescicale i precursori di origine scheletrica (MDSC) esprimano marcatori di differenziazione muscolare liscia. In vitro tale fenomeno è stato indotto tramite l'uso di fattori di crescita come il VEGF (88). L'espressione di geni tipici del fenotipo muscolare liscio (alfa Smooth Muscle Actin) è stata evidenziata in precursori isolati da muscolo scheletrico definiti non-SP (vedi 2.3) (89). Tuttavia tale espressione è considerata transitoria nei mioblasti, che la mantengono in vitro fino all'espressione dell'actina sarcomerica, circa 7 giorni da quando vengono posti in coltura. In vivo non è stata segnalata espressione di alfa SMA oltre il primo giorno dopo iniezione nel muscolo scheletrico (90).

L'individuazione di una fonte di precursori del muscolo liscio nel muscolo scheletrico potrebbe essere importante nell'ambito della rigenerazione del tratto digerente. Infatti, l'ingegnerizzazione di segmenti intestinali ha dato ancora risultati poco convincenti, in particolare riguardo alla rigenerazione dello strato muscolare dei visceri (91). Inoltre precursori specifici del tessuto muscolare liscio non sono stati chiaramente individuati nei tessuti adulti (92).

1.C.6 Lavoro preliminare

Il modello di rigenerazione della GEJ dopo danno da congelamento usato nel progetto, è stato preliminarmente utilizzato per ottenere dati su time point a breve termine pubblicati dal nostro gruppo nel 2007 (137). In questo lavoro abbiamo esplorato la possibilità di iniettare nella GEJ le MPCs come agente biologico. Per valutare la capacità di tali cellule di rigenerare il tessuto muscolare in questa peculiare sede abbiamo utilizzato il modello di danno da congelamento estensivamente usato nello studio della rigenerazione muscolare scheletrica e cardiaca. Nel nostro studio preliminare è stata osservata una progressiva riduzione delle cellule mononucleate che inizialmente venivano riscontrate, dopo una settimana dall'iniezione, prevalentemente raccolte nello spazio sottomucoso. Tale riduzione coincideva con la progressiva integrazione a livello dello strato muscolare e la partecipazione alla formazione di neo-fibre muscolari. Inoltre si osservava una transitoria espressione, a 2 settimane, di marcatori di muscolo liscio. A quattro settimane il numero di fibre non aumentava e cellule mononucleate non erano più riscontrabili (Fig 1.3).



Questo studio porta alla conclusione che l'iniezione è fattibile e che cellule precursori muscolari scheletrici possono avere un ruolo nella rigenerazione dello strato muscolare delle alte vie digestive. Inote tali risultati hanno spinto all'esecuzione di ulteriori esperimenti n vivo e in vitro oggetto di questo lavoro di Tesi.

1.C.7 Precursori del sistema nervoso enterico

Il sistema nervoso enterico (ENS) è parte del sistema nervoso periferico che controlla la motilità e la secrezione della parete intestinale. E' stato segnalato come fino al 20 % degli individui soffra di patologie che coinvolgono il ENS, includendo tra queste l'intestino irritabile e il GERD (93). I neuroni e la glia di cui è composto il ENS sono organizzati in gangli e complesse connessioni conosciute come plessi: mioenterico, sottomucoso e mucoso (Fig.2.4).

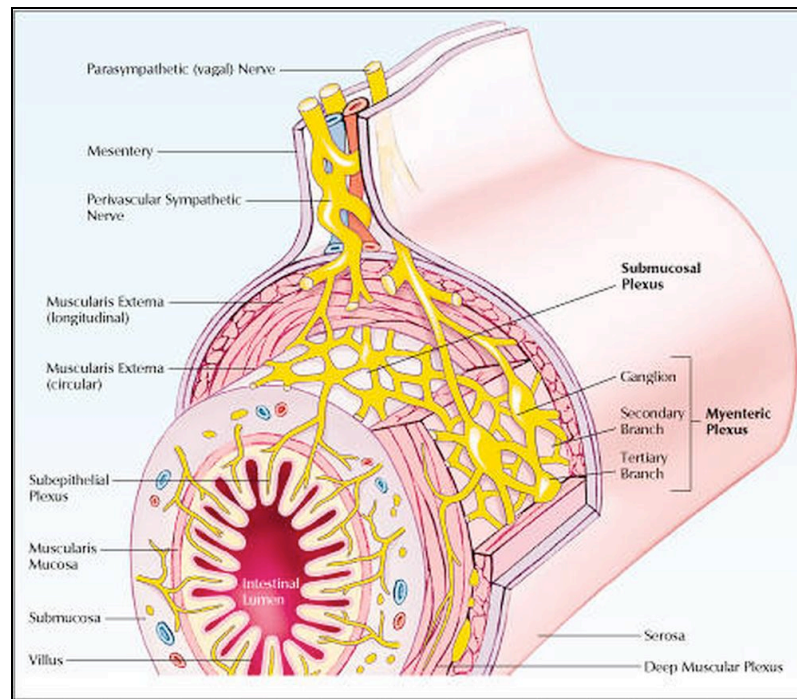


Fig.2.4 *schema delle componenti del sistema nervoso enterico (ENS).*

Gli elementi che danno origine a queste strutture derivano durante l'embriogenesi principalmente dalla cresta neurale (94), queste cellule invadono il mesenchima dell'intestino embrionale al 9^o giorno dalla fecondazione e completano la colonizzazione in senso cranio-caudale al 13.5 giorno. L'incompleta migrazione dei precursori determina patologie come la malattia di Hirschsprung (95). La migrazione delle cellule della cresta

neurale nell'intestino è accompagnata dall'espressione di geni specifici (*Sox 10*) secondo uno schema che mantiene un fenotipo indifferenziato fino a quando le cellule arrivano in prossimità dell'intestino craniale. A questo punto l'attivazione di *Mash 1* è l'indice della iniziale differenziazione in senso neuronale mentre *Ret* contribuisce alla proliferazione e migrazione (96). Inoltre l'espressione di marcatori neuronali specifici (Tubulina-TuJ1 e PGP9.5) si completa entro le 2 settimane dopo la nascita. L'interesse per cellule che siano in grado di colonizzare la parete dell'intestino, come possibile terapia delle patologie della motilità, ha portato all'isolamento, prima nei roditori poi nell'uomo, di precursori presenti in epoca fetale e postatale. L'ipotesi della presenza nell'intestino di cellule indifferenziate, in grado di formare tessuto nervoso maturo, è stata suggerita dall'osservazione nei gangli dei plessi del ENS di topo neonato, di una percentuale (1-4%) di cellule non neuronali, non gliali (97). Sono state quindi isolate cellule con la proprietà di *self renewal*, in grado di ricostituire in vitro e in vivo neuroni e glia, note come neural crest stem cells (NCSCs) (98). L'assenza di molecole di membrana specifiche al 100% delle cellule staminali ENS, unita alla difficoltà di mantenere colture di cellule proliferanti che rimangano indifferenziate, risulta difficile una migliore caratterizzazione (93). Sono state, finora, messe a punto diverse tecniche per l'isolamento di tali precursori. Una di esse prevede la coltura di una sospensione cellulare dell'intera parete dell'intestino, per ottenere NCSCs fetali, o dello strato muscolare esterno, nel caso delle postatali. Tali colture dopo 24 ore non esprimono markers neuronali o gliali. Dopo la formazione di caratteristiche colonie cellulari dopo 10 giorni si osserva la formazione di aggregati cellulari che si distaccano dalle piastre e restano in sospensione (neurosphere like bodies, NLBs). Queste strutture presentano cellule neuronali e glia come dimostrato dagli staining specifici (Fig.2.5). Vista l'iniziale negatività si deve dedurre che queste formazioni derivino da precursori indifferenziati. L'origine dalla cresta neurale di tali precursori è confermata dalla loro

assenza in colture derivate da tessuto di animali RET-deficienti.

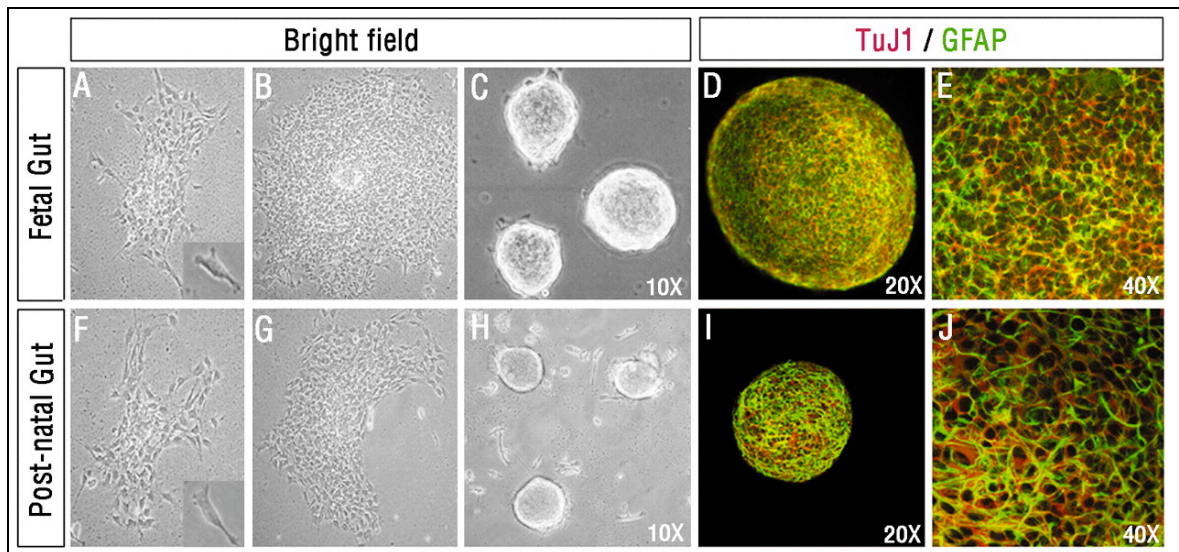


Fig.2.5 *A e F: caratteristiche colonie derivate da cellule intestinali murine di feto e postatale rispettivamente dopo 2-3 giorni in coltura; B e G:dopo 5 giorni; C e H: dopo 10 giorni si vedono le caratteristiche NLBs. D, E, I, J: Queste ultime sono positive per i marcatori neuronali e gliali (vedi nel testo).Tratto da Bondurand development 2003*

Dalle neurosfere così ottenute si possono ottenere colonie di cellule ad alto indice di replicazione non esprimenti markers neuronali o gliali maturi (TuJ1 o GFAP) se non dopo espansione e successiva differenziazione. Infatti, in vitro le cellule derivate dalle NLBs ripercorrono il profilo ontogenetico dei progenitori del ENS. Più in dettaglio, appena in coltura le colonie proliferanti derivate da NLBs esprimono Sox 10, mentre Mash 1 e Ret compaiono solo più tardi. In seguito si ottengono fenotipi neuronali e gliali maturi confermando la natura bipotenziale dei precursori. Dalle colonie di progenitori, ottenute come descritto, si ottengono fenotipi neuronali caratteristici del sistema nervoso enterico. Si possono infatti ritrovare sub-set cellulari esprimenti la Tyrosine Hidroxylase (TH), tipicamente espresso transitoriamente dai neuroni derivati dalla cresta neurale vagale che migrano nell'intestino dei roditori; il peptide vasoattivo (VIP), neuropeptide-Y (NPY) e il peptide correlato al gene della calcitonina (CGRP) che sono neuro-peptidi tipici dei

neuroni del ENS dei mammiferi. Ancora più interessante è la capacità di queste cellule di colonizzare la parete intestinale in una coltura organotipica di intestino embrionale di mutanti *Retk-* (99). Precursori ottenuti secondo questo metodo sono stati trapiantati in vitro in segmenti di intestino umano (100). Inoltre precursori umani hanno la proprietà di migrare dalle neurosfere nella parete di intestino embrionale distale aganglionico e differenziare in glia e neuroni esprimendo markers caratteristici del ENS, inclusa la sintesi dell'ossido nitrico (NOS), e il VIP (101). Vista la similitudine tra i precursori ottenuti dal ENS e dal SNC, sono state riportate esperienze di impianto di questi ultimi nel tratto digerente. Micci ha impiantato NCSCs ottenute dalla regione subventricolare di embrione nell'antro gastrico di topi *NOS*-deficienti, che sono noti per avere un rallentamento nello svuotamento gastrico. In questo lavoro l'autore ha dimostrato non solo la sopravvivenza e differenziazione delle cellule impiantate in neuroni esprimendo NOS, ma anche il miglioramento nello svuotamento gastrico degli animali trattati (102).

Le conoscenze sulla presenza di questi precursori nei tessuti adulti, sebbene la loro potenzialità sia attualmente reputata inferiore a quella della controparte fetale, fanno pensare a potenziali approcci terapeutici per le disfunzioni del NES. Gli approcci teorici potrebbero essere due: stimolare la neurogenesi delle cellule endogene o attuare una terapia cellulare autologa dopo espansione di precursori derivati da tessuto enterico dello stesso individuo (93).

Capitolo 2. Scopi della tesi

L'interesse per le emergenti tecniche endoscopiche per il trattamento del GERD, unite alle conoscenze sulle terapie cellulari e l'ingegneria tissutale del muscolo scheletrico, hanno ispirato questo studio. Nella prima parte del lavoro, abbiamo usato un modello murino di danno della GEJ, per esplorare la capacità di precursori muscolari scheletrici (*muscle precursor cells* MPCs), di sopravvivere e differenziare in fenotipo muscolare maturo dopo iniezione a medio e lungo termine. Preliminari risultati sul medesimo modello ci hanno spinto ad appurare in vitro le capacità differenziative in senso muscolare liscio di precursori scheletrici. Inoltre nell'ottica di "impianti funzionali" abbiamo preso in considerazione la possibilità di elaborare più complessi sistemi cellulari iniettabili coinvolgenti precursori del sistema nervoso enterico. In una seconda fase ci siamo interessati a tecniche di isolamento e coltura che limitassero i passaggi in coltura dei precursori muscolari, fattore determinante nell'ipotesi di utilizzo in clinica. Ulteriori esperimenti sono stati condotti nell'ipotesi di trattamento dell'incontinenza dello sfintere anale interno acquisita (es. gravi compromissioni neurologiche) o congenita (malformazioni ano-rettali). A tale scopo è stato disegnato un modello murino di danno meccanico per uno studio preliminare.

Capitolo 3: Materiali e metodi

3.1 Colture cellulari

Isolamento e coltura delle muscle progenitor cells (MPCs).

In questo studio sono state utilizzate MPCs derivate da una omogenea popolazione di cellule satelliti. Le cellule satelliti sono state isolate dalla singola miofibra come descritto in precedenza. (103). In breve, il muscolo *flexor digitorum brevis* e' stato prelevato da topi esprimenti la proteina di fluorescenza *green fluorescent protein* (GFP). I muscoli sono stati digeriti in Collagenasi tipo 1 (SIGMA-Aldrich, Saint Louis USA) al 0.2% in DMEM a 37°C per 3 ore. Dopo diluizione, le fibre sono state selezionate usando uno stereomicroscopio da dissezione. Le singole fibre sono state seminate su piastre pre-rivestite con Matrigel (BD Labware, Franklin Lakes, USA) e mantenute con una minima quantità di terreno di coltura in incubatore per colture cellulari per 72 ore. Al terzo giorno si è aggiunto il medium di proliferazione (DMEM, 20% fetal bovine serum (FBS), 10% horse serum; Invitrogen, Milano Italy), successivamente sostituito ogni 3 giorni. MPCs sono state poi espanse fino a circa il 20^o giorno prima di essere distaccate con lavaggio di tampone citrato per l'iniezione in vivo. Un milione di queste cellule contato con il Coulter Counter (Beckman, Fullerton USA), è stato usato per l'analisi citofluorimetrica.

Coltura primaria di muscolo scheletrico adulto.

