

POLITECNICO DI MILANO

Scuola di Ingegneria Industriale e dell'Informazione

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



**PROTOCOLLI SPERIMENTALI PER LA
DECELLULARIZZAZIONE, RICELLULARIZZAZIONE E
CARATTERIZZAZIONE DI PERICARDIO DI ORIGINE
PORCINA PER LA FABBRICAZIONE DI BIOPROTESI
VALVOLARI**

Relatore:

Prof. Ing. Monica SONCINI

Correlatore:

Ing. Filippo CONSOLO

Tesi di Laurea di:

Marco SPICCIA

Matricola 783163

Anno Accademico 2012-2013

INDICE

SOMMARIO	I
ABSTRACT	XI
INTRODUZIONE	1
PATOLOGIE VALVOLARI CARDIACHE E TERAPIE TRADIZIONALI	6
1.1 Disfunzioni delle valvole cardiache	6
1.2 Sostituzione valvolare aortica	10
1.3 Le protesi valvolari.....	11
1.3.1 Protesi valvolari meccaniche.....	12
1.3.2 Protesi valvolari biologiche.....	16
1.3.3 Protesi pericardiche	18
1.4 Degenerazione delle protesi valvolari biologiche	21
1.4.1 Calcificazione.....	22
1.4.2 Degradazione non calcifica	23
INGEGNERIA TISSUTALE DELLE VALVOLE CARDIACHE: STATO DELL'ARTE ...	24
2.1 Ingegneria tissutale delle valvole cardiache	24
2.1.1 Scaffold per l'ingegneria tissutale delle valvole cardiache	26
2.1.1.1 Scaffold di origine sintetica.....	27
2.1.1.2 Scaffold di origine biologica	29
2.2 Tecniche di decellularizzazione di tessuti biologici.....	31
Metodi chimici	33
Metodi enzimatici.....	34
Metodi fisici	34
2.2.1 Caratterizzazione delle matrici decellularizzate.....	36
2.2.2 Scaffold ottenuti da tessuti decellularizzati.....	41
2.3 Ricellularizzazione degli scaffolds.....	48
2.3.1 Metodi di ricellularizzazione.....	48
2.3.2 Ricellularizzazione del pericardio	49
DECELLULARIZZAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI MATRICI DI TESSUTO PERICARDICO DI ORIGINE PORCINA	55
3.1 Protocollo di decellularizzazione del pericardio	56
3.2 Fissaggio in GA.....	60
3.3 Caratterizzazione del tessuto	60

3.3.1	Caratterizzazione istologica	61
3.3.1.1	Preparazione dei campioni	61
3.3.1.2	Colorazione istologica tricromica di Masson	62
3.3.1.3	Immunofluorescenza anti- α -gal	64
3.3.2	Caratterizzazione meccanica	68
3.3.2.1	Prove di trazione monoassiale	68
3.3.2.2	Prove di permeabilità	72
3.3.2.3	Analisi statistica	79
PROCEDURE SPERIMENTALI PER LA RICELLULARIZZAZIONE DELLE MATRICI DI PERICARDIO DECELLULARIZZATE		80
4.1	Sistema per la semina e la coltura confinata di patch di pericardio decellularizzato	81
4.1.1	Progettazione e realizzazione del sistema di coltura	81
4.1.2	Collaudo del sistema di coltura: prove di tenuta	86
4.2	Uso del sistema di coltura per la ricellularizzazione del pericardio in condizioni di sterilità	87
4.2.1	Sterilizzazione del sistema di coltura	88
4.2.2	Decontaminazione del pericardio	90
4.2.3	Alloggiamento del patch di pericardio decellularizzato nel sistema di coltura in condizioni di sterilità	91
4.2.4	Prove di mantenimento della sterilità: test del tioglicolato	94
4.2.4.1	Esperimento 1	96
4.2.4.2	Esperimento 2	97
4.3	Ricellularizzazione e caratterizzazione dei patch di pericardio decellularizzato	99
4.3.1	Isolamento delle Valve Interstitial Cells	99
4.3.2	Calcolo della densità ottimale di semina delle Valve Interstitial Cells	101
4.3.3	Protocollo di semina delle Valve Interstitial Cells su patch di pericardio decellularizzato	102
4.3.4	Caratterizzazione biologica dei campioni di pericardio ricellularizzati	104
4.3.4.1	Test del MTT	106
4.3.4.2	Colorazione istologica con Ematossilina&Eosina	107
4.3.4.3	Immunofluorescenza con DAPI	108
4.3.4.4	Analisi della struttura del pericardio tramite immagini a contrasto di fase	109
RISULTATI E DISCUSSIONE		110
5.1	Decellularizzazione del tessuto pericardico	110
5.1.1	Caratterizzazione biologica del tessuto pericardico decellularizzato	111
5.1.2	Caratterizzazione meccanica del tessuto pericardico decellularizzato	114

5.1.2.1 Prove di trazione monoassiale.....	115
5.1.2.2 Prove di permeabilità/distensibilità del tessuto	122
5.2 Ricellularizzazione delle matrici pericardiche decellularizzate	129
5.2.1 Collaudo del sistema per la semina e la coltura confinata.....	130
5.2.2 Prove di mantenimento della sterilità: test del tioglicolato	131
5.2.2.1 Esperimento 1.....	131
5.2.2.2 Esperimento 2.....	133
5.2.3 Campagne sperimentali di semina e coltura confinata di VICs su patch di pericardio decellularizzato.....	134
5.2.3.1 Calcolo della densità ottimale di semina delle VICs.....	134
5.2.3.2 Caratterizzazione biologica dei campioni di pericardio ricellularizzati	134
Test MTT	135
Colorazione istologica con Ematossilina&Eosina	139
Immunofluorescenza con DAPI e immagini a contrasto di fase	141
CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.....	144
Bibliografia	151

