



POLITECNICO
MILANO 1863

SCUOLA DI INGEGNERIA INDUSTRIALE
E DELL'INFORMAZIONE

EXECUTIVE SUMMARY OF THE THESIS

Design and realization of a bioink for tubular constructs made by porcine ECM gel

MASTER DEGREE IN BIOMEDICAL ENGINEERING

Author: ANTONELLA CARBUTTI, ANTONELLA SURIANO

Advisor: PROF. SARA MANTERO

Co-advisor: ING. FEDERICA POTERE

Academic year: 2020-2021

Key words: ECM; decellularization; biomaterial ink; 3D bioprinting

1. Introduction

The innovative medical and biomedical techniques evolution aims to remedy the so-called “transplant crisis” because the transplanted organs and tissues demand exceeds their availability. Hence the Regenerative Medicine and Tissue Engineering play a huge role in the development of new technologies and new methods to regenerate the injured region by promoting a spontaneous repair process. These new therapies try to overcome two of the most important limits of transplant, i.e. the immunological rejection and the need of immunosuppressive therapy [1]. The majority of regenerative therapies aims to create either a customized organ or tissue through either staminal or adult autologous cells, functionalized natural or synthetic scaffolds or extracellular matrix resulting from decellularization protocols. The latter allow the cellular and nuclear materials removal from tissues keeping the integrity and structure ECM (ExtraCellular Matrix) unchanged, using biological, chemical or physical agents or/and a mix of them. The evolution of Additive Ma-

nufacturing (AM) techniques in the biomedical field, namely 3D bioprinting, leads to the realization of tridimensional customized constructs in order to reproduce the structures complexity. The aim of the thesis is to reproduce tracheal and coronary substitutes compliant with the shape, functionality and integrity requirements of the original organs. Some decellularization protocols were tested to obtain trachea and aorta dECM (decellularized ECM), later freeze-dried and solubilized to gain dECM powders (pdECM). Moreover several solutions, based on gelatine and alginate, were made to create a printable biomaterial ink. To adopt the same experimental protocols, this study used porcine tracheal and aortic models due to their similar geometrical dimensions, instead of coronary arteries: the trachea diameter is 20-25 mm (thickness 2 mm); the aorta diameter is 20-30 mm (thickness 2 mm); the coronary arteries diameter is 4 mm (thickness 1 mm).

2. Materials & Methods

All experiments were conducted in the 3D Bioprinting and Soft Tissue Mechanics laboratory at LaBS of Milan Polytechnic.

All reagents were provided by Sigma-Aldrich

(UK).

2.1. Decellularization protocols

The six executed protocols have been inspired by two experimental studies, i.e. *Decellularization of Trachea With Combined Techniques for Tissue-Engineered Trachea Transplantation* [2] and *Whole rat stomach decellularization using a detergent-enzymatic protocol* [3]. The general steps carried out were:

1. Trachea and aorta thawing;
2. Removal of surrounding tissues and samples splitting;
3. Samples washing in PBS (phosphate buffer solution);
4. Samples immersion in different percentage of deoxycholic acid and dH₂O (distillate water), under biological hood;
5. Samples incubation at 37°C for 4 hours, mixing every 30 minutes;
6. Acid solution removal and samples washing with dH₂O and 1% P/S (Penicillin/Streptomycin/Gentamicine/Fungizone) at least an hour;
7. Samples immersion in solution made of Dnase, MgSO₄ or CaCl₂ and dH₂O under biological hood;
8. Solution removal and samples washing with dH₂O and 1% P/S (Penicillin/Streptomycin/Gentamicine/Fungizone) overnight.

All protocols details are listed in the below Table 1; n stands for numbers of cycles.

Protocols	n	I step	II step
First	3	0.25% deoxycholic acid	150 U Dnase e 50 mmmol/L MgSO ₄
Second	3	0.25% deoxycholic acid	150 U Dnase, 1.11 g/L CaCl ₂ , 0.9%NaCl
Third*	4	1% deoxycholic acid	22.5 mg/L Dnase, 1.11 g/L CaCl ₂
Fourth**	5	1.25% deoxycholic acid	22.5 mg/L Dnase, 1.11 g/L CaCl ₂
Fifth	3	4% deoxycholic acid	22.5 mg/L Dnase, 1.11 g/L CaCl ₂
Sixth	3	4% deoxycholic acid	2.5 mg/mL Dnase, 50 mmol MgSO ₄

Table 1: Summary of main protocol steps. [*First cycle: 0.25% deoxycholic acid; ** First cycle: 0.25% deoxycholic acid; fifth cycle: 4% deoxycholic acid].

The above records show how the percentage of deoxycholic acid increased from 0.25% to 4% to improve the decellularization yeld.

2.2. Decellularization protocols evaluation

The evaluation of decellularization protocols efficacy were led by Dr. Giorgio Croci at *Ospedale Maggiore-Policlinico di Milano*. QIAGEN kit

was used to quantify the DNA and cells content; Hematoxylin and Eosin (H&E) staining played a key role to visualize the structure and the nuclei and cells presence quality.

2.3. Freeze-drying

All decellularized samples were lyophilized to obtain the trachea and aorta dECM powder in order to prepare biomaterial inks.

The steps were:

- Freezing at -80°C;
- Freeze-drying;
- Immersion in liquid nitrogen followed by pulverization by pestle.

2.4. dECM powder enzymatic digestion

The trachea and aorta pdECM were digested with pepsin according to two protocols. Firstly two enzymatic digestions followed the *J.H. Park et al.* [4] modified protocol starting from 0.1 mg/mL of acetic acid dissolved pepsin:

- **First Digestion:** 0.12 g of pdECM were dissolved into 2mL of acetic acid for 72 hours at room temperature;
- **Second Digestion:** 0.04 g of pdECM were dissolved into 1.5 mL of acetic acid for 72 hours at room temperature.

The ratio 1:0.1 between powder and pepsin (0.8 g of pdECM and 0.08 g of pepsin) dissolved in 80 mL 0.01 M HCl for 96 hours at room temperature, was decisive for the third enzymatic digestion, performed by *Martin et al.* [5]. At the end the pH adjustment was carried out using 0.1 M NaOH drops.

2.5. Biomaterial inks preparation

Natural biomaterials were used to develop the right biomaterial inks in terms of chemical, physical and mechanical properties of each tracheal and aortic layers. Several attempts were actioned:

1. 4% alginate (Alginic Acid Sodium Salt, Low Viscosity, MP Biomedicals) were dissolved in 10 mL of dH₂O under continuous stirring overnight;
2. 4% alginate were dissolved in 10 mL of dH₂O under continuous stirring overnight and then mixed with 60 mM CaCl₂ pre-crosslinker (ratio 4:3);
3. 4% alginate were dissolved in 10 mL of

dH₂O under continuous stirring overnight, then mixed with 10% gelatin (Gelatin from bovine skin type B, Sigma-Aldrich) (ratio 1:1), dissolved in 10 mL of distillate water under continuous stirring for 15 minutes;

4. 8% gelatin - 7% alginate, following the *Di Giuseppe et al.* [6] protocol: 8% gelatin were dissolved in dH₂O at 60°C for 15 minutes under continuous stirring. Then 7% alginate was added keeping the solution at 37°C for one hour.

All solutions were stored at 4°C.

2.6. Tracheal and aortic structures design

The CAD software used to design constructs is *SolidWorks*. Two testing structures were shaped, as shown in Figure 1 and in Table 2, adapting geometrical dimensions to diameter printheads, 20 G (0.58 mm) and 22 G (0.41 mm), to start.

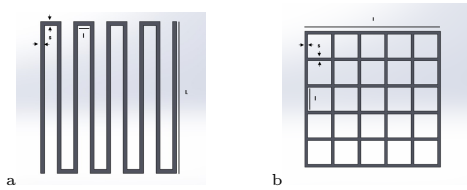


Figure 1: 3D CAD models: a) serpentine model; b) grid model.

	Serpentine 20 G	Grid 20 G	Serpentine 22 G	Grid 22 G
L (mm)	22	19.8	22	18.66
l (mm)	1.8	3.24	1.8	3.24
s (mm)	0.58	0.58	0.41	0.41

Table 2: Geometrical dimensions used to design serpentine and grid models for 20 G and 22 G printheads.

Later the tracheal and aortic models were designed taking in consideration the anatomical dimensions: the trachea diameter is 20-25 mm (thickness 2 mm); the aorta diameter is 20-30 mm (thickness 2 mm). The final 3D constructs are shown in Figure 2.

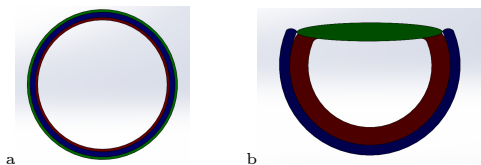


Figure 2: 3D CAD models: a) aortic model; b) tracheal model.

As graphically shown above, the aorta (Figure 2

a) was designed using four rings: one ring for intima tunica (red), two rings for media tunica (blue) and one ring for adventitia tunica (green); two structures were designed for tracheal model (Figure 2 b): an internal structure for connective and muscle tissues (red and green) and a fibrocartilaginous ring (blue). As described in Table 3 and Table 4, the constructs sizing depended on n parameter (mm distance between all components of each structure). Moreover components height was adapted to 22 G print-head dimension, so to 0.41 mm.

Aorta	n=0.5	n=0.7	n=1
Intima tunica (mm)	D _i =20; D _e =20.82	D _i =20; D _e =20.82	D _i =20; D _e =20.82
Media tunica 1 (mm)	D _i =21.82; D _e =22.64	D _i =22.22; D _e =23.04	D _i =22.82; D _e =23.64
Media tunica 2 (mm)	D _i =23.64; D _e =24.46	D _i =24.44; D _e =25.26	D _i =25.64; D _e =26.46
Adventitia tunica (mm)	D _i =25.46; D _e =26.28	D _i =26.66; D _e =27.48	D _i =28.46; D _e =29.28

Table 3: Aortic components sizing.

Trachea	n=0.5	n=0.7	n=1
Internal structure (mm)	R _i =10; R _e =11	R _i =10; R _e =11	R _i =10; R _e =11
Fibrocartilaginous ring (mm)	R _i =11.5; R _e =11.91	R _i =11.7; R _e =12.11	R _i =12; R _e =12.41

Table 4: Tracheal components sizing.

2.7. Slicing and g-code generation

Constructs slicing was done using the software *CELLINK HeartWare*. The default parameters remained unchanged, except for the layers height and nozzles diameter set to 0.41 mm or 0.58 mm (serpentine and grid structures). Gradually, the bioprint complexity was increased: starting from one layer to three/four and ten layers and from one extruder to two extruders. The final prototypes were characterized by ten layers and made by two extruders, as presented below in Figure 3.

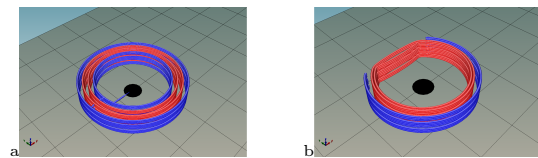


Figure 3: Final tracheal and aortic slicing made of 10 layers and 2 extruders.

The generated g-code had many error that could be easily removed modifying the opening and closing of cartridges valves using respectively the commands M760 and M761 for the first extruder and M762 and M763 for the second one.

2.8. 3D Bioprinting

The 3D bioprinting was carried out using *Cellink INKREDIBLE+*. The printer allows to rebuild tridimensional tissues by using a microextrusion pneumatic system and two printheads.

The initial essential steps are the printer calibration along x-y-z and, the pressure and temperature settings.

This first action taken was printing the testing structures (serpentine and grid) with all already made biomaterial inks and 20 G and 22 G printheads. Then the obtained constructs were crosslinked by 3% CaCl₂. The last printed constructs were three and ten layers trachea and aorta, characterized by 0.5, 0.7 and 1 mm of distance between each components to evaluate the extrusion filament behaviour. The final improvement was storing at 4°C the printed structures for 10 minutes and then crosslinking with CaCl₂.

3. Results

3.1. Decellularization protocols evaluation

The DNA and cellular contents were evaluated by Dr. Croci:

- **First protocol** The DNA content at the end of the cycles was in contrast with the histological evaluation as the latter showed a relevant cellular and DNA contents in both native and treated aorta, rather than quantitative analysis that showed that the native aorta DNA concentration was 163 ng/ μ L and the decellularized aorta DNA concentration was 2.5 ng/ μ L;
- **Third protocol** The quantitative evaluation was carried out on aortic samples: the DNA concentration of decellularized aorta was high at the value of 423 ng/ μ L, but lower than native aorta DNA concentration (614 ng/ μ L). The histological analysis confirmed the previous results; in addition, the tracheal decellularized samples maintained a significant and reduced cellular content, respectively in fibrocartilaginous and in muscle tissues.
- **Fifth protocol** Both decellularized and native aorta showed a degraded DNA, as demonstrated by the histological evaluation too. In fact, a quality control PCR was per-

formed to evaluate the integrity of the extracted DNA. As result, the only quantified value was the decellularized trachea: 104 ng/ μ L.

- **Sixth protocol** Similarly to the fifth protocol, the DNA content of native samples was not quantified. Although, decellularized trachea and aorta DNA contents were respectively 183 ng/ μ L and 143 ng/ μ L.

The results of the samples decellularization obtained by the second and fourth protocols were not received; however, the other protocols were processed.

In general, the decellularization protocols carried out didn't produce the desired results. In fact, the nuclear and cellular content still remained quite high exceeding the DNA limit values of 50 ng/mg of dehydrated tissue. Despite these results, the comparison of the last two protocols performances, in which the same number of cycles were conducted and the same quantities of deoxycholic acid and DNase were used, proved that the inclusion of CaCl₂, rather than MgSO₄, gave better outcomes.

3.2. Enzymatic digestion results

The aortic powder derived from freeze-drying procedure was enzymatically digested as previously described. The first two digestions didn't show the desired results; the last one gave a quite homogeneous solution. A further improvement could be achieved by constantly stirring the solution, to reduce the time achieving the same result and even obtain a more homogeneous solution.

3.3. 3D bioprinting results

The first alginate solution was not printed: the reason behind was the solution didn't achieve the desired density at room temperature. To improve the alginate printability, the pre-crosslinking agent was added to the cartridge at the ratio 4:3; the serpentine and grid structures were printed using a 20 G extruder and pressure of 7-10 kPa and then immediately cross-linked with calcium chloride for 15 min, as shown in Figure 4.

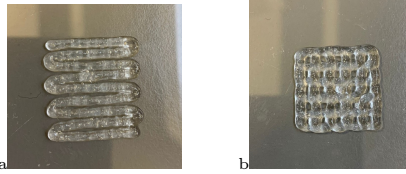


Figure 4: Printing of serpentine(a) and grid(b).

Since the extruded filament (0.58 mm diameter nozzle) was too thick, subsequent printing attempts were conducted using a 0.41 mm diameter nozzle. Then the 10% gelatin-4% alginate solution didn't give any printing results due to the solid state and probably the too low pressure set. The latest combination of 8% gelatin and 7% alginate gave promising results with the test structures as shown in Figure 5.

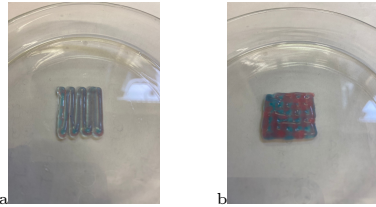


Figure 5: Two extrusion print of serpentine(a) and grid(b).

Then it was decided to place the solution in an incubator at 37°C before printing. Moreover, the temperature of the extruders was also increased and fixed at 37°C in order to maintain the sol behaviour of the material and therefore guarantee printability. Immediately after printing, the usual cross-linking with 3% CaCl₂ was performed for 5 min.

Subsequently, the tracheal and aortic structures were printed initially in 3 layers for the 3 distances n (0.5, 0.7 and 1 mm) considered; the pressure of the two cartridges was about 100 kPa and the resulting structures are shown in Figure 6, Figure 7 and Figure 8.

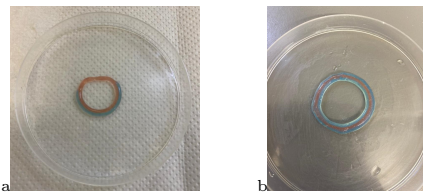


Figure 6: Printing of 3 layers of trachea (a) and aorta (b) with two extruders, $n=0.5$ mm.

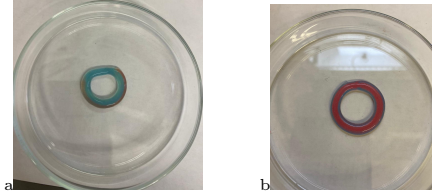


Figure 7: Printing of 3 layers of trachea (a) and aorta (b) with two extruders, $n=0.7$ mm.

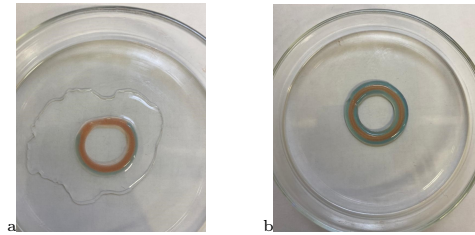


Figure 8: Printing of 3 layers of trachea (a) and aorta (b) with two extruders with $n=1$ mm.

The first result that can be seen when comparing the structures at different distances is the lower overlap between the blue and pink filaments by increasing n parameter. Fixing the right distance at $n=1$ mm, the definitive structures of the trachea and aorta were printed in 10 layers, as shown in Figure 9.

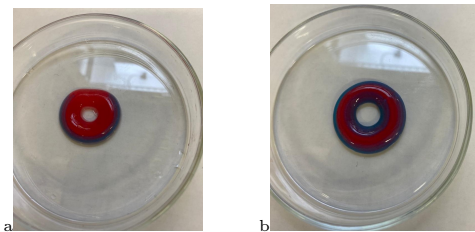


Figure 9: Printing of final tracheal (a) and aortic (b) structures, 10 layers.

The two final structures were placed at 4°C for 10 minutes before being crosslinked, avoiding the bubbles spillage. The increasing of layers number determined a final thickening of the entire structure and consequently a reduction of the internal diameter in both the trachea and aorta.

4. Conclusion and future development

The various decellularization protocols carried out show that it is not easy and straightforward to choose a procedure to obtain adequately decellularised tissue. In fact, in all six protocols quantitative and qualitative analyses showed

significant DNA and cell contents. Although the fifth protocol showed better results, these are not enough to consider decellularization adequate. Therefore, it might be useful, either, to increase the number of cycles or to formulate a new and appropriate protocol for the correct decellularization of porcine trachea and aorta. Following a careful research of the literature and experiments, the right composition of gelatine and alginate was achieved, which allowed the printing of the constructs using the *SolidWorks* software.

It was only with perseverance in the experimental experience that some results, still entirely preliminary, were achieved.

In the future, pursuing the thesis project, it could be possible to improve the constructs. First of all, starting from a freeze-dried powder, this can be combined with the chosen gelatine and alginate solution, following different ratios. To distinguish the components that constitute the trachea and aorta, a different percentage of solubilized extracellular matrix powder could be loaded between the two cartridges; rheological tests could be conducted to evaluate the behaviour of both mixtures prior printing and of the printed structures; mechanical analyses to examine the behaviour of the constructs at the pressure values applied in vivo to the aorta and trachea. In addition, the cross-linking procedure could be improved by using other cross-linkers, such as late-acting ones, that could allow homogeneous cross-linking.

Once the prototypes have been optimised and the functional characteristics have been reached, in line with the physiological ones, the last step could be the post-printing cell seeding or rather the incorporation of the cells in the biomaterial inks, adapted to the different tissue components, thus obtaining the bioinks. In particular, with only two printing cartridges available, mesenchymal stem cells (MSCs) could be used: for the cartilaginous ring of the trachea and the media layer of the coronary arteries, it could be effective to differentiate the MSCs prior printing into chondrocytes and muscle cells, respectively; rather, for the internal structure of the trachea and for the intimal and adventitious layer of the coronary arteries, the cells could be differentiated in a suitable culture medium, through static or dynamic conditioning. This could be useful

to reproduce the physiological environment and thus also ensure cell adhesion and proliferation. If the requirements of Good Laboratory Practice (GLP) and Good Manufacturing Practice (GMP) are satisfied, the in vivo experimentation on animal models could be continued, firstly by implanting the constructs subcutaneously and then in situ; if the results are acceptable, the study could continue in humans, starting the clinical phase and thus reaching a good goal in the field of Regenerative Medicine.

References

- [1] (2009). *Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa*. R. PIETRA-BISSA
- [2] (2018). *Decellularization of Trachea With Combined Techniques for Tissue-Engineered Trachea Transplantation*. A.BATIOGLU-KARAALTIN, E.OVALI, M.V.KARAALTIN, M.YENER, M.YILMAZ, F.EYUPOGLU, Y.Z.YILMAZ, E.R.BOZKURT, N.DEMIR, E.KONUK, E.S.BOZDAG, O.YIGIT, H.CANSIZ
- [3] (2018). *Whole rat stomach decellularisation using a detergent-enzymatic protocol*. E.ZAMBAITI, F.SCOTTONI, E.RIZZI, S.RUSSO, K.DEGUCHI, S.EATON, A.F.PELLEGATA, P.D.COPPI
- [4] (2018). *A rational tissue engineering strategy based on three-dimensional (3D) printing for extensive circumferential tracheal reconstruction*. J.H. PARK, J.Y. PARK, I-C NAM, M. AHN, J.Y. LEE, S.H. CHOI, S.W. KIM, D-W CHO
- [5] (2008). *Preparation and rheological characterization of a gel form of the porcine urinary bladder matrix*. D.O.FREYTES, J.MARTIN, S.S. VELANKAR, A.S. LEE, S.F. BADYLAK
- [6] (2018). *Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting*. M. DI GIUSEPPE, N. LAW, B. WEBB, R.A. MACRAE, L.J. LIEW, T.B. SERCOMBE, R.J.DILLEY, B.J. DOYLE

POLITECNICO DI MILANO

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Scuola di Ingegneria Industriale e dell'Informazione



Progettazione e realizzazione di un ECM gel porcino come bioink per costrutti tubolari

Relatore: Prof.essa Sara Mantero

Correlatore: Ing. Federica Potere

Tesi di Laurea di:

Antonella Carbutti, matricola 945952

Antonella Suriano, matricola 943700

Anno Accademico 2020-2021

Alle nostre famiglie.

*Ringraziamo la professoressa Mantero e
l'ingegnere Federica Potere per la fiducia e il supporto dati.*

Abstract

The innovative medical and biomedical techniques evolution aims to remedy the so-called “transplant crisis” because the transplanted organs and tissues demand exceeds their availability. Hence the Regenerative Medicine and Tissue Engineering play a huge role in the development of new technologies and new methods to regenerate the injured region by promoting a spontaneous repair process. These new therapies try to overcome two of the most important limits of transplant, i.e. the immunological rejection and the need of immunosuppressive therapy.

To this purpose, the thesis seeks the right application of decellularization, freeze-drying, the extracellular matrix solubilization and 3D bioprinting techniques to create a trachea or a coronary artery substitute according to the human anatomical structures. The work starts from the development of a valid decellularization protocol, compliant to the limit parameters required for the tissue decellularization. Then suitable protocols were sought to guarantee the extracellular matrix solubilization, after the dECM (decellularized extracellular matrix) lyophilization. Lastly, the suitable biomaterial ink composition was identified to bioprint the constructs taking care of the correct parameters.

Specifically, the thesis is structured as below: starting from *Introduction*, it provides an overview of the project work with an historical and medical background and defines the main points conducted to reach the final objective. Then *Chapter 1* provides the state-of-the-art in order to give a detailed explanation of all topics discussed in the thesis. In particular, the macro-areas considered are: the anatomy, pathology and conventional therapies of the trachea and coronary arteries to provide details about the anatomical structures

treated and the related pathologies and conventional approaches; Regenerative Medicine importance, acquired over the years, and the goals that it seeks, with the main technologies developed such as the decellularization and 3D printing methodologies; then explanation of decellularization and the different methods developed; extracellular matrix and description of its major components, important to preserve in decellularization protocols; freeze-drying meaning and steps to obtain a powder; the brief state of the art overview concerning enzymatic digestion of extracellular matrix powder; 3D printing and bioprinting, summarising the different steps and technologies; an overview of the main natural and synthetic bioinks used in the three-dimensional constructs bioprinting; Regenerative Medicine technologies and approaches applied to trachea and coronary arteries developed and being tested in the last years. All materials and methods used in the project are described in *Chapter 2*. We start with the chosen and modified decellularization protocols in order to process the trachea and aorta: six decellularization protocols were tested. Then the quantitative and qualitative evaluation methods of the decellularization protocols, performed by Dr. Croce, and the externally conducted freeze-drying procedure are briefly described. There is a section dedicated to the dECM enzymatic digestion, in which the three tested solubilization procedures are described. In addition, the gelatin and alginate-based bioinks, proposed for printing, are shown and, finally, all the pre-processing steps, i.e. the three-dimensional structures design with SolidWorks software and their slicing with Cellink software (both for test constructs and final prototypes), and processing steps, i.e. the constructs printing with the Inkredible+ printer (testing the different prepared materials and the different geometries with pre-crosslinking or post-crosslinking with single or many layers) are analysed. Then, *Chapter 3* is dedicated to results. The decellularization protocols evaluations, received from the Policlinico di Milano, are described and explained; the freeze-drying, enzymatic digestion and bioink preparation results are reported; the 3D bioprinting results are shown and demonstrated both for the test structures and for the trachea and aorta prototypes with 0.41 mm or 0.58 mm diameter nozzles, with a single layer or with several layers and then also with two extruders. The last attempt was, in fact, the tracheal and aortic printing

with 10 layers using two cartridges, containing the same solution but different dyes, in order to reproduce the components of aorta (intima, media, adventitia) and trachea (connective and muscular tissue, fibrocartilaginous ring). The whole project is summarised in the last section with evaluations and conclusions and possible future developments. In fact, starting from the initial idea of designing and producing an ECM (extracellular matrix) porcine gel as a bioink for tubular constructs, the intention is to implement the studies carried out and transfer them to coronary arteries. The qualitative and quantitative analyses could be extended for a complete characterisation of all the procedural steps; the two bioinks composition, loaded in the printing cartridges, could be varied to improve the printability parameters; the cells could be incorporated or post-printing seeded; the constructs could be adequately stimulated by physical and chemical stimuli. If the experiment is carried on, the suitably designed and characterised constructs could be tested *in vivo*, in animal models, and subsequently, enter in the clinical phase, on humans, achieving a goal in the field of Regenerative Medicine.

Sommario

Lo sviluppo di diverse tecniche mediche e biomediche mirano spesso a porre rimedio alla cosiddetta “crisi di trapianto” per cui la necessità di organi e tessuti da trapiantare supera notevolmente la disponibilità degli stessi. In tale prospettiva si inserisce la Medicina Rigenerativa e quindi l’Ingegneria dei Tessuti, tramite la ricerca di nuove tecnologie e nuovi metodi volti a rigenerare la regione lesionata favorendo un processo spontaneo di riparazione, superando così due limiti fondamentali del trapianto quali, il rigetto immunologico e la necessità di una terapia immunosoppressiva.

In quest’ottica si colloca il presente lavoro di tesi che, ricercando la giusta combinazione di tecniche di decellularizzazione, liofilizzazione, solubilizzazione della matrice extracellulare e di stampa 3D, si pone come obiettivo ultimo la realizzazione di un sostituto tridimensionale di trachea e di arteria coronarica il più possibile conformi alle strutture anatomiche umane. Il progetto è stato sviluppato a partire dalla messa a punto di un valido protocollo di decellularizzazione che soddisfacesse i parametri limite necessari affinché la trachea e l’aorta porcini fossero adeguatamente decellularizzati; gli studi sono stati effettuati su campioni di trachea e aorta di maiale ma l’intento finale è quello di trasferire questi ultimi approfondimenti alle arterie coronariche, vasi arteriosi simili all’aorta ma con dimensioni ridotte. Dopo la liofilizzazione della dECM (matrice extracellulare decellularizzata), sono stati ricercati protocolli idonei a garantire la solubilizzazione della matrice extracellulare; in ultimo è stata individuata la composizione adatta del bioinchiostro per la successiva stampa tridimensionale dei costrutti di interesse con i corretti parametri.

Entrando nello specifico, la tesi è strutturata nel seguente modo: a partire dall’*Introduzione*,

essa fornisce una visione generale del progetto di lavoro, contestualizzandolo in ambito storico e sanitario e definisce i punti salienti condotti per raggiungere l'obiettivo finale. All'interno del *Capitolo 1* è presentato lo stato dell'arte per permettere una migliore comprensione degli argomenti trattati nella tesi. In particolare le macro-aree considerate sono: anatomia, patologia e terapie convenzionali della trachea e delle arterie coronariche per fornire dettagli sulle strutture anatomiche trattate e le relative problematiche e patologie con gli approcci interventistici convenzionali. Nella sezione riguardante la Medicina Rigenerativa, è spiegata l'importanza che ha acquisito nel corso degli anni e gli obiettivi che essa persegue con le principali tecnologie sviluppate, focalizzando l'attenzione sulle metodologie di decellularizzazione e stampa 3D; quindi spiegazione della decellularizzazione e dei vari metodi sviluppati; matrice extracellulare e descrizione dei maggiori componenti, importanti da preservare durante la decellularizzazione; significato della liofilizzazione e step previsti per l'ottenimento di una polvere; breve panoramica sullo stato dell'arte riguardante la digestione enzimatica della polvere di matrice extracellulare; stampa e biostampa 3D, elencando i diversi step e le tecnologie in uso; panoramica dei principali bioinks naturali e sintetici, utilizzati nella biostampa dei costrutti tridimensionali; tecnologie e approcci di Medicina Rigenerativa applicati a trachea e arterie coronarie sviluppati e in corso sperimentale negli ultimi anni. Spostandoci nel vivo del lavoro di tesi, all'interno del *Capitolo 2* sono descritti tutti i materiali e i metodi impiegati nel progetto. Si inizia con i protocolli di decellularizzazione scelti e adattati per trattare gli organi di interesse, trachea e aorta: in tutto sono stati testati sei protocolli di decellularizzazione. Successivamente sono presentati i metodi di valutazione quantitativa e qualitativa dei protocolli di decellularizzazione, effettuati dal Dr. Croce, e il procedimento di liofilizzazione, condotto esternamente. È presente una sezione dedicata alla digestione enzimatica della dECM, in cui sono state descritte le tre procedure di solubilizzazione provate. Inoltre sono illustrati i bioinchiostri proposti per la stampa, a base di gelatina e alginato, e in ultimo sono analizzati tutti gli step di pre-processing quali, progettazione delle strutture tridimensionali con il software *SolidWorks* e slicing delle stesse con il software *Cellink*, sia per i costrutti di prova sia per i prototipi

finali, e di processing come la stampa dei costrutti con la stampante *Inkredible+*, testando i diversi materiali preparati e le diverse geometrie con pre-reticolante o post-reticolante a singoli o molti strati. Il *Capitolo 3*, invece, é dedicato ai risultati. Sono mostrate e spiegate le valutazioni relative ai protocolli di decellularizzazione ricevute dal Policlinico di Milano; sono riportati i risultati relativi alla liofilizzazione, digestione enzimatica e preparazione dei bioinks; sono mostrati e commentati i risultati della biostampa 3D sia per le strutture di prova sia per le strutture di trachea e aorta con ugelli di 0.58 mm o di 0.41 mm di diametro, a singolo strato o con diversi strati e quindi anche con due estrusori. Il tentativo ultimo é stato, infatti, la stampa di trachea e aorta a 10 strati con ugelli di 22 G utilizzando due cartucce, contenenti la stessa soluzione ma coloranti differenti, per riprodurre le componenti di aorta (tonaca intima, media, avventizia) e di trachea (tessuto connettivo e muscolare, anello fibrocartilagineo). Nell'ultima sezione (*Conclusioni*) si riassume tutto il progetto effettuato con le relative valutazioni, conclusioni e i possibili sviluppi futuri. Sono stati raggiunti alcuni risultati ancora del tutto preliminari infatti, partendo dall'idea iniziale di progettazione e realizzazione di un ECM (matrice extracellulare) gel porcino come bioink per costrutti tubolari, l'intento é quello di implementare gli studi effettuati e trasferirli alle arterie coronarie. Si potrebbero ampliare le analisi qualitative e quantitative per una completa caratterizzazione di tutti gli step procedurali, si potrebbe variare la composizione dei due bioinks da caricare nelle cartucce di stampa migliorando i parametri di stampabilitá e tenendo conto delle differenti componenti che costituiscono trachea e arterie coronarie, si potrebbero incorporare o seminare successivamente le cellule e si potrebbero stimolare adeguatamente i costrutti tramite stimoli fisici e chimici. Proseguendo con la sperimentazione, i costrutti opportunamente realizzati e caratterizzati potrebbero essere testati in vivo, su modelli animali, e successivamente, entrando nella fase clinica, sull'uomo, raggiungendo un buon traguardo nel campo della Medicina Rigenerativa.