Per la citofluorimetria sono stati utilizzati animali wild type C57BL6J e TGN-eGFP C57BL6J per le cellule da iniettare. Sono stati prelevati gastrocnemi (in toto: gemelli, soleo, plantaris, fascia), quadricipiti e tricipiti delle zampe anteriori. Eliminati epimisio, fasce connettivali e grasso al microscopio da dissezione, i muscoli sono lavati in PBS e

successivamente stati triturati con lama da bisturi ulteriormente lavati in PBS prima di sospenderli in Collagenasi 0,2% in DMEM a 37°C. Dopo un'ora è stata aggiunta tripsina 0,25% in PBS (20 ml) e sono stati eseguiti 3 cicli. Ogni 15 minuti il surnatante ricco di cellule in sospensione è stato raccolto e la tripsina è stata inattivata con FCS. Le cellule raccolte sono filtrate con filtro da 40 micron di diametro e centrifugate a 1500 RPM per 10 minuti a RT. Risospese in F12+20% FCS, le cellule sono state contate e seminate in petri tissue culture. I cambi terreno sono stati eseguiti ogni 3 giorni.

Isolamento e preparazione delle satelliti isolate fresche (FISCs).

Singole fibre ottenute da extensor digitorum longus (EDL) o muscolo soleo tramite digestione enzimatica (collagenasi tipo I 0,2% in DMEM), sono state trasferite in tubi con 1 ml DMEM. Successivamente le cellule satellite sono state dissociate dalle fibre tramite passaggi ripetuti (20 passaggi) attraverso ago da 18G e aspirazione in siringa da 1ml. La sospensione risultante è stata quindi filtrata con filtro da 40 μ m (Falcon) e centrifugata a 450 RPM per 15 min. Le cellule sono state poi risospese in 10 μ l di soluzione salina fisiologica prima dell'iniezione.

3.2 Caratterizzazione delle MPCs, FISC e coltura primaria.

MPCs sono state marcate con anticorpi FITC- o PE-labeled contro CD34, CD44, CD45, CD90 (Thy-1.1), Sca-1, CD117 (c-kit), Flk-1, MHC I e II (BD Pharmingen, San Diego USA). L'analisi è stata eseguita usando il citometro Beckman Coulter (COULTER Epics XL-MCL; Fullerton USA; EXPOTM 32 ADC Software).

Stessi markers sono stati testati per la coltura primaria. Le FISC sono state caratterizzate mediante immuno-staining per Pax7, Myf5, MyoD, CD45, CD163, CD31 in precedenti esperimenti.

3.3 Impianto.

Per tutti gli esperimenti sono stati utilizzati topi C57BL/6 wild-type e topi transgenici C57BL/6-TgnEGFP di un'età tra 4 e 6 mesi. Gli animali sono stati allevati e operati presso lo stabulario del Centro Interdipartimentale Vallisneri, University of Padova, secondo le condizioni specificate nel "D.L. 27-1-92, numero 116, circolare applicativa del Ministero della Sanità numero 8 del 22-4-1994". Gli animali hanno avuto libero accesso ad una dieta standard fino al momento dell'intervento. Gli animali appartenenti al gruppo di studio hanno ricevuto l'iniezione di MPCs, o FISC, il gruppo di controllo per gli esperimenti a lungo termine (1,3 e 6 mesi) ha ricevuto cellule da primaria di muscolo intero. Un ulteriore controllo è stato ottenuto iniettando, in un gruppo di animali (sham group) lo stesso volume di soluzione salina fisiologica. Gli animali sono stati sottoposti ad anestesia generale inalatoria con isoflurane 2%. Sotto ingrandimento 12x (microscopio chirurgico ZEISS, Thornwood USA) è stata eseguita una laparotomia sulla linea mediana per esporre la giunzione gastroesofagea (GEJ) dopo aver sezionato i legamenti epatogastrico e gastrosplenico. Il danno da freddo è stato eseguito seguendo il metodo descritto in modelli di rigenerazione della vescica e del miocardio (104;105). , uno specillo metallico (0.5 mm di diametro) pre-raffreddato in azoto liquido, è stato piazzato per 10 secondi su la parete anteriore e posteriore della GEJ. Dopo aver indotto il danno, è stato iniettato un totale di 5×10^6 cellule nei due siti (parete anteriore e posteriore) del GEJ utilizzando una siringa micrometrica con ago da 30 gauge. In un ulteriore gruppo di controllo sono state iniettate 5×10^5 (low density). Quest'ultimo gruppo è stato posto in confronto con il gruppo che ha ricevuto l'iniezione di FISCs. L'ago veniva infisso attraverso la membrana sierosa circa 3 mm al disotto della GEJ e la punta portata fino a 3 mm al disopra. L'iniezione veniva eseguita durante la lenta retrazione dell'ago. La laparotomia è stata chiusa con doppio strato con punti in PDS®. L'intervento Sham

prevedeva le stesse procedure eccetto per l'iniezione che era costituita di solo soluzione salina. Un ulteriore controllo è stato ottenuto iniettando in alcuni animali le MPCs senza preventivamente sottoporre la GEJ a danno da freddo (undamaged group). Gli animali sono stati strettamente monitorati nelle successive 72 ore e hanno ricevuto la somministrazione di analgesici per tre giorni (Tramadol 10 mg/kg).

3.4 Contrastografia esofago-gastrica.

Una valutazione radiografica è stata eseguita per escludere grossolane alterazioni dell'esofago e dello stomaco e provocate dall'iniezione delle cellule o dal solo danno da freddo. Gli animali sono stati, quindi, sottoposti ad una contrastografia delle prime vie digerenti prima di venire sacrificati ai time point di 4 settimane e 6 mesi. Lo studio è stato condotto su animali iniettati con MPCs, FISCs, animali del gruppo Sham e animali normali. Il mezzo di contrasto [Diatrizoate Meglumine (GASTROGRAFIN®, Schering Sp)] è stato somministrato attraverso un sondino oro-faringeo CH 5 sotto anestesia generale iniettiva (XILAZINA + ZOLETIL®, Bio 98 Bologna, Verbac Milano, Italy) prima di essere sacrificati. Sono state acquisite immagini sequenziali per escludere stenosi.

3.5 Impianto nello sfintere anale

Vedi 3.1.3 per animali, trattamento preoperatorio, anestesia e post-operatorio. Gli animali sono stati sottoposti a danno meccanico caratterizzato da stretching forzato mediante dilatazione pneumatica con pallone (controllo monometrico fino al raggiungimento di una pressione 2 ATM per un diametro di 8 mm). Si è utilizzata una sonda con pallone per dilatazione esofagee endoscopiche (M00558390 BOSTON SCIENTIFIC). Dopo il danno, gli animali appartenenti al gruppo di studio hanno ricevuto l'iniezione di MPC (5×10^5 divisa in 2 siti) tra il margine cutaneo e linea pettinata con ago da 30G nello spessore muscolare. Gli animali controllo sono stati sacrificati a time points brevi 1, 2, 4 settimane.

Sono stati utilizzati 3 animali per time point al solo scopo di valutare l'integrazione delle cellule.

3.6 Istologia e immunoistochimica.

Gli animali sono stati sacrificati per dislocazione cervicale a seconda del gruppo di allocazione a 1, 2, 4 settimane, 3 e 6 mesi. Le GEJ e le porzioni terminali del canale ano-rettale, sono state prelevate e fissate in paraformaldeide 2% in PBS per 2 ore e, dopo rapido lavaggio in PBS, mantenute in saccarosio 30% in acqua per 24 ore. I campioni sono stati congelati in isopentano raffreddato in azoto liquido e sezionati al criotomo, ottenendo sezioni di 10µm di spessore. Le sezioni sono state conservate a -80°C fino all'analisi. Per l'analisi istologica convenzionale sono state eseguite colorazioni con ematossilina ed eosina, tricromica di masson. L'analisi immunoistochimica è stata eseguita usando anticorpi anti-GFP (rabbit polyclonal; Molecular Probes-Invitrogen, Milano Italy), anti-Desmina (rabbit polyclonal; Cappel MP USA) e anti- α SMA (mouse monoclonal; SIGMA-Aldrich, Saint Louis USA). I campioni sono stati incubati con gli anticorpi anti-GFP o anti-desmina, diluiti 1:100. I campioni testati per la GFP sono stati successivamente incubati con anticorpo secondario FITC-coniugato anti-rabbit IgG (Roche, Milano Italy), mentre le sezioni analizzate per desmina sono state incubate con anticorpo secondario Cy3-coniugato anti-rabbit (Jackson, Cambridgeshire UK) diluito 1:200. Le sezioni sono state colorate con DAPI (0.1 µg/ml) e montate in anti-fade fluorescent mounting medium (Dako Cytomation, Milano Italy). L'analisi immunoistochimica per α -smooth muscle actin (α SMA) è stata condotta usando anticorpo mouse monoclonal anti- α SMA (SIGMA), dopo protocollo Mouse On Mouse immuno-staining (Vector, Burlingame USA); quella per Anticorpo anti-VACHT (mouse monoclonal, diluito 1:50, Phoenix Europe GmbH). L'espressione del vesicular acetylcholine transporter è stata usata come indice di connessioni

sinaptiche mature tra neofibre e terminali vagali.

L'anticorpo secondario usato era Cy3 anti-mouse (Jackson). Le sezioni così colorate sono state analizzate con microscopio ad epifluorescenza (LEICA DMR Wetzlar Germany) accoppiato ad una fotocamera CCD ad alta risoluzione (LEICA DFC 480, Leica). Il software per l'acquisizione dell'immagine era il LEICA IM500 version 4.0. Le cellule e le fibre GFP+ve sono state contate per dare un'espressione quantitativa della sopravvivenza delle cellule come funzione del tempo trascorso dall'iniezione. Sono stati scelti i tre campioni con il miglior risultato per ciascun time point e la migliore sezione per ciascuno di essi è stata selezionata e contata. L'analisi statistica è stata fatta usando il *t test*. I risultati sono stati espressi come media e deviazione standard (SD).

3.2 Esperimenti in vitro

Co-coltura di MPCs con cellule muscolari lisce.

Coltura di MPCs

Le cellule satellite murine sono state ottenute con il metodo descritto in 3.1.1. per l'isolamento della singola fibra è stato utilizzato il *flexor digitorum brevis* delle zampe posteriori di topi transgenici esprimenti la proteina di fluorescenza GFP (Charles river, USA). Le fibre ottenute sono state seminate su vetrini pre-rivestiti con matrigel in piastre multiwell-24.

Coltura di cellule muscolari lisce (SMCs)

Cellule muscolari lisce sono state ottenute da animali wild type con la tecnica descritta in precedenza (88). In breve, lo strato muscolare della vescica urinaria è stato separato dalla sua mucosa sotto il microscopio da dissezione e sminuzzato con lama di bisturi. Le cellule

sono state dissociate in collagenase tipo 1 0.2% e seminate in piastre multiwell-6 tissue culture. Il medium (20% FBS, 1% SP in DMEM) con aggiunta di TGF beta1 5 ng/ml (SIGMA-Aldrich, Saint Louis USA) è stato sostituito ogni tre giorni. Raggiunta la confluenza, le cellule sono state distaccate con tripsina-EDTA contate e sospese in medium da muscolo liscio.

Cocoltura MPCs e SMCs

La sospensione così ottenuta è stata seminata sulle MPCs ottenute da topo GFP+ve. Dopo 3 giorni il medium è stato cambiato con medium per muscolari lisce e i vetrini fissati dopo 5 giorni di co-coltura in paraformaldeide 4% per 5 minuti a temperatura ambiente e mantenuti in PBS a 4°C fino all'analisi. I vetrini sono stati sottoposti a stainings per gli anticorpi anti- α SMA e anti-smooth muscle myosine heavy chain (monoclonale in mouse, SIGMA). Il protocollo prevedeva incubazione a temperatura ambiente con cloruro di ammonio (NH₄Cl) per 20 minuti, permeabilizzazione con Triton o Metanolo (ice-cold) per 10 minuti, incubazione con l'anticorpo primario diluito 1:40 in BSA in camera umida per un'ora a temperatura ambiente. Dopo i consueti tre lavaggi in PBS è stato posizionato l'anticorpo secondario (goat anti-mouse 594-coniugated, INVITROGEN) diluito 1: 200. I vetrini sono poi stati colorate con DAPI (0.1 μ g/ml) e montate in anti-fade fluorescent mounting medium.

Co-coltura di MPCs con precursori del ENS.

Coltura di MPCs

Le cellule satellite murine sono state ottenute con il metodo descritto in 3.1.1. per l'isolamento della singola fibra è stato utilizzato il *flexor digitorum brevis* delle zampe posteriori di topi CD1 *wild tipe* (Charles river, USA).

Isolamento di precursori del sistema nervoso enterico (ENS) fetale.

Neurosphere like bodies (NLBs) da tessuto enterico sono state ottenute come descritto in precedenza (99). In breve, l'intestino *in toto* di embrioni E11.5 (Parkes outbred mice) è stato prelevato posto in medium L15 (Invitrogen, UK) lavato con PBS Ca^{++} - Mg^{++} free. Gli intestini sono quindi stati posti in collagenase/dispase 0.1% (Roche, UK) per 6 minuti a temperatura ambiente, la sospensione ottenuta è stata seminata in medium NCSC [15% chicken embryo extract (CEE) and basic fibroblast growth factor (bFGF; 20 ng/ml; R&D Systems)], su piastre multiwell-6 prerivestite con fibronectina [20 mg/ml fibronectin (Sigma)]. Il medium è stato cambiato ogni 2 giorni. Una volta comparse le NLBs (*neurosphere like bodies*), è stato aggiunto al medium human recombinant epidermal growth factor (hrEGF) (20 ng/ml; Calbiochem). Passaggi successivi sono stati eseguiti per ottenere il numero desiderato di NLBs (approssimativamente 6 giorni).

C-colture MPCs e ENS precursors

Prima di ricevere le ENS precursors, le MPCs presenti su ciascuna piastra sono state contate. Le ENS precursore sono state quindi seminate in rapporti differenti sulle MPCs. Le colture sono state mantenute in proliferating medium per due settimane. Sono state registrate immagini al microscopio a contrasto di fase con microscopio a luce invertita (Olympus IX71 Japan) accoppiato ad una fotocamera CCD ad alta risoluzione (LEICA DFC 480, Leica).

Western blot

Le colture cellulari sono state dissolte in 100 μl di lysis buffer (Tris-phosphate 125mM, EDTA 2mM, DTT 2mM, Triton X100 1%). Approssimativamente 45 μg di proteine sono state caricate per ciascuna corsia in gel di 12% poly-acrylamide che è stato fatto correre per 3 ore prima del blotting su membrana di nitrocellulosa (Amersham, Buckinghamshire, UK).le membrane sono state testate con anticorpi anti- Desmina (MP Biomedicals,

Cambridge, UK), anti- β -Tubulina Neuronale Classe III (Covance, Cambridge, UK) e anti-actina (Santa Cruz, Heidelberg, Germany). I filtri sono stati trattati poi con goat anti-mouse IgG HRP-conjugated e con goat anti-rabbit IgG HRP-conjugated (Dako-Cytomation, Milano, Italy). La chemoluminescenza è stata indotta con “enhanced chemiluminescence reagents” kit (Sigma-Aldrich) e la luce emessa impressionata su pellicola. La densitometria delle bande è stata registrata con Molecular Imager GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad, Hertfordshire, UK).

Capitolo 4: Risultati

4.1 Colture cellulari e caratterizzazione

Isolamento e caratterizzazione di MPCs.

Una media di 2,500 \pm 500 miofibre (Fig. 4.1A) sono state ottenute per ciascuna preparazione. Dopo 2 giorni di coltura cellule satellite attivate emergono dalla singola fibra e migrano nella piastra. (Fig. 4.1B-C). queste cellule al 7^o giorno sono confluenti e iniziano a formare miotubi. Se le MPCs vengono mantenute in coltura fino alla confluenza e alla fusione, possono essere osservati miotubi esprimenti markers di muscolo scheletrico (troponina e MyoD) dopo 8 giorni (Fig. 4.1D-F). l'analisi citofluorimetrica ha mostrato l'assenza di markers di cellule endoteliali (Flk-1, CD90) ed ematopoietiche (CD45, CD117). Importante da notare il basso livello di espressione nelle MPCs di MHC I e MHC II (Fig. 4.1G).

Isolamento e caratterizzazione di cellule da coltura primaria di muscolo scheletrico.