SOMMARIO

Introduzione

Le disfunzioni delle valvole cardiache rappresentano tuttora una delle principali cause di invalidità e mortalità in tutto il mondo. Negli ultimi anni, si studia con interesse sempre maggiore la possibilità di sviluppare sostituti valvolari (protesi) alternativi a quelli tradizionalmente utilizzati i quali hanno evidenziato numerosi limiti che portano spesso al progressivo fallimento della protesi e alla necessità di un re-intervento per la sua sostituzione. Mentre le valvole meccaniche causano infatti l'alterazione dell'emodinamica, la necessità di trattamento farmacologico anticoagulante per l'intera vita del paziente, e non hanno la capacità di adattarsi e rimodellarsi a seguito della crescita fisiologica dei pazienti, le bioprotesi realizzate con pericardio di origine animale (tipicamente bovino) fissato in glutaraldeide (GA) vanno incontro a fenomeni degenerativi legati principalmente alla calcificazione dei lembi e possono inoltre generare risposta infiammatoria e/o immunitaria dopo l'impianto.

Per superare tali limiti, sono state recentemente sviluppate metodologie di ingegneria tissutale delle valvole cardiache (*tissue engineering of heart valve*, TEHV). La TEHV si pone come obiettivo la produzione di protesi valvolari realizzate in tessuto biologico che non richiedano fissaggio del tessuto con GA. In particolare, tra le tecniche che hanno mostrato i risultati più incoraggianti, vi è il processo di decellularizzazione dei tessuti biologici,

che porta ad ottenere una matrice privata degli agenti immunogenici, mantenendo pressoché inalterata la sovrastruttura della matrice del tessuto [2, 3]. I vantaggi derivanti dall'utilizzo di matrici biologiche decellularizzate nel campo della TEHV sono molteplici. In primo luogo tali vantaggi risiedono nelle proprietà meccaniche e di riconoscimento biologico della matrice: nei tessuti sono preservate, infatti, le proteine strutturali che determinano le caratteristiche biomeccaniche del tessuto, ed i fattori di bioinduzione, come le sequenze amminoacidiche della matrice extracellulare (ECM) in grado di promuovere l'adesione e l'attività delle cellule che vi vengono seminate (fase di ricellularizzazione *in vitro* del tessuto), permettendo così la sintesi di nuova ECM, ed in ultima analisi la formazione di un costrutto ingegnerizzato funzionalizzato. Inoltre, le bioprotesi sono in grado di rimodellarsi ed adattarsi durante la vita del paziente, in quanto costituite da tessuti cellulari biologicamente vivi e funzionali. Infine, essendo le componenti proteiche della ECM compatibili tra le differenti specie, è possibile utilizzare fonti xenogeniche (bovino, porcino, ecc..) per l'ottenimento delle matrici decellularizzate su cui seminare cellule autologhe del paziente (umano) prima di procedere con l'impianto *in vivo*.

Sulla base delle considerazioni fin qui espresse, il presente lavoro di tesi, svolto presso il μ BS Lab del DEIB del Politecnico di Milano in collaborazione con il Laboratorio di Ingegneria Tissutale Cardiovascolare del Centro Cardiologico Monzino di Milano, ha come obiettivo la

definizione di opportune procedure sperimentali volte allo sviluppo di un protocollo per la decellularizzazione e la ricellularizzazione di matrici di pericardio di origine porcina, con lo scopo di analizzare le potenzialità del costrutto ingegnerizzato per applicazioni di TEHV in assenza di trattamento con GA.

Nel dettaglio, il lavoro è consistito in: *i*) campagne di decellularizzazione di foglietti di pericardio parietale estratti da cuori di maiale e caratterizzazione (meccanica e biologica) dei tessuti decellularizzati al fine di valutare l'efficacia del protocollo di decellularizzazione; *ii*) sviluppo di un set-up che consenta la semina e la coltura confinata di *valve interstitial cells* (VICs) ovvero cellule proprie del tessuto dei lembi valvolari, sulle matrici decellularizzate; *iii*) campagne di ricellularizzazione attraverso esperimenti di coltura delle VICs porcine sul pericardio decellularizzato e caratterizzazione (biologica) dei costrutti al termine della coltura, al fine di valutare l'influenza delle diverse variabili di processo identificate (ovvero la superficie del pericardio: fibrosa vs sierosa; la densità di semina; la durata della coltura).

Materiali e Metodi

Protocollo di decellularizzazione

Il protocollo di decellularizzazione utilizzato in questo lavoro di tesi, adattato da un precedente studio realizzato in collaborazione tra il μ BS Lab del Politecnico e il Centro Cardiologico Monzino [5], prevede l'utilizzo di un metodo combinato di tipo fisico-chimico-enzimatico. In breve, i foglietti di

pericardio vengono estratti e successivamente incubati e mantenuti in agitazione in soluzioni contenenti, rispettivamente, *i*) buffer ipotonico (Tris-HCl, pH 8.0, 16h a 4°C), che causa lisi cellulare per shock osmotico; *ii*) detergente ionico (Sodiododecilsolfato, SDS, 24h a temperatura ambiente), che rimuove i residui cellulari dagli strati più interni del tessuto; *iii*) endonucleasi (DNase I, 3h a 37°C), per la denaturazione e rimozione del DNA.

Per valutare l'efficacia del protocollo di decellularizzazione, le matrici decellularizzate sono state caratterizzate sia dal punto di vista biologico che meccanico. La caratterizzazione biologica è consistita in: *i*) analisi istologica attraverso tricromica di Masson, per valutare l'eventuale presenza di residui cellulari e il grado di mantenimento della sovrastruttura dell'ECM (orientamento, distribuzione ed organizzazione delle fibre di collagene); *ii*) immunofluorescenza con DAPI ed anti- α -gal, per verificare la rimozione delle componenti nucleiche e dell'epitopo specie-dipendente α -gal. Per queste analisi sono state confrontate le immagini acquisite da tessuto nativo e da tessuto decellularizzato.