Acronimi

A.I.D.O	Associazione italiana per la donazione di Organi, Tessuti e cellule
HLA	Antigene Leucocitario umano
ECM	Matrice Extracellulare
AM	Additive Manufacturing
3D	Tridimensionale
dECM	Matrice Extracellulare decellularizzata
dECM-t	Matrice Extracellulare di trachea decellularizzata
dECM-a	Matrice Extracellulare di aorta decellularizzata
ACD	Arteria Coronaria Destra
ACS	Arteria Coronaria Sinistra
MR	Medicina Rigenerativa
TE	Tissue Engineering
AIFA	Agenzia Italiana del Farmaco
DNA	Acido desossiribonucleico
PLA	Acido polilattico
PGA	Acido poliglicolico
PCL	Policaprolattone
MSC	Cellule Staminali Mesenchimali
E	Campo Elettrico

SDS	Sodio Dodecil Solfato
GAG	Glicosaminoglicani
GF	Fattori di crescita
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)dimetilammonio]-1-propansolfonato
TBP	Tributil-fosfato
RNA	Acido Ribonucleico
EDTA	Acido Etilendiamminotetraacetico
EGTA	Acido Etilenglicole Tetracetico
DAPI	4',6-diamidin-2-fenilindolo
H&E	Ematossilina ed Eosina
PI	Ioduro di propidio
ELISA	Saggio immuno-assorbente legato ad un enzima
2D	Bidimensionale
HPLC	Cromatografia liquida ad alta prestazione
pdECM	Polvere di Matrice Extracellulare decellularizzata
SEM	Microscopio Elettronico a Scansione
TEM	Microscopio Elettronico a Trasmissione
G'	Modulo elastico
G''	Modulo viscoso
CAD	Progettazione assistita dall'elaboratore
FDM	Modellazione a Deposizione Fusa
LIFT	Laser-Induced Forward Transfer
SLA	Stereolitografia
T_c	Temperatura di Transizione
RX	Radiografia

EDS	Spettrometria per Dispersione di Energia
AFM	Microscopio a Forza Atomica
TC	Tomografia Computerizzata
DSC	Calorimetria Differenziale a Scansione
IR	Raggi Infrarossi
FTIR	Spettroscopia Infrarossa
XPS	Spettroscopia Fotoelettronica a Raggi X
ESCA	Spettroscopia Elettronica per Applicazioni Chimiche
PEG	Polietilenglicole
HEMA	Idrossietil-metacrilato del destrano
GTA	Glutaraldeide
DNase	Desossiribonucleasi
PDGF	Fattore di crescita derivato dalle piastrine-bb
VEGF	Fattore di crescita endoteliale vascolare
TEBV	Tissue-Engineered Blood Vessels
GelMA/C	Gelatina metacrilato/catecolo
dH₂O	Acqua distillata
MgSO₄	Solfato di Magnesio
P/S	Penicillina, Streptomina, Gentamicina e Fungizone
RNAi	RNA interference
LCD	Display a cristalli liquidi
STL	Standard Triangulation Language

Indice

Abstract	i
Sommario	v
Acronimi	ix
Elenco delle figure	xvii
Elenco delle tabelle	xxi
Introduzione	1
1 Stato dell'arte	6
1.1 Trachea	6
1.1.1 Anatomia	6
1.1.2 Patologia della trachea	8
1.1.3 Terapie convenzionali della trachea	9
1.2 Arterie coronarie	12
1.2.1 Anatomia	12
1.2.2 Patologie delle arterie coronarie	13
1.2.3 Terapie convenzionali delle arterie coronarie	14
1.3 Medicina Rigenerativa	16
1.3.1 Decellularizzazione	20

1.3.1.1	Matrice extracellulare	23
1.3.2	Liofilizzazione	26
1.3.3	Digestione enzimatica della polvere di dECM	28
1.3.4	3D Bioprinting	28
1.3.5	Bioink	34
1.3.6	Medicina Rigenerativa applicata alla trachea	41
1.3.7	Medicina Rigenerativa applicata alle arterie coronarie	45
2	Materiali e Metodi	51
2.1	Decellularizzazione di trachea e aorta	51
2.1.1	Primo protocollo di decellularizzazione	52
2.1.2	Secondo protocollo di decellularizzazione	55
2.1.3	Terzo protocollo di decellularizzazione	57
2.1.4	Quarto protocollo di decellularizzazione	59
2.1.5	Quinto protocollo di decellularizzazione	62
2.1.6	Sesto protocollo di decellularizzazione	65
2.2	Valutazione della decellularizzazione	67
2.3	Liofilizzazione	68
2.4	Digestione enzimatica della dECM	68
2.5	Preparazione dei biomaterial inks	69
2.6	Progettazione della struttura di trachea e aorta	71
2.7	Slicing del progetto e generazione del g-code	74
2.8	3D Bioprinting: Inkredible plus	78
3	Risultati	83
3.1	Valutazione della decellularizzazione	83
3.1.1	Primo protocollo di decellularizzazione	83
3.1.2	Terzo protocollo di decellularizzazione	85
3.1.3	Quinto protocollo di decellularizzazione	86

3.1.4	Sesto protocollo di decellularizzazione	86
3.2	Risultati della liofilizzazione e della digestione enzimatica	87
3.3	Risultati di stampa 3D	88
	Conclusione e sviluppi futuri	95
	Appendice A: Protocollo di analisi dei campioni decellularizzati	100
	Appendice B: Impostazioni di stampa, stampante e filamento	105
	Appendice C: G-code	110
	Bibliografia	116

Elenco delle figure

1.1	Raffigurazione della trachea.[7]	7
1.2	Procedura di anastomosi della trachea. [12]	9
1.3	Terapie convenzionali della trachea. [13]	11
1.4	Raffigurazione delle coronarie. [15]	12
1.5	Terapie convenzionali delle arterie coronarie. [22]	16
1.6	Raffigurazione della matrice extracellulare.[25]	24
1.7	Rappresentazione dei diversi metodi di stampa [32].	33
1.8	Trachea con struttura di supporto di PCL. [42]	42
1.9	Raffigurazione della trachea decellularizzata con supporto. [5]	43
1.10	Impalcatura PCL stampata in 3D. [43]	43
1.11	Costrutto in PCL e anelli di silicone con applicazione di foglietti di mucosa di trachea decellularizzata e di MSC. [44]	44
1.12	Stampa 3D di anelli in policarbonato posizionati manualmente sullo scaffold. [45]	44
1.13	Scaffold stampato 3D in poliuretano teroplastico. [46]	44
1.14	Rappresentazione del metodo di ottenimento dello scaffold in PCL e alginato. [47]	45
1.15	Innesto vascolare con strato interno carico di VEGF e strto esterno carico con PDGF. [49]	46
1.16	Processo di fabbricazione di un TEBV senza scaffold, basato su hMSC. [50] .	47

1.17	Schema per produrre TEBV con cellule muscolari lisce indotte e cellule endoteliali derivate dal sangue del cordone umano. [51]	47
1.18	Stampa 3D dello scaffold in PCL. [52]	47
1.19	Biostampa a estrusione coassiale del costrutto vascolare: la parte interna contiene impasto reticolato fuggitivo e cellule endoteliali; la parte esterna contiene bioinciostrro GelMA/C e cellule muscolari lisce. [53]	48
1.20	Stampa multimateriale a sei strati con tre diverse composizioni di inchiostro per riprodurre i tre strati della struttura vascolare. [54]	48
2.1	Aorta e trachea native, dopo la rimozione dei tessuti circostanti.	52
2.2	Campioni ottenuti dal primo protocollo di decellularizzazione, a destra l'aorta e a sinistra la trachea.	54
2.3	Campioni ottenuti dal secondo protocollo di decellularizzazione, a destra l'aorta e a sinistra la trachea.	57
2.4	Campioni ottenuti dal terzo protocollo di decellularizzazione di trachea e aorta.	59
2.5	Campioni ottenuti dal quarto protocollo di decellularizzazione di trachea e aorta.	62
2.6	Campioni ottenuti dal quinto protocollo di decellularizzazione di trachea e aorta.	64
2.7	Campioni ottenuti dal sesto protocollo di decellularizzazione di trachea e aorta.	66
2.8	Sezioni anatomiche rispettivamente di trachea e aorta.	69
2.9	Modelli CAD di prova.	71
2.10	Modelli 3D delle strutture oggetto di studio.	72
2.11	Disegni CAD esemplificativi delle strutture di aorta e trachea.	74
2.12	Sulla sinistra della schermata Cellink é presente l'area di stampa che mostra il costrutto da realizzare e il percorso dei due estrusori in blu e rosso; sulla destra sono specificati il tempo di stampa, il numero di layer e altre informazioni utili.	76
2.13	Risultati dello Slicer dei costrutti di aorta e trachea.	77

2.14	Bioprinter INKREDIBLE+.	79
3.1	Immagini istologiche dei campioni di aorta ottenute dal primo protocollo di decellularizzazione.	84
3.2	Immagini istologiche dei campioni di trachea ottenute dal primo protocollo di decellularizzazione.	85
3.3	pdECM-t a destra e pdECM-a a sinistra.	87
3.4	Soluzione di pepsina, acido cloridrico e pdECM al termine delle 96 ore.	88
3.5	Costrutti stampati a singolo strato con alginato al 4% e pre-reticolante secondo un rapporto 4:3 e utilizzando l'ugello a 20 G.	89
3.6	Stampa con due estrusori delle strutture di prova di serpentina e griglia.	90
3.7	Stampa di 3 strati di trachea e aorta con due estrusori con n=0.5 mm.	91
3.8	Stampa di 3 strati di trachea e aorta con due estrusori con n=0.7 mm.	91
3.9	Stampa di 3 strati di trachea e aorta con due estrusori con n=1 mm.	92
3.10	Stampa di 10 strati di trachea e aorta con due estrusori con n=1 mm.	93

Elenco delle tabelle

2.1	Riassunto dei principali step dei protocolli di decellularizzazione [*Per il primo ciclo é stato utilizzato lo 0.25% di Acido deossicolico; ** Per il primo ciclo é stato utilizzato lo 0.25% di Acido deossicolico e per il quinto ciclo il 4%].	67
2.2	Composizione dei quattro biomaterial inks realizzati.	70
2.3	Dimensionamento dei modelli di serpentina e griglia per gli ugelli 20 e 22 G.	72
2.4	Dimensionamento delle componenti dell'aorta.	73
2.5	Dimensionamento delle componenti della trachea.	73
3.1	Risultati della quantificazione del DNA nei campioni di aorta.	84

Introduzione

La “crisi di trapianto” é una delle principali difficoltà delle terapie convenzionali che ha spinto la scienza verso nuove frontiere. Tra queste, la Medicina Rigenerativa punta a colmare il crescente dislivello fra donatori e richiedenti d’organo o di tessuto [1]. Questo divario ha comportato un aumento dei tempi medi di attesa, pertanto, i pazienti non ricevono il trapianto per tempo: i dati del Ministero della Salute mostrano infatti un’aspettativa solitamente compresa tra i due e i cinque anni aggiornata settimanalmente [2]. La pandemia da Sars Covid-19 ha peggiorato questa crisi a causa dell’impossibilità di eseguire la normale procedura di trapianto nei reparti di terapia intensiva, a partire dall’identificazione del donatore, espianto e trapianto vero e proprio [3]. I dati dell’Associazione Italiana per la Donazione di Organi, Tessuti e Cellule (A.I.D.O.) hanno rilevato una riduzione percentuale del numero di trapianti da donatore vivente nei diversi Paesi europei, come Spagna e Francia. Questa tendenza potrebbe indurre un peggioramento di un fenomeno già presente prima della pandemia, quale l’esclusione dalle liste di attesa per i trapianti di pazienti in condizioni critiche.

La Medicina Rigenerativa, nata dalla sinergia tra diverse discipline come Biologia cellulare e molecolare, Bioingegneria e Ingegneria dei Tessuti, Scienze cliniche e chirurgiche, include terapie innovative che hanno l’obiettivo di supportare e attivare l’intrinseca capacità riparativa del corpo umano. Le tecniche sviluppate consentono la sostituzione, il ripristino e la rigenerazione di cellule, tessuti e organi danneggiati o malati, superando uno dei principali problemi delle tecniche convenzionali, quale il rigetto immunologico. Il donatore e il

ricevente, infatti, devono possedere una determinata compatibilità immunologica definita dalla presenza di un gruppo di antigeni HLA altamente specifici espressi sulla superficie delle cellule, deputati al riconoscimento univoco dell'organismo. La grande variabilità delle proteine, dovuta alla ricombinazione genica, rende pertanto complicato il raggiungimento del livello di compatibilità richiesto. Le tecniche di Medicina Rigenerativa sono in grado, dunque, di superare questa difficoltà tramite terapie a base di cellule autologhe staminali o adulte, la creazione di costrutti di origine naturale o artificiale opportunamente funzionalizzati, la produzione di matrici extracellulari ottenute attraverso processi di decellularizzazione. I diversi protocolli di decellularizzazione, tramite l'utilizzo di agenti fisici, biologici, chimici o la combinazione dei tre, prevedono la rimozione di tutto il materiale cellulare e nucleare dal tessuto o dall'organo prelevato da donatore, preservando la struttura, l'attività biologica e l'integrità meccanica dell'ECM, nonché l'impalcatura per l'impianto di nuove cellule proprie del paziente ricevente e quindi per la ricellularizzazione. L'obiettivo è dunque l'ottenimento di un organo funzionale per un ipotetico impianto, che ha permesso di superare i due grandi ostacoli legati al trapianto: la scarsa disponibilità di tessuti o organi e il rigetto immunologico, evitando molto spesso l'utilizzo di terapie immunosoppressive. La decellularizzazione è stata già sperimentata e applicata su modelli animali per diversi organi e tessuti, ma è necessario che i protocolli siano ulteriormente implementati per trasferirli in ambito clinico. Infatti, persistono ancora alcune problematiche: la possibile perdita delle caratteristiche native della matrice extracellulare; il mancato raggiungimento del minimo contenuto di DNA e cellule ammissibile; l'esigenza di un costrutto paziente-specifico in termini di forma, tipo, età, tempo e zona della superficie corporea interessata [4]. Questo aspetto della "personalizzazione" di un dispositivo, proprio per la grande variabilità tra gli individui, è l'aspetto fondamentale della Medicina moderna.

Per la realizzazione di scaffold funzionalizzati, oltre alla necessità di ricercare dei materiali naturali o sintetici con proprietà simili a quelle dei tessuti biologici, bisogna tener conto della complessità strutturale degli stessi organi o tessuti. Grazie allo sviluppo di tecnologie di Additive Manufacturing (AM), in particolare la stampa 3D, è stato possibile trasferire

la realizzazione di strutture tridimensionali anche in campo biomedico in cui, a partire da un'immagine solitamente diagnostica del paziente, si elabora un modello 3D digitale quale input di stampa. L'utilizzo di queste tecniche, rispetto a quelle convenzionali, ha permesso di ottimizzare la realizzazione di un costrutto bioingegnerizzato funzionalizzato, portando ad alcuni vantaggi: dal momento che la funzione di un organo o tessuto é subordinata alla forma dello stesso, é possibile ricreare strutture con geometrie complesse e paziente-specifiche; é possibile ridurre lo spreco di materiale utilizzato, grazie al principio additivo della stampa; é possibile incorporare direttamente le cellule in fase di stampa.

Partendo dai sopracitati pro e contro della Medicina Rigenerativa e quindi della decellularizzazione e della stampa, il presente lavoro di tesi ha l'obiettivo di realizzare sostituti tracheali e coronarici, il piú possibile conformi ai requisiti di forma, funzionalità e integritá delle strutture native di trachea e arterie coronariche. Partendo dall'isolamento della trachea e dell'aorta porcina, sono stati svolti alcuni protocolli di decellularizzazione, da cui sono stati ottenuti campioni di matrice extracellulare decellularizzata (dECM); attraverso un processo di liofilizzazione, la dECM-t (matrice decellularizzata della trachea) e dECM-a (matrice decellularizzata dell'aorta) sono state ridotte in polvere e poi solubilizzate. Sono state preparate soluzioni a base di gelatina e alginato, con lo scopo di ottenere un gel stampabile. L'intento finale é quello di combinare la polvere di matrice extracellulare (pdECM) di trachea e aorta con questi materiali ed eventualmente incorporare successivamente le cellule all'interno dei gel per realizzare costrutti tracheali e aortici con l'utilizzo della stampa 3D. In tal modo si potrebbero superare due limiti importanti, quali, la perdita di alcune proprietà della dECM a seguito del processo di decellularizzazione, tramite la combinazione della polvere di matrice extracellulare con un materiale adeguato e la limitata efficienza di semina cellulare del costrutto post-stampa, tramite l'incorporazione delle cellule nel gel. Questa combinazione di tecniche, applicate alla trachea e all'aorta é ancora in fase sperimentale. Infatti, la ricerca si é incentrata sulla sola decellularizzazione, sulla stampa di un costrutto tracheale o aortico con materiali sintetici o sulla stampa di un supporto con materiale sintetico alla struttura della matrice extracellulare decellularizzata [5]. Nonostante

l'intento sia quello di approfondire la ricerca sulla rigenerazione di arterie coronariche, il lavoro é stato svolto sull'aorta e sulla trachea le cui dimensioni sono comparabili e pertanto é stato possibile applicare gli stessi protocolli sperimentali: la trachea ha, infatti, un diametro di circa 20-25 mm e uno spessore di 2 mm, l'aorta un diametro di 20-30 mm e uno spessore di 2 mm. Le coronarie, infatti, sono caratterizzate da una composizione tissutale simile all'aorta da cui derivano, infatti seppur in diverse percentuali sono costituite sempre da endotelio, tessuto elastico, tessuto muscolare e tessuto fibroso, ma presentano dimensioni notevolmente ridotte, con un diametro di 4 mm e uno spessore di 1 mm. L'idea futura, comunque, é quella di trasferire queste metodologie e gli ulteriori miglioramenti, anche alle coronarie. Si spera, inoltre, che lo studio effettuato possa essere approfondito, al fine di valutare i risultati in ambito pre-clinico e successivamente clinico.

Capitolo 1

Stato dell'arte

1.1 Trachea

1.1.1 Anatomia

La trachea, come mostrato nella Figura 1.1 é un organo dell'apparato respiratorio che consente il passaggio dell'aria che deve essere opportunamente ripulita dall'esterno fino ai polmoni, dalla laringe ai bronchi [6] : é un condotto, con una lunghezza di circa 11 cm e un diametro di 2,5 cm, che inizia anteriormente alla vertebra C_6 , con l'attacco legamentoso alla cartilagine cricoidea, e termina a livello del mediastino, in corrispondenza della vertebra T_5 , con la biforcazione bronchiale dove si divide nei due bronchi principali destro e sinistro [7] e successivamente, a livello dei polmoni, in bronchioli e poi alveoli.

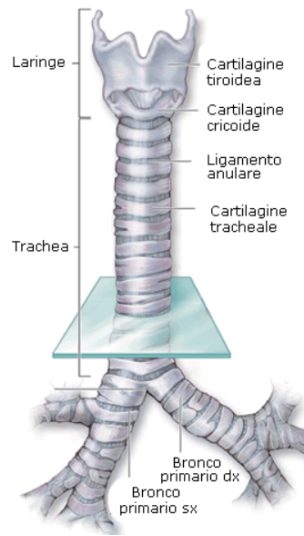


Figura 1.1: Raffigurazione della trachea.[7]

La trachea é, quindi, una struttura tubolare fibro-cartilaginea molto resistente e flessibile, costituita dai seguenti strati:

- **Mucosa tracheale:** é rivestita da epitelio respiratorio poggiante su uno strato di tessuto connettivo, lamina propria, che separa l'epitelio dalle cartilagini. L'epitelio é caratterizzato dalla presenza di ciglia che, insieme al muco, filtrano e bloccano le sostanze indesiderate introdotte con la respirazione; il muco, infatti, viene eliminato spingendolo in alto verso la laringe e poi, attraverso l'epiglottide, nell'esofago e nello stomaco dove si trovano i succhi gastrici che digeriscono questa sostanza [7]-
- **Sottomucosa tracheale:** circondante la mucosa, é uno spesso strato di tessuto connettivo che contiene le ghiandole mucose comunicanti con la superficie epiteliale tramite i dotti escretori, vasi sanguigni e terminazioni nervose.
- **Cartilagine tracheale:** esternamente ci sono circa 15-20 anelli cartilaginei tracheali uniti da legamenti anulari elastici, i quali proteggono il passaggio dell'aria all'interno della trachea ed evitano collassamento, iperespansione e variazioni pressorie. Gli anelli

cartilaginei tracheali, che determinano il profilo superficiale irregolare, hanno la forma di C con la porzione aperta posteriore rivolta verso l'esofago in grado di deformarsi durante la deglutizione, permettendo il passaggio di cibo. A livello posteriore, i margini di ciascun anello tracheale sono legati tra loro da un legamento elastico e dal muscolo tracheale. Quest'ultimo, con la contrazione, modifica il diametro del lume della trachea e quindi la resistenza al flusso aereo mentre, con l'attivazione del sistema nervoso simpatico, aumenta il diametro della trachea per garantire il passaggio di flussi di aria importanti.

Inoltre ci sono altri fascetti a decorso longitudinale, che si portano dalla trachea all'esofago, andando a costituire il muscolo tracheoesofageo.

1.1.2 Patologia della trachea

Le patologie a carico della trachea, infiammatorie autoimmuni o iodopatiche, possono essere suddivise essenzialmente in patologie congenite e patologie acquisite [8]. Le prime, molto rare, comprendono: atresia della trachea cioè assenza di pervietà del canale; stenosi tracheale ossia restringimento patologico che ostacola il normale passaggio di aria; tracheomalacia cioè mancanza di rigidità degli anelli tracheali che causano durante l'inspirazione il collasso del lume tracheale; condrodisplasia cioè malattia genetica con deformazione delle cartilagini; fistola tracheoesofagea cioè discontinuità congenita dell'esofago dove il moncone a fondo cieco distale comunica con la trachea attraverso una fistola. Le seconde comprendono patologie post-traumatiche e patologie neoplastiche che portano allo sviluppo di tumori benigni o maligni.

La riduzione del lume tracheale è una delle cause più gravi in quanto rappresenta un ostacolo al passaggio dell'aria, soprattutto nella fase inspiratoria. Questo fenomeno è per lo più causato dal ricorso all'utilizzo di manovre invasive ventilatorie, nonché da intubazioni brevi o prolungate mirate a gestire insufficienze respiratorie. Nonostante l'incidenza di stenosi tracheali post-intubazione sia molto variabile fra valori dell'1% e del 21% [9], a causa della pandemia da COVID-19 queste percentuali tenderanno ad incrementare in virtù

dell'utilizzo di tali interventi invasivi. Dal momento che per il trattamento della stenosi si può procedere per via chirurgica o endoscopica, l'Humanitas ha dunque fondato un team multidisciplinare con lo scopo di gestire, monitorare e condividere i trattamenti utilizzati.

1.1.3 Terapie convenzionali della trachea

Per la cura della stenosi solitamente si effettua la resezione del tratto tracheale ostruito, ma la ricostruzione e la sostituzione di quest'ultimo costituisce un procedimento complesso, soprattutto quando la lunghezza del tratto danneggiato è elevata, proprio per la rigidità della struttura tracheale, la mancanza di elasticità longitudinale, l'apporto vascolare laterale e la vicinanza con altre strutture vascolari [10]. Se la porzione di trachea prelevata è minore del 50% negli adulti e del 30% nei bambini si procede chirurgicamente all'anastomosi diretta end-to-end alle strutture anatomiche adiacenti; in base alla sede e all'estensione della stenosi si interviene a cielo aperto, con accesso limitato, oppure in modo mini-invasivo e a cielo aperto del torace [11]: si asporta la porzione di trachea interessata dalla lesione e si sutura con fili monofilamento riassorbibili la parte superiore del tubo endotracheale distale alla struttura tracheale prossimale, tramite manovre di alleggerimento della tensione delle vie aeree residue, come rappresentato in Figura 1.2.

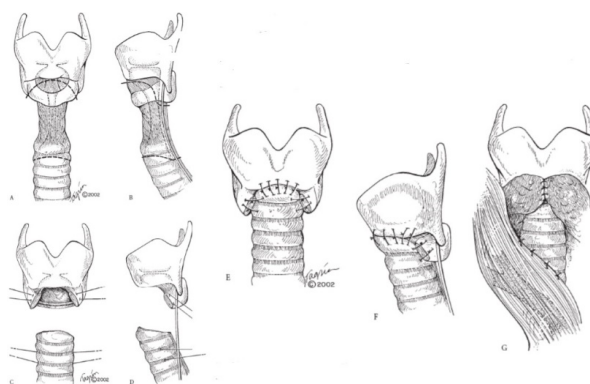


Figura 1.2: Procedura di anastomosi della trachea. [12]

Il limite fondamentale dell'intervento chirurgico mediante anastomosi é direttamente correlato alla lunghezza del tratto interessato dalla stenosi. Per porzioni che superano le percentuali sopracitate, non é possibile procedere mediante questo tipo di trattamento poiché si superano i limiti di tensione sostenibile che, nel medio o lungo termine, possono comportare l'insorgere di una stenosi post-trattamento. Inoltre, anche se l'intervento chirurgico di anastomosi ha un alto grado di successo, maggiore del 90%, é molto frequente l'insorgere di complicanze postoperatorie anastomotiche come formazione di tessuto di granulazione, ristrenosi o rottura dell'anastomosi e non anastomotiche come infezioni, ematomi, formazione di fistola e sopraggiunta di disfonia o disfagia. I rischi di queste complicanze sono anche direttamente correlati alla lunghezza della stenosi tracheale infatti, superati i 4 cm di sito leso, le complicanze aumentano. Per di piú, in caso di reintervento aumenta globalmente, per tutte le lunghezze di tratto tracheale danneggiato, il tasso di fallimento rispetto agli interventi di resezione primaria.

Se la lunghezza del tratto stenotico é maggiore del 50% ci sono diverse opzioni terapeutiche per la sostituzione tracheale come mostrato in Figura 1.3 : trapianto, allograf, stent, protesi sintetiche solide o porose e composito di tessuto autologo [13]. Il trapianto (Figura 1.3(e)), tra tutti i trattamenti, é la prima soluzione pensabile ma la meno praticabile a causa di quattro principali ostacoli, quali disponibilitá d'organo limitata, necessitá di terapia immunosoppressiva, difficile rivascularizzazione della trachea e chirurgia complessa. Gli allotrapianti, invece, possono essere aortici (Figura 1.3(c)) o tracheali (Figura 1.3(d)); se i primi non sono in grado di promuovere la rigenerazione, gli innesti tracheali permettono una buona riparazione della stenosi. Per migliorare le prestazioni e supportare l'innesto, entrambe le tipologie di graft sono state spesso precedute dal posizionamento degli stent nella sede di interesse. Nonostante questo, i due approcci hanno mantenuto un alto tasso di mortalitá. Talvolta lo stent é stato anche utilizzato singolarmente (Figura 1.3(g)) e si é cercato di superare il problema della migrazione suturandolo alla parete della trachea [14]. Restano, comunque, le difficoltá legate all' utilizzo di uno stent, quali fenomeni di ristrenosi e rottura per fatica meccanica. Le protesi sintetiche solide (Figura 1.3(a)) o porose (Figura

ra 1.3(b)) rappresentano una buona alternativa all'utilizzo di materiali di origine biologica grazie alla loro versatilità e disponibilità, ma aumentano i rischi legati alla biocompatibilità, all'infezione ed erosione dei tessuti adiacenti e alla formazione di tessuto granuloso. Pertanto non sono in grado di sostituire interamente la trachea, se non una piccola porzione prossimale nel caso delle protesi porose. In ultimo, le strutture composite (Figura 1.3(f)) sono caratterizzate dalla combinazione di un innesto e una struttura di supporto rigida che è in grado di riprodurre gli anelli cartilaginei. Le esperienze cliniche limitate hanno mostrato buoni risultati nel periodo postimpianto, ma non sono disponibili dati a lungo termine per valutarne l'effettiva efficacia.

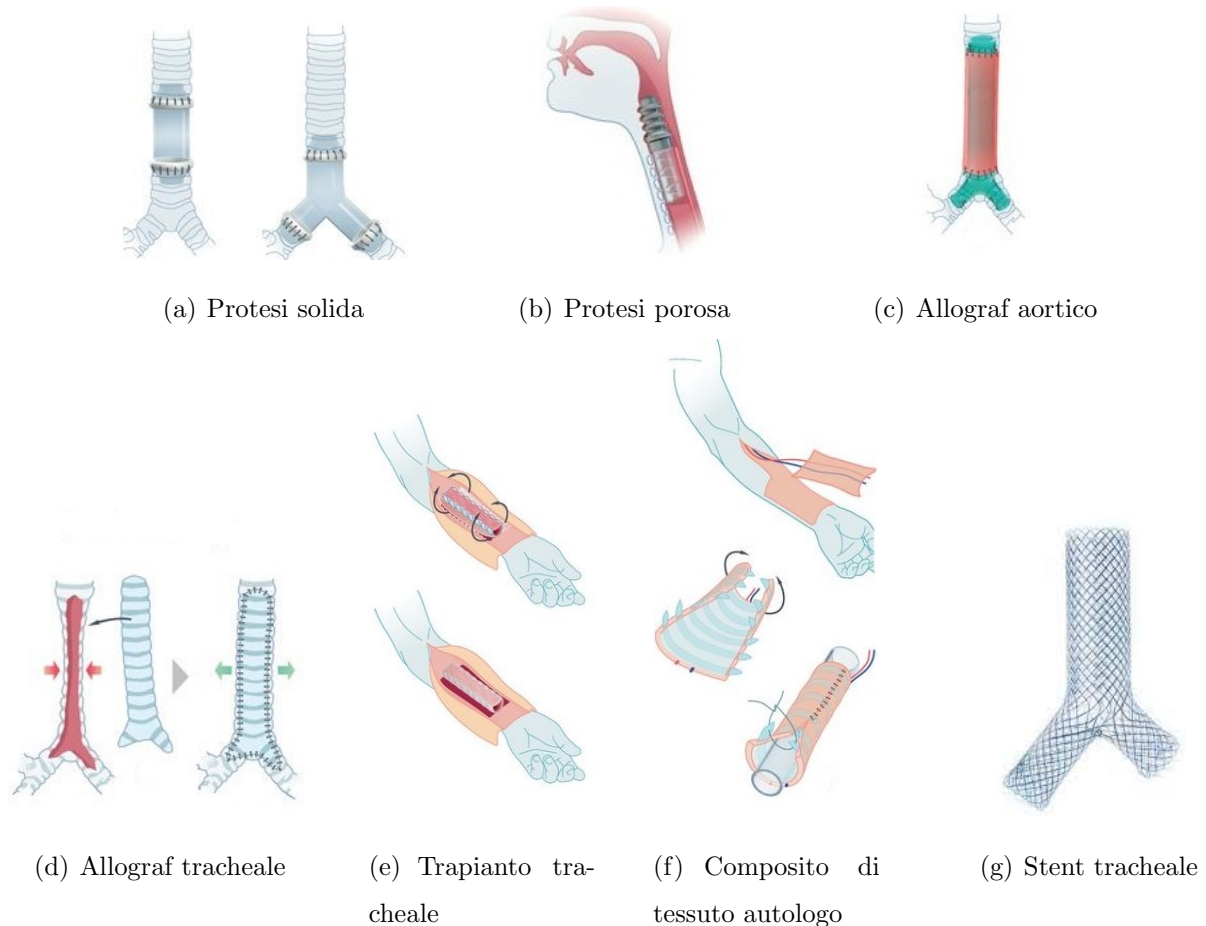


Figura 1.3: Terapie convenzionali della trachea. [13]

1.2 Arterie coronarie

1.2.1 Anatomia

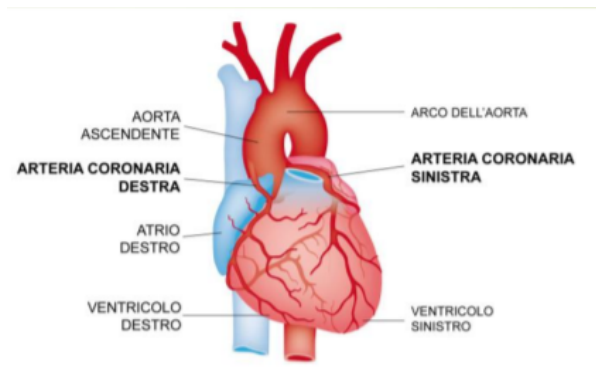


Figura 1.4: Raffigurazione delle coronarie. [15]

Le arterie coronarie, coronaria destra (ACD) e coronaria sinistra (ACS), sono due vasi sanguigni che consentono di ossigenare il miocardio. Le due arterie destra e sinistra originano dall'aorta ascendente, in particolare, dai seni aortici di Valsalva anteriore destro e sinistro rispettivamente, come mostrato in Figura 1.4. Le ACD e ACS, posizionate nei solchi atrioventricolari, danno origine a numerose ramificazioni disposte nei solchi interventricolari posteriore ed anteriore. Nello specifico [16], la coronaria destra ossigena l'atrio destro, il ventricolo destro e minima parte del sinistro, il sistema di conduzione elettrica nel 60% della popolazione e il muscolo papillare postero-mediale. Invece, l'atrio sinistro, il restante 80-75 % di ventricolo sinistro, il sistema di conduzione nel 40 % della popolazione, il setto interventricolare e il muscolo papillare antero-laterale sono alimentati dalla coronaria sinistra.

