

POLITECNICO DI MILANO

Facoltà di Ingegneria dei Sistemi
Corso di laurea magistrale (CLM) in Ingegneria Biomedica



**Metodi e protocolli di *decellularizzazione* e
ricellularizzazione di tessuti biologici**

Relatore: Prof.ssa Monica Soncini
Correlatore: Prof. Manuel Doblarè Castellano

Tesi di laurea di:
Claudia Samà
matricola 751739

Anno Accademico 2010-2011

INDICE

POLITECNICO DI MILANO	1
SOMMARIO	I
INTRODUZIONE	1
1. CAPITOLO 1: INGEGNERIZZAZIONE DI ORGANI E TESSUTI	4
1.1 <i>Decellularizzazione</i> di organi e tessuti	4
1.1.1 La matrice extracellulare (ECM) come <i>scaffold</i> biologico	5
1.1.2 Metodi di <i>decellularizzazione</i>	8
1.1.3 Tecniche di analisi del tessuto decellularizzato	16
1.1.4 Panoramica sullo stato dell'arte della <i>decellularizzazione</i> di organi complessi....	19
1.1.5 Panoramica dello stato dell'arte sulla <i>decellularizzazione</i> esofagea	33
1.2 <i>Ricellularizzazione</i> di organi e tessuti	40
1.2.1 Tecniche di analisi	46
1.2.2. Panoramica dello stato dell'arte sulla <i>ricellularizzazione</i> esofagea	46
2 CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI	49
2.1 Incannulazione di organi complessi per la loro <i>decellularizzazione</i>	50
2.1.1 Set-up sperimentale e principio di funzionamento	51
2.1.2 Metodo di incannulazione utilizzato per i diversi organi	54
2.1.3 Valutazione dell'efficacia del metodo di incannulazione.....	56
2.2 <i>Decellularizzazione</i> esofagea	58
2.2.1 Set-up sperimentale e principio di funzionamento.....	59
2.2.2 Protocolli di <i>decellularizzazione</i>	63
2.2.3 Tecniche di analisi dell'efficacia della <i>decellularizzazione</i>	65
2.3 <i>Ricellularizzazione</i> esofagea.....	70
2.3.1 Coltura ed espansione cellulare	71
2.3.2 Set-up sperimentale e principio di funzionamento	76
2.3.3 Protocolli di <i>ricellularizzazione</i>	82
2.4 Prove meccaniche	83
3 CAPITOLO 3:RISULTATI E DISCUSSIONE	88
3.1 Valutazione dell'efficacia del metodo di incannulazione di organi complessi	88
3.1.1 Valutazione del set-up sperimentale.....	88
3.1.2 Valutazione del metodo di incannulazione.....	89
3.2 <i>Decellularizzazione</i> esofagea	91
3.2.1 Valutazione del set-up sperimentale	91
3.2.2 Risultati degli esperimenti di <i>decellularizzazione</i> di esofagi	92
3.3 <i>Ricellularizzazione</i> esofagea.....	102
3.3.1 Scelta del siero per la coltura e l'espansione cellulare.....	102
3.3.2 Valutazione del set-up sperimentali	104
3.3.3 Risultati degli esperimenti di <i>ricellularizzazione</i> esofagea.....	105
3.4 Confronto tra esofago nativo, decellularizzato e ricellularizzato	109
3.4.1 Analisi istologica	110
3.4.2 Analisi del DNA	111
3.4.3 Analisi meccanica.....	112
CAPITOLO 4:CONCLUSIONE E SVILUPPI FUTURI.....	119
BIBLIOGRAFIA	127

SOMMARIO

Introduzione

Il trattamento delle patologie degenerative che vedono la compromissione definitiva di un organo, prevede il trapianto. Purtroppo la scarsa disponibilità degli organi provoca un notevole aumento del tasso di morbilità e mortalità. Ogni anno negli Stati Uniti muoiono circa 27000 individui per patologie epatiche, 120000 per compromissioni polmonari, 112000 per disfunzioni renali e 425000 per patologie cardiache [1].

A seguito del trapianto esistono inoltre problemi legati al rischio di insorgenza di una forma di rigetto, con conseguente danneggiamento dell'organo, e maggiore probabilità di insorgenza di neoplasie provocata dalla terapia immunosoppressiva.

È in questo contesto che ha acquisito maggior credito il tentativo da parte dell'ingegneria dei tessuti di rigenerare *in vitro* interi organi da impiantare poi nel paziente. Il vantaggio è notevole: la possibilità di ricostruire *in vitro* degli organi geneticamente compatibili con i pazienti riceventi costituirebbe la soluzione a tutte le problematiche fino ad ora riscontrate nei trapianti. Questo approccio consiste nella *decellularizzazione*, ossia nella rimozione della componente cellulare, di organi o tessuti provenienti da donatori allogenici o xenogenici per ottenere *scaffold* biologici tridimensionali, costituiti dalla matrice extracellulare (ECM), da coltivare successivamente con popolazioni cellulari prelevate dal paziente stesso [2]. Questo tipo di matrice contiene la struttura ed i componenti ottimali per ospitare cellule primarie, fornendo un ambiente ideale per i recettori cellulari di superficie [3].

Sono molteplici i lavori pubblicati in letteratura relativi a tentativi di rigenerazione di un organo *in vitro* e sono numerosi i protocolli di *decellularizzazione* messi a punto, la maggior parte dei quali prevede la perfusione di questi con detergenti, agenti chimici o enzimatici, sfruttando la rete vascolare nativa. Mentre la fase di *decellularizzazione*, quella relativa alla *ricellularizzazione* si può dire che sia ancora

agli inizi. L'idea di questo lavoro di tesi nasce proprio dalla consapevolezza dell'importanza di questa nuova strategia basata sulla medicina rigenerativa. Questo studio è stato svolto presso il gruppo GEMM del centro di ricerca dell'*Universidad de Zaragoza*, sotto la supervisione dell'Ing. Manuel Doblarè, del Dott. Iñazio Ochoa e della Dott.ssa Clara Alcaine. In un primo momento sono stati messi a punto il set-up sperimentale e il metodo di incannulazione di organi complessi come il cuore, il fegato e i polmoni, che permettano di ottenere una perfusione adeguata degli organi con la soluzione decellularizzante.

Ci si è poi soffermati principalmente sull'esofago, organo strutturalmente più semplice rispetto a cuore, fegato e polmoni. È stato messo a punto un sistema e un protocollo di *decellularizzazione* esofagea. Una volta ottimizzato il protocollo di *decellularizzazione* e ricavato quindi un tessuto adeguatamente decellularizzato, è stata effettuata una campagna sperimentale preliminare di *ricellularizzazione* dello *scaffold* così ottenuto.

I risultati mostrano matrici decellularizzate integre e una parziale adesione di cellule mesenchimali umane seminate (hMSC) sulle matrici decellularizzate.

Materiali e Metodi

Incannulazione di organi complessi per la loro *decellularizzazione*

Cuore, fegato e polmoni sono stati prelevati da due ratti *Sprague-Dawley* e sono stati congelati a secco ad una $T \approx -140^\circ\text{C}$. Per la perfusione degli organi con una soluzione decellularizzante, è stato messo a punto un sistema schematizzato in Figura 1 e composto da una pompa, una camera di *decellularizzazione* e un circuito idraulico.

L'organo da decellularizzare è stato posto, previa incannulazione, nella camera di *decellularizzazione*, costituita da un reservoir in vetro da 250 ml riempito con la soluzione decellularizzante. La perfusione dell'organo è stata garantita dalla pompa peristaltica,

Sommario

mediante la quale la soluzione decellularizzante è stata infusa nell'organo con una portata pari a 30ml/min.

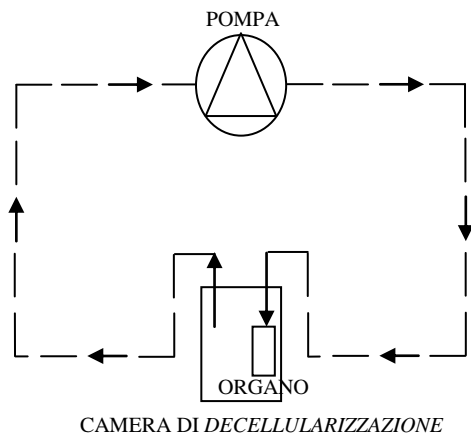


Figura 1: Rappresentazione schematica del sistema utilizzato per la valutazione dell'efficacia della tecnica di incannulazione di organi di *Sprague-Dawley*

A perfusione avvenuta la soluzione è fuoriuscita attraverso i tessuti dell'organo, per poi essere nuovamente reimpressa nell'organo. Per l'incannulazione dell'organo da perfondere è stata utilizzata una microcannula opportunamente inserita e vincolata all'organo con filo di sutura. Nel caso del cuore la cannula è stata inserita a livello dell'aorta; per quanto riguarda il fegato, invece, la scelta è ricaduta sulla vena porta che nell'organismo ha il compito di convogliare al fegato il sangue proveniente dalla digestione intestinale e dalla milza. Infine i polmoni sono stati perfusi mediante un'incannulazione della trachea, essendo quest'ultima un condotto connesso con l'albero bronchiale, che ha permesso così un'irrorazione totale dell'organo. In seguito all'incannulazione, gli organi sono stati ancorati al sistema di perfusione mediante la connessione della microcannula con i tubi del circuito idraulico, per poi essere sottoposti ad un processo di *decellularizzazione*, per il quale è stato seguito un protocollo di *decellularizzazione* epatica definito dal gruppo di ricerca dell'*Universidad de Zaragoza* in collaborazione con l'*Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza*. Si tratta di un protocollo di tipo fisico-chimico comprendente una fase di congelamento-

scongelo e una fase di perfusione con il detergente SDS.

La valutazione del metodo di incannulazione è stata effettuata mediante un'ispezione visiva. Una volta perfuso l'organo, infatti, se ne è stimato il cambiamento di colore. Gli organi incannulati in maniera corretta hanno mostrato un cambiamento omogeneo e totale del colore, mentre gli organi non correttamente incannulati non hanno mostrato variazioni di colore.

Decellularizzazione esofagea

Sono stati sacrificati sei conigli di razza australiana da cui sono stati estratti gli esofagi di lunghezza media $L=12\pm 1.3$ cm e diametro 0.5 ± 0.12 cm. Per ottimizzare la disponibilità dei campioni, ogni esofago è stato tagliato in tre o quattro parti, in funzione della sua lunghezza. Dopo la misurazione, i campioni così ottenuti sono stati immediatamente congelati a secco ad una $T\approx -140^\circ\text{C}$.

Per la *decellularizzazione* esofagea ci si è ispirati al sistema utilizzato per la *decellularizzazione* di organi complessi della Figura 2 al quale è stato però necessario apportare delle modifiche.

Una rappresentazione schematica del set-up sperimentale di cui ci si è avvalsi, che consta principalmente di un sistema di pompaggio, una camera di *decellularizzazione* e un circuito idraulico, è rappresentato in

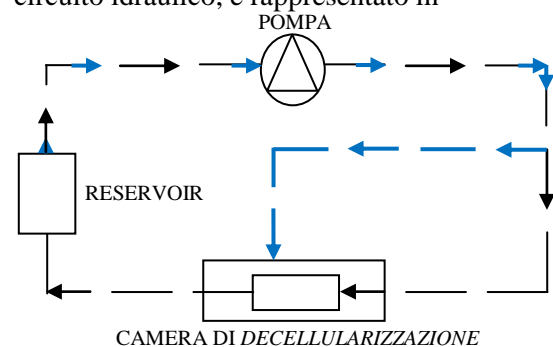


Figura 2: Rappresentazione schematica del sistema di *decellularizzazione* di esofagi di conigli di razza australiana

La perfusione dell'esofago con la soluzione decellularizzante contenuta all'interno di un reservoir, è stata ottenuta con una pompa peristaltica *Watson Marlow 323*. Come camera di *decellularizzazione* è stato

Sommario

utilizzato un dispositivo progettato da *Ebers Medical Technology*, un'azienda start-up del centro di ricerca dell'*Universidad de Zaragoza*, costituito da una camera di perfusione e da una camera di immersione. L'esofago è stato vincolato all'interno della camera di perfusione mediante filo di sutura (Figura 3) e l'architettura della camera ha permesso alla soluzione decellularizzante di immergere completamente l'organo sulla superficie esterna e di percorrerlo in direzione longitudinale sulla superficie interna.



Figura 3: Vascular Package TEB 100 Series con l'esofago ancorato con filo di sutura ai tubi di vetro della camera di perfusione

Nel sistema di Figura 2 sono infatti presenti due circuiti idraulici, uno di perfusione esofagea (tratteggio nero) e uno di riempimento della camera di decellularizzazione (frecche azzurre).

Una volta messo a punto il set-up sperimentale si è proceduto con la valutazione e l'ottimizzazione del protocollo di decellularizzazione. Nella Tabella 1 vengono riportati tre protocolli definiti per la valutazione preliminare del processo di decellularizzazione, mentre nella Tabella 2 sono descritti in maniera schematica i protocolli ottimizzati, a valle di modifiche effettuate sulla base dei risultati preliminari ottenuti con i protocolli di Tabella 1. Per l'ottimizzazione del protocollo di decellularizzazione, ci si è avvalsi di un'ispezione visiva e di un'estrazione di DNA.

PROTOCOLLO					
Velocità pompa	Step 1	Step 2	Step 3	N campioni	Analisi
15 rpm	[SDS]=0.01% T=4°C, t=24h	[SDS]=0.1% T=4°C, t=24h	[SDS]=1% T.amb, t=24h	N=1	Visiva
30 rpm	[SDS]=0.01% T=4°C, t=24h	[SDS]=0.1% T=4°C, t=24h	[SDS]=1% T.amb,t=24h	N=1	Visiva
60 rpm	[SDS]=0.01% T=4°C, t=24h	[SDS]=0.1% T=4°C, t=24h	[SDS]=1% T.amb,t=24h	N=1	Visiva

Tabella 1: Protocolli per la valutazione preliminare del processo di decellularizzazione

PROTOCOLLO				
Velocità pompa	Step 2	Step 3	N campioni	Analisi
30 rpm	[SDS]=0.1% T=4°C, t=24h	[SDS]=1% T.amb, t=12h	N=2	-Visiva - Estrazione di DNA
60 rpm	[SDS]=0.1% T=4°C, t=24h	[SDS]=1% T.amb, t=12h	N=2	-Visiva - Estrazione di DNA

Tabella 2: Protocolli di *decellularizzazione* modificati sulla base dei risultati preliminari

Ricellularizzazione esofagea

Una volta determinato il protocollo ottimo di *decellularizzazione*, altri quattro campioni esofagei sono stati decellularizzati con questo protocollo e conservati in etanolo 70% a T=4°C. I quattro campioni di esofago decellularizzati sono stati in seguito utilizzati per la valutazione di due diversi protocolli di *ricellularizzazione*. Le cellule utilizzate in questa fase sono cellule staminali mesenchimali umane (hMSC) immortalizzate. È stato necessario effettuare un'espansione cellulare al fine di ottenere il numero di cellule desiderato per ripopolare l'esofago decellularizzato. A tale scopo è stato importante individuare il siero, elemento importante per la vitalità cellulare, più indicato per la coltura delle hMSC. È stato quindi condotto un test con sei differenti sieri fetali bovini (FBS) e la vitalità delle cellule hMSC è stata valutata dopo un giorno e dopo tre giorni di coltura mediante il test MTT. Individuato il siero da utilizzare, si è proceduto con l'espansione cellulare *in vitro* al fine di ottenere il numero di cellule necessario per l'esecuzione dei primi due esperimenti di *ricellularizzazione*, pari a tre milioni di cellule.

Viene di seguito riportata una rappresentazione schematica del set-up sperimentale utilizzato nella fase di *ricellularizzazione* esofagea (Figura 4), costituito principalmente da un sistema di pompaggio, una camera di *ricellularizzazione* e un circuito idraulico.

Come camera di *ricellularizzazione* è stato utilizzato lo stesso dispositivo utilizzato come camera di *decellularizzazione*, che ha quindi permesso contemporaneamente la

perfusione del lume interno dell'esofago con la sospensione cellulare e l'immersione dell'organo in mezzo di coltura MEM addizionato con il 10% del siero selezionato.

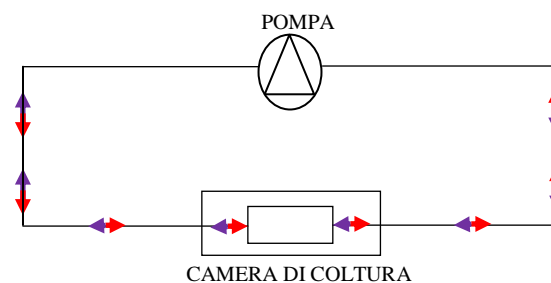


Figura 4: Rappresentazione schematica del sistema di *ricellularizzazione* di esofagi di conigli di razza australiana

La perfusione dell'esofago con la sospensione cellulare è stata garantita da un sistema di pompaggio peristaltico, totalmente integrato nel bioreattore TEB 1000 Master Unit (EBERS Medical Technology, Zaragoza Spain), nel quale è stata alloggiata la camera di coltura connessa al circuito idraulico. Come deducibile dalle frecce rosse e viola della Figura 4, si tratta di una perfusione oscillatoria. Infatti la pompa del bioreattore TEB genera un'oscillazione della sospensione cellulare. All'interno dei tubi del circuito vi sono due mezzi, aria e liquido, in modo tale da poter visualizzare il movimento della sospensione cellulare durante tutta la durata della prova. La perfusione esofagea è avvenuta con 8ml di sospensione cellulare ad una portata di 5ml/min imposta con la pompa peristaltica.

Definito e implementato il set-up sperimentale per poter ricellularizzare l'esofago, sono stati messi a confronto due

Sommario

protocolli differenti: il primo prevede due iniezioni cellulari da un milione di cellule ciascuno, mentre il secondo prevede una sola iniezione da un milione di cellule. Entrambi i protocolli constano di 3 step: iniezione cellulare, semina dinamica (oscillante) (24 ore) e coltura statica (24 ore)

Per la valutazione dei due protocolli si è ricorsi ad un'ispezione visiva e ad un'estrazione di DNA.

Sono state infine effettuate delle prove meccaniche a trazione e un'analisi istologica su campioni nativi, decellularizzati e ricellularizzati con i protocolli migliori per verificare l'efficacia dei processi di *decellularizzazione* e *ricellularizzazione* messi in atto.

Risultati e discussione

Valutazione dell'efficacia del metodo di incannulazione di organi complessi

La valutazione dell'efficacia del metodo di incannulazione di cuore, fegato e polmoni è avvenuta esclusivamente mediante un'ispezione visiva, durante la quale si è osservato il cambiamento del colore degli organi incannulati e sottoposti a *decellularizzazione*.

Per quanto riguarda il cuore si è ottenuto un successo del 100%; l'incannulazione aortica si è dimostrata efficace in entrambi i campioni che, dopo il processo di *decellularizzazione*, sono apparsi completamente bianchi (Figura 5a).

Anche per quanto riguarda i polmoni si è ottenuto un successo del 100% (Figura 5b), mentre nel caso del fegato la decellularizzazione non è avvenuta con successo in entrambi gli organi: solo uno è apparso decellularizzato, come appare in Figura 5c mentre l'altro è stato decellularizzato solo parzialmente.

Questo parziale insuccesso è stato causato esclusivamente dalla difficile individuazione del vaso da incannulare.

La soluzione migliore sarebbe stata pertanto quella di individuare il sito di incannulazione adeguato *in vivo*, perfondendo l'animale con PBS, per eliminare eventuali coaguli, e inserendo la cannula durante questa fase, quando i vasi non hanno ancora perso il loro

tono e non sono collassati. Questa soluzione, inoltre, avrebbe il vantaggio di garantire un processo semplificato che non comporti la manipolazione dell'organo e il rischio di danneggiamento, come accade invece con l'incannulazione *ex vivo*.

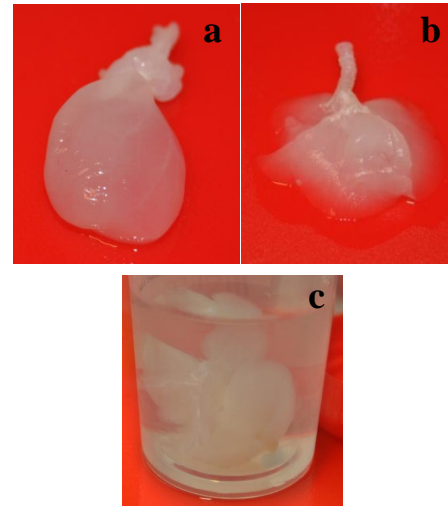


Figura 5: Cuore (a), polmoni (b) e fegato (c) incannulati e decellularizzati

L'incannulazione *in vivo* sarebbe quindi la fase iniziale dei processi di *decellularizzazione* di organi complessi.

Decellularizzazione esofagea

La semplicità del set-up sperimentale e l'utilizzo di una camera di *decellularizzazione* che permettesse simultaneamente la perfusione e l'immersione dell'esofago nella soluzione decellularizzante, hanno garantito un'adeguata perfusione esofagea in tutti gli esperimenti di *decellularizzazione* condotti.

Il primo protocollo di Tabella 1, ossia quello relativo ad una velocità della pompa uguale a 15 rpm ($Q=15$ ml/min), è stato scartato in quanto ha mostrato due limiti. In primo luogo la velocità troppo bassa della pompa non ha consentito una totale *decellularizzazione* dell'esofago in 72 ore. Inoltre la precipitazione del soluto a concentrazioni molto alte ($[SDS]=1\%$) ha provocato l'otturazione dei tubi con conseguente aumento della pressione e rottura dell'esofago.

Per quanto riguarda gli altri due protocolli riportati nella Tabella 1, ossia quelli relativi ad una velocità della pompa pari a 30 rpm ($Q=30$ ml/min) e a 60rpm ($Q=60$ ml/min),

Sommario

non è stato osservato alcun cambiamento di colore dell'esofago dopo il primo dei tre step del protocollo. Questo non vuol dire che la concentrazione dello 0.01% non abbia avuto alcuno effetto sulla rimozione cellulare, bensì che l'effetto non sia stato rilevante. Inoltre da una valutazione dello stato degli esofagi alla fine del processo di *decellularizzazione* è emerso un loro danneggiamento per entrambe le velocità della pompa (30 rpm e 60 rpm). A valle di queste considerazioni sono stati presi due provvedimenti: la rimozione della fase di perfusione con una soluzione contenente SDS ad una concentrazione dello 0.01%, per motivi di efficienza e di risparmio di detergente, e la riduzione della lunghezza della fase di perfusione con una soluzione contenente SDS ad una concentrazione dell'1% da 24 a 12 ore.

Sono stati dunque valutati due protocolli di *decellularizzazione* modificati sulla base dei risultati preliminari (Tabella 2).

La riduzione della durata del secondo step per entrambi i protocolli si è mostrata una scelta corretta. Infatti il problema legato alla perdita dell'integrità strutturale dell'esofago non si è più presentato.

Poichè visivamente gli organi sono apparsi decellularizzati con entrambe le velocità della pompa peristaltica, testimoniato dal colore traslucido assunto dagli esofagi decellularizzati (Figura a) rispetto a quelli nativi (Figura b), si è ricorsi all'estrazione del DNA per la valutazione del protocollo che garantisse una maggiore rimozione cellulare.

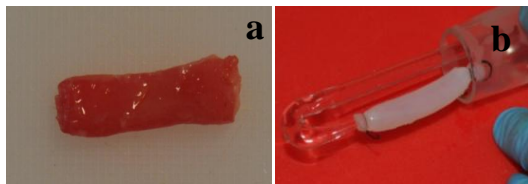


Figura 6: Confronto tra l'esofago nativo (a) e decellularizzato (b)

I valori di DNA ottenuti e riportati nell'istogramma di Figura 7, hanno mostrato una sostanziale diminuzione del DNA negli esofagi decellularizzati rispetto a quelli nativi. La quantità di DNA estratta dagli organi trattati, risulta essere inferiore a quella indicata in letteratura da Ozeky et al.[4] ed in

linea con il valore di DNA minimo definito da Crapo et al. [5] pari a 50 ng/mg.

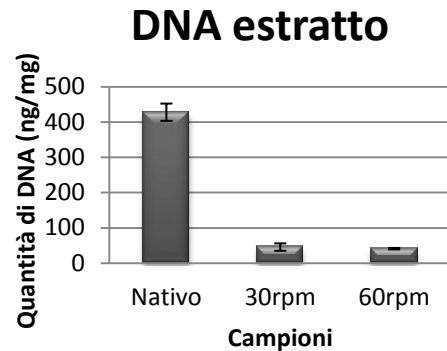


Figura 7: Iistogramma relativo alla quantità di DNA estratta da campioni nativi e decellularizzati con protocollo a 30 rpm e 60 rpm.

A parità di efficacia ed efficienza di *decellularizzazione* tra i due protocolli a diversa velocità (30rpm e 60 rpm), si è ritenuto che fosse meglio utilizzare la velocità più bassa in modo da ridurre l'entità delle sollecitazioni sul campione, essendo il sistema di pompaggio costituito da una pompa peristaltica di natura pulsatile.

Ricellularizzazione esofagea

Il test di vitalità cellulare MTT ha permesso di selezionare il siero che garantisse una maggiore proliferazione cellulare. A tal proposito è stato scelto il siero SIGMA, F7524 (lotto n° 06OM3399), inattivato per 30 minuti a T=56°C e filtrato.

Il sistema di *ricellularizzazione* che è stato messo a punto in questa fase, riportato schematicamente in Figura 4, ha dato dei risultati positivi, garantendo la perfusione esofagea con una sospensione cellulare e creando un ambiente favorevole alla sopravvivenza cellulare. Inoltre l'oscillazione della sospensione cellulare aumenta l'efficacia dei processi di semina e l'uniformità della distribuzione delle cellule all'interno del costrutto, al fine di ottenere costrutti ingegnerizzati più omogenei [6].

L'efficacia dei due protocolli di *ricellularizzazione* messi a punto in questa fase del lavoro è stata valutata mediante un'ispezione visiva ed un'estrazione del DNA. Con un'analisi visiva è stato possibile

Sommario

riscontrare un parziale cambiamento del colore degli esofagi sottoposti a *ricellularizzazione* (Figura 8a) se confrontati con quelli decellularizzati (Figura 8b).

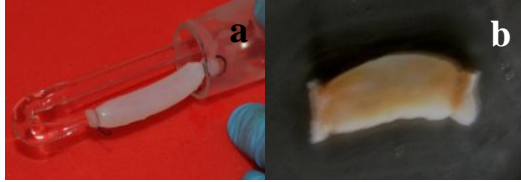


Figura 8: Confronto tra l'esofago decellularizzato (a) e ricellularizzato (b)

Poichè si tratta di un'analisi puramente qualitativa, si è dovuti ricorrere all'estrazione del DNA. I valori di DNA ottenuti e riportati nell'istogramma di Figura 9, hanno confermato quello che ci si aspettava, ossia una quantità maggiore di DNA nel caso dell'esofago sottoposto ad una doppia iniezione cellulare, rispetto a quello estratto dall'esofago sottoposto a singola iniezione cellulare.

In letteratura non sono presenti dati relativi alla quantità di DNA estratto da esofagi sottoposti a ripopolamento cellulare, per avere dei termini di paragone.

Quello che ci si è limitati a fare in questa fase preliminare è stato osservare che la quantità di DNA in un esofago sottoposto ad un'iniezione cellulare è maggiore rispetto a quella di un esofago decellularizzato.

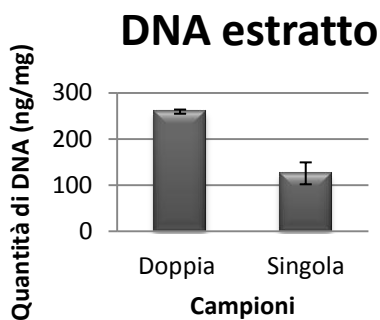


Figura 9: Iistogramma relativo alla quantità di DNA estratta da campioni sottoposti ad una doppia iniezione cellulare e ad una singola iniezione cellulare.

I risultati sono quindi incoraggianti. Questo fatto è riconducibile all'efficacia del sistema di *ricellularizzazione* utilizzato, soprattutto alla possibilità di effettuare una coltura dinamica. Per dare più credito a questa affermazione, sarebbe stato interessante

avere un campione di controllo, ottenuto mediante una semina puramente statica del costruito, iniettando le cellule nel lume dell'esofago e facendo a valle dell'iniezione solo una coltura statica. Questo, però, non è stato possibile a causa dell'esiguo numero di organi a disposizione.

Confronto tra esofago nativo, decellularizzato e ricellularizzato

È stato infine fatto un confronto dal punto di vista istologico, del contenuto di DNA e delle proprietà meccaniche tra l'esofago nativo, l'esofago decellularizzato con il protocollo ottimizzato e quello ricellularizzato mediante l'iniezione di due milioni di cellule.

Con una colorazione ematossilina eosina è stato possibile osservare la presenza di differenti strati cellulari nell'esofago nativo (Figura 10a), che diventano invece difficilmente individuabili nell'esofago decellularizzato (Figura 10b) che inoltre non presenta cellule sottoforma di punti neri. L'esofago ricellularizzato presenta una parvenza di strato epiteliale generato dall'adesione delle cellule iniettate. (freccie rosse in Figura 10c)

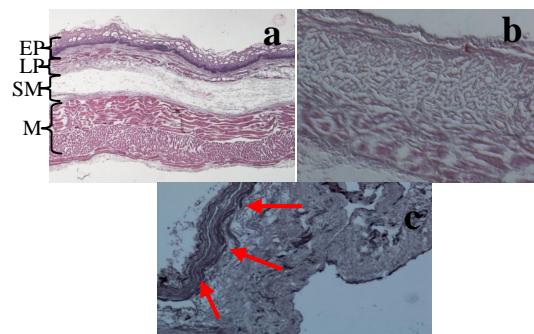


Figura 10: Immagini istologiche di una sezione di esofago nativo (a), decellularizzato (b) e ricellularizzato (c)

Inoltre una colorazione Tricromica di Masson ha permesso di rilevare il mantenimento della matrice di collagene nelle tre popolazioni.

Un'analisi statistica relativa al contenuto di DNA nelle tre popolazioni, ha riscontrato la presenza di differenze statisticamente significative tra l'esofago nativo, quello decellularizzato e quello ricellularizzato, a testimonianza del fatto che il protocollo di *decellularizzazione* può essere ritenuto

Sommario

ottimo dal punto di vista della rimozione cellulare. La differenza rilevata tra l'esofago ricellularizzato e quello decellularizzato è indice di un'avvenuta adesione delle cellule iniettate, mentre quella tra l'esofago nativo e quello ricellularizzato indica la necessità di ulteriori affinamenti del protocollo di ricellularizzazione.

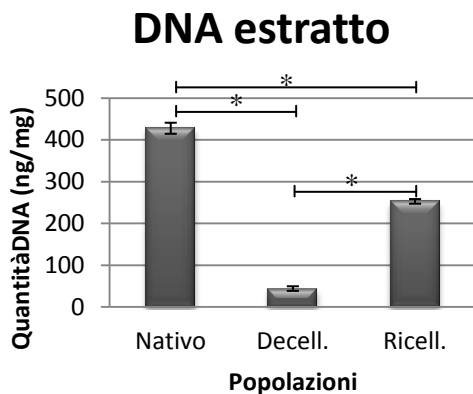


Figura 0.1: Quantità media di DNA estratto in tre popolazioni a confronto: esofago nativo, decellularizzato e ricellularizzato. Le barre di errore identificano le deviazioni standard (* indica le popolazioni per le quali è stata verificata una differenza significativa, $p < 0.05$)

Infine un'analisi meccanica non ha permesso di fare un confronto definitivo tra le proprietà meccaniche degli esofagi appartenenti alle tre popolazioni a causa del basso numero dei provini, ma ha dato la possibilità di compiere una prima indagine. È stata effettuata un'analisi statistica tra le tre popolazioni, considerando quattro parametri: modulo di Young a basse deformazioni (E_{low}), modulo di Young ad alte deformazioni (E_{high}), sforzo massimo a rottura (σ_{max}) e deformazione massima (ϵ_{max}), distintamente per i provini longitudinali e circolari. Dall'osservazione delle curve σ - ϵ , è evidente l'anisotropia dell'esofago nativo e ricellularizzato che invece diminuisce nell'esofago decellularizzato. Dai risultati ottenuti si può notare che non vi è differenza tra il comportamento a trazione dell'esofago nativo e quello decellularizzato; infatti in nessun caso vengono riscontrate differenze statisticamente significative. Questo è un buon risultato e sta a significare che, anche dal punto di vista meccanico, il processo di decellularizzazione non ha compromesso la

struttura dell'organo. Le differenze maggiori si rilevano invece tra l'esofago ricellularizzato e quello decellularizzato, in termini di aumento dello sforzo massimo a rottura e della rigidità ad alte deformazioni (nel caso longitudinale) (Figura 12), come se ci fosse un aumento delle prestazioni delle caratteristiche meccaniche a valle del trattamento di ricellularizzazione, ma anche un irrigidimento della struttura (E_{high} più elevati) (Figura 13). Questo comportamento merita ulteriori indagini e una caratterizzazione meccanica completa e definitiva potrà essere messa a punto aumentando radicalmente il numero di campioni.

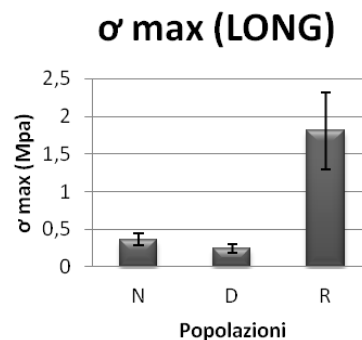


Figure 12: Sforzo massimo in tre popolazioni a confronto: esofago nativo, decellularizzato e ricellularizzato. Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard.

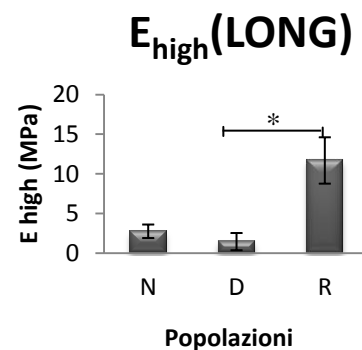


Figure 13: Modulo elastico ad alte deformazioni in tre popolazioni a confronto: esofago nativo, decellularizzato e ricellularizzato. Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard.

Conclusione e sviluppi futuri

Questo progetto di tesi ha dimostrato le potenzialità dei metodi di *decellularizzazione* e *ricellularizzazione* nella rigenerazione di organi *in vitro*. Gli obiettivi raggiunti e le difficoltà incontrate nelle varie fasi di questo studio, devono fungere da punto di partenza per possibili sviluppi futuri, al fine di superare i limiti e le difficoltà incontrate durante il percorso.

Per quanto riguarda la parte relativa alla *decellularizzazione* di organi anatomicamente complessi, sarebbe dunque necessario introdurre un primo step di incannulazione *in vivo*, al fine di garantire una buona perfusione ed un'adeguata *decellularizzazione*.

Il protocollo di *decellularizzazione* esofagea si è dimostrato adeguato sia sulla base dell'analisi del contenuto di DNA che dal punto di vista del mantenimento dell'integrità strutturale, grazie ad un'analisi istologica. Sarebbe però necessaria una completa caratterizzazione degli esofagi decellularizzati, possibile con un ottenimento di un numero consistente di campioni. Solo mediante una completa caratterizzazione degli organi ottenuti si potrebbe poi affermare l'assoluta adeguatezza ed efficacia del protocollo di *decellularizzazione*. Diversi sono i possibili miglioramenti da apportare alla fase di *ricellularizzazione*.

Alcuni miglioramenti sono raggiungibili in un breve termine e riguardano la possibilità di eseguire campagne sperimentali con un gruppo di campioni più ampio, mediante l'utilizzo di pompe multicanale che permettano la conduzione in parallelo di esperimenti indipendenti. Anche la possibilità di stabilire il numero di cellule minimo per ottenere una completa *ricellularizzazione* del lume interno esofageo è auspicabile nel breve termine. Più ambiziosa è invece l'idea di progettare un bioreattore che presenti la possibilità di perfondere il lume interno dell'esofago con una sospensione cellulare oscillante, ma che allo stesso tempo permetta la semina e la coltura della superficie esterna del costruito, magari ricorrendo a due popolazioni cellulari

diverse, essendo l'esofago costituito da più strati cellulari.

Sebbene siano stati fatti numerosi sforzi, ad oggi non esiste un sostituto esofageo strutturalmente e funzionalmente adeguato, che possa garantire un successo a lungo termine. Sulla base di questo scenario e con la consapevolezza delle conoscenze acquisite negli anni bisogna ancora investire molto alla ricerca di un sistema adeguato soprattutto per quanto riguarda la fase di *ricellularizzazione*.

Bibliografia

- [1] Stephen F.Badylak, Doris Taylor, Korkut Uygun. Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds. Annual Review of Biomedical Engineering, 2011: p. 27-53;
- [2] S. Mantero, A.Remuzzi, M.T. Raimondi, A. Ahluwall. Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa. Patron Editore (2010);
- [3] Stephen F.Badylak, Donald O.Freytes, Thomas W.Gilbert. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. Acta Biomateriala vol 5, 2009: p. 1-13;
- [4] Masayasu Ozeki, Yuji Narita, Hideaki Kagami, Naoki Ohmiya, Akihiro Itoh, Yoshiki Hirooka, Yasumasa Niwa, Minoru Ueda, Hidemi Goto. Evaluation of decellularized esophagus as a scaffold for cultured esophageal epithelial cells. Wiley InterScience, 2006: p.771-778;
- [5] Peter M.Crapo, Thomas W.Gilbert, Stephen F.Badylak. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials vol.32, 2011: p.3233-3243;
- [6] Wendt D, Marsano A, Jakob M, Heberer M, Martin I. Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity. Biotechnol Bioeng vol.84, 2003: p.205-214

ABSTRACT

Introduction

Nowadays the most widespread treatment for degenerative pathologies, which cause the complete impairment of an organ is the transplantation. The critical shortage of donor organs leads to increase mortality rate. Every year in the United States about 27000 patients die because of hepatic pathologies, 120000 because of impairments of the lungs, around 112000 deaths are caused by renal dysfunction and 425000 occur for cardiac pathologies [1]. Moreover, there are complications due to the risk of chronic rejection of the transplanted organ, that could be damaged, and of the development of neoplasms associated with a lifelong regimen of immunosuppressant therapy.

An ambitious idea that could overcome those problems arises from tissue engineering and is based on the *in vitro* regeneration of entire organs, subsequently implanted into the patients. The advantages of this technique are considerable: the reconstruction of organs genetically compatible would be the solution to all the inconveniences connected to the transplants. This method involves the *decellularization* (removal of the cells) of organs or tissues taken from allogeneic or xenogeneic donors in order to obtain biological 3D scaffolds, made of extracellular matrix (ECM). The scaffolds obtained are then seeded with cellular populations taken from the patient and those cells are cultured [2]. In fact, the ECM has the structure and the optimal components to host primary cells, providing the perfect environment for the cell surface receptors [3]. Many studies about the regeneration of organs *in vitro* have been published and different decellularization protocols have been developed. The most of those protocols is based on the perfusion of the organ with

detergents and chemical or enzymatic agents, exploiting the natural vascular network. Concerning the *recellularization*, on the other hand, more studies are needed in order to define an optimal protocol.

The idea of this thesis has been conceived considering the importance of this new technique based on regenerative medicine.

This study was carried out with the group GEMM of the Research Center of the Universidad de Zaragoza, under the supervision of Professor Manuel Doblarè, Dr. Ochoa Iñazio and Dr. Clara Alcaine

It has been first defined the experimental set-up and the cannulation method for complex organs, such as heart, liver and lungs, thus obtaining a correct perfusion of the organs with the decellularizing solution. Specific attention has been paid to the esophagus, an organ with a structure simpler than the one of the other organs considered. It has been developed a specific system and an esophageal *decellularization* protocol, which has been optimized in order to obtain a tissue correctly decellularized. This tissue has been later used as *scaffold* and recellularized with human mesenchymal stem cells (hMSC).

Materials and Methods

Cannulation of complex organs for their *decellularization*

The heart, the liver and the lungs were taken from two rats *Sprague-Dawley* and were freeze dried at $T \approx -140^\circ\text{C}$. The organs were perfused with a decellularizing solution using the system shown in Figure 1, which is composed by a pump, a decellularization chamber and an hydraulic circuit.

After the cannulation, the organ was placed in the *decellularization* chamber, composed of a 250 ml reservoir made of glass filled with decellularizing solution. The organ perfusion has been made by the peristaltic pump, through which a flow rate of 30 ml/min of decellularizing solution has been

Abstract

infused in the organ. During the perfusion, the solution leaked out from the organ, and then it was re-injected into the organ. The cannulation of the organ has been made using a micro-cannula inserted in the vessel and sutured.

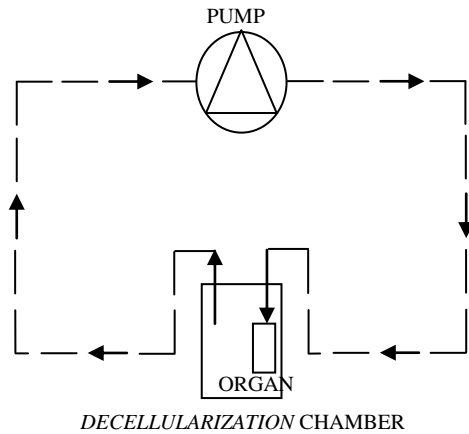


Figure 1: Schematic representation of the system used for the evaluation of the effectiveness of the cannulation technique of organs taken from rats *Sprague-Dawley*

For the cannulation of the heart, the cannula has been inserted in the aorta, while for the liver it has been used the portal vein, which drains the blood coming from the gastrointestinal tract into the liver. The lungs were perfused through the cannulation of the trachea, a tube that connects the bronchi to the lungs, allowing the complete perfusion of the organ. Afterwards the micro-cannula has been connected to the hydraulic circuit in order to anchor the organs to the perfusion system in order to decellularize them. The *decellularization* has been performed according to the hepatic *decellularization* protocol defined by the research group of the *Universidad de Zaragoza* in collaboration with the *Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza*. This protocol includes a first phase of freezing-thawing followed by a perfusion phase with the detergent SDS. The evaluation of the cannulation method has been made by a visual inspection of the change in the organ colour after the perfusion. Organs correctly cannulated showed a complete and uniform change in the colour, while in organs not perfectly cannulated the colour remained unchanged.

Esophageal *decellularization*

Six esophagi of normal length $L=12\pm 1.3\text{cm}$ and diameter $0.5\pm 0.12\text{cm}$ were taken from six Australian rabbits. In order to optimize the availability of the samples, each esophagus has been cut in three or four parts, depending on its size. After the measurement, the samples were immediately frozen at $T\approx -140^\circ\text{C}$.

The system used for decellularizing the esophagi was similar to the one used for complex organ shown in Figure 1, with some modifications. The experimental set-up used is represented in Figure 2; it is composed of a pumping system, a decellularizing chamber and a hydraulic circuit.

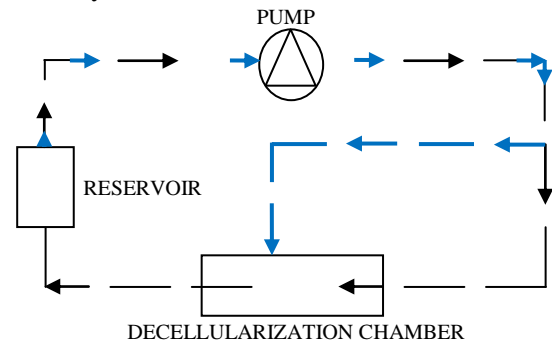


Figure 2: Schematic representation of the decellularization system for esophagi of Australian rabbits

The perfusion of the esophagus with the decellularizing solution has been obtained by a peristaltic pump *Watson Marlow 323*. The decellularizing chamber, composed by a perfusion chamber and an embedding chamber, is a device designed by *Ebers Medical Technology*, a start up company of the research centre of the *Universidad de Zaragoza*.

The esophagus has been sutured to the inner part of the perfusion chamber (Figure 3). Thanks to the chamber design, the decellularizing solution has been entirely covering the outer surface of the organ and flowing through the inner part in longitudinal direction.

Abstract

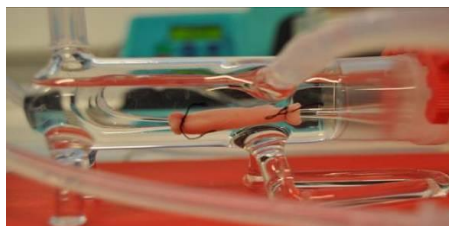


Figure 3: Vascular Package TEB 100 Series with the esophagus sutured to the glass tubes of the perfusion chamber.

In figure 2 two hydraulic circuits are represented: the one for esophageal perfusion

(black hatch) and the one to fill the *decellularization* chamber (blue arrows).

Once the experimental set-up was completed, the evaluation and the optimization of the *decellularization* protocol have been performed. The Table 1 shows the three protocols defined for the preliminary evaluation of the *decellularization* process. The optimization of the *decellularization* protocol was the result of the visual inspection and the DNA extraction.

PROTOCOL					
Pump speed	Step 1	Step 2	Step 3	Samples	Analysis
15 rpm	[SDS]=0.01% T=4°C, t=24h	[SDS]=0.1% T=4°C, t=24h	[SDS]=1% T.amb, t=24h	N=1	Visual
30 rpm	[SDS]=0.01% T=4°C, t=24h	[SDS]=0.1% T=4°C, t=24h	[SDS]=1% T.amb, t=24h	N=1	Visual
60 rpm	[SDS]=0.01% T=4°C, t=24h	[SDS]=0.1% T=4°C, t=24h	[SDS]=1% T.amb, t=24h	N=1	Visual

Table 1: Protocols for the preliminary assessment of the *decellularization* process

Pump speed	PROTOCOLLO		Samples	Analysis
	Step 2	Step 3		
30 rpm	[SDS]=0.1% T=4°C, t=24h	[SDS]=1% T.amb, t=12h	N=2	-Visual - DNA extraction
60 rpm	[SDS]=0.1% T=4°C, t=24h	[SDS]=1% T.amb, t=12h	N=2	-Visual - DNA extraction

Table 3: *Decellularization* protocols modified on the basis of preliminary results

Esophageal Recellularization

Once that the optimized *decellularization* protocol was completed, four more esophageal samples were decellularized and preserved in ethanol 70% at T=4°C.

The four samples were used for the evaluation of two different *recellularization* protocols.

The cells used are human mesenchymal stem cells (hMSC) immortalized. In order to obtain the number of cells required to populate the decellularized esophagus, a cell expansion has been performed.

Since the choice of the serum for the culture of the hMSC is important for the cellular vitality, a test with six different bovine sera has been conducted. The vitality of the

Abstract

hMSC has been evaluated through the MTT assay after one and three days of culture.

When the serum was chosen, the cellular expansion has been performed in order to obtain the number of cells necessary for the first two experiments of *recellularization* (three millions of cells.).

In Figure 4 the experimental set-up used for the esophageal *recellularization* is reported: it is composed of a pumping system, a *recellularization* chamber and an hydraulic system.

The recellularization chamber is the same device used as decellularization chamber, which allows the perfusion of both the inner and the outer surfaces at the same time by a culture medium MEM with the 10% of the selected serum.

The perfusion of the esophagus has been guaranteed by a peristaltic pump integrated in the bioreactor TEB 1000 Master Unit (*EBERS Medical Technology, Zaragoza Spain*), in which the culture chamber was inserted connected to the hydraulic circuit.

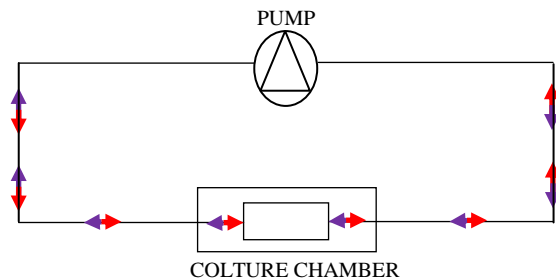


Figura 4: Schematic representation of the *recellularization* system for esophagi of Australian rabbits

As it is shown by the red arrows in Figure 4, the perfusion is oscillatory, due to the oscillation of the cellular suspension generated by the pump of the bioreactor.

Inside the tubes of the circuit there are two different media, air and liquid (cells suspended in culture medium), thus allowing the visualization of the suspension movement during the entire experiment.

The esophageal perfusion has been obtained through 8 ml of cellular suspension with a flow rate of 5 ml/min, set by the peristaltic pump.

After defining and developing the experimental set-up of the esophageal *recellularization*, two different protocols were compared. The first one consists of two

injections of one million of cells each, while the second one involves just one injection of one million cells. Both the protocols are made of three steps: cellular injection, dynamic seeding and static culture.

In order to evaluate the two protocols, a visual inspection and a DNA extraction have been used.

At last, tensile mechanical analysis and histological analysis were performed on the samples decellularized and recellularized with the optimized protocols to verify the effectiveness of the *decellularization* and *recellularization* protocols implemented.