La caratterizzazione meccanica delle matrici decellularizzate è stata invece effettuata per caratterizzarne le proprietà meccaniche e per valutare quanto queste si discostino da quelle del tessuto nativo e dal tessuto fissato con GA (fissato con una soluzione allo 0.6% di GA, seguendo un protocollo presente in letteratura [6]). La caratterizzazione ha previsto lo svolgimento di: *i*) prove di trazione

monoassiale su provini ricavati da campioni di tessuto pericardico nativo, decellularizzato e fissato ed estrazione di sei parametri (analisi quantitativa) caratteristici del comportamento meccanico dei provini (Figura 1, [7]);

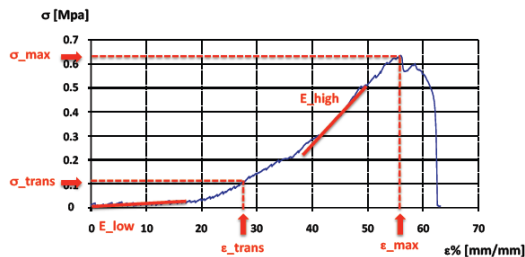


Figura 1: Curva σ - ε ricavata dalle prove di trazione monoassiale di un provino di pericardio nativo: in rosso vengono evidenziati i 6 parametri caratteristici del comportamento meccanico del tessuto [7].

ii) prove di permeabilità/distensibilità del tessuto: i campioni di tessuto appartenenti alle 3 popolazioni - nativo, decellularizzato e fissato - sono stati alloggiati in una camera di perfusione e sottoposti ad una perfusione confinata; attraverso un sistema di monitoraggio e controllo (Figura 2), è stato possibile registrare in tempo reale durante la prova la caduta di pressione (P) a cavallo del patch a diverse portate di fluido Q imposte.

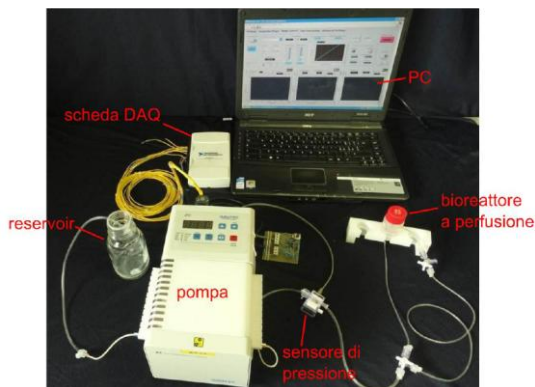


Figura 2: set-up per le prove di permeabilità. Per ciascuna delle tre popolazioni, sono state effettuate diverse prove utilizzando

differenti valori di portata (Q, pari a 10, 20 e 30 $\mu\text{l}/\text{min}$), ricavando così il coefficiente di permeabilità (K) del tessuto (calcolato come inverso del coefficiente angolare della retta interpolante i punti sperimentali P-Q ottenuti durante la prova).

I dati acquisiti sono stati inoltre visualizzati in un grafico pressione-volume (curva P-V, Figura 3, V indica il volume di fluido erogato dalla pompa) dal quale sono stati estratti 4 parametri caratteristici delle proprietà di distensibilità del patch [7].

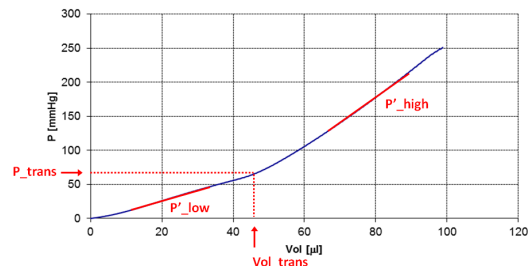


Figura 3: Curva P-V ricavata dalle prove di permeabilità/distensibilità su un campione di tessuto di pericardio: in rosso vengono evidenziati i 4 parametri caratteristici delle proprietà di distensibilità del tessuto.

Sistema per la semina e la coltura confinata delle VICs sul pericardio decellularizzato

In Figura 4 viene mostrato il disegno CAD degli elementi che costituiscono il sistema per la semina e la coltura confinata del patch di pericardio decellularizzato. Il sistema mostrato è costituito da: i) una cartuccia portasccaffold, realizzata in silicone biomedicale in cui alloggiare, e vincolare mediante un o-ring, il patch decellularizzato; ii) un reservoir, che rappresenta l'elemento di contenimento della sospensione cellulare seminata e del

terreno di coltura necessario al mantenimento in coltura delle cellule e che consente la coltura confinata su una specifica superficie del foglietto di pericardio alloggiato.

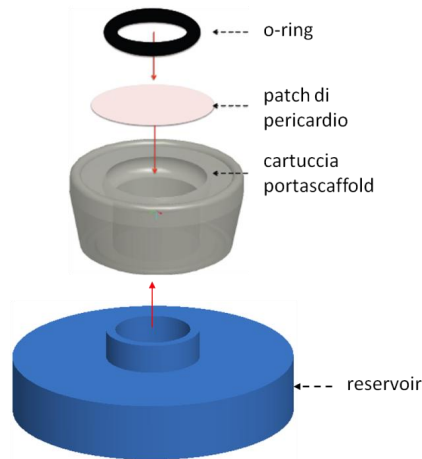


Figura 4: Disegno CAD dei componenti del sistema per la semina e la coltura confinata del patch di pericardio decellularizzato. Le frecce rosse indicano come vengono assemblati i diversi elementi del sistema.

Una volta assemblato, il sistema di coltura del patch di pericardio è posto in uno dei pozzetti di una *multiwell* da 6 pozzetti, che consente di svolgere i test di coltura cellulare in condizioni di sterilità all'interno di un incubatore (37°C, 5%CO₂), impedendo l'ingresso di agenti patogeni e/o di microorganismi e garantendo, al tempo stesso, l'ossigenazione del medium in cui sono immerse le cellule.