L'espressione relativamente alta di CD 45, 44 e 117 indica almeno una parziale contaminazione di cellule ematopoietiche. Il livello di Sca 1 conferma la presenza di cellule miogeniche. Il valore percentuale delle cellule esprimenti i markers testati è mostrato nella fig. 4.12.

Isolamento e caratterizzazione di FISCs

Dati non pubblicati dimostrano una efficienza delle FICs nel rigenerare fibre muscolari con un rapporto di 1/100 rispetto alle cellule satellite coltivate (MPCs). La purezza delle cellule ottenute con la tecnica descritta è dimostrata dagli stainings per markers specifici: Pax7 97 \pm 1% , Myf5 92 \pm 8% , MyoD 95 \pm 3%, CD45 0%, CD163 0%, CD31 0%

4.2 Impianto nella GEJ

Gli esperimenti sul modello di danno della GEJ sono stati condotti per ottenere un totale per ciascun time point di 8 animali per il gruppo trattato con le MPCs, 3 per le FISCs, 3 per il gruppo sham, 3 per il gruppo trattato con le cellule da primaria, 1 animale per il gruppo *undamaged*. Un totale di 48 animali è stato sottoposto a laparotomia in anestesia generale (Fig 4.2). Il tasso di mortalità è stato di 2/48. Entrambi gli animali deceduti sono morti entro le 24 ore dall'intervento. Tutti gli animali sopravvissuti non hanno mostrato difficoltà nell'alimentazione mostrando una crescita del peso corporeo comparabile con animali controllo normali (dati non mostrati). Il problema principale all'atto dell'iniezione è stato in alcuni casi la perdita di parte della sospensione cellulare, attraverso la breccia nella sierosa dell'esofago dovuta all'inserimento dell'ago.

Gli esperimenti preliminari sul modello di danno dello sfintere anale sono stati condotti su 9 animali complessivamente.

4.3 Contrastografia esofago-gastrica

Quattro settimane dopo l'intervento, gli animali sottoposti a iniezione di MPCs presentavano un lume esofageo pervio senza grossolane alterazioni nell'anatomia esofagogastrica, comparabili con il controllo sham e con un animale normale (Fig 4.3 A-C). Gli animali sacrificati a 6 mesi dall'iniezione di MPCs ad alta densità (5×10^6) presentavano un'immagine di "minus" nella regione della GEJ, presente in diverse acquisizioni sequenziali (Fig 4.3 D). Tali animali, similmente agli altri, non avevano presentato difficoltà nell'alimentazione fino al momento del sacrificio.

Dopo 6 mesi dall'iniezione di MPCs a bassa densità (5×10^5) o di FISCs, la giunzione gastroesofagea non presentava alterazioni di rilievo (Fig 4.4).

4.4 Istologia e immunoistochimica.

L'analisi con istologia convenzionale non ha mostrato alterazioni di rilievo delle GEJ dei vari gruppi ai time point considerati. In particolare dopo 6 mesi dal danno più o meno iniezione di cellule non si riscontrano distorsioni dell'architettura della parete muscolare né aumento del tessuto fibroso (Fig 4.5-6). Le GEJ iniettate con MPCs ad alta densità in assenza di danno da congelamento, presentano solo poche cellule mononucleate GFP positive che si riducono progressivamente senza segni di integrazione nella parete muscolare. Nella Fig. 4.7 si può osservare la presenza di una piccola quantità di cellule mononucleate nella sottomucosa di un animale undamaged dopo 4 settimane dall'iniezione di MPCs.

Nella figura 4.8 è rappresentata una sezione di GEJ di un animale sacrificato 12 settimane dopo l'iniezione di MPCs. Si può notare un notevole aumento, rispetto a quanto visto al time point di 4 settimane, delle fibre GFP+ve esprimenti la co-positività per la desmina (Fig. 4.8 B-D). A questo stesso time point sono presenti ancora alcune cellule mononucleate nello strato muscolare e non più nella sottomucosa (Fig 4.9 A). Sorprendentemente tali cellule non presentano la doppia positività per la desmina, ciò lascia pensare alla perdita del fenotipo muscolare scheletrico di tali cellule (Fig 4.9 B-D). Dopo ulteriori 12 settimane nelle sezioni di GEJ di animali iniettati con MPCs, una gran parte delle fibre dello strato muscolare esprime la GFP (Fig 4.10 A). Naturalmente le fibre sono positive per la Desmina (Fig. 4.10 B-D). La quantificazione del numero di cellule mononucleate e delle fibre GFP positive è riportato negli istogrammi in figura 4.11. In figura 4.12 sono invece rappresentati gli staining per l'espressione del recettore vescicolare dell'acetilcolina, marker della maturazione delle connessioni sinaptiche tra miofibre e terminali vagali. Si può notare che sono presenti fibre muscolari GFP+ che mostrano aree di espressione del marcatore sia a 3 che 6 mesi dall'iniezione. Tale superficie sia come

numero di fibre che come area per singola fibra non aumenta in modo significativo tra i due time points. Le sezioni delle GEJ degli animali di controllo iniettati con cellule di coltura primaria sono mostrate in figura 4.13. Come si può osservare dopo 4 settimane dall'iniezione le cellule GFP+ve si trovano ancora raccolte nello spazio submucoso, senza mostrare alcun aspetto di integrazione nella parete del viscere (4.13 A). A 12 settimane il segnale è ancora localizzato nella sede iniziale. Non si possono rintracciare strutture riferibili a miotubi maturi (4.13 B). Al time point delle 24 settimane non si può notare nessun sostanziale cambiamento nella localizzazione delle cellule e del loro grado di integrazione nell'esofago. Si può inoltre notare una riduzione del numero delle cellule (4.13 C).

Riguardo agli animali trattati con MPCs a bassa densità (5×10^5) si è riscontrato una riduzione proporzionale del numero di cellule mononucleate nelle sezioni di GEJ a 3 e 6 mesi rispetto agli animali trattati con MPCs ad alta densità. Le fibre GFP+ sono state riscontrate solo in sporadiche sezioni ed in numero mai superiore alle 2 unità. Nessuna fibra GFP+ è stata riscontrata nelle sezioni di GEJ di animali trattati con FISCs.

4.5 Iniezione nello sfintere anale.

Gli esperimenti condotti sul modello di danno da stretching forzato dello sfintere, sono da considerarsi preliminari. Ai vari time point si è osservata la presenza di un numero modesto di cellule mononucleate, per il quale non è stata eseguita una quantificazione. Sporadiche fibre muscolari a livello dello sfintere anale interno hanno mostrata in alcune sezioni a 4 settimane la positività per la proteina di fluorescenza.

4.6 Co-culture di MPCs e cellule muscolari lisce

La coltura e isolamento di cellule satelliti da topo GFP+ si è svolta come descritto per gli esperimenti in vivo. Le MPCs, derivate dalle satelliti, come usuale nelle condizioni di coltura di controllo, dopo circa 7 giorni hanno mostrato aspetti di fusione e formazione di miotubi. Con la tecnica descritta per produrre una coltura di cellule muscolari lisce si è ottenuta una popolazione morfologicamente omogenea di cellule che tendono ad assumere un aspetto fusato fino ai primi 4-5 giorni di coltura per poi distendersi sulla piastra a formare dei larghi “fazzoletti” dai margini frastagliati (Fig. 4.14 A). Queste cellule sono positive per marcatori altamente specifici del tessuto contrattile liscio come la catena pesante della miosina specifica (SM-MHC) (Fig. 4.14 B-C). Le cellule GFP+ve mostrano dopo 5 giorni nella condizione di co-cultura con cellule muscolari lisce, un aspetto simile a queste ultime, e co-esprimono il loro marcatore specifico (Fig. 4.15 A-F). Si deve pure notare che nonostante l’elevata densità cellulare nelle colture anche le cellule negative per i marcatori specifici di muscolo liscio non mostrano la tendenza a fondere che è presente nei controlli (Fig. 4.16). Dopo 5 giorni di cocultura (10 giorni dalla semina delle fibre) non si rintracciano miotubi in nessuna delle condizioni studio (co-cultura in proliferating medium o medium per muscolo liscio), mentre nel controllo i miotubi sono presenti già a 6 giorni dalla semina delle fibre (non mostrato).

4.7 Co-culture di MPCs e precursori del ENS

Le neurosfere derivate dal ENS, poste in coltura hanno progressivamente formato delle caratteristiche formazioni simili ad una rete neuronale (Fig.4.17 A-C). Le cellule satellite, hanno proliferato come usuale, e nei controlli hanno mostrato la normale tendenza alla fusione (Fig. 4.18 A). Quando poste in cocultura, le MPCs e hanno mostrato una spiccata tendenza alla maturazione. Questo fenomeno è dimostrato dalla formazione in vitro di

miofibre mature con le caratteristiche striature sarcomeriche (Fig. 4.18 C-D), fenomeno che non si ottiene in vitro con colture pure di mioblasti di topo, e dalla quantificazione dell'espressione della Desmina che è aumentata nelle coculture (Fig.4.17 riquadro). La densitometria delle bande ha rivelato che l'espressione è circa doppia che nel controllo. Altro importante fenomeno osservato è stato il pattern di contrazione delle fibre che mostravano una frequenza di contrazioni nettamente più elevata dei controlli (dato non mostrato). Nelle coculture la tubulina neuronale è aumentata rispetto alla coltura pura di neurosfere (Fig.4.17 riquadro).

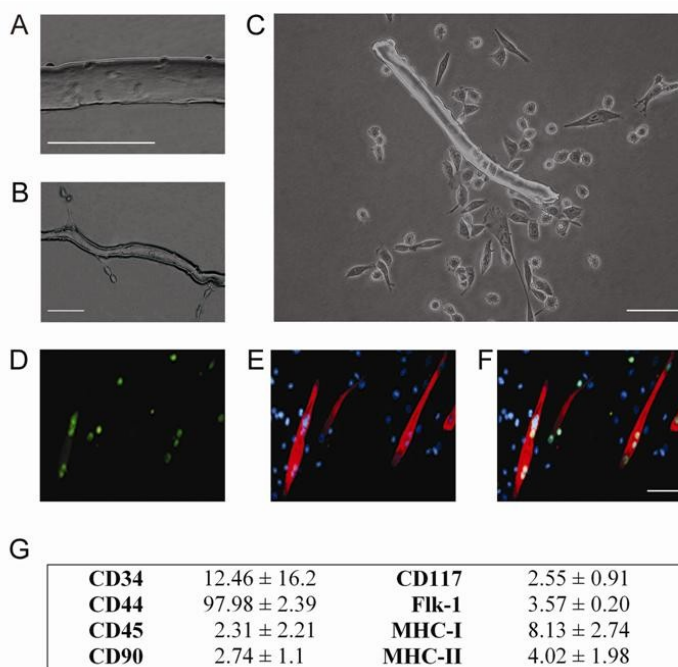


Fig.4.1 *Coltura e caratterizzazione e di cellule satellite con il protocollo della singola fibra.* A: cellule satellite ancora aderenti alla superficie della appena dopo la semina della fibra. B: cellule satellite proliferanti (MPCs) che migrano dalla fibra dopo 2 giorni dalla semina su piastra. C: proliferazione delle of MPCs intorno alla fibra di origine dopo 4 giorni. D-F: MPCs mantenute in coltura fondono a formare sincizi multinucleati. Gli immunostaining rivelano l'espressione del fattore miogenico MyoD (verde in D), della proteina sarcomerica troponina I (rosso in E) e la sovrapposizione dei due conferma la loro coespressione nelle cellule in coltura. Barra della scala: 50µm. G: valori dell'esame citofluorimetrico delle MPCs. I valori indicano la percentuale delle cellule esprimenti il marcatore, rappresenta la media e la deviazione standard tra tre esperimenti indipendenti

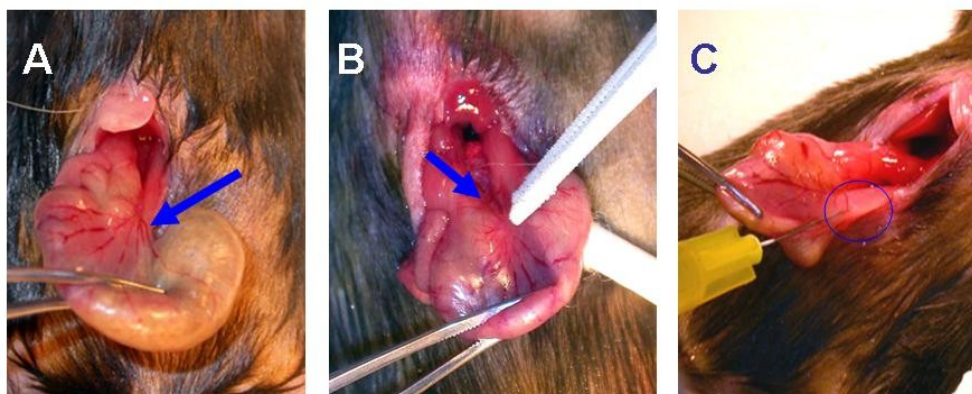


Fig.4.2 Iniezione nella GEJ dopo danno da congelamento. A: esposizione della giunzione gastroesofagea attraverso la piccola laparotomia mediana, la freccia indica il passaggio tra esofago e stomaco. B: apposizione dello specillo pre-raffreddato in azoto liquido. C: iniezione della sospensione cellulare. Si noti l'impallidimento dell'area iniettata dovuto all'effetto "bulging" (nel cerchio).

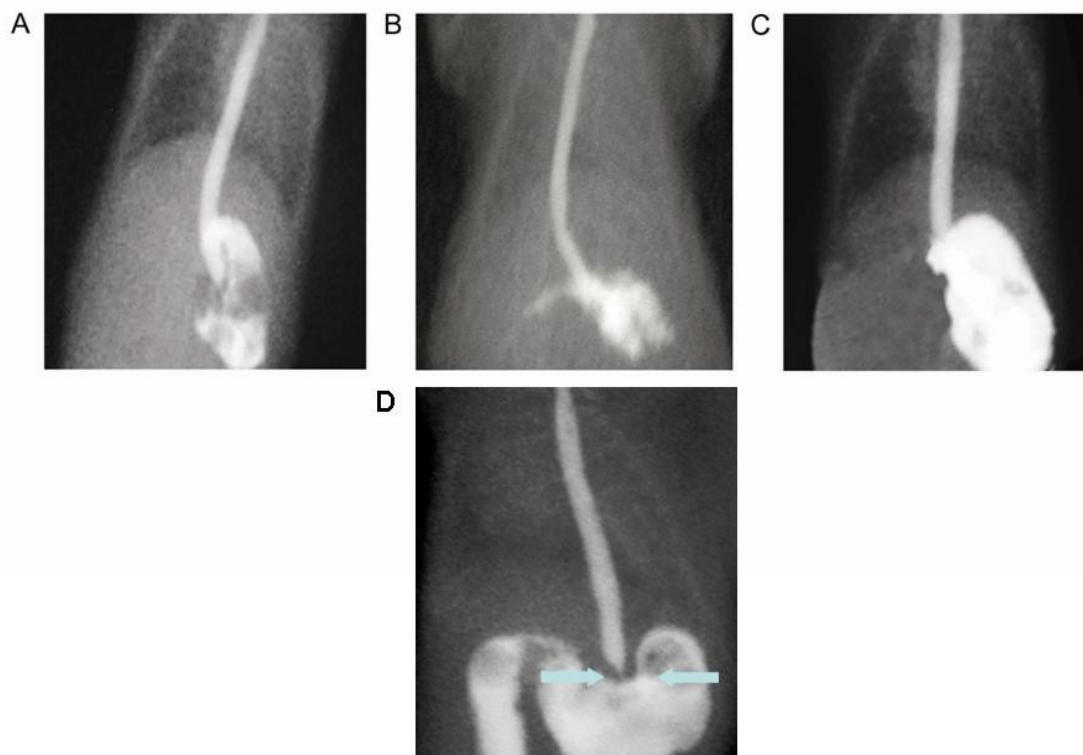


Figura 4.3 Contrastografia. A: animale normale. B: sham control. C: animale dopo 4 settimane dall'iniezione di MPCs. D: animale dopo 6 mesi dall'iniezione di MPCs 5×10^6 .