Results and Discussion

Evaluation of the method to cannulate complex organs

The evaluation over the efficacy of the method to cannulated heart, liver and lungs was assessed only by a macroscopic observation. This led to observe a color change within the cannulated organs undergoing *decellularization*.

Regarding the heart, an 100% of success was achieved; the aortic cannulation was effective in both the samples, appearing completely white after the *decellularization* (Figure 5a). Similarly, an 100% of success was obtained for the lungs (Figure 5b), while the liver *decellularization* was totally successful only for one sample (Figure 5c), while the other resulted only partially *decellularized*.

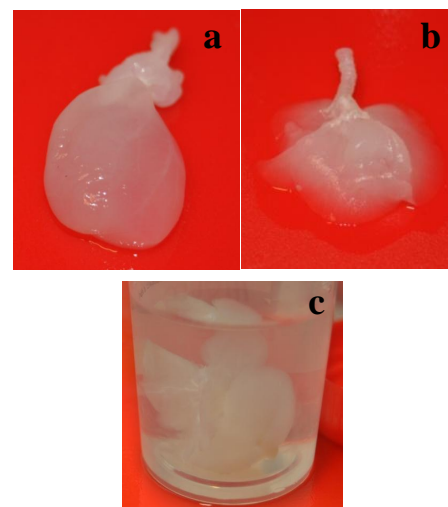


Figure 5: Cannulated and decellularized heart (a), lungs (b) and liver (c)

Abstract

This partial failure was due to the difficulty in individuating the vessel to cannulate. The best solution would have been to individuate the best cannulation site *in vivo*, perfusing the animal with PBS in order to avoid clots. In this way, the vessel would still be tonic without any collapse, facilitating the cannula insertion. Moreover, this solution would have the advantage to ensure a simplified process without requiring for the organ manipulation or leading to damages, like in the *ex vivo* approach. The *in vivo* incannulation will thus be the initial step of *decellularization* of complex organs.

Esophageal decellularization

An adequate esophageal perfusion was ensured in all the *decellularization* experiments thanks to the simplicity of the experimental set-up and the use of a chamber able to concurrently perfuse and submerge the esophagus in the decellularization solution.

The first protocol, with the pump velocity of 15 rpm ($Q=15\text{ml/min}$), was dismissed because of two limits. First, the low pump velocity did not allow a complete esophageal *decellularization* within 72 hours. Then, the solute precipitation at high concentrations ($[\text{SDS}]=1\%$) caused the tubes occlusion, leading to an increment in pressure and consequently to the esophagus rupture.

Regarding the other two protocols in Table 1, with pump velocities of 30 rpm ($Q=30\text{ml/min}$) and 60rpm ($Q=60\text{ml/min}$), any change in the esophagus color was observed after the first step. This does not mean the 0.01% concentration did not affect the cellular removal, but the effect was not relevant. Moreover, a post *decellularization* evaluation showed a damage of the esophagi for both the pump velocities (30 rpm e 60 rpm). Due to these considerations, two modifications were introduced. First, the removal of the perfusion phase with the 0.01% SDS solution in order to improve the efficacy and save the detergent amount. Second, the shortening of the perfusion phase with the step at 1% SDS solution reduced from 24 to 12 hours.

Two different decellularization protocols have been assessed, based on the preliminary results (Table 2). The choice to shorten the

second step was successful for both the protocols, since the esophagus rupture was not detected anymore.

Based on a macroscopic comparison of the color between the decellularized (Figure b) and the control organs (Figure a), both the peristaltic pump velocities led to an esophageal *decellularization*.

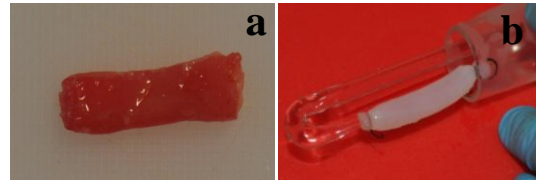


Figure 6: Comparison between the native (a) and decellularized esophagus (b)

To validate the results and define which protocol led to a higher cellular removal, a DNA extraction was performed.

The results of DNA extraction shown in Figure 7, demonstrate a decrement of the DNA content in the decellularized esophagi with respect to the native ones. The content of DNA resulted lower than the values found by Ozeky et al. [4] and close to the minimum DNA content of 50 ng/mg reported by Crapo et al. [5].

The two protocols at different velocities (30 rpm e 60 rpm) resulted similar for efficacy and efficiency, but the lower velocity was chosen to decrease the stress applied to the sample by the peristaltic pulsatile pump.

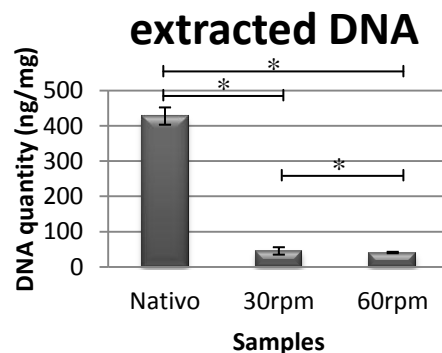


Figure 7: Histogram of the DNA content extracted from the native and decellularized samples at 30 rpm e 60 rpm velocities.

Esophageal *recellularization*

The MTT viability test allowed the selection of the serum leading to a higher cellular proliferation. The utilized serum was thus the SIGMA, F7524 (n° 06OM3399), deactivated for 30 minutes at 56°C and filtered.

The designed *recellularization* system, reported in Figure 4, gave positive results ensuring the esophageal perfusion with a cellular suspension and creating a favorable environment for the cellular survival. Moreover, the oscillation of cellular suspension increases the seeding efficacy and the uniformity of the cellular distribution within the construct, leading to a more homogeneous distribution of cells [6]. The efficacy of the two protocols was evaluated through a macroscopic inspection coupled with a DNA extraction. From the visual analysis, a partial change in the *recellularized* esophagi color was detected (Figure 8a) when compared to the decellularized ones (Figure 8b).

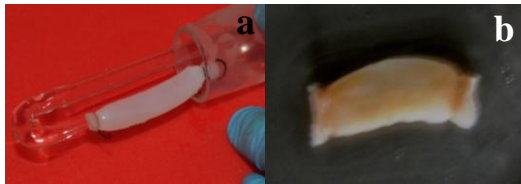


Figure 8: Comparison between decellularized (a) and recellularized (b) esophagi.

Due to the qualitative character of this observation, a quantitative DNA extraction was performed. The obtained DNA values, reported in Figure 9, confirmed the results showing a higher DNA content in the esophagus subjected to a double cells injection, compared to the single injected one.

Since there are no literature data about DNA content of recellularized esophagi as comparison, the only conclusion that can be derived from the read out of the assay is that the esophagus subjected to a double injection has more DNA than the other. This is related to the efficacy of the used *recellularization* protocol.

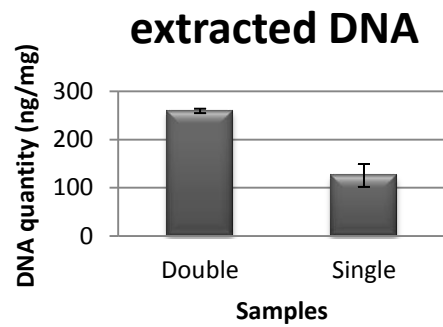


Figure 9: Histogram of the DNA content extracted from the samples subjected to double and single cells injection.

Comparison among native, decellularized and recellularized esophagus

A final comparison was carried on among the native esophagus, the one decellularized through the optimized protocol and the one recellularized by the injection of 2M of cells in terms of histology, DNA content and mechanical properties.

The hematoxylin eosin staining showed the presence of different cellular layers within the native esophagus (Figure 10a), becoming less evident in the decellularized one (Figure 10b). The recellularized esophagus presents a epithelial-like layer created by the injected cells (red arrows in Figure 10c).

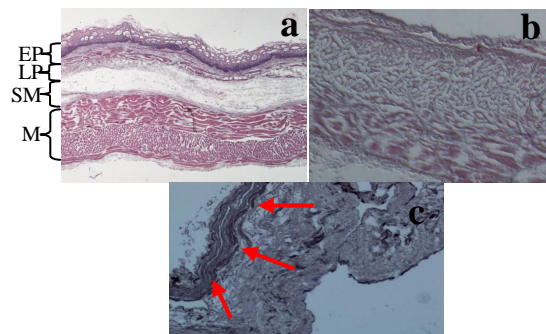


Figure 10: Histological images of sections from native (a), decellularized (b) and ricellularized (c) esophagi.

Moreover, the Masson Trichrome staining allowed the detection of the collagen matrix maintenance for all the three populations. The statistical analysis on DNA content within the three populations underlined statistically significant differences among native, decellularized and recellularized esophagi. This allowed to conclude the

Abstract

decellularization protocol gives great results in terms of cellular removal. The difference between the recellularized and decellularized esophagi is index of the injected cells adhesion, while the difference between the native and the recellularized ones is caused by the necessity to better investigate and optimize the *recellularization* protocol.

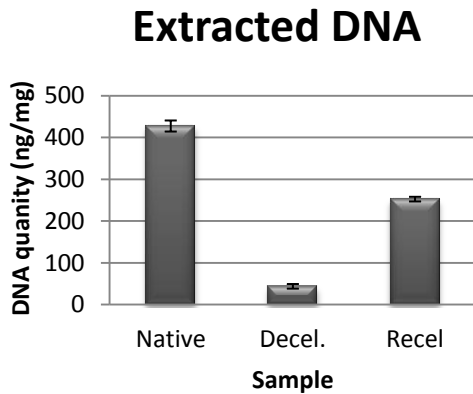


Figure 11: Average DNA content extracted from the three compared populations: native, decellularized and recellularized esophagi. The error bars represent the standard deviations (*= $p < 0.05$)

Finally the mechanical analysis did not allow a definitive comparison among the three populations due to the few samples tested. However, it can be considered a preliminary investigation.

A statistical analysis among the populations considered four parameters: low deformation's Young modulus (E_{low}), high deformation's Young modulus (E_{high}), maximum stress (σ_{max}) and maximum deformation (ϵ_{max}), with a distinction between transversal and circumferential specimens. By observing the σ - ϵ curves, the anisotropy of the native and the decellularized esophagus is evident. This anisotropy decreases in the decellularized esophagus. The results demonstrated there is no great difference in tensile behavior between the native and decellularized esophagus (no statistically significant differences were found). This can lead to the conclusion that the *decellularization* process did not affect the organ structure. The greater differences were instead found between the recellularized and decellularized esophagus

in terms of increment of σ_{max} (Figure 12) and of longitudinal high deformation stiffness. This could lead to detect higher performance of the esophagus, and a stiffening of the structure (higher E_{high}) (Figure 13) after the recellularized treatment. This behavior deserves further investigations and a complete and definitive mechanical characterization can be developed radically increasing the number of samples.

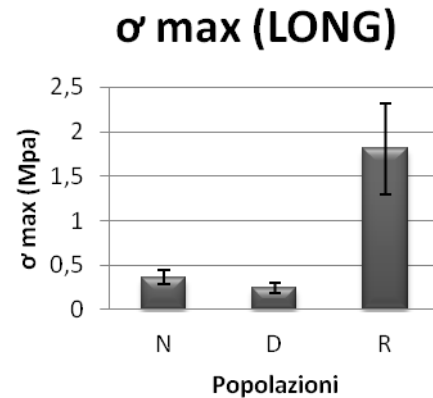


Figure 12: Maximum stress in three compared populations: native, decellularized and recellularized esophagi. The error bars represent the standard deviations

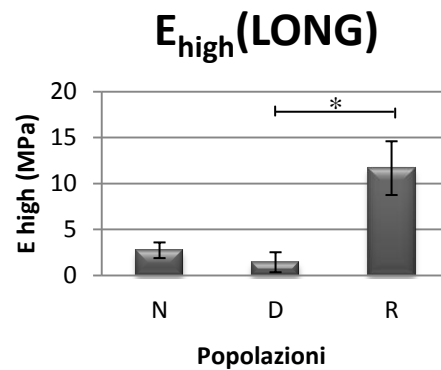


Figure 13: High Young modulus in three compared populations: native, decellularized and recellularized esophagi. The error bars represent the standard deviations (*= $p < 0.05$)

Conclusion and future developments

This thesis project demonstrated the potentialities of *decellularization* e *recellularization* to restore organs *in vitro*. The achieved results and the faced

Abstract

difficulties can be considered as initial steps to optimize these techniques and to overcome the highlighted limits.

Regarding the *decellularization* of anatomically complex organs, it should be introduced an initial *in vivo* cannulation step, to ensure adequate perfusion and cell removal. The esophageal *decellularization* protocol has been demonstrated to be adequate based on both the DNA content analysis and the maintenance of the structural integrity shown by the histological analysis. Only a more consistent number of samples will lead to a complete characterization of the decellularized esophagi, required for assaying the absolute efficacy of the *decellularization* protocol.

Different are the possible improvements to apply on the *recellularization* phase. Some of them are achievable in a short time and are correlated to the possibility of wider experimental campaigns using multichannel pumps allowing several independent conditions to be tested in parallel. In addition, the definition of the cell number required for a complete *recellularization* can be considered a short-term aim. More ambitious is the idea to design a bioreactor able to perfuse the esophagus internal lumen with an oscillating cellular suspension, and allowing at the same time the seeding and the culture of the construct external surface. The final idea would be to use two different cellular populations to mimic and replicate the features of the native esophagus, which shows different cellular layers.

Despite the efforts, it does not exist up today an esophageal substitute that is structurally and functionally adequate to ensure a long term success. Starting from this consideration and thanks to the acquired knowledge it will be possible to further investigate and optimize the proposed protocols and set-ups, especially for the *recellularization* phase.

Bibliography

[1] Stephen F.Badylak, Doris Taylor, Korkut Uygun. Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds. Annual

Review of Biomedical Engineering, 2011: p. 27-53;

[2] S. Mantero, A.Remuzzi, M.T. Raimondi, A. Ahluwall. Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa. Patron Editore (2010);

[3] Stephen F.Badylak, Donald O.Freytes, Thomas W.Gilbert. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. Acta Biomateriala vol 5, 2009: p. 1-13;

[4] Masayasu Ozeki, Yuji Narita, Hideaki Kagami, Naoki Ohmiya, Akihito Itoh, Yoshiki Hirooka, Yasumasa Niwa, Minoru Ueda, Hidemi Goto. Evaluation of decellularized esophagus as a scaffold for cultured esophageal epithelial cells. Wiley InterScience, 2006: p.771-778;

[5] Peter M.Crapo, Thomas W.Gilbert, Stephen F.Badylak. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials vol.32, 2011: p.3233-3243;

[6] Wendt D, Marsano A, Jakob M, Heberer M, Martin I. Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity. Biotechnol Bioeng vol.84, 2003: p.205-214.

INTRODUZIONE

Il trattamento delle patologie degenerative che vedono la compromissione di un organo, consiste principalmente nel trapianto.

Nonostante la maggiore comprensione dei principi chirurgici e biologici e il miglioramento delle procedure, il trapianto di organi e tessuti soffre ancora oggi di importanti limitazioni che ne riducono l'applicabilità e il successo per tre ragioni principali: progressivo danneggiamento dell'organo trapiantato a causa di una forma di rigetto cronico, effetti collaterali della terapia antirigetto (maggiore incidenza di neoplasie) e scarsa disponibilità degli organi da trapiantare [1].

Ogni anno negli Stati Uniti muoiono circa 27000 individui per patologie epatiche, 120000 per patologie polmonari, 112000 per compromissioni renali e 425000 per malattie cardiache [2]. Se poi si considerano i pazienti che muoiono in attesa di un trapianto, i numeri crescono esponenzialmente.

È sulla base di questo scenario che negli ultimi anni ha acquisito sempre più importanza un approccio alternativo per la sostituzione di interi organi, basato sulla rigenerazione *in vitro* di organi geneticamente compatibili con i pazienti a cui sono destinati. Questo processo prevede una fase di *decellularizzazione* dell'organo allogenico o xenogenico per l'ottenimento di matrici extracellulari (ECM) integre da utilizzare come *scaffold* per la semina e la coltura di nuove cellule nella fase di *ricellularizzazione*. Si verrebbero così a superare i limiti della terapia convenzionale basata sul trapianto, quali la disponibilità degli organi e la necessità di una terapia immunosoppressiva a vita.

Con il termine di *decellularizzazione* si indica il procedimento mediante il quale avviene la rimozione cellulare da un organo o da un tessuto che viene quindi ridotto a sola ECM [2]. Effettuando una ricerca bibliografica si possono trovare un numero notevole di protocolli sviluppati e ottimizzati per la *decellularizzazione* degli organi, la maggior parte dei quali prevede la perfusione di questi con detergenti, agenti chimici o enzimatici, sfruttando la rete vascolare nativa. Esistono inoltre anche dei metodi fisici quali congelamento-scongelo, sonicazione, applicazione di pressione ed agitazione meccanica [3]. Molti protocolli vedono la combinazione di metodi diversi per poterne aumentare l'efficacia. Sicuramente l'aspetto principale, a monte di un'adeguata rimozione

Introduzione

cellulare, è la preservazione dell'integrità della ECM, da coltivare poi con le cellule del paziente.

Nella fase di *ricellularizzazione*, invece, il tipo cellulare da infondere dipende dalla scopo e dal tipo di organo. Anche le modalità di infusione variano di caso in caso, ma solitamente l'iniezione avviene mediante la vascolatura, che deve essere preservata. Sebbene ci siano in letteratura esempi di protocolli atti alla valutazione della biocompatibilità della ECM decellularizzata per un futuro ripopolamento cellulare [2], ad oggi è necessaria una fase di ottimizzazione per la rigenerazione *in vitro* di interi organi ricellularizzati.

L'idea di questo lavoro di tesi nasce proprio dalla consapevolezza dell'importanza di questo nuovo approccio terapeutico basato sulla medicina rigenerativa e sul desiderio di incominciare ad entrare attivamente nel mondo della rigenerazione degli organi *in vitro*, intraprendendo un percorso che fosse compatibile con i tempi relativi ad un lavoro di tesi. Il progetto di tesi, della durata di otto mesi, è stato svolto presso il gruppo *GEMM* (Group of Structural Mechanics and Materials Modelling) del centro di ricerca della *Universidad de Zaragoza*, sotto la supervisione del Prof. Manuel Doblare, del Prof. Iñazio Ochoa e della Dott.ssa Clara Alcaine. Può essere suddiviso sostanzialmente in due parti. In un primo momento l'attenzione è stata rivolta ad organi anatomicamente complessi, come il cuore, il fegato e i polmoni. Prima di procedere con la messa a punto del protocollo di *decellularizzazione*, è stata di fondamentale importanza valutare l'efficacia della tecnica di incannulazione dell'organo, necessaria per la sua perfusione con la soluzione decellularizzante. A tal fine è stato molto importante effettuare un'analisi anatomica approfondita di questi organi ed un'analisi bibliografica relativa ai metodi di incannulazione già utilizzati e verificati da altri gruppi di ricerca. In letteratura ci sono infatti molti lavori che riguardano la *decellularizzazione* soprattutto di cuore e fegato. Molti protocolli, però, prevedono set-up sperimentali molto complessi, a volte incompatibili con gli strumenti a disposizione in normali laboratori di ricerca. È quindi stato messo a punto un sistema di *decellularizzazione* basato sulla perfusione dell'organo ottenuta con un sistema di pompaggio e garantita da un'adeguata incannulazione. Per la valutazione della tecnica d'incannulazione, gli organi sono stati sottoposti ad un protocollo di *decellularizzazione* che consentisse la rimozione cellulare, in modo tale da poter correlare il loro cambiamento di colore, causato dalla perfusione con il fluido

Introduzione

decellularizzante, con l'efficacia della tecnica di incannulazione. Per questa fase del lavoro è stato utilizzato un protocollo di *decellularizzazione* ottimizzato dal gruppo di ricerca dell'*Hospital Miguel Servet de Zaragoza*, che collabora con il gruppo *GEMM*.

La difficoltà della tecnica e il parziale insuccesso del metodo di incannulazione, ha fatto sì che l'attenzione si spostasse su un organo strutturalmente più semplice, quale l'esofago. È proprio sull'esofago che si concentra la parte preponderante del lavoro di tesi, in particolar modo sull'ottimizzazione del protocollo di *decellularizzazione* ed in seguito su una valutazione preliminare di un protocollo di *ricellularizzazione*.

Per far ciò ci si è ispirati al protocollo di rimozione cellulare seguito per la valutazione della tecnica di incannulazione, ma poi ottimizzato per il caso specifico, grazie ad un'analisi istologica e all'estrazione di DNA. Come camera di *decellularizzazione* ci si è avvalsi di un dispositivo prodotto dalla Ebers Medical Technology, un'azienda start-up del centro di ricerca della *Universidad de Zaragoza*.

Una volta ottimizzato il protocollo di *decellularizzazione* e ricavato quindi un tessuto opportunamente decellularizzato, si è proceduto ad effettuare esperimenti preliminari di *ricellularizzazione*. La *ricellularizzazione*, però, è stata una fase di lavoro ancora molto preliminare che ha comunque consentito di ottenere risultati incoraggianti anche se ancora da verificare e da esplorare ulteriormente. È stato utilizzato un bioreattore prodotto anche questa volta dall'azienda biomedica Ebers, costituito principalmente da un incubatore all'interno del quale vi è un doppio sistema di pompaggio che permette la coltura dinamica dei costrutti mediante l'oscillazione della sospensione cellulare.

L'esofago decellularizzato è stato perfuso con la soluzione contenente cellule solo in corrispondenza del lume interno; il numero delle cellule iniettate seguendo i protocolli preliminari è risultato essere molto basso se confrontato con la quantità di cellule necessaria per ottenere una vera e propria *ricellularizzazione*. Per di più la matrice decellularizzata è stata coltivata con cellule di linea immortalizzate (hMSC) che potrebbero provocare l'insorgenza di tumori *in vivo*. Questo obiettivo è nato dalla consapevolezza di alcuni limiti legati al laboratorio, quale soprattutto la difficile reperibilità di cellule primarie. L'obiettivo preposti in questa fase del lavoro non era comunque la completa *ricellularizzazione* esofagea, che richiederebbe un lavoro molto lungo e complesso, ma la valutazione dell'adeguatezza del processo di decellularizzazione nell'ottenimento di uno *scaffold* ECM adeguato per l'adesione cellulare.

CAPITOLO 1: INGEGNERIZZAZIONE DI ORGANI E TESSUTI

Questo capitolo è strutturato in due parti fondamentali: nella prima viene fatta una panoramica generale sui metodi di *decellularizzazione* in uso, soffermandosi poi su un inquadramento dei protocolli di *decellularizzazione* utilizzati per organi anatomicamente complessi come cuore, fegato e polmoni e per organi strutturalmente più semplici come l'esofago. Nella seconda parte invece viene fatto un inquadramento generale del processo di *ricellularizzazione*, riservando maggiore attenzione alla *ricellularizzazione* esofagea su cui ci si è concentrati nella terza fase del lavoro di tesi.

1.1 *Decellularizzazione di organi e tessuti*

Con il termine *decellularizzazione* si definisce il processo mediante il quale si rimuove la componente cellulare da un tessuto o da un organo, riducendolo a un complesso di proteine funzionali e strutturali che costituiscono la matrice extracellulare (ECM) [2].

Il tessuto da cui viene ottenuta la matrice, le specie di origine e il metodo di *decellularizzazione* variano notevolmente e ogni variabile in gioco influisce sulla composizione e sull'ultrastruttura, ossia la struttura osservabile a livello microscopico, della matrice extracellulare decellularizzata, con conseguenti ripercussioni sulla risposta dell'organismo ospite, una volta che avviene l'impianto della matrice.

L'obiettivo di un protocollo di *decellularizzazione* è quello di rimuovere in maniera efficace tutto il materiale cellulare e nucleare, cercando di ridurre al minimo, o meglio di eliminare, ogni danno sulla composizione, sull'attività biologica e sull'integrità meccanica della rimanente ECM [2].

Il processo di *decellularizzazione* nell'ingegneria dei tessuti rappresenta uno step molto importante. L'ingegneria dei tessuti è la disciplina che ha come obiettivo la ricomposizione *in vitro* o *in vivo* di un tessuto che possa sostituire quello danneggiato a partire da poche cellule del paziente. Costituisce quindi un'alternativa al trapianto che presenta numerosi limiti tra cui: lo sviluppo di una forma di rigetto cronico, la necessità di una terapia antirigetto a vita che provoca una maggiore incidenza di neoplasie ed infine una scarsa disponibilità di organi. Attualmente nei paesi industrializzati sono molto più numerosi i pazienti in lista d'attesa che quelli che possono beneficiare del trapianto di un

organo. Il problema della disponibilità degli organi destinati al trapianto verrebbe risolto se si disponesse di una fonte alternativa, ad esempio, potendo trapiantare nell'uomo organi di animali. Il trapianto tra specie diverse, detto xenotrapianto, è in effetti una delle linee di ricerca attualmente perseguite, nonostante rimangano da risolvere importanti problematiche quali il rigetto iperacuto dello xenotrapianto e il potenziale trasferimento di agenti patogeni dall'animale all'uomo [1]. Questi limiti non si presenterebbero se si pensasse di privare gli organi di animali, anatomicamente compatibili con l'uomo, della componente cellulare. A questo punto l'organo si ridurrebbe a ECM e fungerebbe da *scaffold* per la coltura di cellule del paziente ricevente. Non vi sarebbero più problemi di rigetto in quanto il biomateriale che sostituisce il tessuto patologico verrebbe coltivato con le cellule del paziente, ottenendo quella che comunemente viene definita "compatibilità biologica" [2].

Quindi con la *decellularizzazione* si verrebbero a generare *scaffold* biologici, naturali e tridimensionali (ECM), che possano essere successivamente coltivati con popolazioni cellulari selezionate per ottenere un nuovo organo compatibile con l'organismo del paziente ricevente. Inoltre questo tipo di matrice, diversamente da quelle artificiali formate da uno o più polimeri di sintesi, contiene la struttura ed i componenti ottimali per ospitare le cellule dell'organismo, fornendo un ambiente ideale per i recettori cellulari di superficie e costituendo una riserva per i fattori di crescita che modulano i processi biologici quali l'angiogenesi, la migrazione e la proliferazione cellulare [4].

1.1.1 La matrice extracellulare (ECM) come *scaffold* biologico

Nell'ultimo decennio tra le proposte più accreditate dell'ingegneria dei tessuti, c'è quella di utilizzare polimeri di origine naturale, come biomateriali, per gli *scaffold*, in particolare quelli che compongono fisiologicamente la ECM.

Nei tessuti degli animali la ECM è un composto eterogeneo costituito da diverse proteine strutturali e funzionali, glicoproteine e proteoglicani organizzati in una sovrastruttura tridimensionale molto complessa. Si tratta di un materiale gelatinoso, detto anche sostanza di base, che tiene unite le cellule di un tessuto e contiene numerosi pori attraverso cui le sostanze nutritive e l'ossigeno passano e si diffondono verso le singole cellule [5].

La ECM è il componente che determina le proprietà fisiche di ogni tipo di tessuto connettivo ed è costituita da tre componenti principali: matrice di sostanza organica,

chiamata sostanza fondamentale, in cui sono collocati vari tipi di fibre e un gruppo di glicoproteine strutturali che mediano le interazioni tra le cellule e gli altri costituenti [6]. La sostanza fondamentale è un materiale amorfo e trasparente che ha le proprietà di un gel semifluido. I liquidi tissutali sono debolmente legati alla sostanza fondamentale e formano il nesso di passaggio dei materiali attraverso il tessuto connettivo, permettendo lo scambio dei metaboliti con il sistema circolatorio. La sostanza fondamentale comprende sette tipi di catene polisaccaridiche lunghe, non ramificate, ciascuna delle quali è formata dalla ripetizione di unità disaccaridiche. Una delle unità del disaccaride è solitamente un acido ialuronico e l'altra un aminosaccaride (N-acetil glucosamina o N-acetil galattosina), da ciò il termine glicosamminoglicani (GAG) con cui queste catene sono definite [6]. La Figura 1.1 rappresenta una sezione della ECM in cui sono indicati i componenti principali.

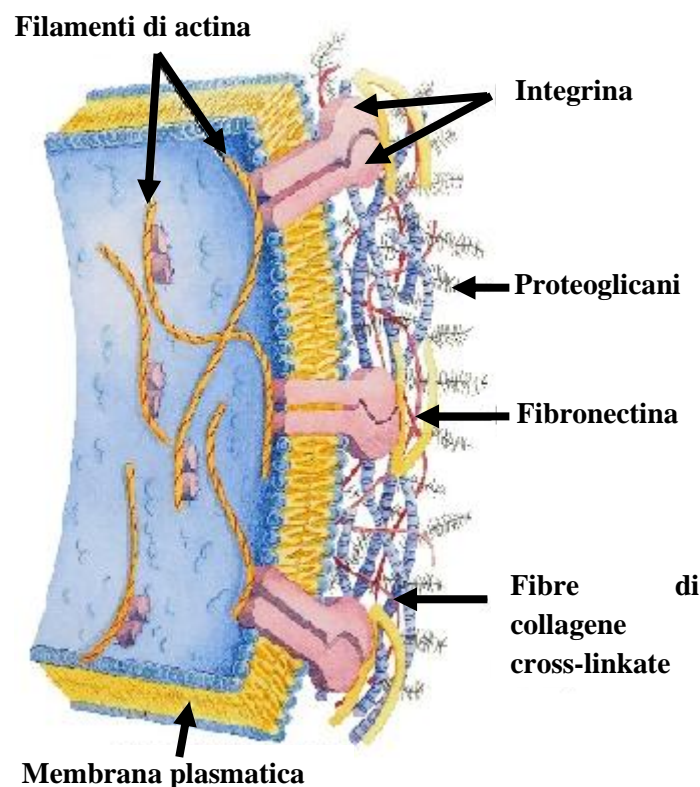


Figura 1.1: Sezione della ECM in cui sono indicati i componenti principali quali collagene, actina, integrina, fibronectina e proteoglicani [4].

Tra le glicoproteine vi sono le fibre di collagene ed elastina, la fibronectina e la laminina [5]. Il collagene è la proteina più presente nel corpo umano; la sua importante funzione è

di offrire resistenza alla trazione e viene secreta dalla ECM sotto forma di tropocollagene, per poi polimerizzare e dare vita al collagene.

L'elastina è un'importante proteina strutturale organizzata in fibre e fogli discontinui nella ECM della pelle, dei polmoni e dei vasi, ai quali conferisce proprietà di allungamento e ritorno elastico. Viene sintetizzata dai fibroblasti sotto forma di precursore, la tropoelastina, che polimerizza nei tessuti extracellulari.

La fibronectina e la laminina sono glicoproteine strutturali, ossia un gruppo di molecole composte principalmente da catene proteiche legate a polisaccaridi ramificati [6].

Questo connubio tra elasticità e resistenza rende quindi la ECM un materiale ideale per la realizzazione di *scaffold* biologici, avendo inoltre dimostrato di facilitare il rimodellamento di differenti tessuti sia in studi preclinici su animali che in applicazioni cliniche su pazienti [4].

Scaffold biologici costituiti da ECM vengono comunemente utilizzati in una grande varietà di applicazioni chirurgiche ricostruttive e stanno trovando sempre più impiego nella medicina rigenerativa per la sostituzione di organi e tessuti [4]. Le ECM utilizzate per la creazione di questi *scaffold* vengono ottenute da diversi tessuti tra cui pelle, submucosa intestinale, vescica, vasi sanguigni e valvole cardiache e sono costituite da un complesso di molecole funzionali e strutturali che influenzano una varietà di attività cellulari. Altre proteine come la laminina, il collagene e il fibrinogeno sono state spesso usate nella generazione di *scaffold* biodegradabili per il loro ruolo strutturale e funzionale. Uno dei vantaggi di questi peptidi è la loro abbondanza nell'ambiente fisiologico di molte specie diverse, permettendo il prelievo da fonti animali senza avere intolleranze e risposte infiammatorie eccessive [7].

Inoltre la struttura e la composizione della ECM è in costante cambiamento perché risponde all'attività metabolica delle popolazioni cellulari residenti. Questo concetto di "reciprocità dinamica" tra la ECM e la popolazione cellulare residente è uno dei maggiori vantaggi nell'utilizzo della ECM come *scaffold* rispetto ai materiali sintetici ed enfatizza l'importanza del mantenimento della composizione nativa dell'ultrastruttura durante la preparazione di questi *scaffold* tridimensionali.

È noto inoltre che l'ECM riveste un ruolo nel differenziamento cellulare (ad esempio da mioblasti a miotubi): pertanto la si può definire una componente attiva dei processi che coinvolgono i tessuti.

L'impiego della matrice proteica come *scaffold* per la rigenerazione dei tessuti è stato quindi una diretta conseguenza della consapevolezza della sua influenza sul comportamento cellulare. Ad esempio si sono scoperti peptidi quali l'RGD, presente nelle molecole di fibronectina, che agiscono direttamente sull'adesione delle cellule.

È di fondamentale importanza che la struttura della ECM, qualora si voglia utilizzare come materiale per la realizzazione di uno *scaffold* biologico, venga preservata, in termini di ultrastruttura e architettura tridimensionale, durante i processi utilizzati per il suo ottenimento, mantenimento e preparazione [7].

1.1.2 Metodi di *decellularizzazione*

In letteratura sono riportate differenti tecniche utilizzate per la *decellularizzazione* di organi e tessuti. Generalmente si fa una distinzione tra metodi fisici, chimici ed enzimatici, come riportato in Figura 1.2.

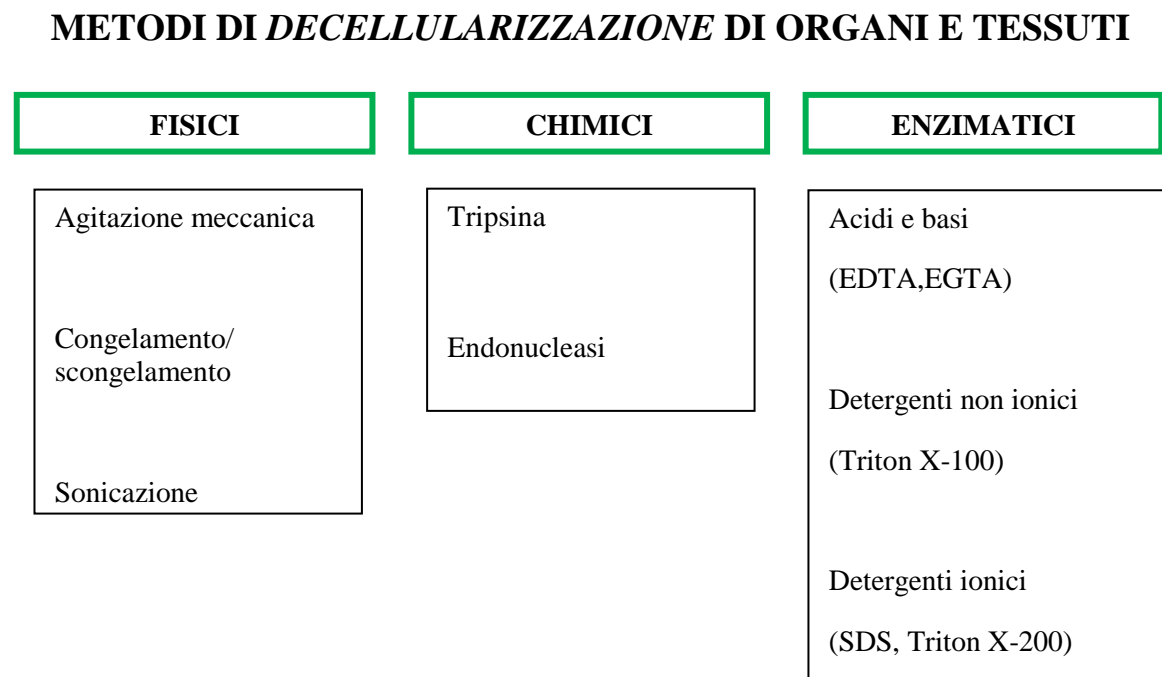


Figura 1.2: Esempi di tecniche utilizzate per decellularizzare organi e tessuti. EDTA è l'acido tetracetico etilene diamine, EGTA è l'acido tetracetico glicol etilene, SDS è il sodiododecilsolfato e CHAPS si riferisce al 3-[(3-colamidopropil)dimetilammonio]-1-propanosulfonato [2].

Come è chiaramente mostrato nella Figura 1.2, tra i trattamenti fisici si possono includere agitazione, sonicazione, pressione, congelamento e scongelamento; questi metodi

distruggono la membrana cellulare consentendo il rilascio del contenuto cellulare e facilitando quindi la loro rimozione dalla ECM [3].

I trattamenti fisici, però, non sono da soli sufficienti per l'ottenimento di una completa *decellularizzazione* e devono quindi essere combinati con dei trattamenti chimici.

È la combinazione di questi differenti approcci che viene infatti tipicamente utilizzata per massimizzare gli effetti di *decellularizzazione*.

I trattamenti enzimatici, come ad esempio l'uso della tripsina, e i trattamenti chimici, come ad esempio l'utilizzo di soluzioni ioniche e detergenti, distruggono la membrana cellulare e i legami responsabili delle connessioni intra e extracellulari [2].

I protocolli di *decellularizzazione* più efficaci vedono una combinazione di trattamenti fisici, chimici ed enzimatici:

- 1° step: lisi della membrana cellulare mediante un approccio fisico (agitazione, pressione, congelamento e successivo scongelamento) o mediante l'utilizzo di soluzioni ioniche;
- 2° step: separazione dei componenti cellulari dalla matrice extracellulare per mezzo di trattamenti enzimatici;
- 3° step: solubilizzazione del citoplasma e dei componenti nucleari grazie a detergenti chimici.

Questi step possono essere accompagnati, ad esempio, da agitazione meccanica per aumentare l'efficacia del processo. In seguito alla *decellularizzazione* tutti i residui chimici devono essere rimossi per evitare qualunque risposta avversa da parte del tessuto ospite [3].

La Tabella 1.1 presenta un elenco dei metodi utilizzati nei processi di *decellularizzazione*; oltre ad una suddivisione delle varie tecniche in fisiche, chimiche o enzimatiche, viene riportata anche la modalità d'azione e gli effetti che tali approcci possono avere sulla ECM [2][8].

Capitolo 1: Ingegnerizzazione di organi e tessuti

METODI	MODALITA' D'AZIONE	EFFETTI SULLA ECM
Fisici		
<u>Congelamento/scongelamento</u>	Durante il congelamento, i cristalli di ghiaccio intracellulari distruggono la membrana	La ECM può essere distrutta o danneggiata in seguito a congelamenti rapidi
<u>Pressione</u>	La pressione può distruggere le cellule e facilita la rimozione del materiale cellulare	La pressione può distruggere la ECM
<u>Agitazione meccanica</u>	Può causare la lisi cellulare, ma viene più comunemente utilizzata per facilitare l'esposizione chimica e la rimozione del materiale cellulare	Un'agitazione aggressiva o una sonicazione può distruggere la ECM
<u>Elettroporazione</u>	I campi elettrici pulsati possono distruggere la membrana cellulare	I campi elettrici potrebbero distruggere la ECM
Enzimatici		
<u>Tripsina</u>	Rompe i legami peptidici dell'Arg e della Lys a livello del terminale C	Un contatto prolungato con la tripsina può distruggere la struttura dell'ECM, rimuovere la laminina, la fibronectina, l'elastina e i GAG
<u>Endonucleasi</u>	Catalizza l'idrolisi dei legami interni delle catene dei (deossi)ribonucleotidi	E' difficile da rimuovere dai tessuti
<u>Esonucleasi</u>	Catalizza l'idrolisi dei legami terminali delle catene dei (deossi)ribonucleotidi	E' difficile da rimuovere dai tessuti

Capitolo 1: Ingegnerizzazione di organi e tessuti

Chimici		
<u>Acidi e basi</u>	Solubilizzano le componenti citoplasmatiche delle cellule, distruggono gli acidi nucleici e tendono a denaturare le proteine	Possibile danno al collagene e rimozione dei GAG
<u>Soluzioni ipertoniche e ipotoniche</u>	Lisi cellulare a causa di uno shock osmotico e distruzione della interazione DNA-proteina	Queste soluzioni provocano la lisi cellulare ma non rimuovono del tutto i residui cellulari
<u>Detergenti non ionici:</u> - <u>Triton X-100</u>	Distrugge l'interazione DNA-proteina, lipide-lipide e proteina-lipide; intatto il legame proteina-proteina	Danni a livello dell'ultrastruttura dell'ECM e del collagene. Rimozione dei GAG e dei fattori di crescita (GF)
<u>Detergenti ionici:</u> - <u>Sodio dodecil solfato (SDS)</u> - <u>Sodio deoxicolato</u> - <u>Triton X-200</u>	Solubilizzano la membrana citoplasmatica e nucleare; tendenza alla denaturazione delle proteine. L'efficacia dipende dal tipo di tessuto	Rimuovono effettivamente i residui nucleari e le proteine citoplasmatiche dai tessuti. Tendono a distruggere l'ultrastruttura della ECM, rimuovono i GAG e i GF.
<u>Detergenti Zwitterionici:</u> - <u>CHAPS</u> - <u>Sulfobetaina 10 e 16 (SB-10, SB-16)</u>	Hanno proprietà sia di detergenti ionici che non ionici. Efficiente rimozione cellulare	Distruzione dell'ECM simile a quella del Triton-100
<u>Tri(n-butil)fosfato (TBP)</u>	Solvente organico che distrugge le interazioni proteina-proteina. Rimozione cellulare variabile	Perdita di collagene sebbene gli effetti sulle proprietà meccaniche siano minimi
<u>Agenti chelanti:</u> - <u>EDTA</u> - <u>EGTA</u>	Questi agenti si legano agli ioni metallici proibendo l'adesione cellulare alla ECM. Tipicamente associati ai metodi enzimatici. Sono infatti inefficaci se utilizzati da soli.	Rimozione dei GAG dell'ECM

Tabella 1.1: Metodi ed agenti comunemente utilizzati per la *decellularizzazione* di organi e tessuti [2][8]

1.1.2.1 Metodi fisici

I metodi fisici che possono essere utilizzati per facilitare la *decellularizzazione* dei tessuti includono il congelamento/scongelamento, l'applicazione di pressione, l'agitazione meccanica e l'elettroporazione [2].

Mediante un congelamento rapido del tessuto si vengono a formare dei cristalli di ghiaccio all'interno delle cellule che causano la lisi cellulare in seguito alla rottura della membrana. I processi di congelamento e scongelamento distruggono in maniera efficace le cellule all'interno di organi e tessuti, ma i contenuti intracellulari e i residui di membrana rimangono se non si procede ad una loro rimozione mediante successivi processi. È stato anche osservato che un singolo ciclo di congelamento-scongelamento può ridurre le risposte immuni contrarie, come ad esempio le infiltrazioni di leucociti, e cicli ripetuti minimizzano la risposta immunitaria senza aumentare in maniera significativa la perdita di proteine di membrana dal tessuto [2]. Quindi tale processo ha delle minime conseguenze sull'ultrastruttura, sulle proprietà meccaniche della ECM e sul mantenimento delle proprietà meccaniche dei tessuti [8].

La pressione idrostatica richiede un tempo relativamente basso, risultando quindi più efficiente di detergenti o enzimi per la rimozione delle cellule [8].

L'elettroporazione prevede l'applicazione di pulsazioni elettriche della durata di microsecondi attraverso il tessuto e quindi attraverso le cellule del tessuto, provocando la formazione di micropori nella membrana cellulare a causa di una instabilità del potenziale elettrico. La presenza di questi micropori provoca una perdita dell'omeostasi e quindi la morte cellulare [9]. L'elettroporazione ha però alcuni limiti: le sonde sono relativamente piccole limitando quindi la dimensione del tessuto che può essere decellularizzato. Inoltre, poiché il meccanismo di rimozione cellulare è mediato dal sistema immunitario, il processo di *decellularizzazione* deve avvenire *in vivo*, limitando dunque le potenziali applicazioni. È sempre meglio associare una tecnica di perfusione per l'eliminazione dei residui lasciati dall'elettroporazione [8].

L'agitazione meccanica e la sonicazione sono state utilizzate in concomitanza a trattamenti chimici per l'eliminazione dei detriti cellulari in seguito a lisi cellulare. L'agitazione meccanica può essere ottenuta utilizzando, ad esempio, un piatto magnetico mescolante o uno "shaker". In entrambi i casi la velocità, la quantità di reagenti e la durata

dell'agitazione meccanica dipende dalla composizione, dal volume e dalla densità del tessuto da decellularizzare [2].

1.1.2.2 Metodi chimici

L'efficacia di un processo di *decellularizzazione* dipende da molti fattori tra cui la cellularità, la densità, il contenuto lipidico e lo spessore del tessuto. Poiché tutti gli agenti per la rimozione cellulare alterano la composizione della ECM, uno degli obiettivi della *decellularizzazione* è la minimizzazione di questi effetti indesiderati [8].

Gli acidi e le basi provocano o catalizzano la degradazione idrolitica delle biomolecole, solubilizzano la componente citoplasmatica delle cellule, rimuovono gli acidi nucleici come DNA e RNA. Ad esempio l'acido acetico, l'acido paracetico (PAA), l'acido solforico e l'idrossido di ammonio (NH_4OH) possono effettivamente distruggere le membrane cellulari e gli organelli intracellulari, ma allo stesso tempo dissociano importanti molecole come i GAG dai tessuti ricchi di collagene.

Le soluzioni ipertoniche saline dissociano il DNA dalle proteine, mentre quelle ipotoniche possono causare la lisi cellulare per effetti osmotici con minime conseguenze sull'architettura della matrice. Per ottenere un aumento dell'effetto osmotico è possibile sottoporre il tessuto a diversi cicli di immersione in una soluzione ipertonica e ipotonica in maniera alternata; tali soluzioni permettono inoltre un risciacquo del tessuto dai residui cellulari [8].

I detergenti non ionici, quelli ionici e quelli zwitterionici solubilizzano le membrane cellulari e dissociano il DNA dalle proteine, risultando molto efficienti nella rimozione dei residui cellulari dal tessuto decellularizzato. I detergenti non ionici distruggono l'interazione lipide-lipide e lipide-proteina, lasciando intatta però quella tra proteina e proteina. I detergenti ionici, invece, sono in grado di distruggere anche il legame proteina-proteina. Il Triton X-100 è il detergente non ionico maggiormente utilizzato grazie alle sue buone proprietà decellularizzanti soprattutto nei tessuti più spessi, dove i metodi enzimatici e osmotici non sono sufficienti.

Il sodio dodecil solfato (SDS), il sodio deossicolato e il triton X-200 sono invece i detergenti ionici di maggior impiego: il SDS rimuove la componente cellulare dal tessuto in maniera soddisfacente, ma tende a distruggere la struttura nativa del tessuto, provocando una diminuzione della concentrazione dei GAG e una perdita dell'integrità del

collagene, nonostante non sia stata dimostrata nessuna rimozione del collagene dal tessuto [8].

Anche il deossicolato ha effetti positivi sulla rimozione cellulare e dei residui, ma provoca una maggiore distruzione dell'architettura nativa del tessuto rispetto al SDS che, però, risulta essere il detergente che garantisce una maggiore rimozione della componente nucleare e cellulare, insieme ad un'eliminazione dei residui [8].

I detergenti zwitterionici presentano alcune proprietà dei detergenti ionici e altre dei detergenti non ionici, ma hanno la tendenza a denaturare le proteine. CHAPS, SB-10 e SB-16 sono solo alcuni degli agenti zwitterionici che vengono utilizzati nei processi di *decellularizzazione*.

Il Tri(n-butil)fosfato (TBP) è un solvente organico che viene comunemente utilizzato per inattivare i virus presenti nel sangue senza però compromettere l'attività dei fattori coinvolti nella coagulazione. Solo recentemente è stato usato come agente decellularizzante: presenta una buona capacità di rimozione delle componenti nucleari, senza apportare danni ad esempio alle fibre di collagene e senza provocare effetti negativi sul comportamento meccanico della ECM. E' per tale motivo che viene visto come un agente decellularizzante promettente [2].

Infine gli agenti chelanti, come EDTA e EGTA, sono molecole che formano un complesso molecolare a forma di anello che lega e isola uno ione metallico centrale; vengono utilizzate nel distacco delle cellule dal substrato proteico. Questo avviene grazie al sequestro da parte delle molecole strutturate ad anello, dei cationi bivalenti metallici, come ad esempio Ca^{2+} e Mg^{2+} , necessari per i legami di adesione cellulare al collagene e alla fibronectina in corrispondenza dei recettori RGD. Legando questi cationi divalenti, gli agenti chelanti facilitano la rimozione del materiale cellulare dal tessuto [2]. Sono tipicamente combinati ad altre sostanze in quanto, se operano da soli, la loro azione è inefficace. Ad esempio la EDTA viene utilizzata in combinazione alla tripsina.

Quando si procede con i metodi chimici è di primaria importanza assicurarsi di aver eliminato e rimosso qualunque residuo chimico dalla ECM in seguito al processo di *decellularizzazione*. Questi agenti potrebbero infatti risultare tossici per le cellule del tessuto ospite in seguito ad un impianto *in vivo* dello *scaffold* [8].