Protocollo di decontaminazione dei tessuti e prove di mantenimento della sterilità

Prima di procedere alla ricellularizzazione dei patch di pericardio decellularizzato, sono stati definiti i protocolli per il raggiungimento ed il successivo mantenimento delle

condizioni di sterilità necessarie per la sopravvivenza delle cellule durante la coltura. Tale fase del lavoro ha previsto: *i)* la sterilizzazione delle componenti del sistema, *ii)* la definizione di un protocollo per la decontaminazione del tessuto pericardico decellularizzato, che consiste nell'incubazione in BASE.128 (sono stati considerati due differenti tempi di incubazione 24h e 72h), e *iii)* la definizione di un protocollo per l'alloggiamento del patch di pericardio decontaminato nel sistema di coltura, sotto cappa, in condizioni di sterilità. L'efficacia delle procedure sopra descritte è stata valutata mediante il test del tioglicolato che consiste nell'incubazione (a 37°C per 7 giorni) dei tessuti decontaminati all'interno di una provetta contenente il tioglicolato; la limpidezza del mezzo è stata controllata quotidianamente: un intorbidimento del terreno indica contaminazione batterica (test positivo, Figura 5, destra), al contrario, la limpidezza del mezzo al termine dell'incubazione indica sterilità del campione analizzato (test negativo, Figura 5, sinistra).

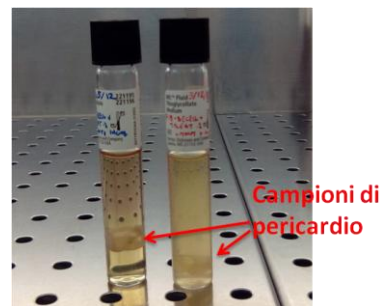


Figura 5: Test del tioglicolato: confronto della limpidezza del mezzo tra un campione sterile (sinistra) e uno contaminato (destra).

Ricellularizzazione delle matrici pericardiche decellularizzate

Le cellule utilizzate per la ricellularizzazione del pericardio decellularizzato, le VICs, sono state isolate mediante digestione enzimatica di una valvola aortica porcina. Prima di procedere agli esperimenti di semina, sono stati condotti test di espansione cellulare su piastra, per valutare la densità di semina ottimale per il ripopolamento dei patch di pericardio. A valle di questo passaggio, si è proceduto agli esperimenti di semina delle VICs. In particolare, sono stati effettuati 2 esperimenti seminando, rispettivamente, la superficie fibrosa e quella sierosa del foglietto di pericardio. Inoltre, per ciascuna delle due superfici seminate sono state selettivamente variate altre due condizioni: *i*) densità di semina (0.6×10^3 cell/mm² vs. 3×10^3 cell/mm²); *ii*) durata della coltura (24h vs. 72h).

Caratterizzazione biologica dei costrutti ricellularizzati

Al fine di valutare la reale efficacia del protocollo di semina utilizzato, in funzione delle 3 variabili di processo considerate (superficie di semina, densità di semina, durata della coltura), i costrutti ricellularizzati sono stati sottoposti a: *i*) colorazione con MTT, *ii*) colorazione istologica con Ematossilina e Eosina (H&E), e *iii*) immagini di immunofluorescenza per DAPI combinate con immagini in contrasto di fase dei costrutti. Tali analisi sono volte a valutare l'adesione e la distribuzione della VICs sulla superficie seminata e l'eventuale ripopolamento delle sezioni più interne dei patch di pericardio.

Risultati

Matrici decellularizzate: caratterizzazione biologica e meccanica

In Figura 6 vengono riportati i risultati dell'analisi istologica (tricromia di Masson) con cui sono stati confrontati i tessuti di pericardio nativo ed i tessuti decellularizzati.

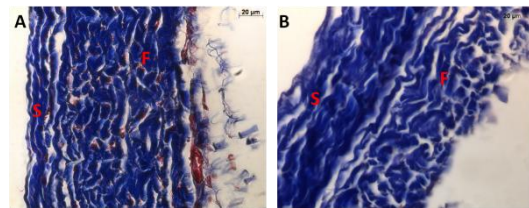


Figura 6: Analisi istologica (tricromia di Masson) di campioni di tessuto di pericardio nativo (A) e decellularizzato (B); S: superficie sierosa; F: superficie fibrosa. Blu: collagene; Rosso: nuclei cellulari.

L'analisi istologica delle sezioni di tessuto decellularizzato (Figura 6B) ha permesso di verificare l'effettiva rimozione delle cellule dal tessuto: a differenza del tessuto nativo (Figura 6A), non sono osservabili nuclei cellulari, colorati in rosso. Inoltre, tramite tale colorazione istologica è stato possibile stabilire che il protocollo di decellularizzazione utilizzato ha consentito di preservare la sovrastruttura della ECM nativa, come dimostrato dal mantenimento dell'integrità strutturale, della distribuzione e della compattezza all'interno della ECM delle fibre di collagene, colorate in blu.

L'analisi in immunofluorescenza (Figura 7) ha permesso di valutare la completa rimozione dei nuclei cellulari e dell'epitopo specie-dipendente α -gal dal tessuto decellularizzato (Figura 7B): non è possibile individuare, infatti, nuclei cellulari (colorati in blu e presenti nel

tessuto nativo, Figura 7A) né la presenza di cellule che esprimono α -gal (colorate in verde e presenti nel tessuto nativo in Figura 7A).