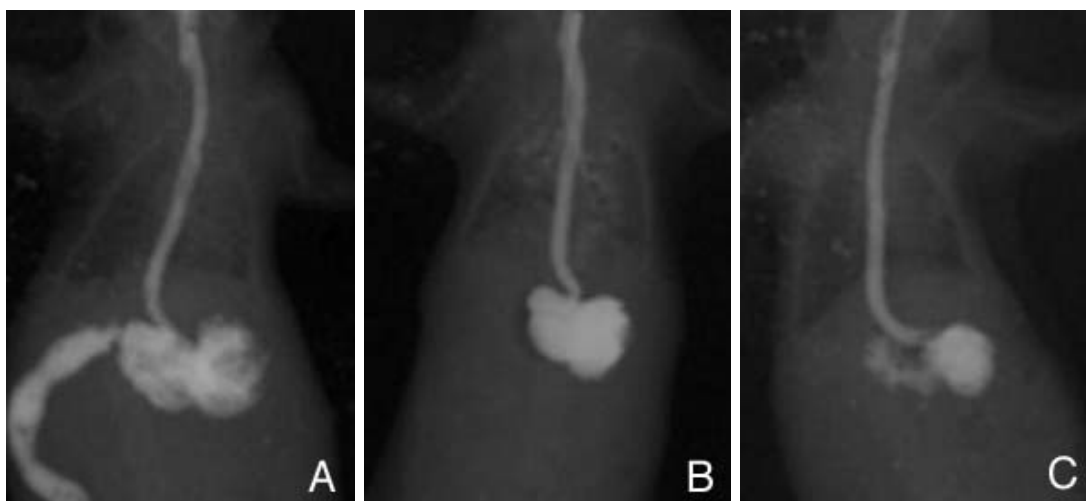


Figura 4.4 Contrastsografia, A: sham a 6 mesi, B: MPCs 5x10⁵ a 6 mesi, FISCs a 6 mesi.

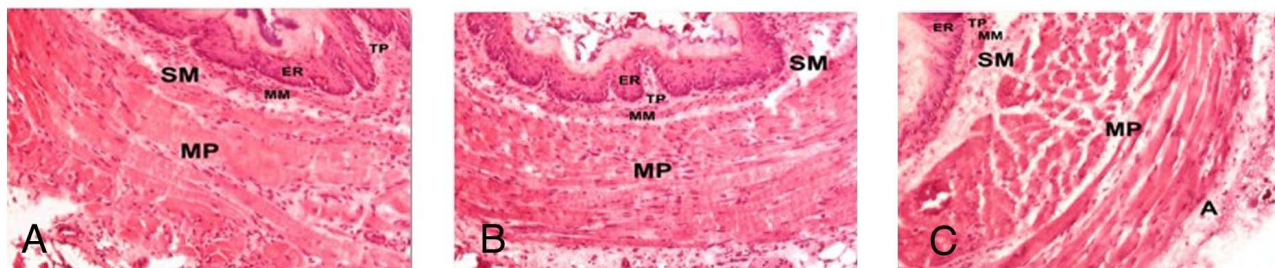


Figura. 4.5 ematossilina eosina sezioni a 6 mesi, A sham, B MPCs ,C FISCs

ER = epitelio di rivestimento TP = tonaca propria MM = muscolaris mucosae SM = sottomucosa MP = muscolaris propriae A = avventizia

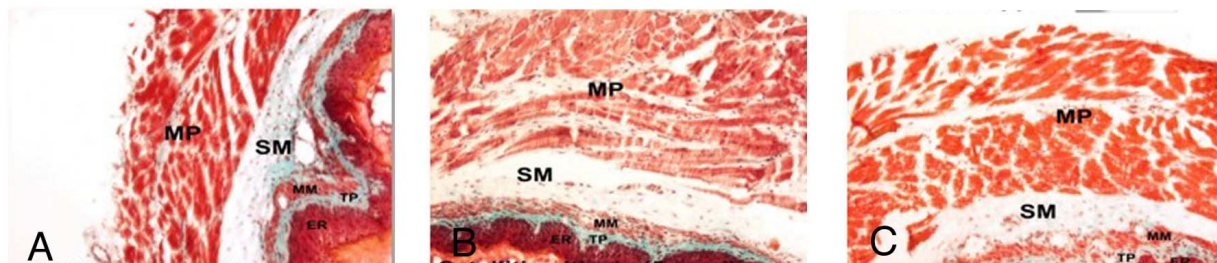


Figura 4.6 tricromica di Masson, sezioni a 6 mesi, A sham, B MPCs ,C FISCs

ER = epitelio di rivestimento TP = tonaca propria MM = muscolaris mucosae SM = sottomucosa MP = muscolaris propriae A = avventizia

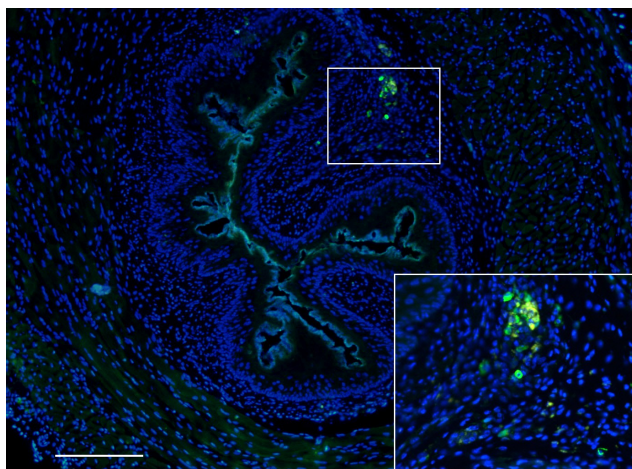


Figura 4.7 Immunostaining su sezione esofagea di animale sacrificato 4 settimane dopo iniezione di MPCs in assenza di danno da freddo. Si può notare la piccola quantità di cellule ancora presenti nello spazio submucoso e la completa assenza di segni di integrazione nello strato muscolare. Barra 200 μ m.

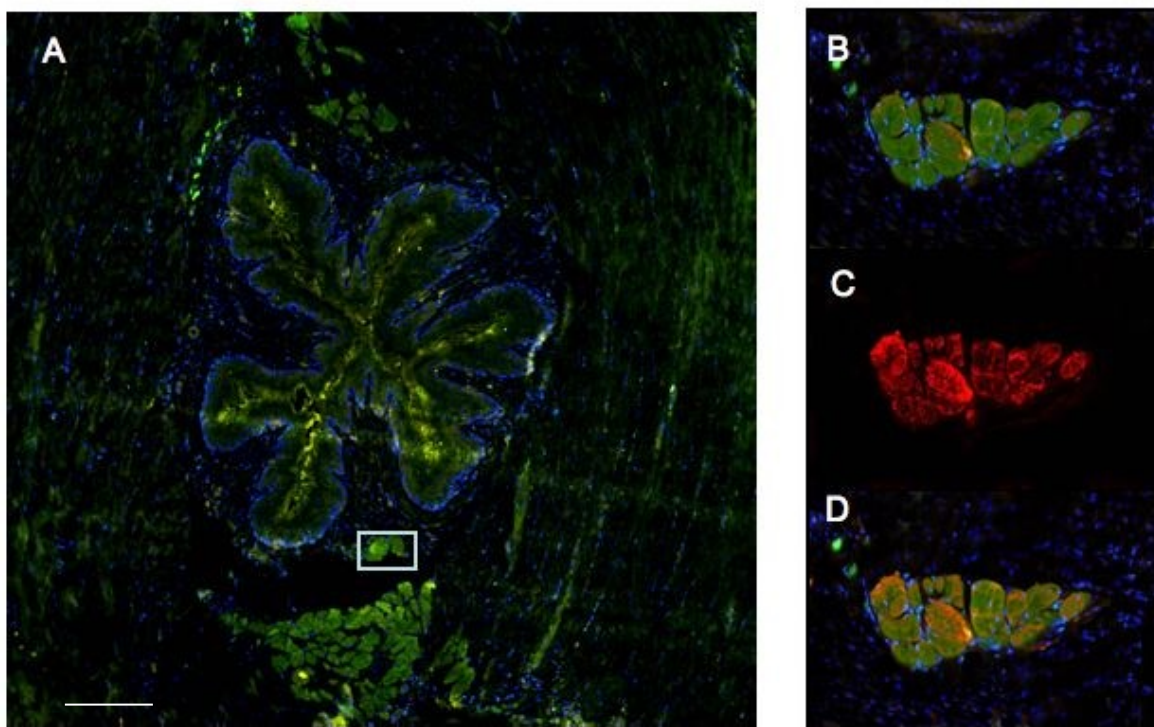


Figura 4.8 Immunostaining su sezioni esofagee di animale sacrificato 12 settimane dopo iniezione di MPCs. In A si noti l'elevato numero di fibre GFP+ve, l'ingrandimento del riquadro (B) mostra la coespressione della desmina (rosso in C) nelle aree GFP+ve (merge in D). Barra 200 μ m.

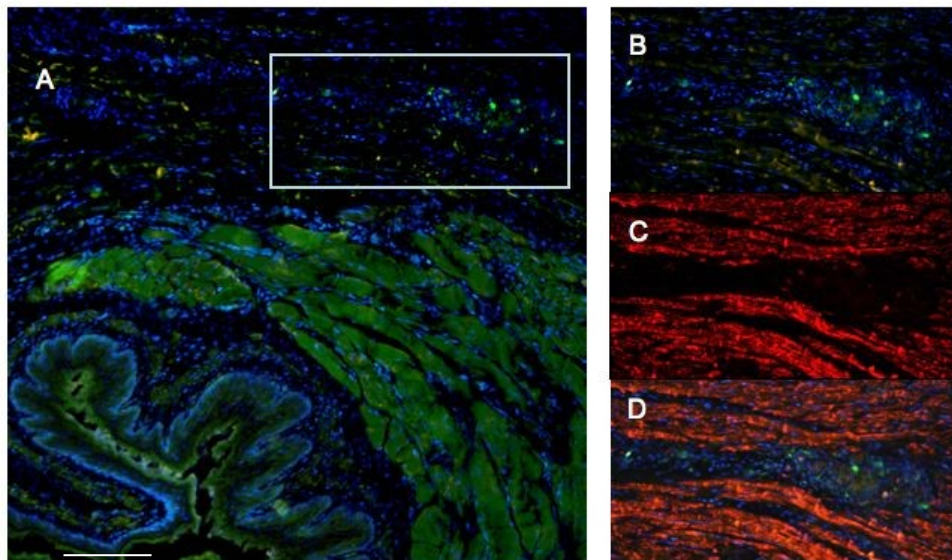


Figura 4.9 *Immunostaining su sezioni esofagee di animale sacrificato 12 settimane dopo iniezione di MPCs.* A questo time point sono presenti ancora cellule GFP+ve mononucleate (A). B: ingrandimento del riquadro. C: staining per la desmina. D: merge, si può notare che le cellule GFP+ve non sono desmina positive. Barra 400 μm .

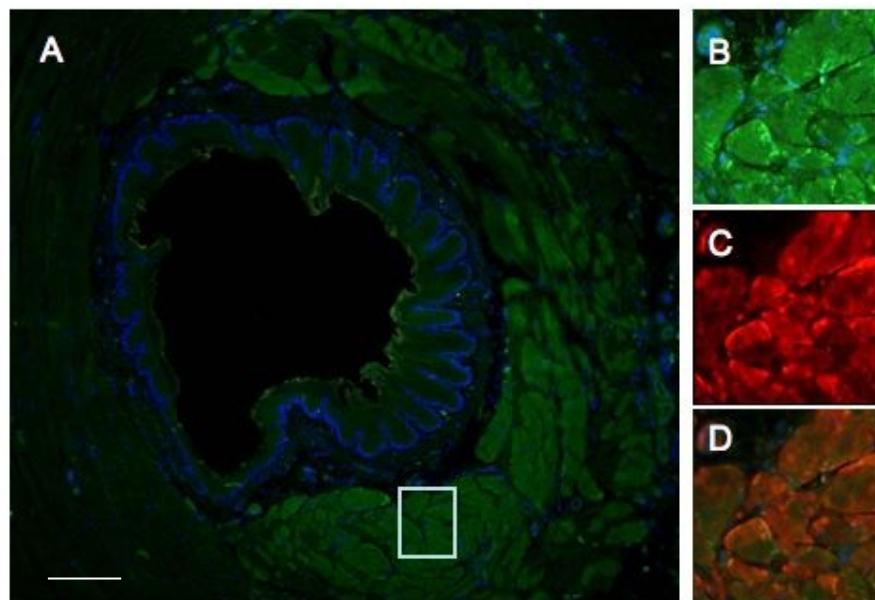


Figura 4.10 *Immunostaining su sezioni esofagee di animale sacrificato 24 settimane dopo iniezione di MPCs.* A: una grande porzione dello strato muscolare esprime la GFP. Si noti l'assenza di cellule GFP+ve mononucleate. B: ingrandimento del riquadro, C: staining per la desmina D: merge tra B e C. Barra 200 μm .

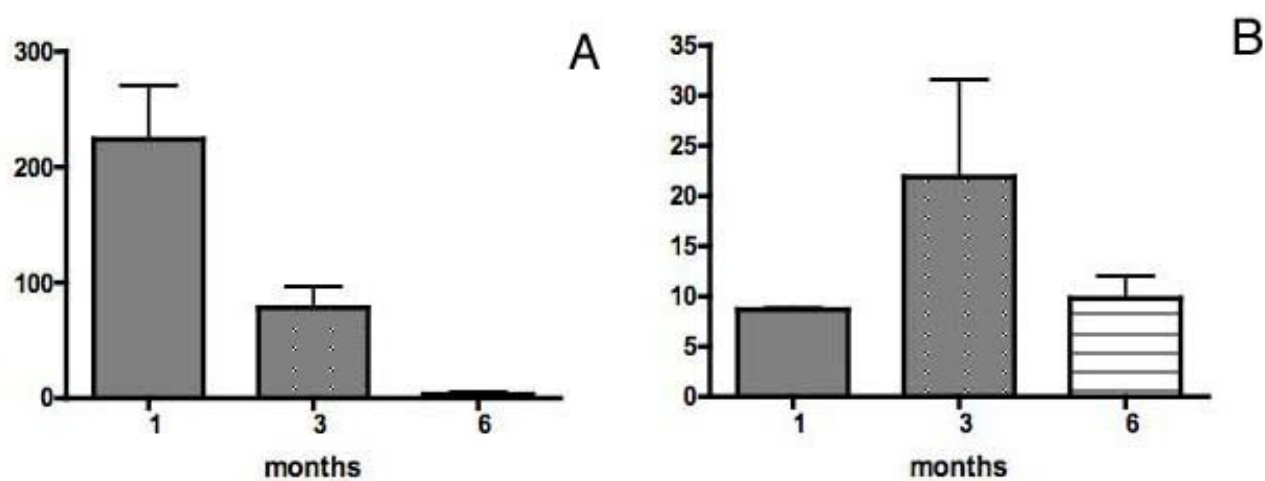


Figura 4.11 quantificazione. A Conta delle cellule mononucleate dopo iniezione di MPCs ad alta densità (5×10^6) ai diversi time points. L'istogramma mostra una differenza statisticamente significativa tra 1 e 3, 3 e 6, 1 e 6 mesi nel numero di cellule GFP+ (* p 0.015, ** p 0.002; *** p 0.0008). La media e deviazione standard erano: 1 mese 224 ± 114 ; 3 mesi 78 ± 44 ; 6 mesi $3,3 \pm 5$. B Conta delle fibre GFP positive dopo iniezione di MPCs ad alta densità (5×10^6). La conta delle fibre GFP+ cresce da $8,6 \pm 0$ a $21,8 \pm 29$ tra 1 e 3 ri-decresce a $9,7 \pm 6,6$ a 6 mesi