1.1.2.3 Metodi enzimatici

Le tecniche di *decellularizzazione* basate sui metodi enzimatici prevedono l'impiego di enzimi di digestione (proteasi) e di nucleasi.

La tripsina è uno degli enzimi proteolitici maggiormente presente nei protocolli di *decellularizzazione*. Rompe i legami peptidici all'estremità carbossilica dell'Arg e della Lys e la sua attività è ottimizzata a 37°C e a pH= 8 [2]. Poiché le proteine della ECM presentano una resistenza limitata alla tripsina, deve essere utilizzata con cautela. Rispetto ai detergenti risulta essere più distruttiva soprattutto nei confronti dell'elastina e del collagene, ma i tessuti trattati mostrano una maggiore conservazione del contenuto glicosamminoglicanico. Svolge un'azione più lenta in termini di rimozione cellulare e una *decellularizzazione* completa con la tripsina è quasi impossibile perché richiederebbe lunghi tempi di incubazione, anche in presenza di tessuti molto sottili. È per questo motivo che la tripsina viene utilizzata in combinazione ad altri agenti: l'enzima distrugge l'ultrastruttura del tessuto e migliora la successiva penetrazione di altri agenti decellularizzanti [8].

Le nucleasi, come le endonucleasi, catalizzano l'idrolisi dei legami interni delle catene ribonucleotidiche e deossiribonucleotidiche, mentre le esonucleasi catalizzano l'idrolisi dei legami terminali di deossiribonucleotide e ribonucleotide, provocando la degradazione di RNA e DNA [2].

È necessario assicurarsi che gli agenti enzimatici vengano rimossi in seguito al processo di *decellularizzazione*, in quanto una loro permanenza nel tessuto potrebbe provocare una risposta immunitaria avversa da parte dell'organismo ospite [2].

1.1.2.4 Protocolli di *decellularizzazione*

L'efficacia di un metodo o di un protocollo di *decellularizzazione* dipende dal tessuto da trattare. Diversi studi hanno mostrato che l'origine, la composizione e la densità del tessuto sono fattori che intervengono in maniera significativa sul successo di un processo di *decellularizzazione*. È per questo motivo che sarebbe opportuno studiare per ogni organo o tessuto un protocollo differente [2].

Gauss et al. [10] hanno infatti osservato che un protocollo basato solo sull'utilizzo della tripsina è inefficace quando si ha a che fare con la valvola aortica di topo. Lo stesso

trattamento, invece, applicato alla valvola polmonare porcina, garantisce una rimozione cellulare completa, come è stato dimostrato nello studio di Schenke-Layland et al. [11].

Inoltre la combinazione dei trattamenti fisici, chimici ed enzimatici migliorano l'efficacia dei protocolli di *decellularizzazione*.

A titolo esemplificativo sono riportati in Figura 1.3 diversi protocolli di *decellularizzazione*, che vedono appunto la combinazioni di differenti metodi.

Per ogni tessuto (pericardio, derma, tessuto adiposo, trachea e fegato) è stato formulato ed ottimizzato un protocollo di *decellularizzazione* specifico e la lunghezza delle frecce rappresenta la durata di ogni step del processo.

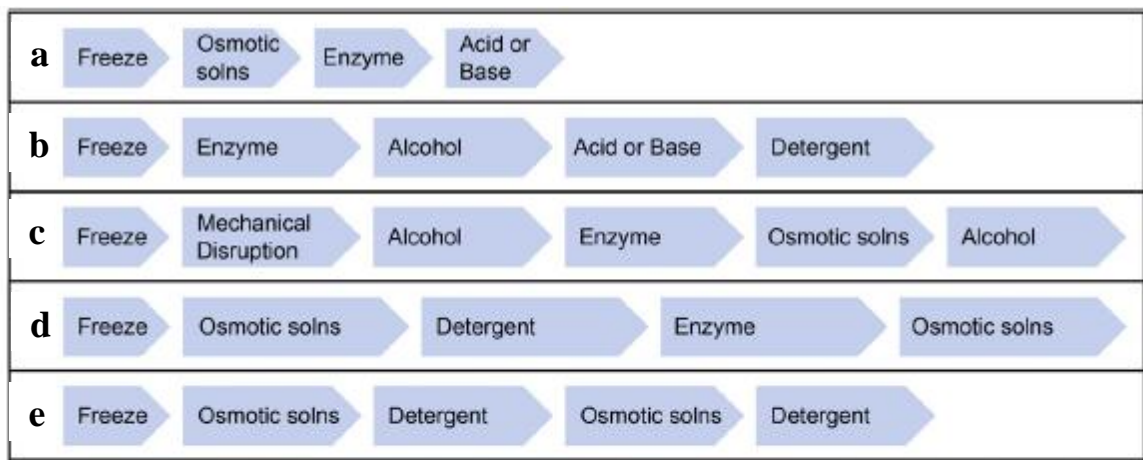


Figura 1.3: Esempi di protocolli di *decellularizzazione* per lamine sottili come il pericardio (a), per tessuti più spessi come il derma (b), per tessuti amorfi con presenza di grasso come il tessuto adiposo (c), per tessuti composti o semplici organi interi come la trachea (d) e organi vitali interi come il fegato (e) [8]

Dalla Figura 1.3 si può vedere come, in base al tessuto da trattare, il protocollo varia. Un'ulteriore osservazione è che nessun protocollo prevede l'applicazione di un solo metodo, bensì di una combinazione di metodi, anche quando si ha a che fare con lamine sottili come il pericardio (Figura 1.3a).

1.1.3 Tecniche di analisi del tessuto decellularizzato

Un'indagine post *decellularizzazione* è fondamentale soprattutto quando si vuole utilizzare il tessuto o l'organo decellularizzato come *scaffold* biologico. Le tecniche di analisi consentono di verificare il grado di *decellularizzazione* per valutare l'efficacia di un metodo rispetto ad un altro, l'efficienza di un particolare agente chimico o enzimatico o

semplicemente per dimostrare l'avvenuta rimozione cellulare da un organo o da un tessuto.

Quest'ultimo aspetto non è da trascurare in quanto la permanenza di materiale cellulare all'interno della ECM può provocare problemi di citocompatibilità *in vitro* e causare una risposta avversa del tessuto ospite *in vivo*.

L'ispezione visiva è la prima tecnica di analisi di cui ci si deve avvalere per verificare l'avvenuta *decellularizzazione* di un organo. Si tratta di un metodo del tutto qualitativo che, però, può essere utilizzato per effettuare una valutazione iniziale. Infatti gli organi decellularizzati assumono un colore bianco-trasparente come mostrato in Figura 1.4 dove viene rappresentato il fegato di topo, sottoposto ad un trattamento decellularizzante, in corrispondenza di tre diversi time point .

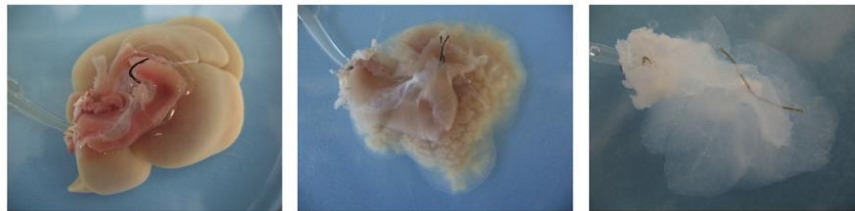


Figura 1.4: Fegato di topo sottoposto ad un processo di *decellularizzazione* [8]

Dall'immagine in Figura 1.4 si può vedere chiaramente come il colore dell'organo cambia notevolmente, passando da un colore rosa-marrone, tipico di organo nativo, ad un colore biancastro, tipico di un organo decellularizzato.

Un altro metodo per la determinazione del grado di *decellularizzazione* e quindi dell'efficacia del processo e del protocollo scelto, consiste nell'analisi istologica. L'istologia consente di mettere in evidenza la morfologia dei tessuti e delle cellule che li compongono, sia da un punto di vista morfologico che funzionale. Mediante questa tecnica si ottengono delle sezioni dei campioni che possono essere osservate al microscopio in seguito alla loro colorazione. Ad esempio una colorazione istologica standard con Ematossilina e Eosina (H&E) può essere utile come prima ispezione per determinare la presenza di strutture nucleari, mentre una colorazione Tricromica di Masson (TM) può rilevare la presenza di diverse molecole citoplasmatiche ed extracellulari, come ad esempio il collagene.

Una colorazione con elementi fluorescenti come DAPI permette di individuare i nuclei delle cellule che, ad un'osservazione microscopica, appaiono come puntini blu.

Nella Figura 1.5 è riportato un esempio di analisi istologica (a,b) e di colorazione fluorescente con DAPI (c,d) di sezioni ottenute da un fegato di topo sottoposto ad un processo di *decellularizzazione*. Viene fatto un confronto tra il campione nativo (Figura 1.5a, Figura 1.5c) e quello decellularizzato (Figura 1.5b, Figura 1.5d).

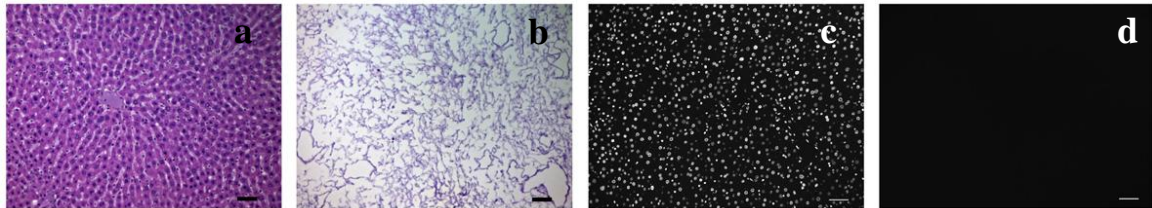


Figura 1.5: Immagini istologiche (a,b) e colorazione DAPI (c,d) di campioni ottenuti da un fegato di ratto sottoposto sottoposta a *decellularizzazione* [8].

Con una colorazione H&E è stato possibile individuare i nuclei cellulari che appaiono come dei puntini neri (Figura 1.5a). Si può notare facilmente che la seconda immagine (Figura 1.5b) è praticamente priva di questi puntini neri, se comparata con la prima, il che testimonia l'avvenuta rimozione cellulare.

Nelle ultime due immagini è stata effettuata una colorazione fluorescente con DAPI, che rileva la presenza dei nuclei cellulari. Come nel caso dell'analisi istologica, la prima figura (Figura 1.5c) presenta un elevato numero di puntini azzurri, indice della presenza cellulare, che risultano invece assenti nell'ultima immagine (Figura 1.5d), relativa ad un tessuto decellularizzato [8].

Oltre ad un'analisi visiva e istologica degli organi decellularizzati, se si vogliono avere dati più precisi riguardo al grado di rimozione cellulare, quello che si può fare è procedere con una quantificazione del DNA. Una comparazione tra la quantità di DNA nel campione nativo e in quello sottoposto a *decellularizzazione* è uno strumento valido per valutare l'efficacia del mezzo utilizzato, del protocollo in se e per valutare se realmente si può parlare di *decellularizzazione*.

Le tecniche di *decellularizzazione* non possono però rimuovere il 100% del materiale cellulare. Crapo et al. [8] hanno quantitativamente definito un valore limite relativo alla quantità di DNA permanente nel tessuto in seguito al processo di eliminazione cellulare. Affinchè il tessuto possa essere ritenuto decellularizzato è importante che questo limite

non venga oltrepassato: è necessario che l'organo decellularizzato presenti una quantità di DNA < 50 ng ogni mg di EMC [8].

Quindi la quantificazione del DNA nel tessuto trattato è utile sia per valutare l'efficacia della tecnica scelta sia per verificare che realmente l'organo sia stato decellularizzato.

Infine un test meccanico può verificare il mantenimento dell'integrità della struttura e delle caratteristiche meccaniche della matrice extracellulare in seguito a processo di rimozione cellulare [2].

1.1.4 Panoramica sullo stato dell'arte della *decellularizzazione* di organi complessi

Nei casi di malattie cardiache, epatiche e polmonari allo stadio terminale, il trapianto è l'unica soluzione ad oggi ritenuta valida. In questo contesto si inserisce l'ambiziosa proposta dell'ingegneria dei tessuti di rigenerare gli organi *in vitro*.

In letteratura si trovano numerosi studi che si pongono come obiettivo la rigenerazione di questi organi. Il primo step è, però, l'ottenimento dell'impalcatura, dello *scaffold* tridimensionale per la successiva semina delle cellule del paziente ricevente.

A titolo esemplificativo viene fatta una panoramica generale sullo stato dell'arte per quanto riguarda la *decellularizzazione* di cuore, fegato e polmoni, sintetizzando i lavori pubblicati più recentemente.

1.1.4.1 *Decellularizzazione epatica*

L'insufficienza epatica, soprattutto nella forma acuta, è una patologia che può portare al decesso in pochi giorni ed attualmente le possibilità di trattamento sono limitate. I pazienti spesso non sopravvivono per il tempo necessario al reperimento di un organo per il trapianto. Nel passato sono stati sviluppati sistemi passivi per la sostituzione temporanea della funzione epatica (emodialisi, plasmaferesi, emofiltrazione), senza ottenere però sostanziali miglioramenti della sopravvivenza di pazienti affetti da epatite fulminante.

Più recentemente sono stati sviluppati sistemi extracorporei per la sostituzione della funzione epatica basati sull'impiego di cellule epatiche. Si tratta del fegato bioartificiale che viene utilizzato per supportare pazienti in condizioni critiche, in attesa di trapianto. È un sistema extracorporeo di supporto epatico all'interno del quale viene inserita una componente biologica, ossia cellule epatiche sane messe in coltura su una matrice

sintetica. Le prime esperienze risalgono ad oltre trent'anni fa, quando si allestì un sistema basato sul principio dell'emodialisi con una sospensione di epatociti di ratto metabolicamente attivi. Due sono i principali sistemi di fegato bioartificiale attualmente utilizzati: il sistema ELAD (Extracorporeal Liver Assist Device), che utilizza come componente biologica epatociti umani, e il sistema BAL (BioArtificial Liver) che utilizza cellule epatiche porcine, in quanto il maiale è la specie più simile, dal punto di vista anatomico e fisiologico, all'uomo [12]. Il principio di funzionamento dei due sistemi è il seguente: il sangue intero o il plasma del paziente viene convogliato in un secondo circuito extracorporeo dove entra in contatto con cellule epatiche, umane o xenogeniche; passando attraverso questo sistema il sangue si detossifica e acquista proteine e glucosio, contribuendo così alla sintesi del fegato umano danneggiato. Sebbene in linea teorica questo sistema potrebbe rappresentare un'alternativa al trapianto, vi sono ancora delle complicazioni legate al mantenimento della funzionalità degli epatociti nella matrice e ai costi elevati [12].

In entrambi i sistemi, inoltre, rimane il rischio immunologico. ELAD infatti utilizza cellule umane allogeniche e vi è quindi il rischio di immunizzazione, analogamente a quanto avviene in un trapianto d'organo o tessuti. Nel BAL il rischio immunologico deriva dalla presenza nell'uomo di anticorpi naturali diretti contro antigeni porcini, che potrebbero essere causa di patologie immunitarie.

La scoperta che le cellule staminali epatiche potessero essere prelevate dal midollo osseo, ha aperto le porte ad una nuova soluzione basata sull'ingegneria dei tessuti, ossia alla possibilità di colonizzare un dato *scaffold* con le cellule del paziente stesso [13]. Con la *decellularizzazione* del fegato di un donatore, si otterrebbe uno *scaffold* costituito dalla ECM epatica, successivamente ripopolata con le cellule del paziente stesso. In questo modo i problemi di compatibilità e il rischio immunologico presenti nel BAL e nel ELAD scomparirebbero.

È importante prima di tutto individuare un protocollo di *decellularizzazione* che possa garantire allo stesso tempo la completa rimozione cellulare e il mantenimento della struttura delle ECM.

A titolo esemplificativo, Shupe et al. [13] hanno effettuato una *decellularizzazione* mediante la perfusione *in vivo* del fegato di ratto, seguendo un protocollo che consta di tre step e che vede l'utilizzo di agenti chimici.

Ai ratti, dopo essere stati sedati con una dose di sodio pentobarbitale pari a 100mg/kg, viene incannulata la vena cava inferiore (IVC), mentre la vena porta e la vena cava superiore (SVC) vengono clampate.

Il primo step consiste nella perfusione del fegato con 100ml di PBS (pH=7.4) per la rimozione di tutto il sangue e per evitare la formazione di coaguli. È una semplice fase di lavaggio in cui lo schiarimento dell'organo è dovuto solo ed esclusivamente all'eliminazione del sangue (Figura 1.6A). Un successivo trattamento con 300 ml di Triton X-100, mediante una pompa peristaltica (5ml/min), garantisce la solubilizzazione dei lipidi (Figura 1.6B), ma solo il terzo step, ossia la perfusione con una soluzione costituita da 300ml di PBS e contenente lo 0.1% di SDS, permette l'eliminazione dei residui nucleari (Figura 1.6C).

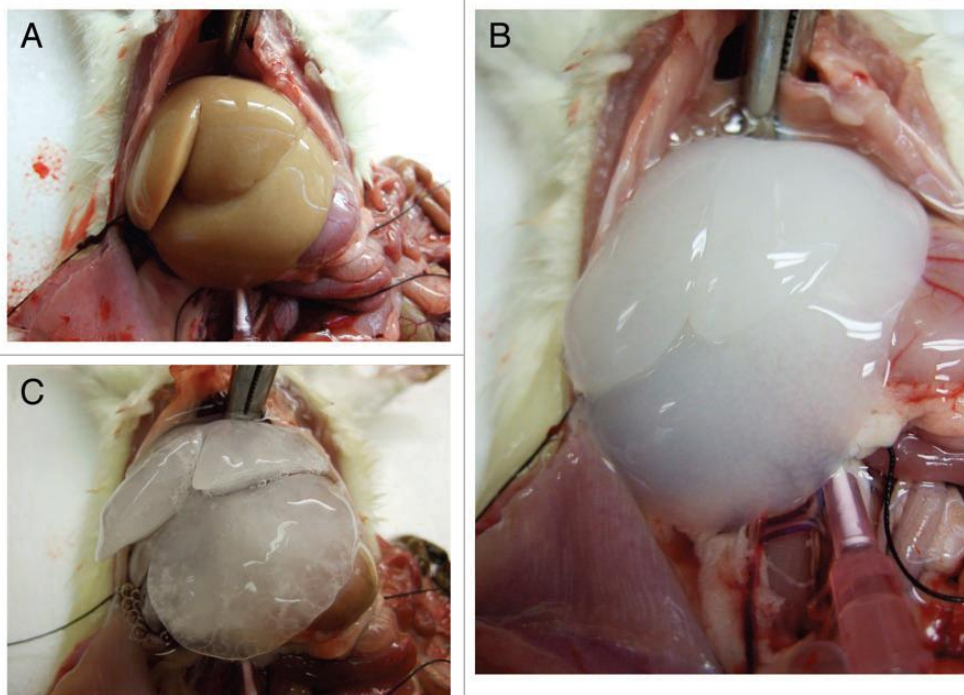


Figura 1.6: Schiarimento progressivo del fegato (da A a C) mano a mano che si procede con la *decellularizzazione* [13]

Nonostante visivamente il fegato appaia decellularizzato sia dopo la perfusione con Triton X-100 (Figura 1.6B) che dopo la perfusione con SDS (Figura 1.6C), una colorazione con DAPI rivela la presenza di strutture nucleari intatte all'interno della matrice alla fine del secondo step. Solo una successiva perfusione dell'organo con una soluzione contenente

SDS garantisce una rimozione del DNA rimanente [14]. Shupe et al. hanno dunque sviluppato un metodo molto semplice per rimuovere la componente cellulare da un fegato intatto di ratto e una colorazione con Ematossilina e Eosina delle sezioni di fegato, rivela l'assenza di nuclei cellulari che solitamente appaiono come puntini neri, come si può osservare nella figura seguente (Figura 1.7).

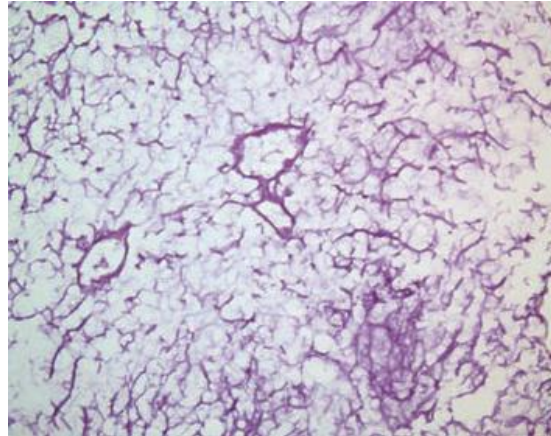


Figura 1.7: Immagine istologica relativa ad una sezione di fegato decellularizzato con il protocollo di Shupe et al. [13]

Un protocollo di *decellularizzazione* epatica alternativo è stato proposto da Uygun et al. che, nel loro studio, hanno ottenuto un intero organo decellularizzato solamente mediante la sua perfusione con SDS, dopo estrazione. Mediante l'incannulazione della vena porta, viene fatta fluire la soluzione decellularizzante all'interno del fegato e dopo 72 ore si ottiene uno *scaffold* trasparente che ha mantenuto la sua forma e la sua struttura tipica [14]. Visivamente si può osservare una progressiva perdita di colore da parte del fegato che arriva ad assumere un colore traslucido alla fine del processo di *decellularizzazione* (Figura 1.8).

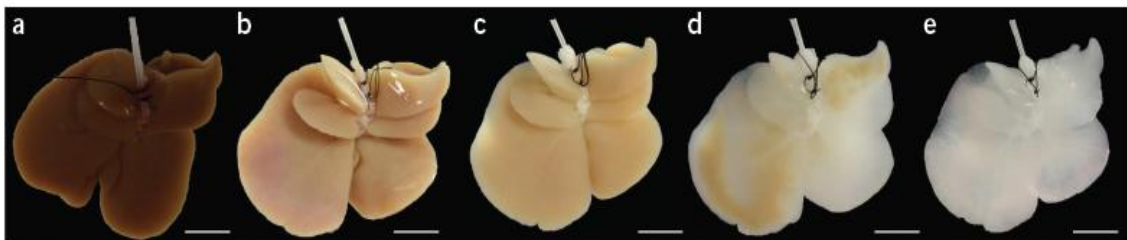


Figura 1.8: *Decellularizzazione* di un fegato di ratto, ottenuta mediante l'incannulazione della vena porta e la perfusione con una soluzione detergente (SDS) a 0h (a), a 18h (b) a 48h (c), a 52h (d) e a 72h (e) [14].

Una valutazione istologica rivela inoltre un'assenza di nuclei nell'organo decellularizzato rispetto a quello normale, come possibile osservare in Figura 1.9. Una colorazione con H&E, infatti, permette la visualizzazione di nuclei sotto forma di puntini scuri nell'organo nativo (Figura 1.9a), che scompaiono invece nell'organo privo di cellule (Figura 1.9b).

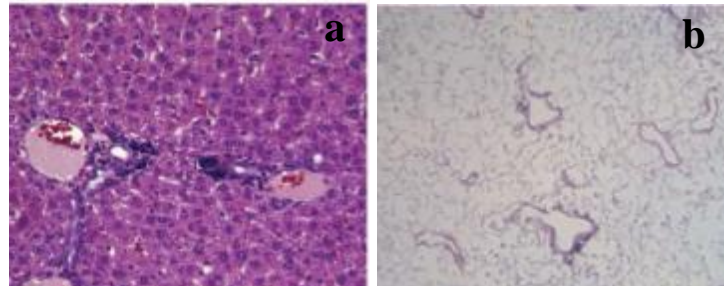


Figura 1.9: Confronto istologico di una sezione epatica nativa (a) ed una decellularizzata con il protocollo di Uygun et al [14]

La totale *decellularizzazione* è infine testimoniata dall'assenza di puntini azzurri fluorescenti che compaiono nelle sezioni in seguito a colorazione con DAPI (Figura 1.10). Quello che si può inoltre notare dall'osservazione delle immagine fluorescenti, è che la matrice di collagene è rimasta pressoché intatta in seguito alla *decellularizzazione*.

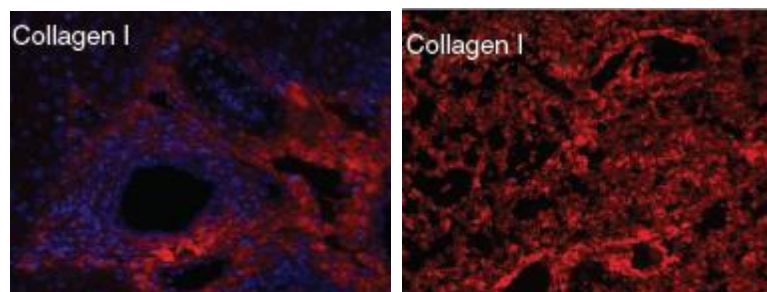


Figura 1.10: Immagini fluorescenti di un campione epatico nativo (a) e di uno decellularizzato con il protocollo di Uygun et al. (b). I puntini rappresentano i nuclei cellulari, le sezioni rosse si riferiscono al collagene [14].

Infine, un altro aspetto di grande importanza è il mantenimento della rete vascolare che rimane immutata, come è possibile osservare in Figura 1.11.

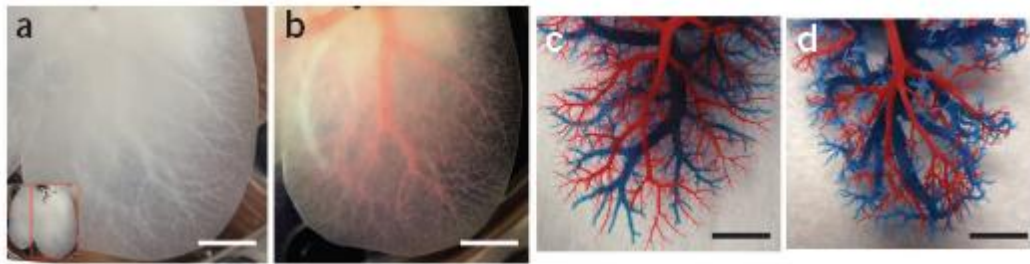


Figura 1.11: Mantenimento della struttura e della rete vascolare epatica. Lobulo sinistro laterale e lobulo mediano decellularizzato (a). Albero vascolare visibile in seguito ad una perfusione con il colorante rosso Allura (b). Nella figura 8c e 8d è rappresentata la vascolatura arteriosa (rossa) e venosa (blu) [14].

Per dimostrare che il protocollo di *decellularizzazione* garantisce il mantenimento della funzionalità del letto vascolare, i vasi sono stati perfusi con un colorante rosso, iniettato nella vena porta. Un'ulteriore colorazione della rete arteriosa e venosa, rispettivamente in rosso e in blu, mostra come sia la macro che la microvascolarizzazione restano intatte in seguito al processo di *decellularizzazione* [14].

A titolo esemplificativo viene riportato un terzo protocollo di *decellularizzazione* utilizzato da Baptista et al. [15] per l'ottenimento di uno *scaffold* biologico che mantenga la struttura epatica e che possa essere successivamente ricellularizzato.

I fegati sono stati rimossi dai cadaveri di diverse specie animali e la vena porta è stata incannulata e connessa ad una pompa, mediante la quale è stata fatta fluire acqua distillata (5ml/minuto) in modo da eliminare la componente ematica. Un secondo step è consistito nella perfusione del fegato con una soluzione di Triton X-100 (1%) più Idrossido di Ammonio (0.1%). Un'ultima perfusione con acqua distillata ha garantito la rimozione dei residui chimici [15].

Le tre immagini di Figura 1.12 rappresentano lo stato del fegato di furetto, sottoposto al processo di *decellularizzazione* di Baptista et al. [15], in corrispondenza di tre time point: 0 minuti, 20 minuti e 120 minuti. Da un'analisi visiva è chiara la progressiva perdita di colore del fegato con l'avanzamento del tempo di perfusione.



Figura 1.12: Fegato di furetto sottoposto ad un processo di decellularizzazione secondo il protocollo di Baptista et al. Viene riportato lo stato dell'organo in corrispondenza di tre time points: 0 minuti, 20 minuti e 120 minuti [15].

Una conferma dell'avvenuta *decellularizzazione* è data dalle immagini istologiche (Figura 1.13) in cui, mediante due colorazioni differenti (H&E in Figura 1.13a e Tricomico di Masson in Figura 1.13b) si rileva un'assenza della componente cellulare ed un mantenimento della composizione proteica della matrice [15].

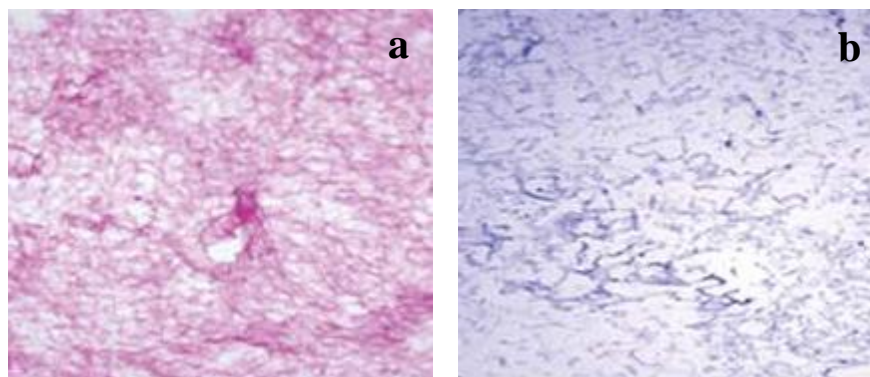


Figura 1.13: Colorazione con H&E (a) e Tricomico di Masson (b) della sezione epatica decellularizzata con il protocollo di Baptista et al. Assenza di residui cellulari e mantenimento della parte proteica della ECM, rappresentate dalle parti rosse in a e blu in b [15].

1.1.4.2 *Decellularizzazione cardiaca*

Nel 2008 negli Stati Uniti circa cinque milioni di persone erano affette da disturbi cardiaci e circa 550.000 nuovi casi venivano diagnosticati annualmente [16].

Il trapianto cardiaco rimane tuttora l'unico trattamento possibile in presenza di gravi patologie che vedono la compromissione del cuore, che non è dunque più in grado di svolgere la sua funzione.

Anche in questo caso uno dei problemi principali è la scarsa disponibilità di organi e della qualità della vita del paziente in seguito ad un trapianto, in termini di rischio di rigetto e di necessità di una terapia immunologica a vita.

Una delle alternative è la generazione di un organo “nuovo” e funzionante, ricavato applicando i principi dell’ingegneria dei tessuti, ottenendo quindi uno *scaffold* biologico mediante un processo di *decellularizzazione* da coltivare con le cellule autologhe del paziente, al fine di evitare qualunque problema legato al rigetto e garantendo una migliore qualità della vita per il ricevente dell’organo stesso [16].

Per l’ottenimento di uno *scaffold* cardiaco, che abbia una geometria tridimensionale e un sistema di vascolarizzazione intatto, Ott et al. [16] hanno effettuato una perfusione coronarica, per un tempo di circa 12 ore, di 140 cuori prelevati da cadaveri di ratto con tre differenti soluzioni in alternativa: sodio dodecilfosfato (SDS), polietilene glicolico (PEG) e Triton X-100.

Hanno confrontato dunque diversi metodi di *decellularizzazione* ottenuti al variare della componente del detergente.

Come osservabile in Figura 1.14, i cuori, man mano che si procede con la perfusione, acquistano un aspetto traslucido, segno un una graduale rimozione cellulare.

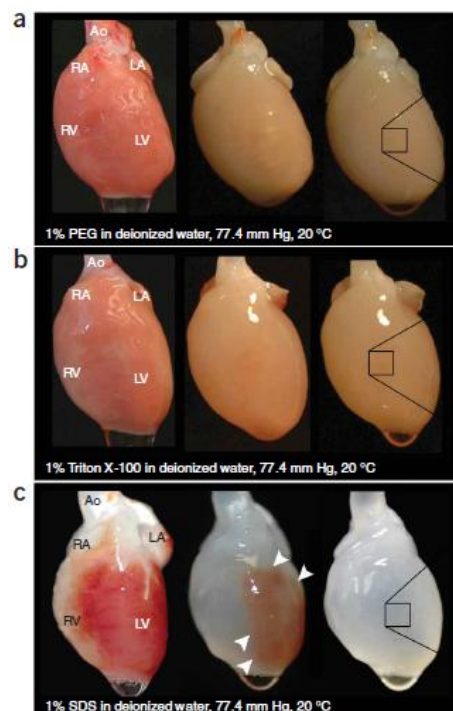


Figura 1.14: Perfusione di cuori di ratto con PEG (a), con Triton X-100 (b) e con SDS (c) [16]

I risultati hanno però dimostrato che l’uso di SDS (fig.10c) è più vantaggioso per la rimozione del DNA, delle strutture proteiche intracellulari e di tutte le componenti

intracellulari, rispetto al PEG (Figura 1.14a) e al Triton X-100 (Figura 1.14b). Basti vedere infatti il colore assunto dai cuori nei tre casi per comprendere che solo con l'utilizzo di SDS (Figura 1.14c), si ottiene un organo di colore bianco, indice di un'avvenuta *decellularizzazione*. In questo caso la colorazione del tessuto cardiaco varia al progredire del processo di *decellularizzazione*: il cuore diviene sempre più traslucido man mano che il materiale cellulare viene allontanato dal ventricolo destro, poi dagli atri ed infine dal ventricolo sinistro.

Anche una colorazione istologica con H&E conferma questo risultato, come osservabile in Figura 1.15: i cuori trattati con PEG (Figura 1.15a) e Triton X-100 (Figura 1.15b) mostrano una *decellularizzazione* incompleta, testimoniata dalla presenza di nuclei e miofibre, mentre l'immagine istologica relativa al cuore perfuso con SDS (Figura 1.15c) rileva la totale assenza di elementi cellulari, a dimostrazione dell'efficace *decellularizzazione* ottenuta [16].

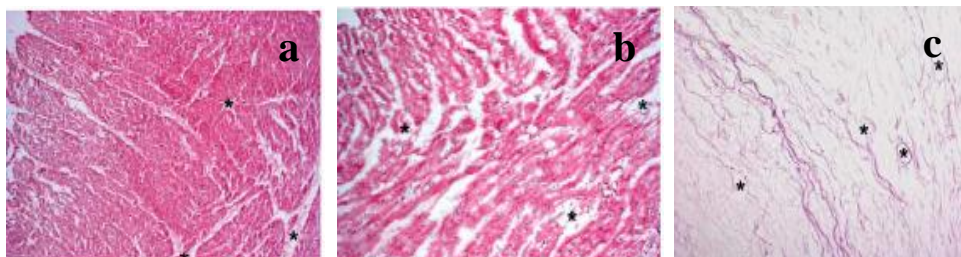


Figura 1.15: Colorazioni H&E di sezioni cardiache provenienti da cuori trattati con PEG(a), TritonX-100(b) e SDS (c). Gli asterischi neri mostrano i condotti vascolari che si sono mantenuti in seguito al processo di *decellularizzazione* [16]

In tutti e tre i casi, permangono intatte le fibre di collagene di tipo I e III, la laminina, la fibronectina del cuore originale, sia in termini di composizione che di orientazione.

Infine un'immunofluorescenza delle sezioni cardiache trattate con SDS (Figura 1.16), conferma una completa *decellularizzazione* del cuore che in questa immagine specifica è testimoniata dall'assenza di puntini blu e quindi di nuclei, di actina (rosso) e di miosina (verde) [16].

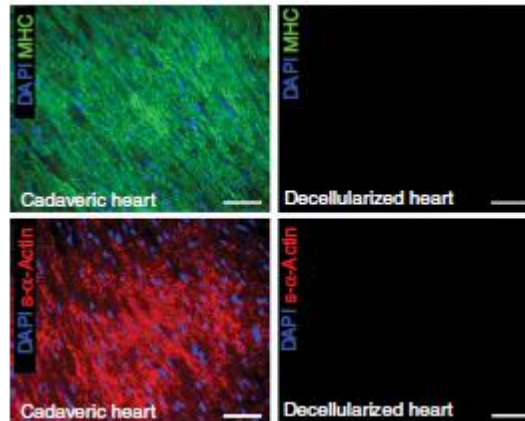


Figura 1.16: Immunofluorescenza di una sezione cardiaca normale molto sottile (immagini a sinistra) con corrispondenti sezioni decellularizzate (destra). Evidente l'assenza di puntini blu fluorescenti (nuclei cellulari), parti verdi (catene pesanti dell' α -miosina) e parti rosse (α actina) nelle sezioni decellularizzate [16].

Weymann et al. [17] hanno invece studiato un protocollo di *decellularizzazione* specifico per cuori porcini. È infatti vero che non si può definire un protocollo universale, in quanto sono in gioco differenti variabili che influenzano notevolmente il processo di rimozione cellulare; basti pensare alla maggiore dimensione di un cuore porcino rispetto a quello di ratto per capire facilmente che la quantità di detergente o il tempo di perfusione del secondo non saranno sufficienti per una completa *decellularizzazione* del primo.

Nel loro studio Weymann et al. [17] hanno prelevato il cuore da dodici scrofe di razza Landrace tedesca. Questi organi, dopo essere stati eparinizzati per la rimozione dei coaguli di sangue, lavati con una soluzione di PBS e antibiotico (1.5L/min per 24 ore) e incubati tutta la notte in un mezzo di coltura (Modified Eagle's Medium) a 4°C, sono stati connessi uno alla volta al sistema riportato in Figura 1.17[17].

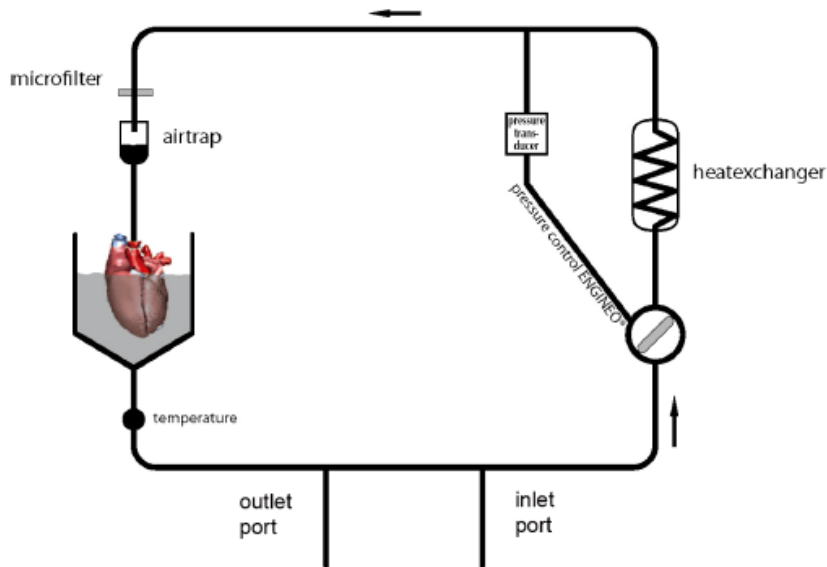


Figura 1.17: Diagramma schematico riguardante un modello per la *decellularizzazione* cardiaca porcina. [17].

Tutti i componenti del sistema sono stati sterilizzati in autoclave prima dell'utilizzo e connessi con tubi di silicone.

La perfusione avviene mediante l'aorta, grazie alla connessione del vaso con una cannula e di quest'ultima alla pompa roller. Durante tutto il processo la temperatura viene mantenuta costante a 37°C per mezzo di uno scambiatore di calore. Il funzionamento della pompa roller è controllato da un sistema computerizzato che è in grado di monitorare costantemente la pressione di perfusione, che viene mantenuta a 100 mmHg. La soluzione detergente circolante, PBS+4%SDS a 2 L/min per 12 ore, viene rinnovata ad ogni passaggio. Durante questo processo i cuori vengono lavati per 15 minuti con PBS ogni tre ore per rimuovere i residui. La fase finale di lavaggio, in seguito al trattamento con SDS, prevede un trattamento con PBS per altre 24 ore (1.5 L/min) per l'eliminazione dell'agente chimico e dei detriti cellulari. La Figura 1.18 mostra un cuore nativo (Figura 1.18A) e un cuore sottoposto al processo di *decellularizzazione* di Weymann et al. (Figura 1.18B) [17].

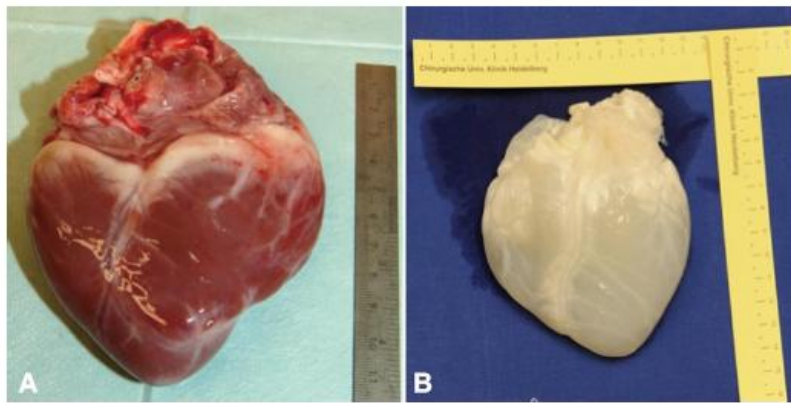


Figura 1.18: Rappresentazione macroscopica di un cuore porcino prima (A) e dopo 12 ore di perfusione con l'agente decellularizzante (B) [17].

Non ci sono danni evidenti alla struttura del cuore e la morfologia delle strutture risulta normale, come viene confermato dalle immagini in Figura 1.19 in cui vengono mostrati nel dettaglio la valvola aortica (A), la valvola polmonare (B), la valvola mitrale (D) [17].

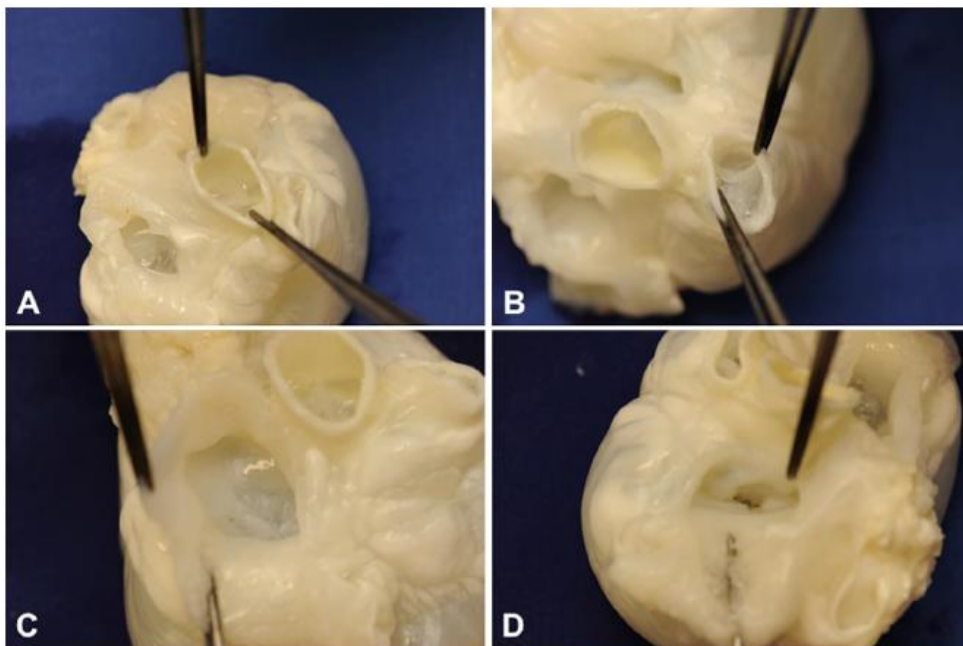


Figura 1.19: Immagini relative ad un cuore decellularizzato con il processo di Weymann che come evidenziano queste foto non ha apportato nessun danno a livello strutturale e morfologico. La valvola aortica (A), la valvola polmonare (B), la valvola tricuspide (C), la valvola mitrale (D) risultano infatti intatti [17].

Dal punto di vista microscopico un'analisi istologica e un'immunofluorescenza confermano quello che già visivamente era stato osservato: il cuore risulta privo di

qualsiasi componente cellulare, come testimoniato dall'assenza di nuclei in seguito a colorazione con DAPI e con H&E (Figura 1.20)[17].

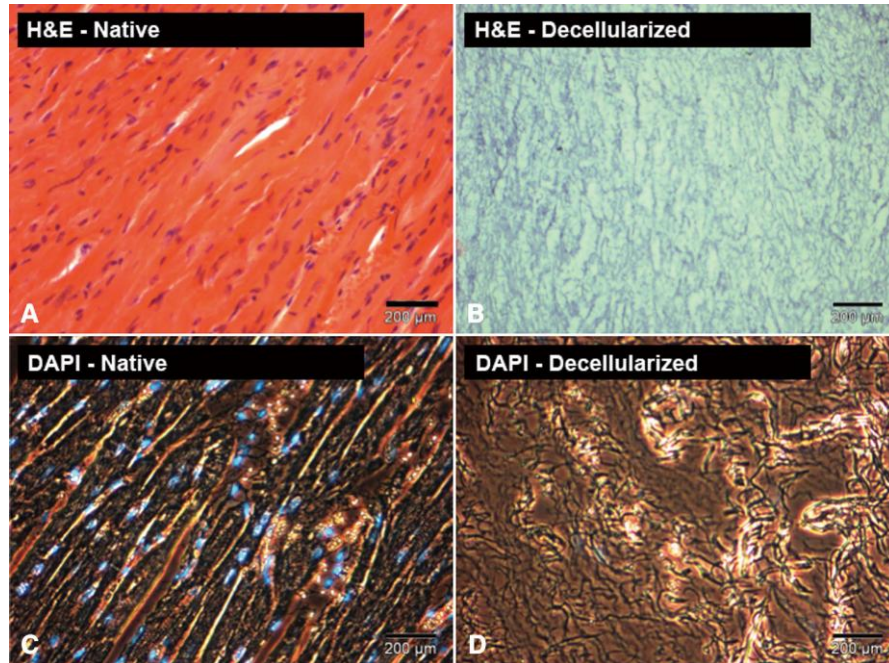


Figura 1.20:Colorazione con H&E e con DAPI del tessuto ventricolare con assenza di componente nucleare in seguito alla *decellularizzazione*. H&E del ventricolo normale (A) e decellularizzato (B); DAPI del ventricolo nativo (C) e decellularizzato (D) [17].

L'estrazione del materiale genetico da un cuore nativo da uno decellularizzato, hanno riportato il seguente risultato quantitativo (Figura 1.21). È stata paragonata la quantità di DNA (ng DNA/mg tessuto) in un campione normale (circa 10-15mg) con quella in una campione decellularizzato secondo il protocollo di Weymann [17].

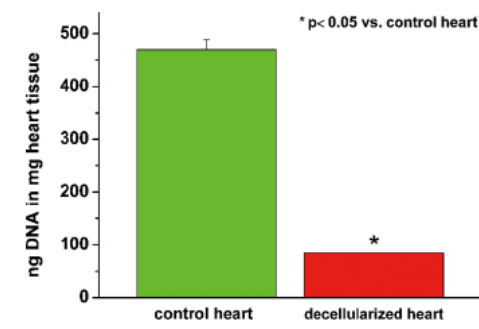


Figura 1.21:Risultati relativi ad un'analisi quantitativa. Il contenuto totale di DNA diminuisce significativamente in seguito alla *decellularizzazione* [17].

Tra i valori di DNA estratti dalle due popolazioni viene riscontrata una differenza statisticamente significativa ($p < 0.05$), indice dell'efficacia della tecnica di rimozione cellulare [17].

1.1.4.3 Decellularizzazione polmonare

Le patologie polmonari come il tumore o le malattie ostruttive croniche, causano ogni anno 280.000 morti; ad esempio le malattie polmonari ostruttive sono ad oggi la quarta causa di morte negli Stati Uniti. I polmoni sono totalmente privi di meccanismi riparativi e non si rigenerano a livello cellulare. È per questo motivo che la rigenerazione *in vitro* costituirebbe una soluzione molto interessante alle innumerevoli patologie che lo riguardano.