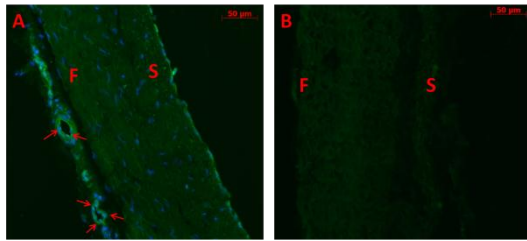


Figura 7: Immagini in immunofluorescenza su tessuto nativo (A) e decellularizzati (B). S: superficie sierosa; F: superficie fibrosa. Blu: nuclei cellulari, Verde: α -gal

Per quanto riguarda la caratterizzazione meccanica dei tessuti decellularizzati, il confronto dei sei parametri ricavati dalle prove di trazione monoassiale ha permesso di verificare che il protocollo di decellularizzazione non altera le proprietà meccaniche del tessuto rispetto al pericardio nativo; al contrario, il trattamento con GA provoca alterazioni significative della risposta meccanica dei tessuti caratterizzati, in particolare, da una maggiore rigidità rispetto al tessuto nativo (ANOVA, $p < 0.05$).

Le prove di permeabilità (Figura 8) hanno messo in evidenza come il tessuto nativo (N) ed il tessuto fissato (GA) risultino pressoché impermeabili: la pressione P aumenta infatti linearmente con il volume V erogato dalla pompa per l'intera durata del test.

Al contrario, nel caso del tessuto decellularizzato (DE, Figura 8), la pressione P raggiunge un valore di plateau, indicativo della filtrazione del fluido che investe il patch a cavallo della matrice. Per il gruppo DE è stato dunque possibile calcolare il valore del

coefficiente K, pari a $0.12 \pm 0.01 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}$. I risultati ottenuti indicano chiaramente la necessità di una fase di ricellularizzazione del tessuto prima del suo effettivo utilizzo per la fabbricazione dei lembi di una bioprotesi per valvole cardiache: la ricellularizzazione è finalizzata anche a ripristinare la proprietà di impermeabilità che caratterizza il pericardio nativo.

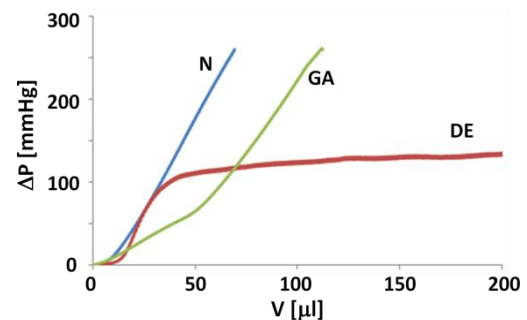


Figura 8: Curve P-V caratteristiche del tessuto pericardico nativo (N), decellularizzato (DE) e fissato (GA) acquisite imponendo una portata pari a $20 \mu\text{l}/\text{min}$.

Inoltre, le analisi statistiche svolte (ANOVA test) sui 4 parametri estratti dalle curve P-V, hanno evidenziato come il tessuto decellularizzato conservi le proprietà di distensibilità tipiche del tessuto nativo ($p > 0.05$), a differenza del pericardio fissato in GA (ANOVA, $p < 0.05$), confermando i risultati ottenuti con le prove di trazione monoassiale relativamente al comportamento meccanico del tessuto a valle dei due diversi trattamenti.

Campagne sperimentali di ricellularizzazione dei patch di pericardio decellularizzato e caratterizzazione dei costrutti

Il protocollo definito per la decontaminazione del pericardio

decellularizzato, messo a punto al termine di diversi test di valutazione del mantenimento della sterilità, è costituito da una prima incubazione in BASE.128 per 72h. Questo trattamento garantisce il completo abbattimento della carica batterica che caratterizza il tessuto nativo e che la decellularizzazione non è stata in grado di eliminare. Inoltre, poiché la procedura di alloggiamento del patch all'interno del sistema di coltura rappresenta una potenziale fonte di reintroduzione di nuova contaminazione del tessuto con conseguente perdita della sterilità, è stata valutata la necessità di effettuare una seconda incubazione del tessuto in BASE.128, di durata pari a 24h, a valle dell'alloggiamento del patch nel sistema. Tale nuova incubazione si è dimostrata efficace nel garantire il mantenimento della sterilità dei tessuti decellularizzati da utilizzare per le successive prove di ricellularizzazione.

Il passo successivo è consistito dunque nell'esecuzione degli esperimenti di semina di VICs porcine, variando selettivamente la superficie di semina (fibrosa vs. sierosa), la densità cellulare di semina e la durata della coltura. Dalla caratterizzazione biologica dei costrutti ricellularizzati è emerso che la condizione che ha dimostrato i risultati più incoraggianti è risultata la condizione con la semina delle VICs sulla superficie sierosa del pericardio, alla densità di 3×10^3 cell/mm² -valore stimato dagli esperimenti di espansione delle VICs su piastra- e per un tempo di coltura pari a 72h.

In Figura 9 vengono riportati i risultati del test MTT, della analisi istologica con

H&E e dell'analisi in immunofluorescenza DAPI combinata con l'analisi delle immagini in contrasto di fase delle sezioni interne del tessuto del pericardio seminato sulla superficie fibrosa (Figura 9 A,C,E) e sulla superficie sierosa (Figura 9 B,D,F). Dall'analisi delle immagini in Figura 9 è possibile osservare come la superficie sierosa del pericardio favorisca l'adesione e la proliferazione delle VICs, al contrario di quanto avvenga sulla superficie fibrosa che sembra invece inibire il processo di adesione delle VICs, che vanno incontro a morte nell'arco di 72h.