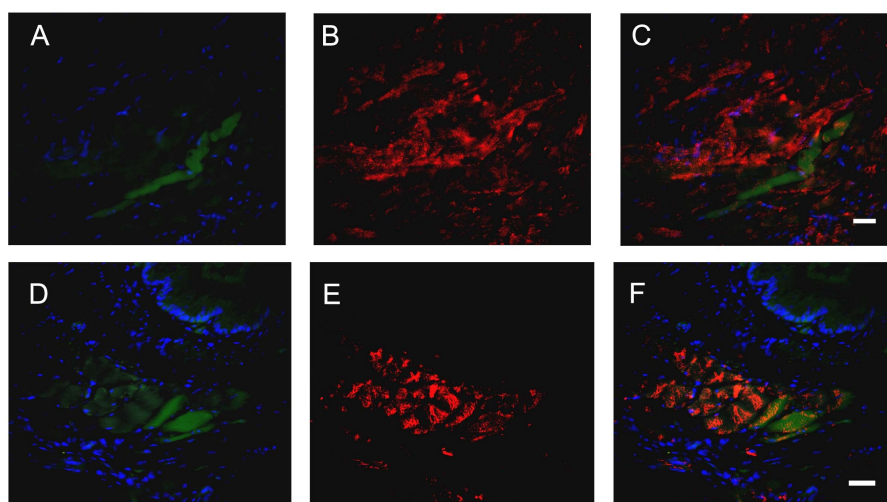
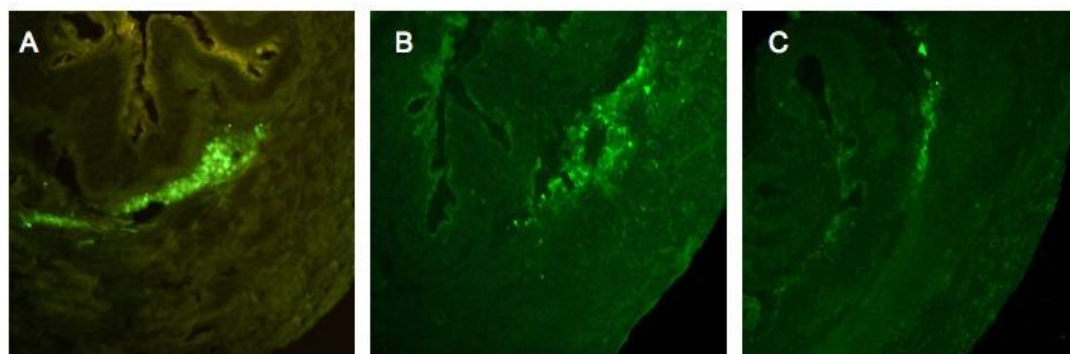


Figura 4.12 VACHT staining. Staining di GEJ a 3 mesi (A-C) e 6 mesi (D-F) dopo iniezione MPCs ad alta densità. A e D: anti GFP-DAPI. D ed E: anti VACHT (rosso). C ed F: merge. Scale bar 100 μm. L'area positiva per l'espressione di VACHT non aumenta significativamente tra 3 e 6 mesi ($p > 0.05$).



CD34	7.50	CD90	2.01
CD44	98.09	CD117	18.07
CD45	25.58	Sca-1	96.51

Figura 4.13 Immunostaining su sezioni esofagee di animali sottoposti ad iniezione di cellule da coltura primaria di muscolo adulto. A: sezione di GEJ di animale sacrificato a 4 settimane. B: 12 settimane. C: 20 settimane. Si noti la progressiva riduzione nel tempo del numero di cellule GFP+ve, l'assenza di integrazione nello strato muscolare in tutti i time points. Nel riquadro sono riportati i valori percentuali delle cellule esprimenti i markers indicati all'esame fluorocitometrico. Barra 200 μ m.

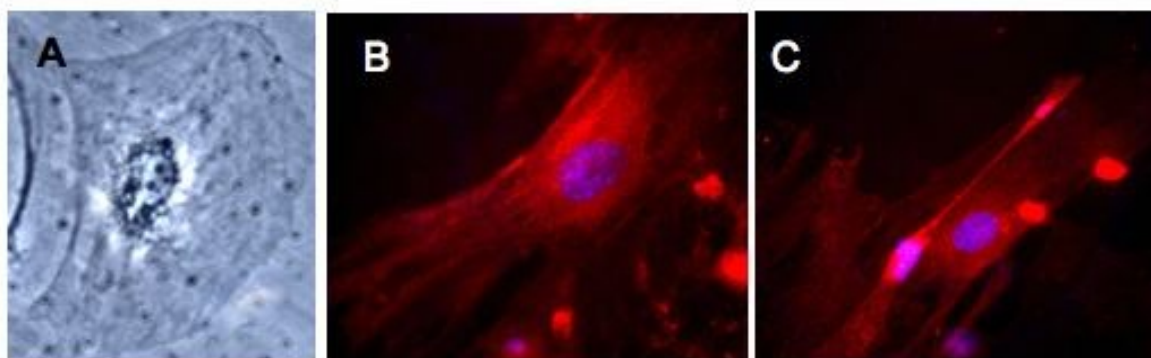


Figura 4.14 Coltura di cellule muscolari lisce. A: cellula muscolare liscia (SMC) in coltura dopo 4-5 giorni. B e C: staining per la SM-MHC (smooth muscle myosin heavy chain) e DAPI della coltura di SMCs. Ingrandimento 400X.

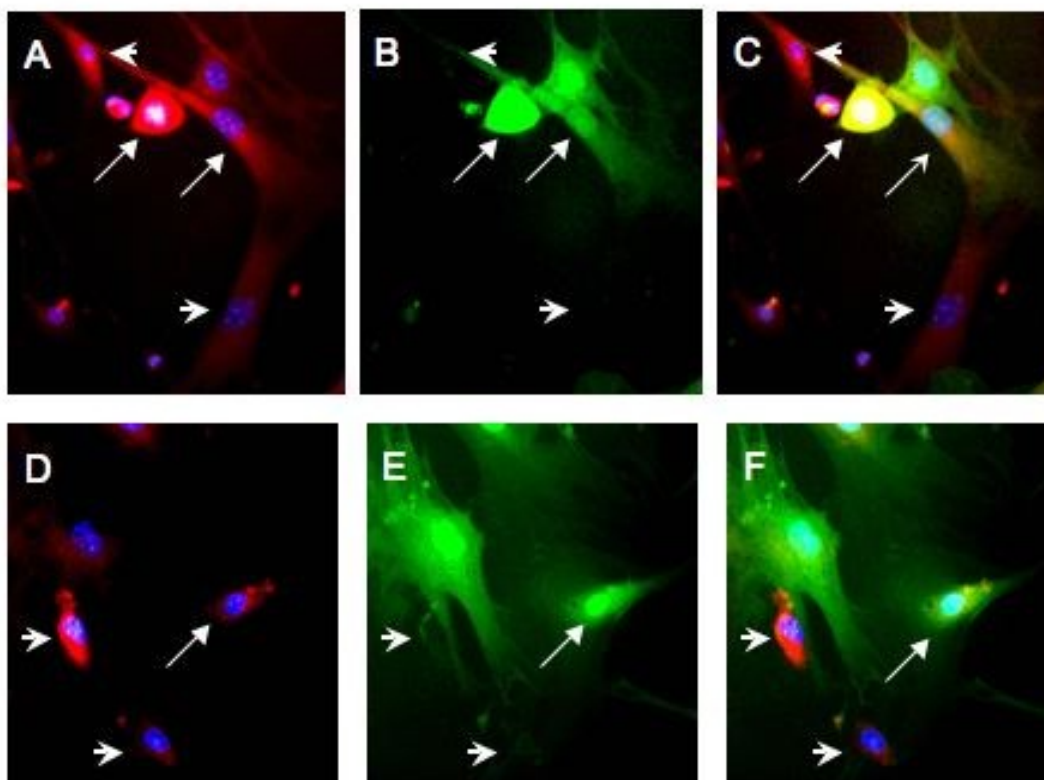


Figura 4.15 *Coltura di MPCs GFP+ve e cellule muscolari lisce.* A e D: staining anti- SM-MHC e DAPI. B ed E: staining per GFP. C ed F: merge. Le frecce indicano le cellule con coespressione di GFP e SM-MHC, le punte di freccia cellule positive solo per SM-MHC. Ingrandimento 200X.

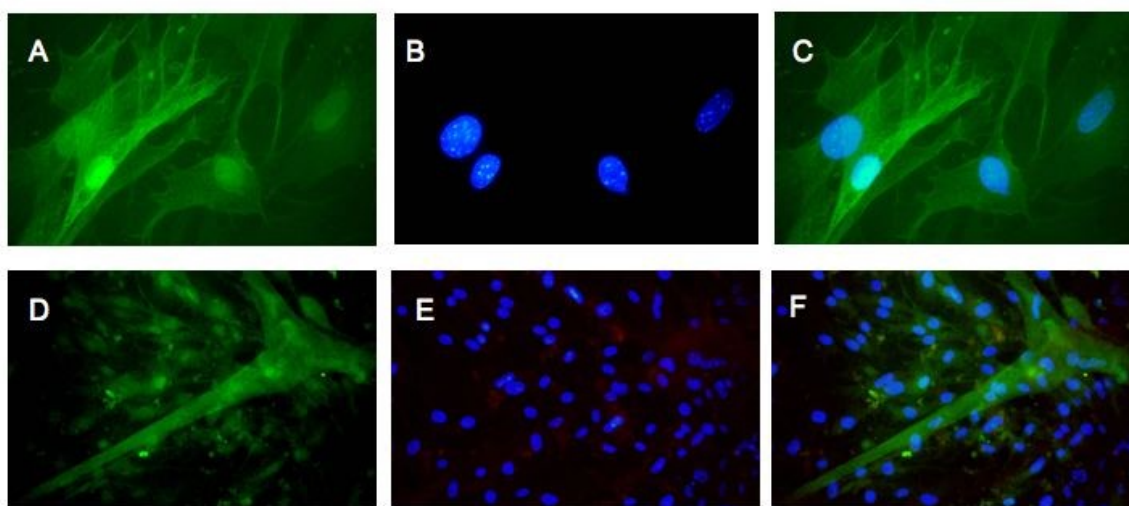


Figura 4.16 *Coltura di MPCs GFP+ve.* A e D: staining per GFP. B ed E: staining anti- SM-MHC e DAPI. C ed F: merge. Si noti che nella coltura di controllo nessuna cellula mostra positività per SM-MHC (B ed E) e che da 7 giorni di coltura si possono osservare miotubi maturi (D-F). A-C ingrandimento 400X, D-F ingrandimento 200X.

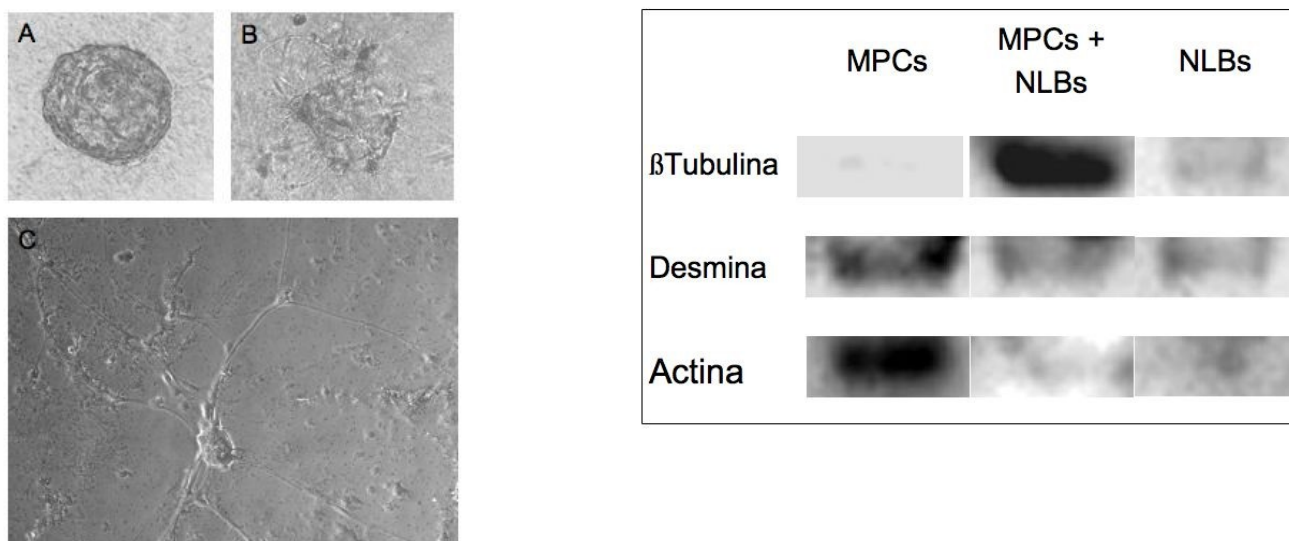


Figura 4.17 *Coltura di NLBs (neurosphere like bodies) e western blot delle coculture MPCs- NLBs.* A neurosfere 24 ore dopo essere state poste in coltura. B: 48 ore. C: 4 giorni. Si noti la progressiva formazione di una pseudo rete neuronale. Nel riquadro il wb delle coculture ad una settimana. La densitometria ha rivelato un valore di desmina circa doppio del controllo, rapportato alla proteina di controllo (actina), e circa triplo di tubulina beta.

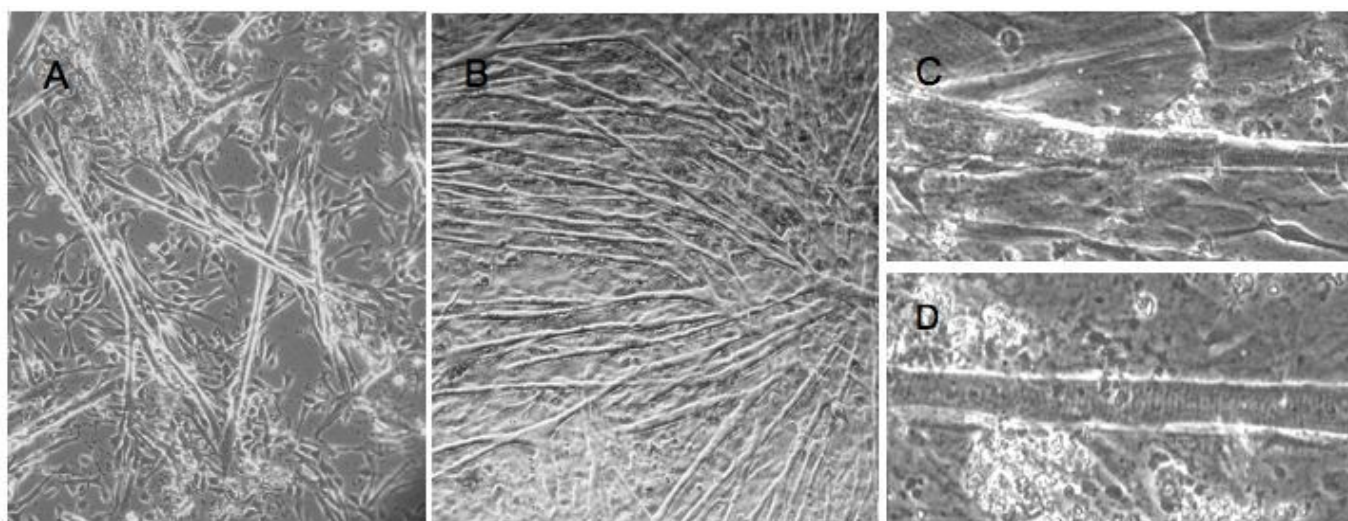


Figura 4.18 *Coculture MPCs- NLBs.* A: coltura di MPCs di controllo, si notino i miotubi neoformati e un ampio numero di cellule mononucleate non ancora fuse ad una settimana dalla coltura (ingrandimento 200X). B: cocoltura, evidenti i numerosissimi miotubi (ingrandimento 100X). C e D: particolari dei miotubi in cui si evidenzia la striatura sar