In uno studio Calle et al. [18] hanno sottoposto i polmoni, estratti da ratti adulti, ad un processo *decellularizzazione* che lasciasse intatte le ramificazioni gerarchiche delle vie aeree, assicurando allo stesso tempo l'integrità del sistema vascolare e della membrana basale, composta da collagene di tipo IV, laminina e fibronectina [18]. A tale scopo è stato utilizzato un bioreattore come quello di Figura 1.22:

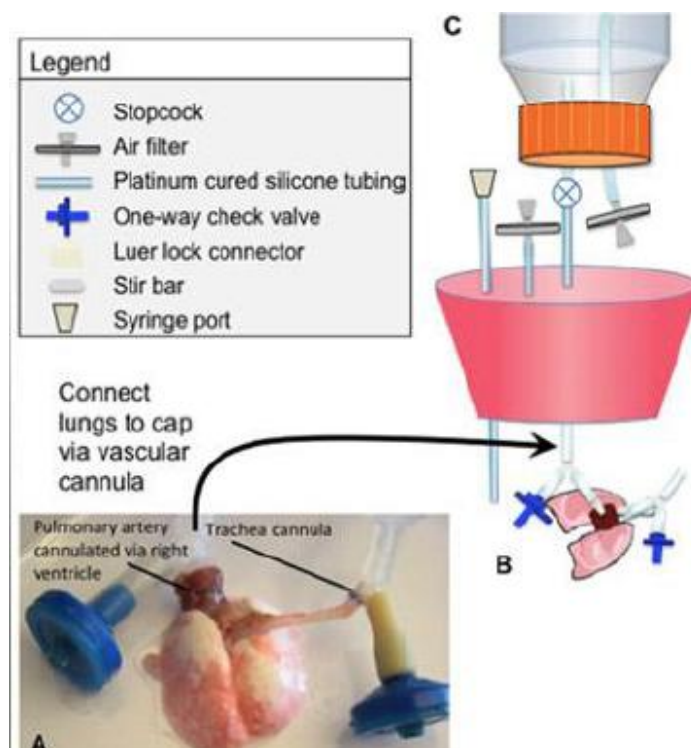


Figura 1.22: Modello di bioreattore utilizzato per la *decellularizzazione* del polmone [18]

Questo sistema presenta una doppia connessione: la cannula posizionata nell'arteria polmonare viene connessa al circuito di perfusione, mentre una seconda cannula, posizionata nella trachea, viene regolata in apertura e chiusura da una valvola che è libera di muoversi.

I polmoni vengono d'apprima perfusi con una soluzione di PBS/nitroprussiato di sodio (SNP), dopodichè con 500 ml di soluzione decellularizzante costituita da CHAPS (8mM), NaCl (1ml) e EDTA (25Mm), il tutto in PBS. Inizialmente la portata di perfusione è molto bassa (≈ 0.2 ml/min), per poi aumentare rapidamente durante la seconda ora (≈ 1 ml/min), per una durata totale del trattamento pari a 2.5 ore.

Le immagini istologiche attestano che la *decellularizzazione* dell'organo è avvenuta (Figura 1.23).

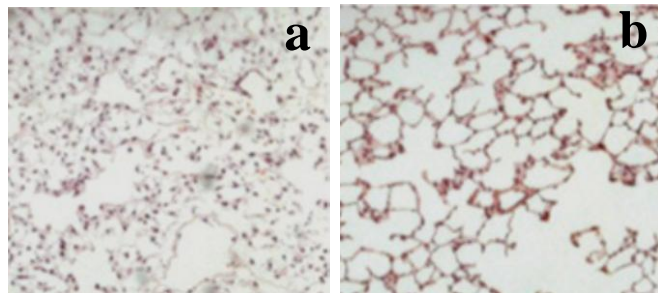


Figura 1.23: Immagini istologiche relative ad una sezione polmonare nativa (a) e ad una decellularizzata secondo il protocollo di Calle et al. Colorazione H&E [18]

Una colorazione con H&E indica l'assenza di residui cellulari nei polmoni decellularizzati (Figura 1.23b), che invece sono presenti nel campione nativo (Figura 1.23a), utilizzato come controllo.

1.1.5 Panoramica dello stato dell'arte sulla *decellularizzazione* esofagea

Il cancro esofageo provoca ogni anno negli Stati Uniti circa 400.000 morti ed è la sesta causa principale di morte. Nella maggior parte dei casi richiede la rimozione chirurgica dell'esofago, detta esofagectomia [19].

Esistono differenti strategie per la ricostruzione dell'esofago; una di queste prevede l'utilizzo del condotto dello stomaco, del colon o dell'intestino tenue per il ripristino esofageo.

A questa soluzione è associata però una morbilità postoperatoria legata a malnutrizione, infezioni e complicazioni polmonari, del 40% [19]. Inoltre questi sostituti non possono compensare completamente la funzione esofagea.

Un'ulteriore approccio prevede il trapianto con i limiti ad esso connessi [20].

Per questi molteplici motivi si è cercato di trovare delle soluzioni alternative che vedono l'utilizzo di materiali sintetici come il Dacron, il Vicryl e il politetrafluoroetilene (PTFE). Queste protesi, però, presentano dei limiti quali la rottura e la stenosi che porterebbero inevitabilmente al fallimento del sostituto.

Una soluzione per ovviare ai problemi correlati all'uso dei materiali artificiali potrebbe essere l'uso di *scaffold* naturali, ottenuti con la *decellularizzazione* dell'esofago [20].

Marzaro et al. [21], in uno studio del 2006, hanno proposto un protocollo per la *decellularizzazione* di esofagi suini. Il processo di *decellularizzazione* prevede una fase preliminare che comprende quattro lavaggi in una soluzione di PBS più il 4% di fluido amniotico (AF). I campioni vengono in seguito trattati in sequenza con: acqua distillata per 72 ore ad una temperatura di 4°C, sodio deossicolato (4%) per 4 ore ed infine con una soluzione di NaCl (1M) più 2000kU di DNase I per tre ore. Questo processo viene ripetuto cinque volte e l'assenza di cellule in seguito alla *decellularizzazione* viene confermata da un'analisi istologica mediante una colorazione con H&E (Figura 1.24) [21].

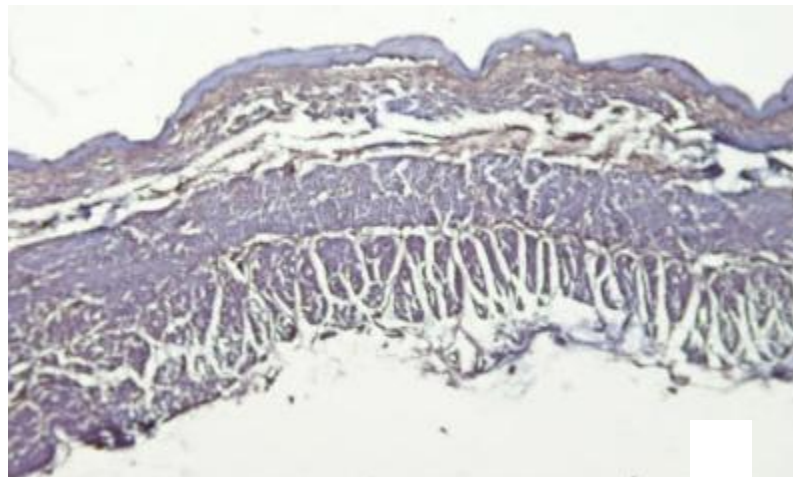


Figura 1.24: Sezione trasversale (5µm) della matrice decellularizzata mediante il trattamento chimico-enzimatico di Marzaro et al. [21]

Dall'osservazione delle immagini istologiche, come quella di Figura 1.24, si evince che il metodo di *decellularizzazione* descritto garantisce una rimozione della componente

cellulare, testimoniata dall'assenza di puntini neri, preservando però l'integrità della matrice [21].

Ozeki et al. [20] nel loro studio hanno valutato in maniera critica gli effetti che differenti tecniche di *decellularizzazione* hanno sull'integrità architettonica e strutturale della ECM acellulare [20].

Gli esofagi sono stati ottenuti da ratti Wistar adulti e sono stati isolati e mantenuti in condizioni di sterilità (PBS+1% antibiotico-antimitotico) e trattati seguendo due diversi protocolli di *decellularizzazione*, che vedono l'impiego di acido desossicolico (DEOX) e di Triton X-100. Il DEOX è un detergente anionico che solubilizza le proteine di membrana e i componenti intracellulari, mentre il Triton X-100 è un detergente molto potente la cui azione chimica potrebbe danneggiare la struttura della matrice.

Nel primo caso i campioni vengono prima trattati con una soluzione di PBS più 1% di sodio azide per 12 ore e poi agitati in una soluzione di PBS più il 4% DEOX più lo 0.1% di sodio azide per 24 ore a 37°C. L'ultimo step prevede infine il trattamento con una soluzione di PBS + NaCl 1M + 0.2 mg/ml DNase per 12 ore a 37°C [20].

Nel secondo caso (Triton X-100), invece, gli esofagi sono sottoposti a continua agitazione in una soluzione di PBS + 1% Triton X-100 + 0.02% di acido etilendiammintetracetico con 20µg/ml di RNase A e 0.2mg/ml DNase I per 72 ore a 37°C [20].

Mediante un'ispezione visiva e un confronto con l'esofago nativo (Figura 1.25A), si può riscontrare un aumento del diametro sia degli esofagi trattati con DEOX (Figura 1.25B) che di quelli trattati con Triton X-100 (Figura 1.25C). E' inoltre evidente il cambio di colore degli esofagi decellularizzati, anche se vi è una sostanziale differenza tra il colore assunto dall'esofago trattato con DEOX (Figura 1.25B) e quello trattato con Triton X-100 (Figura 1.25C), che appare più trasparente [20].



Figura 1.25: Vista macroscopica di un esofago nativo di topo (A), di un esofago decellularizzato con DEOX (B) e di uno trattato con Triton X-100 (C) [20].

Si è poi ricorsi ad un'analisi istologica per valutare l'effettiva rimozione cellulare e lo stato della matrice in seguito al processo di *decellularizzazione*. Sono state dunque messe a confronto delle sezioni istologiche di esofago nativo (Figura 1.26A,D), trattato con DEOX (Figura 1.26B,E) e trattato con Triton X-100 (Figura 1.26C,F). Un esofago nativo presenta differenti strati cellulari quali l'epitelio (EP), la lamina propria, la submucosa (SM) e lo strato muscolare (M) (Figura 1.26A). Gli esofagi decellularizzati presentano tutti gli strati tipici di un esofago nativo, ad eccezione dell'epitelio. Il mantenimento della ECM negli esofagi decellularizzati viene valutato mediante una colorazione Tricromica di Masson (Figura 1.26E, Figura 1.26F), che consente di osservare che la struttura extracellulare viene preservata maggiormente negli esofagi trattati con DEOX rispetto a quelli trattati con Triton X-100, soprattutto per quanto riguarda la submucosa (SM) e lo strato muscolare (M) [20]. Infine gli esofagi trattati con entrambi i metodi non mostrano evidenze di residui cellulari, come testimoniato dall'assenza di puntini neri nella Figura 1.26C, nella Figura 1.26D, nella Figura 1.26E e nella Figura 1.26F.

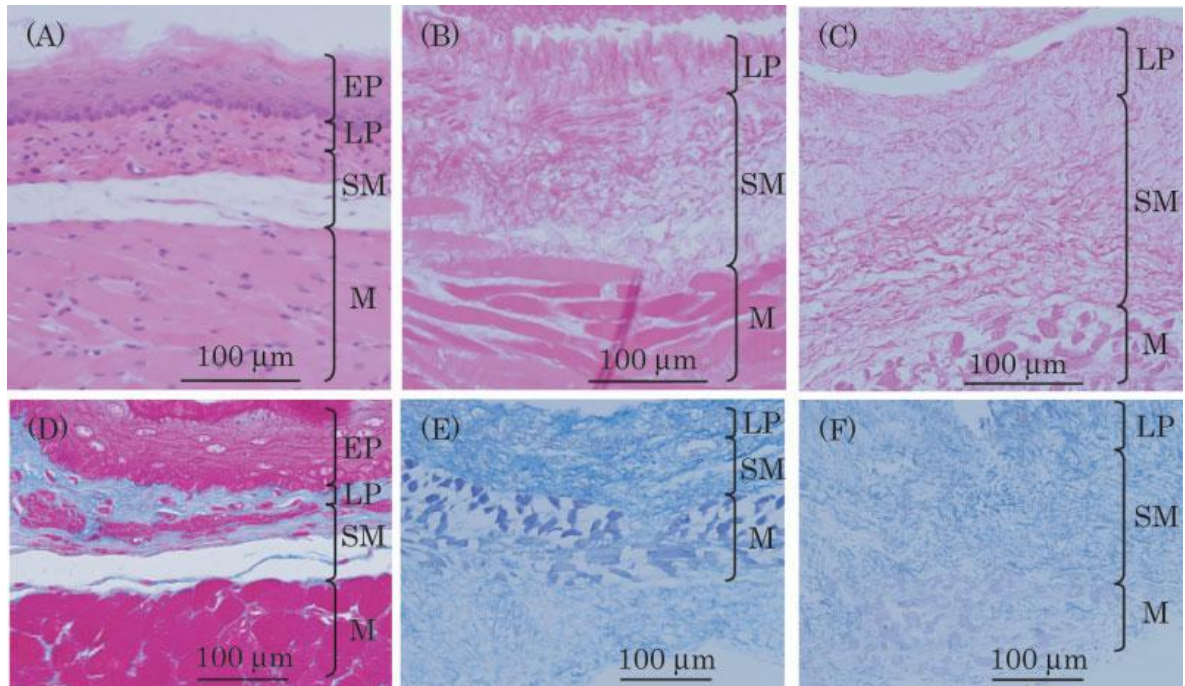


Figura 1.26: Colorazione con H&E di un esofago di ratto nativo (A), decellularizzato con DEOX (B) e con Triton X-100(C). Colorazione con Tricromica di Masson di un esofago di ratto nativo (D), decellularizzato con DEOX (E) e con Triton-100 (F) [20].

Infine un'estrazione del DNA dai campioni decellularizzati rivela che il contenuto di DNA misurato negli organi trattati con DEOX risulta essere molto inferiore rispetto a quello ottenuto dagli esofagi decellularizzati con Triton X-100. La differenza tra i due contenuti di DNA è statisticamente significativa ($p < 0.05$): $0.14 \pm 0.074 \mu\text{g}/\text{mg}$ nell'esofago trattato con DEOX e $2.41 \pm 1.82 \mu\text{g}/\text{mg}$ per quanto riguarda l'esofago trattato con Triton X-100 [20].

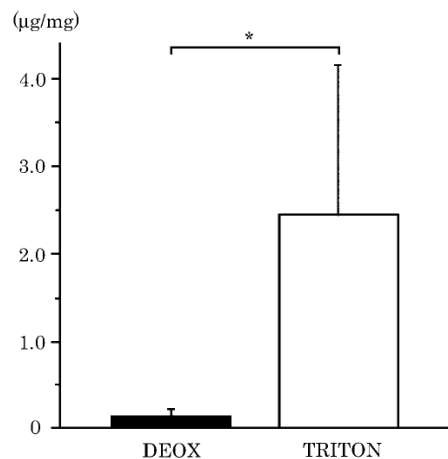


Figura 1.27: Stima del DNA di un esofago decellularizzato con DEOX e con Triton X-100 (*= $p < 0.05$) [20]

La quantità di materiale genetico estratta dall'esofago decellularizzato con Triton X-100 è molto elevata. Dal valore ottenuto, infatti, si direbbe che nell'organo sia rimasta una grande quantità di materiale cellulare, nonostante le immagini istologiche suggeriscano l'esatto contrario.

Un protocollo di *decellularizzazione* alternativo è stato proposto da Bhrany et al. [22] per l'ottenimento di una matrice esofagea decellularizzata che preservasse sia la struttura che la funzione della ECM. A tale scopo sono stati prelevati 344 esofagi da ratti Fisher e mantenuti in condizioni di sterilità mediante il lavaggio in una soluzione di PBS contenente 100 U/ml di penicillina G, 100µg/ml di streptomina e 0.025µg di amfotericina B. Il protocollo ottimizzato da Bhrany et al [22] consta di sette step, di cui 3 sono fasi di lavaggio alle quali si interpongono una fase di lisi cellulare mediante una soluzione ipotonica, due fasi di estrazione cellulare mediante due detergenti (Triton X-100 e SDS) ed una fase di digestione degli acidi nucleici attraverso enzimi di digestione (DNase I e RNAase A).

I dettagli di questo protocollo sono riportati in Tabella 1.2.

Hypotonic lysis	10 mM Tris buffer (pH 8.0, 4°C) × 48 h
Detergent cell extraction #1	1% Triton X-100 in 50 mM Tris buffer (KCl 1.5 M, pH 8.0, 4°C) × 48 h
Rinse	SPB (pH 7.4, 25°C) × 3 h
Nucleic acid digestion	DNase I (400 U/mL) and RNAse A (0.125 mg/mL) in SPB with MgSO ₄ (0.01 M) and CaCl ₂ (0.5 mM) (pH 7.4, 37°C) × 6 h
Rinse	SPB (pH 7.4, 25°C) × 30 min
Detergent cell extraction #2	0.5% SDS in 50 mM Tris buffer (pH 9.0; 4°C) × 48 h
Final rinse	50 mM Tris buffer (pH 9.0, 25°C) × 24 h PBS (pH 7.4, 25°C) × 48 h

Tabella 1.2: **Protocollo di *decellularizzazione* esofagea proposto da Bhrany et al. [22]**

Lo strato epiteliale cheratinizzato rimanente viene rimosso a mano da ogni esofago, successivamente sterilizzato per tutta la notte in etanolo al 70% e conservato in PBS a 4°C.

Il trattamento con Triton X-100 è efficace per la rimozione degli strati cellulari, ma solo il detergente SDS garantisce una completa *decellularizzazione*, con eliminazione delle fibre muscolari rimaste intatte in seguito all'immersione in Triton X-100 [22].

Una colorazione istologica H&E mostra l'assenza di nuclei cellulari e fibre muscolari, mentre una colorazione Tricromica di Masson (Figura 1.28) rivela il mantenimento della struttura esofagea, in termini di presenza di fibre di collagene, nella matrice decellularizzata. Vengono messe a confronto due sezioni istologiche, ottenute mediante una colorazioni Tricromica di Masson, di un esofago nativo (Figura 1.28a) e di uno decellularizzato con il protocollo di Bhrany et al. [22] (Figura 1.28b). Nell'esofago nativo sono ben distinguibili i vari strati cellulari, in particolar modo è evidente lo strato epiteliale (indicato con le frecce rosse in Figura 1.28a) che invece scompare nell'esofago decellularizzato.

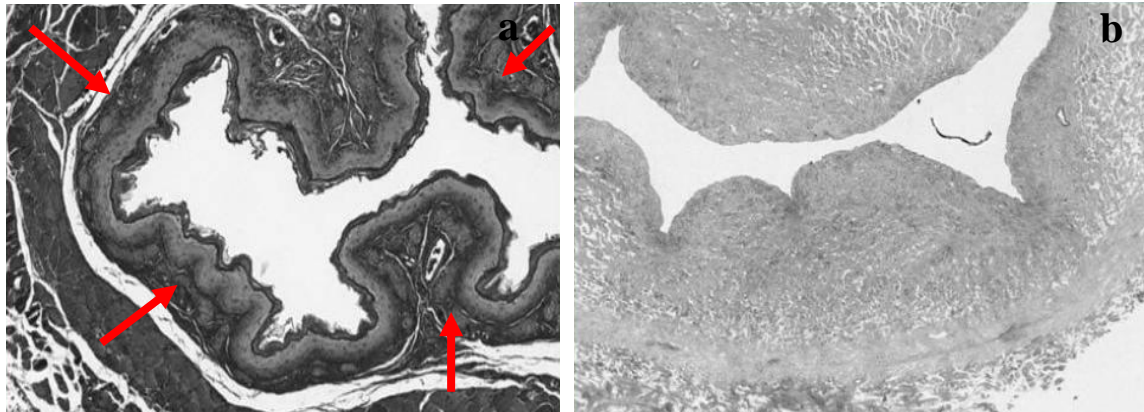


Figura 1.28: Colorazione Tricromica di Masson di una sezione circolare di un esofago di ratto nativo (a) e decellularizzato con il protocollo di Bhrany et al.(b) [22].

Una colorazione con Van Gieson (Figura 1.29) permette di rilevare la presenza di elastina a livello della mucosa muscolare (frecce gialle), dei vasi ematici (doppia freccia nera) e della membrana basale (freccia nera). Questo aspetto è riscontrabile sia nell'esofago normale (Figura 1.29°) che in quello decellularizzato (Figura 1.29b)

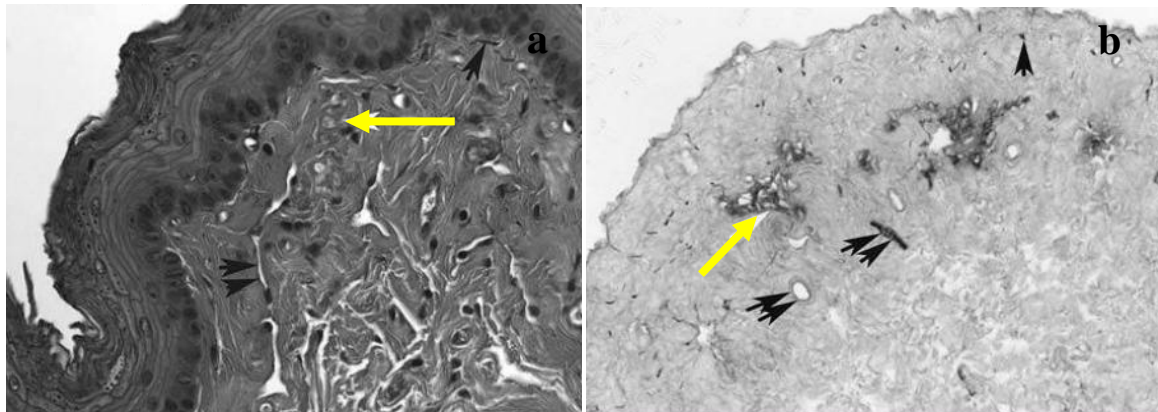


Figura 1.29: Colorazione con Van Gieson di una sezione di un esofago di ratto nativo (a) e decellularizzato con il protocollo di Bhrany et al.(b) [22].

Mediante l'analisi istologica viene dunque confermato il mantenimento strutturale dell'esofago in seguito alla sua decellularizzazione con il protocollo proposto da Bhrany et al. [22].

1.2 Ricellularizzazione di organi e tessuti

Ad oggi esistono due differenti tecniche per generare organi artificiali. Una prima strategia consiste nella realizzazione di una matrice di collagene che abbia la forma dell'organo da rigenerare, su cui andare poi a coltivare le cellule del paziente. Una seconda strategia, invece, prevede l'eliminazione delle cellule dall'organo, riducendolo a sola matrice extracellulare, per poi ripopolarlo sempre con le cellule autologhe del ricevente.

In entrambi i casi si parla di "ripopolazione dell'organo o della matrice con le cellule del paziente", ossia di *ricellularizzazione*. Con questo termine si indica il processo attraverso il quale si tenta di ripopolare una matrice, qualunque sia la sua provenienza, che risulta essere non vivente, con delle popolazioni cellulari, ricreando *in vitro* le condizioni ottimali per l'adesione, per la crescita, per il differenziamento e per la proliferazione cellulare. L'obiettivo è dunque l'ottenimento di un organo funzionante e pronto per un ipotetico trapianto [23].

Per le applicazioni nell'uomo la scelta migliore sarebbe quella di prelevare gli organi dai cadaveri e decellularizzarli, in modo che possano essere usati come *scaffold* per la coltura di cellule autologhe. Un vantaggio rilevante è che il processo di *ricellularizzazione* della matrice richiederebbe un tempo di poche settimane. Si verrebbe quindi a risolvere uno dei

principali problemi legati ai lunghi tempi d'attesa per la disponibilità di un organo per gli iscritti alle liste dei trapianti [23].

Negli ultimi anni, la medicina rigenerativa, la terapia cellulare e l'ingegneria dei tessuti stanno rivestendo un ruolo sempre più importante. Infatti, combinando l'aspetto medico, biologico e ingegneristico, si cerca di trovare un trattamento più fisiologico e definitivo alle patologie cronic-degenerative per le quali i farmaci convenzionali non sono efficaci. Viene offerta dunque la speranza di poter trattare importanti patologie neurodegenerative, tumori, diabete di tipo I insulina-dipendente e problemi cardiaci, tutte patologie causate da una degenerazione cellulare che i farmaci non sono in grado di trattare.

La rigenerazione cellulare-tessutale e la produzione di organi per il trapianto vedono principalmente l'utilizzo di cellule staminali. Si tratta di cellule non specializzate, in grado di replicarsi per lunghi periodi senza andare incontro a differenziamento. Possiedono quindi la capacità di auto-rinnovamento ma possono anche dare origine a cellule progenitrici di transito, con capacità proliferativa limitata, dalle quali discendono popolazioni di cellule altamente differenziate (nervose, muscolari, ematiche), come mostrato in Figura 1.30.

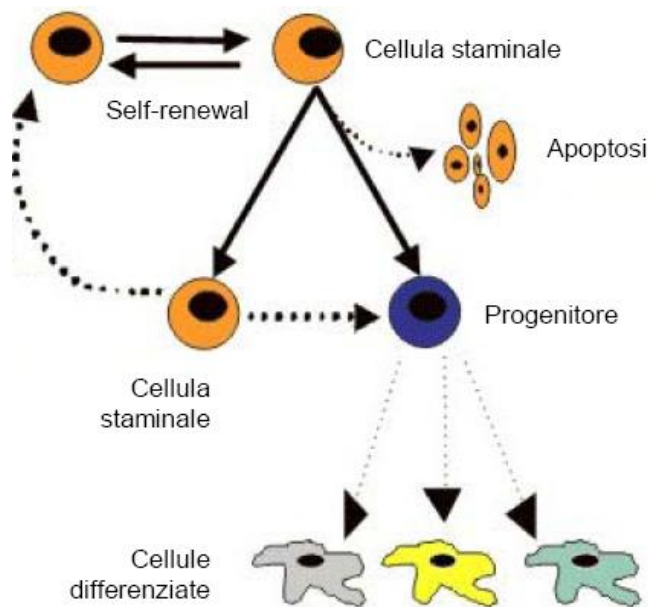


Figura 1.30: Rappresentazione schematica delle due peculiarità delle cellule staminali: capacità di auto rinnovamento senza differenziazione e capacità di dare origine a cellule progenitrici di transito dalle quali discendono popolazioni cellulari altamente specializzate [24]

Non vi sono dubbi che le cellule staminali siano i migliori candidati per la *ricellularizzazione*, però ne esistono diversi tipi e quindi è importante scegliere il tipo

cellulare più appropriato. A tal proposito vi sono cellule staminali adulte e embrionali. Inoltre, in base alla loro “potenza” le cellule staminali si dividono in totipotenti, multi o pluripotenti e unipotenti. Le cellule totipotenti danno vita potenzialmente a tutti i tipi cellulari. Un esempio è dato dalle cellule staminali embrionali. Le cellule pluri o multipotenti danno origine a progenitori diversi per diversi tipi cellulari. Sono di questo tipo le cellule staminali ematopoietiche del sangue. Infine le cellule staminali unipotenti danno vita ad un progenitore che è in grado di generare un solo tipo cellulare. Il prototipo di questo tipo cellulare è la cellula staminale dell’epidermide, che genera solo i cheratinociti della pelle [24].

Le cellule staminali che non possono essere inserite nel gruppo delle cellule staminali embrionali e quindi totipotenti sono le cellule staminali adulte (ASC Adult Stem Cell), che presentano naturalmente una potenza inferiore. Dagli studi sulle cellule staminali nell’adulto, nel trascorso trentennio era emerso chiaramente che in molti tessuti fossero presenti cellule staminali unipotenti. Negli anni più recenti, invece, si è arrivati alla scoperta della presenza di cellule staminali pluripotenti in molti tessuti: nel midollo osseo, nel cervello e nel mesenchima di vari organi.

Infine un’altra classificazione delle cellule staminali riguarda la loro provenienza: le cellule autologhe vengono prelevate dal paziente ricevente. In questo caso non ci sono fenomeni di rigetto, di scatenamento di una risposta immunitaria avversa e di obbligo di una terapia immunosoppressiva a vita. Sfortunatamente, però, in molti organi, come ad esempio pancreas, polmoni e cuore, l’estrazione delle cellule staminali autologhe risulta essere molto difficoltosa e il numero raccolto è insufficiente per una possibile rigenerazione di un tessuto [2].

Le cellule allogeniche sono definite “not self-derived” e possono essere raccolte in grandi quantità da individui giovani e in salute e mantenute ed espanse con successo. In molte applicazioni della medicina rigenerativa la scelta tra fonti autologhe e allogeniche dipende da numerosi fattori tra i quali il numero di cellule richieste, la facilità di raccolta, di espansione e di differenziamento *in vitro*. Per esempio nel caso di una lesione grave dove il tempo è critico, un prodotto basato su cellule allogeniche potrebbe essere vantaggioso rispetto ad un prodotto autologo che richiederebbe settimane per la preparazione. Una situazione opposta, invece, potrebbe essere la sostituzione articolare in cui i costrutti potrebbero crescere *in vitro* per lunghi periodi (settimane o addirittura mesi): in questo

caso l'alternativa autologa potrebbe essere contemplata. Nella Figura 1.31 è riportato un esempio tipico di un algoritmo di decisione per la selezione del tipo cellulare da utilizzare per la *ricellularizzazione* di uno *scaffold* 3D.

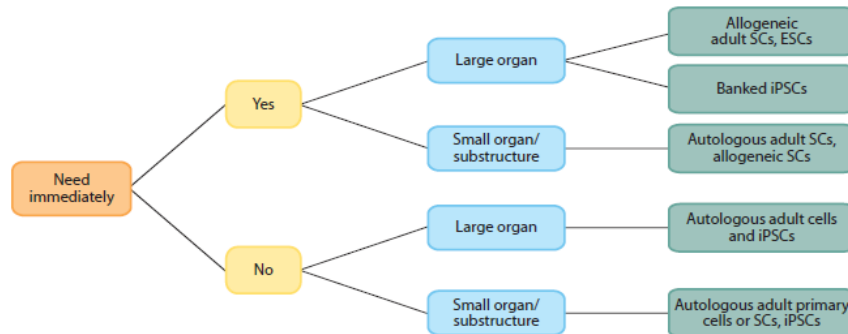


Figura 1.31: Esempio di un algoritmo di decisione per la selezione del tipo cellulare da utilizzare per ricellularizzare uno *scaffold* tridimensionale. I tipi cellulari considerati sono: cellule staminali a pluripotenza indotta (iPSC) e cellule staminali adulte (adultSCs) (inducibile pluripotent stem cell), SC (stem cell) [2].

Quindi, in base alla necessità delle cellule, più o meno immediata, viene selezionato il tipo cellulare. Un altro aspetto che deve essere preso in considerazione è la grandezza dell'organo da ripopolare.

Da un punto di vista ingegneristico ed economico le cellule allogeniche hanno alcuni vantaggi: prima di tutto possono essere isolate, espanse e caratterizzate. Alcune di loro hanno grandi capacità proliferative e possono essere modificate *in vitro* con geni o altri agenti biologici; in secondo luogo sono solitamente meno costose e richiedono meno tempo per la preparazione. Hanno però lo svantaggio di avere potenziali reazioni immunitarie avverse e di dare origine ad un prodotto potenzialmente contaminato [2].

Nel caso di organi altamente rigenerativi come il fegato, le cellule autologhe potrebbero essere una scelta percorribile in quanto queste possono essere estratte ed espanse *in vitro* con successo.

Il primo obiettivo della *ricellularizzazione* è il ripopolamento degli organi decellularizzati con una popolazione cellulare adeguata in termini di tipi cellulari coinvolti e numero di cellule utilizzate. I tipi e il numero di cellule necessarie nel processo di *ricellularizzazione* variano significativamente in base all'organo trattato: le cellule parenchimali sono le cellule responsabili delle specifiche funzioni dell'organo, come ad esempio gli epatociti nel fegato, i cardiomiociti nel cuore e le cellule epiteliali nei polmoni, mentre le cellule non

parenchimali, come ad esempio i fibroblasti e le cellule endoteliali intensificano il fenotipo funzionale delle cellule parenchimali e contribuiscono all'organizzazione dell'architettura della matrice e del tessuto [2].

Oltre alla scelta del tipo cellulare, un altro parametro di fondamentale importanza è il numero di cellule da utilizzare, che dipende strettamente dal tipo di organo che si vuole ricellularizzare [2]. Ad esempio il cuore e i polmoni possiedono una funzione biomeccanica ed è quindi necessario che quando vengono impiantati siano già degli organi funzionali, il che richiede che sia già presente un'alta percentuale di cellule al momento dell'impianto. Esistono, però, altri organi con funzioni metaboliche primarie, come ad esempio il fegato e il pancreas, che possono essere impiantati anche quando presentato solo una piccola percentuale della loro massa cellulare nativa. Si è stimato che il fegato di un adulto (70 kg) possa contenere circa $2.8 \cdot 10^{11}$ epatociti; sebbene la massa cellulare, richiesta per supportare un modello animale utilizzabile in caso di fallimento epatico, non sia stata ancora determinata, studi clinici hanno dimostrato che la massa cellulare minima necessaria per supportare un paziente con una compromissione epatica è di circa il 5-10% del peso totale del fegato, il che richiederebbe circa 10^{10} cellule nell'uomo e $50-100 \cdot 10^6$ cellule in un modello animale di ratto [2].

Il cuore, invece, è un organo che presenta un'alta densità cellulare ($\approx 10^8$ cardiomiociti/cm³); per generare un cuore che sia completamente funzionante è necessario che la matrice tridimensionale sia totalmente ricellularizzata nel momento dell'impianto. Poiché si tratta di un numero di cellule troppo elevato, se parliamo di tecniche basate sul solo impiego di cellule staminali, si potrebbe pensare di utilizzare una combinazione di cellule mature e cellule staminali [2].

Una volta selezionato il tipo cellulare e compreso il numero di cellule necessario, bisogna procedere con la loro iniezione nell'organo. Le tecniche di semina attualmente utilizzate nei processi di *ricellularizzazione* vedono un'iniezione di cellule direttamente nell'organo o nel torrente circolatorio. Una volta che le cellule vengono seminate nello scaffold è necessaria una continua perfusione dell'organo. Affinché si ottenga un ripopolamento adeguato, con una giusta differenziazione delle cellule staminali, è importante che venga riprodotto *in vitro* un ambiente che mimi il più possibile l'ambiente fisiologico, in termini di temperatura, concentrazione di gas e stimoli: è quindi importante che l'ambiente di coltura venga fortemente controllato da un dispositivo. Il ruolo di riproduttore di un

ambiente di coltura ottimale viene rivestito dal bioreattore [25]. Il bioreattore è un dispositivo che consente lo svolgimento dei processi biologici e/o biochimici in condizioni ambientali e operative monitorate, automatizzate e controllate (pH, temperatura, apporto di nutrienti, rimozione di cataboliti, ecc.) [24].

Uno schema logico e funzionale di un bioreattore è riportato in Figura 1.31 e in Figura 1.32: vi è una netta separazione tra quello che è l'ambiente di coltura in cui alloggerà il costruito (organo decellularizzato + cellule) e l'esterno, ossia quella parte che si interfaccia con l'operatore. In sintesi viene fatta una distinzione tra ambiente sterile e non sterile, ed è proprio il punto di passaggio da un ambiente all'altro che è molto critico, perché possibile origine di contaminazioni e causa quindi di fallimento della *ricellularizzazione in vitro* [24].

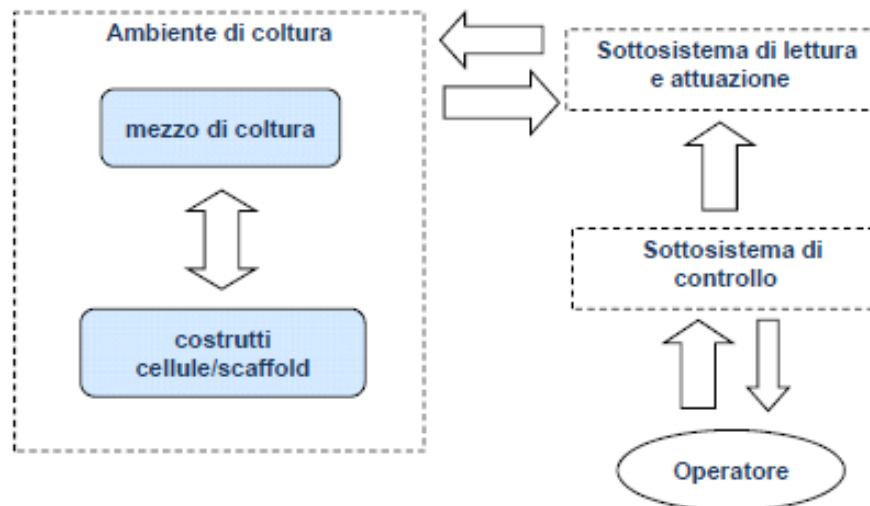


Figura 1.32. Schema logico e funzionale di un bioreattore [24]

Genericamente un bioreattore è costituito da una camera di coltura in cui viene posto l'organo in fase di *ricellularizzazione* che sarà sottoposto ad una perfusione. L'ambiente di coltura deve essere sterile in quanto la camera rappresenta la parte più delicata del sistema, essendo la zona a diretto contatto con le cellule. Inoltre per il mantenimento cellulare è necessaria una temperatura pari a 37°C, una concentrazione di anidride carbonica del 5% e un'umidità relativa del 95%. Vi sono particolari bioreattori che posseggono già al loro interno un controllore di temperatura e CO₂.

È inoltre necessario riprodurre un condizionamento chimico fisico che abbia l'obiettivo di far rispondere l'organo in via di *ricellularizzazione* nel modo più fisiologico possibile. Dal punto di vista chimico vengono determinati e controllati i seguenti parametri: la

concentrazione di gas quali ossigeno e anidride carbonica, l'umidità relativa che si deve sempre aggirare intorno al 95% (il nostro corpo è per la maggior parte costituito di acqua), il pH che dovrà mantenersi sempre sul valore neutro. Per quanto riguarda invece il condizionamento fisico, gli stimoli applicati dipendono principalmente dal costruito in questione. Come prima cosa bisogna vedere che funzioni ha l'organo *in vivo*, dopodichè si cerca di far riprodurre tali funzioni all'organo *in vitro*, mediante l'applicazione di differenti stimoli che possono essere elettrici, meccanici, fluidodinamici, eccetera [24].

A titolo esemplificativo se si vuole *ricellularizzare* un cuore, bisognerà applicare degli stimoli elettrici mediante degli elettrodi, affinché le cellule che sono state seminate acquisiscano capacità contrattili, oppure affinché le cellule staminali non ancora differenziate, si differenzino in cardiomiociti.

Altro elemento di fondamentale importanza in un bioreattore è il sistema di controllo che solitamente è pc-based e che viene direttamente gestito da un operatore che imposta i parametri e i vari componenti che producono gli stimoli. Tale controllore rappresenta il cervello del sistema: deve garantire la stabilità e l'affidabilità dei processi, ma deve essere di facile programmazione e utilizzo da parte dell'utente [24].

1.2.1 Tecniche di analisi

Come nel caso della *decellularizzazione*, una volta che il processo di *ricellularizzazione* è terminato, vengono condotte delle analisi sui campioni trattati per verificare quale sia effettivamente il grado di ripopolamento e per valutare la tecnica utilizzata. Anche in questo caso le analisi istologiche e immunofluorescenti e l'estrazioni di DNA sono utili al fine di valutare l'effettiva adesione cellulare al costruito. Anche delle prove meccaniche, per esempio di trazione, possono essere utili per verificare se il tessuto abbia riacquisito le medesime proprietà che aveva prima di subire il trattamento di *decellularizzazione*.

1.2.2. Panoramica dello stato dell'arte sulla *ricellularizzazione* esofagea

Effettuando una ricerca in PubMed è emerso che ad oggi non è stato pubblicato alcuno studio che abbia come principale obiettivo la *ricellularizzazione* esofagea.

In due studi presentati nella sezione dedicata alla panoramica dello stato dell'arte sulla *decellularizzazione* esofagea (Paragrafo 1.1.5), però, è inclusa un'ultima fase di semina

del costruito con le cellule. Lo scopo è più che altro valutare la biocompatibilità della matrice esofagea in seguito al processo di *decellularizzazione* presentato.

Marzano et al. [21] hanno utilizzato cellule muscolari lisce, ottenute da una biopsia cervicale di maiale, messe in coltura in DMEM contenente il 20% di Fetal Calf Serum (FCS) per tre giorni. La superficie esterna delle matrici esofagee decellularizzate sono state seminate con una quantità di cellule pari a $5 \cdot 10^5$ ogni cm^2 [21], per essere poi messe in coltura con DMEM+10% FCS. Dopo 24 ore di coltura i campioni sono stati fissati e ricoperti con uno strato d'oro per effettuare un'analisi morfologica mediante microscopio elettronico a scansione (SEM). Vengono messe a confronto due immagini SEM relative ad un esofago in seguito a *decellularizzazione* con il protocollo di Marzano et al. [21] (Figura 1.33a) e in seguito alla coltura di 24 ore (Figura 1.33b).

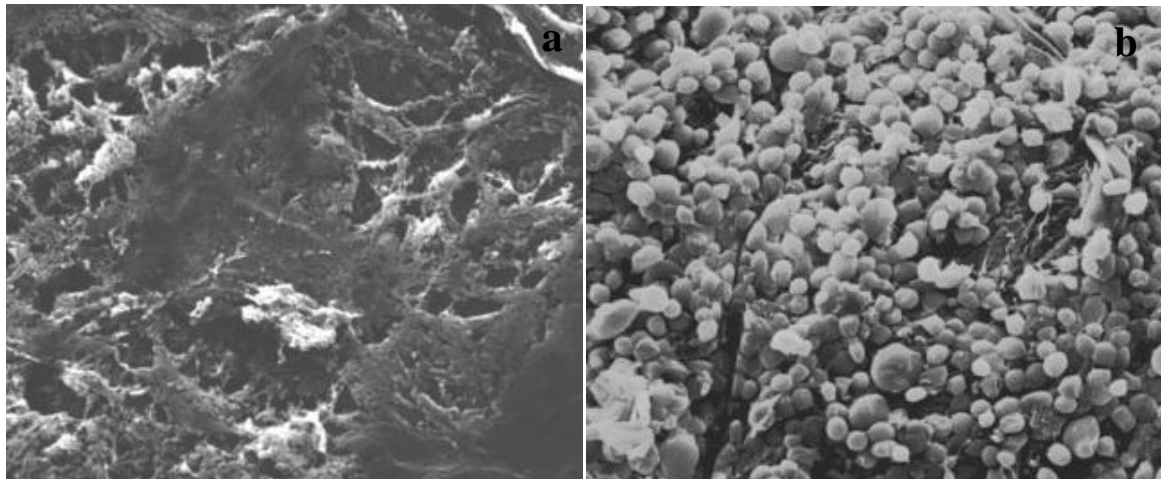


Figura 1.33: Immagini SEM di un esofago decellularizzato con il protocollo di Marzano et al. (a) ed in seguito ad una coltura di 24 ore con $5 \cdot 10^5/\text{cm}^2$ (b) [21]

La superficie esofagea decellularizzata appare irregolare e naturalmente non vi è traccia di cellule, a differenza di quella ricellularizzata che appare totalmente ricoperta da cellule muscolari lisce.

Si può dunque considerare raggiunto l'obiettivo di Marzano et al. [21] di dimostrare la compatibilità cellulare di una *scaffold* naturale ottenuto mediante il processo di *decellularizzazione* da loro proposto.

Lo stesso intento è stato raggiunto da Ozeki et al. [20] i quali hanno utilizzato cellule di linea epiteliali esofagee per ripopolare il lume interno degli esofagi trattati con DEOX con una sospensione di 10^6 cellule, utilizzando una combinazione di una coltura dinamica

(sistema rotante con una velocità di 30rpm) per 8 ore a 37°C e di una coltura statica per sette giorni a 37°C.

Un'analisi istologica mediante colorazione con H&E rileva negli esofagi ricellularizzati (Figura 1.34A) la presenza di uno strato epiteliale simile a quello dell'esofago nativo (Figura 1.34B).

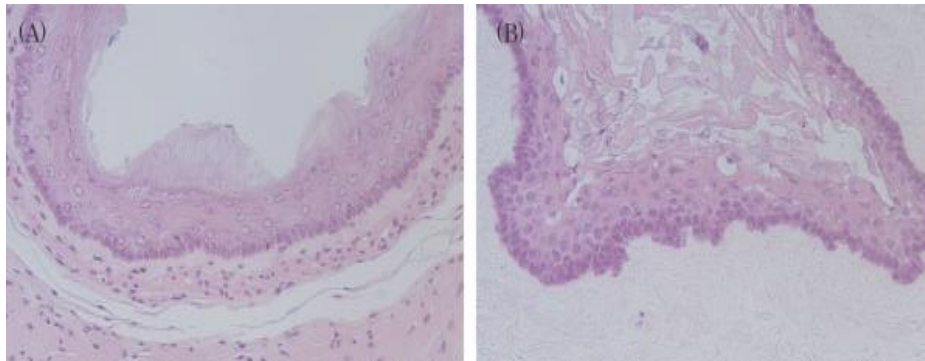


Figura 1.34: Colorazione con H&E di una sezione circolare di esofago decellularizzato con DEOX ed in seguito seminato con (A) e di uno ricellularizzato con cellule epiteliali (B) [20]

L'unico strato che si è ricreato è quello epiteliale in quanto l'esofago è stato perfuso solo a livello del lume interno, mentre quello muscolare, necessario per un impianto *in vivo* non appare [20].

I risultati ottenuti da Marzano et al. [21] e da Ozeky et al. [20] sono indicativi della biocompatibilità degli *scaffold* decellularizzati con i due protocolli. Infatti in entrambi i casi si riscontra un'adesione cellulare, indice della non citotossicità degli esofagi sottoposti al trattamento chimico di rimozione cellulare. Assodato questo aspetto, il secondo passo sarebbe quello di ottenere una completa *ricellularizzazione* degli esofagi, con sistemi pensati ad hoc per la semina, la coltura e il condizionamento esofageo.

CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI

In questo capitolo verranno trattate in modo dettagliato le procedure sperimentali seguite per il raggiungimento degli obiettivi di questo lavoro di tesi (Figura 2.1), quali la valutazione dell'efficacia del metodo di incannulazione nella *decellularizzazione* di organi complessi, l'ottimizzazione di un protocollo ottimo di *decellularizzazione* esofagea e una fase preliminare di *ricellularizzazione* delle matrici esofagee decellularizzate con il protocollo ottimo.

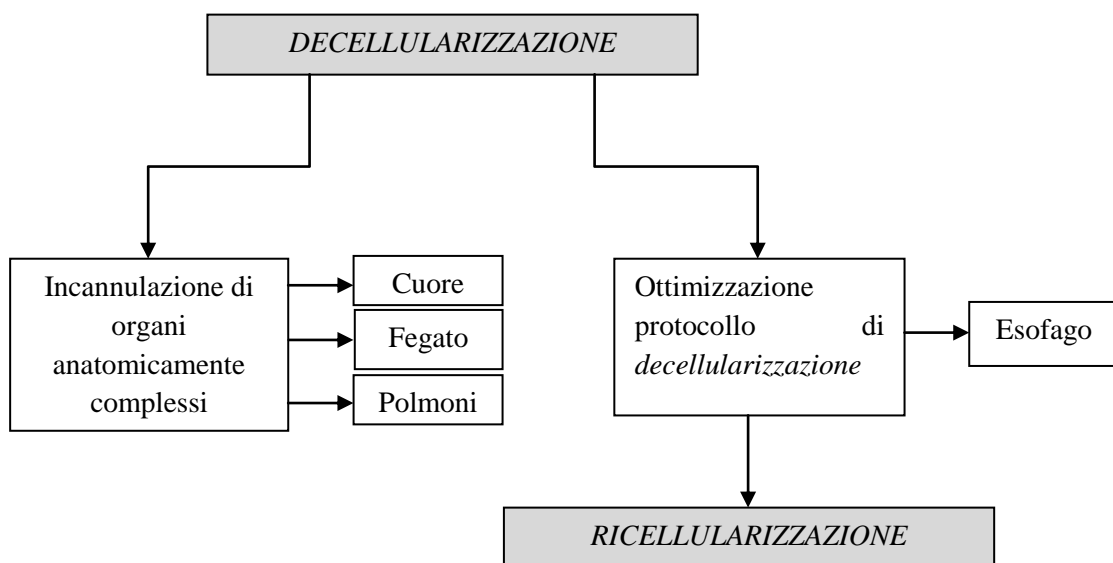


Figura 2.1: Rappresentazione schematica degli obiettivi del lavoro di tesi

In base agli obiettivi, presentati schematicamente in Figura 2.1, la descrizione delle metodologie e delle tecniche utilizzate nel lavoro è strutturata in tre parti.

La prima parte verterà sul procedimento attuato per la valutazione dell'efficacia dell'incannulazione di organi complessi quali cuore, fegato e polmoni. Data però la complessità anatomica di questi organi e le maggiori difficoltà che si incontrano sia in fase di *decellularizzazione* che in fase di *ricellularizzazione*, l'attenzione è stata rivolta ad un organo più semplice: l'esofago, che è stato utilizzato nella fase di ottimizzazione dei protocolli di *decellularizzazione* e *ricellularizzazione*, che sono state di fatto le parti preponderanti del lavoro di tesi svolto. Inoltre l'ottimizzazione di un protocollo di *decellularizzazione* e *ricellularizzazione* di un organo complesso, avrebbe richiesto tempi di lavoro non compatibili con il lavoro di tesi. Nella seconda parte verrà esposto il percorso seguito per la definizione di un protocollo efficace di *decellularizzazione*.