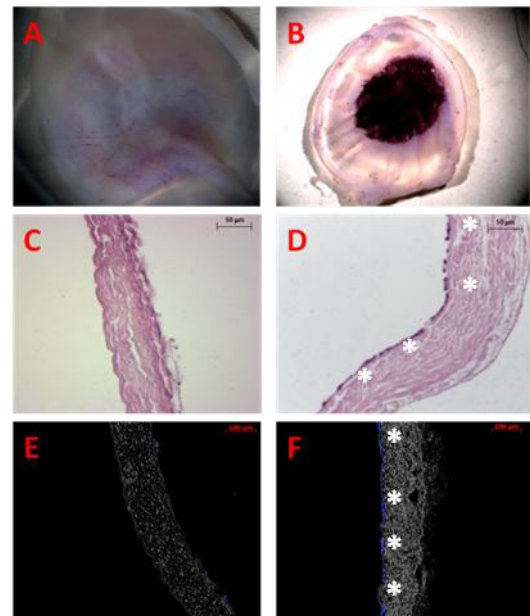


Figura 9: Caratterizzazione biologica dei costrutti di pericardio seminati con le VICs sulla superficie fibrosa (A, C, E) e sierosa (B, D, F): test MTT (A, B), H&E (C, D) e DAPI+immagini del tessuto in contrasto di fase (E, F). Densità di semina: 3×10^3 cell/mm²; tempo di coltura: 72h. Gli asterischi bianchi (C-F) evidenziano nuclei cellulari chiaramente visibili sulla superficie sierosa del pericardio. In ciascuna immagine, la superficie sierosa è rivolta verso sinistra, quella fibrosa verso destra.

In dettaglio, il test MTT, test puramente qualitativo e da intendersi come analisi preliminare (il test consente di avere i risultati rapidamente ed è un test a basso costo) permette di visualizzare una intensa colorazione purpurea - indice della presenza di una elevata quantità di cellule vitali - sulla superficie sierosa del tessuto (Figura 9B), molto più intensa ed uniforme rispetto alla superficie fibrosa (Figura 9A). Tale risultato è confermato dalle analisi istologiche e in immunofluorescenza che mostrano la formazione, al termine delle 72h, di uno strato di cellule confluenti e uniformemente distribuite sulla superficie sierosa del pericardio (Figura 9 D,F). Al contrario, sulla superficie fibrosa l'adesione è debole e le poche cellule rimaste vive al termine delle 72h sono isolate.

Tuttavia, anche nel caso di semina della superficie sierosa, non è stato osservato un effettivo e completo ripopolamento del tessuto: le cellule adese in superficie non sono riuscite, infatti, a penetrare all'interno del tessuto. In prima analisi, ciò può essere dovuto al tempo di mantenimento in coltura delle VICs, pari a 72h, sufficiente a far aderire le cellule ma non a consentire la loro migrazione negli strati più interni del tessuto.

Conclusioni

Attraverso la caratterizzazione biologica delle matrici decellularizzate è stato possibile evidenziare come il protocollo di decellularizzazione valutato nel presente lavoro di tesi, oltre a garantire la completa rimozione delle componenti immunogeniche del tessuto ha consentito di preservare le proprietà strutturali e

funzionali delle componenti della ECM del tessuto. Dalla caratterizzazione meccanica (prove di trazione monoassiale e di distensibilità del tessuto) è emerso, infatti, come il tessuto decellularizzato presenti un comportamento biomeccanico molto simile al tessuto nativo.

Tale risultato dimostra che la decellularizzazione, ed in particolare il protocollo messo a punto nell'ambito del presente lavoro, rappresenta una valida alternativa al trattamento di fissaggio con GA consentendo di superare alcuni tra i principali limiti che caratterizzano i tessuti trattati con GA, ed in particolare la significativa alterazione delle proprietà meccaniche indotta proprio dall'azione della GA.

Il sistema per la semina e la coltura confinata di cellule su matrici di pericardio decellularizzato, realizzato nel presente progetto di tesi, ha soddisfatto le specifiche definite in fase di progetto, consentendo quindi di eseguire i test di coltura cellulare confinata sul tessuto decellularizzato al variare delle diverse condizioni testate. Il sistema è stato inoltre facilmente integrato con gli strumenti tipicamente utilizzati nel laboratorio biologico di colture cellulari senza comportare la necessità di modificare le procedure utilizzate dal personale del laboratorio e senza comportare un significativo aumento dei costi per la realizzazione degli esperimenti.

Le procedure definite per l'ottenimento e il mantenimento della sterilità (decontaminazione del pericardio decellularizzato e protocollo di

alloggiamento del patch di tessuto in condizioni di sterilità) hanno consentito di svolgere le campagne sperimentali di ricellularizzazione di patch di tessuto nel sistema di coltura senza incorrere in problemi legati alla perdita della sterilità dei campioni, dimostrando quindi la loro efficacia.

La caratterizzazione biologica eseguita sui costrutti ricellularizzati ha reso possibile l'identificazione della superficie sierosa del pericardio come la superficie che favorisce l'adesione, la proliferazione e la migrazione cellulare delle VICs. Questo risultato è di assoluto interesse in ambito scientifico in quanto permette di andare a colmare la mancanza di dati di letteratura a riguardo.

Inoltre, i risultati ottenuti in fase di ricellularizzazione delle matrici decellularizzate, seppur preliminari, costituiscono un promettente punto di partenza per l'ottenimento di foglietti di pericardio ingegnerizzato per la realizzazione dei lembi di valvole cardiache bioprotesiche. A tale scopo, alcuni sviluppi futuri del presente lavoro di tesi potranno essere: *i*) campagne di ricellularizzazione utilizzando VICs di origine umana per valutare la possibile traslabilità del protocollo su soggetti umani; *ii*) aumento della durata della coltura (7, 14 e 21gg) per valutare se in tale periodo le VICs riescano a penetrare negli strati più interni della matrice così da ripopolare completamente il tessuto; *iii*) introduzione di una fase di condizionamento in bioreattore per favorire la colonizzazione degli strati più interni del pericardio e la sintesi da parte delle cellule di nuova ECM, così da

giungere alla formazione di tessuto funzionale. Questo sviluppo necessita di una fase di studio preliminare finalizzata alla definizione delle opportune condizioni di stimolazione dei costrutti.