Generalmente la struttura dei vasi sanguigni é caratterizzata da tre strati concentrici, quali:

- **Tonaca intima:** disposta internamente, a diretto contatto con il letto del vaso, l'intima é composta da un sottile strato di cellule endoteliali su cui poggia una membrana

basale di elastina e collagene di tipo 4. L'endotelio svolge una funzione di barriera e di regolazione dei fenomeni di trasporto.

- **Tonaca media:** rivestita dalla lamina di elastina da entrambe le parti, a contatto con la tonaca intima e con la tonaca avventizia, la media é lo strato piú spesso, variabile a seconda del distretto corporeo. Nel caso di arterie in prossimitá del cuore, come le coronarie, c'è una disposizione alternata di lamine elastiche fenestrate a fibre di collagene e cellule muscolari lisce. La struttura della tonaca media consente di regolare elasticitá e contrattilitá, nonché la vasodilatazione e la vasocostrizione dei vasi sanguigni.
- **Tonaca avventizia:** Con la sua funzione di protezione e di ancoraggio ad altri tessuti come vasi linfatici e fibre nervose, l'avventizia é caratterizzata da fasci di collagene di tipo 1 determinanti per la rigiditá dell'intera struttura.

Secondo una classificazione dimensionale delle arterie, le coronarie sono vasi muscolari o di distribuzione con calibro compreso tra 2 mm e 4 mm. Data l'importante funzione di vasoregolazione, la tonaca media delle arterie coronarie presenta uno strato di muscolatura liscia piú spesso, anche rispetto ai grandi vasi elastici. Al contrario il tessuto elastico e quindi l'elastina diminuisce con l'aumentare della distanza dall'aorta.

1.2.2 Patologie delle arterie coronarie

Come per la trachea, anche le patologie a carico delle arterie coronarie possono essere distinte in congenite o acquisite. Nelle prime rientrano quelle anomalie rare di carattere ereditario, il cui riconoscimento é molto spesso rilevante in quanto responsabili di infarto del miocardio o di ischemia. Tra queste, l'aneurisma delle coronarie é una malformazione congenita caratterizzata dalla dilatazione della parete del vaso per cedimento meccanico e che raggiunge dimensioni 1.5 volte maggiori del normale calibro [17]. Queste patologie sono talvolta associate a cardiopatie congenite o possono riguardare l'errato sviluppo del vaso, solitamente della ACS.

Con il termine coronaropatia, quale patologia acquisita, si fa riferimento alla stenosi delle coronarie, che comporta il restringimento del lume del vaso sanguigno causato dalla formazione di una placca aterosclerotica o da un coagulo. A seconda dell'entità dell'occlusione varia la sintomatologia e la probabilità che insorgano altre patologie come dolore al torace, difficoltà respiratorie, infarto, aritmie, insufficienza o, raramente, arresto cardiaco.

La coronaropatia é la principale causa di decessi la cui incidenza aumenta con l'età [18]. Per tali ragioni accanto ai trattamenti chirurgico e farmacologico, rimane fondamentale un cambiamento nello stile di vita del paziente con lo scopo di ridurre o eliminare i fattori di rischio della patologia. Inoltre la stessa malattia coronarica può costituire fattore di rischio per i pazienti che contraggono l'infezione da Covid-19 oltre a richiedere un impegno tecnologico significativo rispetto alle poche risorse disponibili, limitate dalle esigenze della pandemia [19].

1.2.3 Terapie convenzionali delle arterie coronarie

Le coronaropatie, dette anche cardiopatie coronariche, possono essere controllate e curate in diversi modi. Il medico, in base al quadro clinico, all'ubicazione e alla gravità delle ostruzioni, prescrive il trattamento terapeutico migliore [20]. Se la malattia é ad uno stadio precoce, si può adottare una terapia interventistica o farmacologica: la prima consiste nella modifica dello stile di vita per evitare il deposito delle placche di grasso, molte volte dovuto al fumo, all'ipertensione, a iper/ipocolesterolemia, al diabete, ad una condizione di sovrappeso, alla sedentarietà o allo stress. La seconda, invece, consiste nella somministrazione di farmaci, come nitrati, ipocolesterolizzanti, betabloccanti, acido acetilsalicilico e calcio-antagonisti, che alleviano il dolore toracico attraverso la riduzione del carico del cuore e la dilatazione delle arterie, prevenendo la comparsa dei sintomi di angina e sindrome coronarica acuta, evitano il restringimento dell'arteria o ripristinano il lume dell'arteria ostruita [21].

Queste due tipologie di approcci, tuttavia, non sono in grado di curare la patologia in uno stadio avanzato, quindi risultano insufficienti. Pertanto, in condizioni più gravi una pro-

cedura comune é il by-pass aorto-coronarico (Figura 1.5(a)), per il quale si crea un ramo parallelo al vaso naturale, posizionato a monte del tratto ostruito. Infatti, la stenosi non viene rimossa, ma semplicemente scavalcata. Tradizionalmente, l'intervento é effettuato a cuore fermo; per alcuni pazienti, però, può essere eseguito a cuore battente, procedura che spesso necessita di strumentazione speciale. Gli impianti vascolari di by-pass possono essere di origine biologica, come una vena o un'arteria del paziente stesso, di cadavere o di animale, oppure di origine sintetica e in tal caso si parla di protesi vascolari. I materiali utilizzati nelle protesi sono politetrafluoretilene (PTFE o Gore-Tex se espanso), polietilentereftalato (PET o Dacron) o poliuretano (PU). Nel caso specifico delle arterie coronarie, il materiale piú appropriato é il Gore-Tex (Figura 1.5(b)), largamente utilizzato per piccoli vasi e flussi ridotti. Diverse sono le cause di fallimento degli impianti di by-pass: invecchiamento e degradazione rapida delle protesi biologiche causata da calcificazioni, sclerosi della parete o da iperplasia fibrosa in corrispondenza delle suture; infezioni e trombosi in ciascun tipo di protesi; lacerazioni dei punti di sutura delle anastomosi causate dalle continue sollecitazioni e dalla discontinuitá di flusso all' interfaccia vaso naturale - vaso artificiale. Nel corso degli anni, la Medicina ha sviluppato nuove tecniche mini-invasive con lo scopo di superare le suddette difficoltà. Inizialmente, l'angioplastica con palloncino (Figura 1.5(c)) é stata pensata per ripristinare la pervietá del lume del vaso sanguigno, senza la necessitá di bypassare il tratto stenotico. Infatti, il trattamento consiste nell'inserimento, per via endoscopica, di un catetere con palloncino, adeguatamente gonfiato per comprimere la placca aterosclerotica fino a raggiungere il diametro fisiologico della coronaria. Poiché l'intento é di prolungare la pervietá del vaso e di evitare una possibile ristenosi precoce, l'angioplastica é stata implementata tramite l'utilizzo di stent (Figura 1.5(d)). Si tratta di strutture a maglia, generalmente metalliche, in grado di espandersi nel punto desiderato sfruttando le proprietá elastiche o termiche del materiale, rispettivamente leghe a memoria di forma autoespandibili o espandibili termicamente, o le proprietá plastiche del materiale nel caso di acciaio inossidabile o leghe Co-Cr allargati con palloncino. Ancora una volta, i rischi legati a ristenosi non sono del tutto superati e per questo si sono studiati stent a

rilascio di farmaco (Figura 1.5(e)) che risolvono però il problema solo in maniera temporanea e portano ad una trombosi tardiva. In aggiunta ai fallimenti di origine biologica, gli stent possono cedere per fatica meccanica, fenomeno spesso consequenziale all'insorgere di ristenosi, o possono migrare dal sito interessato.

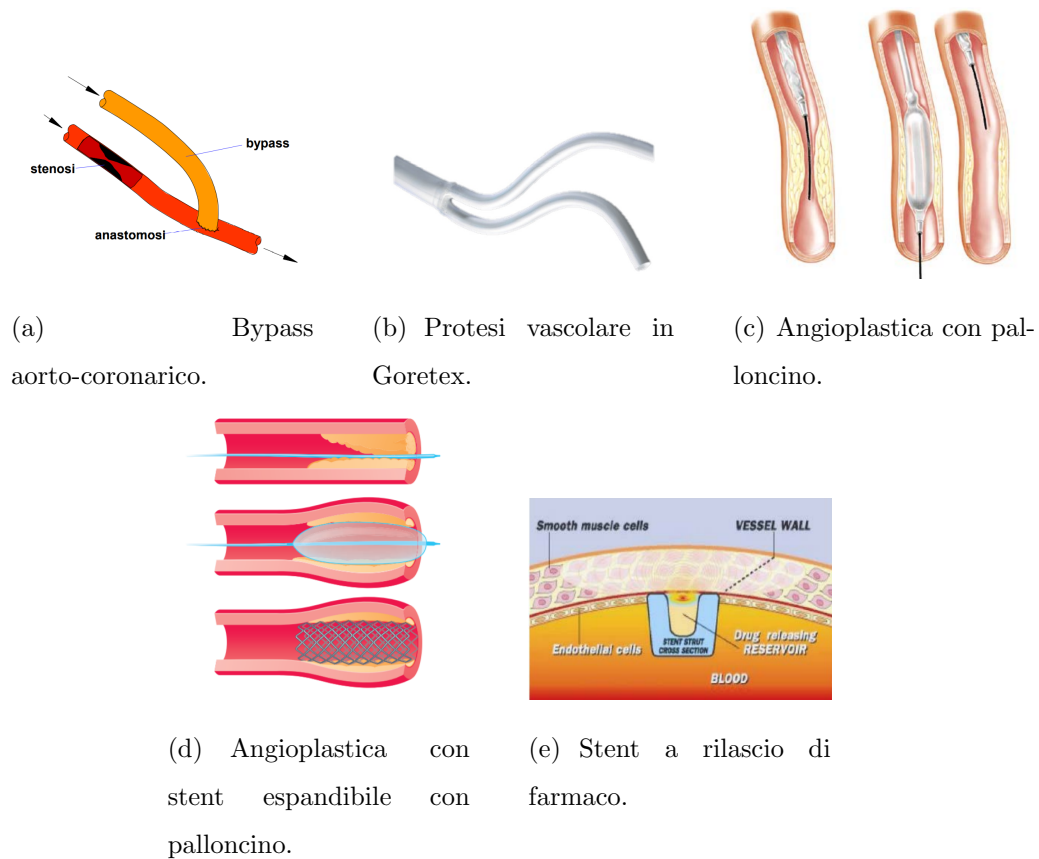


Figura 1.5: Terapie convenzionali delle arterie coronarie. [22]

1.3 Medicina Rigenerativa

La Medicina Rigenerativa (MR) é una branca multidisciplinare delle scienze della salute sviluppatasi negli ultimi anni come valida alternativa alle difficoltà degli approcci terapeutici precedenti. Inoltre, nel corso degli anni, si é passati da una rilevanza delle patologie acute infettive sempre meno importante, a patologie cronic-degenerative piú prevalenti

legate all'invecchiamento della popolazione e a fattori ambientali e comportamentali [23]. Quest'ultime minano la sopravvivenza del paziente a lungo termine, perciò i metodi di Medicina Rigenerativa tentano di ridurre la mortalità e di migliorare la qualità della vita, evitando i rischi legati al trapianto e dunque al rigetto immunologico e al conseguente uso di immunosoppressori per la loro tossicità, nonostante siano necessari per garantire la tolleranza immunitaria [24]. La MR con l'obiettivo di riparare, rigenerare e sostituire cellule, tessuti o organi danneggiati, sfruttando l'abilità intrinseca del corpo umano di ripararsi autonomamente, include diverse approcci terapeutici che necessitano di tre elementi fondamentali: le cellule; uno scaffold, ossia un sostegno opportunamente progettato che supporti l'adesione e la crescita cellulare; segnali, quali stimoli di natura chimica o fisica che consentano la proliferazione e il differenziamento delle cellule sul supporto. Inoltre, se queste componenti sono inglobate tutte nell'ideazione di una terapia, allora si parla di Ingegneria dei Tessuti (TE).

La TE, come sottodisciplina della Medicina Rigenerativa, comprende anch'essa la Biologia cellulare, la Scienza dei materiali e la Chirurgia, con l'obiettivo di progettare, costruire, modificare, mantenere e crescere tessuti viventi, utilizzando le cellule del paziente stesso. In tal modo, il tessuto ingegnerizzato in vitro, ha una struttura e una funzione il più possibile simili a quelle del tessuto naturale, permettendo un'ottima integrazione all'interno del paziente e bypassando i limiti legati sia ai sostituti sintetici, per la risposta al corpo estraneo, sia ai sostituti biologici omologhi, per la scarsa disponibilità di organi e la necessità di immunosoppressori. Prendendo in considerazione i tre elementi fondamentali del tessuto ingegnerizzato, questi ultimi devono garantire e soddisfare le opportune specifiche: le cellule, in base alla tipologia di costrutto, possono essere differenziate, indifferenziate, quindi cellule staminali embrionali o cellule staminali adulte, o co-colture per lo sviluppo di un tessuto più specializzato; dal momento che le cellule isolate sono difficilmente in grado di organizzarsi spontaneamente per formare tessuti complessi, lo scaffold, con le appropriate caratteristiche di morfologia, di biodegradabilità, di processabilità, di proprietà meccaniche e chimiche, fornisce un supporto biomeccanico temporaneo al tessuto fin quando le cellule

non iniziano a produrre nuova matrice extracellulare e permette il rilascio di fattori bioattivi; il condizionamento biochimico e biofisico, il piú simile possibile a quello del tessuto nativo, prevede l'uso di fattori di crescita e di differenziazione o di bioreattori, ossia dispositivi applicati nella TE per avere una semina cellulare dinamica, aumentare la diffusione di sostanze nutritive attraverso un flusso di terreno di coltura e applicare stimoli di perfusione, compressione, tensione o taglio per la maturazione del tessuto, ottimizzando i processi di ingegnerizzazione dello scaffold.

Le procedure utilizzate nell'Ingegneria dei Tessuti devono seguire determinate fasi nel rispetto di standard di qualità. I costrutti opportunamente progettati sono testati prima in vitro attraverso un contatto diretto o indiretto con le cellule. Successivamente sono eseguito test in vivo su modello animale. In ultimo, se la precedente fase preclinica rispetta i parametri di sicurezza, efficacia ed efficienza, si entra nella fase clinica con test effettuati sui pazienti. L'ultima fase dei trial clinici é la commercializzazione del prodotto terapeutico che consente la sorveglianza degli effetti a lungo termine dello stesso.

La Medicina Rigenerativa condivide gli stessi obiettivi dell'Ingegneria Tissutale per la costruzione di tessuti e organi ingegnerizzati. Quest'ultima prevede diverse componenti e step procedurali:

1. Donatore. Può corrispondere al paziente ricevente stesso, ad un altro paziente o embrione, ad un uomo deceduto o un feto, ad un animale;
2. Materiale donato. In base alla tipologia di donatore, si possono prelevare cellule somatiche, cellule germinali, cellule staminali embrionali, una biopsia di un tessuto, un organo o una parte di esso, il cordone ombelicale o la placenta;
3. Cellule. Si può procedere all'isolamento o all'espansione delle cellule, alla transfezione del DNA, all'induzione delle cellule somatiche alla pluripotenza o alla clonazione o partenogenesi delle cellule della linea germinale;
4. Scaffold. Di origine naturale, come organo o tessuto decellularizzato, o di origine sintetica, come PLA, PGA e PCL, deve possedere un'adeguata topografia e rigidità

per la regolazione delle forze intracellulari da parte delle cellule;

5. Costrutto. Come risultato degli step progettuali precedentemente descritti può essere una sospensione cellulare, un aggregato cellulare, uno scaffold seminato con cellule, un tessuto o un organo ricellularizzato con cellule;
6. Stimolazione. Può essere convenzionale, attraverso l'utilizzo di fattori chimici, o innovativa, con la stimolazione chimica e fisica da parte dei bioreattori;
7. Distribuzione. Il sistema di consegna del costrutto bioingegnerizzato all'interno dell'organismo ospite avviene in maniera mini-invasiva o aggressiva con l'impianto chirurgico;
8. Ricevente. Corrisponde al paziente beneficiario di cellule, tessuto o organo progettato.

I bioreattori sono molto importanti nella MR e nella TE in quanto riescono a riproporre e controllare gli stimoli fisiologici del tessuto o organo che si sta progettando. Infatti, nei tessuti e organi naturali, durante la deposizione della matrice extracellulare, campi elettrici variabili nello spazio e nel tempo, pressione osmotica, pressione idrostatica, stress, tensione e flusso del fluido influiscono sul comportamento delle cellule, che cercano di adattarsi alle forze meccaniche, modificando il loro ambiente e quindi la ECM. Poiché la matrice extracellulare manca all'inizio dell'ingegnerizzazione in vitro del costrutto, tutti questi stimoli vengono conferiti dai bioreattori.

La Medicina Rigenerativa rappresenta il futuro della Medicina odierna e alcuni approcci hanno già ricevuto l'approvazione per la commercializzazione e la diffusione da parte dell'autorità competente, in Italia l'AIFA. Negli ultimi anni diverse sono le strategie innovative che si stanno sviluppando, tra queste ci sono la decellularizzazione di tessuti o organi, la biostampa tridimensionale dei costrutti, la terapia genica, l'utilizzo di cellule staminali mesenchimali multipotenti opportunamente differenziate o addirittura in futuro, con studi più approfonditi sull'efficacia, efficienza e sicurezza, l'utilizzo del loro secretoma. Le cellule staminali adulte, infatti, sembrano detenere grandi potenzialità rispetto alle cellule staminali

embrionali o pluripotenti in quanto, non presentano problemi etici, la mancanza di opportuni protocolli di ridifferenziazione, i fenomeni di rigetto immunologico, rischio di tumori o formazione di teratoma, il problema della disponibilità e quantità; per di più, il diretto impiego dei prodotti solubili delle MSC (secretoma) potrebbe ridurre i rischi sopracitati evitando anche la somministrazione di cellule.

1.3.1 Decellularizzazione

La decellularizzazione è un processo mediante il quale si tenta di rimuovere tutto il materiale cellulare e nucleare dal tessuto o organo di interesse clinico, preservando la matrice extracellulare e quindi evitando danni sulla composizione chimica, sull'attività biologica e sull'integrità meccanica di quest'ultima. La ECM decellularizzata costituisce, quindi, un substrato biologico tridimensionale ottimale per la successiva semina cellulare, al fine di ottenere una buona compatibilità del tessuto o organo con l'organismo ospite. Diversi protocolli di decellularizzazione sono stati comprovati e solitamente sono raggruppati in tre macro-categorie, in base ai prodotti o alla strumentazione utilizzata: metodi fisici, metodi chimici e metodi enzimatici.

I metodi fisici possono sfruttare:

- **TEMPERATURA.** Con il congelamento, i cristalli di ghiaccio intracellulari distruggono la membrana cellulare.
Rischio: congelamenti troppo rapidi potrebbero distruggere anche la ECM.
- **AGITAZIONE MECCANICA.** Tramite l'applicazione diretta di forza si rimuove il tessuto e la componente cellulare.
Rischio: un'agitazione aggressiva o una sonicazione distruggono la ECM.
- **PRESSIONE.** Si distruggono le cellule e si rimuove il materiale cellulare con l'esplosione.
Rischio: la pressione può danneggiare la ECM.

- **ELETTROPORAZIONE.** Il campo elettrico pulsatile distrugge le membrane cellulari. Rischio: le oscillazioni di E possono danneggiare o modificare la ECM.

Tra i metodi chimici ci sono:

- **DETERGENTI IONICI.** Questi agenti, tra cui SDS, Sodio deossicolico e Triton X-200, solubilizzano le membrane cellulari e nucleari e denaturano, nella maggior parte dei casi, le proteine.
Rischio: l'SDS, nonostante rimuova efficacemente residui nucleari e proteici da tessuti densi, tende a distruggere l'ultrastruttura, a rimuovere i GAG e i fattori di crescita e a danneggiare il collagene; il Sodio Deossicolico tende a distruggere l'ultrastruttura e a rimuovere i GAG; il Triton X-200, nonostante rimuova efficacemente le cellule dai tessuti con una elevata complessità, tende a distruggere violentemente l'ultrastruttura.
- **DETERGENTI NON IONICI.** Il Triton X-100 distrugge l'interazione DNA-proteine, lipidi-lipidi e lipidi-proteine e limitatamente proteine-proteine.
Rischio: Possono intaccare l'ultrastruttura e rimuovere i GAG, nonostante siano efficaci sui tessuti sottili.
- **ACIDI E BASI.** Questi agenti solubilizzano i componenti citoplasmatici, distruggono gli acidi nucleici e denaturano le proteine.
Rischio: possono danneggiare il collagene, i GAG e i GF.
- **SOLUZIONI IPOTONICHE E IPERTONICHE.** Lo shock osmotico va a distruggere la membrana cellulare e l'interazione DNA-proteine.
Rischio: non sono in grado di rimuovere efficacemente i residui dopo la distruzione delle cellule.
- **DETERGENTI ZWITTERIONICI.** Combinando le proprietà sia di detergenti ionici sia di detergenti non ionici, il CHAPS e la Sulfobetaina 10 e 16 rimuovono efficacemente le cellule.
Rischio: distruggono l'ultrastruttura nei tessuti sottili.

- **SOLVENTI.** Il Tributyl-fosfato (TBP), formando complessi stabili con i metalli, distrugge le interazioni proteina-proteina; Alcool e Acetone, invece, inducono la lisi cellulare per disidratazione, rimuovendo efficacemente le cellule, inattivano i patogeni e rimuovono i lipidi, solubilizzandoli.

Rischio: Il TBP comporta la perdita di collagene nei tessuti densi, sebbene gli effetti sulle proprietà meccaniche siano minimi; Alcool e Acetone determinano la precipitazione delle proteine come il collagene.

Nei metodi enzimatici sono impiegati agenti biologici, tra cui:

- **ENZIMI.** Diverse sono le tipologie di enzimi, come le endo ed eso-nucleasi che catalizzano l'idrolisi del DNA e dell'RNA; la Tripsina che taglia i legami peptidici sul carbonio terminale di Arginina e Lisina; le Dispasi che tagliano peptidi specifici come fibronectina e collagene di tipo IV.

Rischio: le Nucleasi, essendo difficili da rimuovere dal tessuto, possono scatenare la risposta immunitaria; la Tripsina può danneggiare l'ultrastruttura e rimuovere diversi componenti della matrice extracellulare se la sua esposizione e concentrazione sono elevate; le Dispasi, come la Tripsina, possono danneggiare l'ultrastruttura e rimuovere eccessivamente fibronectina e collagene di tipo IV con una prolungata esposizione.

- **CHELANTI.** Solitamente associate a metodi enzimatici, altrimenti inefficaci, l'EDTA e l' EGTA vanno a legare gli ioni metallici, staccando le cellule dalla ECM.

Rischio: possono rimuovere GAG dalla ECM.

I protocolli di decellularizzazione più promettenti, però, prevedono la combinazione dei diversi agenti chimici, fisici ed enzimatici per raggiungere la miglior efficacia. Infatti, solitamente, si parte con la lisi della membrana cellulare tramite uno dei metodi fisici, successivamente si separano i componenti della ECM con enzimi ed infine si procede con la solubilizzazione del citoplasma e dei componenti nucleari tramite agenti chimici. Al termine del protocollo di decellularizzazione, tutti i residui chimici ed enzimatici devono essere cautamente rimossi per evitare, dopo l'impianto in vivo del costruito, risposte indesiderate

del ricevente come tossicità e cattiva reazione immunitaria.

Riprendendo la definizione di decellularizzazione come tecnica che cerca di eliminare le componenti cellulari e nucleari, é stato necessario definire dei parametri che fissano la soglia limite dei contenuti di DNA e di lunghezza dei frammenti dello stesso ammissibili: il tessuto decellularizzato deve presentare una quantità di DNA minore di 50 ng per mg di tessuto disidratato; tali frammenti residui devono avere una lunghezza minore di 200 bp (coppie di basi); infine, tramite tecniche di immunoistochimica, come la colorazione DAPI, non deve essere presente del materiale nucleare residuo. Questi requisiti sono fondamentali per evitare il rigetto immunologico nell'organismo ospite e l'eventuale necessità di una terapia immunosoppressiva.

In quest'ottica, quindi, la matrice extracellulare é utilizzata come scaffold per le cellule: rispetto ai materiali di origine sintetica o naturale, la dECM preserva l'ultrastruttura e la composizione multiproteica native, approfondite in seguito, fondamentali per segnali di adesione, crescita e differenziamento cellulare.

1.3.1.1 Matrice extracellulare

La ECM rientra tra le componenti non cellulari di un tessuto e costituisce l'ambiente fondamentale con cui le cellule interagiscono scambiando materiale per le loro funzionalità vitali, in un processo descritto come reciprocità dinamica. Inoltre, la matrice oltre a garantire forma e struttura agli organi con la sua funzione di sostegno, fornisce un supporto per l'orientamento e la migrazione delle cellule, fondamentale nello sviluppo embrionale e nei processi omeostatici e di rigenerazione dei tessuti, e svolge un ruolo chiave nel differenziamento e proliferazione cellulare.

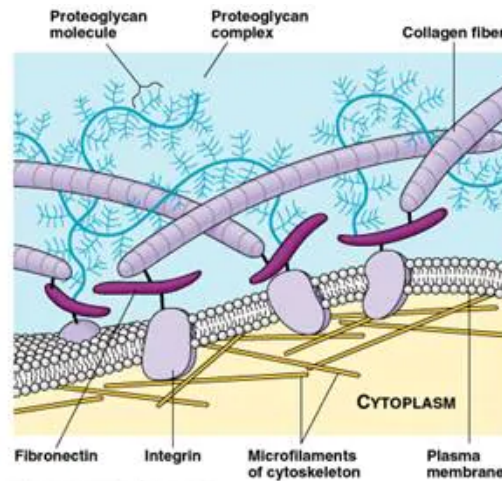


Figura 1.6: Raffigurazione della matrice extracellulare.[25]

Si tratta, come mostrato in Figura 1.6, di una struttura gelatinosa multiproteica costituita da glicoproteine, proteoglicani e, in prevalenza, acqua. Quest'ultima, infatti, rappresenta il 60-65% e insieme con diversi tipi di fibre, forma la sostanza fondamentale simile ad un gel semifluido. Tra le fibre presenti ci sono i glicosamminoglicani: queste lunghe catene proteiche caratterizzate dalla ripetizione di unità disaccaridiche sono le componenti fondamentali della sostanza amorfa della matrice, in grado di combinarsi anche con altre proteine a formare i proteoglicani, e hanno funzioni di ammortizzazione e resistenza a seconda del tessuto connettivo in cui si trovano. Collagene ed elastina, rappresentando le proteine strutturali, chiamate anche proteine fibrose, consentono ai tessuti di resistere a sollecitazioni di trazione e compressione, anche ripetutamente, senza deformazioni plastiche o rotture [26]. Nello specifico, il collagene, rappresentando il 6% del peso corporeo [27] è la proteina più abbondante nel nostro corpo con la funzione di garantire resistenza alla trazione e ne esistono 28 tipologie organizzate nei vari distretti corporei. L'elastina è la proteina strutturale elastica e, in quanto tale, consente un ritorno elastico della struttura a seguito di stiramento o contrazione. Tra le glicoproteine adesive, la fibronectina e laminina sono fondamentali per l'ancoraggio alla membrana cellulare e per processi di migrazione

e sviluppo embrionale. Per assolvere a queste funzioni, la fibronectina espone il proprio dominio RGD a cui i recettori transmembrana delle cellule si legano. Nello specifico si tratta delle integrine, quali glicoproteine caratterizzate da domini extracellulari ed intracellulari a diretto contatto con il citoscheletro. Il legame fibronectina-integrina é alla base della comunicazione cellulare perché é in grado di indurre una cascata di segnali interni alla cellula, attivando la risposta allo stimolo esterno. All'interno della ECM si trovano anche i fattori di crescita, proteine idrosolubili legate in maniera non covalente ai GAG, che regolano la comunicazione cellula-cellula nei processi di proliferazione, adesione, migrazione e differenziamento cellulare e di espressione genica. Le macromolecole non agiscono mai singolarmente anzi, grazie alla sinergia di queste proteine, la matrice presenta le giuste caratteristiche di resistenza ed elasticità per un'adeguato supporto cellulare.

I protocolli di decellularizzazione, ottimizzati per ogni applicazione tissutale, sono opportunamente studiati affinché sia garantita l'effettiva efficacia del processo ed evitata un'eccessiva modifica dell'ultrastruttura della matrice extracellulare. Al termine, infatti, sono eseguiti, qualitativamente o quantitativamente, sia test di valutazione dell'efficienza della decellularizzazione con il controllo del contenuto di DNA, GAG e cellule sia test biomeccanici per verificare l'eventuale perdita di resistenza e rigidità del tessuto che potrebbero verificarsi con l'utilizzo di sostanze aggressive. L'analisi degli acidi nucleici può essere eseguita qualitativamente, tramite tecniche istologiche e immunoistochimiche come la colorazione con DAPI o H&E, o quantitativamente, tramite saggi spettrofotometrici come PicoGreen, PI o bisbenzimidide e elettroforesi su gel. Le componenti dell'ECM come collagene, GAG e proteine adesive possono essere studiate qualitativamente e quantitativamente tramite metodi spettroscopici, colorazione di un componente specifico con l'aiuto di anticorpi, ELISA. Per l'analisi biomeccanica e strutturale si possono sfruttare la microscopia elettronica a scansione o trasmissione, la microscopia laser, le prove di trazione o compressione. Spesso anche l'analisi approfondita delle proteine della ECM é importante quindi, per una ottima

caratterizzazione del proteoma, si può procedere con una combinazione di elettroforesi su gel 2D e spettrometria di massa; metodi immunoistochimici sono utilizzati per la caratterizzazione di specifiche proteine intracellulari come actina e vimentina. Per osservare la presenza di altre molecole extracellulari e citoplasmatiche sono condotte colorazioni istologiche alternative come Trichome di Masson, Pentachrome di Movat o Safranin-O. Come detto in precedenza, la presenza di agenti chimici decellularizzanti residui é un grosso problema al termine del processo di decellularizzazione in quanto anche bassissime concentrazioni possono risultare citotossiche. Per verificarne l'assenza si utilizzano test chimici basati su HPLC, test non invasivi a base di blu di metilene, spettrometria a luce visibile e altri metodi. Dunque, un buon protocollo consente sia di ridurre al minimo tutte quelle componenti che possono provocare il rigetto immunologico, ma anche di mantenere l'integritá meccanica e strutturale della matrice.

L'utilizzo di dECM nelle applicazioni d' organo o tessuto, può però determinare disallineamento dimensionale, rischio di trasmissione di agenti patogeni, semina cellulare post-decellularizzazione e mancanza di geometria su misura. Viste queste necessità e problematiche, sono state messe a punto opportune procedure di liofilizzazione e digestione enzimatica, analizzate in seguito, che consentono di ottenere una forma solubile della dECM, in grado di preservare la bioattività fisiologica della matrice. Un'analisi attenta, però, della temperatura e neutralità della soluzione viscosa sono fondamentali per formare successivi idrogeli e garantire la spontanea riformazione dei legami intramolecolari delle proteine. Poiché é stato dimostrato che le glicoproteine e i proteoglicani sono coinvolti nella regolazione dinamica della fibrillogenesi dell'idrogelo a base di dECM, é importante preservare la giusta quantità di queste componenti durante il processo di decellularizzazione e solubilizzazione.

1.3.2 Liofilizzazione

Il processo di liofilizzazione, applicato nell'ambito della Medicina Rigenerativa, consiste nella disidratazione di campioni biologici e successiva riduzione in polvere con la possibilità di preservare le qualità e le proprietà intrinseche dei campioni [28]. Infatti, la liofilizzazione

é adatta a materiali delicati e termolabili, inoltre consente di ottenere prodotti reidratabili e sterili [29].