Nella terza parte del capitolo viene presentato un primo approccio alla *ricellularizzazione* degli esofagi decellularizzati. Infine in un'ultima parte verrà descritto il procedimento messo a punto per eseguire una caratterizzazione meccanica e istologica degli esofagi nativi, decellularizzati e ricellularizzati secondo i protocolli che sono risultati migliori.

2.1 Incannulazione di organi complessi per la loro *decellularizzazione*

L'aspetto su cui ci si è concentrati in una prima fase del lavoro è stata l'incannulazione. Infatti la complessità anatomica degli organi trattati, quali cuore, fegato e polmoni, ha richiesto del tempo per la verifica della correttezza della tecnica di incannulazione scelta. Nella prima parte di questo paragrafo viene quindi presentato il procedimento operativo con cui è stato indagato il metodo di incannulazione di organi complessi. Uno schema di questo processo è rappresentato in Figura 2.2.

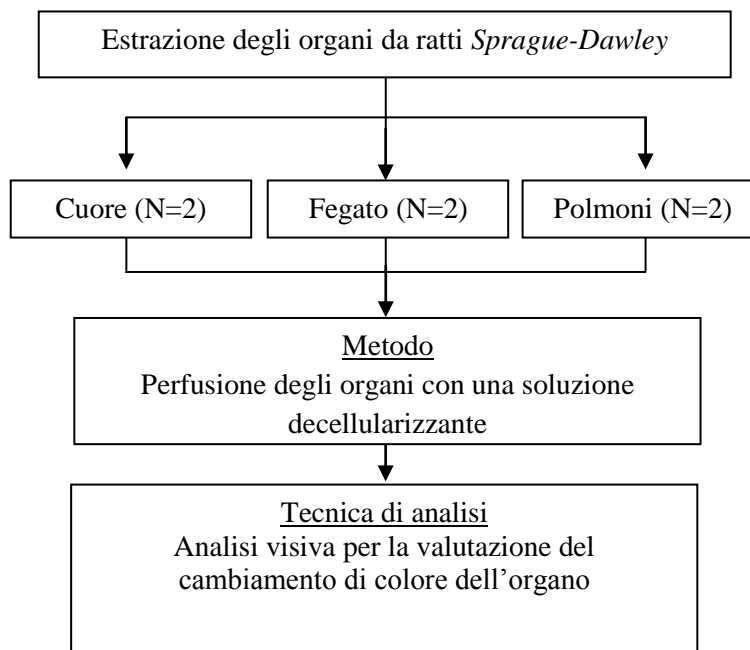


Figura 2.2: Rappresentazione schematica del procedimento seguito per la valutazione dell'efficacia della tecnica di incannulazione di organi di *Sprague-Dawley*

Sono stati prelevati cuore, fegato e polmoni da due ratti *Sprague-Dawley* per poi essere immediatamente congelati a secco ad una $T \approx -140^{\circ}\text{C}$. Per evitare la formazione di coaguli,

l'estrazione degli organi è avvenuta in seguito alla perfusione dell'animale sacrificato con Phosphate Buffered Saline (PBS).

Al fine di valutare la tecnica di incannulazione, si è pensato di perfondere gli organi con una soluzione decellularizzante. Questa scelta è stata dettata dal fatto che il fluido decellularizzante provoca un cambiamento del colore del tessuto in quanto ne elimina tutta la componente cellulare. È proprio grazie al cambiamento del colore dell'organo che ci si è potuti basare solo su un'analisi visiva per valutare l'efficacia della perfusione e quindi dell'incannulazione.

2.1.1 Set-up sperimentale e principio di funzionamento

Per la perfusione di cuore, fegato e polmoni è stato messo a punto un set-up sperimentale molto semplice che potesse garantire un'irrorazione adeguata degli organi. L'idea è stata quella di perfondere l'organo con una soluzione decellularizzante mediante un sistema di pompaggio. A tal fine è stato ideato un sistema come quello rappresentato schematicamente in Figura 2.3, è costituito da tre componenti:

- un sistema di pompaggio;
- una camera di *decellularizzazione*;
- un circuito idraulico.

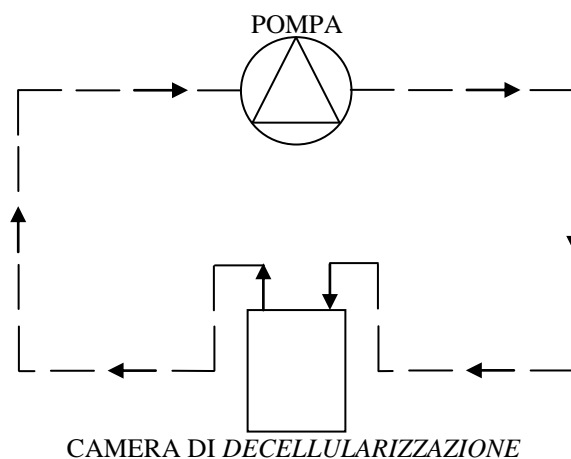


Figura 2.3: Rappresentazione schematica del sistema di *decellularizzazione* utilizzato per la valutazione dell'efficacia della tecnica di incannulazione di organi di *Sprague-Dawley*

Per comprendere meglio il set-up sperimentale, viene di seguito riportata un'immagine del sistema di perfusione che è stato assemblato ed utilizzato per le prove sperimentali di incannulazione (Figura 2.4).

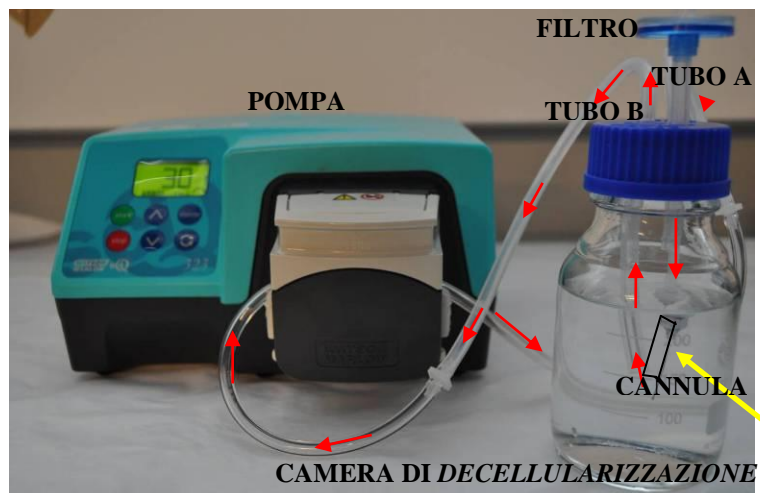


Figura 2.4: Sistema utilizzato per la perfusione di cuore, fegato e polmoni di ratti Sprague-Dawley

La camera di *decellularizzazione* è un reservoir costituito da una bottiglia di vetro da 250 ml (DURAN[®] GL 45, SCHOTT, North America) riempito con la soluzione decellularizzante nella quale viene immerso l'organo da perfondere. La separazione tra l'ambiente interno e quello esterno della camera di *decellularizzazione* è dovuta alla presenza di un tappo in materiale polimerico. Sul tappo sono stati effettuati dei fori *ad hoc*: un foro ha reso possibile l'applicazione di un filtro da 0.22 micron in politetrafluoroetilene (PTFE) (OzoneLab[™] Instruments) per il mantenimento della pressione atmosferica a livello del pelo libero, mentre altri due fori hanno permesso il passaggio dei tubi del circuito idraulico (tubo A e tubo B in Figura 2.4).

L'organo è stato posizionato e immobilizzato all'interno della camera di *decellularizzazione*. Come prima cosa la microcannula è stata opportunamente inserita e vincolata all'organo con filo di sutura. Questo passaggio è stato effettuato su un tavolo da lavoro, disponendo di una lampada dotata di una lente d'ingrandimento, data la ridotta dimensione degli organi di ratto. Successivamente il sistema microcannula-organo è stato posizionato nel reservoir, previa connessione dell'estremità della cannula con il tubo in silicone del circuito idraulico entrante nella camera (tubo A in Figura 2.4)

La perfusione degli organi è stata garantita dalla pompa peristaltica *Watson Marlow 323*. Le pompe peristaltiche sono il tipo di pompa più semplice possibile in quanto non possiedono valvole o guarnizioni che potrebbero intasarsi o corrodarsi. Un ulteriore vantaggio è che solo il tubo entra in contatto con il fluido da trasferire, eliminando quindi la possibilità che la pompa contami il fluido o che il fluido contami la pompa. La

pompa è costituita da un rotore a cui sono applicati due o più rulli che, ruotando, comprimono il tubo e provocano l'avanzamento del fluido. Componente fondamentale della pompa è il tubo che deve resistere allo schiacciamento il più a lungo possibile, deformandosi, cioè, in maniera elastica e non plastica. È proprio l'elasticità che gli consente di riacquisire le dimensioni originali e quindi la capacità d'aspirazione. Il rullo che avanza occlude il tubo il quale, mentre riacquista la sua dimensione normale, aspira il fluido che viene poi bloccato dal rullo successivo e quindi espulso dalla pompa. La completa occlusione del tubo consente alla pompa di agire per trasporto meccanico. La pompa peristaltica è per sua natura una pompa "pulsatile", in quanto la portata non è costante sul singolo giro. In particolare la pompa peristaltica *Watson Marlow 323* presenta le seguenti caratteristiche:

- portate da 2 μ l/min a 3 l/min in funzione del diametro del sottopompa utilizzato;
- velocità da 1.0rpm a 200rpm;
- canale singolo o fino a sei diversi canali;
- accuratezza e ripetibilità della portata;
- pompaggio senza contaminazione;
- utilizzo di tubi con diametri variabili;
- facilità di installazione, utilizzo e mantenimento;
- motori brushless che eliminano l'eventuale manutenzione;
- assenza di costose guarnizioni, valvole, membrane o rotori che causino perdite o che si corrodano [26].

Infine il circuito idraulico è costituito da una serie di tubi (*Saint-Gobain Performance Plastics France*) e connettori in polipropilene. Tutti i tubi del sistema presentano un diametro interno pari a 1.6 mm ed esterno pari a 3.2 mm e sono realizzati in silicone. Il tubo a contatto con la pompa è un tubo Tygon. Tygon è un marchio che designa una famiglia di tubi flessibili, comprendenti una grande varietà di materiali di base, che si caratterizzano per la loro elevata resistenza. Nel sottopompa è quindi più indicato l'utilizzo di un tubo Tygon che, data la sua elevata resistenza, è in grado di sopportare le ripetute compressioni generate dai rulli della pompa, che potrebbero altrimenti danneggiarlo fino alla rottura.

Il principio di funzionamento del sistema riportato nella Figura 2.3 e Figura 2.4, è facilmente comprensibile se si osservano le frecce rosse che indicano il percorso effettuato

dalla soluzione decellularizzante per la perfusione dell'organo posizionato nella camera di coltura.

Mediante la pompa peristaltica, sulla quale è stata impostata la velocità di 30 giri al minuto (rpm), corrispondente ad una portata $Q=30$ ml/min per il sottopompa utilizzato, il fluido è stato infuso all'interno dell'organo, opportunamente vincolato e posto all'interno del reservoir riempito con la stessa soluzione. Il fluido è stato così in grado di entrare nell'organo perfondendolo. A perfusione avvenuta lo stesso fluido è uscito dall'organo attraverso i suoi tessuti, per essere poi nuovamente reimmesso nello stesso organo. Non si è stati in grado di comprendere con precisione lo specifico sito d'uscita della soluzione, ma ci si è solo limitati ad accertare l'effettiva uscita una volta iniettato all'interno dell'organo, per evitare fenomeni di rigonfiamento e quindi danneggiamento del tessuto. Una prima verifica è avvenuta nel momento dell'incannulazione; una volta inserita e vincolata la cannula nell'organo, prima della connessione al sistema, è stata iniettata al suo interno dell'acqua distillata mediante una siringa. Il gocciolamento della soluzione iniettata è stato indice di fuoriuscita del fluido. Un'ulteriore verifica è stata fatta a connessione avvenuta, nei primi istanti della perfusione. L'osservazione di piccole bolle fuoriuscenti dall'organo per l'espulsione di aria intrappolata, ha testimoniato la corretta presenza di siti per la fuoriuscita della soluzione decellularizzante. Così facendo si è venuta a generare una continua circolazione del fluido.

2.1.2 Metodo di incannulazione utilizzato per i diversi organi

L'aspetto fondamentale da tenere in considerazione per l'ottenimento di una corretta perfusione dell'organo è stata l'incannulazione dell'organo da perfondere. È infatti proprio la valutazione dell'efficacia del metodo di incannulazione il primo obiettivo che si è voluto raggiungere.

A tale scopo è stata utilizzata una microcannula di 1.5 pollici con sistema di aggancio Luer-Lock, come quella di Figura 2.5 inserita nell'organo e vincolata in un secondo momento ai tubi del circuito idraulico descritto nel paragrafo 2.1.1 (vedi freccia gialla in Figura 2.4).



Figura 2.5: Microcannula da 1.5 pollici con sistema di ancoraggio Luer-Lock

Lo studio dell'anatomia di cuore, fegato e polmoni è stato di fondamentale importanza per la scelta del sito più appropriato per l'introduzione della cannula. Infatti la corretta e omogenea perfusione avviene solo nel caso in cui la soluzione scorre nei vasi che irrorano l'organo in questione.

Nel caso del cuore la cannula è stata inserita a livello dell'aorta; l'ideale sarebbe stato ottenere una perfusione coronarica, ma questo non è possibile quando si ha a che fare con organi di dimensioni così ridotte come quelle del cuore di ratto. Inoltre da un'analisi anatomica si è visto come con un'incannulazione aortica veniva garantito il passaggio del liquido decellularizzante anche nelle coronarie, essendo queste ultime connesse proprio con la suddetta arteria.

Per quanto riguarda il fegato, invece, la scelta è ricaduta sulla vena porta che nell'organismo ha il compito di convogliare al fegato il sangue proveniente dalla digestione intestinale e dalla milza.

Infine i polmoni sono stati perfusi mediante un'incannulazione della trachea, essendo quest'ultima un condotto connesso con l'albero bronchiale, che ha permesso così un'irrorazione totale dell'organo.

A titolo esemplificativo viene riportata la Figura 2.6, nella quale si osserva il fegato di ratto incannulato e posto all'interno della camera di *decellularizzazione*. Nella figura non è possibile osservare chiaramente il sito di introduzione della microcannula, ma è visibile il punto di connessione tra la microcannula e i tubi del circuito, rappresentato da un connettore Luer-Lok grazie al quale la connessione è stata possibile. È comunque un esempio del sistema camera di *decellularizzazione*-organo incannulato.



Figura 2.6: Fegato di ratto Sprague-Dawley incannulato, posizionato nella camera di coltura ed immerso nella soluzione decellularizzante

2.1.3 Valutazione dell'efficacia del metodo di incannulazione

Gli organi, una volta incannulati e opportunamente inseriti nel sistema di *decellularizzazione*, sono stati sottoposti ad un processo di *decellularizzazione*. Per la definizione del protocollo ci si è ispirati ad un protocollo di *decellularizzazione* epatica definito dal gruppo di ricerca dell'*Universidad de Zaragoza* in collaborazione con l'*Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza*. I ricercatori spagnoli avevano messo a confronto diversi protocolli di *decellularizzazione* epatica già utilizzati e pubblicati. Nello specifico avevano valutato l'efficacia dei protocolli di Uygun et al. [14] e di Baptista et al. [15], concludendo che la capacità del Sodio Dodecil Solfato (SDS) ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) per la *decellularizzazione* del fegato è maggiore rispetto a quella dell'idrossido di ammonio. Definirono quindi un protocollo che prevedeva il trattamento del fegato con SDS a diverse concentrazioni.

Le fasi del protocollo di *decellularizzazione* epatica del gruppo di ricerca dell'*Universidad de Zaragoza* e utilizzati anche per il lavoro di tesi sono le seguenti:

- scongelamento graduale dell'organo ad una $T=4^{\circ}C$;
- perfusione dell'organo mediante una soluzione di SDS 0.1% w/v per 24 h ad una $T=4^{\circ}C$;
- perfusione dell'organo mediante una soluzione di SDS 1% w/v per 6 ore a temperatura ambiente;

Capitolo 2: Materiali e Metodi

- lavaggio dell'organo con *Phosphate Buffered Saline*, PBS (*SIGMA ALDRICH*) per l'eliminazione dei resti cellulari e della sporcizia per un'ora a temperatura ambiente;
- conservazione dell'organo in PBS + penicillina/streptomicina (2% w/v) o in alcohol al 70% (T=4°C) per evitare la contaminazione dell'organo decellularizzato.

Lo stesso protocollo è stato utilizzato anche per il cuore e i polmoni, nonostante non si sapesse con certezza se avrebbe avuto la stessa efficacia dimostrata anche per il fegato.

In letteratura, però, si hanno degli esempi di *decellularizzazione* cardiaca ottenuta mediante la perfusione coronaria [16] e aortica [17] con una soluzione contenente SDS. Lo stesso non vale per i polmoni. Infatti in letteratura non sono stati trovati lavori che vedessero l'utilizzo del detergente SDS per la *decellularizzazione* polmonare. Si è voluta quindi verificare la potenziale efficacia del protocollo proposto dal gruppo di ricerca dell'*Universidad de Zaragoza* in collaborazione con l'*Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza*, nel caso dei polmoni.

Quindi tutti e sei gli organi estratti sono stati sottoposti ad un processo di incannulazione e perfusione con il sistema di *decellularizzazione*.

La valutazione del metodo di incannulazione è stata effettuata mediante un'ispezione visiva. Una volta perfuso l'organo, infatti, se ne è stimato il cambiamento di colore. Gli organi incannulati in maniera corretta hanno mostrato un cambiamento omogeneo e totale del colore. Questi infatti sono risultati essere bianchi traslucidi, indice di un'avvenuta *decellularizzazione*. Al contrario gli organi non correttamente incannulati non hanno mostrato variazioni di colore.

La complessità anatomica di questi organi e il non completo successo della *decellularizzazione* a causa del metodo di incannulazione utilizzato, ci ha spinto a concentrarci sull'esofago che, data la sua forma cilindrica, è di più semplice manipolazione.

2.2 Decellularizzazione esofagea

In questa seconda parte ci si concentrerà sulla descrizione dei processi messi a punto per il conseguimento del secondo obiettivo del lavoro di tesi, ossia la definizione di un protocollo ottimo di *decellularizzazione* esofagea.

Una rappresentazione schematica generale di quello che è stato operativamente fatto per il raggiungimento dello scopo è presentato nella Figura 2.7.

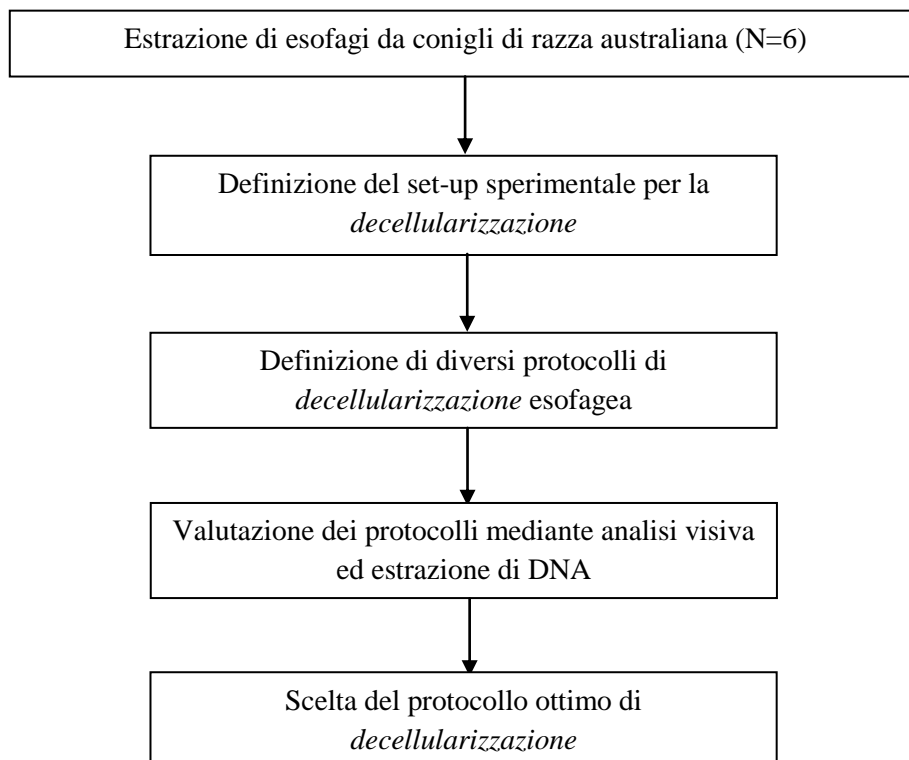


Figura 2.7: Rappresentazione schematica del procedimento seguito per la definizione di un protocollo ottimo di *decellularizzazione* di esofagi di conigli di razza australiana

Sono stati sacrificati sei conigli di razza australiana da cui sono stati estratti gli esofagi di lunghezza media $L=12\pm 1.3$ cm e diametro $0,5\pm 0.12$ cm. Per ottimizzare la disponibilità dei campioni, ogni esofago è stato tagliato in tre o quattro parti, in funzione della sua lunghezza. I campioni così ottenuti sono stati immediatamente congelati a secco ad una $T\approx -140^{\circ}\text{C}$.

È stato definito in seguito un set-up sperimentale e sono stati ideati ed analizzati differenti protocolli di *decellularizzazione*, per poi definire quello ottimo. Per la scelta del protocollo finale, ci si è basati sui risultati ottenuti da un'analisi visiva e da un'estrazione di DNA.

2.2.1 Set-up sperimentale e principio di funzionamento

Poiché l'obiettivo del lavoro di tesi era l'ottenimento di un esofago totalmente decellularizzato, si è cercato di ideare un sistema che potesse irrorare in maniera omogenea l'organo da trattare.

Ci si è ispirati al sistema utilizzato per la valutazione dell'efficacia del metodo di incannulazione della Figura 2.4, al quale è stato però necessario apportare delle modifiche. Viene qui di seguito riportata una rappresentazione schematica del set-up sperimentale utilizzato in questa fase del progetto di tesi (Figura 2.8), che consta principalmente di un sistema di pompaggio, una camera di *decellularizzazione* e un circuito idraulico.

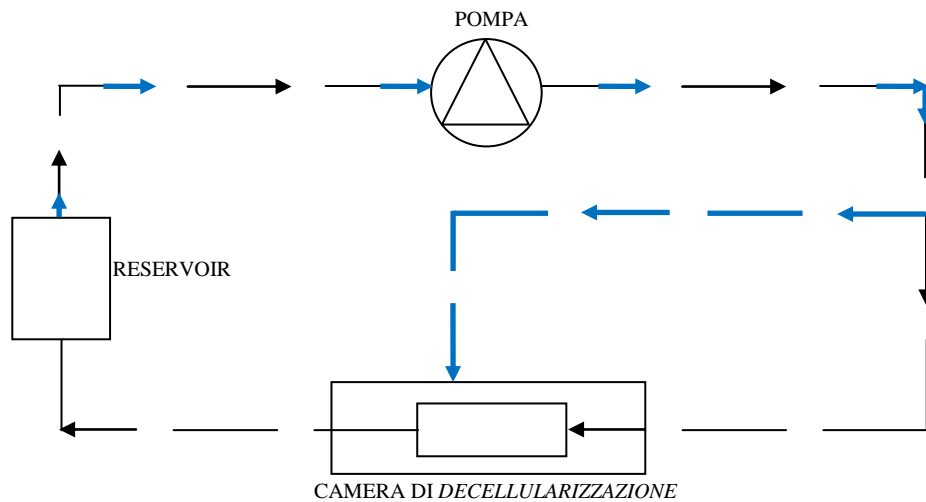


Figura 2.8: Rappresentazione schematica del sistema di *decellularizzazione* di esofagi di conigli di razza australiana

Per comprendere meglio il set-up sperimentale, viene qui di seguito riportata un'immagine del sistema di *decellularizzazione* che è stato assemblato e utilizzato per la valutazione di diversi protocolli di *decellularizzazione* esofagea (Figura 2.9).

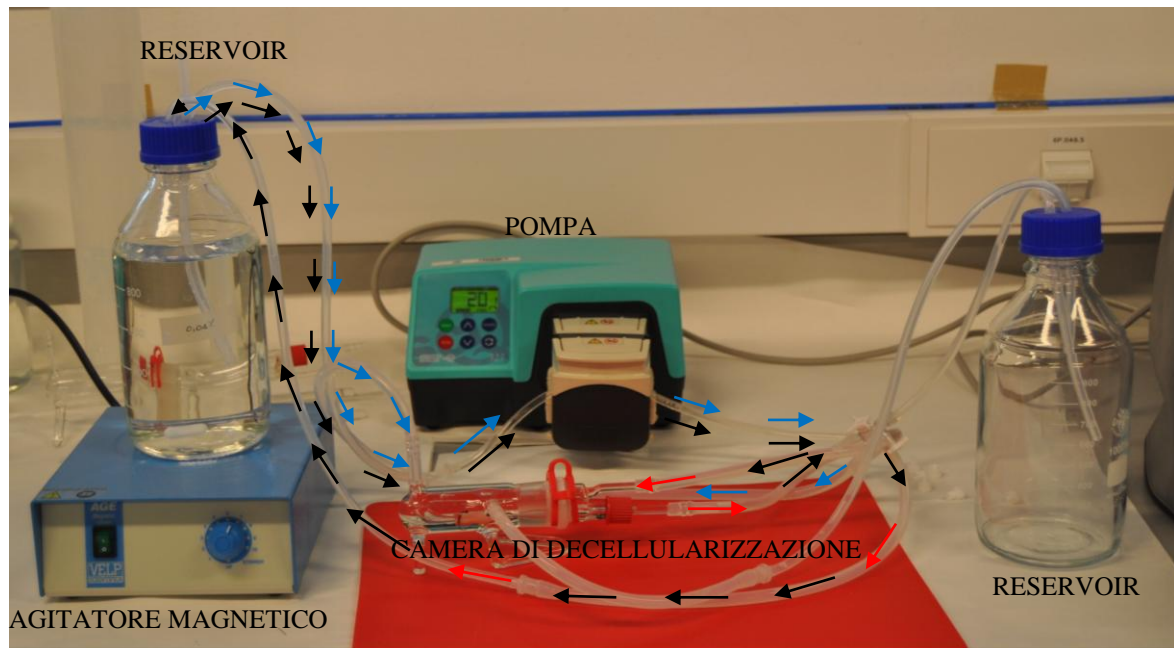


Figura 2.9: Sistema messo a punto per la *decellularizzazione* di esofagi di conigli di razza australiana.

Come nel caso precedente, la perfusione dell'esofago con la soluzione decellularizzante contenuta all'interno di un reservoir (bottiglia di vetro da 1l, DURAN[®] GL 45, SCHOTT), è stata garantita da un sistema di pompaggio peristaltico. Anche in questo caso è stata utilizzata una pompa peristaltica *Watson Marlow 323*.

Come camera di *decellularizzazione* è stato utilizzato un dispositivo progettato da *Ebers Medical Technology*, un'azienda start-up del centro di ricerca dell'*Universidad de Zaragoza*. Si tratta della *Vascular Package TEB 100 Series*. Progettato per la crescita cellulare su *scaffold* di forma tubulare, il dispositivo è stato nel nostro caso utilizzato per la perfusione e quindi per la *decellularizzazione* esofagea, senza la necessità di apportare alcuna modifica. L'esofago è stato quindi vincolato al suo interno mediante del filo di sutura, così come previsto dal sistema di ancoraggio della camera. Inoltre l'architettura della *Vascular Package TEB 100 Series* ha permesso alla soluzione decellularizzante di immergere completamente l'organo e di percorrerlo in direzione longitudinale. Infatti nel sistema sono presenti due circuiti: uno di perfusione esofagea indicato dalle frecce nere in Figura 2.8 e in Figura 2.9 e l'altro di immersione esofagea, indicato dalle frecce azzurre in Figura 2.8 e in Figura 2.9. La soluzione decellularizzante viene spinta all'interno della camera di *decellularizzazione* dalla pompa. In un primo momento viene riempita la camera, dopodiché si procede con la perfusione continua dell'esofago precedentemente

alloggiato al suo interno. Si viene a generare una continua circolazione del fluido che, una volta uscito dall'esofago, ricade nel reservoir di partenza, posto su un agitatore magnetico AGE (*Velp SCIENTIFICA srl*) che garantisce una miscelazione della soluzione decellularizzante, scongiurandone la precipitazione del soluto.

Nel momento della messa a punto del sistema di *decellularizzazione*, si era pensato di introdurre un secondo reservoir, come appare in Figura 2.9 che, però, non è stato utilizzato. Infatti questa bottiglia di vetro da 1 litro era stata inizialmente inserita nel sistema per la raccolta della soluzione uscente dall'esofago. In seguito si è ritenuto sufficiente far ricircolare il medesimo fluido senza rinnovarlo ad ogni passaggio.

Di seguito verrà descritta nel dettaglio la camera di *decellularizzazione* utilizzata per il processo di rimozione cellulare esofagea.

La camera di *decellularizzazione* Vascular Package TEB 100 Series è composta da due parti principali, come si può osservare dalla Figura 2.10 che per comodità verranno chiamate camera di immersione (in alto) e camera di perfusione (in basso).

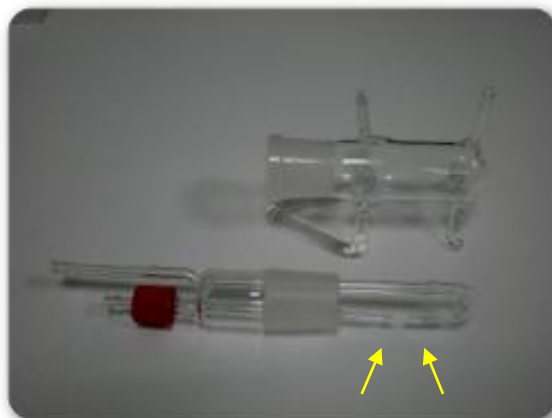


Figura 2.10: Vascular Package TEB 100 Series (EBERS Medical Technology, Zaragoza, Spain) con i due componenti separati: camera di immersione (in alto) e camera di perfusione (in basso) [27]

La componente principale è la camera di perfusione che permette di alloggiare scaffold di differenti lunghezze e diametri. Il sito di ancoraggio del costrutto è indicato dalle frecce gialle in Figura 2.10 e nella Figura 2.11 e si trova in corrispondenza del gap tra i tubi di vetro della camera di perfusione. Nella Figura 2.11 è riportata la camera di perfusione in due taglie distinte.

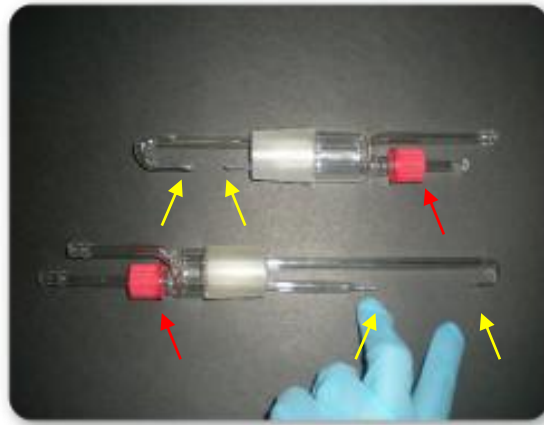


Figura 2.11: Camera di perfusione della Vascular Package TEB 100 Series in due taglie differenti [27]

La possibilità di alloggiare costrutti di lunghezze diverse, è dato dal fatto che i tubi in vetro della camera di perfusione non sono fissi ma sono mobili. Esiste infatti una guarnizione di materiale polimerico (freccie rosse in Figura 2.11) che, se allentata, permette lo scorrimento in avanti e indietro dei tubi della camera di perfusione. Una volta raggiunta la lunghezza che si desidera, la guarnizione viene stretta così da garantire l'immobilizzazione dei tubi nella posizione prescelta. Per quanto riguarda la taglia piccola si possono posizionare costrutti cilindrici che presentano una lunghezza fino a $L \approx 6$ cm, contro i 10-12 cm per la taglia grande. Il diametro dipende della grandezza del sito di ancoraggio, ma in questi due casi si aggira intorno ai 0.5-1 cm per entrambe le camere. Le taglie delle camere attualmente disponibili sono solo quelle di Figura 2.11, ma, a seconda delle necessità, si potrebbero produrre camere che abbiano dimensioni differenti. Nel caso dell'esofago entrambe le taglie si sono dimostrate efficaci, grazie appunto alla possibilità di adattamento di campioni di dimensioni diverse, semplicemente mediante lo scorrimento dei tubi in vetro della camera di perfusione. Oltre al vantaggio di poter alloggiare costrutti di dimensioni differenti, un ulteriore aspetto positivo è dato dalla trasparenza della Vascular Package TEB 100 Series che permette quindi la visualizzazione del costrutto al suo interno; è inoltre autoclavabile ad una $T=121^{\circ}\text{C}$. Infine, l'indipendenza delle due camere del dispositivo garantisce un facile vincolo dell'esofago all'interno della camera di perfusione [27].

Nella Figura 2.12a è rappresentata la camera di *decellularizzazione* nella configurazione di lavoro con i tubi del circuito idraulico connessi. Nel nostro caso l'esofago è stato

innanzitutto vincolato alla camera di perfusione mediante il filo di sutura. Sono stati fatti due nodi in corrispondenza delle estremità dell'esofago che è stato saldamente immobilizzato all'interno camera di perfusione. Dopodiché il sistema esofago-camera di perfusione è stato inserito nella camera di immersione (Figura 2.12b).

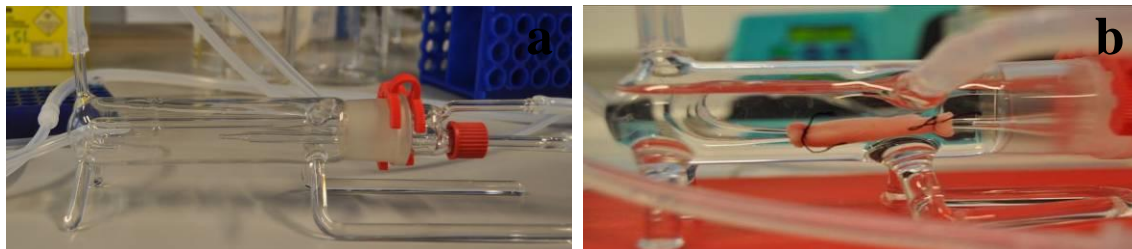


Figura 2.12: Vascular Package TEB 100 Series nella configurazione di lavoro (a) e con l'esofago ancorato con del filo di sutura ai tubi di vetro della camera di perfusione (b).

Infine il circuito idraulico è costituito da una serie di tubi (*Saint-Gobain Performance Plastics France*) in materiale siliconico e di connettori in polipropilene. I tubi del sistema presentano due diametri differenti: quelli connessi con la camera di *decellularizzazione* hanno un diametro interno pari a 2.4 mm ed esterno pari a 4.8 mm, mentre quello uscente ed entrante nel reservoir presenta un diametro interno pari a 1.6 mm ed esterno pari a 3.2 mm. Della stessa dimensione e in Tygon è il tubo che si inserisce nella testa della pompa. La differenza nei diametri dei tubi utilizzati è legata esclusivamente ad un fattore logistico: infatti i fori presenti sul coperchio del reservoir presentano una dimensione minore rispetto a quella dei punti di connessione della camera di *decellularizzazione*.

2.2.2 Protocolli di *decellularizzazione*

Una volta definito il set-up sperimentale, si è proceduto con la valutazione e l'ottimizzazione del protocollo di *decellularizzazione*. Ci si è ispirati al protocollo di *decellularizzazione* fisico-chimico presentato nel paragrafo 2.1.3, in quanto si è mostrato efficace nella rimozione cellulare degli organi complessi. Dei lavori presenti in letteratura e riguardanti la messa a punto di un protocollo di *decellularizzazione* esofagea [20][21][22], solo quello di Bhrany et al. [22] vede l'utilizzo di SDS. Essi hanno però utilizzato un protocollo molto complesso, fatto di diversi step, in cui solo una fase prevedeva il trattamento con il detergente ionico. Si è voluta dunque valutata l'efficacia di un protocollo mai formulato, che vedesse il solo impiego di SDS come agente decellularizzante, in seguito allo scongelamento dell'esofago precedentemente congelato.

In un primo momento l'attenzione è rivolta alla velocità di perfusione esofagea, stabilita dalla pompa. Si è valutata l'efficacia e l'efficienza della *decellularizzazione* dell'esofago utilizzando tre differenti velocità: 15 rpm, 30 rpm e 60 rpm, che, con il sottopompa utilizzato, corrispondono rispettivamente a delle portate pari a 15 ml/min, 30 ml/min e 60 ml/min. Sono stati dunque formulati tre protocolli identici in cui la unica variabile era rappresentata appunto dalla velocità della pompa. Ogni protocollo è costituito da tre step, ognuno dei quali prevede la perfusione dell'esofago con una soluzione di SDS a diverse concentrazioni (0.01%, 0.1% e 1%). La durata complessiva di ogni protocollo è di 72 ore. La Tabella 2.1 riporta lo schema generale di ogni protocollo, il numero di campioni impiegati e la tecnica di analisi utilizzata per la sua valutazione.

Velocità pompa	PROTOCOLLO			N campioni	Analisi
	Step 1	Step 2	Step 3		
15 rpm	[SDS]=0.01% T=4°C, t=24h	[SDS]=0.1% T=4°C, t=24h	[SDS]=1% T.amb, t=24h	N=1	Visiva
30 rpm	[SDS]=0.01% T=4°C, t=24h	[SDS]=0.1% T=4°C, t=24h	[SDS]=1% T.amb, t=24h	N=1	Visiva
60 rpm	[SDS]=0.01% T=4°C, t=24h	[SDS]=0.1% T=4°C, t=24h	[SDS]=1% T.amb, t=24h	N=1	Visiva

Tabella 2.1: Protocolli per la valutazione preliminare del processo di *decellularizzazione*

I primi due step dei protocolli (24h SDS 0.01%, 24h SDS 0.1%) sono stati svolti in una camera fredda a T=4°C, mentre l'ultimo step a temperatura ambiente, in quanto la bassa temperatura avrebbe potuto provocare la precipitazione del soluto, essendo la sua concentrazione molto alta.

Per valutare i tre protocolli riportati in Tabella 2.1, sono stati utilizzati tre campioni ottenuti dallo stesso esofago (un campione per ciascuna delle velocità in fase di studio).

Analizzando i risultati ottenuti dalla prima campagna sperimentale, il primo protocollo (v=15 rpm) è stato scartato perchè poco efficiente e causa della rottura dell'esofago. Quindi l'attenzione è stata rivolta solo agli ultimi due protocolli della Tabella 2.1 che, però, sono stati modificati per aumentarne l'efficacia e ridurne la durata complessiva.

La Tabella 2.1 riporta lo schema generale di ogni protocollo, il numero di campioni impiegati e la tecnica di analisi utilizzata per la sua valutazione, che questa volta si è

avvalsa oltre che dell'analisi visiva, anche dell'analisi quantitativa del contenuto di DNA degli organi decellularizzati.

Velocità pompa	PROTOCOLLO		N campioni	Analisi
	Step 1	Step 2		
30 rpm	[SDS]=0.1% T=4°C, t=24h	[SDS]=1% T.amb, t=12h	N=2	-Visiva -Estrazione di DNA
60 rpm	[SDS]=0.1% T=4°C, t=24h	[SDS]=1% T.amb, t=12h	N=2	-Visiva - Estrazione di DNA

Tabella 2.2: Protocolli di *decellularizzazione* modificati sulla base dei risultati preliminari

In seguito alla determinazione del protocollo di *decellularizzazione* ottimo, altri otto campioni sono stati decellularizzati con il protocollo definitivo. Cinque di questi sono stati utilizzati per una successiva *ricellularizzazione*, uno per l'esecuzione della caratterizzazione meccanica a trazione, uno per l'istologia e due per l'estrazione del DNA per una sua quantificazione.

2.2.3 Tecniche di analisi dell'efficacia della *decellularizzazione*

Le tecniche di analisi a cui si è ricorsi per la valutazione dei protocolli di *decellularizzazione* sono state l'ispezione visiva, l'estrazione di DNA e l'analisi istologica.

2.2.3.1 Ispezione visiva

L'analisi visiva è consistita nell'osservazione degli esofagi sottoposti al processo di *decellularizzazione*. Sebbene fosse una tecnica di analisi puramente qualitativa, è stata utile per una valutazione preliminare dello stato dell'esofago e quindi dell'efficacia del processo di rimozione cellulare. Non si è potuto ricorrere, però, solo all'ispezione visiva per l'ottimizzazione del protocollo di *decellularizzazione*. L'estrazione di DNA è stata la tecnica decisiva per la scelta del protocollo finale.

2.2.3.2 Estrazione di DNA

L'estrazione di DNA è la tecnica di analisi principale che è stata utilizzata per la scelta del protocollo ottimo di *decellularizzazione*. Il procedimento utilizzato per la determinazione della quantità di DNA dai vari campioni è stato il seguente:

1. pesare il campione;
2. omogeneizzare il campione con le forbici;
3. aggiungere 1ml di soluzione di lisi (100ml: 100mM di NaCl (10 ml NaCl 1M). Disciogliere 5.88g di NaCl in 80ml di acqua);
4. omogeneizzare con omogeneizzatore;
5. aggiungere 40 μ l Proteinase K (0.04%);
6. incubare tutta la notte a 37°C o da 2 a 8 ore a 55°C, fino alla completa dissoluzione del tessuto nella soluzione;
7. trasferire la soluzione così ottenuta in due eppendorf (500 μ l in ogni eppendorf);
8. aggiungere 500 μ l di fenolo in ogni eppendorf e mescolare bene;
9. cetrifugare a 3000rpm per 5 minuti;
10. si ottengono due fasi: trasferire la fase superiore acquosa in un nuovo eppendorf, eliminando quella inferiore;
11. preparare una soluzione 1:1 di fenolo-cloroformio;
12. aggiungere 500 μ l di fenolo-cloroformio ad ogni eppendorf contenente la fase superiore acquosa e mescolare bene;
13. centrifugare a 5000rpm per 3 minuti;
14. si ottengono due fasi: trasferire la fase superiore acquosa in un nuovo eppendorf, eliminando quella inferiore;
15. aggiungere mezzo volume di Acetato di Ammonio (AcNH₄) 7.5M (disciogliere 28.905g in 50ml di acqua distillata, non è necessario autoclavare);
16. aggiungere 2/2.5 volumi di etanolo assoluto a -20°C. Agitare;
17. se appare una medusa di DNA, pescarla con un pipetta pasteur e trasferirla in un nuovo tubo. La medusa si presenta come una sostanza gelatinosa di colore bianco, sospeso nella soluzione;
18. lasciare asciugare e risospendere in 50 μ l di acqua distillata;
19. se non appare la medusa, porre il tubo a T=4°C per 15 minuti;
20. centrifugare a massima velocità per 15minuti;

21. eliminare il liquido in eccesso per decantazione;
22. aggiungere un volume di etanolo 70% per eliminare i possibili resti salini che sono potuti precipitare con il DNA in seguito alla centrifugazione;
23. centrifugare a massima velocità per 10minuti;
24. eliminare il liquido in eccesso per decantazione;
25. centrifugare a massima velocità per due minuti e lasciare asciugare;
26. risospendere in 50 μ l di acqua distillata.

In entrambi i casi (punto 18 e punto 26), si ottiene dunque una soluzione in cui il DNA estratto è risospeso in acqua distillata.

La quantificazione del DNA avviene materialmente mediante l'ausilio del lettore di micropiastre multi-mode Synergy HT (*BioTek*), strumento economico, affidabile e facile da usare (Figura 2.13). Si tratta di un lettore in fluorescenza, assorbanza e luminescenza.



Figura 2.13: Lettore di micropiastre multi-mode Synergy HT (*BioTek*) [28]

A differenza di molti lettori di micropiastre multi-mode, il Synergy HT utilizza un sistema a doppia ottica. Il controllo della lettura è eseguito mediante il software per l'analisi dei dati Gen5™ di *BioTek*. La quantificazione del DNA avviene in assorbanza. Quando vengono eseguite misurazioni in assorbanza, lo strumento utilizza una lampada flash allo xeno e un monocromatore per la selezione della lunghezza d'onda. L'uso di una lampada flash allo xeno consente misurazioni d'assorbanza nel campo dell'ultravioletto e del visibile [28].

La struttura ad anello aromatico delle frazioni puriniche e pirimidiniche che compongono le basi nucleositiche di DNA e RNA sono responsabili dell'assorbanza della luce UV a 260 nm. Il protocollo prevede una pre-lettura della micropiastre per sottrarre l'assorbanza

di fondo a 260 nm, una determinazione dell'assorbanza a 977 nm e a 900 nm, che sono rispettivamente le lunghezze di banda del DNA e dell'RNA. L'assorbanza così corretta viene utilizzata per calcolare la concentrazione di DNA [29].

Operativamente la microquantificazione avviene mediante l'utilizzo di piastre multi spot, in grado di misurare fino a 48 diversi campioni contemporaneamente con un volume pari a 2 μ l ciascuno senza diluizione. Nel nostro caso sono state utilizzate piastre da 16 micro spot (Figura 2.14), ognuno dei quali è stato riempito con un volume pari a 2 μ l di campione.



Figura 2.14: Piastre multi spot in configurazione chiusa (a sinistra) e aperta (a destra) [28]

In ogni spot è stato collocato un volume pari a 2 μ l di sospensione ottenuta secondo il protocollo di estrazione. Per avere dei controlli di riferimento, i primi due spot della piastra sono stati riempiti con dell'acqua distillata. Inoltre è stato estratto materiale genetico anche da due esofagi nativi, utilizzati come controlli bianchi. In questa maniera è stato possibile mettere in relazione la quantità di DNA estratta da organi trattati e non. Per ogni campione analizzato sono stati riempiti quattro spot, in modo tale da avere più valori per lo stesso campione e poter fare una stima del dato. Una volta avvenuta la lettura della piastra, il software Gens 5.10 ha creato un report in cui per ogni spot veniva indicata la quantità di DNA espressa in ng/ μ l. Avendo riempito quattro spot a campione, è stata calcolata una media tra i quattro valori di DNA ottenuti, successivamente normalizzata con il peso del campione e con il volume di acqua distillata utilizzata per risospendere il DNA (solitamente 50 μ l).

2.2.3.3 Analisi istologiche

L'analisi istologica è stata utilizzata per la valutazione dei tessuti decellularizzati con il protocollo ottimo. Il procedimento attuato per l'ottenimento delle immagini istologiche è stato il seguente:

1. fissare il campione in aldeidi reattiva come la formalina, a temperatura ambiente. Lo scopo del fissaggio è quello di impedire la degenerazione dei tessuti per autolisi e di mantenere il più possibile inalterato il quadro strutturale dei tessuti. La durata del fissaggio varia in base alla grandezza del campione e al suo spessore (da poche ore a 1-2 giorni);
2. tagliare il campione in sezioni longitudinali e circonferenziali;
3. disidratare i campioni in etanolo attraverso passaggi in soluzioni a concentrazione crescente ("serie ascendente di alcoli": 50°,70°,80°,95°100°);
4. includere i campioni in paraffina. Lo scopo dell'inclusione è quello di rendere il campione di consistenza tale da poter essere affettato allo spessore voluto (circa 4µm). Poiché la paraffina viene venduta in blocchi o in granuli è necessario prima liquefarla a bagnomaria. Si versa uno strato di circa 2mm di paraffina sul fondo della vaschetta in cui sono posizionati i campioni disidratati da includere. Quando si forma un leggero opacamento (indice di un iniziale raffreddamento), si preleva rapidamente il campione dalla paraffina pura e lo si pone su uno strato di paraffina appena preparato in uno stampo metallico;
5. aspettare il raffreddamento e la solidificazione della paraffina e staccare il blocchetto con all'interno il campione dallo stampo metallico;
6. tagliare con il microtomo i blocchi di paraffina. Lo scopo del taglio è quello di ottenere uno strato di campione incluso dello spessore voluto, in modo da poter essere osservato al microscopio dopo opportuna colorazione. Conviene raffreddare i blocchi per renderli più rigidi al taglio e realizzare in questo modo sezioni più sottili. Poiché il blocchetto è molto sovrabbondante rispetto al campione che vi è incluso, si inizia con fette piuttosto spesse, asportando così la paraffina fino quando il campione comincia ad essere lambito dalla lama;
7. mediante l'ausilio di un pennellino sottile a pelo morbido, prelevare le fettine (spessore di circa 4µm) dal microtomo e porle in un'apposita vaschetta a riscaldamento contenente acqua tiepida ad una T=37-40°C. Questa operazione è

- necessaria per la distensione delle sezioni ottenute, affinché non si vengano a generare delle grinze che potrebbero compromettere la successiva colorazione;
8. trasferire le sezioni così distese sui vetrini. Il trasporto viene effettuato immergendo il vetrino inclinato sotto la sezione e, con l'aiuto del pennellino, la si fa scorrere sul vetrino facendovela aderire. A trasferimento avvenuto si estrae il vetrino dall'acqua e lo si lascia asciugare a $T=37^{\circ}\text{C}$ per un paio di ore;
 9. rimuovere la paraffina prima della colorazione. La sparaffinatura si effettua mediante l'immersione del vetrino in xilene e poi in una scala discendente di alcoli ($100^{\circ}, 95^{\circ}, 80^{\circ}, 70^{\circ}, 50^{\circ}$);
 10. procedere con la colorazione delle sezioni. In base alla colorazione che si vuole effettuare si deve seguire il protocollo specifico;
 11. lasciare asciugare il vetrino così colorato per rendere visibili le sezioni così ottenute al microscopio ottico.