Capitolo 5: Discussione

Come visto nell'introduzione, il GERD è il risultato di una serie di eventi patogenetici, che portano all'incompetenza della giunzione gastroesofagea (106). Sebbene questa patologia sia uno tra i più comuni fenomeni riscontrati nella popolazione adulta e pediatrica, la complessità dei meccanismi che la provocano rende difficile un'interpretazione univoca. Questo si rispecchia nell'impossibilità di individuare un approccio terapeutico realmente basato sulla rimozione o correzione della causa primaria. In particolare, non è tuttora chiaro in quali elementi la patologia, da un punto di vista patogenetico, differisce tra individuo adulto e pediatrico. Ancora più complesso è l'inquadramento del paziente con sintomi da reflusso gastroesofageo affetto da deficit neurologico. L'approccio terapeutico è pertanto basato su una sequenza di fasi progressivamente più invasive e finalizzate alla correzione dei sintomi. Risulta chiaro che ciascun presidio terapeutico sia mirato a correggere uno o alcuni degli ipotetici momenti patogenetici alla base della sintomatologia. Ne deriva, inoltre, la difficoltà nell'interpretazione di dati sull'efficacia delle terapie, disponibili o in via di sviluppo, provenienti dalla letteratura. È evidente in particolare che nell'adulto il target principale è il controllo dei sintomi soggettivi o la riduzione della dipendenza da farmaci (3). In tale ottica i risultati promettenti di alcune più recenti terapie, vanno estesi con cautela alle differenti tipologie di pazienti. Ciò è particolarmente vero se per controllo della malattia si intende la protezione da eventi potenzialmente rischiosi per la sopravvivenza, come l'inalazione massiva del contenuto gastrico. Recentemente sono state sviluppate alcune tecniche endoscopiche finalizzate alla correzione della funzione deficitaria del LES. L'efficacia di tali tecniche è supportata da alcuni studi in cui il target della terapia era il controllo soggettivo dei sintomi (107). Quale meccanismo sia realmente

implicato nell'azione delle tecniche endoscopiche non è stato chiarito. Sembra coinvolta tra l'altro un'azione lesiva sulle terminazioni nervose sensitive dell'esofago, che rende il GER "asintomatico". Poco convincenti sono i dati relativi al follow-up a lungo termine su rilievi di tipo funzionale (es. pHmetria esofagea) e le complicanze segnalate non sono trascurabili. In particolare, sebbene sia stata dimostrata la natura inerte dei materiali iniettabili, il desiderato effetto *bulging* stesso, ottenuto con un materiale non vitale, può portare potenzialmente a difetti locali della vascolarizzazione e a secondarie reazioni flogistiche (108). Le piccole casistiche riguardanti pazienti pediatriche non consentono attualmente di trarre conclusioni, sebbene ci risulti affascinante l'ipotesi di un approccio poco invasivo nei pazienti a maggior rischio di complicanze (109). Il discorso è ancora più complesso per l'incontinenza dello sfintere anale. Infatti varie sono le cause congenite ed acquisite che portano al mancato sviluppo o alla perdita dei meccanismi di continenza fecale. La patologia di interesse pediatrico vede principalmente i pazienti con compromissione neurologica (es. spina bifida, paralisi cerebrale) o malformativa (malformazioni anorettali), in cui il canale anale nella sua componente sfinteriale è deficitario per definizione. Tuttavia nell'ottica della ricostituzione di un meccanismo di continenza le strutture e le funzioni da ripristinare o creare ex novo sono molteplici. Tuttavia approcci "semplicistici" di trasposizione di lembi muscolari sono stati provati in setting clinici con risultati poco incoraggianti. Nuovi approcci di ingegneria tissutale sono stati ipotizzati e dati assolutamente preliminari sul ruolo rigenerativo di precursori cellulari in modelli murini sono stati pubblicati (146). I modelli proposti in letteratura riguardano anche in questo caso lesioni indotte che poco hanno a che vedere con le situazioni patologiche. In particolare per indurre un deficit misurabile nel tono dello sfintere anale, è stata molto usata la miotomia dello sfintere. La sezione del nervo pudendo, pure proposta, che bene potrebbe rappresentare l'insufficienza presente nei disrafismi spinali, non si

adatta ad approcci sperimentali di rigenerazione del tessuto muscolare come primo endpoint. La presenza in letteratura di studi in cui è stato utilizzato il danno da stretching forzato dello sfintere, ci hanno indotto a percorrere questa strada (145). Infatti tale lesione potenzialmente conduce ad un danno tissutale, con conseguente attivazione di meccanismi rigenerativi nei quali la terapia cellulare può intervenire. Inoltre l'effetto sulla funzione contrattile è misurabile. Sfortunatamente i dati dei nostri esperimenti preliminari su questo modello sono scoraggianti (vedi oltre).

Il nostro studio, da considerarsi preliminare, esplora la possibilità di individuare un materiale biologico che, iniettato nella giunzione gastroesofagea e nel contesto dello sfintere anale interno, ne ristori la funzione. Il primo *end-point* è stato quello di saggiare cellule precursori di tessuto muscolare scheletrico come materiale vitale iniettabile. Le MPCs sono state derivate da cellule satellite attivate, isolate dalla singola fibra muscolare scheletrica. Questa tecnica consente di ottenere una popolazione pura di cellule miogeniche e presenta numerose utili caratteristiche che la rendono attraente per protocolli terapeutici. Nel nostro laboratorio, inoltre, è stato di recente provato che la tecnica è applicabile a tessuti umani (110). I precursori attivati, trapiantati in un muscolo scheletrico danneggiato, hanno la proprietà di integrarsi e fondere in miofibre rigeneranti (111). Cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo (*mesenchymal stem cells from bone marrow* - MSCs) hanno dimostrato di avere la capacità sia *in vitro* che *in vivo* di rigenerare muscolo scheletrico e liscio, potrebbero teoricamente essere applicabili alla tecnica da noi presentata. Tuttavia le MPCs hanno il vantaggio di essere precursori *committed* della linea muscolare, mentre le MSCs possono facilmente dare origine *in vivo* non solo a linee miogeniche ma anche adipogeniche e osteogeniche (112). Inoltre, è stato riportato che le MPCs hanno l'ulteriore vantaggio di essere efficacemente ingegnerizzate a secernere fattori di crescita vascolari o nervosi che potrebbero contribuire all'intero

processo della riparazione muscolare, incluse re-vascularizzazione e re-innervazione (113;114). Le MPCs hanno dimostrato di mantenere in coltura una bassa espressione di CD34, normalmente espresso da cellule satellite attivate e in coltura e che è ritenuto indice di abilità differenziativa verso linee non miogeniche (115). È molto importante notare che le cellule non avevano markers di fenotipo ematopoietico essendo negative per il CD45 e CD117 (116). Un altro importante riscontro del nostro lavoro è stato che anche dopo molti giorni di coltura, si osserva una bassa espressione dell'antigene maggiore d'istocompatibilità I e II. Recenti studi hanno dimostrato che la scarsa espressione di MHC II nelle cellule staminali mesenchimali riduce il rigetto allogeneico (117). Se questo dato, confermato per le nostre MPCs, rappresenta una grande accentuazione del loro potenziale terapeutico. Per valutare la capacità rigenerativa delle MPCs sulla giunzione gastroesofagea abbiamo utilizzato un modello di danno da freddo. Il danno da freddo è stato estensivamente usato nel muscolo scheletrico e nel miocardio per creare modelli di rigenerazione tissutale. (118;119). Il modello utilizzato negli esperimenti discussi in questa tesi, è stato preventivamente utilizzato per esperimenti con time points più brevi oggetto già di pubblicazione (137). Il danno da congelamento, è stato utilizzato nei roditori per valutare i processi rigenerativi del muscolo liscio della vescica (120;121). E' stato dimostrato che in questi modelli si ottiene non solo la perdita di tessuto nativo, ma anche la perdita dei precursori stanziali nel tessuto adulto. Pertanto, le cellule iniettate possono integrarsi e differenziare fondendo con le pre-esistenti miofibre. Nel nostro modello abbiamo dimostrato che i precursori nativi sono in grado di riparare il danno e che a lungo termine non è riscontrabile traccia del danno anche negli animali sdi controllo. L'effettiva lesività dell'insulto è stato saggiato in una prima fase sacrificando gli animali a 24 ore dalla lesione. A tale time point si è osservata la presenza di un importante danno sulle miofibre dello strato esterno della parete e portando il tempo di contatto a 30 secondi anche

a livello dello strato interno. Al danno si accompagnava un importante infiltrato macrofagico non più presente ai time points in studio. I modelli sperimentali di GERD su piccolo animale, proposti in letteratura, sono finalizzati principalmente allo studio degli effetti lesivi del reflusso sulla mucosa esofagea (122;123). L'incontinenza del cardias in questi modelli è ottenuta con la rimozione dello strato muscolare della GEJ. Si tratta quindi di una lesione del tutto lontana dalle alterazioni che portano al GERD nell'uomo. I nostri risultati supportano l'ipotesi che anche in un tessuto peculiare come quello muscolare delle alte vie digerenti murine, l'insulto è necessario per l'integrazione e la differenziazione di progenitori muscolari autologhi. L'evidenza di questo posa sull'assenza di formazione di fibre GFP+ve nel gruppo di controllo *undamaged*. La necessità di una lesione che porti alla perdita di elementi cellulari muscolare per ottenere l'attivazione della rigenerazione da precursori nativi o impiantati, è parzialmente confermata dall'assenza dell'integrazione attesa nel nostro modello di danno meccanico dello sfintere anale interno. Tale modello scelto per ottenere anche una riduzione funzionale misurabile, come descritto in letteratura, non prevede la perdita di sostanza muscolare ma la distruzione delle fibre muscolari. Ipoteticamente quello che accade a livello cellulare è la transitoria riduzione di capacità contrattile

Il processo di integrazione sembra incrementare tra 1 e 3 mesi anche se non in modo statisticamente significativo. In seguito il numero di fibre tende nuovamente a ridursi. Si può ipotizzare che si tratti di un effetto dovuto all'immunogenicità della proteina GFP (144) che induca per tanto una reazione immunomediata contro le neofibre, alla formazione delle quali avevano partecipato le cellule iniettate. Inoltre si deve considerare che il processo di riparazione, quindi gli stimoli citochino-mediati si arresta dopo 4 settimane (137). Tuttavia in 2 degli animali sacrificati dopo 6 mesi dall'iniezione di MPCs ad alta densità si è osservata una alta percentuale delle fibre muscolari della parete della

GEJ esprimenti la GFP. Nella figura 4.3D è rappresentata la contrastografia relativa ad uno di questi animali. Tale risultato “incostante” è difficile da spiegare. Si può supporre che a dispetto di una procedura standardizzata, il processo lesivo sia risultato in qualche modo variabile tra soggetto e soggetto.

Nell’ottica di un utilizzo in clinica, fattore da considerarsi sicuramente limitante di ogni terapia cellulare è la quantità di cellule necessarie ad ottenere l’effetto terapeutico e i conseguenti passaggi in coltura. Tale fattore è da considerarsi particolarmente importante nell’utilizzo di precursori adulti come le MPCs. Inoltre i risultati preliminari sui time points a breve termine (137) lasciavano pensare che dopo l’iniezione ci fosse un importante drop-out del numero cellulare non giustificato da un normale turn-over e dalla progressiva integrazione nel tessuto rigenerante. L’ipotesi avanzata è che i meccanismi di apoptosi-necrosi fossero accentuati da l’elevata densità cellulare della sospensione iniettata. Abbiamo quindi voluto ripetere gli esperimenti utilizzando aliquote inferiori di cellule di un fattore 10 per ciascun animale. Il risultato conferma che l’integrazione e rigenerazioni di neofibre da parte delle cellule iniettate è proporzionale al numero di cellule iniettate. Il fattore numerico che lega i fenomeni non è calcolabile sulla base dei nostri esperimenti. Tuttavia attualmente l’elevata densità della sospensione sembra un fattore pro-rigenerazione piuttosto che il contrario.

L’ulteriore approccio esplorato, quello di utilizzare popolazioni cellulari ad alta efficienza rigenerativa (FISCs) ha ugualmente mostrato dei limiti nei nostri esperimenti. Infatti le satelliti non coltivate non hanno mostrato l’elevata efficienza in termini di integrazione nelle fibre rigeneranti mostrata in esperimenti su muscolo scheletrico. Dal momento che l’esofago dei roditori possiede uno strato muscolare composto principalmente da tessuto muscolare scheletrico, le cellule iniettate sono state probabilmente influenzate dall’ambiente circostante a differenziare in muscolo scheletrico. Nel lavoro preliminare

pubblicato (137) due settimane dopo l'iniezione era stata rintracciata nelle cellule ancora raccolte nello spazio sottomucoso la positività per un markers comunemente usato per individuare cellule muscolari lisce, l'isoforma muscolare liscia dell'actina (α SMA). Sprinter e col. hanno dimostrato che mioblasti primari di topo derivati da muscolo neonatale producono transitoriamente α SMA dopo iniezione in muscoli scheletrici adulti (125) e normalmente perdono questo marker entro pochi giorni dall'impianto. Studi precedenti hanno mostrato che le MDSCs sono capaci di differenziare in muscolo liscio quando iniettate nello strato muscolare rigenerante della vescica. Questo pattern di espressione genica si può estendere alle cellule satellite dal momento che esse, isolate dalla singola miofibra, esprimono transitoriamente durante la differenziazione α SMA sotto la membrana basale (126). Tuttavia non sono stati presentati finora dati sulla differenziazione in vivo di queste cellule in muscolo liscio. Recenti dati hanno indicato che la sottomucosa di vescica e di intestino giocano un ruolo di primo piano nel guidare il processo di differenziazione verso il tessuto muscolare liscio (127); questo concetto ricalca quello noto come della "nicchia" in cui l'interazione delle cellule viciniori determina lo stato di quiescenza o di attivazione di precursori locali ma ne guida anche la differenziazione. Negli esperimenti qui descritti, a timepoints più lunghi non si è mai evidenziata la doppia positività delle cellule iniettate (sia come mononucleate che integrate in fibre muscolari) per markers di cellule muscolari lisce. Sono sicuramente necessari ulteriori studi, su animali in cui l'esofago abbia una struttura più simile a quella degli esseri umani, per esplorare le capacità delle MPCs di integrarsi in un ambiente costituito da tessuto muscolare liscio. Tuttavia, quello che abbiamo osservato in questi primi esperimenti, ci ha portato a valutare ulteriormente in vitro questa specifica proprietà. Abbiamo utilizzato un modello comunemente descritto in letteratura, per valutare la reciproca influenza tra fenotipi cellulari: la co-coltura. Il dato ha confermato e rafforzato il nostro riscontro negli

esprimenti in vivo: le satelliti coltivate insieme alle cellule muscolari lisce provenienti dalla vescica dopo 10 giorni di coltura esprimono un marcatore altamente specifico delle cellule muscolari lisce (128) e non mostrano la normale tendenza alla fusione in miotubi. Questo dato, da confermare con ulteriori esperimenti e a tempi più lunghi, aggiunge ulteriori elementi di interesse per i precursori muscolari di origine scheletrica come base per l'ingegneria tissutale dell'intestino.

Viste le premesse del nostro lavoro, nel quale ci siamo posti l'obiettivo di porre le basi per una "ricostruzione funzionale" della barriera antireflusso, abbiamo valutato anche la possibilità di un'integrazione funzionale con il tessuto nervoso. Gli esperimenti condotti in tale direzione, che sono da considerarsi preliminari, hanno dato incoraggianti indicazioni. L'idea che nella rigenerazione del tessuto muscolare, se pur viscerale, rientri una componente dovuta a precursori nervosi, implica una interazione tra queste cellule. L'influenza sul pattern di espressione delle proteine del citoscheletro e sulla frequenza di contrazione che le cellule nervose dell'ENS esercitano sui mioblasti e sui miotubi, conferma una compatibilità dei due tipi cellulari. Questo pone ulteriormente le basi per un utilizzo "funzionale" della tecnica da noi proposta. Come ipotizzato di recente il ripristino di una funzione contrattile di strutture viscerali, deficitarie da questo punto di vista, può passare per due possibilità. Queste sono l'impianto di precursori del ENS autologhi, derivati da tessuto normale, e la stimolazione dei precursori endogeni a proliferare e rigenerare tessuto nervoso funzionale (93). Inoltre l'incremento dell'espressione delle proteine specifiche del tessuto nervoso, riscontrato al wb della cocoltura, implica un'azione favorente dei precursori muscolari sui neuroni. Questo riscontro concorda con quanto accennato nell'introduzione a proposito di un ruolo nella riparazione del danno nervoso esercitato in modelli sperimentali da precursori muscolari.