Tre sono gli step fondamentali:

1. CONGELAMENTO. Il congelamento lento determina la formazione di grossi cristalli e prevede la diminuzione di temperatura di un 1°C al minuto; con il congelamento rapido fra 10°C e 60°C al secondo, invece, i cristalli formati sono piccoli; in ultimo può essere effettuato un congelamento con soluzioni protettive per cellule o batteri.
2. ESSICCAZIONE PRIMARIA. Per la sublimazione dell'acqua é fondamentale questo step, effettuato sotto vuoto, che provoca l'evaporazione del vapore acqueo e la sua rapida dissipazione. Difatti il vapore viene sottratto all'ambiente convogliandolo verso un condensatore.
3. ESSICCAZIONE SECONDARIA. Con il progressivo riscaldamento fino a 50°C viene rimossa l'acqua residua ancora assorbita nel materiale. Fondamentale é la regolazione della quantità di calore e della sua distribuzione.

Gli strumenti utilizzati, appunto, per allontanare l'acqua dalla matrice sono i liofilizzatori, dotati di una cabina in grado di sostenere gli alti valori di depressione, un gruppo frigorifero per abbassare la temperatura durante la fase di congelamento e una pompa da vuoto [30]. Gli svantaggi di questa tecnologia sono per lo più legati ai costi dei macchinari ed energetici oltre che ai tempi prolungati.

La liofilizzazione applicata alla matrice extracellulare decellularizzata é seguita dalla riduzione in polvere (pdECM) del prodotto tramite strumenti come il CryoMill o, manualmente, con mortaio e filtrazione con l'aiuto di setacci di dimensioni desiderate; molte volte la dECM viene congelata in azoto liquido per aiutare questo processo di polverizzazione. Successivamente si può passare alla digestione della polvere di matrice extracellulare per ottenere la forma solubilizzata.

1.3.3 Digestione enzimatica della polvere di dECM

La digestione enzimatica é nella maggior parte dei casi condotta utilizzando la pepsina, raramente urea. La pepsina é un'idrolasi, nonché un enzima che catalizza una reazione idrolitica. La combinazione di pepsina con HCl consente di diluire efficacemente la polvere di dECM; in alternativa all'utilizzo dell'acido cloridrico, spesso é impiegato l'acido acetico che consente di avere una resa di solubilizzazione comunque adeguata.

La soluzione di pdECM, pepsina e acido viene lasciata il tempo necessario a garantire l'effettiva solubilizzazione, variabile fra 48, 65 e 72 ore a seconda della fonte tissutale e applicazione clinica.

Fondamentale é anche la regolazione del pH, effettuata al termine della digestione vera e propria, per disattivare la pepsina che altrimenti continuerebbe a digerire il composto: poiché con l'aggiunta dell'acido, infatti, si ha la formazione di una soluzione acida, tramite piccole aggiunte di idrossido di sodio, NaOH, si riporta il pH a livello fisiologico.

Al termine della liofilizzazione e della digestione enzimatica si ottiene una soluzione a base di dECM utilizzabile come idrogelo, molto promettente per applicazioni biomediche come rivestimento superficiale, idrogeli iniettabili, modelli di tessuto patologico e substrati di coltura cellulare in vitro, screening e somministrazione di farmaci o cellule e stampa 3D.

1.3.4 3D Bioprinting

Stampa 3D. La stampa 3D, conosciuta anche come prototipazione rapida, rappresenta una tecnologia all'avanguardia, che permette la realizzazione di oggetti tridimensionali mediante produzione additiva (additive manufacturing, AM): si parte dalla modellazione digitale del prototipo, tramite software CAD, si procede con la fase di stampa 3D vera e propria ricostruendo la geometria strato per strato e si termina con la rifinura della struttura post-stampa. Differentemente dalle tradizionali tecnologie come la Phase Separation, il Solvent Casting, il Gas Foaming e il Freeze Drying, la stampa 3D permette l'esecuzione di strutture in modo piú affidabile e semplice, la possibilità di stampare geometrie complesse e assem-

blare anche parti composte da diversi materiali in un singolo processo di produzione, la realizzazione di oggetti customizzati e quindi perfettamente aderenti alla geometria progettata. Le uniche due problematiche associate a queste metodologie sono il tempo necessario di esecuzione e i costi molto elevati.

La stampa 3D si è sviluppata in diversi settori: automotive, gioielleria, calzoleria, settore industriale, aerospaziale, dentistico e medico.

Nell'ambito della TE e quindi della Medicina Rigenerativa si parla di 3D bioprinting, avente come obiettivo l'ottenimento di strutture tridimensionali con caratteristiche simili al tessuto o organo naturale, sia in termini di forma sia in termini di funzione. Si utilizzano, quindi, tecniche che combinano materiale vivente, quali le cellule, a materiale non vivente di origine sintetica o naturale. Nell'ambito della 3D bioprinting si sono sviluppate diverse classi di pensiero riguardante la definizione di bioink come inchiostro prodotto per la stampa del costruito [31]: bioink di supporto per le cellule, bioink fuggitivi, nonché materiali sacrificali, bioink strutturali per dare integrità meccanica e quelli funzionali che forniscono segnali biochimici, meccanici o elettrici. In ultimo, il bioink, approfondito nella prossima sezione, può essere definito in maniera appropriata, come un inchiostro di stampa in cui sono necessariamente presenti le cellule e a cui è possibile combinare materiali compatibili. Se invece, le cellule sono seminate su uno scaffold precedentemente stampato, si parla di inchiostro di biomateriali, biomaterial ink, adeguatamente scelto per garantire la successiva adesione e colonnizzazione dell'intera struttura da parte delle cellule stesse. Il processo di stampa prevede, in tutti i tipi di tecnologie, tre step fondamentali:

1. **Pre-processing:** si costruisce il modello CAD, si effettua lo slicing tramite opportuno software e si genera il file g-code, quale input di stampa. Solitamente, tramite tomografia computerizzata e risonanza magnetica, si acquisiscono le immagini del paziente per identificare il tessuto o organo danneggiato e con queste ricostruire, con opportuni software, il corrispettivo tessuto o organo sano.
2. **Processing:** dopo la preparazione del bioink o biomaterial ink, lo si carica nella

cartuccia della stampante per l'erogazione. Le cellule sono, in generale, prelevate da una biopsia del paziente o comprate e, dopo opportune manipolazioni, incorporate con il materiale da stampare, nel bioink, o nel materiale stampato, nel secondo caso. Molto spesso questa fase di stampa vera e propria comprende la sterilizzazione del materiale prima dell'incorporazione cellulare e la reticolazione post-stampa, in seguito analizzata.

3. **Post-processing:** bisogna rendere stabile la struttura appena stampata, sia dal punto di vista meccanico e strutturale sia dal punto di vista funzionale. Per soddisfare questi requisiti si ricorre ai bioreattori che ricreano un microambiente ideale per la maturazione del tessuto, garantito da una coltura dinamica e un trasporto attivo dei nutrienti, dei GF e dei fattori di differenziazione o da una stimolazione meccanica, specifica per il sito anatomico di interesse. Una volta ottenuto il tessuto funzionale, quest'ultimo può essere impiegato per studi in vitro o per sostituire un tessuto patologico nel paziente.

La manipolazione cellulare effettuata durante il processing è una fase molto delicata: prima della stampa vera e propria il materiale di stampa deve essere sterilizzato per evitare contaminazioni. Sia che il prodotto finale sia un bioink, sia che si tratti di un biomaterial ink ha senso procedere con la sterilizzazione pre-stampa per evitare che questa vada a modificare le proprietà del costruito stampato. In base alla tipologia di materiale si può procedere con filtrazione, utilizzo di radiazione UV o autoclavaggio e le fasi successive di incorporazione cellulare, stampa e post-stampa devono essere condotte sotto cappa, in condizioni sterili. Le due tipologie di inchiostro, inoltre, devono possedere precise proprietà biologiche per garantire l'inclusione cellulare come un buon tasso di adesione, proliferazione e vitalità, quindi una degradazione controllata, e buone proprietà meccaniche. Per stampare bioinchiostri contenenti cellule bisogna rispettare i valori adatti di pressione, temperatura, pH e irraggiamento al fine di evitare la mortalità cellulare. Infatti, è opportuno non stampare al di sopra dei 50°C o al di sotto dei 5°C, non lavorare con pH inferiore a 6.5 o superiore a 7.8, non utilizzare solventi citotossici, non estrarre ad alta pressione per evitare l'applicazione

di elevati sforzi di taglio sulle cellule, e ad alta viscosità dell'inchiostro[32].

Ci sono diverse tecnologie di 3D bioprinting ormai in uso commerciale, come mostrato in Figura 1.7:

- **Estrusione:** é la tecnologia piú utilizzata, basata sull'erogazione, strato per strato, di filamenti di materiale in modo continuo e controllato, attraverso un microugello, su un substrato piano. In base alla tipologia di stampante, l'estrusione puó essere guidata da una vite, un compressore d'aria o un pistone meccanico. In questo ultimo caso bisogna porre attenzione alle proprietá reologiche del materiale, alla temperatura di estrusione, alla pressione applicata e alla grandezza dell'ago. In generale, per una buona stampabilitá e fedeltá di stampa, l'idrogelo dovrebbe soddisfare i requisiti di alta viscositá, elevato carico di snervamento, assottigliamento al taglio e cinetica di recupero rapida. Per aumentare la viscositá fino al livello desiderato per la stampa, l'estrusione puó essere affiancata da riscaldamento o radiazione UV, all'intero estrusore o solo all'ugello o anche alla piastra sottostante, con valori compatibili con la vitalitá cellulare nel caso di bioink. In questa tipologia di bioprinting non c'è una limitazione della concentrazione cellulare ed é possibile erogare diversi bioinchiostri per la creazione di strutture complesse o strutture sacrificali. Il processo garantisce forma e dimensioni dei costrutti rilevanti, un ampio range di viscositá, una buona velocitá di stampa e una vitalitá cellulare anche fino al 90%. Gli unici problemi sono la bassa risoluzione, il pericolo di intasamento dell'ugello e la vitalitá cellulare che puó essere, in alcuni casi, del 40%.
- **Stampa a getto di inchiostro:** si basa sull'erogazione del materiale a bassa viscositá sotto forma di goccioline, tramite un attuatore termico, piezoelettrico, elettrostatico o elettro-idrodinamico. Proprio per la bassa viscositá risulta compatibile con le cellule ma quest'ultime dimostrano vitalitá limitata alla fine del processo. Queste stampanti offrono ottima risoluzione e alta velocitá, utilizzando piccole quantitá di materiale.
- **Stampa assistita da laser:** queste stampanti, in particolare le LIFT per le bioprin-

ter, si basano sull'utilizzo di 3 componenti principali: una sorgente laser pulsata, un bersaglio da cui viene stampato un materiale biologico e un substrato ricevente. L'intento é quello di raggiungere il vetrino donatore coperto da uno strato di metallo ad assorbimento di energia, oro o titanio, e da uno strato di componenti cellulari-bioink. Gli impulsi laser focalizzati sul vetrino inducono localmente l'evaporazione dello strato assorbente, con conseguente produzione di goccioline di bioink verso il substrato ricevente, che deve avere bassa tensione superficiale per favorire l'adesione cellulare. Questa tecnologia ha un'alta risoluzione e vitalità cellulare, non produce intasamenti dell'ugello, permette un ampio range di viscosità ma, é molto costosa, richiede molto tempo, non garantisce una distribuzione cellulare omogenea, non é compatibile con il riscaldamento e il raffreddamento durante l'espulsione delle gocce.

- **Stereolitografia (SLA)**: utilizza un laser o una sorgente di luce visibile o UV per reticolare un bioinchiostro, contenuto in forma liquida e non reticolato all'interno di una vasca, e si procede strato per strato, per mezzo dell'avanzamento di una piattaforma che supporta lo strato di materiale stampato. La stereolitografia garantisce buona risoluzione e velocità, un costo della stampante moderato ma, un costo complessivo del processo spropositato proprio per l'elevata quantità di inchiostro necessario; inoltre, é richiesto un fotoinziatore non tossico e il materiale deve avere viscosità e densità adeguate in presenza di cellule.

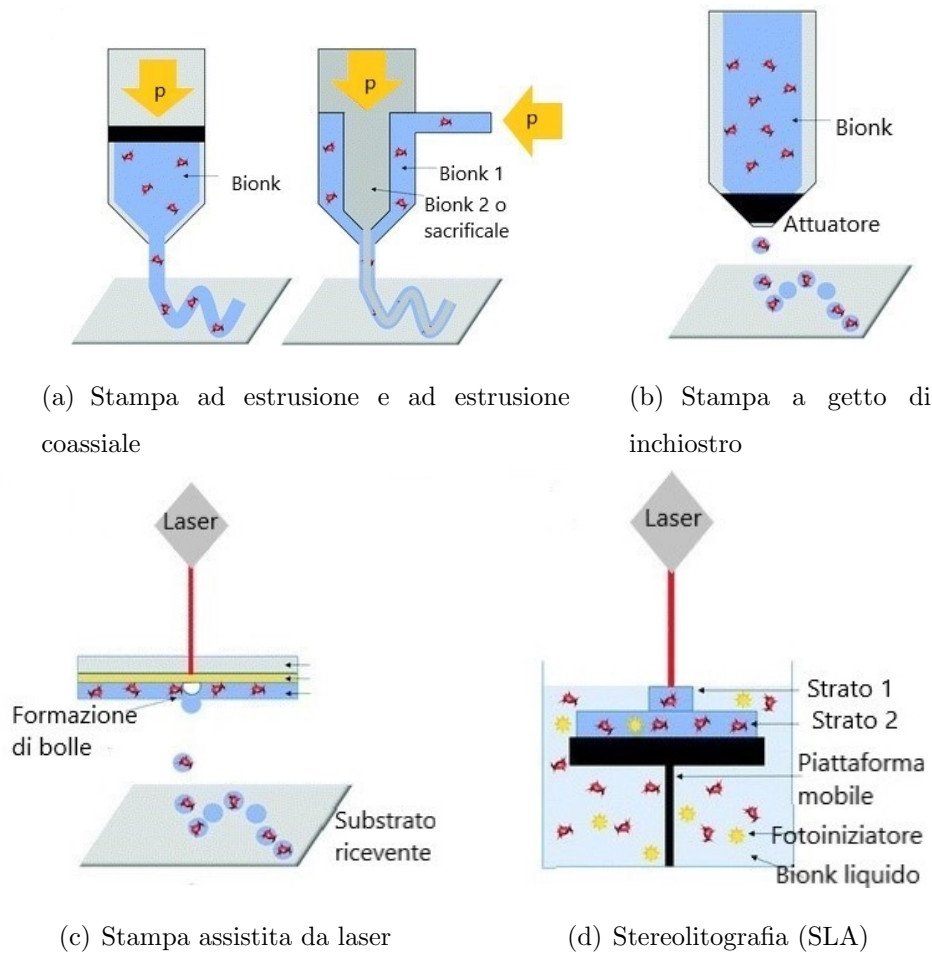


Figura 1.7: Rappresentazione dei diversi metodi di stampa [32].

Le attuali tecniche di 3D-bioprinting, però, presentano limitazioni legate alla bassa risoluzione e alla ridotta selezione di materiali. Un altro ostacolo importante riguarda la difficoltà di vascolarizzazione delle strutture stampate, superabile con l'implementazione dei metodi che utilizzano materiali sacrificali.

Molto spesso è possibile migliorare le caratteristiche del costruito stampato tramite tecniche di reticolazione. Da un punto di vista fisico la reticolazione agisce direttamente sulle catene dei polimeri dividendole, aumentandone così il numero e i legami covalenti inter o intra molecolari. Tale stabilizzazione meccanica può essere di tipo fisico, chimico o enzimatico. Nel primo caso si agisce regolando pressione, temperatura o utilizzando interazioni

di diversa natura. Con i metodi chimici lo stesso effetto si ottiene con l'aggiunta di agenti reticolanti come glutaraldeide o genipina o con fotopolimerizzazione, sfruttando ad esempio la luce UV. La reticolazione enzimatica prevede l'utilizzo di specifici enzimi come la trombina e la transglutaminasi. Molti metodi di reticolazione sono stati studiati sulla gelatina per implementare la sua stabilità in ambiente fisiologico e le sue proprietà meccaniche. Ad esempio, i metodi chimici di cross-link della gelatina sono suddivisi in zero-length e non zero-length: quest'ultimo si differenzia dal primo in quanto consente di catalizzare la formazione dei legami con agenti chimici che entrano a far parte della struttura finale.

Per quanto riguarda invece la caratterizzazione post-stampa dei costrutti, questi possono essere analizzati morfologicamente, chimicamente, fisicamente e meccanicamente: ci sono analisi per valutare la porosità degli scaffold come microscopia ottica e imageJ, stereomicroscopia ottica e imageJ, microscopia elettronica a scansione, sonda RX e EDS, AFM e Micro CT; si possono eseguire prove di stabilità e degradazione in vitro, tramite l'utilizzo di soluzioni che simulano al meglio l'ambiente biologico; per l'analisi sulla struttura del materiale si analizzano le proprietà termiche con DSC e i pesi molecolari con tecniche cromatografiche; per ottenere informazioni sulla struttura superficiale si procede con analisi spettroscopiche, tipicamente radiazione IR, radiazione FTIR, XPS o ESCA, con la valutazione della bagnabilità, considerando l'angolo di contatto statico e dinamico, con l'analisi della rugosità tramite profilometria a contatto o profilometria laser; per valutare il comportamento meccanico si possono testare le proprietà meccaniche a trazione o compressione, eseguire prove reologiche e analisi termo-dinamico-meccaniche.

1.3.5 Bioink

Nella realizzazione di un idrogel con cellule inglobate in fase di stampa è necessario definire i parametri chimico-fisici dei materiali che determinano la stampabilità del costrutto: le proprietà reologiche, cioè la viscosità dell'inchiostro e del costrutto stampato per il mantenimento della forma; il meccanismo di reticolazione per la stabilità meccanica; la dimensione dell'ugello e la velocità di stampa che influiscono sullo shear stress applicato alle

cellule, sulla dimensione del filamento estruso e sulla continuità di deposizione; il tempo di stampa. Inoltre, le cellule richiedono un ambiente favorevole alla propria proliferazione e al proprio differenziamento. Devono essere dunque soddisfatte condizioni di diffusione di nutrienti e ossigeno, un pH fisiologico, specifici siti di adesione e spazio sufficiente che garantisce la deposizione di nuova matrice extracellulare, direttamente correlata alla porosità del costruito e alla sua degradabilità.

Questi idrogeli si sono sviluppati soprattutto negli ultimi anni grazie al progredire della Medicina Rigenerativa e del Bioprinting e sono essenzialmente strutturati in catene polimeriche, di origine naturale o sintetica, in grado di inglobare le cellule. L'utilizzo di materiali sintetici offre elevata riproducibilità e versatilità, con la possibilità di funzionalizzarli o combinarli con altre componenti. Tale necessità di combinazione è legata alla loro bioinerzia che non consente la giusta adesione, la proliferazione e il differenziamento cellulare. Alcuni esempi di materiali sintetici sono [33]:

- GELATINA METACRILATA. Rappresenta la forma denaturata del collagene con gruppi metacrilati; ha una buona resistenza meccanica, bassa viscosità a temperatura ambiente, è facile da estrarre, si può regolare la velocità di reticolazione, ma ha bassi tassi di proliferazione cellulare.
- PLURONIC. Esistono diverse tipologie di Pluronic, in base alla massa molare, alla concentrazione dei componenti idrofili e idrofobi, funzionalità e temperatura di reticolazione. Quest'ultima però può influire negativamente sulla vitalità cellulare.
- POLIETILENGLICOLE. È un polimero idrofilo che non permette, in molti casi, l'adesione cellulare, infatti è necessaria l'aggiunta di altri componenti, e ha scarse proprietà meccaniche.

Focalizzando l'attenzione sui materiali di origine naturale, questi mostrano una buona biocompatibilità e la possibilità di regolare le proprietà tramite metodi di reticolazione, che rallentano la degradabilità e aumentano la robustezza. Tra i materiali di origine naturale troviamo:

- **COLLAGENE.** Rappresenta la proteina piú abbondante nei tessuti biologici e la componente principale delle ECM. In ambito biomedico é molto utilizzato perché é biodegradabile con prodotti di degradazione non tossici, é solubile in soluzioni acquose e relativamente stabile, scatena rare reazioni allergiche, é velocemente assorbito nel corpo umano e ha un basso potenziale antigenico. Per aumentare le basse proprietá meccaniche e il tempo di degradazione troppo veloce, puó essere reticolato in modo fisico, tramite esposizione a radiazioni UV, o chimico, attraverso glutaraldeide o formaldeide, molto tossiche però per le cellule.
- **GELATINA.** É un derivato del collagene, ottenuto per rottura della sua struttura a tripla elica in molecole a singolo filamento, che puó essere basico o acido in base alle condizioni di trattamento, aventi grandi effetti sulle proprietá finali dei prodotti di gelatina. Derivata da pelle di suino, pesce o ossa di suino, cavallo o bovino, ha un basso costo e peso molecolare, é solubile in acqua, ha bassi livelli di immunogenicitá e citotossicitá, una facilitá di lavorazione e degradazione rapida. Anche in questo caso, per aumentare le proprietá meccaniche e la stabilitá, la gelatina viene reticolata fisicamente, tramite trattamento idrotermico, radiazione UV o radiazione gamma, o chimicamente, tramite agenti chimici potenzialmente tossici, o enzimaticamente. Con la reticolazione fisica é difficile controllare la densitá di reticolazione e spesso l'efficienza di tutto il processo é bassa, mentre, con la reticolazione chimica si raggiunge una reticolazione piú efficiente e quindi una struttura piú stabile. La reticolazione enzimatica, invece, é citocompatibile e richiede un tempo molto rapido. In alternativa, la gelatina puó essere combinata con altri materiali che compensano i suoi svantaggi ed evitano l'utilizzo di reticolanti tossici come la glutaraldeide. Riesce a seguire reversibilmente la transizione sol-gel alla temperatura critica di 50°C; trattandosi di un materiale termosensibile, la viscositá dipende dalla concentrazione del polimero e dalla temperatura infatti, per $T < T_c$ si ha un gel fisico con la riformazione della doppia o tripla elica mentre, per $T > T_c$ si ha un comportamento liquido viscoso [34].

- **ALGINATO.** Ottenuto da alghe, é un polissacaride carico negativamente costituito da catene lineari di acido D-mannuronico, M, e acido L-guluronico, G, in diversa concentrazione in base alla fonte di estrazione. Esso va incontro a gelazione reversibile in soluzioni acquose attraverso l'interazione con cationi divalenti, tipicamente Ca^{2+} , che interagiscono con i blocchi di acido guluronico; gli alginati ricchi in blocchi di acido guluronico danno origine a idrogeli piú resistenti e porosi, conservando la loro integritá per tempi piú lunghi ed hanno un grado di rigonfiamento minore. É molto utilizzato nella bioprinting perché risulta facilmente estrudibile e con una buona fedeltá di forma; inoltre, é biodegradabile, ha una porositá controllabile, si possono legare alla struttura altre biomolecole, non é tossico, é economico.
- **CHITOSANO.** Ottenuto dalla deacetilazione della chitina, ha proprietá meccaniche non ottimali e limitata biostampabilitá, permette di inglobare le cellule ma non garantisce la formazione di costrutti su larga scala.
- **AGAROSIO.** Di origine naturale, si trova in stato di gel a basse temperature, é fragile nella forma solida anche se mantiene la struttura per un lungo periodo e per diverse temperature, l'adesione cellulare é scadente. Solitamente utilizzato come stampo per la coltura 3D di aggregati cellulari, viene combinato con altri idrogeli per migliorare le sue proprietá.
- **FIBRINA.** Deriva dalla reazione enzimatica tra trombina e fibrinogeno e permette un alto grado di deformazione senza rotture, incapsulamento e successivo differenzamento cellulare; puó scatenare reazione immunitaria avversa per l'utilizzo di proteine eterologhe, la degradazione é troppo rapida e non presenta buone proprietá meccaniche.
- **ACIDO IALURONICO.** Importante componenete della ECM della cartilagine, é un glicosaminoglicano con eccellente biocompatibilitá e potenzialitá di formare idrogeli flessibili.

Nel corso degli anni le diverse tipologie di bionk, utilizzati singolarmente o in combinazioni per aumentare le prestazioni desiderate dell'idrogelo, sono state studiate e approfondite [35]. Gli idrogeli convenzionali sono a rete singola e possono essere, oltre alla combinazione, anche reticolati per migliorare le prestazioni meccaniche; poiché la reticolazione può essere molto lenta o l'idrogelo può essere inadatto a stampare strutture più alte, si è cercato di rafforzare le reti in diversi modi, adattandoli alla biostampa tridimensionale: funzionalizzazione dei polimeri; reti compenetranti; nanocompositi; bioinchiostri supramolecolari; rinforzo termoplastico. L'obiettivo rimane sempre il buon compromesso tra biocompatibilità e stampabilità e buone prestazioni meccaniche [36]

Il collagene è utilizzato per la pelle, le ossa e il fegato, garantendo adesione, attaccamento e crescita cellulare grazie ai domini di legame dell'integrina; la gelificazione completa, però, è un processo molto lento e le cellule non sono depositate omogeneamente. Per queste limitazioni, si combina il collagene con il Pluronic o con la fibrina. Quest'ultima viene utilizzata per la riparazione della cartilagine del tessuto vascolare e della pelle ma dimostra deboli proprietà meccaniche, non consentendo la manipolazione dopo la gelificazione. Solitamente sono biostampati i due componenti della fibrina, quali trombina e fibrinogeno, tramite stampa a getto di inchiostro ma il fibrinogeno può intasare l'ugello; mentre con la stampa laser il collagene, in quanto delicato, può essere combinato con l'acido ialuronico. L'HA, sfruttato per la riparazione osteo-condrale e nervosa, della valvola cardiaca, della cartilagine e per la guarigione delle ferite, è modificato chimicamente per essere biostampato; molte volte, per migliorare la biostampabilità e la gelificazione, può essere incorporato con HEMA e destrano, con PEG, con derivati metacrilati di gelatina, con fibrina. L'agarosio, come alginato e PEG, non permette una buona proliferazione cellulare e una biosintesi dei componenti quindi, viene miscelato con altri idrogeli come collagene e chitosano. Può essere utilizzato come materiale sacrificale ma non viene utilizzato nella stampa a getto di inchiostro per l'alta viscosità e quindi per il pericolo di ostruzione dell'ugello. Il Matrigel, miscela proteica gelatinosa a base di ECM secreta da cellule di sarcoma di topo, è impiegato in campo vascolare, epatico, osseo e polmonare per la stampa di costrutti molto resistenti,

con buona viscosità, possibilità di reticolazione termica e sopravvivenza cellulare abbastanza alta. L'alginato è stato utilizzato per applicazioni vascolari e del fegato, mostrando una buona vitalità cellulare con tutte le tipologie di stampa; nel caso della biostampa a getto di inchiostro l'aumento della concentrazione cellulare aumenta il tempo di rottura delle goccioline. Inoltre, per la sua natura idrofila, non permette l'assorbimento di proteine e quindi l'attaccamento cellulare perciò si funzionalizza con peptidi tipo RGD, mentre per rafforzarlo si può reticolare con ioni Calcio. Spesso per migliorare la proprietà meccaniche dei costrutti biostampati l'alginato è combinato con agarosio. La gelatina, utilizzata per la ricostruzione della valvola aortica, dei vasi sanguigni e della cartilagine, mostra buona compatibilità con le cellule, promuovendo l'adesione, il differenziamento, la migrazione e la proliferazione, ma l'allungamento cellulare è limitato; solitamente è reticolata enzimaticamente, con un elevato tasso di successo, e non chimicamente perché gli agenti utilizzati sono citotossici. Può essere mischiata con fibrina o con l'alginato. Diversi sono gli studi condotti sulla combinazione di gelatina ed alginato per ottenere un bioink stampabile e i cui parametri di viscosità risultino adeguati per la vitalità cellulare. Ad esempio *Teng Gao et al* [37] hanno indagato su quale fosse il rapporto più adeguato fra modulo elastico e viscoso in relazione alla % di gelatina ed alginato che componevano l'inchiostro. Per una buona vitalità cellulare, bassa viscosità e quindi bassi sforzi di taglio sono opportuni ma, insufficienti a garantire la stabilità strutturale del costrutto stampato. Mantenendo costante la % di gelatina e aumentando la % dell'alginato fino a superare il doppio della quantità di gelatina, il rapporto fra G' e G'' , anche detto tangente di perdita, aumenta, incrementando anche l'uniformità di estrusione e l'integrità strutturale del costrutto. Valori troppo elevati di viscosità sono però sfavorevoli per la vitalità cellulare perché implicano l'applicazione di una pressione di stampa troppo elevata. Dunque valori intermedi della tangente di perdita sono i più appropriati sia per la forma che per le cellule.

Considerando i materiali sintetici, il PEG, utile per i vasi sanguigni e l'osso, presenta basse prestazioni meccaniche perciò si combina con diacrilato di metacrilato, richiedenti fotoreticolazione, dannosa però per le cellule, o con il peptide RGD acrilato. Il Pluronic mostra

bassa resistenza meccanica quindi é combinato con altri materiali come PEG e acido ialuronico metacrilato; inoltre puó essere polimerizzato termicamente, influenzando l'attività metabolica e la vitalità delle cellule, o enzimaticamente. Il Matrigel presenta ottima resistenza meccanica ma problemi di sopravvivenza cellulare implementabile con l'aggiunta di altri idrogeli come PEGDA.

Per quanto riguarda i bioink a base di dECM, questi sono in grado di fornire un microambiente adeguato e molto simile ai tessuti e agli organi naturali, ma non hanno, nella maggior parte dei casi, una opportuna biostampabilità in quanto hanno una bassa viscosità, dovuta alla perdita di proteine tipiche della matrice extracellulare durante il processo di decellularizzazione e solubilizzazione o alle caratteristiche native del tessuto. Per superare questa grossa problematica, i bioink a base di dECM sono combinati con polimeri naturali, come il collagene, la fibroina, la gelatina e l'alginato. In tal caso, i materiali combinati sono opportunamente miscelati con agitazione continua al fine di ottenere un'integrazione corretta con la dECM e inoltre presentano siti di adesione RGD per l'adesione cellulare. Nei casi in cui il bioink a base di dECM sia utilizzato da solo, si rendono necessarie delle modifiche per migliorare stabilità e proprietà meccaniche: si puó ricorrere alla reticolazione tramite vitamina B2, raggi UV o cross-linker a base di PEG [38]. In alcuni studi il bioink a base di dECM é stato stampato tramite l'ausilio di strutture di supporto, che evitano il collasso dell'intero costruito stampato, in materiali resistenti come il PCL [39].

Anche in questo caso, si possono analizzare le caratteristiche dei bioink basati su dECM [39]: la caratterizzazione biochimica, per valutare i profili proteici, viene condotta con SDS-PAGE e spettrometria di massa; la caratterizzazione topologica, per avere un'idea della struttura, prevede l'imaging SEM o, in alcuni casi, TEM; la caratterizzazione reologica, per valutare il comportamento viscoelastico degli idrogeli, prevede l'analisi shear sweep per determinare la viscosità del bioink, la scansione di frequenza per individuare la regione viscoelastica lineare, lo sweep della temperatura a frequenza fissa per studiare la cinetica di gelificazione, valutando il comportamento di G' e G'' e quindi, rispettivamente, del modulo elastico e del modulo viscoso.

1.3.6 Medicina Rigenerativa applicata alla trachea

La TE e quindi la Medicina Rigenerativa applicata alla trachea permette la progettazione in vivo o in vitro e l'impianto di tessuti tracheali senza la necessità di una terapia immunosoppressiva. Diversi sono stati i tentativi di ricostruzione tracheale, nella maggior parte dei casi seminati con cellule tramite l'utilizzo di un bioreattore. Ricordiamo come il bioreattore sia un elemento fondamentale della MR, grazie alla sua capacità di stimolare opportunamente i tessuti chimicamente e fisicamente. Con i primi tentativi [13] non era ancora del tutto chiara la modalità con cui le cellule erano in grado di popolare il costrutto tracheale; inoltre numerose erano le complicanze nel lungo termine specialmente legate all'insorgere di fenomeni di restenosi o collasso della struttura.

Con il tempo, si è reso necessario definire criteri di design di un costrutto ingegnerizzato come la trachea in termini di tipologia cellulare, proprietà strutturali e prestazionali dello scaffold stesso per ricreare la funzione primaria del tessuto [40]. La prima esigenza riguarda la presenza di contiguità tra epitelio e endotelio, a questo si aggiunge la formulazione di un tessuto connettivo di supporto e di uno strato di mucosa. Da un punto di vista meccanico, il costrutto deve garantire la pressurizzazione e la peristalsi nonché la capacità di dilatazione e costrizione al passaggio dell'aria. Le fonti cellulari utilizzate per colonizzare i diversi strati della trachea sono: cellule dell'epitelio respiratorio per la mucosa per ricreare la funzione delle epiteliali; MSC, cellule staminali adipose o condrociti auricolari come condrociti della cartilagine ialina; fibroblasti nasali per l'avventizia come fonte di fibroblasti.