Bibliografia

1. Braga Braile, MV., et al., *In vitro properties and performance of glutaraldehyde-crosslinked bovine pericardial bioprotheses treated with glutamic acid*. Artificial organs, 2011. 35(5):p. 497-501.
2. Gilbert, T.W., et al., *Decellularization of tissues and organs*. Biomaterials, 2006; **27(19)**: p. 3675-83.
3. Crapo, P., et al., *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*. Biomaterials, 2011; 32: p. 3233-3243.
4. Galili, U., *The alpha-gal epitope (Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc-R) in xenotransplantation*. Biochimie, 2001; **83**: p. 557-563.
5. Vinci, M.C., et al., *Mechanical compliance and immunological compatibility of fixative-free decellularized/cryopreserved human pericardium*. PLoS ONE, 2013. **8(5)**: e64769.
6. Hulsmann, J., et al., *Transplantation material bovine pericardium: biomechanical and immunogenic characteristics after decellularization vs. glutaraldehyde fixing*. Xenotransplantation, 2012; **19**: p. 286-297.
7. Consolo, F., et al., *A dynamic distension protocol for whole-organ bladder decellularization:*

*histological and biomechanical
characterization of the acellular
matrix.* J Tissue Eng Regen Med,
2013; doi: 10.1002/term.1767

ABSTRACT

Introduction

Valvular heart diseases still represent, to date, one of the main causes of morbidity and mortality worldwide. Recently, the possibility to develop valvular substitutes (prostheses) alternative to those traditionally used has been investigated. Indeed, standard heart valve prosthesis revealed several drawbacks often leading to prostheses failure thus requiring re-operation for its substitution. In fact, while mechanical valves induce severe hemodynamic alterations, require an anticoagulant drug treatment for the whole patient's life, and miss the ability to remodel and adapt in response to the physiological growth of the patient, the bioprosthesis - made of pericardium of animal origin (typically bovine) fixed in glutaraldehyde (GA) - undergo to degenerative phenomena related to calcification of the leaflets tissue and they can also generate inflammatory response and/or immunoresponse after implantation.

To overcome those limitations, new techniques based on tissue engineering of heart valves (TEHV) have been recently developed. TEHV aims to *in vitro* fabricate fixative-free biological valve prostheses. Particularly, among the different approaches considered in previous studies, native tissue decellularization seems to be a promising procedure to obtain tissues deprived of the immunogenic components (cells, nucleic acids and species-dependent epitopes) while preserving the 3D sovrastructure, i.e: the composition and 3D architecture of the protein fibers

constituting the extracellular matrix, (ECM), of the native tissue. This technique has therefore different advantages, such as: *i*) the retention of the native tissue mechanical properties, which rely mainly on ECM fibers; *ii*) the preservation of bioinduction factors, such as those aminoacidic sequences promoting adhesion and proliferation of the cells seeded on the tissue substrate during the *in vitro* recellularization phase, leading to tissue repopulation and ultimately to the tissue "functionalization"; *iii*) the bioprosthesis are able to remodel, "grow" and adapt during the patient's life since they are composed of biologically active cellular constructs. Finally, since the ECM proteins are conserved among different species, xenogeneic tissue sources (bovine, porcine, etc...) are compatible to be used in human clinical applications, enabling, for example the possibility to repopulate the decellularized tissue with patient's autologous cells before *in vivo* implantation.

On the basis of those observations, the present work, carried out at the μ BS Lab of Politecnico of Milan in collaboration with the Cardiovascular Tissue Engineering Lab of Centro Cardiologico Monzino, aims to define a novel *in vitro* procedure to produce a fixative-free cellularized pericardium tissue-patch to be used for fabrication of cardiac valve leaflets with enhanced biomechanical performances and *in vivo* durability.

In detail, the overall work activities consisted in: *i*) experimental campaigns aimed at the decellularization of porcine parietal pericardium tissue patches and

characterization (mechanical and biological) of the decellularized tissues to assess the effectiveness of the decellularization protocol; *ii*) the development of an experimental set-up enabling a *confined* cell - valve interstitial cells, VICs - seeding on the acellular matrices; *iii*) the definition of a proper acellular matrices recellularization protocol and characterization (biological) of the constructs at the end of the seeded constructs, in order to evaluate the influence of different variables we considered, i.e., *i*) the pericardium seeding surface (fibrous *vs.* serous) - *ii*) the seeding density and *iii*) the culture time.

Materials and Methods

The decellularization protocol

The decellularization protocol adopted in this thesis project, adapted from a previously developed one in collaboration between the μ BS Lab and the Centro Cardiologico Monzino [5], is based on a combined physical-chemical-enzymatic method. Particularly, pericardium sheets dissected from the ventricular region of porcine myocardia were subsequently incubated, with orbital shaking, in decellularization solutions containing, respectively, *i*) hypotonic buffer (Tris-HCl, pH 8.0, 16h at 4 ° C), to cause cell lysis by osmotic shock; *ii*) ionic detergent (SDS, 24h at room temperature), to remove cellular debris from the inner layers of the tissue; *iii*) endonucleases (DNase I, 3h at 37° C), for DNA denaturation and removal.

To evaluate the effectiveness of the decellularization protocol, the acellular

matrices have been characterized, biologically and mechanically. Biological characterization consisted in: *i*) histological analysis through Masson's trichrome staining to assess effective cell removal cellular and to evaluate the degree of preservation of the ECM sovrastructure (integrity, distribution and organization of the collagen fibers); *ii*) anti- α -gal and DAPI analysis, to check for α -gal epitopes and nucleic components removal. For those analyses, native and decellularized tissues were compared.

Mechanical characterization was carried out to compare the acellular matrix mechanical properties with respect to the ones exhibited by the native and GA-fixed tissue. Mechanical characterization consisted in: *i*) uniaxial tensile loading (UTL) tests, performed on native, decellularized and GA-fixed tissue specimens, to calculate six parameters describing the tissue mechanical response (Figure 1, [7]);

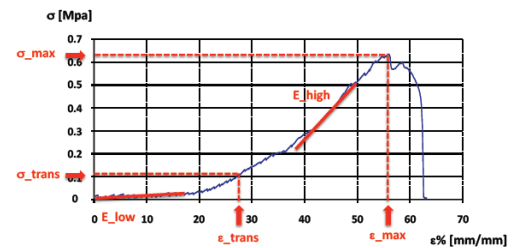


Figure 1: σ - ϵ curve obtained from uniaxial tensile test on native pericardium specimen: the 6 parameters describing the tissue mechanical behaviour are red-highlighted [7].

ii) permeabilità/distensibilità tests: tissue samples - native, decellularized and GA-fixed - were housed in a perfusion chamber and subjected to a confined perfusion regimen; through a control system (Figure 2), the pressure drop (P)

on the patch was monitored and recorded in real-time during the test.