Alcune obiezioni contro le terapie endoscopiche sono legate alla natura transitoria dell'effetto, dovuta a fenomeni di riassorbimento, migrazione o reazione da corpo estraneo che possono "rimuovere" l'agente scelto. L'utilizzo di precursori autologhi deve dimostrare quindi una presenza permanente dell'impianto all'interno della struttura trattata. Abbiamo esteso i nostri esperimenti in vivo e ad un massimo di 5 mesi. Abbiamo potuto riscontrare che esiste un incremento col tempo dell'integrazione delle cellule iniettate e un coinvolgimento nel fenomeno di una gran parte del tessuto trattato. In questi esperimenti inoltre, abbiamo utilizzato come confronto una coltura cellulare che, sebbene non pura, conteneva mioblasti. L'inefficacia dimostrata da queste cellule controllo conferma l'elevata efficienza della tecnica da noi utilizzata nell'isolamento di cellule staminali da muscolo adulto e la superiore versatilità della popolazione ottenuta. Molto interessanti sono stati i riscontri dell'esame contrastografico al quale gli animali sono stati sottoposti prima di essere sacrificati. Le immagini sequenziali sono state acquisite per valutare la presenza di stenosi indotte dall'iniezione di cellule o dal solo danno da freddo. In un recente studio la contrastografia è stata utilizzata per accertare la presenza di GER in un modello di patologia su ratto. Tuttavia la tecnica proposta è complessa e terminale e non applicabile ad esperimenti di *recovery* (129). I nostri risultati hanno mostrato che, fino a 4 settimane dall'iniezione non si osservano sostanziali differenze tra animali trattati e controlli. Sorprendentemente, in alcuni animali sacrificati dopo 5 mesi abbiamo riscontrato la presenza di un restringimento della regione del cardias "a torsolo di mela" che faceva pensare ad una lesione occupante spazio. Gli animali con tale aspetto non mostravano alcuna difficoltà nell'alimentazione e l'istologia non faceva pensare ad alterazioni infiammatorie o fibrotiche. Questo fa presumere che alla base ci sia un effetto di "contrazione" del cardias. Per accertare l'effetto di incremento della continenza del cardias dovuto all'integrazione di precursori muscolari autologhi, sono necessarie ulteriori

indagini ed un modello sperimentale di patologia che si adatti alla nostra tecnica e che consenta analisi funzionali.

I risultati provenienti dai primi esperimenti condotti sul modello di danno dello sfintere anale, hanno relativamente deluso le nostre aspettative. Infatti, la semplicità della tecnica di impianto, che non richiede dissezioni chirurgiche, lascia presumere una alta percentuale di successo dell'impianto stesso. Tale tecnica prevede l'infissione dell'ago appena distalmente alla linea pettinata della mucosa del canale anale. A tale livello il materiale iniettato dovrebbe ritrovarsi nel contesto del muscolo dello sfintere interno, eventuale materiale in eccesso potrebbe coinvolgere gli elementi muscolari dello sfintere esterno, partecipando alla rigenerazione dello stesso.

Tuttavia l'assenza di uno strato sieroso che eserciti un effetto di contenimento come nell'esofago, e l'assenza di una diretta visione come durante l'iniezione in laparotomia, fanno sì che il materiale che venga a farsi strada oltre lo strato muscolare possa disperdersi nel tessuto lasso peri-rettale non analizzato nelle sezioni.

Inoltre sebbene esistano lavori che riportano il danno da stretching come stimolo per la rigenerazione del muscolo sfinteriale, i nostri esperimenti preliminari potrebbero negare che tale danno rappresenti una valida alternativa al congelamento per lo studio della rigenerazione. È stato scelto questo modello in quanto potrebbe rappresentare anche un modello funzionale. Infatti il muscolo sfinteriale sottoposto a stretching forzato porta ad una incontinenza che anche se transitoria riproduce l'incontinenza neurogena potenzialmente oggetto di terapie innovative come quelle cellulari.

Sono tuttavia necessari ulteriori esperimenti per verificare la applicabilità a studi di rigenerazione e tanto più di ripristino della funzione su questo modello.

Conclusioni

Il nostro studio conferma il dato preliminare della fattibilità dell'iniezione di precursori muscolari nella giunzione gastro esofagea (GEJ). La tecnica da noi utilizzata per l'isolamento di precursori muscolari ci ha consentito di ottenere una popolazione omogenea di mioblasti (MPCs) che ha dimostrato proprietà differenziative nella linea muscolare scheletrica matura sia in vivo che in vitro e che sembra in grado di transdifferenziare verso la linea muscolare liscia. Iniettate nella GEJ di topo, tali cellule si integrano nello strato muscolare. Nel tempo si assiste ad una progressiva riduzione delle cellule mononucleate, derivanti dal pool iniettato, ed ad un incremento delle fibre muscolari da esse derivate. Esiste un rapporto tra il numero di satelliti coltivate iniettate e sopravvivenza delle stesse e la formazione di neofibre nel cardias. Sono necessari ulteriori esperimenti per stabilire la densità limite e quella ottimale per ottenere il miglior risultato in termini di integrazione. Il rapporto ottimale va ricercato nell'ottica di un uso clinico, pertanto in funzione dell'aspetto funzionale che non è possibile esplorare con questo modello. Le satelliti non coltivate non hanno mostrato l'elevata capacità di integrazione e formazione di miotubi mostrata nell'impianto nel muscolo scheletrico.

Gli esperimenti in vitro indicano inoltre la possibilità non solo di direzionare tali cellule verso un fenotipo di tipo muscolare liscio, più simile a quello che si ritrova nella giunzione gastroesofagea umana, ma anche di elaborare composti cellulari più complessi coinvolgenti precursori del sistema nervoso enterico allo scopo di incrementare la funzione dell'impianto.

Bibliografia

- (1) Fonkalsrud EW, Ament ME. Gastroesophageal reflux in childhood. *Curr Probl Surg* 1996; 33(1):1-70.
- (2) Vandenplas. gastroesophageal reflux. *Pediatric Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management*. 2006.
Ref Type: Generic
- (3) Moayyedi P, Talley NJ. Gastro-oesophageal reflux disease. *Lancet* 2006; 367(9528):2086-2100.
- (4) Labenz J, Morgner-Miehlke A. An update on the available treatments for non-erosive reflux disease. *Expert Opin Pharmacother* 2006; 7(1):47-56.
- (5) Sondheimer JM, Morris BA. Gastroesophageal reflux among severely retarded children. *J Pediatr* 1979; 94(5):710-714.
- (6) Wesley JR, Coran AG, Sarahan TM, Klein MD, White SJ. The need for evaluation of gastroesophageal reflux in brain-damaged children referred for feeding gastrostomy. *J Pediatr Surg* 1981; 16(6):866-871.
- (7) Byrne WJ, Euler AR, Ashcraft E, Nash DG, Seibert JJ, Golladay ES. Gastroesophageal reflux in the severely retarded who vomit: criteria for and results of surgical intervention in twenty-two patients. *Surgery* 1982; 91(1):95-98.
- (8) Corbally MT, Simpson E, Guiney EJ. Management of gastroesophageal reflux in mentally retarded children. *Ir Med J* 1985; 78(11):317-319.
- (9) Halpern LM, Jolley SG, Johnson DG. Gastroesophageal reflux: a significant association with central nervous system disease in children. *J Pediatr Surg* 1991; 26(2):171-173.
- (10) Abrahams P, Burkitt BF. Hiatus hernia and gastro-oesophageal reflux in children and adolescents with cerebral palsy. *Aust Paediatr J* 1970; 6(1):41-46.
- (11) Frisby CL, Mattsson JP, Jensen JM, Lehmann A, Dent J, Blackshaw LA. Inhibition of transient lower esophageal sphincter relaxation and gastroesophageal reflux by metabotropic glutamate receptor ligands. *Gastroenterology* 2005; 129(3):995-1004.
- (12) Orenstein SR. Infantile reflux: different from adult reflux. *Am J Med* 1997; 103(5A):114S-119S.
- (13) Omari TI, Miki K, Fraser R et al. Esophageal body and lower esophageal sphincter function in healthy premature infants. *Gastroenterology* 1995; 109(6):1757-1764.

- (14) Bredenoord AJ, Tutuian R, Smout AJ, Castell DO. Technology Review: Esophageal Impedance Monitoring. *Am J Gastroenterol* 2006.
- (15) Orlando RC. Current understanding of the mechanisms of gastro-oesophageal reflux disease. *Drugs* 2006; 66 Suppl 1:1-5.
- (16) Kuiken S, Van Den EB, Tytgat G, Bennink R, Boeckstaens G. Evidence for pooling of gastric secretions in the proximal stomach in humans using single photon computed tomography. *Gastroenterology* 2002; 123(6):2157-2158.
- (17) Khoshoo V, Le T, Haydel RM, Jr., Landry L, Nelson C. Role of gastroesophageal reflux in older children with persistent asthma. *Chest* 2003; 123(4):1008-1013.
- (18) Menkes JH, Ament ME. Neurologic disorders of gastroesophageal function. *Adv Neurol* 1988; 49:409-416.
- (19) Leon FF, Gasparella M, Gamba PG. [Antireflux surgery in neurologically impaired children]. *Pediatr Med Chir* 2005; 27(1-2):75-80.
- (20) Bianchi A. Total esophagogastric dissociation: an alternative approach. *J Pediatr Surg* 1997; 32(9):1291-1294.
- (21) Cameron BH, Cochran WJ, McGill CW. The uncut Collis-Nissen fundoplication: results for 79 consecutively treated high-risk children. *J Pediatr Surg* 1997; 32(6):887-891.
- (22) Carre IJ. Management of gastro-oesophageal reflux. *Arch Dis Child* 1985; 60(1):71-75.
- (23) Sullivan PB. Gastrointestinal problems in the neurologically impaired child. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1997; 11(3):529-546.
- (24) Fonkalsrud EW, Bustorff-Silva J, Perez CA, Quintero R, Martin L, Atkinson JB. Antireflux surgery in children under 3 months of age. *J Pediatr Surg* 1999; 34(4):527-531.
- (25) Kawai M, Kawahara H, Hirayama S, Yoshimura N, Ida S. Effect of baclofen on emesis and 24-hour esophageal pH in neurologically impaired children with gastroesophageal reflux disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 38(3):317-323.
- (26) Hassall E. Antireflux surgery in children: time for a harder look. *Pediatrics* 1998; 101(3 Pt 1):467-468.
- (27) Di LC, Orenstein S. Fundoplication: friend or foe? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 34(2):117-124.
- (28) Hassall E. Decisions in diagnosing and managing chronic gastroesophageal reflux disease in children. *J Pediatr* 2005; 146(3 Suppl):S3-12.
- (29) Takamizawa S, Tsugawa C, Nishijima E, Muraji T, Satoh S. Laryngotracheal separation for intractable aspiration pneumonia in neurologically impaired children: experience with 11 cases. *J Pediatr Surg* 2003; 38(6):975-977.

-
- (30) Lasser MS, Liao JG, Burd RS. National trends in the use of antireflux procedures for children. *Pediatrics* 2006; 118(5):1828-1835.
 - (31) Wilder-Smith CH, Rohss K, Nilsson-Pieschl C, Junghard O, Nyman L. Esomeprazole 40 mg provides improved intragastric acid control as compared with lansoprazole 30 mg and rabeprazole 20 mg in healthy volunteers. *Digestion* 2003; 68(4):184-188.
 - (32) Arenz T, Antos D, Russmann H et al. Esomeprazole-based 1-week triple therapy directed by susceptibility testing for eradication of *Helicobacter pylori* infection in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 43(2):180-184.
 - (33) Canani RB, Cirillo P, Roggero P et al. Therapy with gastric acidity inhibitors increases the risk of acute gastroenteritis and community-acquired pneumonia in children. *Pediatrics* 2006; 117(5):e817-e820.
 - (34) Fonkalsrud EW, Ashcraft KW, Coran AG et al. Surgical treatment of gastroesophageal reflux in children: a combined hospital study of 7467 patients. *Pediatrics* 1998; 101(3 Pt 1):419-422.
 - (35) Pitcher DE, Curet MJ, Martin DT et al. Successful management of severe gastroesophageal reflux disease with laparoscopic Nissen fundoplication. *Am J Surg* 1994; 168(6):547-553.
 - (36) Goyal A, Khalil B, Choo K, Mohammed K, Jones M. Esophagogastric dissociation in the neurologically impaired: an alternative to fundoplication? *J Pediatr Surg* 2005; 40(6):915-918.
 - (37) Buratti S, Kamenwa R, Dohil R, Collins D, Lavine JE. Esophagogastric disconnection following failed fundoplication for the treatment of gastroesophageal reflux disease (GERD) in children with severe neurological impairment. *Pediatr Surg Int* 2004; 20(10):786-790.
 - (38) Wilson GJ, van dZ, Bax NM. Endoscopic gastrostomy placement in the child with gastroesophageal reflux: is concomitant antireflux surgery indicated? *J Pediatr Surg* 2006; 41(8):1441-1445.
 - (39) Liu DC, Somme S, Mavrelis PG et al. Stretta as the initial antireflux procedure in children. *J Pediatr Surg* 2005; 40(1):148-151.
 - (40) Oleynikov D, Oelschlager B. New alternatives in the management of gastroesophageal reflux disease. *Am J Surg* 2003; 186(2):106-111.
 - (41) Ozawa S, Yoshida M, Kumai K, Kitajima M. New endoscopic treatments for gastroesophageal reflux disease. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 11(3):146-153.
 - (42) Ozawa S, Yoshida M, Kumai K, Kitajima M. New endoscopic treatments for gastroesophageal reflux disease. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 11(3):146-153.

-
- (43) O'Connor KW, Lehman GA. Endoscopic placement of collagen at the lower esophageal sphincter to inhibit gastroesophageal reflux: a pilot study of 10 medically intractable patients. *Gastrointest Endosc* 1988; 34(2):106-112.
- (44) Deviere J, Pastorelli A, Louis H et al. Endoscopic implantation of a biopolymer in the lower esophageal sphincter for gastroesophageal reflux: a pilot study. *Gastrointest Endosc* 2002; 55(3):335-341.
- (45) Deviere J, Costamagna G, Neuhaus H et al. Nonresorbable copolymer implantation for gastroesophageal reflux disease: a randomized sham-controlled multicenter trial. *Gastroenterology* 2005; 128(3):532-540.
- (46) Fockens P, Bruno MJ, Gabbrielli A et al. Endoscopic augmentation of the lower esophageal sphincter for the treatment of gastroesophageal reflux disease: multicenter study of the Gatekeeper Reflux Repair System. *Endoscopy* 2004; 36(8):682-689.
- (47) Feretis C, Benakis P, Dimopoulos C et al. Plexiglas (polymethylmethacrylate) implantation: technique, pre-clinical and clinical experience. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2003; 13(1):167-78, xi.
- (48) Tintillier M, Chaput A, Kirch L, Martinet JP, Pochet JM, Cuvelier C. Esophageal abscess complicating endoscopic treatment of refractory gastroesophageal reflux disease by Enteryx injection: a first case report. *Am J Gastroenterol* 2004; 99(9):1856-1858.
- (49) Shaheen NJ. Raising the bar in studies of endoscopic anti-reflux procedures. *Gastroenterology* 2005; 128(3):779-782.
- (50) Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: hype and reality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2002;369-391.
- (51) Alison MR, Poulson R, Forbes S, Wright NA. An introduction to stem cells. *J Pathol* 2002; 197(4):419-423.
- (52) Palsson B. tissue engineering. Pearson Prentice Hall Bioengineering. 2004. Ref Type: Generic
- (53) Mackenzie I. Stem cells: patterning and differentiation. *European cells and materials* . 2003 . Ref Type: Generic
- (54) Rosenblatt JD, Lunt AI, Parry DJ, Partridge TA. Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1995; 31(10):773-779.
- (55) Rando TA. The adult muscle stem cell comes of age. *Nat Med* 2005; 11(8):829-831.
- (56) Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 2000; 102(6):777-786.