Tra le tecnologie sviluppate, i metodi di decellularizzazione, liofilizzazione, digestione e stampa 3D della trachea si pongono l'obiettivo di creare costrutti riproducibili e adattabili su larga scala. Risulta fondamentale fissare protocolli che consentano prima di eliminare tutta la componente cellulare e nucleare così da evitare rigetto immunologico, poi di evitare notevoli alterazioni della matrice extracellulare e in ultimo di ricostruire la trachea ingegnerizzata con proprietà simili a quella nativa. Generalmente la decellularizzazione della trachea si basa sull'utilizzo di soluzioni ipo/ipertoniche come acqua distillata o PBS, detergenti ionici come l'acido deossicolico e enzimi come la DNase. Fondamentale è la quantità

dei singoli reagenti, il loro tempo di esposizione e il numero di cicli di decellularizzazione a cui la trachea é sottoposta. Negli ultimi anni si é cercato di ridurre i tempi dell'intero protocollo e quindi il numero di cicli [41] partendo da una trachea precedentemente liofilizzata. Questo consente, in aggiunta, di ridurre la % di reagenti necessari. In alternativa la liofilizzazione puó essere effettuata anche sulla dECM-t al fine di ottenere una polvere stampabile. Talvolta la tecnologia del bioreattore é sfruttata durante il processo di decellularizzazione, consentendo di velocizzare il protocollo rendendolo automatico. In tal caso é fondamentale definire requisiti di automazione, perfusione, condizionamento fisico, regolazione termica, sterilitá, facilitá di utilizzo e affidabilitá del processo.

Negli ultimi anni diversi sono stati i tentativi di ricreare la trachea o di progettare un sistema di supporto che evitasse il collasso della stessa nel lungo termine tramite l'utilizzo della 3D bioprinting:

- 2015. Lo studio condotto da *Morrison et al.* [42] riguarda la stampa di una struttura di supporto alla trachea in PCL (Figura 1.8).

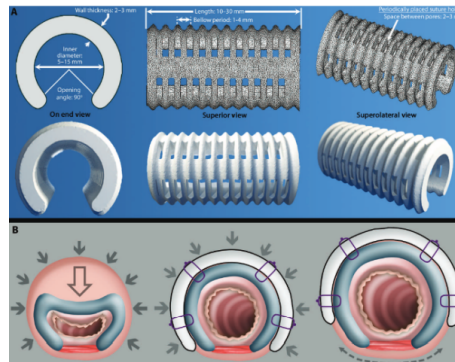


Figura 1.8: Trachea con struttura di supporto di PCL. [42]

- 2016. Progettazione di un supporto stampato in PCL per la trachea decellularizzata da *Johnson et al.* [5], come mostrato in Figura 1.9.

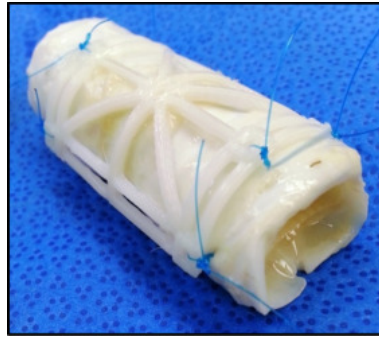


Figura 1.9: Rappresentazione della trachea decellularizzata con supporto. [5]

- 2017. Il costrutto progettato da *Gao et al.* è uno scaffold biodegradabile stampato in PCL sospeso in coltura con condrociti [43], come mostrato in Figura 1.10.

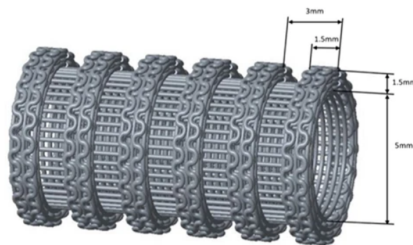


Figura 1.10: Impalcatura PCL stampata in 3D. [43]

- 2018. Il costrutto raffigurato in Figura 1.11 prevede una struttura portante in PCL combinata ad anelli di silicone che mimano gli anelli cartilaginei. Inoltre, sul lato interno della struttura sono stati applicati un foglietto di mucosa di trachea decellularizzata e un foglietto di cellule mesenchimali stromali [44].

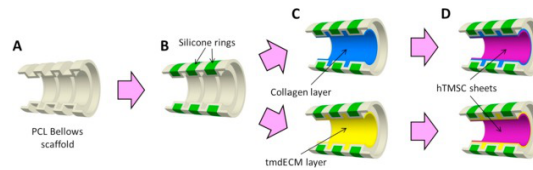


Figura 1.11: Costrutto in PCL e anelli di silicone con applicazione di foglietti di mucosa di trachea decellularizzata e di MSC. [44]

- 2018. Progettazione di una struttura tubulare in PU e PET tramite elettrospinning e stampa 3D di ring in policarbonato di *Best et al.* [45], come mostrato in Figura 1.12.

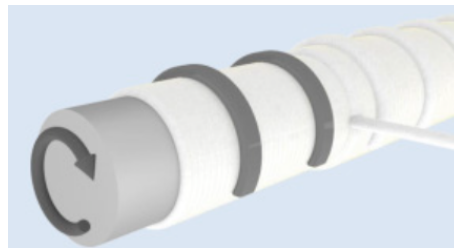


Figura 1.12: Stampa 3D di anelli in policarbonato posizionati manualmente sullo scaffold. [45]

- 2019. Progettazione, come mostarto in Figura 1.13, di un'impalcatura in poliuretano termoplastico stampata 3D con fibre elettrofilate per promuovere l'adesione cellulare [46].

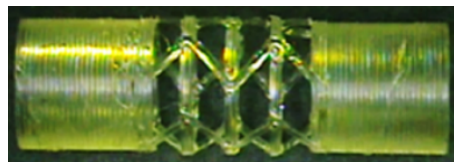


Figura 1.13: Scaffold stampato 3D in poliuretano teroplastico. [46]

- 2019. Ricostruzione e stampa 3D di una trachea artificiale multistrato con PCL e idrogel di alginato con cellule epiteliali autologhe nasali e auricolari e condrociti [47], come mostrato in Figura 1.14.

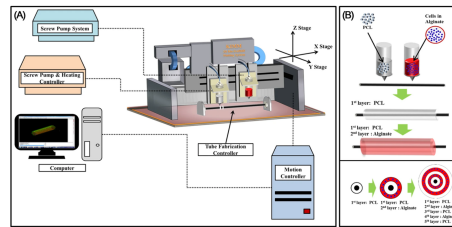


Figura 1.14: Rappresentazione del metodo di ottenimento dello scaffold in PCL e alginato. [47]

Nonostante non ci sia ancora alcun esempio di applicazione clinica consolidato, la ricerca tenta di rigenerare porzioni sempre più grandi di trachea evitando l'utilizzo di strutture di supporto e quindi materiali di origine sintetica, prediligendo la combinazione di decellularizzazione, liofilizzazione, solubilizzazione e stampa 3D. Questo offre anche la possibilità di ridurre la manipolazione cellulare dal momento che è possibile inglobare le cellule di tipo autologo, durante la fase di 3D-bioprinting.

1.3.7 Medicina Rigenerativa applicata alle arterie coronarie

Per quanto riguarda le arterie coronarie e l'aorta e quindi i tessuti vascolari, anche qui si sono sviluppati diversi modelli di Ingegneria dei Tessuti e di Medicina Rigenerativa che cercano di riprodurre fedelmente le strutture tubulari native, complesse dal punto di vista strutturale per la presenza di tre strati cellulari e per il diametro, e dal punto di vista funzionale per il pompaggio del sangue. Dopo i primi tentativi con l'angioplastica con palloncino, gli stent in metallo e poi quelli a rilascio di farmaci, si rende necessario l'intervento con altri mezzi in quanto la presenza continua di stent non fornisce effetti positivi nel lungo termine [48]. Esempi di miglioramento derivano dalla progettazione di stent biodegradabili e riassorbibili, per i quali però risulta difficile regolare la cinetica di degradazione.

Come per la trachea, i costrutti vascolari devono seguire determinati criteri di design. Per rispettare la stratificazione delle arterie, le fonti cellulari utilizzate sono: per la mucosa cellule epiteliali primarie del sistema respiratorio o cellule stromali mesenchimali per riprodurre la funzione delle cellule epiteliali; per la submucosa cellule staminali mesenchimali o cellule staminali derivate dal tessuto adiposo o condrociti auricolari per il differenziamento e la crescita dei condrociti; per l'avventizia i fibroblasti nativi [40]. Inoltre gli scaffold vascolari devono garantire il passaggio del flusso sanguigno all'interno del lume, oltre a stimoli di pressurizzazione e peristalsi. Ad oggi, si ritiene sempre piú opportuno sfruttare le caratteristiche dell'arteria decellularizzata generalmente attraverso protocolli che prevedono l'uso di acqua distillata, sodio deossicolico e DNase. Gli ultimi sviluppi della Medicina Rigenerativa applicata ai vasi sanguigni sono spiegati di seguito:

- 2013. *Zhang at al.* [49] hanno tentato di rigenerare il vaso sanguigno con una metodologia di elettrospinning coassiale, con incapsulamento del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e del fattore di crescita derivato delle piastrine-bb (PDGF), come mostrato in Figura 1.15 .

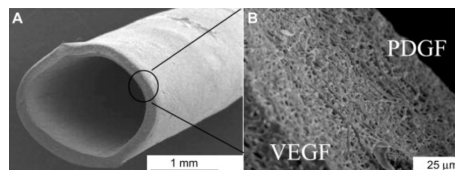


Figura 1.15: Innesto vascolare con strato interno carico di VEGF e strato esterno carico con PDGF. [49]

- 2015. Come rappresentato in Figura 1.16, *Jung at al.* [50] cercano di fabbricare un TEBV con cellule staminali mesenchimali sulla parete esterna e cellule progenitrici endoteliali derivate dal sangue del cordone ombelicale nel lume interno; i foglietti sono stati avvolti su mandrini, rimossi dopo la maturazione, e coltivati in bioreattori senza la necessità di uno scaffold di supporto.

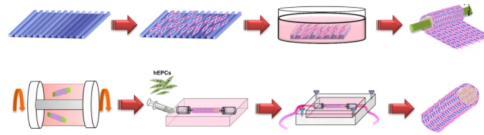


Figura 1.16: Processo di fabbricazione di un TEHV senza scaffold, basato su hMSC. [50]

- 2017. Gel di collagene incorporato con fibroblasti indotti a pluripotenza e successivamente ridifferenziati in cellule muscolari lisce, coltivato nel lume interno con cellule endoteliali derivate dal sangue del cordone ombelicale per ricreare il costrutto tubolare [51]. Lo schema é rappresentato in Figura 1.17.

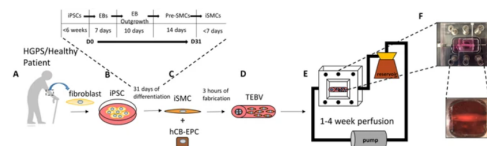


Figura 1.17: Schema per produrre TEHV con cellule muscolari lisce indotte e cellule endoteliali derivate dal sangue del cordone umano. [51]

- 2018. Stampa 3D del costrutto tubolare in policaprolattone (Figura 1.18) e successiva semina con fibroblasti [52].



Figura 1.18: Stampa 3D dello scaffold in PCL. [52]

- 2019. *H.Cui et al.* [53] hanno stampato un bioink contenente GelMA/C e cellule muscolari lisce dell'arteria coronaria umana esternamente e un impasto contenente Pluronic, periodato di sodio e cellule endoteliali della vena ombelicale umana internamente; dopo l'indurimento della struttura lo strato stampato di Pluronic é stato rimosso, garantendo la pervietà del vaso, come mostrato in Figura 1.19.

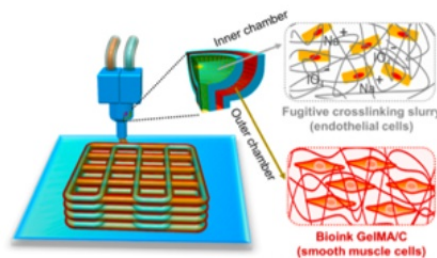


Figura 1.19: Biostampa a estrusione coassiale del costrutto vascolare: la parte interna contiene impasto reticolato fuggitivo e cellule endoteliali; la parte esterna contiene bioinciostrro GelMA/C e cellule muscolari lisce. [53]

- 2021. Biostampa multimateriale di cellule endoteliali, cellule staminali mesenchimali e fibroblasti in bioinchiostro di alginato e GelMA per riprodurre, rispettivamente, la tonaca intima, la tonaca media e la tonaca esterna [54], come mostrato in Figura 1.20.

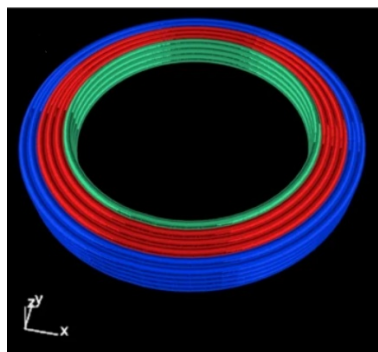


Figura 1.20: Stampa multimateriale a sei strati con tre diverse composizioni di inchiostro per riprodurre i tre strati della struttura vascolare. [54]

Sono stati prodotti anche modelli per simulare alcune patologie dei sistemi vascolari, con l'obiettivo di una futura elaborazione e somministrazione di farmaci specifici per la cura delle stesse.

Sebbene i progressi siano consistenti, bisogna testare la sicurezza e l'efficacia di alcune metodologie e protocolli nel lungo termine per l'impianto in vivo nei pazienti; inoltre poiché la maggior parte degli studi si incentra su vasi di medio-grande calibro come l'aorta, risulta necessario superare la limitazione data dal ridotto diametro delle arterie coronarie con costrutti che siano il più possibile conformi alle dimensioni native.

Capitolo 2

Materiali e Metodi

Il presente progetto di tesi é stato condotto nel Laboratorio di 3D Bioprinting e meccanica dei tessuti soffici (3DBSTM), presso il Laboratorio di Meccanica delle Strutture Biologiche (LaBS) del Politecnico di Milano.

2.1 Decellularizzazione di trachea e aorta

Il presente lavoro di tesi é iniziato con la decellularizzazione di trachea e aorta porcini, specificatamente trachea e aorta di maiale. Come prima prova, é stato preso in considerazione il protocollo detergente-enzimatico eseguito da *A.Batioglu-Karaaltin et al.* [55], in cui sono state trattate trachee di coniglio lunghe circa 3.5 cm in diverse modalitá. Tra le 6 proposte di protocolli, é stato scelto il terzo in quanto ha fornito risultati adeguati in termini di quantitativo di DNA, contenuto di glicosaminoglicani e valori di sforzo a trazione. Successivamente sono state apportate alcune modifiche a questo protocollo e sperimentate altre tecniche. In tutti i protocolli si é partiti dallo scongelamento di trachea e aorta, rimozione dei tessuti circostanti, suddivisione in piccoli campioni e lavaggio degli stessi. Tutti i reagenti utilizzati per eseguire i diversi protocolli sono forniti dall'azienda Sigma-Aldrich

(UK). Al termine del lavaggio sono stati isolati i campioni di controllo e congelati. La Figura 2.1 mostra gli organi interi di trachea e aorta processati.



Figura 2.1: Aorta e trachea native, dopo la rimozione dei tessuti circostanti.

I protocolli scelti sono accomunati dall'utilizzo di acido deossicolico per la degradazione delle membrane cellulari e nucleari e DNase, opportunamente combinato con altre sostanze per scindere i legami degli acidi nucleici.

2.1.1 Primo protocollo di decellularizzazione

Il primo protocollo di decellularizzazione é stato effettuato su 20 campioni, precisamente 8 di trachea e 12 di aorta suddivisi rispettivamente in 3 e 4 provette. In generale la quantità di soluzione necessaria a ricoprire tutti i campioni é stata di 200 mL. Gli step eseguiti sono stati:

1. Scongellamento di aorte e trachee;
2. Rimozione dei tessuti circostanti e ottenimento dei campioni;

3. Lavaggio ripetuto dei campioni in PBS;
4. Preparazione della soluzione di acido deossicolico e dH₂O sotto cappa:
 - Pesati 0.5 g di acido equivalenti allo 0.25% di 200 mL di dH₂O;
 - Miscelati dH₂O e acido nel becker;
5. Immersione dei campioni nella soluzione acida all'interno delle provette, fino a coprirli;
6. Posizionamento delle provette sigillate con Parafilm nell'incubatore a 37°C per 4 ore, con agitazione ogni mezz'ora;
7. Rimozione della soluzione acida e lavaggio dei campioni in dH₂O contenente 1% di P/S a 4°C per tutta la notte;
8. Preparazione della soluzione contenente 150 U/mL di DNase, 50 mmol di MgSO₄ e dH₂O:
 - DNase: l'enzima é fornito in 2000 kU, opportunamente diluite in 2 mL di dH₂O. Dal momento che sono necessarie 150 U, secondo la relazione

$$1 \text{ kU} : 1.5 \text{ U} = X \text{ kU} : 150 \text{ U},$$

la DNase prelevata é 100 μ L corrispondente a 100 kU.

- MgSO₄: a partire dal peso molecolare del solfato di magnesio e dalle 50 mmol necessarie

$$m_{MgSO_4} = 50 * 10^{-3} \text{ mol/L} * 120.366 \text{ g/mol} = 6 \text{ g/L}$$

da cui, avendo 200 mL di dH₂O

$$m_{MgSO_4} = 6 \text{ g/L} * 200 \text{ mL} = 1.2 \text{ g};$$

- Miscelati dH₂O, DNase e solfato di magnesio nel becker;

9. Immersione dei campioni nella soluzione all'interno delle provette, fino a coprirli;
10. Posizionamento delle provette sigillate con Parafilm nell'incubatore a 37°C per 3 ore, con agitazione ogni mezz'ora;
11. Rimozione della soluzione e lavaggio dei campioni in dH₂O contenente 1% di P/S a 4°C per tutta la notte.

Il protocollo é stato ripetuto complessivamente 3 volte adattando le quantità di sostanze necessarie in base al volume di soluzione necessario a ricoprire i campioni, fatta eccezione per i primi 3 step (questi step sono stati eseguiti solo al primo ciclo). Per ogni ciclo sono state congelate 2 provette, rispettivamente una contenente campioni di aorta e l'altra contenente campioni di trachea, per la successiva quantificazione del DNA e confronto dei diversi cicli di decellularizzazione.

Le seguenti figure, Figura 2.2(a), Figura 2.2(b) e Figura 2.2(c) , mostrano i campioni al termine di ciascun ciclo



(a) Primo ciclo di decellularizzazione

(b) Secondo ciclo di decellularizzazione



(c) Terzo ciclo di decellularizzazione

Figura 2.2: Campioni ottenuti dal primo protocollo di decellularizzazione, a destra l'aorta e a sinistra la trachea.

2.1.2 Secondo protocollo di decellularizzazione

Il secondo protocollo di decellularizzazione é stato effettuato su 24 campioni, precisamente 12 di trachea e 12 di aorta suddivisi in 6 provette. In generale la quantità di soluzione necessaria a ricoprire tutti i campioni é stata di 200 mL. Gli step, di seguito elencati, combinano il protocollo eseguito da *A. Batioglu-Karaaltin et al.* [55] e quello effettuato da *E. Zambaiti et al.* [56]. Quest'ultimo protocollo prevedeva la decellularizzazione dello stomaco di ratto e ha mostrato buoni risultati in termini di mantenimento delle principali componenti della matrice extracellulare sia strutturalmente sia nella loro composizione.

1. Scongellamento di aorte e trachee;
2. Rimozione dei tessuti circostanti e ottenimento dei campioni;
3. Lavaggio ripetuto dei campioni in PBS;
4. Preparazione della soluzione di acido deossicolico e dH₂O sotto cappa:
 - Pesati 0.5 g di acido equivalenti allo 0.25% di 200 mL di dH₂O;
 - Miscelati dH₂O e acido nel becker;
5. Immersione dei campioni nella soluzione acida all'interno delle provette, fino a coprirli;
6. Posizionamento delle provette sigillate con Parafilm nell'incubatore a 37°C per 4 ore, con agitazione ogni mezz'ora;
7. Rimozione della soluzione acida e lavaggio dei campioni in dH₂O contenente 1% di P/S a 4°C per tutta la notte;
8. Preparazione della soluzione contenente 150 U/mL di DNase, 1.11 g/L di CaCl₂, 0.9 % di NaCl e dH₂O:
 - DNase: la quantità di enzima necessario é 150 U, quindi secondo la relazione

$$1 \text{ kU} : 1.5 \text{ U} = X \text{ kU} : 150 \text{ U},$$

la DNase prelevata é 100 μL corrispondente a 100 kU.

- CaCl_2 : avendo a disposizione cloruro di calcio diidrato i calcoli effettuati per ottenere 0.3 gr di $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, sono i seguenti:

$$moli_{\text{CaCl}_2} = \frac{1.11 \text{ g/L}}{110.98 \text{ g/mol}} = 0.01 \text{ mol/L}$$

$$m_{\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} = 147.01 \text{ g/mol} * 0.01 \text{ mol/L} = 1.47 \text{ g/L},$$

da cui, avendo 200 mL di dH_2O

$$m_{\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} = 1.47 \text{ g/L} * 200 \text{ mL} = 0.3 \text{ g};$$

- NaCl: la soluzione fisiologica necessaria é di 1.8 mL;
 - Miscelate tutte le componenti nel becker;
9. Immersione dei campioni nella soluzione all'interno delle provette, fino a coprirli;
 10. Posizionamento delle provette sigillate con Parafilm nell'incubatore a 37°C per 3 ore, con agitazione ogni mezz'ora;
 11. Rimozione della soluzione e lavaggio dei campioni in dH_2O contenente 1% di P/S a 4°C per tutta la notte.

Come in precedenza, il protocollo é stato ripetuto complessivamente 3 volte, con la conservazione al termine di ogni ciclo dei campioni per la caratterizzazione.

Di seguito, le figure Figura 2.3(a), Figura 2.3(b) e Figura 2.3(c) mostrano i campioni al termine di ciascun ciclo di questo secondo protocollo di decellularizzazione.

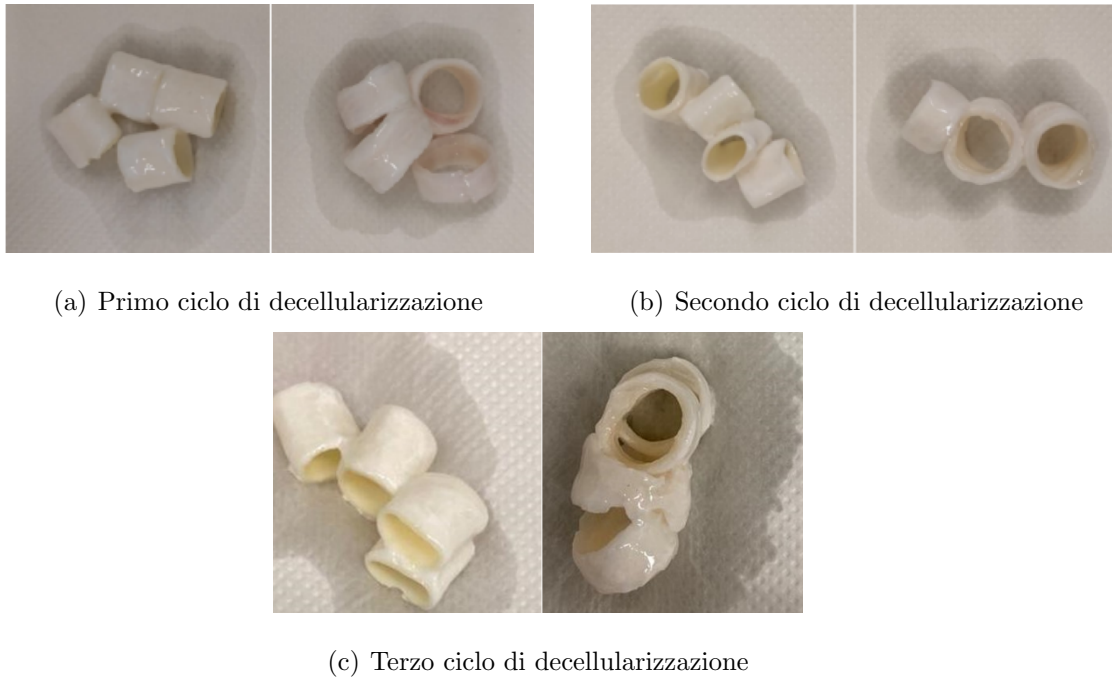


Figura 2.3: Campioni ottenuti dal secondo protocollo di decellularizzazione, a destra l'aorta e a sinistra la trachea.

2.1.3 Terzo protocollo di decellularizzazione

Il terzo protocollo di decellularizzazione, effettuato su trachea e aorta di maiale, segue la procedura di *E. Zambaiti et al.* modificandola nel quantitativo di acido deossicolico utilizzato nei vari cicli. L'incremento graduale di acido effettuato anche nei successivi protocolli, a partire dallo 0.25% fino al valore realmente utilizzato nello studio di riferimento, *Whole rat stomach decellularisation using a detergent-enzymatic protocol* [56], consente una finale valutazione comparativa sia dei protocolli che dei cicli.

La quantità di soluzione necessaria a ricoprire tutti i campioni, 8 di trachea e 8 di aorta, esclusi già i controlli lavati e congelati, è stata di 200 mL. Dunque, i passaggi eseguiti sono stati:

1. Scongellamento di aorte e trachee;
2. Rimozione dei tessuti circostanti e ottenimento dei campioni;

3. Lavaggio ripetuto dei campioni in PBS;
4. Preparazione della soluzione di acido deossicolico e dH₂O sotto cappa:
 - Pesati 0.5 g di acido equivalenti allo 0.25% di 200 mL di dH₂O;
 - Miscelati dH₂O e acido nel becker;
5. Immersione dei campioni nella soluzione acida all'interno delle provette, fino a coprirli;
6. Posizionamento delle provette sigillate con Parafilm nell'incubatore a 37°C per 4 ore, con agitazione ogni mezz'ora;
7. Rimozione della soluzione acida e lavaggio dei campioni in dH₂O contenente 1% di P/S a 4°C per tutta la notte;
8. Preparazione della soluzione contenente 22.5 mg/L di DNase, 1.11 g/L di CaCl₂ e PBS:
 - DNase: la quantità di enzima in polvere necessaria é 4.5 mg;
 - CaCl₂: avendo a disposizione cloruro di calcio diidrato i calcoli effettuati per ottenere 0.3 gr di CaCl₂2H₂O, sono i seguenti:

$$moli_{CaCl_2} = \frac{1.11 \text{ g/L}}{110.98 \text{ g/mol}} = 0.01 \text{ mol/L}$$

$$m_{CaCl_2 \cdot 2H_2O} = 147.01 \text{ g/mol} * 0.01 \text{ mol/L} = 1.47 \text{ g/L},$$

da cui, avendo 200 mL di dH₂O

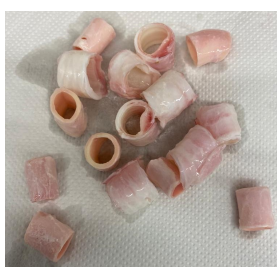
$$m_{CaCl_2 \cdot 2H_2O} = 1.47 \text{ g/L} * 200 \text{ mL} = 0.3 \text{ g};$$

- Miscelate tutte le componenti nel becker;
9. Immersione dei campioni nella soluzione all'interno delle provette, fino a coprirli;

10. Posizionamento delle provette sigillate con Parafilm nell'incubatore a 37°C per 3 ore, con agitazione ogni mezz'ora;
11. Rimozione della soluzione e lavaggio dei campioni in dH₂O contenente 1% di P/S a 4°C per tutta la notte.

Il protocollo é stato ripetuto complessivamente 4 volte; in particolare nei cicli successivi al primo, é stata incrementata la quantità di acido deossicolico all'1%, corrispondente a 2 g. Tutti i campioni sono stati congelati per effettuare un diretto confronto con i controlli nativi.

I campioni appaiono, alla fine di ogni ciclo, nel modo seguente:



(a) Primo ciclo di decellularizzazione



(b) Secondo ciclo di decellularizzazione



(c) Terzo ciclo di decellularizzazione



(d) Quarto ciclo di decellularizzazione

Figura 2.4: Campioni ottenuti dal terzo protocollo di decellularizzazione di trachea e aorta.

2.1.4 Quarto protocollo di decellularizzazione

Il quarto protocollo di decellularizzazione é stato effettuato su 18 campioni di trachea e 12 di aorta, conservando due campioni di ciascuna tipologia come controllo. I passaggi sono gli stessi del terzo protocollo, l'unica differenza é la quantità di acido utilizzato che é stata aumentata all'1.25%, dopo il primo ciclo.

La quantità di soluzione necessaria a ricoprire tutti i campioni nel corso della procedura é stata di 400 mL. Gli step eseguiti sono stati quindi:

1. Scongellamento di aorte e trachee;

2. Rimozione dei tessuti circostanti e ottenimento dei campioni;
3. Lavaggio ripetuto dei campioni in PBS;
4. Preparazione della soluzione di acido deossicolico e dH₂O sotto cappa:
 - Pesati 1 g di acido equivalenti allo 0.25% di 400 mL di dH₂O; dal secondo ciclo in poi pesati 5g di acido deossicolico, corrispondenti all'1.25% di 400 mL
 - Miscelati dH₂O e acido nel becker;
5. Immersione dei campioni nella soluzione acida all'interno delle provette, fino a coprirli;
6. Posizionamento delle provette sigillate con Parafilm nell'incubatore a 37°C per 4 ore, con agitazione ogni mezz'ora;
7. Rimozione della soluzione acida e lavaggio dei campioni in dH₂O contenente 1% di P/S a 4°C per tutta la notte;
8. Preparazione della soluzione contenente 22.5 mg/L di DNase, 1.11 g/L di CaCl₂ e PBS:
 - DNase: la quantità di enzima in polvere necessaria é 9 mg;
 - CaCl₂: avendo a disposizione cloruro di calcio diidrato i calcoli effettuati per ottenere 0.6 gr di CaCl₂2H₂O, sono i seguenti:

$$moli_{CaCl_2} = \frac{1.11 \text{ g/L}}{110.98 \text{ g/mol}} = 0.01 \text{ mol/L}$$

$$m_{CaCl_2 \cdot 2H_2O} = 147.01 \text{ g/mol} * 0.01 \text{ mol/L} = 1.47 \text{ g/L},$$

da cui, avendo 400 mL di dH₂O

$$m_{CaCl_2 \cdot 2H_2O} = 1.47 \text{ g/L} * 400 \text{ mL} = 0.6 \text{ g};$$

- Miscelate tutte le componenti nel becker;
9. Immersione dei campioni nella soluzione all'interno delle provette, fino a coprirli;
 10. Posizionamento delle provette sigillate con Parafilm nell'incubatore a 37°C per 3 ore, con agitazione ogni mezz'ora;
 11. Rimozione della soluzione e lavaggio dei campioni in dH₂O contenente 1% di P/S a 4°C per tutta la notte.

Il protocollo é stato ripetuto complessivamente 5 volte e al termine tutti i campioni sono stati congelati per effettuare la quantificazione del DNA, confrontandola con i controlli nativi. In particolare nel quinto ciclo, in concomitanza con il quinto protocollo di decellularizzazione, la quantità di acido deossicolico é stata aumentata già al 4%; sono stati utilizzati quindi 16 g di acido, corrispondenti al 4% di 400 mL di soluzione di dH₂O.

Le figure Figura 2.5(a), Figura 2.5(b), Figura 2.5(c), Figura 2.5(d) e Figura 2.5(e) mostarno i campioni alla fine di ogni ciclo.



(a) Primo ciclo di decellularizzazione



(b) Secondo ciclo di decellularizzazione



(c) Terzo ciclo di decellularizzazione



(d) Quarto ciclo di decellularizzazione



(e) Quinto ciclo di decellularizzazione

Figura 2.5: Campioni ottenuti dal quarto protocollo di decellularizzazione di trachea e aorta.

2.1.5 Quinto protocollo di decellularizzazione

Il quinto protocollo di decellularizzazione é stato effettuato su 2 trachee e 2 aorte di maiale, ottenendo rispettivamente 18 e 19 campioni, seguendo sempre il protocollo proposto da *E. Zambaiti et al.*. In questo caso sono state rispettate perfettamente tutte le quantità delle soluzioni, aumentando notevolmente la percentuale di acido deossicolico e quindi utilizzando il 4%.