Non sono state ottenute immagini istologiche per la scelta e l'ottimizzazione del protocollo a causa di problemi avuti con la macchina per la disidratazione dei campioni.

2.3 Ricellularizzazione esofagea

In questa parte sarà presentato il percorso seguito per il raggiungimento del terzo obiettivo, ossia un'iniziale *ricellularizzazione* esofagea. Si tratta di un primo approccio in cui si è voluto più che altro valutare il sistema sperimentale utilizzato e in cui si è cercato di formulare un protocollo che portasse a risultati preliminari incoraggianti.

Una volta determinato il protocollo migliore di *decellularizzazione*, altri quattro campioni esofagei sono stati decellularizzati con il protocollo ottimo e conservati in etanolo 70% a $T=4^{\circ}\text{C}$. La conservazione in etanolo, infatti, ha permesso di fissare la struttura degli organi e di preservarli da possibili contaminazioni. I quattro campioni decellularizzati sono stati in seguito utilizzati per la valutazione di due diversi protocolli di *ricellularizzazione*.

Di seguito è presentato uno schema generale del percorso messo in atto per la definizione di un protocollo che potesse garantire un'iniziale *ricellularizzazione* del tessuto (Figura 2.15).

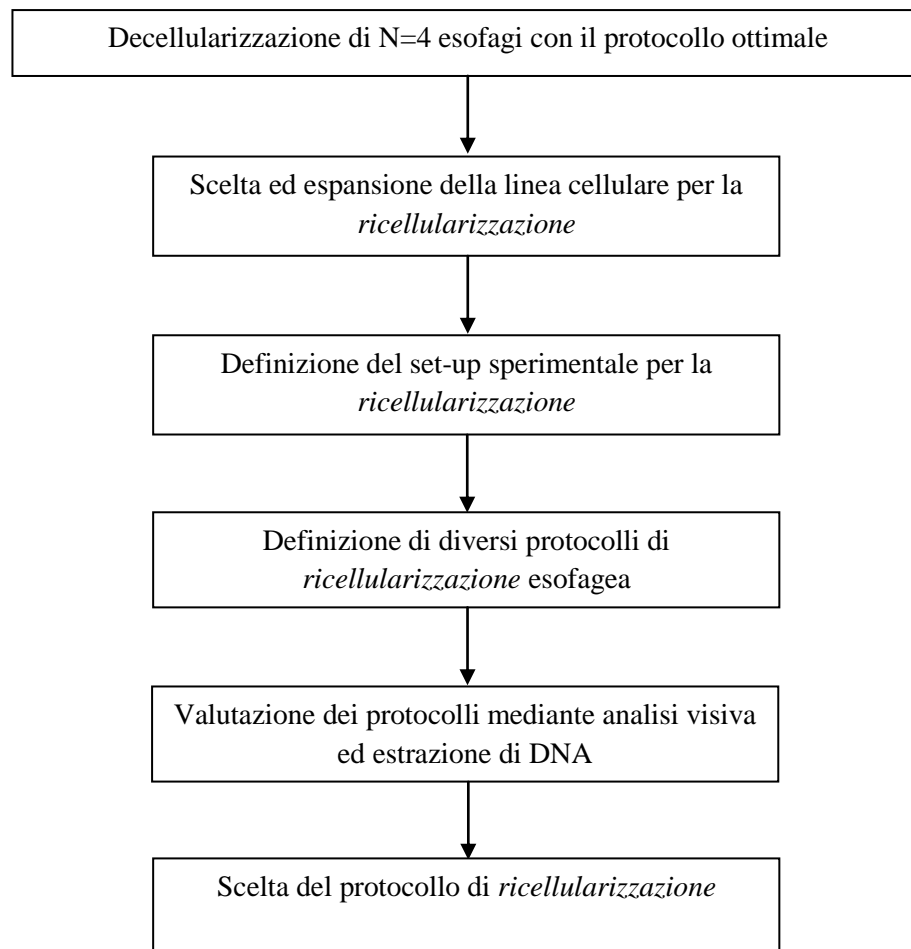


Figura 2.15: Rappresentazione schematica del procedimento seguito per la definizione di un protocollo di *ricellularizzazione* di esofagi di conigli di razza australiana

Dopo aver selezionato ed espanso la linea cellulare necessaria per la *ricellularizzazione* degli esofagi precedentemente decellularizzati, è stato definito e implementato un set-up sperimentale e sono stati ideati e valutati due protocolli di *ricellularizzazione*, per individuare quello migliore. Per la scelta del protocollo finale, ci si è basati sui risultati ottenuti da un'analisi visiva e da un'estrazione di DNA dai campioni ricellularizzati.

2.3.1 Coltura ed espansione cellulare

Il primo passo per la *ricellularizzazione* è stata la scelta della linea cellulare da utilizzare, che nel nostro caso è ricaduta sulle cellule staminali mesenchimali umane (hMSC). Poiché l'obiettivo del lavoro di tesi è una valutazione preliminare della capacità della matrice decellularizzata ad essere ricellularizzata, il primo passo è consistito nel valutare se il dispositivo e il protocollo di *ricellularizzazione* fossero adeguati. L'unico parametro che si è considerato per la scelta del tipo cellulare da utilizzare è stata la disponibilità immediata delle cellule. Infatti sono cellule da banca disponibili presso il laboratorio e solitamente

Capitolo 2: Materiali e Metodi

utilizzate per valutazioni preliminari. È stato necessario effettuare un'espansione cellulare al fine di ottenere il numero di cellule desiderato per andare a ripopolare l'esofago decellularizzato. A tale scopo è stato valutato il siero, elemento importante per la vitalità cellulare, più indicato per la coltura delle hMSC. È stato quindi condotto un test con sei differenti sieri fetali bovini (FBS), quali:

1. **L1** (*Lonza*): FBS di origine brasiliana, DE14-801E (lotto n° OSBO10), inattivato per 30 minuti a T=56°C e filtrato;
2. **L2** (*Lonza*): FBS di origine sudamericana, DE14-801E (lotto n° 95BO21), inattivato per 30 minuti a T=56°C e filtrato;
3. **G** (*Gibco*): FBS di origine sudamericana, 10270-106 (lotto n° 41F2703K), inattivato per 30 minuti a T=56°C e filtrato;
4. **H** (*Thermo*): FBS di origine sudamericana, SV30160.02 (lotto n° RVM35886), inattivato per 30 minuti a T=56°C e filtrato;
5. **S₁** (*SIGMA*): FBS non originario degli Stati Uniti, F7524 (lotto n° 06OM3399), inattivato per 30 minuti a T=56°C e filtrato;
6. **S₂** (*SIGMA*): FBS non originario degli Stati Uniti, F7524 (lotto n° 118K3395), inattivato per 30 minuti a T=56°C e filtrato.

Operativamente sono state seminate sei piastre da 96 pozzetti ciascuna. In ogni piastra 36 pozzetti sono stati riempiti con 100 µl di PBS, e i 60 rimanenti con 100 µl di una sospensione di 5000 cellule hMSC (10 µl FBS + 90 µl Minimum Essential Medium Eagle, MEM *SIGMA ALDRICH*). L'organizzazione della piastra è riportata in Figura 2.16: i 36 pozzetti contenenti PBS sono indicati con BLK in rosso e delimitano il perimetro della piastra. Il riempimento dei pozzetti perimetrali della piastra con PBS viene effettuato per evitare l'evaporazione della soluzione nei pozzetti di cui ci interessa misurare l'assorbanza. I 30 riquadri indicati con SPL1 corrispondono ai pozzetti contenenti la sospensione cellulare su cui è stato aggiunto un siero. La stessa cosa vale per le caselle SPL2, dove è stato aggiunto un secondo siero di tipo diverso da quello messo in SPL1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK
B	BLK	SPL1	SPL1	SPL1	SPL1	SPL1	SPL2	SPL2	SPL2	SPL2	SPL2	BLK
C	BLK	SPL1	SPL1	SPL1	SPL1	SPL1	SPL2	SPL2	SPL2	SPL2	SPL2	BLK
D	BLK	SPL1	SPL1	SPL1	SPL1	SPL1	SPL2	SPL2	SPL2	SPL2	SPL2	BLK
E	BLK	SPL1	SPL1	SPL1	SPL1	SPL1	SPL2	SPL2	SPL2	SPL2	SPL2	BLK
F	BLK	SPL1	SPL1	SPL1	SPL1	SPL1	SPL2	SPL2	SPL2	SPL2	SPL2	BLK
G	BLK	SPL1	SPL1	SPL1	SPL1	SPL1	SPL2	SPL2	SPL2	SPL2	SPL2	BLK
H	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK

Figura 2.16: Rappresentazione schematica dell'organizzazione delle piastre multi pozzetto su cui sono stati condotti i test sui sieri.

Come deducibile dall'osservazione della Figura 2.16, in ogni piastra sono stati analizzati due sieri differenti e ogni piastra è stata realizzata in duplicato. Per ogni siero, infatti, la vitalità delle hMSC è stata valutata dopo un giorno di coltura e dopo tre giorni, mediante il test di vitalità cellulare MTT. Il saggio MTT è un saggio colorimetrico che permette di rilevare l'attività degli enzimi mitocondriali. Essi, infatti, riducono l'anello tetrazolico della molecola di MTT (4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5 difeniltetrazolio bromuro) in sali di formazano, i quali rimangono localizzati all'interno dei mitocondri, producendo un viraggio della colorazione dal giallo al blu-violetto (Figura 2.17).

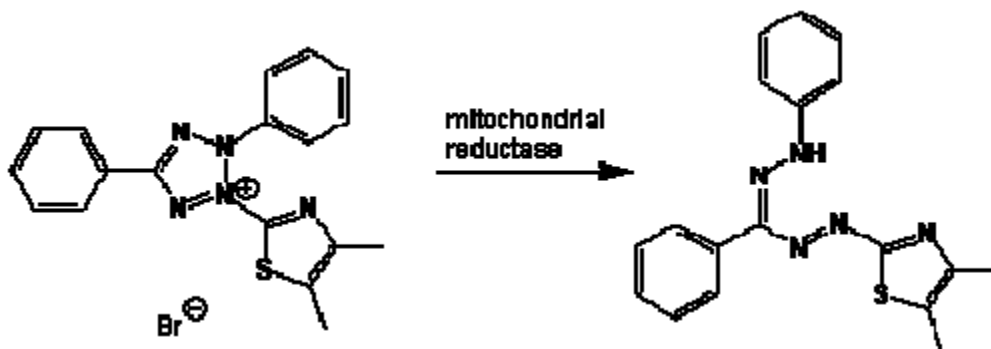


Figura 2.17: MTT (4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5 difeniltetrazolio bromuro) è ridotto in sali di formazano viola nelle cellule viventi, a opera delle reductasi mitocondriali.

Capitolo 2: Materiali e Metodi

Questa riduzione ha luogo solo se gli enzimi mitocondriali di riduttasi sono attivi, e quindi la conversione avviene solo in presenza di cellule vive. L'intensità della colorazione della soluzione ottenuta è direttamente proporzionale alla concentrazione di formazano ed è quindi espressione della vitalità cellulare.

Da un punto di vista operativo, sono stati aggiunti 10 µl di MTT in ogni pozzetto e dopo 4 ore 100 µl di agente solubilizzante. Il giorno seguente ciascuna piastra è stata inserita nell'apposito lettore di piastre (multi-mode Synergy HT, *BioTek*), gestito dal software *GENS 5.1.10*, che ha permesso di calcolare l'assorbanza per ciascun campione, con due filtri da 550 nm e 690 nm precedentemente selezionati, e di creare un report con il valore corrispondente ad ogni campione. Il sale di formazano che precipita emette in un range di lunghezza d'onda pari a 550-600 nm. Si usa come lunghezza d'onda di riferimento 690 nm che può essere considerata come un bianco della misura della lunghezza d'onda. Quindi si ottengono due valori di assorbanza in corrispondenza di 550 nm e 690 nm che vengono in seguito sottratti tra di loro (550-690), essendo appunto 690 nm il valore della lunghezza d'onda di riferimento. La legge di Lambert-Beer calcola l'assorbanza ad una certa lunghezza d'onda λ come $A_\lambda = -\text{Log}(I/I_0)$, dove I_0 è l'intensità del raggio incidente nel mezzo e I quella del raggio trasmesso. I valori di assorbanza ottenuti sono stati correlati direttamente con la vitalità cellulare e vi è una proporzionalità diretta tra i due parametri. Questi risultati sono stati poi elaborati in forma grafica.

Determinato quindi il siero da utilizzare, è stato scongelato un *cryovial* contenente un milione di cellule hMSC P14 provenienti da una banca cellulare (*European Collection Of Animal Cell Cultures, ECACC*). Si tratta di cellule di linea immortalizzate che, avendo subito una modifica del codice genetico, sono in grado di crescere velocemente e di replicarsi infinitamente *in vitro*, non andando così incontro a senescenza. La crioconservazione in azoto liquido permette il mantenimento della temperatura a -196°C : le cellule sono infatti in grado di sopportare l'ipotermia e non l'ipertermia che causerebbe la denaturazione delle proteine e la conseguente morte cellulare. Per la crioconservazione le cellule sono state poste in *cryovials*, ovvero piccole provette, e successivamente depositate nel contenitore contenente azoto liquido. Tali cellule sono state sospese in una soluzione che prende il nome di *freezing mix*: si tratta di una miscela composta dal 10% v/v di dimetilsolfossido (DMSO) e dal 90% v/v di FBS. Il dimetilsolfossido (DMSO) è un agente crioprotettivo che previene la formazione di cristalli di ghiaccio e quindi protegge

la membrana cellulare dalla rottura. Il FBS è la fonte energetica delle cellule che, sebbene siano in quiescenza, necessitano di nutrimento. In questa maniera viene preservata la morfologia e la funzione cellulare anche per anni. Il DMSO, però, a 37°C è tossico ed è proprio per questo che il processo di scongelamento deve essere molto rapido e correttamente eseguito.

Per lo scongelamento e in seguito per l'espansione cellulare è stata seguita la procedura riportata in Figura 2.18 e descritta in seguito.

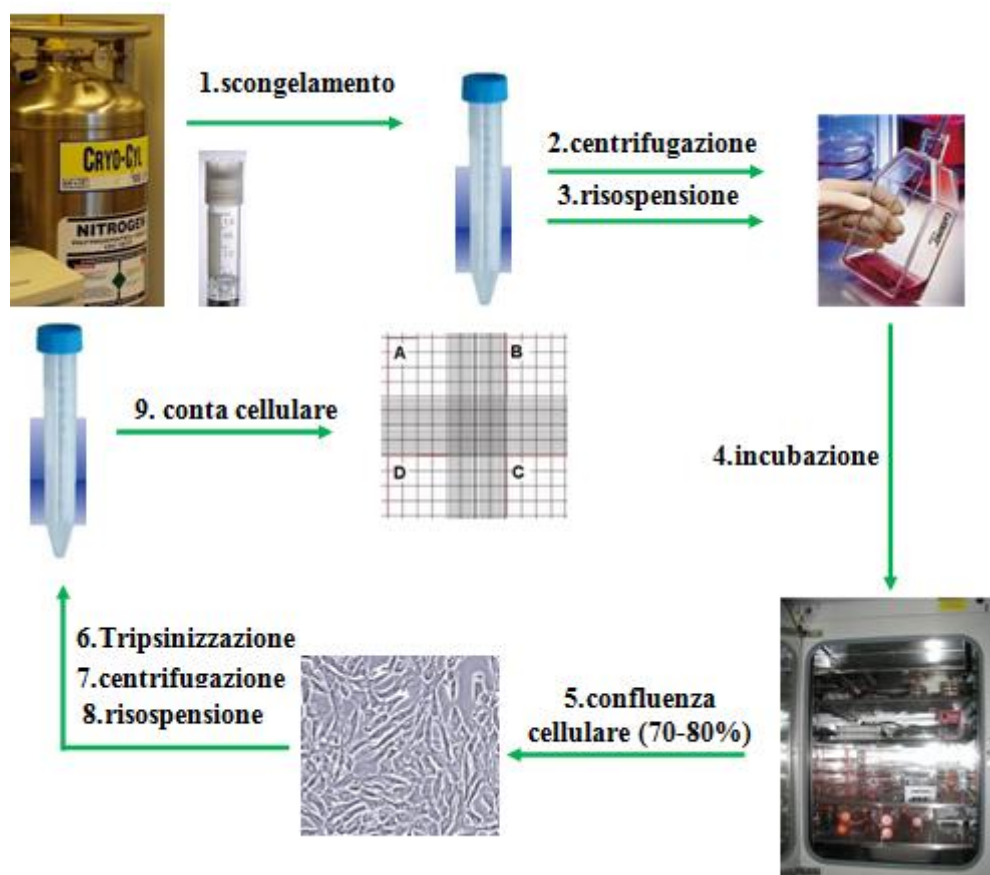


Figura 2.18: Processo standard di scongelamento e coltura cellulare

Dopo la rimozione del *cryovial* contenente le cellule dall'azoto liquido, questo è stato immerso in un bagnetto a 37°C per facilitare lo scongelamento. In seguito è stato aggiunto del terreno di coltura fresco (Minimum Essential Medium Eagle, MEM SIGMA ALDRICH) per bloccare l'azione del DMSO. Attraverso una centrifugazione (1500rpm per 5minuti), si è venuto a depositare un *pellet* di colore biancastro che è costituito dalle

cellule. In questo modo si è ottenuta la separazione del *pellet* di cellule dalla fase liquida, che è stata rimossa per eliminare il DMSO citotossico. *Il pellet* è stato poi risospeso con del mezzo di coltura fresco, per creare un ambiente adatto alle cellule e consentire le condizioni di crescita ottimali, trasferito in una *flask* e il tutto è stato poi posto in incubazione ($T=37^{\circ}\text{C}$, $[\text{CO}_2]=5\%$, $\text{RH}=95\%$) per espandere le cellule.

Come medium per l'espansione è stato utilizzato il Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (SIGMA ALDRICH), contenente il 10% del siero scelto in seguito all'analisi MTT, l'1% di amminoacidi non essenziali (SIGMA ALDRICH), 2 mM di L-Glutammina (SIGMA ALDRICH), 10 unità/mm di penicillina (SIGMA ALDRICH), 0.1 mg/mL di streptomicina (SIGMA ALDRICH) per evitare contaminazioni. Le cellule sono state mantenute in queste condizioni fino al raggiungimento di una buona confluenza (70-80% della superficie della *flask* occupata). A questo punto le cellule adese alla superficie della *flask* sono state staccate attraverso l'uso dell'enzima proteolitico tripsina, che ha un tempo di azione di 5 minuti a 37°C . Una volta aggiunto mezzo di coltura e centrifugata la soluzione (previo trasferimento in un tubo da centrifuga), si è ottenuto il *pellet* cellulare in seguito all'espansione.

La quantità di cellule necessaria per l'esecuzione dei primi due esperimenti di *ricellularizzazione* era di tre milioni di cellule. È stato dunque eseguito un conteggio cellulare utilizzando una *camera di Neubauer*. Il volume di sospensione corrispondente ai tre milioni di cellule è stato prelevato per la semina degli esofagi, mentre la restante parte è stata posta in una nuova *flask* per permetterne l'ulteriore espansione.

2.3.2 Set-up sperimentale e principio di funzionamento

Per la messa a punto di un sistema di *ricellularizzazione* ci si è ispirati al sistema di *decellularizzazione*. L'idea alla base è sempre la stessa e cioè ottenere la perfusione omogenea dell'organo. Naturalmente la differenza sostanziale sta nella soluzione di perfusione che cambia notevolmente rispetto al processo di *decellularizzazione*. In questo caso, infatti, l'esofago viene perfuso con una sospensione cellulare.

Viene qui di seguito riportata una rappresentazione schematica del set-up sperimentale utilizzato in questa fase del progetto di tesi (Figura 2.19), che consta principalmente di un sistema di pompaggio, una camera di *ricellularizzazione* e un circuito idraulico.

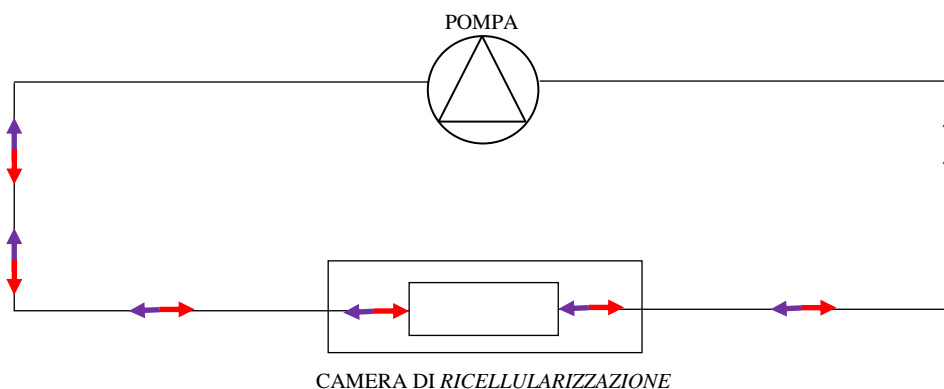


Figura 2.19: Rappresentazione schematica del sistema di *ricellularizzazione* di esofagi di conigli di razza australiana

Per comprendere meglio il set up sperimentale, viene di seguito riportata un'immagine del sistema di *ricellularizzazione* che è stato assemblato sotto cappa a flusso laminare ed in seguito utilizzato per ripopolare gli *scaffold* decellularizzati (Figura 2.20)



Figura 2.20: Sistema utilizzato per la *ricellularizzazione* dell'esofago

Come nel caso della *decellularizzazione*, la perfusione dell'esofago con la sospensione cellulare è stata garantita da un sistema di pompaggio peristaltico, totalmente integrato nel bioreattore TEB 1000 Master Unit (*EBERS Medical Technology, Zaragoza Spain*), nel quale viene alloggiato il sistema camera di coltura connessa circuito idraulico.

Come deducibile dalle frecce rosse e viola della Figura 2.19, si tratta di una perfusione oscillatoria. La pompa del bioreattore TEB genera un'oscillazione della sospensione

cellulare. All'interno dei tubi del circuito vi sono due mezzi, aria e liquido, in modo tale da poter visualizzare il movimento della sospensione cellulare durante tutta la durata della prova.

Come camera di *ricellularizzazione* è stato utilizzato lo stesso dispositivo utilizzato come camera di *decellularizzazione*, la Vascular Package TEB 100 Series (*EBERS Medical Technology, Zaragoza Spain*).

Il circuito idraulico è costituito da una serie di tubi (*Saint-Gobain Performance Plastics France*) in silicone, permeabili all'ossigeno, e di connettori in polipropilene. I tubi del sistema presentano due diametri differenti: quelli a contatto con la camera di *ricellularizzazione* possiedono un diametro interno pari a 2.4 mm ed esterno pari a 4.8 mm, mentre quello a contatto con la pompa presenta un diametro interno pari a 1.6 mm ed esterno pari a 3.2 mm. la permeabilità all'ossigeno in questa fase è molto importante per l'ossigenazione della sospensione cellulare all'interno dei tubi del circuito idraulico. Il tubo del sottopompa è un tubo Tygon.

Il bioreattore TEB 1000 Master Unit funge da incubatore. Infatti in questa fase è necessario garantire le condizioni necessarie per il mantenimento e la crescita cellulare in termini di temperatura, concentrazione di gas (O_2 e CO_2) e umidità relativa.

Inoltre, grazie alla presenza di un sistema di controllo di facile interfaccia con l'operatore, si è in grado di agire direttamente sul funzionamento di un sistema di pompaggio totalmente integrato nell'incubatore. Tale sistema consta di due pompe peristaltiche indipendenti alloggiare nella parete posteriore dell'incubatore, i cui motori sono posti al di fuori del bioreattore, così da scongiurare il pericolo di contaminazione. Uno schermo *touchscreen* fa sì che l'operatore sia in grado di impostare la portata del *medium*. La semina omogenea del costrutto è di fondamentale importanza per un corretto sviluppo degli esperimenti. In merito a ciò si è visto come una coltura dinamica, mediante la perfusione del costrutto, sia un metodo efficace per l'ottenimento di popolazioni cellulari seminate omogeneamente.

I maggiori vantaggi derivati dall'utilizzo del bioreattore TEB 1000 Master Unit sono:

- assenza delle problematiche legate all'introduzione dei sistemi convenzionali di pompaggio all'interno dell'incubatore, quali surriscaldamento, rischio di contaminazione, perdita di volume utile. Per quanto riguarda l'ultimo aspetto, il fatto di avere un sistema di pompaggio all'interno dell'incubatore fa sì che i tubi di

Capitolo 2: Materiali e Metodi

connessione del circuito idraulico sia di minore lunghezza garantendo così un minor volume di priming;

- versatilità e flessibilità. Non viene imposta alcuna limitazione in termini di spazio, forma o capacità dei costrutti che si alloggiano al suo interno, grazie all'architettura della Master Unit che è in grado di accogliere una grande varietà di camere di coltura;
- possibilità di condurre esperimenti simultanei con diverse condizioni di flusso, grazie al controllo indipendente di ciascuna pompa;
- basso costo in confronto ad altri bioreattori [27].

Descrivendo nel dettaglio il set up sperimentale utilizzato per la *ricellularizzazione* dell'esofago (Figura 2.20), il sistema costituito dalla camera di coltura e dal circuito idraulico è stato montato interamente sotto cappa, dopo sterilizzazione in autoclave ($T=121^{\circ}\text{C}$ per circa 20 minuti). Una volta avvenuto l'assemblaggio dei differenti elementi, il sistema è stato trasferito all'interno dell'unità Master e connesso ad una delle due pompe peristaltiche. È proprio il controllo di questa pompa, mediante un'interfaccia diretta con il sistema di controllo di tutto il sistema, che ha reso possibile l'oscillazione della sospensione cellulare, in modo da effettuare una semina dinamica del costrutto al fine di ottenere una distribuzione omogenea delle cellule.

L'esofago, decellularizzato e conservato in etanolo al 70% ad una $T=4^{\circ}\text{C}$, è stato ancorato al circuito interno della camera di coltura con del filo di sutura (Figura 2.21a), per poi essere immerso in una soluzione di circa 75 ml di terreno di coltura Minimum Essential Medium Eagle, MEM (*SIGMA ALDRICH*) con aggiunta di un antifungina ad una concentrazione di $1.25\ \mu\text{g/ml}$ (*Amphotericin B, GIBCO*), che riempie interamente il circuito esterno della camera di coltura (Figura 2.21c). Il riempimento della camera è avvenuto mediante l'utilizzo di una siringa in corrispondenza di una delle valvole a tre vie agganciata ad un tubo in silicone di diametro interno pari a 2.4 mm ed esterno 4.8 mm (*Saint-Gobain Performance Plastics, France*) del circuito idraulico (freccia gialla in Figura 2.21b). A questo punto un milione di cellule è stato risospeso in una soluzione di MEM (8 ml) (addizionato di FBS precedentemente selezionato al 10%) e di un FGF (*Fibroblast Growth Factor*) ad una concentrazione di 5 ng/ml ed è stato iniettato nella camera di perfusione della camera di coltura. L'iniezione della sospensione cellulare è

Capitolo 2: Materiali e Metodi

avvenuta anche questa volta con l'ausilio di una siringa in corrispondenza dell'altra valvola a tre vie del circuito idraulico, connessa al tubo in silicone di diametro interno pari a 2.4 mm ed esterno 4.8 mm, (*Saint-Gobain Performance Plastics, France*) (freccia gialla nella Figura 2.21d).

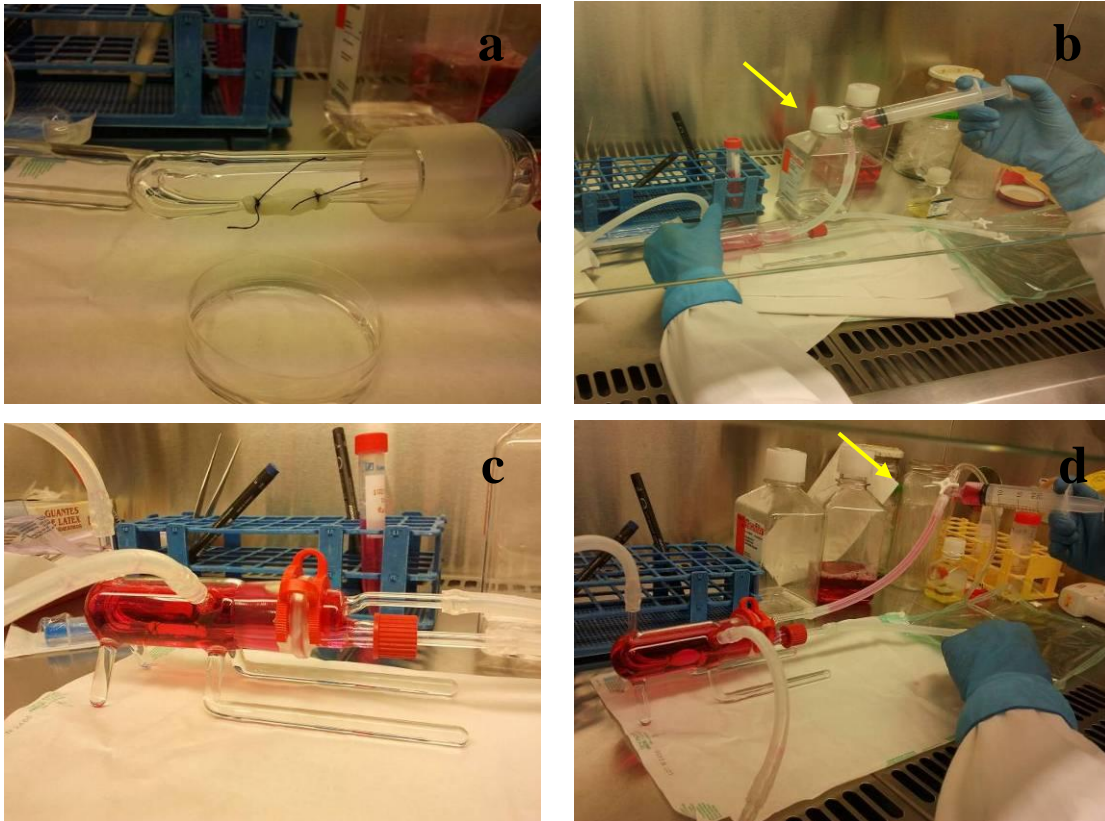


Figura 2.21: a) Esofago decellularizzato vincolato alla camera di perfusione della camera di coltura mediante del filo di sutura; b) riempimento della camera di immersione della camera di coltura con il terreno di coltura per mezzo di una siringa; c) Vascular Package TEB 100 Series in configurazione di lavoro con l'esofago totalmente immerso nel mezzo; d) iniezione della sospensione cellulare di hMSC all'interno della camera di perfusione della camera di coltura, mediante l'ausilio di una siringa.

Il sistema così montato in condizioni di sterilità, è stato successivamente trasferito all'interno del bioreattore TEB e connesso ad una delle due pompe peristaltiche situate nella parete posteriore. In Figura 2.22 viene riportato nel dettaglio il sistema di controllo del bioreattore TEB 1000 Master Unit.



Figura 2.22: Sistema di controllo del bioreattore TEB 1000 Master Unit (*EBERS Medical Technology, Zaragoza Spain*)

Prima impostazione di determinati parametri, quali diametro esterno del tubo sottopompa (3,2 mm), volume (3 ml), portata (5 ml/min), è stata avviata la perfusione dell'esofago per un tempo dipendente dal tipo di protocollo. La pompa, direzionata dal sistema di controllo, ha generato l'oscillazione della sospensione cellulare, al fine di evitare di ottenere una semina non omogenea del costrutto. L'idea è quella di fare in modo che la sospensione cellulare stia sempre a contatto con l'esofago e che un'oscillazione della stessa incrementi la probabilità di ottenere una distribuzione cellulare omogenea nel lume interno del substrato. È stato importante accertarsi che la sospensione non arrivasse mai a livello della pompa, per evitare il possibile danneggiamento delle cellule in seguito alla compressione dei tubi. In merito a quest'ultimo aspetto, c'è la possibilità di regolare un fattore di disequilibrio (Factor de disequilibrio in Figura 2.22) per regolare l'oscillazione e scongiurare pericoli di danneggiamento cellulare. Ad esempio, per un fattore di disequilibrio uguale a 0%, l'oscillazione è simmetrica e quindi la sospensione raggiunge la medesima altezza in entrambe le parti. Oltre al fattore di disequilibrio esiste anche un altro parametro, il lato di disequilibrio, necessario per selezionare il lato di asimmetria. A titolo esemplificativo, per un fattore di disequilibrio pari al 10% (lato di disequilibrio sinistra) si avrà un 10% in più della sospensione cellulare sul lato sinistro e così via.

2.3.3 Protocolli di *ricellularizzazione*

Definito e implementato il set-up sperimentale per poter ricellularizzare l'esofago, sono stati messi a confronto due protocolli differenti, il primo con due iniezioni cellulari e il secondo con una sola iniezione cellulare. Entrambi i protocolli prevedevano 3 step:

- iniezione cellulare;
- semina dinamica (oscillante);
- coltura statica.

1. Protocollo a doppia iniezione cellulare:

- **Giorno 0:** iniezione di un milione di cellule e oscillazione della sospensione cellulare per 24 ore (semina dinamica);
- **Giorno 1:** interruzione dell'oscillazione e mantenimento del costruito in condizioni di staticità per 24 ore;
- **Giorno 2:** iniezione di un milione di cellule e oscillazione della sospensione cellulare per 24 ore (semina dinamica);
- **Giorno 3:** interruzione dell'oscillazione e mantenimento del costruito in condizioni di staticità per 24 ore;
- **Giorno 4:** prelievo e analisi dell'organo.

Per la valutazione di questo primo protocollo sono stati utilizzati due campioni esofagei. Le tecniche di analisi utilizzate sono state un'ispezione visiva e un'estrazione di DNA secondo il protocollo descritto nel paragrafo 2.2.3.2.

2. Protocollo a singola iniezione cellulare:

- **Giorno 0:** iniezione di un milione di cellule e oscillazione della sospensione cellulare per 24 ore (semina dinamica);
- **Giorno 1:** interruzione dell'oscillazione e mantenimento della condizione di staticità per 72 ore;
- **Giorno 4:** prelievo e analisi dell'organo.

Anche per la valutazione di questo protocollo sono stati trattati due campioni con le medesime tecniche di analisi utilizzate per l'analisi del primo protocollo.

Infine, a valle dell'identificazione del protocollo migliore, altri tre campioni esofagei, provenienti dallo stesso animale, precedentemente decellularizzati e conservati in etanolo al 70% a $T=4^{\circ}\text{C}$, sono stati ricellularizzati con il protocollo finale; due di questi sono stati utilizzati per l'estrazione di DNA e per una caratterizzazione istologica, mentre sul terzo è stata effettuata una caratterizzazione meccanica di trazione in direzione longitudinale e circonferenziale.

La stessa prova è stata effettuata anche su un esofago nativo e su uno decellularizzato con il protocollo di *decellularizzazione* ottimizzato.

2.4 Prove meccaniche

In quest'ultima parte viene riportato il procedimento seguito per lo svolgimento delle prove meccaniche di trazione. In generale le prove di tipo meccanico servono a descrivere il comportamento di un materiale sottoposto a deformazione.

Le stesse prove di trazione sono state effettuate su un esofago nativo, su un esofago decellularizzato con il protocollo ottimo e su un esofago ricellularizzato anche in questo caso con il protocollo migliore. Questa scelta è stata dettata dal fatto che si voleva confrontare il comportamento dell'esofago nativo, decellularizzato e ricellularizzato, al fine di valutare se lo stato di la rigidezza, lo sforzo massimo e la deformazione del tessuto avevano subito alterazioni a seguito dei trattamenti e, in caso affermativo, come questi parametri sono stati alterati.

Le prove sono state eseguite a temperatura ambiente e sono consistite nel sottoporre i campioni a rottura per mezzo di uno sforzo di trazione generato da una macchina di prova di tipo meccanico (Figura 2.23).



Figura 2.23: Vista frontale e laterale del sistema *INSTRON 5848 micro-tester*

Da un esofago di forma cilindrica ($L \approx 3$ cm e diametro ≈ 0.5 cm) sono stati ricavati, in base alla grandezza dell'organo, diversi provini rettangolari (longitudinali e circonferenziali) mediante l'ausilio di un bisturi. Sull'esofago cilindrico è stato effettuato un taglio longitudinale (in rosso nella Figura 2.24a) in modo da avere il campione esofageo in una configurazione tale da permettere l'ottenimento dei provini a forma di striscia (Figura 2.24b). Il numero di campioni ottenuti è dipeso dalla grandezza del campione iniziale ed è riassunto nel seguito:

- esofago nativo: 5 longitudinali + 5 circonferenziali;
- esofago decellularizzato: 3 longitudinali + 4 circonferenziali;
- esofago ricellularizzato: 3 longitudinali + 3 circonferenziali.

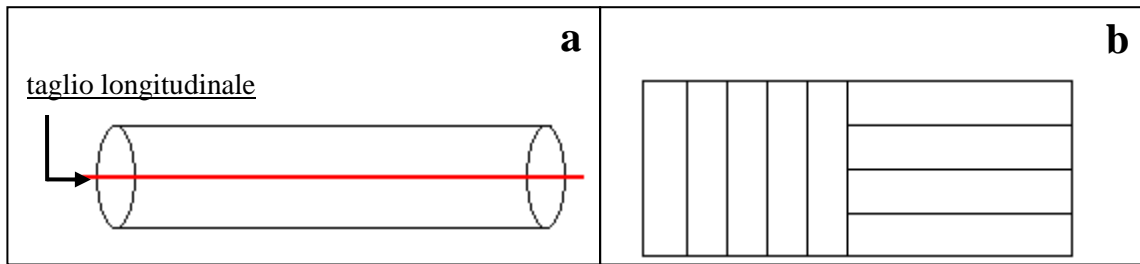


Figura 2.24: Provini a forma di striscia ottenuti in direzione longitudinale e circonferenziale (a) partire dall'esofago di forma cilindrica su cui è stato effettuato un taglio longitudinale (in rosso) (b)

I campioni così ottenuti sono stati misurati, in termini di lunghezza, larghezza e spessore, mediante un calibro (*Mitutoyo, Italia*) che presenta una risoluzione di 0.01 mm (Figura 2.25):

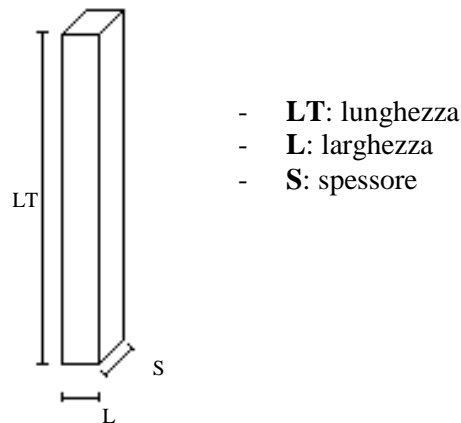


Figura 2.25: Schematizzazione dei provini sottoposti a prove di trazione.

Una volta misurato il provino è stato fissato tra i due morsetti della macchina di trazione in posizione verticale. Le estremità sono state vincolate in corrispondenza di due ganasce dotate di viti che, una volta posizionato il provino, vengono serrate in modo tale da garantire il corretto afferraggio durante la prova (Figura 2.26). Un vaporizzatore, posto davanti alla macchina di trazione, ha permesso il mantenimento dei provini in condizioni di umidità per tutta la durata della prova.

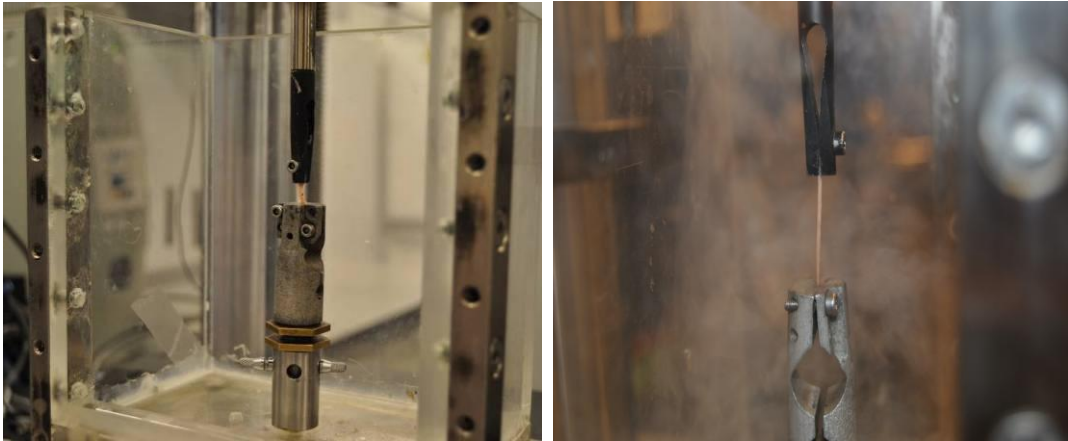


Figura 2.26: Campione immobilizzato tra i morsetti della macchina *INSTRON 5848 micro-tester*

I provini così vincolati sono stati sottoposti a prove di trazione senza alcun preconditionamento. mediante l'utilizzo della macchina *INSTRON 5848 micro-tester* rappresentata Figura 2.23. La macchina a trazione è progettata per prove statiche e dinamiche ed esegue prove di trazione, compressione, flessione, cicliche e di taglio su diversi materiali, provini e componenti. Sulla macchina è presente inoltre una cella di carico elettronica con fondo scala di 10 N che misura istante per istante la forza applicata al provino. Si tratta di un componente elettronico (trasduttore) impiegato per misurare la forza tramite la misura di un segnale elettrico che varia a causa della deformazione che tale forza produce sul provino.

È stata effettuata una prova di trazione in controllo di spostamento, in cui l'estensione del provino è stata misurata valutando lo spostamento di una delle due traverse in direzione opposta rispetto allo stato di sforzo generato nel provino. La velocità della traversa è stata imposta costante e pari a 1.5 mm/min

La fine della prova è avvenuta a rottura del provino.

Per ogni provino (in tutto 21) sono stati calcolati quattro parametri:

1. E_{low} [MPa]: modulo di Young iniziale; corrisponde alla pendenza della curva sforzo-deformazione nel tratto iniziale;
2. E_{high} [MPa]: modulo di Young finale; corrisponde alla pendenza della curva sforzo-deformazione fino al raggiungimento della rottura;
3. sforzo massimo (σ_{max}) [MPa]: rappresenta il rapporto tra la il carico applicato (F) e l'aria iniziale del provino (A_0);

Capitolo 2: Materiali e Metodi

4. deformazione massima (ϵ_{max}) [%]: grandezza adimensionale che equivale al rapporto tra la variazione di lunghezza (Δl) e la lunghezza iniziale del provino (l_0).

Per ogni prova è stato ottenuto un diagramma sforzo-deformazione ed è stato fatto un confronto tra gli andamenti delle curve σ - ϵ popolazioni in esame.

Sui parametri estratti dalle prove di caratterizzazione meccanica è stata poi effettuata una analisi statistica al fine di individuare eventuali differenze statistiche significative tra le popolazioni in esame. Per la comparazione tra le tre diverse popolazioni di dati è stato utilizzato un test *One Way ANOVA* per l'analisi delle varianze, seguito da un *Dunn test* per l'analisi delle differenze tra due campioni disaccoppiati dei diversi gruppi di dati messi a confronto.

CAPITOLO 3: RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo capitolo vengono riportati i risultati ottenuti nelle diverse campagne sperimentali che sono state condotte: la valutazione del metodo di incannulazione di organi complessi, l'ottimizzazione di un protocollo di *decellularizzazione* esofagea e la valutazione e selezione di un possibile protocollo di *ricellularizzazione* esofagea ancora in fase del tutto preliminare.

La prima parte del capitolo verte sui risultati ottenuti durante la valutazione della tecnica di incannulazione di organi, che si basano fondamentalmente sull'analisi visiva degli organi sottoposti a incannulazione e *decellularizzazione*.

La seconda parte, invece, presenta i risultati sperimentali che hanno portato all'ottimizzazione del protocollo di *decellularizzazione* e all'individuazione del protocollo di *ricellularizzazione* definitivo per gli esofagi.

Infine un'ultima parte riguarda gli esiti delle prove di *ricellularizzazione* effettuate sugli esofagi decellularizzati secondo il protocollo di *decellularizzazione* ottimo.

3.1 Valutazione dell'efficacia del metodo di incannulazione di organi complessi

3.1.1 Valutazione del set-up sperimentale

Come prima cosa si è voluto valutare il sistema di *decellularizzazione* dal punto di vista della funzionalità e della semplicità di utilizzo.

Il sistema messo a punto per la valutazione del metodo di incannulazione degli organi è stato utilizzato per svolgere una campagna sperimentale di *decellularizzazione*, durante la quale si è dimostrato adeguato e di facile utilizzo. Non vi sono stati episodi di mal funzionamento del sistema o di inadeguata perfusione degli organi trattati, se non a causa di una non corretta incannulazione.

La trasparenza della camera di *decellularizzazione* ha garantito un continuo monitoraggio dell'organo durante il processo, permettendo di valutare il cambiamento più o meno omogeneo del colore. La variazione di colore dell'organo è stata direttamente correlata all'efficacia della tecnica di incannulazione utilizzata. Infatti uno schiarimento omogeneo del tessuto è stato indice di una corretta incannulazione e, viceversa, una decolorazione assente o non omogenea è stata indice di una non corretta incannulazione.

Un possibile miglioramento del sistema di perfusione avrebbe potuto riguardare il reservoir che costituisce la camera di *decellularizzazione*. Infatti, soprattutto nel caso del fegato, la soluzione decellularizzante è diventata torbida, a causa della grande quantità di sangue presente nell'organo. L'iniezione mediante la cannula del fluido ha generato la fuoriuscita del sangue che si è riversato nello stesso reservoir. In questo modo la visualizzazione del fegato nel corso dell'esperimento è stata più difficoltosa. Per questo motivo si sarebbe potuto migliorare il sistema utilizzando una camera di *decellularizzazione* più grande, ad esempio da 1 litro, per diluire il sangue e diminuire la torbidità della soluzione.

3.1.2 Valutazione del metodo di incannulazione

La valutazione dell'efficacia del metodo di incannulazione di cuore, fegato e polmoni è avvenuta esclusivamente mediante un'ispezione visiva, durante la quale si è osservato il cambiamento del colore degli organi incannulati e sottoposti a *decellularizzazione*.

Le figure di seguito riportate (Figura 3.1a,b,c) mostrano come appaiono cuore, fegato e polmoni in seguito ad un corretto processo di incannulazione e *decellularizzazione*.

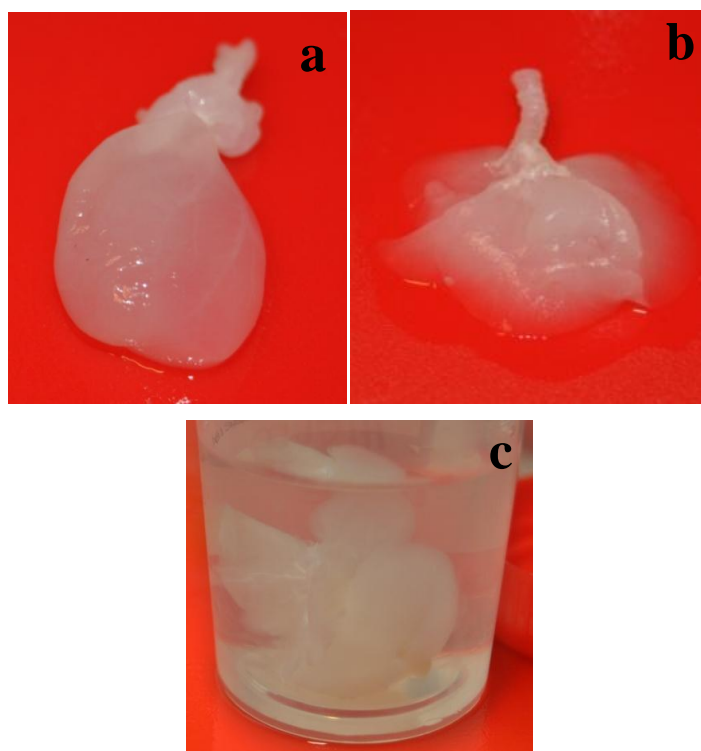


Figura 3.1: Cuore (a), polmoni (b) e fegato (c) incannulati e declularizzati secondo il protocollo descritto nel paragrafo 2.1.3

Per quanto riguarda il cuore si è ottenuto un successo del 100%. L'incannulazione aortica si è dimostrata efficace in entrambi i campioni, che dopo il processo di *decellularizzazione* sono apparsi completamente bianchi, come in Figura 3.1a. Sebbene si sia trattato solo di due campioni e quindi la statistica non sia stata molto significativa, si può affermare che l'aorta potrebbe essere il sito di incannulazione adeguato per l'ottenimento di una perfusione cardiaca omogenea. Questo in contrapposizione al metodo di incannulazione coronarica utilizzato da Ott et al. [16] per la *decellularizzazione* di cuori di ratto. Si può concludere che quando si ha a che fare con cuori di grandi dimensioni come ad esempio quelli di maiale, si può pensare ad una perfusione coronarica o addirittura ad una doppia incannulazione. Si potrebbe infatti far ripercorrere alla soluzione decellularizzante lo stesso percorso che compie il sangue durante la sistole e la diastole. L'incannulazione dovrebbe quindi avvenire in corrispondenza della vena cava e della vena polmonare. Quando, però, le dimensioni degli organi sono ridotte, come quelle di ratto, è meglio procedere con una perfusione aortica, anche per evitare di compromettere l'integrità della rete coronarica. L'aorta, infatti, presenta dimensioni di gran lunga maggiori rispetto alle coronarie e quindi una sua incannulazione risulta essere meno problematica e traumatica.