-
- (57) Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J Cell Biol* 2004; 166(3):347-357.
- (58) Collins CA. Satellite cell self-renewal. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6(3):301-306.
- (59) Rosen GD, Sanes JR, LaChance R, Cunningham JM, Roman J, Dean DC. Roles for the integrin VLA-4 and its counter receptor VCAM-1 in myogenesis. *Cell* 1992; 69(7):1107-1119.
- (60) Jesse TL, LaChance R, Iademarco MF, Dean DC. Interferon regulatory factor-2 is a transcriptional activator in muscle where It regulates expression of vascular cell adhesion molecule-1. *J Cell Biol* 1998; 140(5):1265-1276.
- (61) Cantini M, Massimino ML, Rapizzi E et al. Human satellite cell proliferation in vitro is regulated by autocrine secretion of IL-6 stimulated by a soluble factor(s) released by activated monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 216(1):49-53.
- (62) Merly F, Lescaudron L, Rouaud T, Crossin F, Gardahaut MF. Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve* 1999; 22(6):724-732.
- (63) Anderson JE. A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Mol Biol Cell* 2000; 11(5):1859-1874.
- (64) Anderson J, Pilipowicz O. Activation of muscle satellite cells in single-fiber cultures. *Nitric Oxide* 2002; 7(1):36-41.
- (65) Rudnicki MA. Marrow to muscle, fission versus fusion. *Nat Med* 2003; 9(12):1461-1462.
- (66) Suzuki K, Murtuza B, Heslop L et al. Single fibers of skeletal muscle as a novel graft for cell transplantation to the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 123(5):984-992.
- (67) Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999; 401(6751):390-394.
- (68) Asakura A, Rudnicki MA. Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation. *Exp Hematol* 2002; 30(11):1339-1345.
- (69) Bachrach E, Li S, Perez AL et al. Systemic delivery of human microdystrophin to regenerating mouse dystrophic muscle by muscle progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(10):3581-3586.
- (70) Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 2001; 7(9):1028-1034.

-
- (71) Ferrari G, Cusella-De AG, Coletta M et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279(5356):1528-1530.
- (72) Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K et al. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol (Berl)* 1999; 199(5):391-396.
- (73) Ferrari G, Stornaiuolo A, Mavilio F. Failure to correct murine muscular dystrophy. *Nature* 2001; 411(6841):1014-1015.
- (74) Gussoni E, Bennett RR, Muskiewicz KR et al. Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 2002; 110(6):807-814.
- (75) Rivier F, Alkan O, Flint AF et al. Role of bone marrow cell trafficking in replenishing skeletal muscle SP and MP cell populations. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 10):1979-1988.
- (76) Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R et al. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* 2002; 157(5):851-864.
- (77) Skuk D, Goulet M, Roy B, Tremblay JP. Myoblast transplantation in whole muscle of nonhuman primates. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59(3):197-206.
- (78) Atala A. Recent applications of regenerative medicine to urologic structures and related tissues. *Curr Opin Urol* 2006; 16(4):305-309.
- (79) Atala A, Kim W, Paige KT, Vacanti CA, Retik AB. Endoscopic treatment of vesicoureteral reflux with a chondrocyte-alginate suspension. *J Urol* 1994; 152(2 Pt 2):641-643.
- (80) Caldamone AA, Diamond DA. Long-term results of the endoscopic correction of vesicoureteral reflux in children using autologous chondrocytes. *J Urol* 2001; 165(6 Pt 2):2224-2227.
- (81) Yokoyama T, Yoshimura N, Dhir R et al. Persistence and survival of autologous muscle derived cells versus bovine collagen as potential treatment of stress urinary incontinence. *J Urol* 2001; 165(1):271-276.
- (82) Huard J, Yokoyama T, Pruchnic R et al. Muscle-derived cell-mediated ex vivo gene therapy for urological dysfunction. *Gene Ther* 2002; 9(23):1617-1626.
- (83) Yiou R, Yoo JJ, Atala A. Restoration of functional motor units in a rat model of sphincter injury by muscle precursor cell autografts. *Transplantation* 2003; 76(7):1053-1060.
- (84) Yiou R, Dreyfus P, Chopin DK, Abbou CC, Lefaucheur JP. Muscle precursor cell autografting in a murine model of urethral sphincter injury. *BJU Int* 2002; 89(3):298-302.

-
- (85) Yiou R, Dreyfus P, Chopin DK, Abbou CC, Lefaucheur JP. Muscle precursor cell autografting in a murine model of urethral sphincter injury. *BJU Int* 2002; 89(3):298-302.
- (86) Kwon D, Minnery B, Kim Y et al. Neurologic recovery and improved detrusor contractility using muscle-derived cells in rat model of unilateral pelvic nerve transection. *Urology* 2005; 65(6):1249-1253.
- (87) Strasser H, Marksteiner R, Margreiter E et al. [Stem cell therapy for urinary incontinence]. *Urologe A* 2004; 43(10):1237-1241.
- (88) Hwang JH, Yuk SH, Lee JH et al. Isolation of muscle derived stem cells from rat and its smooth muscle differentiation [corrected]. *Mol Cells* 2004; 17(1):57-61.
- (89) Majka SM, Jackson KA, Kienstra KA, Majesky MW, Goodell MA, Hirschi KK. Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration. *J Clin Invest* 2003; 111(1):71-79.
- (90) Springer ML, Ozawa CR, Blau HM. Transient production of alpha-smooth muscle actin by skeletal myoblasts during differentiation in culture and following intramuscular implantation. *Cell Motil Cytoskeleton* 2002; 51(4):177-186.
- (91) Gupta A, Dixit A, Sales KM, Winslet MC, Seifalian AM. Tissue engineering of small intestine--current status. *Biomacromolecules* 2006; 7(10):2701-2709.
- (92) Hirschi KK, Majesky MW. Smooth muscle stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004; 276(1):22-33.
- (93) Estrada-Mondaca S, Carreon-Rodriguez A, Belkind-Gerson J. Biology of the adult enteric neural stem cell. *Dev Dyn* 2006.
- (94) Durbec PL, Larsson-Blomberg LB, Schuchardt A, Costantini F, Pachnis V. Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts. *Development* 1996; 122(1):349-358.
- (95) McCallion AS, Chakravarti A. EDNRB/EDN3 and Hirschsprung disease type II. *Pigment Cell Res* 2001; 14(3):161-169.
- (96) Gianino S, Grider JR, Cresswell J, Enomoto H, Heuckeroth RO. GDNF availability determines enteric neuron number by controlling precursor proliferation. *Development* 2003; 130(10):2187-2198.
- (97) Young HM, Bergner AJ, Muller T. Acquisition of neuronal and glial markers by neural crest-derived cells in the mouse intestine. *J Comp Neurol* 2003; 456(1):1-11.
- (98) Kruger GM, Mosher JT, Bixby S, Joseph N, Iwashita T, Morrison SJ. Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron* 2002; 35(4):657-669.

-
- (99) Bondurand N, Natarajan D, Thapar N, Atkins C, Pachnis V. Neuron and glia generating progenitors of the mammalian enteric nervous system isolated from foetal and postnatal gut cultures. *Development* 2003; 130(25):6387-6400.
- (100) Rauch U, Hansgen A, Hagl C, Holland-Cunz S, Schafer KH. Isolation and cultivation of neuronal precursor cells from the developing human enteric nervous system as a tool for cell therapy in dysganglionosis. *Int J Colorectal Dis* 2006; 21(6):554-559.
- (101) Almond S, Lindley RM, Kenny SE, Connell MG, Edgar DH. Characterisation and transplantation of enteric nervous system progenitor cells. *Gut* 2006.
- (102) Micci MA, Kahrig KM, Simmons RS, Sarna SK, Espejo-Navarro MR, Pasricha PJ. Neural stem cell transplantation in the stomach rescues gastric function in neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *Gastroenterology* 2005; 129(6):1817-1824.
- (103) Rosenblatt JD, Lunt AI, Parry DJ, Partridge TA. Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1995; 31(10):773-779.
- (104) Yau TM, Kim C, Ng D et al. Increasing transplanted cell survival with cell-based angiogenic gene therapy. *Ann Thorac Surg* 2005; 80(5):1779-1786.
- (105) Thompson RB, Emani SM, Davis BH et al. Comparison of intracardiac cell transplantation: autologous skeletal myoblasts versus bone marrow cells. *Circulation* 2003; 108 Suppl 1:II264-II271.
- (106) Mahmood Z, Byrne PJ, McMahon BP et al. Comparison of transesophageal endoscopic plication (TEP) with laparoscopic Nissen fundoplication (LNF) in the treatment of uncomplicated reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2006; 101(3):431-436.
- (107) Shaheen NJ. Raising the bar in studies of endoscopic anti-reflux procedures. *Gastroenterology* 2005; 128(3):779-782.
- (108) Tintillier M, Chaput A, Kirch L, Martinet JP, Pochet JM, Cuvelier C. Esophageal abscess complicating endoscopic treatment of refractory gastroesophageal reflux disease by Enteryx injection: a first case report. *Am J Gastroenterol* 2004; 99(9):1856-1858.
- (109) Fascetti Leon F. Esophageal injection of a biocompatible polymer as initial antireflux procedure in a neurologically impaired child. 2006. Ref Type: Generic
- (110) De CP, Milan G, Scarda A et al. Rosiglitazone modifies the adipogenic potential of human muscle satellite cells. *Diabetologia* 2006; 49(8):1962-1973.
- (111) Brimah K, Ehrhardt J, Mouly V, Butler-Browne GS, Partridge TA, Morgan JE. Human muscle precursor cell regeneration in the mouse host is enhanced by growth factors. *Hum Gene Ther* 2004; 15(11):1109-1124.

-
- (112) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411):143-147.
- (113) De CP, Delo D, Farrugia L et al. Angiogenic gene-modified muscle cells for enhancement of tissue formation. *Tissue Eng* 2005; 11(7-8):1034-1044.
- (114) Lavasani M, Lu A, Peng H, Cummins J, Huard J. Nerve growth factor improves the muscle regeneration capacity of muscle stem cells in dystrophic muscle. *Hum Gene Ther* 2006; 17(2):180-192.
- (115) Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS et al. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol* 2000; 151(6):1221-1234.
- (116) Kinney-Freeman SL, Majka SM, Jackson KA, Norwood K, Hirschi KK, Goodell MA. Altered phenotype and reduced function of muscle-derived hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2003; 31(9):806-814.
- (117) Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)* 2005; 2:8.
- (118) Yau TM, Kim C, Ng D et al. Increasing transplanted cell survival with cell-based angiogenic gene therapy. *Ann Thorac Surg* 2005; 80(5):1779-1786.
- (119) Thompson RB, Emani SM, Davis BH et al. Comparison of intracardiac cell transplantation: autologous skeletal myoblasts versus bone marrow cells. *Circulation* 2003; 108 Suppl 1:II264-II271.
- (120) De Coppi P, Callegari A, Chiavegato A et al. Amniotic fluid and bone marrow-derived mesenchymal stem cells can be converted to smooth muscle cells in the cryoinjured rat bladder and prevent compensatory hypertrophy of surviving smooth muscle cells. *Journal of Urology* (in press) 2006.
- (121) Faggian L, Pampinella F, Roelofs M et al. Phenotypic changes in the regenerating rabbit bladder muscle. Role of interstitial cells and innervation on smooth muscle cell differentiation. *Histochem Cell Biol* 1998; 109(1):25-39.
- (122) Montedonico S, ez-Pardo JA, Possogel AK, Tovar JA. Effects of esophageal shortening on the gastroesophageal barrier: an experimental study on the causes of reflux in esophageal atresia. *J Pediatr Surg* 1999; 34(2):300-303.
- (123) Vicente Y, da RC, Perez-Mies B, Madero R, Tovar JA. Effect of reflux and esophagitis on esophageal volume and acid clearance in piglets. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 38(3):328-337.
- (124) Ferrari G, Cusella-De AG, Coletta M et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279(5356):1528-1530.
- (125) Springer ML, Ozawa CR, Blau HM. Transient production of alpha-smooth muscle actin by skeletal myoblasts during differentiation in culture and following intramuscular implantation. *Cell Motil Cytoskeleton* 2002; 51(4):177-186.

-
- (126) Yablonka-Reuveni Z, Rivera AJ. Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev Biol* 1994; 164(2):588-603.
- (127) Chung SY, Krivorov NP, Rausei V et al. Bladder reconstitution with bone marrow derived stem cells seeded on small intestinal submucosa improves morphological and molecular composition. *J Urol* 2005; 174(1):353-359.
- (128) Huang H, Zhao X, Chen L et al. Differentiation of human embryonic stem cells into smooth muscle cells in adherent monolayer culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351(2):321-327.
- (129) Gaia Filho EV, Goldenberg A, Costa HO. Experimental model of gastroesophageal reflux in rats. *Acta Cir Bras* 2005; 20(6):437-444.
- (130) Marc A. Levitt and Alberto Peña in *Anorectal Malformations in Children* Alexander M. Holschneider, Springer 2006
- (131) Whitehead WE. Diagnosing and managing fecal incontinence: if you don't ask they won't tell. *Gastroenterology* 2005;129:6.
- (132) Bharucha AE, Zinsmeister AR, Locke GR, et al. Prevalence and burden of fecal incontinence: a population-based study in women. *Gastroenterology* 2005;129:42-9.
- (133) Mellgren A, Jensen LL, Zetterstrom JP, Wong WD, Hofmeister JH, Lowry AC. Long-term cost of fecal incontinence secondary to obstetric injuries. *Dis Colon Rectum* 1999;42:857-65.
- (134) Whitehead WE, Wald A, Norton NJ. Priorities for treatment research from different professional perspectives. *Gastroenterology* 2004;126:S1980-5.
- (135) Borrie MJ, Davidson HA. Incontinence in institutions: costs and contributing factors. *CMAJ* 1992;147:322-8. Snooks SJ, Swash M, Setchell M, Henry M. Injury to innervation of pelvic floor sphincter musculature in childbirth. *Lancet* 1984;2:546-50.
- (136) Kiff ES, Swash M. Slowed conduction in the pudendal
- (137) Fascetti-Leon F, Malerba A, et al. Murine Muscle Precursor Cells Survived and Integrated in a Cryoinjured Gastroesophageal Junction *Journal of Surgical Research* 143, 253-259 (2007)
- (138) de Lorijn F, de Jonge WJ, Wedel T, Vanderwinden JM, Benninga MA, Boeckxstaens GE. Interstitial cells of Cajal are involved in the afferent limb of the rectoanal inhibitory reflex. *Gut*. 2005 Aug;54(8):1107-13.
- (139) Fillmann HS, Llessuy S et al. Diabetes Mellitus and Anal Sphincter Pressures: An Experimental Model in Rats. *Dis Colon Rectum*, April 2007 50: 517-522

- (140) Jones OM, Brading AF, Mortensen NJ. Role of nitric oxide in anorectal function of normal and neuronal nitric oxide synthase knockout mice: a novel approach to anorectal disease. *Dis Colon Rectum*. 2003 Jul;46(7):963-70.
- (141) Kang SB, Lee HN, Lee JY, Park JS, Lee HS, Lee JY. Sphincter contractility after muscle-derived stem cells autograft into the cryoinjured anal sphincters of rats. *Dis Colon Rectum*. 2008 Sep;51(9):1367-73.
- (142) Kido H, Yasukawa H, Hirota T, Shindo A, Naruse T. Decrease in rat internal anal pressure with the use of a topical ointment containing a killed *E. coli* culture suspension. *Int J Colorectal Dis*. 2007 Mar;22(3):271-6. Epub 2006 Apr 21.
- (143) Lorenzi B, Pessina F, Lorenzoni P, Urbani S, Vernillo R, Sgaragli G, Gerli R, Mazzanti B, Bosi A, Saccardi R, Lorenzi M. Treatment of experimental injury of anal sphincters with primary surgical repair and injection of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Dis Colon Rectum*. 2008 Apr;51(4):411-20.
- (144) Bubnic SJ, Nagy A, Keating A. Donor hematopoietic cells from transgenic mice that express GFP are immunogenic in immunocompetent recipients. *Hematology* 2005;10:289-95.
- (145) Suvorova GN Regeneration of striated muscular tissue of the external rectal sphincter in the rat. *Morfologija*. 2002;121(1):89-91.
- (146) Kajbafzadeh AM, Elmi A, Talab SS, Esfahani SA, Tourchi A. Functional external anal sphincter reconstruction for treatment of anal incontinence using muscle progenitor cell auto grafting. *Dis Colon Rectum*. 2010 Oct;53(10):1415-21