La quantità di soluzione necessaria a ricoprire tutti i campioni, dopo la rimozione dei pezzi di controllo (2 di trachea e 2 di aorta), é stata di 300 mL. Gli step eseguiti sono stati quindi:

1. Scongellamento di aorte e trachee;

2. Rimozione dei tessuti circostanti e ottenimento dei campioni;
3. Lavaggio ripetuto dei campioni in PBS;
4. Preparazione della soluzione di acido deossicolico e dH₂O sotto cappa:
 - Pesati 12 g di acido equivalenti al 4% di 300 mL di dH₂O;
 - Miscelati dH₂O e acido nel becker;
5. Immersione dei campioni nella soluzione acida all'interno delle provette, fino a coprirli;
6. Posizionamento delle provette sigillate con Parafilm nell'incubatore a 37°C per 4 ore, con agitazione ogni mezz'ora;
7. Rimozione della soluzione acida e lavaggio dei campioni in dH₂O contenente 1% di P/S a 4°C per tutta la notte;
8. Preparazione della soluzione contenente 22.5 mg/L di DNase, 1.11 g/L di CaCl₂ e PBS:
 - DNase: la quantità di enzima in polvere necessaria é 6.75 mg;
 - CaCl₂: avendo a disposizione cloruro di calcio diidrato i calcoli effettuati per ottenere 0.45 gr di CaCl₂2H₂O, sono i seguenti:

$$moli_{CaCl_2} = \frac{1.11 \text{ g/L}}{110.98 \text{ g/mol}} = 0.01 \text{ mol/L}$$

$$m_{CaCl_2 \cdot 2H_2O} = 147.01 \text{ g/mol} * 0.01 \text{ mol/L} = 1.47 \text{ g/L},$$

da cui, avendo 300 mL di dH₂O

$$m_{CaCl_2 \cdot 2H_2O} = 1.47 \text{ g/L} * 300 \text{ mL} = 0.45 \text{ g};$$

- Miscelate tutte le componenti nel becker;

9. Immersione dei campioni nella soluzione all'interno delle provette, fino a coprirli;
10. Posizionamento delle provette sigillate con Parafilm nell'incubatore a 37°C per 3 ore, con agitazione ogni mezz'ora;
11. Rimozione della soluzione e lavaggio dei campioni in dH₂O contenente 1% di P/S a 4°C per tutta la notte.

Il protocollo é stato ripetuto complessivamente 3 volte e al termine tutti i campioni sono stati congelati per effettuare la quantificazione del DNA, confrontandola con i controlli nativi.

Le Figura 2.6(a), Figura 2.6(b) e Figura 2.6(c) mostrano i campioni alla fine di ogni ciclo.



(a) Primo ciclo di decellularizzazione



(b) Secondo ciclo di decellularizzazione



(c) Terzo ciclo di decellularizzazione

Figura 2.6: Campioni ottenuti dal quinto protocollo di decellularizzazione di trachea e aorta.

2.1.6 Sesto protocollo di decellularizzazione

A partire dai risultati del primo e quinto protocollo, la sesta decellularizzazione é stato un ulteriore tentativo di combinazione tra gli studi effettuati da *A. Batioglu-Karaaltin et al.* [55] e *E. Zambaiti et al.* [56]. In particolare, é stata mantenuta la percentuale dell'acido deossicolico al 4% e la concentrazione di DNase utilizzata; quest'ultima, però, é stata disciolta con solfato di magnesio. Dunque, gli step seguiti sono stati:

1. Scongellamento di aorta e trachea;
2. Rimozione dei tessuti circostanti e ottenimento dei campioni;
3. Lavaggio ripetuto dei campioni in PBS;
4. Preparazione della soluzione di acido deossicolico e dH₂O sotto cappa:
 - Pesati 6 g di acido equivalenti al 4% di 150 mL di dH₂O;
 - Miscelati dH₂O e acido nel becker;
5. Immersione dei campioni nella soluzione acida all'interno delle provette, fino a coprirli;
6. Posizionamento delle provette sigillate con Parafilm nell'incubatore a 37°C per 4 ore, con agitazione ogni mezz'ora;
7. Rimozione della soluzione acida e lavaggio dei campioni in dH₂O contenente 1% di P/S a 4°C per tutta la notte;
8. Preparazione della soluzione contenente 22.5 mg/L di DNase, 50 mmol di MgSO₄ e dH₂O:
 - DNase: la quantità di enzima in polvere necessaria é 3.38 mg;
 - MgSO₄: a partire dal peso molecolare del solfato di magnesio e dalle 50 mmol necessarie

$$m_{MgSO_4} = 50 * 10^{-3} \text{ mol/L} * 120.366 \text{ g/mol} = 6 \text{ g/L}$$

da cui, avendo 150 mL di dH₂O

$$m_{MgSO_4} = 6 \text{ g/L} * 150 \text{ mL} = 0.9 \text{ g}$$

- Miscelati dH₂O, DNase e solfato di magnesio nel becker;
9. Immersione dei campioni nella soluzione all'interno delle provette, fino a coprirli;
 10. Posizionamento delle provette sigillate con Parafilm nell'incubatore a 37°C per 3 ore, con agitazione ogni mezz'ora;
 11. Rimozione della soluzione e lavaggio dei campioni in dH₂O contenente 1% di P/S a 4°C per tutta la notte.

Il protocollo é stato ripetuto complessivamente 3 volte e al termine seguito dalla consueta fase di congelamento dei campioni per le successive analisi quantitative.

I campioni al termine di ogni ciclo sono visibile nelle seguenti Figura 2.7(a), Figura 2.7(b) e Figura 2.7(c).



(a) Primo ciclo di decellularizzazione



(b) Secondo ciclo di decellularizzazione



(c) Terzo ciclo di decellularizzazione

Figura 2.7: Campioni ottenuti dal sesto protocollo di decellularizzazione di trachea e aorta.

Tutti i protocolli di decellularizzazione, con i principali step effettuati e le informazioni utili, sono riassunti nella seguente tabella Figura 2.1, dove con n si indica il numero di cicli

per ciascun protocollo e con *Campioni Trachea* e *Campioni Aorta* si intende il numero di campioni ottenuti dai rispettivi organi interi. Ovviamente tra uno step e l'altro ci sono stati i lavaggi con PBS o acqua distillata e P/S e con il completamento di tutti i cicli il congelamento dei campioni.

	Campioni Trachea	Campioni Aorta	n	I step	II step
Primo protocollo	8	12	3	0.25% Acido deossicolico	150 U Dnase e 50 mmol/L MgSO ₄
Secondo protocollo	12	12	3	0.25% Acido deossicolico	150 U Dnase, 1.11 g/L CaCl ₂ , 0.9% NaCl
Terzo protocollo*	8	8	4	1% Acido deossicolico	22.5 mg/L Dnase, 1.11 g/L CaCl ₂
Quarto protocollo**	18	12	5	1.25% Acido deossicolico	22.5 mg/L Dnase, 1.11 g/L CaCl ₂
Quinto protocollo	18	19	3	4% Acido deossicolico	22.5 mg/L Dnase, 1.11 g/L CaCl ₂
Sesto protocollo	10	8	3	4% Acido deossicolico	2.5 mg/mL Dnase, 50 mmol MgSO ₄

Tabella 2.1: Riassunto dei principali step dei protocolli di decellularizzazione [*Per il primo ciclo é stato utilizzato lo 0.25% di Acido deossicolico; ** Per il primo ciclo é stato utilizzato lo 0.25% di Acido deossicolico e per il quinto ciclo il 4%].

2.2 Valutazione della decellularizzazione

Per la valutazione dei diversi protocolli di decellularizzazione svolti e quindi per la quantificazione del contenuto di DNA e cellulare é stata effettuata un'analisi quantitativa e qualitativa presso il Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti dell'Ospedale Maggiore-Policlinico di Milano, a cura del Dr. Giorgio Croci: nel primo caso tramite l'utilizzo di un opportuno kit, nel secondo caso tramite analisi istologiche.

La quantificazione del DNA prevede l'impiego di un kit QIAGEN, fornitore di tecnologie innovative per campioni e analisi che definisce gli standard in purificazione e analisi di acidi nucleici e proteine, ricerca sui microRNA e RNAi e automazione delle tecnologie di campionamento.

L'analisi qualitativa, nonché istologica prevede la colorazione con *Ematossilina ed Eosina* sia dei campioni nativi sia dei campioni alla fine di ciascun ciclo. I protocolli utilizzati dal Dr. Giorgio Croci sono dettagliatamente forniti in *Appendice A*.

2.3 Liofilizzazione

Tutti i campioni decellularizzati sono stati liofilizzati per ottenere le polveri di matrice extracellulare di trachea e aorta per la successiva preparazione di biomaterial inks. La procedura é stata eseguita esternamente e il protocollo eseguito schematicamente segue i seguenti step:

- Congelamento a -80°C ;
- Liofilizzazione vera e propria;
- Polverizzazione con mortaio e pestello dopo immersione in azoto liquido.

2.4 Digestione enzimatica della dECM

Dopo la liofilizzazione, la soluzione a base di pdECM é stata preparata solubilizzando le polveri di matrice extracellulare, tramite digestione enzimatica con pepsina. Come in altri studi, prendendo in considerazione il procedimento effettuato da [44], la digestione é stata fatta con una soluzione di acido acetico contenente 0.1 mg/mL di pepsina. Inizialmente, l'idea é stata quella di aggiungere progressivamente piccole quantità di pdECM-a e osservare i risultati della solubilizzazione per studiare la giusta proporzione.

Digestione 1 Il primo tentativo di solubilizzazione é stato effettuato sciogliendo 0.12 g di pdECM in 2mL di acido acetico, contenente 0.2 mg di pepsina, e lasciando proseguire la digestione per 72 ore.

Digestione 2 Poiché il primo tentativo ha mostrato una resa non ottimale in quanto la soluzione non era omogenea e quindi la polvere non era stata completamente digerita, utilizzando 1.5 mL di acido acetico e quindi 0.15 mg di pepsina, é stata diminuita la quantità di pdECM aggiunta a 0.04 g; la soluzione ottenuta é stata lasciata a temperatura ambiente per 72 ore per permettere la digestione completa.

Digestione 3 Avendo avuto a disposizione la pepsina (Sigma-Aldrich, UK) il protocollo eseguito si riferisce al lavoro condotto da *Martin et al.* [57]. Pertanto, a partire dalla quantit  di polvere di dECM-a di 0.8 gr e di pepsina di 0.08 gr, secondo un rapporto di 1:0.1, il volume di HCl 0.01 M necessario   di 80 mL. Avendo acido cloridrico 1 M, 0.8 mL di quest'ultimo sono stati diluiti in 79,2 mL di acqua distillata per raggiungere il volume di 80 mL adatto a ricoprire la pdECM e pepsina. La soluzione   stata tenuta a temperatura ambiente per 96 ore, agitando periodicamente. Al termine, per interrompere la digestione della pepsina e riportare il pH a valore fisiologico di 7.4, sono state aggiunte gocce di NaOH 10 M tramite la pipetta di Pasteur ed   stato monitorato il variare del pH con un pHmetro. La soluzione   stata conservata a 4 C per evitare la gelificazione, che si verifica a 37 C.

2.5 Preparazione dei biomaterial inks

Prendendo in considerazione le strutture anatomiche di trachea (Figura 2.8(a)) e aorta (Figura 2.8(b)),   stato necessario progettare biomaterial inks adatti a replicare le propriet  chimiche, fisiche e meccaniche dei singoli strati che compongono le due strutture in oggetto.

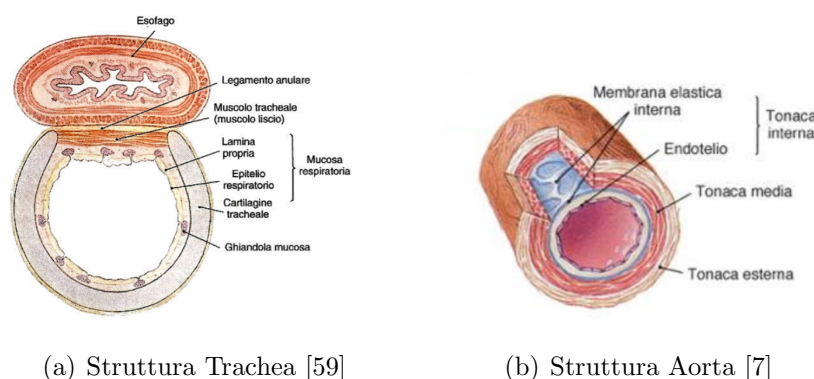


Figura 2.8: Sezioni anatomiche rispettivamente di trachea e aorta.

Viste le buone caratteristiche e l'ampio utilizzo di materiali di stampa a base di alginato e gelatina, questi due sono stati combinati in diverse percentuali ottenendo, cos , diversi bioinchiostri stampabili.

Inizialmente é stato utilizzato solo alginato per testare la sua biostampabilit  con e senza pre-reticolazione e valutare il suo comportamento post-stampa con l'aggiunta o meno di agenti reticolanti. L'alginato (Alginic Acid Sodium Salt, Low Viscosity, MP Biomedicals) al 4% é stato preparato sciogliendone 0.8 g in 20 mL di acqua distillata in costante agitazione per una notte, utilizzando l'agitatore magnetico con riscaldamento (Nahita). A seguito del primo tentativo di stampa con solo alginato, é stato preparato un secondo biomaterial ink a base di alginato al 4% e 60 mM di CaCl_2 , caricato poi nella cartuccia rispettivamente in un rapporto 4:3. Un ulteriore tentativo é stato condotto preparando separatamente alginato al 4%, come descritto precedentemente, e gelatina (Gelatin from bovine skin type B, Sigma-Aldrich) al 10% in acqua distillata, in costante agitazione per circa 15 minuti. Le soluzioni preparate sono state caricate nelle cartucce per la successiva stampa secondo il rapporto di 1:1. In ultimo, con lo scopo di creare una miscela omogenea a base di alginato e gelatina, é stato seguito il protocollo di *Di Giuseppe et al.* [58]: é stata sciolta gelatina all'8% in acqua distillata in continua agitazione a 60°C per circa 15 min e successivamente é stato aggiunto alginato al 7%, mantenendo l'agitazione costante per un'ora e la temperatura intorno a 37°C. Al termine, la soluzione totale é stata divisa equamente in due becker e in ognuno é stata aggiunta la stessa piccola quantit  di colorante. Tutti i materiali sono stati conservati in frigo a 4°. In Figura 2.14 si possono osservare le due cartucce caricate con gelatina e alginato pronte per la stampa.

La seguente Tabella 2.2 riassume i bioinchiostri realizzati:

Biomaterial inks	Composizione
1	4% alginato
2	4% alginato + 60 mM CaCl_2 (4:3)
3	4% aginato + 10% gelatina (1:1)
4	8% gelatina + 7% alginato

Tabella 2.2: Composizione dei quattro biomaterial inks realizzati.

2.6 Progettazione della struttura di trachea e aorta

La fase di pre-processing di stampa ha inizio con la progettazione del modello CAD. É stato utilizzato il software *SolidWorks* della Dassault Systemes, che permette la realizzazione di strutture 2D e 3D attraverso un sistema parametrico e personalizzabile. Tutti i disegni realizzati sono stati salvati sia come parte, in formato SLDPRT, per consentire qualsiasi modifica, sia come file STL, formato riconosciuto dal successivo programma di slicing. Per testare i materiali utilizzati sono state realizzate delle geometrie ben diverse da quelle che riproducono la forma fisiologica di trachea e aorta. Inoltre il dimensionamento dei costrutti in altezza e spessore é stato adattato alla dimensione delle testine di stampa utilizzate e disponibili, quali 0.58 mm (20 G) e 0.41 mm (22 G) corrispondenti al loro diametro. I primi due modelli di prova sono stati la serpentina e la griglia di cui di seguito sono mostrati i modelli CAD in Figura 2.9(a) e Figura 2.9(b) e le dimensioni stabilite a seconda dell'ugello di stampa, in Tabella 2.3.

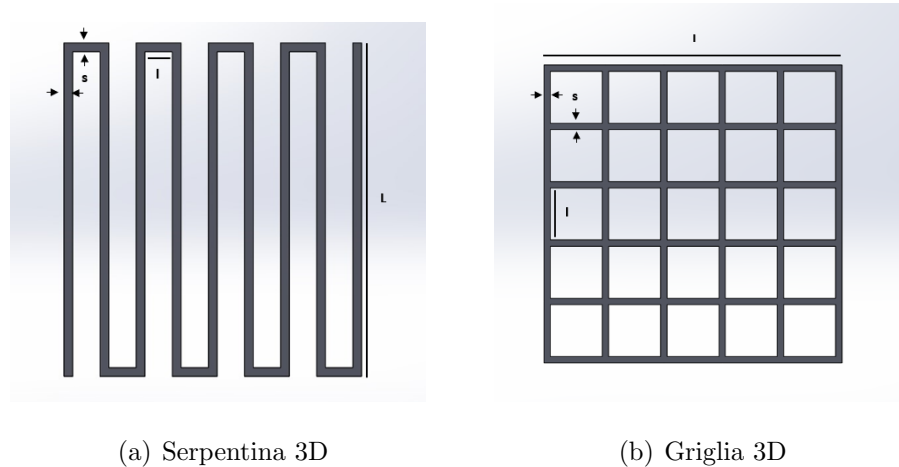
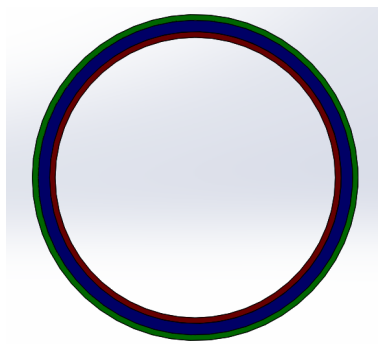


Figura 2.9: Modelli CAD di prova.

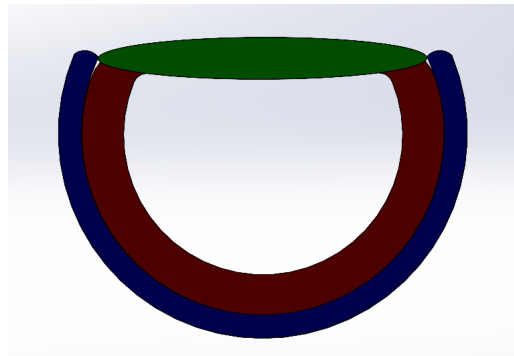
	Serpentina 20 G	Griglia 20 G	Serpentina 22 G	Griglia 22 G
L (mm)	22	19.8	22	18.66
l (mm)	1.8	3.24	1.8	3.24
s (mm)	0.58	0.58	0.41	0.41

Tabella 2.3: Dimensionamento dei modelli di serpentina e griglia per gli ugelli 20 e 22 G.

Per quanto riguarda la progettazione di aorta e trachea i modelli CAD creati si basano sulle loro dimensioni anatomiche: il calibro dell'aorta varia tra 20 e 30 mm con spessore di 2 mm, mentre per la trachea varia tra 20 e 25 mm con spessore di 2 mm. I costrutti sono mostrati in Figura 2.10(a) e Figura 2.10(b).



(a) Modello CAD aorta



(b) Modello CAD trachea

Figura 2.10: Modelli 3D delle strutture oggetto di studio.

Considerando la struttura dell'aorta, lo strato in verde corrisponde alla tonaca avventizia, lo strato in blu più spesso corrisponde alla tonaca media e lo strato in rosso corrisponde alla tonaca intima. Per la trachea, invece, la componente rossa rappresenta il tessuto connettivo, la componente blu rappresenta l'anello cartilagineo e la componente verde rappresenta il tessuto muscolare.

Sono state create quindi le diverse componenti singolarmente, rispettivamente 4 cilindri per l'aorta (un anello per la tonaca avventizia e intima, 2 anelli per la tonaca media) e una

struttura interna (comprendente lo strato di tessuto connettivo e lo strato muscolare) e un anello (corrispondente anello fibrocartilagineo) per la trachea aventi dimensioni dipendenti dal distanziamento n (mm) dato tra le stesse. Tutti i valori, riportati nelle tabelle Tabella 2.4 e Tabella 2.5, sono in mm; inoltre l'altezza di estrusione per ciascuna geometria é stata adattata alle dimensioni dell'ugello 22 G e quindi fissata a 0.41 mm.

Aorta	n=0.5	n=0.7	n=1
Tonaca intima (mm)	$D_i = 20; D_e = 20.82$	$D_i = 20; D_e = 20.82$	$D_i = 20; D_e = 20.82$
Tonaca media 1 (mm)	$D_i = 21.82; D_e = 22.64$	$D_i = 22.22; D_e = 23.04$	$D_i = 22.82; D_e = 23.64$
Tonaca media 2 (mm)	$D_i = 23.64; D_e = 24.46$	$D_i = 24.44; D_e = 25.26$	$D_i = 25.64; D_e = 26.46$
Tonaca avventizia (mm)	$D_i = 25.46; D_e = 26.28$	$D_i = 26.66; D_e = 27.48$	$D_i = 28.46; D_e = 29.28$

Tabella 2.4: Dimensionamento delle componenti dell'aorta.

Trachea	n=0.5	n=0.7	n=1
Struttura interna (mm)	$R_i = 10; R_e = 11$	$R_i = 10; R_e = 11$	$R_i = 10; R_e = 11$
Anello cartilagineo (mm)	$R_i = 11.5; R_e = 11.91$	$R_i = 11.7; R_e = 12.11$	$R_i = 12; R_e = 12.41$

Tabella 2.5: Dimensionamento delle componenti della trachea.

I valori scelti non sono stati casuali ma dipendenti da necessità di stampa al fine di evitare la sovrapposizione dei filamenti estrusi. Le seguenti figure, Figura 2.11(a), Figura 2.11(b) e Figura 2.11(c), mostrano le strutture definitive da stampare.

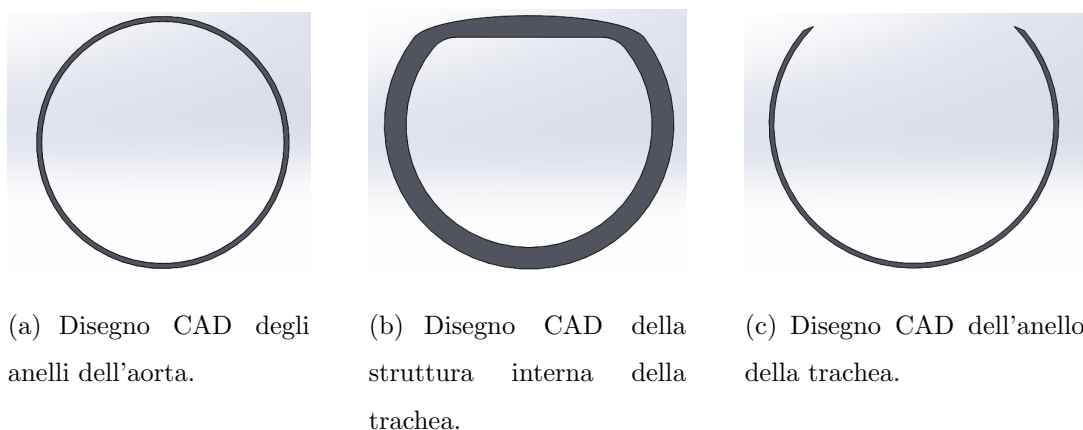


Figura 2.11: Disegni CAD esemplificativi delle strutture di aorta e trachea.

2.7 Slicing del progetto e generazione del g-code

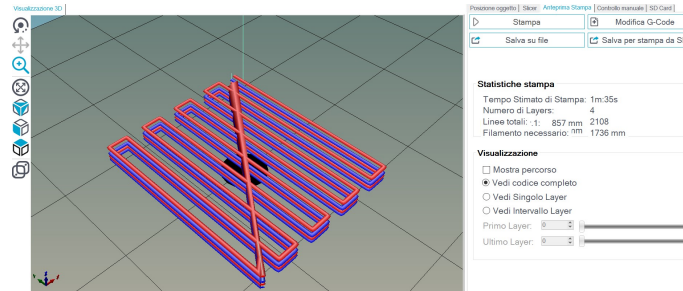
Lo slicing dei costrutti é stato possibile tramite il software *HeartWare* della CELLINK. Il programma richiede i file in formato STL e in uscita restituisce, dopo tutto il procesamiento e la stratificazione del costrutto in base ai parametri imposti, i file in formato G-code. Quest'ultimo é un codice che fornisce le coordinate per permettere il movimento degli estrusori durante la realizzazione del costrutto tridimensionale. É possibile caricare uno o piú file STL in caso di stampa di strutture piú complesse formate da diversi strati, assegnando anche a ciascuno strato l'estrusore desiderato. Si cerca quindi di ricostruire all'interno dell'area di stampa data dal programma l'intera struttura progettata.

Generalmente si inizia caricando i file STL realizzati con *SolidWorks*, che andranno a posizionarsi nell'area di stampa; nella finestra di destra, nella sezione "Posizione oggetto" é possibile lavorare sui disegni andando a posizionarli correttamente, assegnando la giusta cartuccia, trascinando i file uno sull'altro per creare un costrutto complesso, realizzando i diversi strati. Successivamente, sempre nella finestra di destra, nella sezione "Slicer", si settano le impostazioni di stampa con il comando "Configurazione" dove si impostano gli opportuni valori di diametro degli ugelli, il numero di layers massimo, l'infill, la velocità di estrusione, la temperatura, l'altezza del layer e altri parametri utili; sempre nella sezione

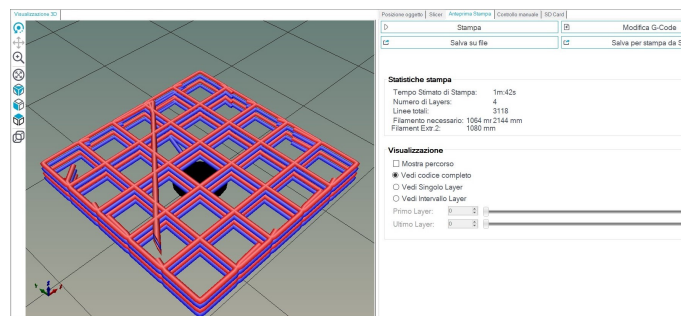
“Slicer” si selezionano la tipologia di stampa e stampante settati, le impostazioni del filamento, l’altezza del layer, la densità e il motivo dell’infill. Completata questa operazione, si procede con lo slicing vero e proprio cliccando sul tasto “Slice con Slic3r”, dal quale, nella sezione “Anteprima di stampa”, si generano il file G-code descrittivo del percorso che gli estrusori compieranno durante la stampa e diverse informazioni come il tempo stimato di stampa, il numero di layers prodotti, le linee totali e la lunghezza del filamento necessario. Inoltre è possibile visualizzare il codice completo e quindi l’intero percorso di stampa o singoli intervalli e layers e modificare manualmente il G-code con il comando “Modifica G-code” se necessario. Se si apportano delle modifiche al codice per garantire una esecuzione di stampa il più perfetta possibile, si possono osservare in tempo reale, nel campo di “Visualizzazione 3D”, le variazioni apportate e quindi il percorso che gli estrusori eseguiranno. Una volta ottenuto lo slicing desiderato, sempre in “Anteprima di stampa” si procede con “Salva su file” per salvare l’oggetto sul file in formato G-code e successivamente si importa nella memoria esterna della stampante CELLINK, da cui poi si selezionerà il costruito da stampare. Nel nostro caso sono stati mantenuti tutti i parametri di default dell’“Impostazioni della stampa”, “Impostazioni della stampante” e “Impostazioni del filamento” rispettivamente su *Organ Simple*, *INKREDIBLE* e *Untitled* come descritto in *Appendice B*. Utilizzando inizialmente ugelli con diametro di 20 G e successivamente di 22 G, gli unici campi impostati a tale valore di diametro sono stati l’altezza del layer e il diametro dei due estrusori nella sezione “Configurazione” e “Impostazioni Stampante”. Nella sezione “Slicer” è stata impostata la densità dell’infill inizialmente al 50% e poi sempre allo 0% per evitare troppo riempimento delle strutture, in quanto il materiale stampato tendeva ad espandersi; mentre per il motivo dell’infill e dell’involucro sono stati scelti quello rettilineo e concentrico, rispettivamente per le strutture di prova e per i costrutti di trachea e aorta.

A seguito della progettazione CAD delle strutture precedentemente descritte, sono stati generati i singoli file G-code. In particolare si è deciso di incrementare la difficoltà di stampa progressivamente, partendo dalla realizzazione di serpentina e griglia a singolo strato, poi

umentando il numero di strati e in ultimo, come mostra la Figura 2.12 (in questo caso per la stampa con ugelli 22 G) associando a ciascuno strato uno dei due estrusori.



(a) Serpentina in Cellink



(b) Griglia in Cellink

Figura 2.12: Sulla sinistra della schermata Cellink é presente l'area di stampa che mostra il costruito da realizzare e il percorso dei due estrusori in blu e rosso; sulla destra sono specificati il tempo di stampa, il numero di layer e altre informazioni utili.

Dalle immagini si nota la presenza di numerosi errori di percorso facilmente removibili. Infatti, per non eliminare punti di coordinate importanti e quindi ostacolare direttamente il percorso degli estrusori, é stato deciso di modificare il codice G-code direttamente sui comandi di apertura e chiusura delle valvole di pressione che consentono la fuoriuscita del materiale di stampa. In particolare, per il primo estrusore si tratta dei comandi M760 e M761, mentre per il secondo M762 e M763, rispettivamente apertura e chiusura delle valvole. Pertanto, le siringhe percorreranno effettivamente quei tratti in eccesso senza estrudere del materiale che potrebbe inficiare sulla resa finale della geometria desiderata. Inoltre per evitare la continua calibrazione in x,y e z degli estrusori al termine di ogni

stampa, necessaria però all'accensione della stampante, è stato modificato l'*end code* in tutti i codici come segue:

```
G90
```

```
M753
```

```
M721
```

```
G0 X0.0 Y0.0
```

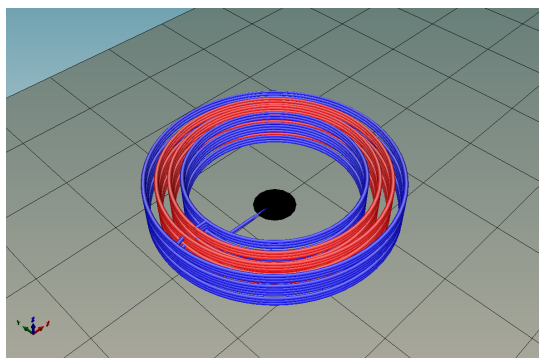
```
M751
```

```
G0 Z50
```

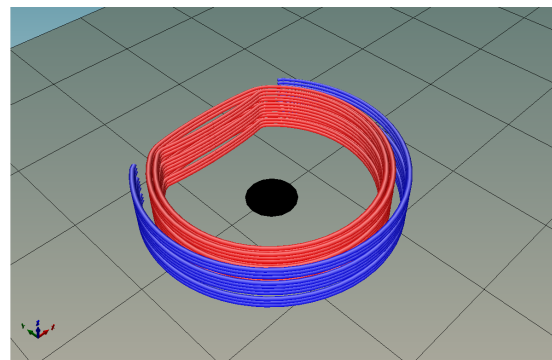
```
M84 ;disable motors
```

```
;END
```

I file in formato STL precedentemente realizzati sono stati caricati nel software *Cellink*. Incrementando la difficoltà progressivamente, si è partiti da strutture da stampare con pochi layers, fino ad arrivare a strutture con 10 layers a ciascun distanziamento pensato e descritto nelle precedenti tabelle Tabella 2.4 e Tabella 2.5, come mostrato in Figura 2.13. In particolare, questo risultato di Slicer riportato prevede un distanziamento tra le componenti di $n=1$ mm.



(a) Slicer dell'aorta a 10 strati.



(b) Slicer della trachea a 10 strati.

Figura 2.13: Risultati dello Slicer dei costrutti di aorta e trachea.

2.8 3D Bioprinting: Inkredible plus

La biostampante presente nel LaBS del Politecnico di Milano, dove sono stati effettuati gli esperimenti, é la INKREDIBLE+ della *Cellink* come mostrato in Figura 2.14. La stampante, che prevede un sistema di microestrusione pneumatica con doppia testina di stampa e sistema integrato di polimerizzazione UV LED, consente la riproduzione tridimensionale di tessuti viventi. Inoltre, offre una serie di vantaggi: una tecnologia a Camera Bianca cioè un ambiente di stampa sterile senza la necessità di una cappa biologica; la presenza di due testine di stampa permette la costruzione di un unico costruito tramite l'estrusione di due materiali differenti potenzialmente combinabili con due diversi tipi cellulari; arrivando ad alte temperature, si può usare un'ampia gamma di materiali; il sistema di reticolazione UV integrato con lunghezze d'onda di 365 nm e 405 nm garantiscono una reticolazione veloce del biomateriale; ha un ingombro ridotto; le testine di stampa hanno alta risoluzione XYZ; é possibile monitorare facilmente il processo di stampa tramite display LCD e regolatori di pressione automatica o tramite computer. La stampante, infatti, può essere utilizzata singolarmente, inserendo la memoria esterna contenente i file delle strutture, o con l'aiuto di un computer.