Anche per quanto riguarda i polmoni si è ottenuto un successo del 100%. Entrambi i campioni incannulati e decellularizzati sono apparsi bianchi (Figura 3.1b) indice di un'avvenuta rimozione cellulare. La perfusione polmonare, mediante l'incannulazione della trachea, è quindi risultata essere molto efficace. Poiché la trachea è il condotto che trasporta l'aria ai polmoni, la soluzione decellularizzante iniettata al suo interno si è distribuita omogeneamente nell'albero bronchiale. Inoltre il processo di incannulazione non è risultato essere problematico in quanto la trachea, anche quando si ha a che fare con organi molti piccoli, possiede una modesta dimensione che fa sì che l'incannulazione non sia troppo difficoltosa.

Nel caso del fegato invece la *decellularizzazione* non è avvenuta con successo in entrambi gli organi: solo uno è apparso decellularizzato, come appare in Figura 3.1c, mentre l'altro organo è stato decellularizzato solo parzialmente. Questo parziale insuccesso è stato causato esclusivamente dalla difficile individuazione del vaso da incannulare. Infatti, una volta estratto l'organo dall'animale, la vena porta non è risultata ben riconoscibile ed inoltre, essendo un vaso molto delicato, il rischio di rottura durante l'inserimento della cannula è elevato. La soluzione migliore sarebbe stata pertanto quella di individuare il sito

di incannulazione adeguato *in vivo*, perfondendo l'animale con PBS per eliminare eventuali coaguli e inserendo la cannula durante questa fase, quando i vasi cioè non hanno ancora perso il loro tono e non sono collassati. Questa soluzione potrebbe essere applicata per tutti gli organi anatomicamente complessi. Con questa strategia ci sarebbe il vantaggio di garantire un processo semplificato che non comporta la manipolazione dell'organo e il rischio di danneggiamento, come accade invece con l'incannulazione *ex vivo*. Infatti, una volta incannulati, gli organi verrebbero estratti, congelati a secco, e scongelati al momento del bisogno; la cannula sarebbe già inserita nel sito corretto e basterebbe solo connettere l'organo con il sistema di perfusione e procedere con la sua *decellularizzazione*. L'incannulazione *in vivo* sarebbe quindi la fase iniziale dei processi di *decellularizzazione* di organi complessi.

3.2 Decellularizzazione esofagea

Questa sezione è divisa in due parti: nella prima vengono fatte delle valutazioni sul set-up sperimentale per la *decellularizzazione* esofagea, mentre nella seconda vengono riportati i risultati che hanno poi portato all'ottimizzazione del protocollo per la *ricellularizzazione* esofagea.

3.2.1 Valutazione del set-up sperimentale

Il set-up sperimentale utilizzato per la *decellularizzazione* esofagea, descritto nella sezione 2.2.1, si è dimostrato appropriato. Come prima cosa, come nel caso precedente, non vi sono stati problemi con il funzionamento del sistema. La semplicità del set-up sperimentale e l'utilizzo di una camera di *decellularizzazione* che permettesse simultaneamente la perfusione e l'immersione dell'esofago nella soluzione decellularizzante, hanno garantito un'adeguata perfusione esofagea in tutti gli esperimenti di *decellularizzazione* condotti. L'indipendenza della camera di perfusione da quella di immersione, inoltre, ha reso agevole il posizionamento dell'esofago all'interno della camera di *decellularizzazione*. Infatti, grazie alla possibilità di separare le due componenti, è stato semplice ancorare l'esofago ai tubi della camera di perfusione mediante del filo di sutura.

Infine la trasparenza della camera di *decellularizzazione* ha permesso un continuo monitoraggio dello stato dell'organo, sia in termini di cambiamento del colore che in

termini di mantenimento della sua integrità strutturale. È stato inoltre possibile accertarsi che l'esofago fosse stabilmente ancorato alla camera di perfusione per tutta la durata dell'esperimento.

3.2.2 Risultati degli esperimenti di *decellularizzazione* di esofagi

In questa sezione viene posta particolare attenzione sui risultati ottenuti durante la fase preliminare di esplorazione di diversi protocolli di *decellularizzazione*.

Il metodo di *decellularizzazione* che è stato utilizzato in tutti i protocolli è un metodo combinato fisico-chimico.

Il congelamento e lo scongelamento degli esofagi prima del trattamento con il detergente non ionico, non ha provocato nessun danno visibile al tessuto, anche se, per poterlo affermare con certezza, sarebbe stato necessario effettuare un'analisi istologica. Infatti altri lavori di letteratura [3][8] affermano che congelamenti rapidi potrebbero distruggere o danneggiare la ECM. Dunque sarebbe stato più appropriato congelare gli organi in maniera più graduale, ad esempio partendo da una $T = -20^{\circ}\text{C}$, per poi passare ad una $T = -80^{\circ}\text{C}$ e solo infine ad una $T \approx -140^{\circ}\text{C}$. Quello che però si può affermare con certezza è che gli esofagi scongelati non presentavano nessun danno visibile ad occhio nudo.

Vengono di seguito riportati e commentati i risultati ottenuti dagli esperimenti eseguiti per *decellularizzare* esofagi utilizzando i tre protocolli preliminari riportati in Tabella 3.1

Velocità pompa	PROTOCOLLO			N campioni	Analisi
	Step 1	Step 2	Step 3		
15 rpm	[SDS]=0.01% T=4°C, t=24h	[SDS]=0.1% T=4°C, t=24h	[SDS]=1% T.amb, t=24h	N=1	Visiva
30 rpm	[SDS]=0.01% T=4°C, t=24h	[SDS]=0.1% T=4°C, t=24h	[SDS]=1% T.amb, t=24h	N=1	Visiva
60 rpm	[SDS]=0.01% T=4°C, t=24h	[SDS]=0.1% T=4°C, t=24h	[SDS]=1% T.amb, t=24h	N=1	Visiva

Tabella 3.1: Protocolli per la valutazione preliminare del processo di *decellularizzazione*

Il primo protocollo, ossia quello relativo ad una velocità della pompa uguale a 15 rpm ($Q=15$ ml/min), è stato scartato in quanto ha mostrato alcuni limiti, quali una bassa

efficienza e un problema connesso ai tubi del circuito idraulico. Per quanto riguarda il primo aspetto la velocità era troppo bassa per garantire una totale *decellularizzazione* in 72 ore. Questo da solo sarebbe stato già un motivo sufficiente per l'eliminazione del protocollo a 15 rpm, infatti uno dei requisiti fondamentali di un buon protocollo di *decellularizzazione* è che la sua durata sia la minore possibile. L'obiettivo finale è la totale rimozione delle cellule senza però la compromissione della struttura del tessuto trattato. È infatti di fondamentale importanza che la matrice extracellulare, qualora la si voglia utilizzare come materiale per la realizzazione di uno *scaffold* biologico, venga preservata in termini di struttura e architettura tridimensionale [7]. Il contatto prolungato dell'esofago con una soluzione aggressiva come quella decellularizzante può avere effetti negativi sull'integrità della struttura della ECM dell'organo.

In aggiunta è stato riscontrato anche un problema con i tubi del circuito idraulico. La precipitazione del soluto a concentrazioni molto elevate ($[SDS]=1\%$) ha provocato l'otturazione dei tubi con conseguente aumento di pressione e rottura dell'esofago. Anche questo specifico problema è legato alla bassa velocità del fluido decellularizzante all'interno del circuito.

Gli esofagi trattati con gli altri due protocolli, riportati in Tabella 3.1, sono stati analizzati mediante un'ispezione visiva durante l'intera durata dell'esperimento, in particolar modo in corrispondenza di tre time point: 24 ore, 48 ore e 72 ore. Dopo 24 ore di perfusione con una soluzione contenente SDS ad una concentrazione dello 0.01%, i due esofagi sono apparsi del medesimo colore dell'esofago nativo. Questo non vuol dire che la concentrazione dello 0.01% non abbia avuto alcuno effetto sulla rimozione cellulare, bensì che non sia stato rilevante. La Figura 3.2 e la Figura 3.3, sono una testimonianza dei risultati precedentemente descritti. Si può osservare, infatti, come il colore dell'organo dopo 24 ore di perfusione (Figura 3.2b e Figura 3.3b) sia praticamente lo stesso rispetto a quello dell'organo nativo (Figura 3.2a e Figura 3.3b), per entrambe le velocità della pompa (30 rpm e 60 rpm).

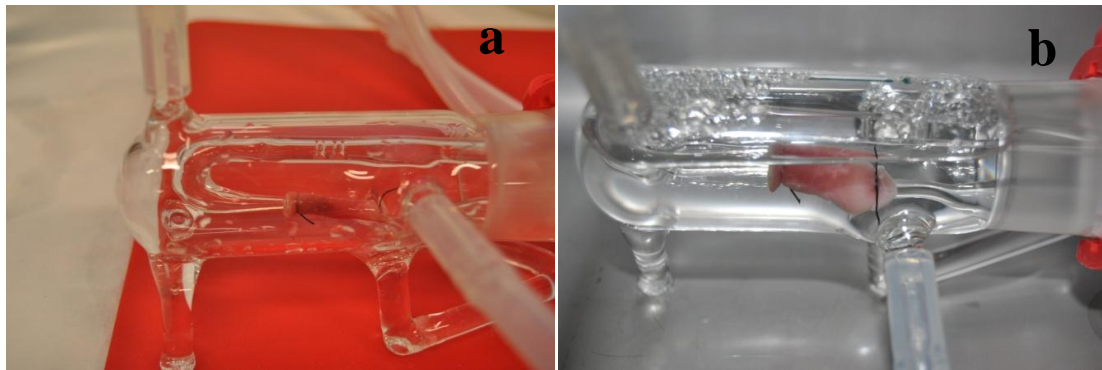


Figura 3.2: Confronto tra un esofago nativo ($t=0$) (a) e lo stesso esofago in seguito ad una perfusione con una soluzione contenente SDS ad una concentrazione dello 0.01%, ad una velocità di 30 rpm ($t=24$ h) (b)

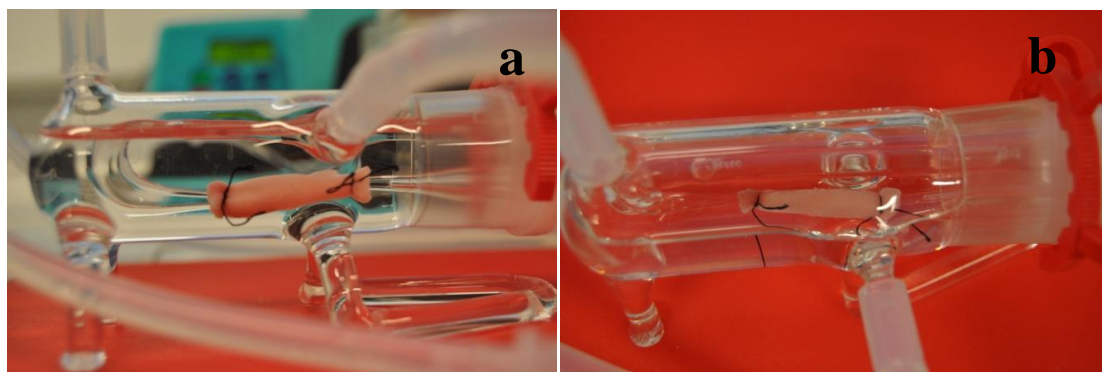


Figura 3.3: Confronto tra un esofago nativo ($t=0$) (a) e lo stesso esofago in seguito ad una perfusione con una soluzione contenente SDS ad una concentrazione dello 0.01%, ad una velocità di 60 rpm ($t=24$ h) (b)

Inoltre da una valutazione dello stato degli esofagi alla fine del processo di *decellularizzazione* è emerso un loro danneggiamento, per entrambe le velocità della pompa (30 rpm e 60 rpm). Questo fatto è stato confermato dalla presenza di particelle di tessuto all'interno del reservoir di vetro, indice di un danneggiamento tessutale, a testimoniare che il tempo di perfusione degli esofagi con una soluzione di SDS all'1% durante un periodo di 24 ore era troppo elevato

Sulla base dei risultati ottenuti, si è deciso di modificare i due protocolli con due provvedimenti: rimozione del primo step, per motivi di efficienza e di risparmio di detergente e riduzione del tempo di perfusione dell'esofago, con una soluzione contenente una concentrazione di SDS pari all'1% da 24 ore a 12 ore (Tabella 3.2).

Velocità pompa	PROTOCOLLO		N campioni	Analisi
	Step 1	Step 2		
30 rpm	[SDS]=0.1% T=4°C, t=24h	[SDS]=1% T.amb, t=12h	N=2	-Visiva -Estrazione di DNA
60 rpm	[SDS]=0.1% T=4°C, t=24h	[SDS]=1% T.amb, t=12h	N=2	-Visiva - Estrazione di DNA

Tabella 3.2: Protocolli di *decellularizzazione* modificati sulla base dei risultati preliminari

La riduzione della durata del secondo step per entrambi i protocolli, riportati in Tabella 3.2, si è mostrata una scelta corretta. Infatti il problema legato alla perdita dell'integrità strutturale dell'esofago non si è più presentato.

Visivamente gli organi sono apparsi decellularizzati con entrambe le velocità della pompa peristaltica. Le immagini riportate in Figura 3.4 e Figura 3.5 sono rappresentative di come appare l'esofago in corrispondenza di tre diversi time point: t=0 ore, t=24 ore e t=36 ore. La Figura 3.4 e la Figura 3.5 sono rispettivamente relative ai protocolli che prevedono una velocità della pompa pari a 30 rpm (Q=30 ml/min) e a 60 rpm (Q=60 ml/min).

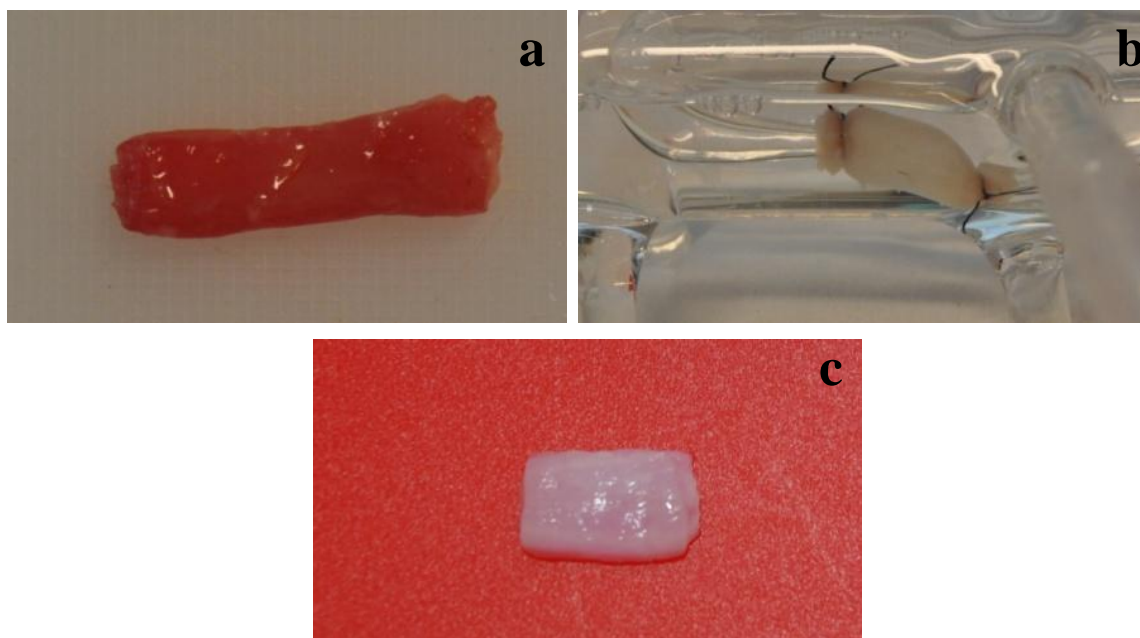


Figura 3.4: Esofago perfuso con una velocità pari a 30 rpm a tre diversi time point: t=0 (a), t=24 ore di trattamento con una soluzione con [SDS]=0.1% (b), t=36 ore di trattamento con una soluzione con [SDS]=1% (c)

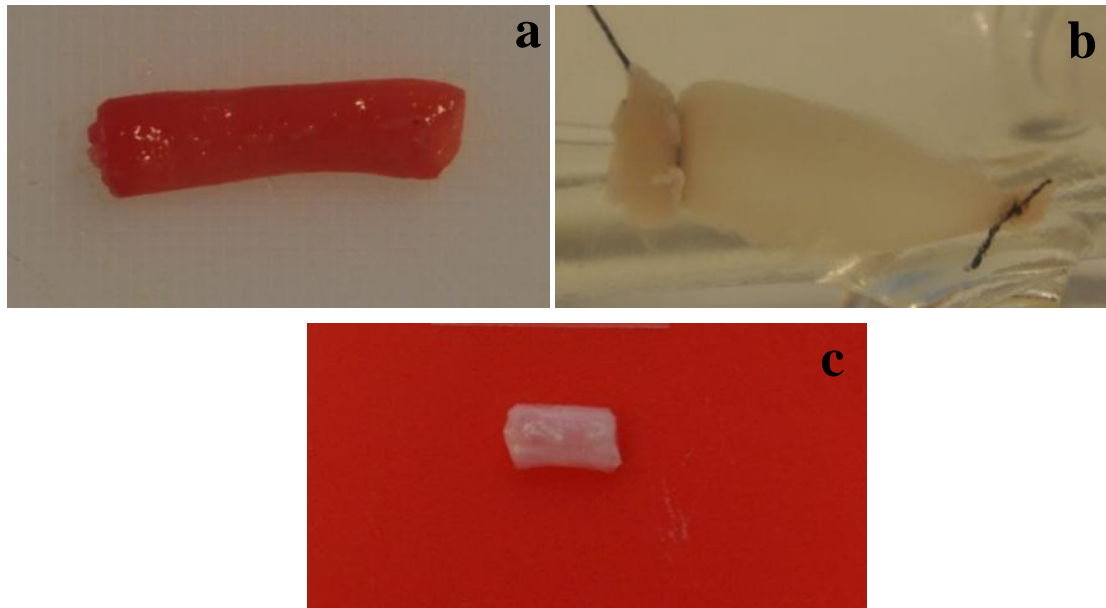


Figura 3.5: esofago perfuso con una velocità pari a 60 rpm a tre diversi time point: $t=0$ (a), $t=24$ ore di trattamento con una soluzione con $[SDS]=0.1\%$ (b), $t=36$ ore di trattamento con una soluzione con $[SDS]=1\%$ (c)

Per la valutazione dei protocolli presenti nella Tabella 3.2 si è ricorsi ad un'analisi visiva e ad un'estrazione di DNA.

Gli esofagi visivamente sono apparsi decellularizzati con entrambe le velocità della pompa peristaltica, come è dimostrato dal loro colore biancastro. Nonostante in Figura 3.4 e in Figura 3.5 sia riportata solo una parte dell'esofago decellularizzato, si può affermare che il colore bianco degli organi alla fine del processo di *decellularizzazione* per entrambi i protocolli, era omogeneo per tutta l'estensione del campione.

Non potendo individuare il protocollo ottimo solo mediante un'ispezione visiva, si è ricorsi ad una tecnica di analisi quantitativa. Dall'estrazione del DNA, secondo il protocollo descritto dettagliatamente nel paragrafo 2.2.3.2, si sono ottenuti i risultati riportati nella Tabella 3.3 e nella Tabella 3.4. Il test è stato fatto in duplicato e ogni tabella corrisponde ai valori di DNA ottenuti in un singolo esperimento. Sulla sinistra di ogni tabella vi sono i dati grezzi, come sono stati ottenuti in seguito alla lettura della micropiastre multi spot. Ogni rettangolo equivale ad uno spot e contiene quattro valori: i primi tre sono relativi alle acquisizioni in corrispondenza delle tre lunghezze d'onda (260 nm, 977 nm e 900 nm), mentre l'ultimo in grassetto rappresenta la quantità di DNA rilevata nello spot. È stata fatta una divisione dei dati in tre popolazioni: esofago nativo, decellularizzato con una velocità della pompa pari a 30 rpm e decellularizzato con una

Capitolo 3: Risultati e Discussione

velocità di 60 rpm. Ad ogni popolazione appartengono quattro valori di DNA estratto, di cui è stata calcolata la media (ng/ μ l) e la deviazione standard (ng/ μ l). La media in seguito è stata normalizzata con il peso del campione (mg) e con il volume di acqua distillata utilizzata per risospendere il DNA (μ l), ottenendo così un valore di DNA espresso in ng/mg (valori in rosso). Tutti questi dati sono riportati nel riquadro di destra.

Capitolo 3: Risultati e Discussione

C	0.935	0.930	<u>peso campione: 230mg</u>	<u>NATIVO</u>	934.546 } 930.252 } Media=927.88 ng/μl 933.625 } Dev.st=10.01ng/μl 913.119 } Sospensione=100 μl	403ng/mg
	0.538	0.535				
	1.737	1.738				
	934.546	930.252				
D	0.934	0.913	<u>peso campione: 280mg</u>	<u>30 rpm</u>	333.166 } 316.211 } Media=318.72 ng/μl 309.727 } Dev.st=10.07ng/μl 315.775 } Sospensione=50 μl	56ng/mg
	0.540	0.524				
	1.730	1.741				
	933.625	913.119				
E	0.333	0.316	<u>peso campione: 263mg</u>	<u>60rpm</u>	282.24 } 287.492 } Media=283,62 ng/μl 284.079 } Dev.st=2.93ng/μl 280.673 } Sospensione=50 μl	53ng/mg
	0.198	0.188				
	1.686	1.685				
	333.166	316.211				
F	0.310	0.316	<u>peso campione: 263mg</u>	<u>60rpm</u>	282.24 } 287.492 } Media=283,62 ng/μl 284.079 } Dev.st=2.93ng/μl 280.673 } Sospensione=50 μl	53ng/mg
	0.185	0.187				
	1.677	1.691				
	309.727	315.775				
G	0.282	0.287	<u>peso campione: 263mg</u>	<u>60rpm</u>	282.24 } 287.492 } Media=283,62 ng/μl 284.079 } Dev.st=2.93ng/μl 280.673 } Sospensione=50 μl	53ng/mg
	0.199	0.202				
	1.415	1.421				
	282.240	287.492				
H	0.284	0.281	<u>peso campione: 263mg</u>	<u>60rpm</u>	282.24 } 287.492 } Media=283,62 ng/μl 284.079 } Dev.st=2.93ng/μl 280.673 } Sospensione=50 μl	53ng/mg
	0.200	0.198				
	1.417	1.416				
	284.079	280.673				

Tabella 3.3: Valori di DNA (in rosso) ottenuti in seguito ad un processo di estrazione del materiale genetico da un da esofago nativo (C,D), decellularizzato con una velocità di 30 rpm (E,F), e decellularizzato con una di 60 rpm (G,H)

Capitolo 3: Risultati e Discussione

C	2.545	2.820	<u>peso campione: 300mg</u>
	1.429	1.606	
	1.781	1.756	
	2544.790	2820.024	
D	2.465	3.016	<u>NATIVO</u>
	1.385	1.713	
	1.780	1.761	
	2464.847	3016.329	
		$\left. \begin{array}{l} 2544.79 \\ 2820.024 \\ 2462.85 \\ 3016.329 \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{Media}= 2710.998 \text{ ng}/\mu\text{l} \\ \text{Dev.st}=254.5\text{ng}/\mu\text{l} \\ \text{Sospensione}= 50 \mu\text{l} \end{array}$	452ng/mg
E	0.133	0.131	<u>peso campione: 190mg</u>
	0.123	0.122	
	1.077	1.078	
	132.766	131.358	
F	0.131	0.133	<u>30rpm</u>
	0.121	0.122	
	1.087	1.087	
	131.156	132.943	
		$\left. \begin{array}{l} 132.766 \\ 131.358 \\ 131.156 \\ 132.943 \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{Media}= 132.056 \text{ ng}/\mu\text{l} \\ \text{Dev.st}=0.92 \text{ ng}/\mu\text{l} \\ \text{Sospensione}= 50 \mu\text{l} \end{array}$	35ng/mg
G	0.103	0.099	<u>peso campione: 173mg</u>
	0.086	0.086	
	1.197	1.146	
	103.005	98.937	
H	0.100	0.100	<u>60rpm</u>
	0.087	0.086	
	1.155	1.169	
	100.247	100.183	
		$\left. \begin{array}{l} 103,005 \\ 98,937 \\ 100,247 \\ 100,183 \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{Media}= 100,593 \text{ ng}/\mu\text{l} \\ \text{Dev.st}=2.71 \text{ ng}/\mu\text{l} \\ \text{Sospensione}= 50 \mu\text{l} \end{array}$	29 ng/mg

Tabella 3.4: Valori di DNA (in rosso) ottenuti in seguito ad un processo di estrazione del materiale genetico da un esofago nativo (C,D), decellularizzato con una velocità di 30 rpm (E,F), e con una di 60 rpm (G,H)

Capitolo 3: Risultati e Discussione

I valori ottenuti grazie all'ausilio del lettore di micropiastre multi-mode Synergy HT, gestito dal software Gens 5.10, mostrano una sostanziale diminuzione del DNA negli esofagi decellularizzati rispetto a quelli nativi, come evidenziato in modo sintetico dall'istogramma riportato in Figura 3.6. La quantità di DNA estratta dagli organi trattati risulta essere inferiore a quella indicata in letteratura da Ozeky et al. [20]. Gli autori di questo lavoro, volendo mettere a confronto l'efficacia di due metodi di *decellularizzazione*, hanno utilizzato l'estrazione di DNA ottenendo due valori, quali $0.14 \pm 0.074 \mu\text{g}/\text{mg}$ e $2.41 \pm 1.82 \mu\text{g}/\text{mg}$, ottenuti rispettivamente da esofagi trattati con DEOX ed esofagi trattati con Triton X-100 [20]. Inoltre si sono ottenuti dei risultati in linea con il limite imposto da Crapo et al. [8] pari a $50 \text{ ng}/\text{mg}$.

Constata l'avvenuta *decellularizzazione* degli esofagi con entrambi i protocolli, sono stati messi a confronto i valori di DNA. Nella Figura 3.6 è riportato un istogramma nel quale viene paragonata la quantità di DNA estratta da un esofago nativo, da uno decellularizzato con una velocità di 30 rpm e da uno perfuso ad una velocità pari a 60 rpm, in seguito all'accorpamento dei risultati ottenuti nelle due prove sperimentali. Come ci si poteva aspettare, la quantità di DNA relativa alla velocità della pompa di 60 rpm è risultata essere inferiore a quella estratta dall'esofago perfuso con una velocità pari a 30 rpm. Questa differenza però, non è risultata essere rilevante.

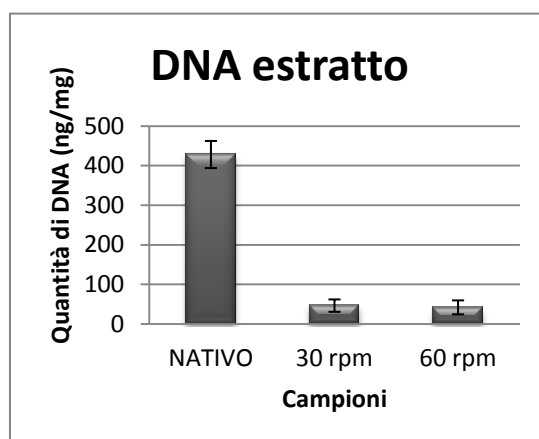


Figura 3.6: Istogramma relativo alla quantità di DNA estratta dai campioni nativi e decellularizzati con protocollo a 30rpm e a 60rpm. L'istogramma accorpa i risultati ottenuti nelle due prove sperimentali e le barre d'errore identificano le deviazioni standard.

A parità di efficacia ed efficienza di *decellularizzazione* tra i due protocolli a diversa velocità, si è ritenuto che fosse meglio utilizzare la velocità più bassa in modo da ridurre le

Capitolo 3: Risultati e Discussione

sollecitazioni sul campione. Una velocità elevata, infatti, potrebbe compromettere l'integrità del tessuto. Questo è dovuto al fatto che la pompa utilizzata è una pompa peristaltica che, essendo di natura pulsatile, fa sì che la portata non sia costante sul singolo giro. Il flusso all'interno dell'esofago risulta essere quindi pulsatile e provoca un battito dell'organo ad ogni giro. Questa continua contrazione e rilassamento dell'organo, se la velocità è elevata, provoca un aumento della pressione interna con conseguente rischio di danneggiamento della struttura esofagea.

A valle di queste considerazioni, il protocollo di *decellularizzazione* individuato come protocollo ottimo è risultato essere quello che presenta una velocità della pompa pari a 30 rpm, i cui dettagli sono riportati in Tabella 3.5.

Velocità pompa	PROTOCOLLO	
	Step 1	Step 2
30 rpm	[SDS]=0.1% T=4°C, t=24h	[SDS]=1% T.amb, t=12h

Tabella 3.5: Protocollo di decellularizzazione ottimizzato

3.3 Ricellularizzazione esofagea

Questa sezione è strutturata in tre parti fondamentali: la prima è dedicata alla descrizione dei risultati del saggio di vitalità cellulare MTT per la scelta del siero migliore per la coltura delle hMSC, mentre la seconda è inerente alla valutazione del sistema di *ricellularizzazione*. Infine una terza parte ha come obiettivo la presentazione dei risultati sperimentali che hanno portato ad una scelta preliminare del protocollo di *ricellularizzazione*.

3.3.1 Scelta del siero per la coltura e l'espansione cellulare

Il test di vitalità cellulare MTT eseguito con un lettore di piastra multi-mode Synergy HT (*BioTek*), ha permesso di misurare l'assorbanza per ciascun campione. Questo valore è correlato all'intensità della colorazione della soluzione ottenuta dal saggio che, a sua volta, è direttamente proporzionale alla concentrazione di formazano ed è quindi espressione della vitalità cellulare.

L'assorbanza è stata misurata con uno spettrofotometro a due lunghezze d'onda (λ) precedentemente selezionate: 550 nm e 690 nm. Per ogni piastra il software ha generato un report presentante i valori di assorbanza rilevati con entrambi i filtri e relativi ad ogni pozzetto della piastra. Successivamente è stata considerata la differenza tra le due assorbanze (550 nm-690 nm). I risultati numerici così ottenuti sono stati direttamente correlati alla vitalità delle hMSC, che è stata valutata singolarmente per ogni tipologia di FBS considerato. La vitalità delle cellule è stata valutata dopo un giorno e dopo tre giorni di coltura. Poiché ogni siero è stato testato su trenta pozzetti, sono stati ottenuti trenta valori di assorbanza, di cui è stata calcolata la media e la deviazione standard. Questa operazione è stata effettuata due volte per ogni siero: per l'analisi della vitalità cellulare a un giorno e a tre giorni dalla coltura. Per completezza in appendice vengono riportate le tabelle relative ai valori di assorbanza dei pozzetti delle piastre. Qui invece sono presentate due tabelle, in ognuna delle quali sono riportati i valori della media e della deviazione standard dell'assorbanza relativa ad ogni siero, ad un giorno (Tabella 3.6) e a tre giorni di coltura (Tabella 3.7). I valori di ogni tabella sono stati inoltre rappresentati in forma grafica con un istogramma.

	S1	S2	L1	L2	G	H
Media	0.186	0.141	0.153	0.131	0.130	0.132
Dev.standard	0.012	0.011	0.008	0.009	0.008	0.009

Tabella 3.6: Media e deviazione standard dei valori di assorbanza per ogni siero testato a un giorno dalla coltura

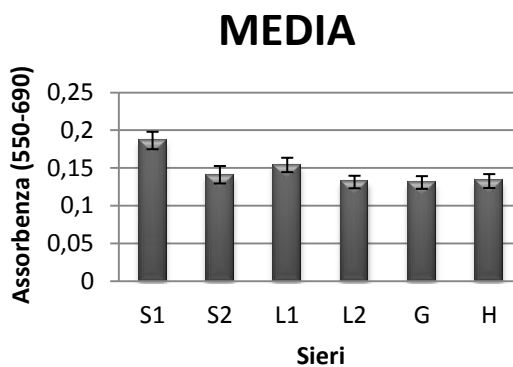


Figura 3.7: Istogramma relativo ai valori medi di assorbanza misurata per i diversi sieri a un giorno di coltura. Le barre d'errore identificano le deviazioni standard

	S1	S2	L1	L2	G	H
Media	0.244	0.208	0.206	0.191	0.191	0.195
Dev.standard	0.010	0.013	0.015	0.014	0.010	0.011

Tabella 3.7: Media e deviazione standard dei valori di assorbanza per ogni siero testato a tre giorni dalla coltura

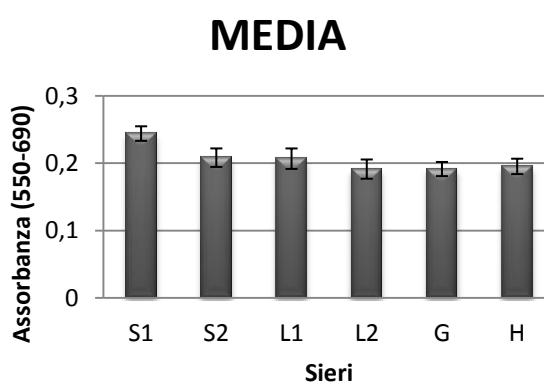


Figura 3.8: Istogramma relativo ai valori medi di assorbanza misurata per i diversi sieri a tre giorni di coltura. Le barre d'errore identificano le deviazioni standard

La deviazione standard, come può essere osservato in Tabella 3.6 e Tabella 3.7, è risultata essere molto bassa in tutti e sei i sieri, indice del fatto che la semina cellulare tra i diversi pozzetti è omogenea. È infatti importante valutare questo aspetto affinché il test possa essere ritenuto affidabile. L'ottenimento di deviazioni standard molto alte potrebbe essere segno di un errore compiuto dall'operatore nel processo di semina, che andrebbe quindi ad invalidare la prova.

I valori medi di assorbanza più elevati, sia dopo un giorno che dopo tre giorni di coltura, sono stati misurati per il siero S1 (*SIGMA*): FBS non di origine statunitense, F7524 (lotto n° 06OM3399), inattivato per 30 minuti a $T=56^{\circ}\text{C}$ e filtrato, che è quindi stato considerato migliore per la coltura delle hMSC.

3.3.2 Valutazione del set-up sperimentali

Il sistema di *ricellularizzazione* che è stato messo a punto in questo lavoro di tesi ha dato dei risultati positivi garantendo la perfusione esofagea con una sospensione cellulare e creando un ambiente favorevole alla sopravvivenza cellulare.

Come nel caso della *decellularizzazione*, la camera di coltura Vascular Package TEB 100 Series ha permesso l'immersione totale dell'esofago nel mezzo di coltura e la sua perfusione con la popolazione cellulare scelta per ripopolare l'organo.

Inoltre l'autoclavabilità della camera di *ricellularizzazione* ha garantito il mantenimento di un ambiente sterile al suo interno, indispensabile per la riduzione al minimo del rischio di contaminazione, che avrebbe potuto minacciare la sopravvivenza cellulare e l'integrità del tessuto. La trasparenza della camera di coltura, ancora una volta, è stata di grande importanza. È stato fondamentale monitorare la fase di iniezione della sospensione cellulare. Questo step, infatti, è avvenuto dopo che la camera di perfusione, con l'esofago ancorato, è stata inserita nella camera di immersione. Se questa camera non fosse trasparente la visualizzazione sarebbe impossibile e non permetterebbe all'operatore di verificare e monitorare il processo di immisione cellulare. Inoltre è stato importante controllare lo stato dell'esofago per tutta la durata dell'esperimento, sia per accertarsi che restasse vincolato alla camera di perfusione, sia per verificare che non ci fossero rigonfiamenti causati da un aumento di pressione al suo interno. Infine, poichè si è ricorsi all'applicazione di un'oscillazione della sospensione cellulare per seminare il costruito, è stato necessario accertarsi che la sospensione cellulare rimanesse sempre a contatto con

il lume interno dell'esofago, per aumentare la possibilità di adesione cellulare al tessuto decellularizzato.

È noto che il movimento della sospensione cellulare permette alle cellule di penetrare all'interno del materiale di supporto e di aderirvi. Inoltre il flusso oscillante delle cellule sospese nel mezzo di coltura permette una migliore distribuzione dell'ossigeno e dei nutrienti all'interno del costruito tridimensionale. La presenza di un sistema di controllo esterno ha permesso la regolazione dell'oscillazione della sospensione, mediante il fattore di disequilibrio, qualora ce ne fosse stato bisogno. Quindi in linea teorica l'oscillazione della sospensione cellulare aumenta l'efficienza dei processi di semina e l'uniformità della distribuzione delle cellule all'interno del costruito, al fine di ottenere costrutti ingegnerizzati ripopolati in modo omogeneo [30].

Infine, fungendo da incubatore, il bioreattore ha garantito lo stretto controllo dei parametri critici quali temperatura, umidità e della concentrazione di ossigeno, in modo non invasivo.

3.3.3 Risultati degli esperimenti di *ricellularizzazione* esofagea

In questa sezione verranno presentati i risultati derivanti da un'ispezione visiva e da un'estrazione di DNA degli esofagi sottoposti a *ricellularizzazione* mediante due differenti protocolli. L'obiettivo non è tanto dimostrare di aver ottenuto un organo parzialmente ricellularizzato, bensì dar prova che il sistema di *ricellularizzazione* così ideato e messo a punto presso il laboratorio del centro di ricerca dell'*Universidad de Zaragoza* sia adeguato per questo fine.

L'analisi visiva e l'estrazione di DNA sono le due tecniche di cui ci si è avvalsi per la valutazione della *ricellularizzazione*, anche se è stata l'estrazione di materiale genetico che ha potuto confermare con certezza l'iniziale ripopolamento dell'esofago decellularizzato.

L'ispezione visiva ha permesso di valutare il parziale cambiamento del colore degli esofagi sottoposti a *ricellularizzazione* per entrambi i protocolli, se confrontati con quelli decellularizzati. In Figura 3.9 vengono messi a confronto due campioni esofagei: il primo (Figura 3.9a) è relativo ad un esofago decellularizzato secondo il protocollo ottimizzato, mentre la seconda immagine (Figura 3.9b) mostra come si presenta l'esofago in seguito al processo di *ricellularizzazione* mediante l'iniezione di due milioni di cellule.

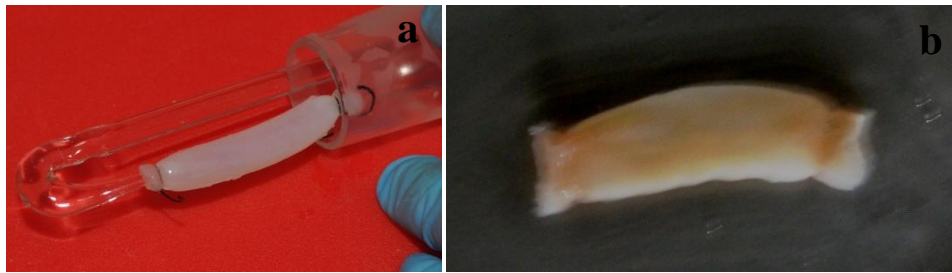


Figura 3.9: Confronto tra un esofago decellularizzato con il protocollo ottimizzato (a) e un esofago in seguito alla iniezione di 2 milioni di cellule

La differenza nel colore è ben visibile, anche se non ci si può basare solo su questa analisi puramente qualitativa per confermare con certezza l'avvenuta adesione cellulare al tessuto, o per la scelta e l'ottimizzazione del protocollo di *ricellularizzazione*.

È proprio per questo motivo che si è ricorsi all'estrazione del DNA, che è stata dunque la tecnica di analisi utilizzata per la valutazione dei due protocolli di *ricellularizzazione* indicati come Protocollo a doppia iniezione cellulare e Protocollo a singola iniezione cellulare nel paragrafo 2.3.3. Come nel caso della *ricellularizzazione*, le prove sono state condotte in duplicato.

I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 3.8 e in Tabella 3.9 Poiché la valutazione dei due protocolli è stata effettuata in duplicato, ogni tabella è relativa ad un esperimento.

Capitolo 3: Risultati e Discussione

B	0.223	0.215	<p><u>peso campione=43mg</u></p> <p><u>Doppia iniezione</u></p> <p>10⁶ + 10⁶ cellule</p>	222,751	<p>Media= 218,848ng/μl</p> <p>Dev.st=3.15ng/μl</p> <p>Sospensione=50μl</p>	254.474ng/mg
	0.130	0.124		215,217		
	1.717	1.737		217,630		
	222.751	215.217		219,192		
C	0.218	0.220	<p><u>peso campione=27mg</u></p> <p><u>Singola iniezione</u></p> <p>10⁶ cellule</p>	54.252	<p>Media= 54,8578ng/μl</p> <p>Dev.st=0.63ng/μl</p> <p>Sospensione=50μl</p>	101.59ng/mg
	0.129	0.129		55.729		
	1.692	1.701		54.554		
	217.630	219.792		54.896		
D	0.054	0.056	<p><u>peso campione=43mg</u></p> <p><u>Doppia iniezione</u></p> <p>10⁶ + 10⁶ cellule</p>	222,751	<p>Media= 218,848ng/μl</p> <p>Dev.st=3.15ng/μl</p> <p>Sospensione=50μl</p>	254.474ng/mg
	0.033	0.033		215,217		
	1.633	1.667		217,630		
	54.252	55.729		219,192		
E	0.055	0.055	<p><u>peso campione=27mg</u></p> <p><u>Singola iniezione</u></p> <p>10⁶ cellule</p>	54.252	<p>Media= 54,8578ng/μl</p> <p>Dev.st=0.63ng/μl</p> <p>Sospensione=50μl</p>	101.59ng/mg
	0.033	0.034		55.729		
	1.633	1.633		54.554		
	54.554	54.896		54.896		

Tabella 3.8: Valori di DNA (in rosso) ottenuti in seguito ad un processo di estrazione di materiale genetico da un esofago ricellularizzato con il protocollo a doppia iniezione (2000000 di cellule) (B,C) e da un esofago ricellularizzato con il protocollo a singola iniezione (1000000 cellule) (D,E)

C	0.129	0.131	<u>peso campione=25mg</u>
	0.120	0.121	
	1.076	1.075	
	128.874	130.605	
D	0.135	0.133	<u>Doppia iniezione</u> 10 ⁶ + 10 ⁶ cellule
	0.121	0.123	
	1.113	1.084	
	134.719	132.914	
		128,874	} Media= 131,778ng/μl Dev.st=2.56ng/μl 263.556ng/mg Sospensione=50μl
		130,605	
		134,719	
		132,914	
E	0.042	0.042	<u>peso campione=28mg</u>
	0.043	0.042	
	0.981	1.007	
	41.803	41.932	
F	0.042	0.041	<u>Singola iniezione</u> 10 ⁶ cellule
	0.042	0.041	
	1.006	1.007	
	42.195	41.094	
		41.803	} Media= 149,129ng/μl Dev.st=0.47ng/μl 149.129ng/mg Sospensione=100μl
		41.932	
		42.195	
		41.094	

Tabella 3.9: Valori di DNA (in rosso) ottenuti in seguito ad un processo di estrazione di materiale genetico da un esofago ricellularizzato con il protocollo a doppia iniezione (2000000 di cellule) (C,D) e da un esofago ricellularizzato con il protocollo a singola iniezione (1000000 cellule) (E,F)

I valori ricavati, grazie all'ausilio del lettore di micropiastre multi-mode Synergy HT, gestito dal software Gens 5.10, hanno confermato quello che ci si aspettava. Si sono ottenuti infatti valori di DNA maggiori nel caso dell'esofago sottoposto ad una doppia iniezione cellulare. Questo risultato è stato riscontrato in entrambe le prove.

Il materiale genetico non è stato estratto anche da esofagi nativi e decellularizzati per ottenere dei valori di riferimento, ma, per poter effettuare un confronto, ci si è basati sui risultati riportati in Tabella 3.3 e in Tabella 3.4.

In letteratura non sono presenti dati relativi alla quantità di DNA estratto da esofagi sottoposti a ripopolamento cellulare per avere dei termini di paragone. Quello che ci si è limitati a fare in questa fase preliminare è stato osservare che la quantità di DNA in un esofago sottoposto ad un'iniezione cellulare è maggiore rispetto a quella di un esofago decellularizzato. Dai risultati ottenuti, il protocollo che prevede due iniezioni cellulari da un milione di cellule ciascuno è risultato essere il più efficace.

Questi risultati sono incoraggianti. Questo fatto è riconducibile all'efficacia del sistema di *ricellularizzazione* utilizzato, soprattutto alla possibilità di effettuare una coltura dinamica

oscillante. Per dare più credito a questa affermazione, sarebbe stato interessante avere un campione di controllo, ottenuto mediante una semina puramente statica del costrutto, consistente esclusivamente nell'iniezione delle cellule nel lume dell'esofago seguito da coltura statica. In questo modo si sarebbe potuto effettuare un confronto tra le due tecniche di semina. Questo, però, non è stato possibile a causa della scarsa numerosità degli organi a disposizione. Si è quindi cercato di ottimizzare i campioni a disposizione, valutando due protocolli basati su un connubio tra coltura dinamica e coltura statica, considerando come assodata la migliore efficacia della coltura dinamica rispetto alla statica nella fase di ripopolamento di un organo. In sostanza si è concentrata l'attenzione più che sul tipo di coltura da effettuare, sul numero totale di cellule da iniettare.

Non si può ancora parlare di ottimizzazione del protocollo di *ricellularizzazione* in quanto si tratta di un'analisi preliminare. Il numero di cellule iniettate (un milione e due milioni) è stato molto basso ed è stato solo il lume dell'esofago ad essere perfuso con la sospensione cellulare. La scelta del numero cellulare da iniettare è stata dettata esclusivamente dalla disponibilità di cellule presenti nel laboratorio. Questa fase del progetto di tesi, però, è stata importante per la valutazione del sistema di *ricellularizzazione*, che ha dimostrato essere un ottimo strumento per condurre esperimenti di semina e di coltura cellulare finalizzati alla *ricellularizzazione* di esofagi.

3.4 Confronto tra esofago nativo, decellularizzato e ricellularizzato

Questa sezione del capitolo è dedicata al confronto dal punto di vista istologico, del contenuto di DNA e delle proprietà meccaniche tra l'esofago nativo, l'esofago decellularizzato con il protocollo ottimo e quello ricellularizzato mediante l'iniezione di due milioni di cellule.

3.4.1 Analisi istologica

La struttura dell'esofago nativo dopo colorazione con H&E e Tricomica di Masson è riportata rispettivamente in Figura 3.10a e in Figura 3.10b.

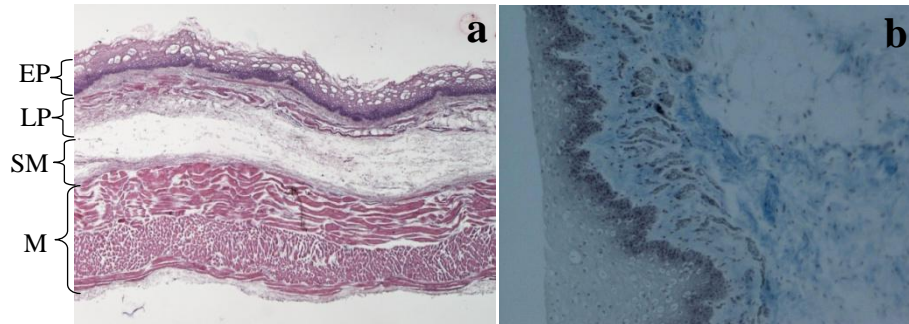


Figura 3.10: Colorazione con H&E (a) e Tricomica di Masson (b) di una sezione longitudinale di esofago nativo

L'esofago nativo presenta differenti strati: l'epitelio (EP), la lamina propria (LP), la sottomucosa (SM) e la tonaca muscolare (M). Mediante colorazione Tricromica di Masson (Figura 3.10b), è possibile osservare le cellule sotto forma di puntini neri e le fibre di collagene sotto forma di fasci blu-verdi.