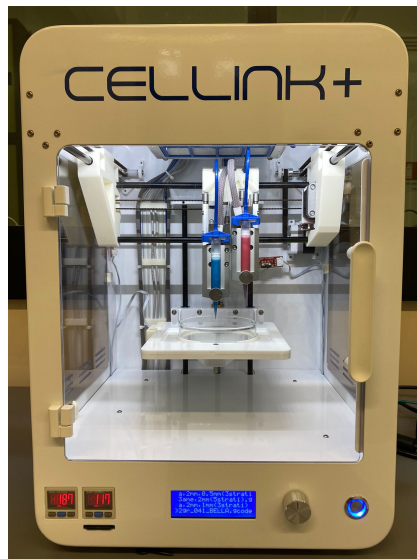


Figura 2.14: Bioprinter INKREDIBLE+.

Entrando piú nel dettaglio delle specifiche della biostampante, le piú importanti sono:

- Temperatura massima della testina di stampa: 130°C;
- Volume di costruzione: 130 * 80 * 100 mm;
- Precisione di posizionamento XY: 10 μm ;
- Precisione di posizionamento Z: 2.5 μm ;
- Risoluzione strato: 100 μm ;
- Campo di viscosità dell'idrogelo: da 0.001 a 250 Pa*s;
- Massima pressione di esercizio: 700 kPa;
- Gamma di pressione impostata: 5-400 kPa;
- Sensibilità: 0.8 kPa;
- Ripetibilità: entro 4 kPa;

- Tempo di risposta della testina di stampa: 5 ms o meno;
- Lunghezza ugello: da 6.35 mm a 38.1 mm;
- Diametro ugello: da 50 a 1540 μm ;
- Pacchetto software: Slic3r, Repetier-Host;
- Tipi di file: STL, OBJ, AMF.

Dopo l'accensione della stampante e del compressore la prima procedura da eseguire é la calibrazione: si inserisce l'attacco dell'aria nella prima siringa e la si posiziona nello spazio apposito, serrando la vite; si prosegue con la calibrazione lungo x e y andando su "Prepare Bioprint" e poi "Home Axes"; si inserisce la piastra Petri e si prosegue con la calibrazione della z prima selezionando "Move z" e muovendo la cartuccia fino quasi a toccare il piattino e poi scegliendo "Calibrate z". Il flusso di estrusione viene impostato manualmente andando su "Prepare Bioprinter" e "Turn ON PH1" e aprendo lateralmente la valvola del primo estrusore: la valvola si gira fin quando non si raggiunge la pressione adeguata alla fuoriuscita continua del filamento.

Se la stampa prevede l'utilizzo di due estrusori si procede con la calibrazione della seconda siringa. Quest'ultima viene posizionata nello spazio apposito collegandola al secondo attacco di aria e si imposta anche qui la pressione sfruttando il comando "Turn ON PH2" e la seconda valvola laterale. Per impostare il corretto offset tra le due siringhe si procede nel modo seguente: si porta il piatto di stampa a $z=0$ e si lascia cadere una goccia dal primo estrusore selezionando rapidamente e consecutivamente i comandi "Turn ON PH1" e "Turn OFF PH1"; nella sezione "Utilities" si spuntano "Raise PH1" e "Lower PH2"; sempre in "Utilities" si seleziona "Move axes" e si sposta il secondo estrusore nelle tre possibili coordinate fino al punto della goccia del primo estrusore rilasciata in precedenza; si salva l'offset con il comando "Advanced Options", "Store PH offset", "Yes".

Inoltre se per alcuni materiali é necessario impostare una determinata temperatura di estrusione, diversa dalla temperatura ambiente di 25°C di default, si selezionano in "Prepare Bio-

print” i comandi “TEMP PH1” e “TEMP PH2”, rispettivamente per le due cartucce. La temperatura può essere solo aumentata e non diminuita, fino ad un massimo di 130°C, e si può verificare il raggiungimento di quest’ultima in “Status Screen”. In caso si superassero i 65°C, andrebbero utilizzate cartucce metalliche.

Per avviare la stampa vera e propria, dopo aver inserito la scheda SDS, si seleziona nel menù “Bioprint” il file G-code di interesse.

La fase di processing é stata condotta a step testando i biomaterial inks precedentemente descritti. Dapprima sono state stampate le strutture di prova di griglia e serpentina utilizzando estrusori a 20 e 22 G con solo alginato, successivamente con alginato e pre-reticolante in rapporto 4:3, in ultimo con le due composizioni di gelatina e alginato. Al termine é stata effettuata una reticolazione post-stampa con CaCl_2 , come mostrano diversi studi presenti in letteratura. In questo caso il cloruro di calcio é stato preparato al 3% in acqua distillata e rilasciato a gocce sul costruito stampato. Verificata la stampabilitá dei biomaterial inks e definita la composizione adeguata di gelatina/alginato, sono state stampate le strutture di aorta e trachea a 4 e 10 layers con distanziamento di 0.5, 0.7 e 1 mm valutando il comportamento dei filamenti estrusi. Un ulteriore miglioramento alla struttura finale é stato eseguito andando ad agire subito dopo la stampa: i costrutti stampati sono stati conservati in frigo a 4°C per circa 10 minuti e successivamente reticolati sempre con CaCl_2 al 3%.

Capitolo 3

Risultati

3.1 Valutazione della decellularizzazione

Una prima considerazione sull'efficacia dei protocolli di decellularizzazione é stata ottenuta dai risultati sulla quantificazione del DNA mediante il kit *QIAGEN*: tutti i dati si riferiscono alla concentrazione di DNA residuo, espresso in $\text{ng}/\mu\text{L}$, presente nei campioni analizzati. Qualitativamente la presenza cellulare e nucleare é osservabile nelle immagini istologiche derivate dalla colorazione dei campioni di trachea e aorta in Ematossilina ed Eosina. Come preannunciato nel *Capitolo 2*, le analisi sono state condotte presso l'Ospedale Maggiore di Milano.

3.1.1 Primo protocollo di decellularizzazione

La tabella Tabella 3.1 mette a confronto i valori di DNA residuo presente nell'aorta nativa e nei campioni alla fine di ciascun ciclo.

Campione	DNA($\text{ng}/\mu\text{L}$)
Nativa	163
I ciclo	55
II ciclo	93
III ciclo	2.5

Tabella 3.1: Risultati della quantificazione del DNA nei campioni di aorta.

I risultati mostrano valori molto bassi di DNA, in particolar modo nel campione del terzo ciclo. Pur sembrando valori molto promettenti, dal confronto con le immagini istologiche é emerso che il contenuto cellulare e quindi di DNA rimane ancora evidente, come mostra la Figura 3.1 di seguito. Pertanto é stato dedotto che l'estrazione degli acidi nucleici non é avvenuta in maniera adeguata trattandosi di tessuto molto fibroso e difficilmente processabile.

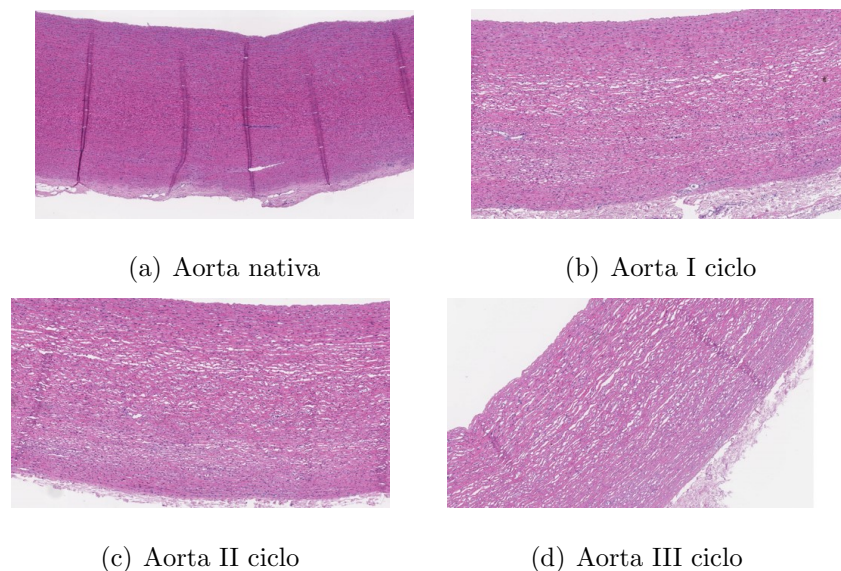


Figura 3.1: Immagini istologiche dei campioni di aorta ottenute dal primo protocollo di decellularizzazione.

Anche per la trachea, di cui sono disponibili i risultati quantitativi dei campioni nativi e

del I ciclo, si riscontra ancora una componente cellulare e nucleare consistente sia con il kit dove, dopo il primo ciclo si sono estratti circa $216 \text{ ng}/\mu\text{L}$ di DNA rispetto ai $268 \text{ ng}/\mu\text{L}$ dei campioni nativi, sia con le immagini istologiche (Figura 3.2).

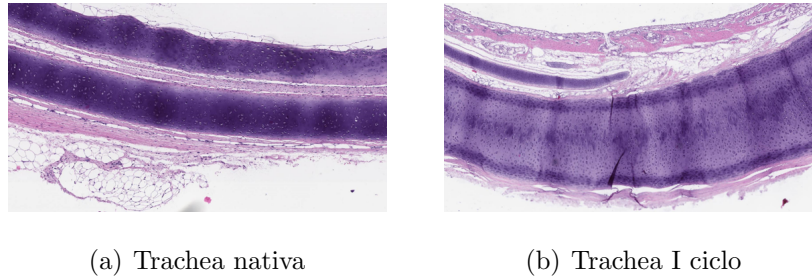


Figura 3.2: Immagini istologiche dei campioni di trachea ottenute dal primo protocollo di decellularizzazione.

In generale, i campioni sottoposti al primo protocollo di decellularizzazione hanno mantenuto una integrità strutturale ma sfortunatamente anche una concentrazione di cellule e di residui di acidi nucleici alta.

3.1.2 Terzo protocollo di decellularizzazione

Per quanto riguarda la quantificazione del DNA, la valutazione è stata effettuata sui campioni di aorta per i quali la concentrazione di DNA al termine dei 4 cicli di decellularizzazione, anche se inferiore al controllo, rimane elevata: $423 \text{ ng}/\mu\text{L}$ vs $614 \text{ ng}/\mu\text{L}$.

L'analisi istologica ha confermato le precedenti valutazioni in quanto si è rilevata una persistenza dei nuclei cellulari soprattutto nella componente connettivale. In particolare, il decellularizzato di aorta mantiene una sostanziale quota di nuclei rispetto al controllo. Nei prelievi tracheali, invece, è stata osservata una sostanziale deplezione nella componente di mucosa, mentre rimane ben conservata la cellularità nel contesto della cartilagine e, in misura più ridotta, nella tonaca muscolare.

3.1.3 Quinto protocollo di decellularizzazione

L'aorta e, curiosamente i controlli, hanno mostrato un DNA molto degradato, ma ancora presente. Infatti, é stata condotta una PCR di controllo di qualità per valutare l'integrità del DNA estratto, soprattutto per i campioni risultati non quantificabili con l'estrazione; questi ultimi hanno mostrato una leggera banda di 100 bps quindi un residuo di DNA a basso peso molecolare, dato molto strano per i campioni di controllo che dovrebbero possedere una quantità nucleare piuttosto elevata. I dati di estrazione, quindi, non sono stati molto affidabili. L'unica quantificazione effettuata é stata della trachea decellularizzata che, al termine di tutti i cicli, presentava invece una concentrazione di DNA di 104 ng/ μ L. L'esame istologico ha mostrato una persistente cellularità nucleata, anche se morfologicamente più degradata rispetto ai controlli.

3.1.4 Sesto protocollo di decellularizzazione

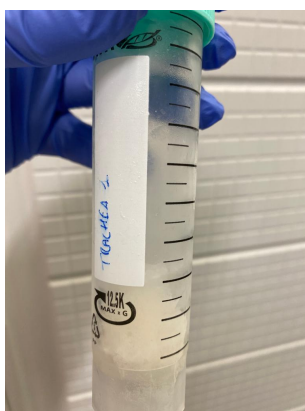
In modo simile al quinto protocollo, i dati relativi ai controlli non sono presenti (anche qui la PCR ha mostrato un quantitativo di DNA a basso peso molecolare) mentre la trachea e l'aorta decellularizzate, al termine di tutti i cicli, presentavano una concentrazione di DNA rispettivamente di 183 ng/ μ L e 143 ng/ μ L. L'esame istologico ha mostrato anche in questo caso una persistente cellularità nucleata, anche se morfologicamente più degradata rispetto ai controlli.

I risultati della decellularizzazione dei campioni ottenuti dal secondo e quarto protocollo non ci sono pervenuti; sono stati comunque condotti gli altri protocolli. In generale, i protocolli di decellularizzazione condotti non hanno dato i risultati sperati. Infatti, il contenuto nucleare e cellulare rimane ancora abbastanza elevato superando i valori limite di DNA di 50 ng/mg di tessuto disidratato, ma confrontando gli ultimi due protocolli effettuati in cui sono stati eseguiti lo stesso numero di cicli e sono state utilizzate

le stesse quantità di acido deossicolico e DNase, l'impiego di CaCl_2 rispetto a MgSO_4 ha dato risultati migliori.

3.2 Risultati della liofilizzazione e della digestione enzimatica

Dalla liofilizzazione sono state ottenute le polveri di matrice extracellulare di aorta e trachea, come mostrato in Figura 3.3. È possibile vedere come a partire da un numero simile di campioni di trachea e aorta di dimensioni comparabili, la resa in polvere della trachea è molto ridotta rispetto all'aorta probabilmente per un minore contenuto di acqua di quest'ultima.



(a) Polvere di dECM di trachea



(b) Polvere di dECM di aorta

Figura 3.3: *pdECM-t* a destra e *pdECM-a* a sinistra.

I campioni liofilizzati sono stati digeriti con pepsina come descritto nel *Capitolo 2* utilizzando la polvere di matrice extracellulare di aorta per gli esperimenti; lo stesso poteva essere effettuato con la *pdECM* della trachea. Le digestioni enzimatiche 1 e 2 non hanno avuto la resa desiderata, come atteso, in quanto la *pdECM* non si è solubilizzata; questo perché la quantità di polvere era elevata. La digestione enzimatica 3, invece, condotta sulla polvere

di dECM ha portato alla formazione di una soluzione abbastanza omogenea al termine delle 96 ore, come mostra la Figura 3.4

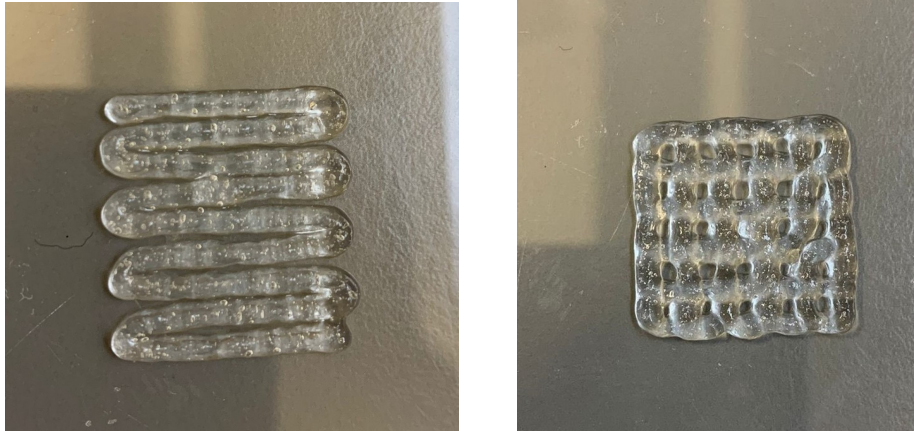


Figura 3.4: Soluzione di pepsina, acido cloridrico e pdECM al termine delle 96 ore.

Un ulteriore miglioramento si potrebbe raggiungere ponendo in costante agitazione la soluzione, così da ridurre il numero di ore necessario a raggiungere lo stesso risultato e una soluzione ancor più omogenea.

3.3 Risultati di stampa 3D

La stampa delle strutture di prova di griglia e serpentina é stata fatta inizialmente con solo alginato con un estrusore di 20 G ma la resa é stata pessima in quanto il biomateriale era troppo liquido stampato a temperatura ambiente o non stampabile a 4°C. Per migliorare la stampabilitá dell'alginato si é aggiunto il pre-reticolante nella cartuccia nel rapporto 4:3 e le strutture sono state stampate con una pressione di 7-10 kPa e subito reticolate con cloruro di calcio per 15 min, come mostrato in Figura 3.5.



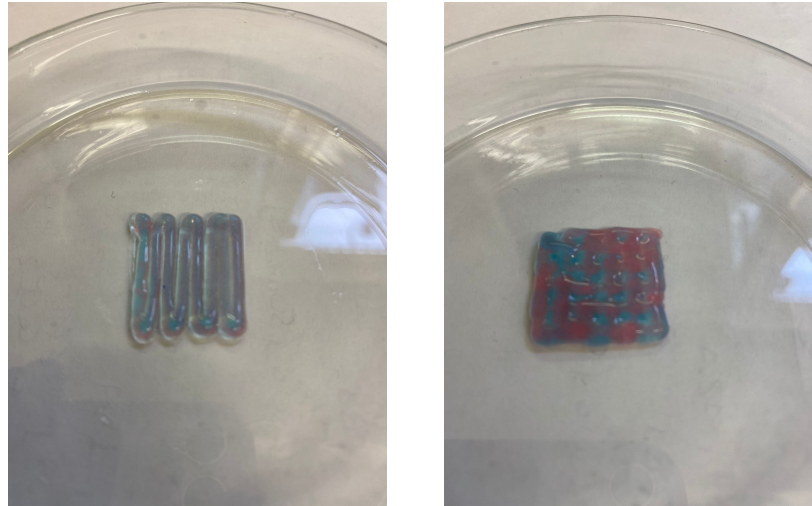
(a) Stampa della serpentina

(b) Stampa della griglia

Figura 3.5: Costrutti stampati a singolo strato con alginato al 4% e pre-reticolante secondo un rapporto 4:3 e utilizzando l'ugello a 20 G.

Dal momento che il filamento stampato risultava troppo spesso e quindi non adatto al mantenimento delle dimensioni delle strutture di trachea e aorta, i successivi tentativi di stampa sono stati condotti utilizzando un ugello di diametro di 0.41 mm. Il diametro ridotto rispetto a 0.58 mm e in particolare il prolungarsi della pre-reticolazione dell'alginato non hanno consentito la stampa a due estrusori dei costrutti di trachea e aorta. Pertanto è stata provata la combinazione di gelatina 10% e alginato 4% in rapporto 1:1 che non ha dato alcun risultato di stampa a causa della forma troppo solida e probabilmente della pressione impostata troppo bassa.

L'ultima combinazione di gelatina 8% e alginato 7% ha dato risultati promettenti con le strutture di prova come mostrato in Figura 3.6.



(a) Stampa serpentina

(b) Stampa griglia

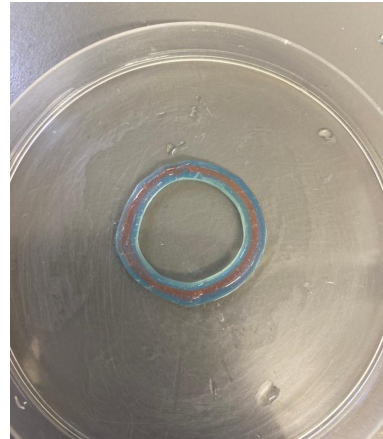
Figura 3.6: Stampa con due estrusori delle strutture di prova di serpentina e griglia.

Da qui in poi, prendendo in considerazione le caratteristiche chimiche dei due biomateriali e sfruttando la letteratura, la soluzione di gelatina e alginato é stata posta in incubatore a 37°C prima della stampa. Inoltre, anche la temperatura degli estrusori é stata aumentata e fissata a 37°C per mantenere il comportamento sol del materiale e quindi garantire la stampabilità. Subito dopo la stampa, é stata eseguita la solita reticolazione al 3% di CaCl_2 per 5 min.

Successivamente sono state stampate le strutture di trachea e aorta inizialmente a 3 strati per le 3 distanze n (0.5, 0.7 e 1 mm) considerate; la pressione delle due cartucce é stata anche in questo caso di circa 100 kPa e le strutture cosí ottenute sono mostrate in figura Figura 3.7, Figura 3.8 e Figura 3.9.

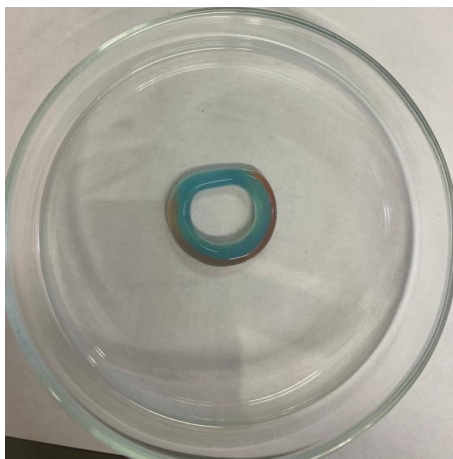


(a) Stampa trachea

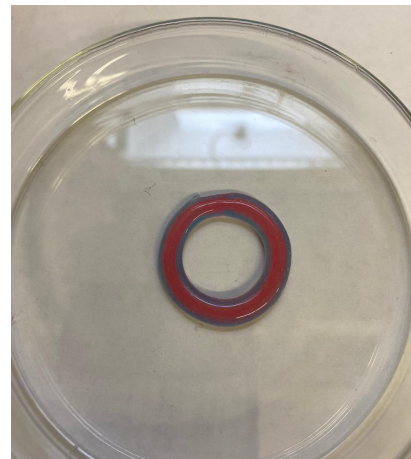


(b) Stampa aorta

Figura 3.7: Stampa di 3 strati di trachea e aorta con due estrusori con $n=0.5$ mm.

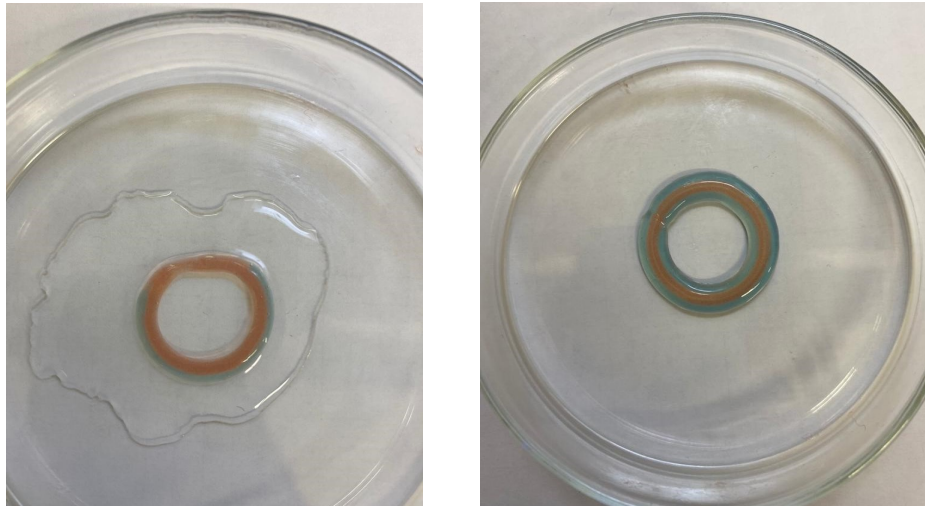


(a) Stampa trachea



(b) Stampa aorta

Figura 3.8: Stampa di 3 strati di trachea e aorta con due estrusori con $n=0.7$ mm.



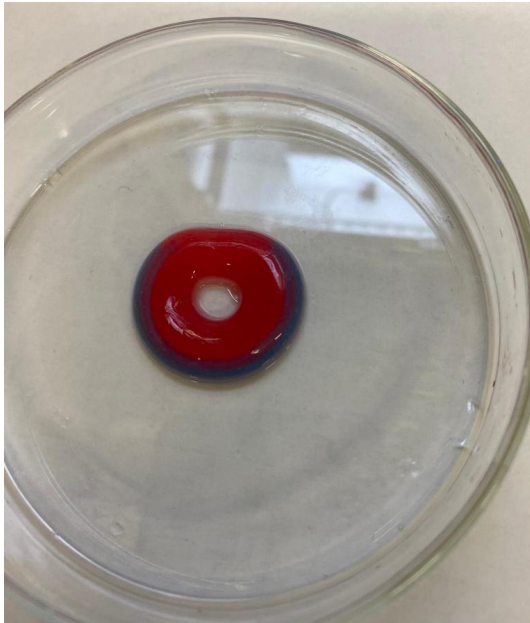
(a) Stampa trachea

(b) Stampa aorta

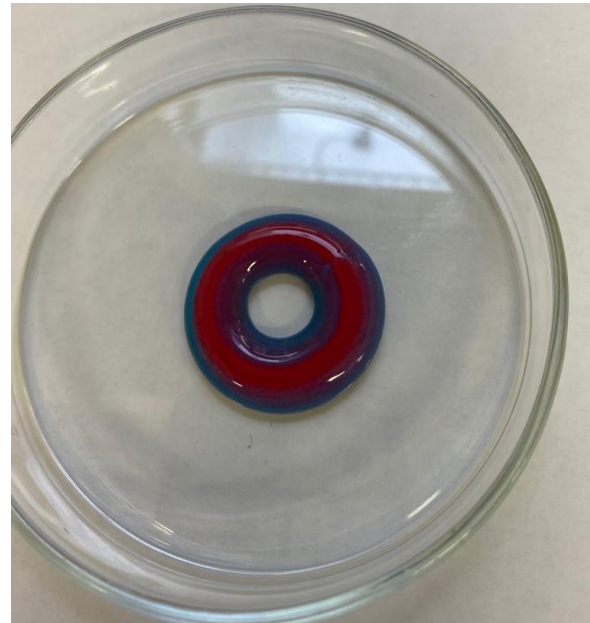
Figura 3.9: Stampa di 3 strati di trachea e aorta con due estrusori con $n=1$ mm.

Il primo risultato visibile dal confronto delle strutture a diversa distanza é nella minore sovrapposizione tra i filamenti blu e rosa aumentando n . Tale sovrapposizione é legata sia alle caratteristiche del filamento e quindi spanciamento e temperatura, ma anche a piccoli errori durante la determinazione dell'offset tra le due cartucce.

Considerando la giusta distanza a $n=1$ mm, sono state stampate le strutture definitive di trachea e aorta a 10 strati. In particolare avendo notato che le strutture mostrate nelle figure Figura 3.7, Figura 3.8 e Figura 3.9 dopo la reticolazione e mantenute a temperatura ambiente mostravano dei rigonfiamenti, i costrutti a 10 strati dopo la stampa sono stati conservati in frigo per circa 10 minuti e poi reticolati con CaCl_2 , visibili in Figura 3.10.



(a) Stampa trachea



(b) Stampa aorta

Figura 3.10: Stampa di 10 strati di trachea e aorta con due estrusori con $n=1$ mm.

Quest'ulteriore step ha evitato la formazione di bolle, dovute probabilmente alla disomogenea reticolazione che il cloruro di calcio consente di ottenere. Si può inoltre pensare che la reticolazione possa essere evitata mantenendo più a lungo il costruito a 4°C o che, aumentando il tempo di post-reticolazione, si possano migliorare le caratteristiche meccaniche.

Dalle figure Figura 3.10(a) e Figura 3.10(b) risulta molto evidente l'aumento dello spessore finale dell'intera struttura che ha determinato la riduzione del diametro interno sia nella trachea che nell'aorta. Questa è diretta conseguenza dell'aumentare del numero degli strati: poiché ogni strato tende a spanciare, con un numero di strati elevato lo spanciamiento finale è più importante rispetto alle strutture precedenti; inoltre il reticolante non riesce ad agire per tutto lo spessore e l'altezza dei prototipi di trachea e aorta.

Conclusione e sviluppi futuri

Per superare e risolvere la problematica della sopracitata “crisi di trapianto” la Medicina Rigenerativa é nata con l’obiettivo di ricercare nuovi approcci, metodi e tecnologie o combinazioni di essi. In questa prospettiva il presente lavoro di tesi ha proposto una sinergia di diverse metodologie innovative quali la decellularizzazione, la liofilizzazione e la stampa 3D per la realizzazione di costrutti tracheali e coronarici. Lo studio é stato condotto in realtà su trachea e aorta per la possibilità di condurre sperimentazioni pressoché identiche grazie alle loro dimensioni simili; le coronarie infatti hanno la problematica della ridotta dimensione (4 mm di diametro e 1 mm di spessore), difficile da gestire soprattutto con la stampa 3D, ma possono essere paragonate all’aorta in termini di struttura e componenti tissutali e cellulari. L’idea, seppur piú difficile, sarebbe quella di trasferire e implementare i risultati ottenuti per l’aorta alle arterie coronarie.

I diversi protocolli di decellularizzazione eseguiti mostrano come non sia facile ed immediata la scelta di un procedimento che consenta di rispondere ai criteri e ai parametri limite affinché si ottenga un tessuto adeguatamente decellularizzato. Infatti, in tutti i sei protocolli le analisi quantitative e qualitative hanno mostrato contenuti importanti di DNA e cellule. Come preannunciato nel *Capitolo 3* il protocollo di *E. Zambaiti et al.* [56] ha fornito risultati migliori, ma non ancora sufficienti a ritenere la decellularizzazione adeguata. Pertanto potrebbe essere utile incrementare il numero di cicli a cui sottoporre i campioni o la formulazione di un nuovo e opportuno protocollo per la corretta decellularizzazione di trachea e aorta porcine. Inoltre, proseguendo con i processi di liofilizzazione, solubilizzazione e stampa 3D continua ad essere fondamentale la ricerca di un metodo e di una procedura

il piú efficace possibile.

A seguito di un'attenta ricerca di letteratura e di esperimenti é stata poi raggiunta la giusta composizione di gelatina ed alginato che ha consentito la stampa dei costrutti realizzati tramite il software *SolidWorks*.

Solo con perseveranza nell'esperienza sperimentale sono stati raggiunti alcuni risultati ancora del tutto preliminari. Difatti, per problematiche tecniche e di tempo non é stato possibile terminare il lavoro iniziato. Portando avanti il progetto sará possibile migliorare e implementare i costrutti di interesse. In primo luogo a partire da una polvere adagualmente liofilizzata, questa potrà essere combinata con la soluzione di gelatina e alginato scelta, seguendo diversi rapporti. Per meglio rendere la differenza fra le componenti che costituiscono i costrutti di trachea e aorta presentate nel *Capitolo 2*, si potrebbe caricare una percentuale di polvere di matrice extracellulare solubilizzata diversa fra le due cartucce: ad esempio, l'anello cartilagineo della trachea, essendo piú rigido rispetto al resto della struttura potrebbe essere stampato utilizzando una cartuccia con maggior concentrazione di gelatina/alginato, mentre l'impalcatura portante interna potrebbe contenere una maggiore quantità di pdECM liofilizzata in quanto deve garantire una determinata flessibilità e quindi piegamento della trachea; lo stesso per l'aorta, dove si potrebbe variare la % delle due componenti in base alla tonaca considerata. Uno studio approfondito sui singoli biomateriali o miscele, sul loro comportamento fisico, sulla viscosità e sulla loro migliore stampabilità potrebbe essere fatto con prove reologiche: queste aiuterebbero a definire le giuste composizioni e i giusti parametri di processamento. Sviluppatisi i costrutti, risulterà necessario e opportuno caratterizzarli in termini di prove meccaniche, come prove di compressione assiale o di trazione. In particolare, si potrebbe valutare il comportamento dei costrutti in corrispondenza dei valori di pressione a cui, in vivo, l'aorta e la trachea sono sottoposte: nel caso dell'aorta si fa riferimento alla pressione arteriosa sistolica (110-140 mmHg) e alla pressione arteriosa diastolica (70-90 mmHg); per la trachea si fa riferimento alla pressione dell'aria durante la respirazione (760 mmHg). Oppure si potrebbe valutare lo sforzo e la deformazione a rottura in direzione longitudinale e assiale. Altra caratteriz-

zazione importante da effettuare potrebbe essere la prova di degradazione dei costrutti in PBS o in diversi terreni di coltura. Si potrebbe pensare che, aumentando la concentrazione del reticolante e il tempo di azione sul materiale, possano migliorare le prestazioni in termini di mantenimento di forma, rigidità e degradazione. Proprio per il mantenimento della forma e quindi delle dimensioni native dei costrutti stampati, soprattutto nel caso di molti strati come visto in Figura 3.10, si potrebbe implementare la metodologia testata inglobando all'interno dei vari biomaterial inks un fotoinziatore da attivare con la luce UV, presente nella stampante INKREDIBLE+, o un reticolante ad azione tardiva che, a differenza del cloruro di calcio, permette una reticolazione omogenea e può essere incorporato prima della stampa senza bloccare gli ugelli. I reticolanti appena descritti risulterebbero molto promettenti per le coronarie, dove la problematica delle dimensioni è più stringente, in quanto si riuscirebbero a stampare porzioni con un diametro molto piccolo mantenendo aperta la cavità centrale.

Ottimizzati i prototipi e raggiunte le caratteristiche funzionali, in linea con quelle fisiologiche, l'ultimo step potrebbe essere la semina cellulare post-stampa o meglio l'incorporazione delle cellule nei biomaterial inks, adeguate alle diverse componenti tissutali, ottenendo così i bioinks. In particolare, avendo a disposizione solo due cartucce di stampa si potrebbero utilizzare MSC: per quanto riguarda l'anello cartilagineo della trachea e lo strato di media delle arterie coronarie potrebbe essere efficace differenziare le MSC prima della stampa rispettivamente in condrociti e cellule muscolari; mentre per la struttura interna della trachea e per la tonaca intima e avventizia delle coronarie si potrebbe lasciare differenziare le cellule in terreno di coltura idoneo, attraverso un condizionamento statico o dinamico. Questo potrebbe essere utile a riprodurre l'ambiente fisiologico e quindi a garantire anche l'adesione e la proliferazione cellulare.

Se dovessero essere soddisfatti i requisiti di *Good Laboratory Practise* and *Good Manufacturing Practise*, si potrebbe proseguire la sperimentazione in vivo su modelli animali, dapprima attraverso l'impianto dei costrutti a livello sottocutaneo e successivamente in situ; qualora i risultati fossero soddisfacenti si potrebbe continuare lo studio sull'uomo,

iniziando la fase clinica e raggiungendo così un buon traguardo nel campo della Medicina Rigenerativa.

Appendice A:

Protocollo di analisi dei campioni decellularizzati

Il protocollo utilizzato dal Dr. Giorgio Croci presso il Policlinico di Milano per la valutazione quantitativa del DNA si basa sul *Genra Puregene Tissue Kit*, ideale per la purificazione del DNA genomico fresco o solido congelato. A seconda che si tratti di tessuto fra 5 e 10 mg (t1) o fra 50 e 100 mg (t2), l'intero protocollo utilizza quantità differenti dei reagenti:

1. Macinare il tessuto congelato con mortaio e pestello;
2. Dispensare 300 μL (t1) o 3 mL (t2) di soluzione di lisi cellulare in un tritratore da 1.5 mL (t1) o da 15 mL (t2) su ghiaccio e aggiungere il tessuto macinato precedentemente;
3. Scaldare a 65° per 15-60 min
4. Se é richiesta la resa massima aggiungere 1.5 μL (t1) o 15 μL (t2) di Puregene Proteinase K, mescolare capovolgendo la provetta 25 volte e incubare a 55° per 3 ore o fin quando il tessuto non é completamente lisato;
5. Capovolgere periodicamente la provetta durante l'incubazione;
6. Aggiungere 1.5 μL (t1) o 15 μL (t2) di soluzione di RNasi A e mescolare il campione, capovolgendo 25 volte;

7. Incubare a 37° per 15-60 min;
8. Incubare per 1 min (t1) o 3 min (t2) in ghiaccio per raffreddare rapidamente il campione;
9. Aggiungere 100 μL (t1) o 1 mL (t2) di soluzione di precipitazione proteica e agitare vigorosamente per 20 s ad alta velocità;
10. Centrifugare per 3 min a 13000-16000 x g (t1) o per 10 min a 2000 x g (t2) per la formazione del pellet proteico (se il pellet proteico non è stretto, incubare in ghiaccio per 5 min e ripetere la centrifugazione);
11. Pipettare 300 μL (t1) o 3 mL (t2) di isopropanolo in una provetta per microcentrifuga da 1.5 mL (t1) o da 15 mL (t2) e aggiungere il surnatante del passaggio precedente (se si prevede che la resa del DNA sia bassa, minore di 1 μg , aggiungere 0.5 μL di soluzione di glicogeneo);
12. Mescolare capovolgendo delicatamente 50 volte;
13. Centrifugare per 1 min a 13000-16000 x g (t1) o per 3 min a 2000 x g (t2);
14. Eliminare con delicatezza il surnatante e drenare il tubo capovolgendolo su un pezzo pulito di carta assorbente, assicurandosi che il pellet rimanga nel tubo;
15. Aggiungere 300 μL (t1) o 3 mL (t2) di etanolo al 70% e capovolgere più volte per lavare;
16. Centrifugare per 1 min a 13000-16000 x g (t1) o per 1 min a 2000 x g (t2);
17. Eliminare con cura il surnatante e lasciare nel tubo il pellet;
18. Lasciare asciugare all'aria per 5 min (t1) o per 5-10 min (t2);
19. Aggiungere 100 μL (t1) o 400 μL (t2) di soluzione di idratazione del DNA e vortexare per 5 s a media velocità;

20. Incubare a 65° per 1 ora per dissolvere il DNA;
21. Incubare a temperatura ambiente per una notte agitando delicatamente.
22. Centrifugare brevemente i campioni e trasferirli in un tubo di stoccaggio.

L'analisi istologica del risultato dei protocolli di decellularizzazione prevede la colorazione con *Ematossilina ed Eosina* sia dei campioni nativi sia dei campioni alla fine di ciascun ciclo. Il procollo segue i seguenti passaggi:

- I campioni sono posti in paraffina e, adesi su vetrini, sono deparaffinati e reidratati;
- Ogni sezione viene trattata con il primo colorante, l' Ematossilina, responsabile della colorazione violetta dei componenti cellulari carichi negativamente come acidi nucleici, proteine di membrana, membrane cellulari ed elastina, per 2-10 min;
- Risciacquo in acqua di fonte per 5-10 min che, essendo leggermente alcalina, consente il viraggio di colore dei nuclei da viola ad azzurro;
- Lavaggio in dH₂O per eliminare i residui di sale dell'acqua corrente;
- Le sezioni sono immerse in Eosina, secondo colorante utilizzato per colorare il citoplasma delle cellule, per 30-60 s;
- Risciacquo in dH₂O;
- I vetrini vengono disidratati;
- I vetrini sono montati, interposta una goccia di resina naturale, con un vetrino coprioggetto e osservati al microscopio ottico.

Questa colorazione permette, mediante microscopio, l'osservazione dell'aspetto morfologico del campione e l'identificazione delle diverse componenti cellulari. Specificatamente i nuclei

possono variare dal blu scuro al viola scuro; il citoplasma, le sostanze intercellulari e le fibre muscolari appaiono rosa-rosso; i fluidi presenti nei tessuti o negli spazi interstiziali sono per lo piú bianchi; i grassi e i lipidi non si colorano.

Appendice B:

Impostazioni di stampa, stampante e filamento

- Impostazioni di stampa: Organ Simple

avoid_crossing_perimeters = 1

bottom_solid_layers = 0

bridge_acceleration = 0

bridge_flow_ratio = 1

bridge_speed = 10

brim_width = 0

complete_objects = 0

default_acceleration = 0

dont_support_bridges = 0

external_fill_pattern = rectilinear

external_perimeter_

extrusion_width = 0

external_perimeter_speed = 100%

external_perimeters_first = 0

extra_perimeters = 1

extruder_clearance_height = 20

extruder_clearance_radius = 20

extrusion_width = 0

fill_angle = 90

fill_density = 50%

fill_pattern = rectilinear

first_layer_acceleration = 0

first_layer_extrusion_width = 100%

first_layer_height = 0.4

first_layer_speed = 100%

gap_fill_speed = 10

gcode_comments = 1

infill_acceleration = 0

```
infill_every_layers = 1
infill_extruder = 1
infill_extrusion_width = 0
infill_first = 0
infill_only_where_needed = 0
infill_overlap = 50
infill_speed = 10
interface_shells = 0
layer_height = 0.4
max_print_speed = 20
max_volumetric_speed = 0
min_skirt_length = 0
notes =
only_retract_when_crossing_perimeters = 0
ooze_prevention = 0
output_filename_format =
[input_filename_base].gcode
overhangs = 1
perimeter_acceleration = 0
perimeter_extruder = 1
perimeter_extrusion_width = 0
perimeter_speed = 10
perimeters = 1
post_process = /Users/Hector/
Documents/Slic3r/postprocessor.py
raft_layers = 0
resolution = 0
seam_position = nearest
skirt_distance = 6
skirt_height = 1
skirts = 0
small_perimeter_speed = 10
solid_infill_below_area = 0
solid_infill_every_layers = 0
solid_infill_extruder = 1
solid_infill_extrusion_width = 0
solid_infill_speed = 10
spiral_vase = 0
standby_temperature_delta = -5
support_material = 0
support_material_angle = 0
support_material_contact_distance = 0
support_material_enforce_layers = 4
support_material_extruder = 1
support_material_extrusion_width = 0
support_material_interface_extruder = 1
support_material_interface_layers = 3
support_material_interface_spacing = 0
support_material_interface_speed = 100%
support_material_pattern =
rectilinear - grid
support_material_spacing = 0.5
support_material_speed = 60
```

```

support_material_threshold = 90
thin_walls = 1
threads = 2
top_infill_extrusion_width = 0

```

```

top_solid_infill_speed = 10
top_solid_layers = 0
travel_speed = 80
xy_size_compensation = 0

```

- Impostazioni stampante: Inkredible

```

bed_shape =
-62x-42,66x-42,
66x43,-62x43
before_layer_gcode =
end_gcode =
G0 Z50;
M84 ;disable motors;
END
extruder_offset = 0x0,0x0,0x0
gcode_flavor = reprap
layer_gcode =
nozzle_diameter =
0.45,0.5,0.5
octoprint_apikey =
octoprint_host =
pressure_advance = 0
retract_before_travel = 2,2,2

```

```

retract_layer_change = 0,0,0
retract_length = 2,2,2
retract_length_toolchange =
10,10,10
retract_lift = 0,0,0
retract_restart_extra = 0,0,0
retract_restart_extra_toolchange = 0,0,0
retract_speed = 40,40,40
start_gcode = M760
toolchange_gcode =
use_firmware_retraction = 0
use_relative_e_distances = 1
use_volumetric_e = 0
vibration_limit = 0
wipe = 0,0,0
z_offset = 0

```

- Impostazioni del filamento: Untitled

```

bed_temperature = 0
bridge_fan_speed = 100

```

```

cooling = 1
disable_fan_first_layers = 3

```

```
extrusion_multiplier = 1
fan_always_on = 0
fan_below_layer_time = 60
filament_colour = #FFFFFF
filament_diameter = 3
first_layer_bed_temperature = 0
first_layer_temperature = 0
max_fan_speed = 100
min_fan_speed = 35
min_print_speed = 10
slowdown_below_layer_time = 5
temperature = 0
```


Appendice C:

G-code

In questa appendice sono riportati parzialmente i G-Code dei costrutti di aorta e trachea a 4 layers. Sono state mantenute le righe di codice che consentono il passaggio da un layer all'altro e lo scambio tra il primo e secondo estrusore, eliminando tutte le righe centrali per motivi di lunghezza.

- AORTA

```
; external perimeters extrusion width = 0.41mm ; solid infill extrusion width = 0.43mm
; top infill extrusion width = 0.43mm
; perimeters extrusion width = 0.43mm ; support material extrusion width = 0.41mm
;infill extrusion width = 0.43mm
; solid infill extrusion width = 0.43mm G21 ; set units to millimeters
; top infill extrusion width = 0.43mm G90 ; use absolute coordinates
; support material extrusion width = 0.41mm M83 ; use relative distances for extrusion
T0 ; change extruder
; external perimeters extrusion width = 0.41mm G1 Z0.410 F4800.000 ; move to next layer
(0)
; perimeters extrusion width = 0.43mm G1 E-2.00000 F2400.00000 ; retract
; infill extrusion width = 0.43mm G1 X-3.50375 Y0.1 E1
```

G1 X-7.0075 Y0.2 E1	ter
G1 X-10.51125 Y0.3 E1	G1 X-13.4255 Y-3.651 E1
G1 X-14.015 Y0.400 F4800.000 ; move to first perimeter point	G1 X-13.312 Y-4.038 E0.01507 ; perime- ter
G4 P0	G1 X-13.2 Y-4.3585 E1
G1 X-1.751875 Y0.05 E1	G1 X-13.088 Y-4.679 E0.01268 ; perime- ter
G1 X-3.50375 Y0.1 E1	G1 X-12.93 Y-5.0635 E1
G1 X-5.255625 Y0.15 E1	G1 X-12.772 Y-5.448 E0.01553 ; perime- ter
G1 X-7.0075 Y0.2 E1	G1 X-12.6325 Y-5.7435 E1
G1 X-8.759375 Y0.25 E1	G1 X-12.493 Y-6.039 E0.01222 ; perime- ter
G1 X-10.51125 Y0.3 E1	G1 X-12.2905 Y-6.4165 E1
G1 X-12.263125 Y0.35 E1	.
G1 E2.00000 F2400.00000 ; unretract	.
G1 X-14.0055 Y0.0335 E1	.
M760	G1 X-13.996 Y-0.333 E0.01368 F600.000 ; perimeter
G1 X-13.9665 Y-0.7105 E1	G1 X-8.712 Y4.970 E0.01125 ; perimeter
G1 X-13.937 Y-1.088 E0.01415 ; perime- ter	G1 X-8.910 Y4.548 E0.00870 ; perimeter
G1 X-13.89 Y-1.449 E1	G1 X-9.021 Y4.2775 E1
G1 X-13.843 Y-1.810 E0.01360 ; perime- ter	G1 X-9.132 Y4.007 E0.01092 ; perimeter
G1 X-13.7725 Y-2.1945 E1	G1 X-9.292 Y3.551 E0.00902 ; perimeter
G1 X-13.702 Y-2.579 E0.01461 ; perime- ter	G1 X-9.372 Y3.279 E1
G1 X-13.6205 Y-2.9215 E1	G1 X-9.452 Y3.007 E0.01060 ; perimeter
G1 X-13.539 Y-3.264 E0.01314 ; perime-	G1 X-9.5095 Y2.7635 E1
	G1 X-9.567 Y2.520 E0.00935 ; perimeter
	G1 X-9.6165 Y2.2495 E1
	G1 X-9.666 Y1.979 E0.01027 ; perimeter

G1 X-9.6995 Y1.7225 E1	G1 X-12.5625 Y-0.6 E1
G1 X-9.733 Y1.466 E0.00968 ; perimeter	G1 X-12.536 Y-0.940 E0.01274 ; perime-
G1 X-9.7535 Y1.2005 E1	ter
G1 X-9.774 Y0.935 E0.00994 ; perimeter	G1 X-12.4935 Y-1.2665 E1
G1 X-9.781 Y0.6675 E1	G1 X-12.451 Y-1.593 E0.01229 ; perime-
G1 X-9.748 Y-0.600 E0.01000 ; perimeter	ter
M761	G1 X-12.3875 Y-1.9395 E1
G1 E-10.00000 F2400.00000 ; retract for	G1 X-12.324 Y-2.286 E0.01316 ; perime-
toolchange	ter
M753	G1 X-12.2505 Y-2.5955 E1
M712	G1 X-12.177 Y-2.905 E0.01188 ; perime-
G1 X-9.788 Y0.4 Z0.41	ter
M752	G1 X-12.0745 Y-3.2535 E1
T1 ; change extruder	.
G1 E-2.00000 F2400.00000 ; retract	.
G1 X-11.999 Y0.028 E1	.
G1 X-14.210 Y-0.344 F4800.000 ; move to	G1 X-10.451 Y4.504 E0.01246 ; perimeter
first perimeter point	G1 X-10.5415 Y4.2455 E1
G1 X-14.210 Y-0.344 F4800.000 ; move to	G1 X-10.632 Y3.987 E0.01024 ; perimeter
first perimeter point	G1 X-10.723 Y3.6765 E1
G1 X-12.606 Y0.400 F4800.000 ; move to	G1 X-10.814 Y3.366 E0.01209 ; perimeter
first perimeter point	G1 X-10.8795 Y3.0895 E1
G4 P0	G1 X-10.945 Y2.813 E0.01061 ; perimeter
G1 E2.00000 F2400.00000 ; unretract	G1 X-11.0015 Y2.5045 E1
M762	G1 X-11.058 Y2.196 E0.01172 ; perimeter
G1 X-12.5975 Y0.07 E1	G1 X-11.096 Y1.9045 E1
G1 X-12.589 Y-0.260 E0.01233 F600.000	G1 X-11.134 Y1.613 E0.01098 ; perimeter
; perimeter	G1 X-11.1575 Y1.3105 E1


```

G1 X-11.181 Y1.008 E0.01134 ; perimeter .
G1 X-11.189 Y0.704 E1 .
G1 X-11.157 Y-0.400 E0.01136 ; perime- .
ter
G1 X-10.945 Y2.813 E0.01129 ; perimeter
M763 G1 X-11.002 Y2.5045 E1
G1 Z0.820 F4800.000 ; move to next layer G1 X-11.059 Y2.196 E0.01246 ; perimeter
(1) G1 X-11.092 Y1.941 E1
G1 X-12.606 Y0.400 F4800.000 ; move to G1 X-11.125 Y1.686 E0.01022 ; perimeter
first perimeter point G1 X-11.1525 Y1.3465 E1
G4 P0 G1 X-11.180 Y1.007 E0.01353 ; perimeter
M762 G1 X-11.1885 Y0.7035 E1
G1 X-12.5975 Y0.07 E1 G1 X-11.197 Y-0.400 E0.01208 ; perime-
G1 X-12.589 Y-0.260 E0.01311 F600.000 ter
; perimeter M763
G1 X-12.5625 Y-0.6 E1 G1 E-2.00000 F2400.00000 ; retract
G1 X-12.536 Y-0.940 E0.01356 ; perime- .
ter .
G1 X-12.4935 Y-1.2665 E1 .
G1 X-12.451 Y-1.593 E0.01308 ; perime- G90
ter M753
G1 X-12.3875 Y-1.9395 E1 M721
G1 X-12.324 Y-2.286 E0.01400 ; perime- G0 X0.0 Y0.0
ter M751
G1 X-12.2505 Y-2.5955 E1 G0 Z50
G1 X-12.177 Y-2.905 E0.01263 ; perime- M84 ;disable motors
ter ;END
G1 X-12.0745 Y-3.2535 E1

```

- TRACHEA

```

; external perimeters extrusion width = T1 ; change extruder
0.41mm G1 E-2.00000 F2400.00000 ; retract
; perimeters extrusion width = 0.43mm G1 X-0.165 Y3.7645 E1
; infill extrusion width = 0.43mm G1 X-0.330 Y7.529 F4800.000 ; move to
; solid infill extrusion width = 0.43mm first perimeter point
; top infill extrusion width = 0.43mm G4 P0
; support material extrusion width = G1 X-0.0825 Y1.88225 E1
0.41mm G1 X-0.165 Y3.7645 E1
; external perimeters extrusion width = G1 X-0.2475 Y5.64675 E1
0.41mm G1 E2.00000 F2400.00000 ; unretract
; perimeters extrusion width = 0.43mm G1 X-0.777 Y7.538333333333 E1
; infill extrusion width = 0.43mm M762
; solid infill extrusion width = 0.43mm G1 X-1.224 Y7.547666666667 E1
; top infill extrusion width = 0.43mm G1 X-1.671 Y7.557 E0.02505 F600.000 ;
; support material extrusion width = perimeter
0.41mm G1 X-2.099666666667 Y7.577 E1
G21 ; set units to millimeters G1 X-2.528333333333 Y7.597 E1
G90 ; use absolute coordinates G1 X-2.957 Y7.617 E0.02405 ; perimeter
M83 ; use relative distances for extrusion G1 X-3.341 Y7.64975 E1
T0 ; change extruder G1 X-3.725 Y7.6825 E1
G1 Z0.410 F4800.000 ; move to next layer G1 X-4.109 Y7.71525 E1
(0) G1 X-4.493 Y7.748 E0.02879 ; perimeter
G1 E-10.00000 F2400.00000 ; retract for .
toolchange .
M753 .
M712 G1 X1.65475 Y9.085 E1
G1 X0.0 Y0.0 Z0.41 G1 X1.2245 Y9.095 E1
M752 G1 X0.79425 Y9.105 E1

```

G1 X0.064 Y9.115 E0.03215 ; perimeter M763	G1 X-9.444 Y7.736 E0.01066 F600.000 ; perimeter
G1 E-10.00000 F2400.00000 ; retract for toolchange M753 M721	G1 X-9.686 Y7.438 E0.00718 ; perimeter G1 X-9.9155 Y7.126 E1 G1 X-10.145 Y6.814 E0.01447 ; perimeter G1 X-10.411 Y6.409 E0.00905 ; perimeter G1 X-10.5935 Y6.0985 E1
G1 X0.364 Y9.115 Z0.41 M751	.
T0 ; change extruder	.
G1 X-1.8205 Y9.134 E1	.
G1 X-4.005 Y9.153 F4800.000 ; move to first perimeter point	G1 X10.220 Y6.426 E0.01470 ; perimeter G1 X9.965 Y6.814 E0.00923 ; perimeter
G1 X-6.745 Y10.008 F4800.000 ; move to first perimeter point	G1 X9.7355 Y7.126 E1 G1 X9.506 Y7.438 E0.01539 ; perimeter
G1 X-8.036 Y9.695 F4800.000 ; move to first perimeter point	G1 X9.264 Y7.736 E0.00764 ; perimeter G1 X9.031 Y7.9015 E1
G1 X-8.055 Y8.570 F4800.000 ; move to first perimeter point	G1 X8.798 Y8.067 E0.01134 ; perimeter M761
G1 X-8.354 Y7.895 F4800.000 ; move to first perimeter point	G1 E-2.00000 F2400.00000 ; retract G90
G1 X-8.737 Y8.228 F4800.000 ; move to first perimeter point	M753 M721
G1 X-8.978 Y8.067 F4800.000 ; move to first perimeter point	G0 X0.0 Y0.0 M751
G4 P0	G0 Z50
G1 E10.00000 F2400.00000 ; unretract M760	M84 ;disable motors ;END
G1 X-9.211 Y7.9015 E1	

Bibliografia

- [1] (2009). *Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa*. R. PIETRABISSA
- [2] (2021). *Sistema Informativo Trapianti/Liste d'attesa*. MINISTERO DELLA SALUTE
- [3] (2020). *I trapianti e il COVID*. A.I.D.O.
- [4] (2013). *Applicazioni Innovative dell'Ingegneria Biomedica*. L. MANCUSO
- [5] (2016). *In vitro characterization of design and compressive properties of 3D-biofabricated/decellularized hybrid grafts for tracheal tissue engineering*. C. JOHNSON, P. SHESHADRI, J. M.KETCHUM, L. K.NARAYANAN,P. M.WEINBERGER, R. A. SHIRWAIKER
- [6] *Enciclopedia/Trachea*. HUMANITAS
- [7] (2003). *Anatomia Umana*. F.H.MARTINI,M.J. TIMMONS, R.B.TALLITSCH
- [8] *Patologia tracheale*. GASTROEPATO
- [9] (2020). *Trachea e COVID-19: in Humanitas un team multidisciplinare dedicato*. HUMANITAS
- [10] (2015). *Chirurgia della trachea: Tecnica e Risultati*. B. BILIOTTI
- [11] *Chirurgia delle vie aeree superiori (laringe e trachea)*. PROF. S. MATTIOLI

- [12] *Tracheostomia chirurgica, Storia della chirurgia della trachea* A. MONETA
- [13] (2018). *Tracheal replacement*. H. ETIENNE, D. FABRE, A. G. CARO, F. KOLB, S. MUSSOT, O. MERCIER, D. MITILIAN, F. STEPHAN, E. FADEL, P. DARTEVELLE
- [14] (2018). *Suture fixation of tracheal stents for treatment of upper trachea stenosis: a retrospective study*. J. HUANG, Z. ZHANG, T. ZHANG
- [15] *La struttura e la funzione dei vasi sanguigni*. A. INCANDELA
- [16] *Wikipedia /Arterie Coronarie*.
- [17] *Aneurisma congenito dell'arteria coronaria*. ORPHA
- [18] (2020). *Panoramica sulla coronaropatia*. R. N. SWEIS, A. JIVAN
- [19] (2020). *COVID-19 e coronaropatie: uso selettivo e collaborativo delle risorse durante le crisi sanitarie*. E. VILLA, MA. SACCOCCI, A. MESSINA, D. MAFFEO, A. PITÍ, F. BIANCHETTI, C. CUCCIA, G. TROISE
- [20] *Opzioni di trattamento per le coronaropatie*. MEDTRONIC
- [21] (2020). *Trattamento farmacologico della coronaropatia*. R. N. SWEIS, A. JIVAN
- [22] (2020). *Stent*. T. VILLA
- [23] (2019). *Regenerative medicine: the red planet for clinicians*. R. CICCOCIOPPO, A. CANTORE, D. CHAIMOV, G. ORLANDO
- [24] (2020). *Regenerative medicine, organ bioengineering and transplantation*. L. EDGAR, T. PU, B. PORTIERE, J.M. AZIZ, C. LA POINTE, A. ASTANA, G. ORLANDO
- [25] (2019). *Dalla matrice extracellulare alla postura. Il sistema connettivo Ã" il nostro vero Deus ex machina?*. G. CHETTA

- [26] (2020). *Decellularized Extracellular Matrix-based Bioinks for Engineering Tissue- and Organ-specific Microenvironments*. B.S. KIM, S. DAS, J. JANG, D. CHO
- [27] *Wikipedia /Collagene*.
- [28] *Il processo di Liofilizzazione conto terzi*. LYOPHARM
- [29] (2008). *Liofilizzazione*. CORSO DI IMPIANTI DELL'INDUSTRIA FARMACEUTICA
- [30] *Wikipedia /Liofilizzatore*.
- [31] (2018). *A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks*. J. GROLL, J.A. BUDICK, D-W CHO, B. DERBY, M. GELINSKY, S.C. HEILSHORN, T. JÄNGST, J. MALDA, V.A. MIRONOV, K. NAKAYAMA
- [32] (2019). *Chemical insights into bioinks for 3D printing*. L.VALOT, J.MARTINEZ, A.MEHDI, G.SUBRA
- [33] (2017). *The bionk: A comprehensive review on bioprintable materials*. M.HOSPODIUK, M.DEY, D.SOSNOKI, I.T.OZBOLAT
- [34] (2014). *Microsistemi ingegnerizzati: Caratterizzazione della fabbricazione e delle proprietà meccano-strutturali*. M. TRONCONE
- [35] (2018). *Bioinks for 3D bioprinting: an overview*. P.S.GUNGOR-OZKERIM, I.INCI, Y.S.ZHANG, A.KHADEMHOSEINI, M.R.DOKMECI
- [36] (2019). *Hydrogel Bioink Reinforcement for Additive Manufacturing:A Focused Review of Emerging Strategies*. D.CHIMENE, R.KAUNAS, A.K.GAHARWAR
- [37] (2018). *Optimization of gelatin - alginate composite bioink printability using rheological parameters: a systematic approach*. T. GAO, G.J. GILLISPIE, J.S. COPUS, A. KUMAR, Y-J SEOL, A. ATALA, J.J. YOO, S.J. LEE

- [38] (2020). *Designing Decellularized Extracellular Matrix-Based Bioinks for 3D Bioprinting*. A. ABACI, M. GUVENDIREN
- [39] (2014). *Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink*. F.PATI, J.JANG, D.HA, S.W.KIM, J.RHIE, J.SHIM, D.KIM, D.CHO
- [40] (2020). *Building Scaffolds for Tubular Tissue Engineering*. A.J. BOYS, S.L. BARRON, D. TILEV, R.M. OWENES
- [41] (2020). *Rapid preparation of decellularized trachea as a 3D scaffold for organ engineering*. Z.WANG, F.SUN, Y.LU, S.PAN, W.YANG, G.ZHANG, J.MA, H.SHI
- [42] (2015). *Mitigation of tracheobronchomalacia with 3D-printed personalized medical devices in pediatric patients*. R.J. MORRISON, S.J. HOLLISTER, M.F. NIEDNER, M.G. MAHANI, A.H. PARK, D.K. MEHTA, R.G. OHYE, G.E. GREEN
- [43] (2017). *Tissue-engineered trachea from a 3D-printed scaffold enhances whole segment tracheal repair*. M. GAO, H. ZHANG, W. DONG, J. BAI, B. GAO, D. XIA, B. FENG, M. CHEN, X. HE, M. YIN, Z. XU, N. WITMAN, W. FU, J. ZHENG
- [44] (2018). *A rational tissue engineering strategy based on three-dimensional (3D) printing for extensive circumferential tracheal reconstruction*. J.H. PARK, J.Y. PARK, I-C NAM, M. AHN, J.Y. LEE, S.H. CHOI, S.W. KIM, D-W CHO
- [45] (2018). *Designing a tissue-engineered tracheal scaffold for preclinical evaluation*. C.A. BEST, V.K. PEPPER, D. OHST, K. BODNYK, E. HEUER, E.A. ONWUKA, N. KING, R. STROUSE, J. GRISCHKAN, C.K. BREUER, J. JOHNSON, T. CHIANG
- [46] (2019). *Development of a flexible 3D printed scaffold with a cell-adhesive surface for artificial trachea*. C.B.AHN, K.H:SON, Y.S.YU, T.H.KIM, J.I.LEE, J.W.LEE
- [47] (2019). *Experimental Tracheal Replacement Using 3-dimensional Bioprinted Artificial Trachea with Autologous Epithelial Cells and Chondrocytes*. J.H.PARK, J.K.YOON,

- J.B.LEE, Y.M.SHIN, K.W-LEE, S.W.BAE, J.LEE, J.YU, C.R.JUNG, Y.N.YOUN,
H.Y.KIM, D.H.KIM
- [48] (2017). *Article Navigation Frontiers in the management of coronary artery disease: bioabsorbable scaffolds, regenerative medicine, and gene therapy*. T.F.LUSCHER, MD, FESC
- [49] (2013). *Dual-delivery of VEGF and PDGF by double-layered electrospun membranes for blood vessel regeneration*. H.ZHANG, X.JIA, F.HAN, J.ZHAO, Y.ZHAO, Y.FAN, X.YUAN
- [50] (2015). *Scaffold-free, Human Mesenchymal Stem Cell-Based Tissue Engineered Blood Vessels*. Y.JUNG, H.JI, Z.CHEN, H.F.CHAN, L.ATCHISON, B.KLITZMAN, G.TRUSKEY, K.W.LEONG
- [51] (2017). *A Tissue Engineered Blood Vessel Model of Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Using Human iPSC-derived Smooth Muscle Cells*. L.ATCHISON, H.ZHANG, K.CAO, G.A.TRUSKEY
- [52] (2018). *3D-printed Tubular Scaffolds for Vascular Tissue Engineering*. M.RABIONET, A.J.GUERRA, T.PUIG, J.CIURANA
- [53] (2019). *In vitro and in vivo evaluation of 3D bioprinted small-diameter vasculature with smooth muscle and endothelium*. H.CUI, W.ZHU, Y.HUANG, C.LIU, Z.X.YU, M.NOWICKI, S.MIAO, Y.CHENG, X.ZHOU, S.J.LEE
- [54] (2021). *Embedded multimaterial bioprinting platform for biofabrication of biomimetic vascular structures*. C.DIKOL, M.ALTUNBEK, B.KOC
- [55] (2018). *Decellularization of Trachea With Combined Techniques for Tissue-Engineered Trachea Transplantation*. A.BATIOGLU-KARAALTIN, E.OVALI, M.V.KARAALTIN, M.YENER, M.YILMAZ, F.EYUPOGLU, Y.Z.YILMAZ, E.R.BOZKURT, N.DEMIR, E.KONUK, E.S.BOZDAG, O.YIGIT, H.CANSIZ

- [56] (2018). *Whole rat stomach decellularisation using a detergent-enzymatic protocol*. E.ZAMBAITI, F.SCOTTONI, E.RIZZI, S.RUSSO, K.DEGUCHI, S.EATON, A.F.PELLEGATA, P.D.COPPI
- [57] (2008). *Preparation and rheological characterization of a gel form of the porcine urinary bladder matrix*. D.O.FREYTES, J.MARTIN, S.S. VELANKAR, A.S. LEE, S.F. BADYLAK
- [58] (2018). *Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting*. M.DI GIUSEPPE, N.LAW, B.WEBB, R.A.MACRAE, L.J.LIEW, T.B.SERCOMBE, R.J.DILLEY, B.J.DOYLE
- [59] *Apparato respiratorio: anatomia e fisiologia*. UNIVERSITÀ DI TORINO