L'esofago decellularizzato (Figura 3.11a), invece, non ha più cellule, ma mantiene le fibre della matrice intatte. L'epitelio non è più visibile poichè, essendo costituito solo da cellule senza matrice, è stato completamente rimosso durante il processo di *decellularizzazione*. Mediante colorazione Tricromica di Masson (Figura 3.11b) questo fenomeno si evidenzia con la scomparsa dei puntini neri e la persistenza delle fibre blu-verdi.

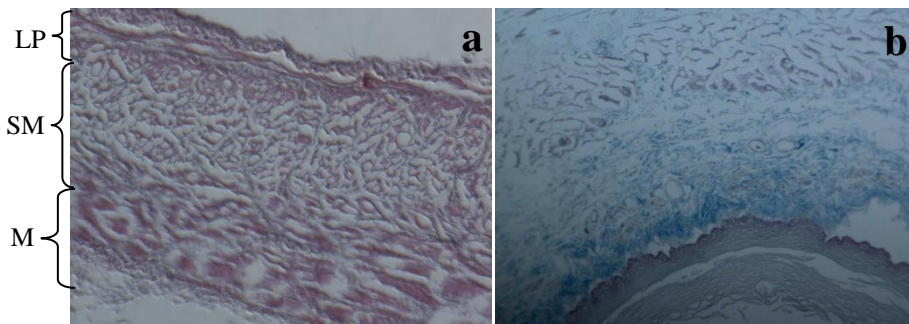


Figura 3.11: Colorazione con H&E(a) e Tricomica di Masson (b) di una sezione longitudinale (a) e di una circolare (b) di esofago decellularizzato

Nell'esofago ricellularizzato Figura 3.12, infine, si ha la comparsa di un nuovo strato di cellule (freccette rosse) a livello dell'epitelio, grazie all'adesione cellulare al lume esofageo.

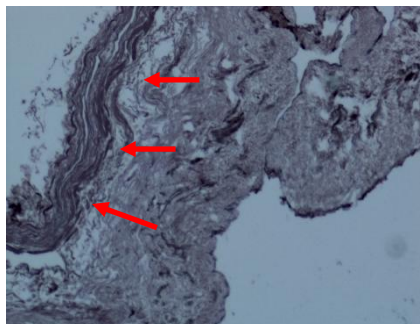


Figura 3.12: Colorazione con H&E di una sezione longitudinale di esofago ricellularizzato

3.4.2 Analisi del DNA

E' stata effettuata un'analisi statistica per mettere a confronto i tre diversi gruppi di esofagi: esofago nativo, esofago decellularizzato ed esofago ricellularizzato, ognuna costituita da quattro campioni.

Per ogni popolazione, sono state calcolate media e deviazione standard. La presenza di differenze statisticamente significative tra le coppie di popolazioni confrontate è stata analizzata attraverso il test statistico *One Way ANOVA* per l'analisi delle varianze, seguito da un *Student-Newman-Keuls method* per l'analisi delle differenze tra due campioni disaccoppiati dei diversi gruppi di dati messi a confronto. (Figura 3.13).

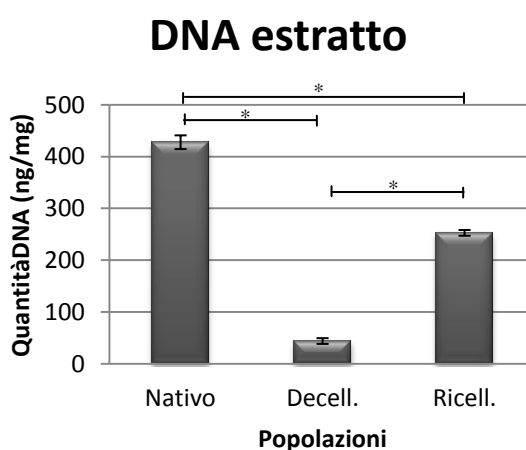


Figura 3.13: Quantità media di DNA estratto in tre popolazioni a confronto: Nativo, decellularizzato (Decell) e ricellularizzato (Ricell). Le barre di errore identificano le deviazioni standard (* indica le popolazioni per le quali è stata verificata una differenza significativa, $p < 0.05$)

E' stata riscontrata una differenza statisticamente significativa ($p < 0.05$) tra l'esofago nativo e quello decellularizzato, il che rappresenta un'ulteriore conferma dell'efficacia della rimozione cellulare con il protocollo di *decellularizzazione* ottimo.

È stata inoltre rilevata una differenza statisticamente significativa ($p < 0.05$) tra l'esofago decellularizzato e quello ricellularizzato, il che testimonia un'avvenuta adesione delle cellule iniettate a livello del lume esofageo.

Infine anche tra l'esofago nativo e ricellularizzato si è osservata una differenza statisticamente significativa ($p < 0.05$). Questo risultato rispecchia i limiti del protocollo di *ricellularizzazione* messo a punto in questo lavoro di tesi. Infatti, nonostante la quantità di DNA sia aumentata considerevolmente rispetto a quella di un esofago decellularizzato, non è ancora paragonabile a quella di un esofago nativo, a causa dell'esiguo numero di cellule iniettate e della parziale perfusione dell'organo.

3.4.3 Analisi meccanica

I test meccanici di trazione sono stati effettuati per valutare il mantenimento delle proprietà meccaniche e dell'organizzazione strutturale della matrice extracellulare in seguito ai processi di *decellularizzazione* e anche a valle del protocollo di *ricellularizzazione*. I test sono stati condotti su provini ottenuti da tre popolazioni: esofago nativo (N), decellularizzato (D) e ricellularizzato (R). Per ogni popolazione cellulare sono stati ricavati un numero di provini che varia tra tre e quattro, in direzione longitudinale e circonferenziale. Per ogni provino (in tutto 21) sono stati calcolati quattro parametri: il modulo elastico a bassi valori di sforzo (E_{low}), il modulo elastico ad alti valori di sforzo (E_{high}), lo sforzo massimo (σ_{max}) e la deformazione massima (ϵ_{max}). È stata fatta una distinzione tra i dati relativi ai provini longitudinali e circonferenziali.

Le curve sforzo-deformazione (σ - ϵ) ottenute dalla prova di trazione a rottura per i provini ricavati dall'esofago nativo sono mostrate in Figura 3.14.

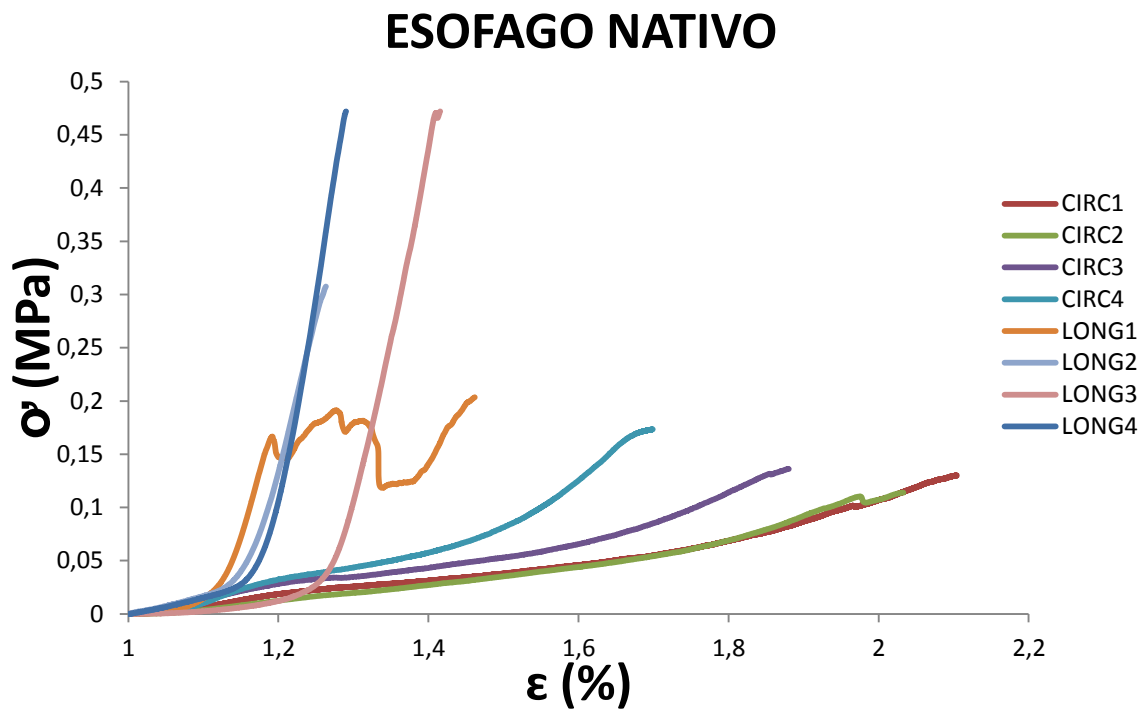


Figura 3.14: Curve sforzo-deformazione relative alle prove a trazione per tutti i provini di un esofago nativo

È evidente la differenza tra il comportamento a trazione in direzione longitudinale e in direzione circonferenziale, il che attesta l'anisotropia dell'esofago nativo. La deformazione risulta maggiore in direzione circonferenziale, in corrispondenza della quale viene riscontrata una minore rigidità. Infatti è ben visibile la maggiore pendenza della curva σ - ϵ dei provini longitudinali rispetto a quelli circonferenziali, indice della maggior rigidezza dell'esofago in direzione longitudinale che raggiunge valori di sforzo molto elevati.

Una differenza comportamentale così evidente non è invece riscontrabile nell'esofago decellularizzato. Come è possibile osservare in Figura 3.15, le curve σ - ϵ nelle due direzioni sono molto simili, nonostante sia sempre in direzione circonferenziale che si ha il raggiungimento di valori di deformazione maggiori e in direzione longitudinale l'assunzione di valori di rigidità notevoli. La diminuzione di anisotropia dell'esofago decellularizzato potrebbe suggerire una perdita dell'integrità strutturale dell'esofago in seguito al processo di *decellularizzazione*.

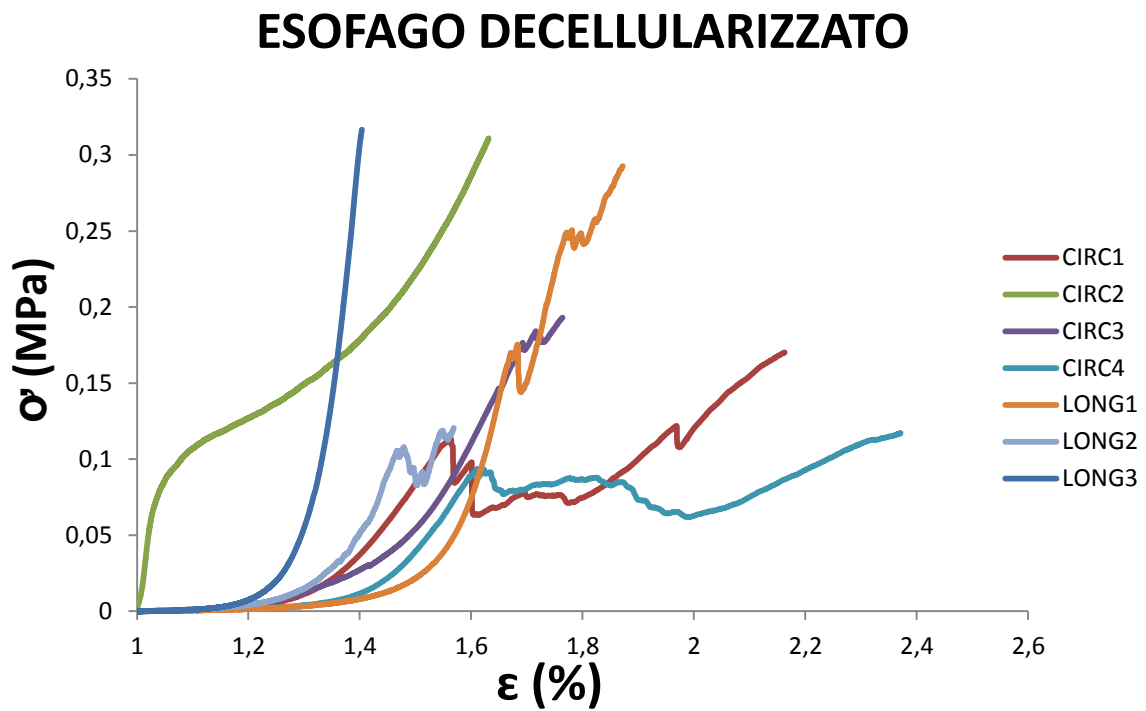


Figura 3.15: Curve sforzo-deformazione relative alle prove a trazione per tutti i provini di un esofago decellularizzato

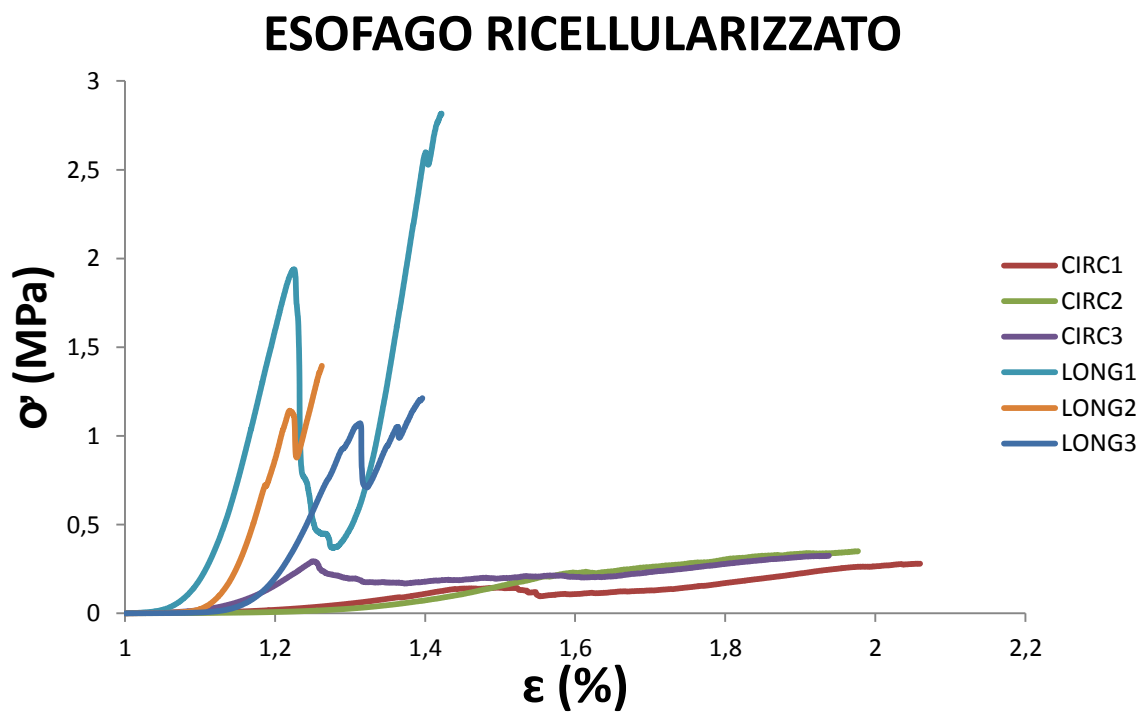


Figura 3.16: Curve sforzo-deformazione relative alle prove a trazione per tutti i provini di un esofago ricellularizzato

Infine il comportamento a trazione dell'esofago ricellularizzato è molto simile a quello dell'esofago nativo. Ancora una volta vi è una sostanziale differenza tra il comportamento in direzione longitudinale e circonferenziale. Come nel caso dell'esofago nativo, i provini longitudinali presentano una rigidezza molto alta se comparata a quella dei provini circonferenziali che raggiungono valori di deformazione elevatissimi.

Da un confronto tra i grafici delle tre popolazioni, quello che salta maggiormente all'occhio è una similitudine tra le curve relative all'esofago nativo e quelle relative all'esofago ricellularizzato.

Nell'analisi statistica, in cui sono state calcolate media e deviazione standard di ogni parametro meccanico per ogni popolazione, la presenza o meno di differenze statisticamente significative è stata analizzata mediante il test statistico *One Way ANOVA* per l'analisi delle varianze, seguito da un *Dunn test* per l'analisi delle differenze tra due campioni disaccoppiati dei diversi gruppi di dati messi a confronto.

Vengono riportati i due istogrammi, ottenuti per i diversi gruppi di provini analizzati sia in direzione longitudinale (a) che in direzione circonferenziale (b).

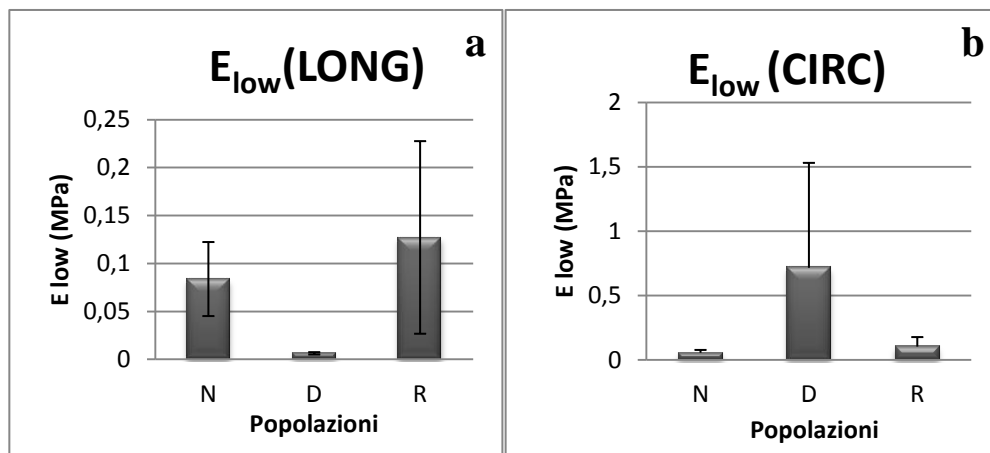


Figura 3.17: Valor medio E_{low} in tre popolazioni a confronto: N (nativo), D (decellularizzato) e R (ricellularizzato). Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard

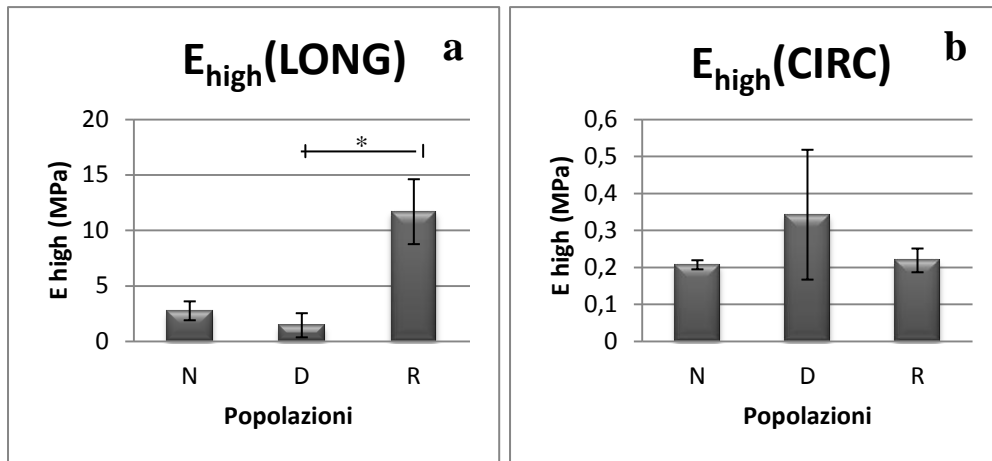


Figura 3.18: Valor medio E_{high} in tre popolazioni a confronto: N (nativo), D (decellularizzato) e R (ricellularizzato). Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard (* indica le popolazioni per le quali è stata verificata una differenza significativa, $p < 0.05$)

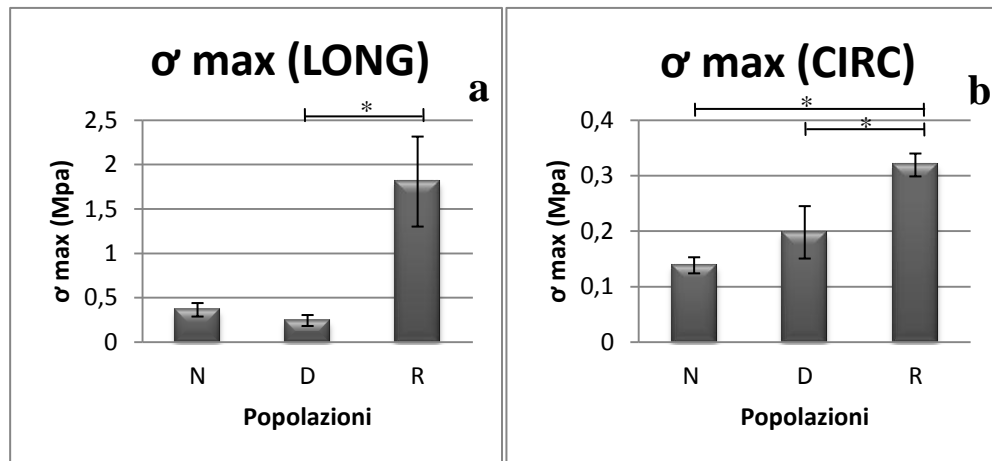


Figura 3.19: Sforzo massimo in tre popolazioni a confronto: N (nativo), D (decellularizzato) e R (ricellularizzato). Le barre di errore rappresentano le deviazioni standard (* indica le popolazioni per le quali è stata verificata una differenza significativa, $p < 0.05$)

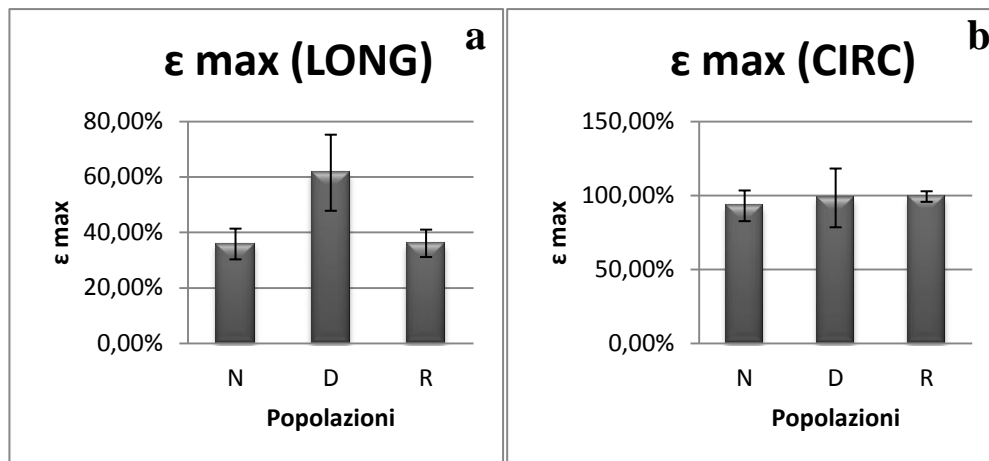


Figura 3.20: Deformazione massima medio in tre popolazioni a confronto: N (nativo), D (decellularizzato) e R (ricellularizzato). Le barre di errore identificano le deviazioni standard

Per quanto riguarda il modulo di Young a basse deformazioni (E_{low}) (Figura 3.17) non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra le tre popolazioni in nessuna delle due direzioni in analisi (longitudinale e circonferenziale). Molto elevata è invece la deviazione standard riscontrata. Il tipo di prova meccanica non consente di stimare in modo adeguato il parametro E_{low} in quanto i provini non sono stati sottoposti a pretensionamento prima della prova di trazione. Quindi c'è la possibilità che ci sia stata una sottostima del modulo elastico a bassi valori di sforzo, causato da un montaggio lasso del provino tra le ganasce della macchina.

In merito al modulo elastico ad alte deformazioni (E_{high}), in direzione circonferenziale non è stata riscontrata nessuna differenza statisticamente significativa tra le tre popolazioni (Figura 3.18b), nonostante E_{high} dell'esofago nativo, molto simile a quello ricellularizzato, risulti essere minore rispetto a quello decellularizzato, come se il processo di *decellularizzazione* avesse provocato un irrigidimento del tessuto in direzione circonferenziale, aspetto che si era riscontrato anche dall'osservazione del grafico sforzo-deformazione di Figura 3.15. Questo fenomeno non si verifica invece in direzione longitudinale (Figura 3.18a) in cui l'esofago decellularizzato presenta il valore di modulo di Young minore, mentre quello ricellularizzato presenta la massima rigidità, mostrando un aumento delle sue prestazioni meccaniche. Osservando i valori di E_{high} è evidente l'anisotropia dell'esofago nativo, decellularizzato e ricellularizzato: i valori del modulo elastico ad alti valori di sforzo in direzione longitudinale assumono per tutte e tre le popolazioni dei valori assai inferiori (2-12 MPa) (Figura 3.18a) rispetto a quelli in direzione circonferenziale (0.2-0.35 MPa) (Figura 3.18b).

Capitolo 3: Risultati e Discussione

La stessa anisotropia è inoltre riscontrabile valutando lo sforzo massimo, anche se la discrepanza tra i valori di sforzo massimo in direzione longitudinale (0.4-1.8 MPa in Figura 3.18a) e circonferenziale (0.15-0.35 MPa in Figura 3.18b) risulta essere minore rispetto a quella rilevabile dall'osservazione dei dati di E_{high} . Lo sforzo massimo dei campioni nativi risulta essere molto simile a quello dei campioni decellularizzati, ma molto differente rispetto all'esofago ricellularizzato in entrambe le direzioni (Figura 3.19). È come se le prestazioni meccaniche dell'esofago siano aumentate in seguito al processo di ripopolamento.

Per quanto riguarda la deformazione (Figura 3.20), non vengono riscontrate differenze statisticamente significative tra esofago nativo, decellularizzato e ricellularizzato sia in direzione longitudinale che in direzione circonferenziale. Le deformazioni per le tre popolazioni, inoltre, assumono valori molto simili tra di loro, risultando però maggiori nel caso circonferenziale.

Dall'analisi statistica emerge che non vi è sostanziale differenza tra i parametri in esame nell'esofago nativo e in quello decellularizzato: infatti in nessun caso vengono riscontrate differenze statisticamente significative. Questo è un buon risultato e sta a significare che, anche dal punto di vista meccanico, il processo di *decellularizzazione* non ha compromesso la struttura dell'organo. Le differenze maggiori si rilevano invece tra l'esofago ricellularizzato e quello decellularizzato, in termini di aumento dello sforzo massimo a rottura e della rigidità ad alte deformazioni nel caso longitudinale, come se ci fosse un aumento delle prestazioni, il che è difficilmente spiegabile, data la notevole somiglianza dei parametri tra l'esofago nativo e quello decellularizzato.

La variabilità dei dati è molto elevata il che potrebbe nascondere delle differenze statisticamente significative che non sono state però rilevate dal test statistico.

CAPITOLO 4: CONCLUSIONE E SVILUPPI FUTURI

Questo progetto di tesi, svolto presso il gruppo GEMM (Group of Structural Mechanics and Materials Modelling) del centro di ricerca dell'*Universidad de Zaragoza*, ha dimostrato le potenzialità dei metodi chimico-fisici di *decellularizzazione* e *ricellularizzazione* nella rigenerazione di organi *in vitro*.

Per il raggiungimento del primo obiettivo prefissato, inerente la valutazione del metodo di incannulazione di organi complessi, è stato messo a punto un set-up sperimentale semplice e compatibile con la strumentazione di base presente in tutti i laboratori. Un sistema di *decellularizzazione* così concepito presenta la stessa efficacia di sistemi molto più complessi già descritti in letteratura [16][18].

I risultati ottenuti in questa fase rappresentano un punto di partenza per possibili sviluppi futuri, al fine di superare i limiti e le difficoltà incontrate durante il percorso di questo lavoro di tesi. Il parziale insuccesso della perfusione epatica, legato ad un difficile riconoscimento del vaso da incannulare, ha spinto a individuare come metodo di incannulazione migliore quello basato sull'incannulazione dell'organo *in vivo*, quando cioè i vasi non sono ancora collassati. L'introduzione della cannula *in vivo*, infatti, avrebbe il vantaggio di garantire un processo semplificato che non comporti l'eccessiva manipolazione dell'organo e il rischio di danneggiamento dei vasi e dei tessuti circostanti. Il mantenimento dell'integrità strutturale dell'organo è, infatti, di primaria importanza e deve essere garantito sin dalle prime fasi del processo di *decellularizzazione*, nell'idea di un futuro impianto dell'organo. Questa tecnica, per i motivi esposti, potrebbe essere applicata anche al cuore e ai polmoni. Sulla base di queste considerazioni, sarebbe ipotizzabile l'utilizzo di un sistema simile a quello messo a punto e utilizzato in questo lavoro di tesi, anche per la *ricellularizzazione* di organi anatomicamente complessi, previa però una corretta incannulazione dell'organo.

La manipolazione di un organo strutturalmente più semplice, quale l'esofago, ha permesso di mettere a punto un sistema e un protocollo di *decellularizzazione* ottimizzato. Questo è stato lo scopo della seconda parte del progetto di tesi, per il raggiungimento del quale ci si è avvalsi di un dispositivo progettato e realizzato dalla *Ebers Medical Technology*, un'azienda start-up dell'*Universidad de Zaragoza*. L'uso del dispositivo, pensato per

Capitolo 4: Conclusione e sviluppi futuri

l'alloggiamento di strutture tubulari, ha garantito un'adeguata perfusione e una contemporanea immersione dell'organo nella soluzione decellularizzante. Anche in questo caso, l'estrema semplicità del sistema di *decellularizzazione* ha rappresentato il punto di partenza per la buona riuscita degli esperimenti e per l'ottenimento di risultati soddisfacenti e promettenti.

È stato poi messo a punto un protocollo di *decellularizzazione* sulla base dell'analisi del contenuto di DNA residuo in esofagi trattati con SDS, che si è dimostrato adeguato, oltre che per la completa rimozione cellulare in tempi brevi, anche dal punto di vista del mantenimento dell'integrità strutturale, verificata grazie ad un'analisi istologica. La caratterizzazione meccanica non è stata molto esplicativa a causa dell'elevata variabilità dei dati e del numero esiguo di campioni che sono stati ottenuti per questo tipo di indagine. Si può comunque affermare che non sono state rilevate notevoli differenze tra i parametri meccanici dell'esofago nativo e quelli dell'esofago decellularizzato, a indicare un mantenimento della struttura della matrice extracellulare esofagea in seguito al processo di rimozione cellulare. Il primo aspetto su cui ci si dovrebbe concentrare in un futuro a breve termine, sarebbe l'esecuzione di una completa caratterizzazione degli esofagi decellularizzati secondo il protocollo scelto, il che richiederebbe un maggior numero di campioni decellularizzati. Dal punto di vista della quantità di DNA residuo, si dovrebbero utilizzare kit di estrazione più precisi e attendibili rispetto al tradizionale protocollo di estrazione fenolo-cloroformio. Si potrebbe inoltre pensare di stimare la quantità delle cellule rimanenti nel tessuto in seguito al processo di *decellularizzazione*, non solo con un'estrazione di DNA, ma anche mediante una valutazione semiquantitativa basata sull'immunofluorescenza, ad esempio mediante la marcatura dei nuclei cellulari con il colorante fluorescente DAPI. Infine l'ottenimento di più campioni decellularizzati sarebbe vantaggioso anche per l'esecuzione delle prove meccaniche, in modo tale da ottenere risultati affidabili su un numero di campioni adeguato per le diverse popolazioni a confronto (circa 20). Il completamento della caratterizzazione meccanica degli esofagi decellularizzati potrebbe riguardare delle prove di misura della compliance, per valutare se e come cambia rispetto a quella di un esofago nativo. Quindi i miglioramenti riguarderebbero più che altro una più completa caratterizzazione degli organi decellularizzati, in modo tale da poter poi affermare la validità del protocollo ottimizzato. È giusto infatti ricordare che il fine ultimo, anche se molto ambizioso, è la rigenerazione

Capitolo 4: Conclusione e sviluppi futuri

dell'organo *in vitro*, il che richiede quindi uno *scaffold* adeguato ottenuto dal processo di *decellularizzazione*.

L'ultimo step del progetto di tesi ha visto la definizione di un sistema di *ricellularizzazione* basato su un sistema di pompaggio totalmente integrato nel bioreattore, che garantisce una coltura dinamica mediante la perfusione del lume esofageo decellularizzato con una sospensione oscillante di cellule mesenchimali di linea. I due protocolli formulati hanno garantito l'adesione cellulare, testimoniata dall'analisi del DNA e, come previsto, il protocollo a doppia iniezione cellulare si è rivelato più efficace rispetto a quello a singola iniezione. L'analisi istologica ha confermato la presenza di cellule, localizzate a livello epiteliale.

Come per il caso della *decellularizzazione*, un possibile sviluppo futuro a breve termine potrebbe riguardare una completa caratterizzazione dei campioni ottenuti con il protocollo considerato migliore, possibile solo se si ha a disposizione un numero di campioni sufficiente. Infatti uno dei problemi che ha portato all'impossibilità di effettuare un confronto meccanico definitivo, ha riguardato il numero esiguo di campioni. Anche in questo caso si potrebbe pensare ad un'analisi a immunofluorescenza per valutare il grado di adesione delle cellule al costrutto, senza dover per forza ricorrere all'estrazione del DNA.

Un secondo aspetto riguarda la possibilità di eseguire campagne sperimentali più ampie mediante l'utilizzo di pompe multicanale che permettano di svolgere in parallelo più di un esperimento. Questa sarebbe una modifica da apportare al TEB 1000 Master Unit (*EBERS Medical Technology, Zaragoza Spain*) che attualmente presenta solo due pompe che consentono di alloggiare un singolo circuito ciascuna. Così facendo si potrebbero effettuare diversi esperimenti indipendenti l'uno dall'altro atti anche a valutare aspetti differenti, così da garantire una riduzione dei tempi necessari a condurre le campagne sperimentali.

Un terzo aspetto riguarda la scelta del numero di cellule da iniettare. Poiché questo è stato uno studio preliminare, è stato iniettato un numero di cellule compatibile con le disponibilità del laboratorio. I risultati preliminari hanno dimostrato che l'iniezione di due milioni di cellule è più efficace rispetto ad un'iniezione di un milione di cellule. Lo step successivo dovrebbe essere la valutazione del numero di cellule necessario per ripopolare interamente il lume interno dell'esofago. Questo potrebbero essere fatto procedendo con

Capitolo 4: Conclusione e sviluppi futuri

un'iniezione di un numero di cellule sempre crescente, fino ad arrivare ad una soglia massima oltre la quale non si osserva un ulteriore miglioramento dell'adesione cellulare.

Oltre al numero di cellule un altro fattore che si potrebbe analizzare è la durata della coltura delle cellule iniettate nell'esofago, verificando lo stato di adesione, proliferazione e differenziamento cellulare a diversi time point.

Definito dunque il numero di cellule, il passo successivo sarebbe la scelta della popolazione cellulare con la quale ripopolare lo *scaffold* decellularizzato. Innanzitutto, i risultati ottenuti con le cellule di linea dovrebbero essere validati con cellule primarie, per un confronto con tipi cellulari caratterizzati da dinamiche con comportamenti più fisiologici. Poiché il sistema di *ricellularizzazione* messo a punto in questa tesi, permette solo la perfusione del lume interno dell'esofago, si potrebbe ricorrere all'utilizzo di cellule primarie epiteliali per valutare l'efficacia del sistema di perfusione anche con cellule primarie che sono meno resistenti di quelle di linea immortalizzate.

La possibilità di perfondere l'esofago solo internamente è un limite notevole di questo sistema di *ricellularizzazione*. L'esofago, infatti, presenta numerosi strati cellulari che dovrebbero essere rigenerati *in vitro* prima di un auspicabile impianto *in vivo*. Questo sarebbe possibile solo se si effettuasse la semina anche della superficie esterna. Come sviluppo a lungo termine si potrebbe pensare ad un sistema che mantenga la caratteristica di generare un'oscillazione della sospensione cellulare a livello del lume interno, ma che allo stesso tempo garantisca la coltura delle cellule, precedentemente seminate sulla superficie esterna. Si potrebbe anche pensare ad un procedimento sviluppato in due step, il primo di rigenerazione epiteliale mediante la perfusione del lume interno dell'esofago con un'oscillazione cellulare, il secondo di semina della superficie esterna e contemporaneo mantenimento delle cellule aderite a livello del lume interno. Bisognerebbe progettare un bioreattore *ad hoc* che permetta di combinare la coltura dinamica del bioreattore prodotto dalla casa Ebers Medical Technology con una camera di *ricellularizzazione* compatibile con una semina anche esterna del costrutto. In questo modo sarebbe possibile una co-coltura cellulare che preveda la semina del costrutto con differenti popolazioni cellulari.

In ultima analisi, si potrebbe prevedere a lungo termine la possibilità di includere particolari stimoli e fattori di differenziamento cellulare, qualora si utilizzino cellule staminali. Le cellule staminali multipotenti o a pluripotenza indotta potrebbero infatti rappresentare la fonte cellulare da utilizzare per la rigenerazione del tessuto esofageo,

Capitolo 4: Conclusione e sviluppi futuri

ovviando così ai problemi derivati dalla scarsa disponibilità e dalla limitata capacità proliferativa delle cellule adulte autologhe *in vitro*.

Il numero di pazienti colpiti dal tumore esofageo e obbligati a sottoporsi a esofagectomia è in costante crescita. Sebbene siano stati fatti numerosi sforzi, ad oggi non esiste un sostituto esofageo strutturalmente e funzionalmente adeguato, che possa garantire un successo a lungo termine. È sulla base di questo scenario e sulla consapevolezza delle conoscenze acquisite negli anni, che bisogna lavorare in maniera persistente, alla ricerca di un sistema adeguato, soprattutto per quanto riguarda la fase di *ricellularizzazione*.

APPENDICE

Vengono riportate le tabelle relative ai valori di assorbanza ottenuti dal test di vitalità cellulare MTT. Ogni tabella rappresenta una piastra multi pozzetto sulla quale sono stati testati due sieri (S1,S2,L1,L2,G,H), indicati in grassetto. Sono stati colorati con lo stesso colore i pozzetti su cui è stato testato il medesimo siero. Su ogni piastra sono stati valutati due sieri e per questo ogni tabella presenta due colori differenti. Poiché la vitalità cellulare è stata testata dopo un giorno e dopo tre giorni di coltura le tabelle sono riportate in duplicato. Le prime tre tabelle sono relative all'assorbanza calcolata dopo un giorno di coltura, le ultime tre si riferiscono invece all'assorbanza misurata dopo tre giorni di coltura.

S1

S2

0.118	0.126	0.125	0.146	0.138	0.182	0.17	0.193	0.177	0.167	550-690
0.136	0.136	0.128	0.142	0.132	0.17	0.194	0.194	0.174	0.192	550-690
0.143	0.174	0.142	0.133	0.147	0.168	0.187	0.209	0.173	0.182	550-690
0.131	0.152	0.133	0.142	0.14	0.187	0.191	0.196	0.182	0.188	550-690
0.143	0.158	0.152	0.15	0.151	0.202	0.193	0.2	0.195	0.188	550-690
0.159	0.142	0.132	0.145	0.134	0.185	0.179	0.184	0.182	0.208	550-690

L1

L2

0.163	0.151	0.145	0.163	0.177	0.129	0.13	0.135	0.122	0.123	550-690
0.154	0.168	0.163	0.162	0.161	0.139	0.144	0.126	0.122	0.125	550-690
0.146	0.162	0.166	0.148	0.156	0.129	0.145	0.12	0.125	0.133	550-690
0.138	0.157	0.15	0.147	0.156	0.137	0.13	0.146	0.128	0.15	550-690
0.142	0.163	0.152	0.15	0.151	0.14	0.135	0.118	0.13	0.124	550-690
0.144	0.157	0.137	0.143	0.147	0.131	0.141	0.13	0.124	0.129	550-690

Appendice

G

H

0.121	0.124	0.136	0.13	0.131	0.16	0.127	0.122	0.139	0.12	550-690
0.122	0.134	0.13	0.126	0.131	0.128	0.125	0.134	0.122	0.131	550-690
0.127	0.118	0.139	0.12	0.149	0.141	0.139	0.134	0.122	0.139	550-690
0.13	0.129	0.128	0.13	0.133	0.115	0.133	0.14	0.127	0.135	550-690
0.124	0.12	0.143	0.138	0.135	0.137	0.124	0.122	0.139	0.128	550-690
0.124	0.144	0.131	0.123	0.151	0.141	0.134	0.142	0.138	0.14	550-690

S1

S2

0.246	0.248	0.246	0.242	0.265	0.227	0.222	0.202	0.203	0.19	550-690
0.257	0.222	0.246	0.241	0.245	0.218	0.209	0.202	0.219	0.192	550-690
0.229	0.227	0.244	0.231	0.268	0.199	0.198	0.227	0.206	0.201	550-690
0.241	0.244	0.246	0.258	0.256	0.214	0.202	0.183	0.183	0.215	550-690
0.243	0.243	0.251	0.228	0.245	0.208	0.212	0.213	0.226	0.24	550-690
0.233	0.253	0.233	0.246	0.244	0.211	0.204	0.21	0.224	0.189	550-690

L1

L2

0.212	0.206	0.218	0.223	0.195	0.205	0.192	0.219	0.186	0.202	550-690
0.208	0.241	0.196	0.204	0.191	0.198	0.188	0.199	0.18	0.206	550-690
0.211	0.222	0.208	0.229	0.22	0.172	0.203	0.194	0.2	0.211	550-690
0.214	0.205	0.214	0.204	0.196	0.183	0.22	0.175	0.182	0.16	550-690
0.204	0.196	0.176	0.212	0.174	0.197	0.177	0.17	0.179	0.19	550-690
0.199	0.182	0.21	0.203	0.231	0.201	0.182	0.181	0.192	0.196	550-690

Appendice

G

H

0.198	0.199	0.206	0.197	0.189	0.194	0.211	0.2	0.198	0.215	550-690
0.199	0.203	0.184	0.185	0.197	0.199	0.177	0.189	0.182	0.184	550-690
0.186	0.188	0.185	0.197	0.187	0.207	0.187	0.192	0.193	0.178	550-690
0.193	0.198	0.196	0.201	0.166	0.196	0.193	0.191	0.167	0.191	550-690
0.168	0.167	0.2	0.204	0.204	0.207	0.184	0.209	0.203	0.195	550-690
0.193	0.186	0.189	0.187	0.191	0.197	0.204	0.203	0.199	0.215	550-690

BIBLIOGRAFIA

1. S. Mantero, A.Remuzzi, M.T. Raimondi, A. Ahluwall. Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa. Patron Editore (2010);
2. Stephen F.Badylak, Doris Taylor, Korkut Uygun. Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds. Annual Review of Biomedical Engineering, 2011: p.27-53.
3. Thomas W. Gilbert, Tiffany L. Sellaro, Stephen F. Badylak. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* vol.27, 2006: p.3675-3683
4. Stephen F.Badylak, Donald O.Freytes, Thomas W.Gilbert. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomateriala* vol.5, 2009: p.1-13
5. D.L.Nelson, M.M.Cox. I principi di Biochimica di Lehninger. Terza edizione. Edizione Zanichelli, 2002
6. B. Young, J.W. Heath. Wheater. Istologia e anatomia microscopica. Testo atlante. Terza edizione. Casa editrice Ambrosiana, 2000
7. www.giovannichetta.it
8. Peter M.Crapo, Thomas W.Gilbert, Stephen F.Badylak. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* vol. 32, 2011: p.3233-3243
9. Phillips M, Maor e, Rubinsky B. Non thermal irreversible electroporation for tissue decellularization. *J. Biomech Eng* vol.132, 2010
10. Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. Histological evaluation of decellularized porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularization methods. *Eur J. Cardiothorac Surg*, vol.27, 2005: p.566-571
11. Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, Konig K, Riemann I, Halbhuber KJ, et al. Impact of extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. *J. Struct Biol*, vol.143, 2003: p.201-208
12. www.aferesi.it

Bibliografia

13. Thomas Shupe, Matthew Williams, Alicia Brown, Bradley Willenberg, Bryon E. Petersen. Method for the decellularization of intact rat liver. *Organogenesis*, vol.6, 2010: p.134-136
14. Basak E. Uygun, Alejandro Soto-Gutierrez, Hiroshi Yagi, Maria-Louisa Izamis, Maria A. Guazzardi, Carley Shulman, Jack Milwid, Naoya Kobayashi, Arno Tilles, Francois Berthiaume, Martin Hertl, Yaakov Nahmias, Martin L. Yarmush, Korkut Uygun. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nature medicine*, 2010: p.814-821
15. Pedro M. Baptista, Mohummad M. Siddiqui, Genevieve Lozier, Sergio R. Rodriguez, Anthony Atala, Shay Soker. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology*, vol.53, 2011: p.604-617
16. Herald C. Ott, Thomas S. Matthisen, Saik-kia Goh, Lauren D. Block, Stefan M. Kren, Theoden I. Netoff, Doris A. Taylor. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Medicine*, 2008: p.213-221
17. Alexander Weymann, Sivakkanan Loganathan, Hiroaki Takahashi, Carsten Schies, Benjamin Claus, Kristof Hirshberg, Pal Saos, Sevil Korkmaz, Bastian Schmack, Matthias Karck, Gabor Szabo,. Development and evaluation of a perfusion decellularization porcine heart model. *Circulation Journal. Official Journal of the Japanese circulation society*, 2011: p.852-860
18. Elizabeth A. Calle1, Thomas H. Petersen, Laura E. Niklason. Procedure for Lung Engineering, www.jove.com
19. Tan JY, Chua CK, Leong KF, Chian KS, Leong WS, Tan LP. Esophageal tissue engineering: an in depth review on scaffold design. *Biotechnol Bioeng, Wiley Periodicals*, 2011
20. Masayasu Ozeki, Yuji Narita, Hideaki Kagami, Naoki Ohmiya, Akihiro Itoh, Yoshiki Hirooka, Yasumasa Niwa, Minoru Ueda, Hidemi Goto. Evaluation of decellularized esophagus as a scaffold for cultured esophageal epithelial cells. *Wiley InterScience*, 2006: p. 771-778

Bibliografia

21. Maurizio Marzaro, Simonetta Vigolo, Barbara Oselladore, Maria Teresa Conconi, Domenico Ribatti, Stefano Giuliani, Beatrice Nico, Giampiero Perrino, Gastone Giovanni Nussdorfer, Pier Paolo Parnigotto. *In vitro* and *in vivo* proposal of an artificial esophagus. Wiley Periodicals, 2006: p.795-801
22. Amit D. Bhrany, Benjamin L. Beckstead, B.S. Tess, C. Lang, D. Gregory Farwell, Cecilia M. Giacchelli, Buddy D. Ratner. Development of an esophagus acellular matrix tissue scaffold. *Tissue engineering*, vol.12, 2006: p.319-332
23. Memoria de solitud proyecto de investigaciòn. Fundaciòn mutua madrileña
24. Materiale Corso Integrato “Applicazioni Biotecnologiche e Bioreattori”, 2011
25. S.A Korossis, F. Bolland, J.N. Kearney, J. Fisher, E. Ingham. Bioreactors in tissue engineering. *Topics in Tissue Engineering*, vol.2, 2005.
26. www.watson-marlow.it
27. www.ebersmedical.com
28. www.biotekinstrument.com
29. Gen 5 Sample Protocols & Experiments Guide (BioTek 2006)
30. Wendt D, Marsano A, Jakob M, Heberer M, Martin I. Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity. *Biotechnol Bioeng*, vol. 84: p.205-214

Ringraziamenti...

A Inaky y Clara, por haberme dado la oportunidad de aprender muchísimas cosas.. porque gracias a vosotros ahora se que quiere decir ir a trabajar contenta... por haber contestado a todos mis correos... porque sois un grupo estupendo. Os llevaré siempre en mi corazón

Alla Prof.ssa Soncini, per essere stata sempre disponibile, per avermi aiutata e per avermi fatto conoscere il piccolo Leonardo.. per avermi fatto capire che in fondo anche a me piacciono i bambini

Ai miei genitori, grazie ai quali tutto questo è stato possibile. Per avermi sostenuta in questo percorso, per avermi regalato un anno in Spagna e perché costantemente mi dimostrano il loro affetto e la loro fiducia in me

A mia sorella per avermi cercato milioni di articoli, per avermi aiutato costantemente, per essere sempre disponibile e ottimista

A mia nonna per aver pregato per me la notte prima di ogni esame

A Gianky, per avermi sopportato nella mia pazzia, per essermi stato a fianco sempre e comunque, per avermi dato la forza di continuare e lottare. Per avermi consolato e per aver sempre creduto in me. Per quello che ogni giorno mi dimostri, per come mi fai sentire importante... perché questo possa essere l'inizio di un futuro insieme

A Paola e Francesca.. per aver condiviso con me gioie e dolori universitari, per avermi tranquillizzato nei momenti di crisi e per essere delle amiche e consigliere fantastiche. Per non essere mai state delle semplici compagne di università

Alle mie amiche di sempre, per aver tollerato le mie reclusioni, i miei scleri e per essere sempre disponibili

A Manu per essere impazzito insieme a me il giorno della consegna