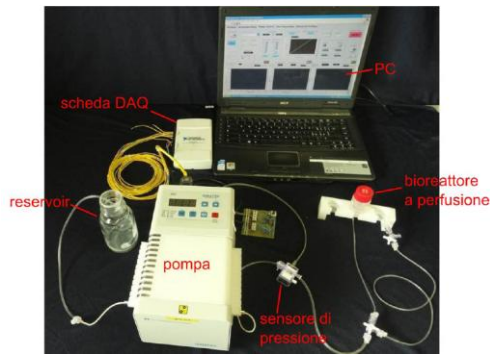


Figure 2: Set-up for permeability tests.

For each group, tests were performed using different flow rate values (Q , equal to 10, 20 and 30 $\mu\text{l}/\text{min}$), in order to calculate the permeability coefficient (K) of the tissue (calculated through linear regression analysis of the Q-P data set).

Furthermore, the acquired data were plotted to obtain the pressure-volume relationship (P-V curve, Figure 3, V is the volume of fluid infused by the pump). From P-V curves, four parameters characterizing the distensibility properties of the patch were calculated (Figure 7, [7]).

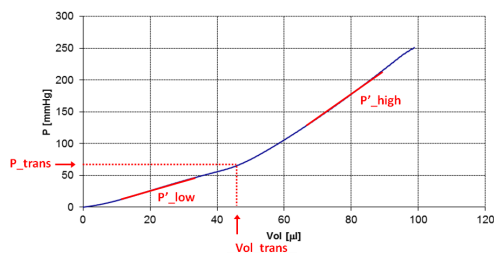


Figure 3: P-V curve obtained from permeability/distensibility test on pericardium specimen: the 4 parameters extracted from the curve are red-highlighted.

The culture system for acellular pericardial matrices recellularization

Figure 4 shows the CAD model of the system designed for the experimental

campaigns of VICs seeding on the decellularized pericardium patch. The system consists of: *i*) a scaffold-holder cartridge where the pericardial patch is placed and constrained through an o-ring; *ii*) a reservoir, representing the element containing the cell suspension and the culture medium.

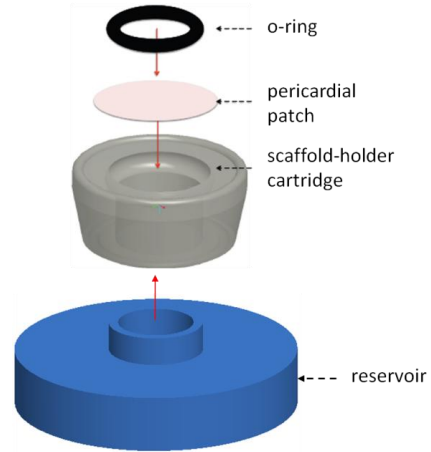


Figure 4: CAD model of the system components. The red arrows show how to assemble the different elements of the system.

Once assembled, the culture system containing the pericardium patch to be recellularized is placed in one of the wells of a 6-well plate, which allows to perform culture tests in sterile conditions inside an incubator (37°C, 5%CO₂), preventing tissue contamination while ensuring culture medium oxygenation.

Tissue decontamination protocol and sterility tests

A proper tissue decontamination protocol ensuring attainment and maintenance of sterile conditions in the culture system was defined, including: *i*) sterilization of the culture system elements, *ii*) definition of a decellularized pericardial tissue decontamination protocol, consisting in tissue incubation in BASE.128 (two

different incubation durations were considered, i.e., 24h and 72h), and *iii*) definition of a protocol for the placing of the decontaminated pericardium patch within the culture system, under sterile conditions. The procedures' efficiency were evaluated through the thioglycolate test, which consists in incubation (37°C for 7 days) of decontaminated tissues inside a tube containing thioglycolate; medium limpidity was checked daily: medium turbidity indicates bacterial contamination (positive test, Figure 5, right), on the contrary, the medium transparency after incubation indicates sterility of the sample (negative test, Figure 5, left).

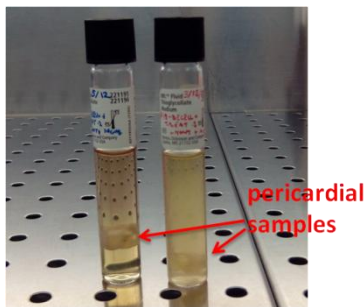


Figure 5: Thioglycolate test: comparison of the medium turbidity between a sterile sample (left, quite transparent) and a contaminated sample (right).

Pericardial acellular matrix recellularization

VICs were isolated by enzymatic digestion of porcine aortic valve leaflets. Before seeding experiments, cell expansion tests were carried out to assess the optimal seeding density allowing proper tissue repopulation. Afterwards, the cell seeding experiments were performed. In particular, two separate experiments were carried out by seeding, respectively, the fibrous and the serous

surface of pericardium. Furthermore, for each of the two seeded surfaces the influence of different culture conditions were analyzed, varying, selectively, *i*) the seeding density (0.6×10^3 cells/mm² vs. 3×10^3 cells/mm²), *ii*) the culture duration (24h vs. 72h).

Characterization of the recellularized tissue constructs

In order to assess the efficiency of the seeding protocol, as a function of the three different culture conditions we considered (surface seeding, seeding density, and duration of the culture), the recellularized constructs were analyzed through: *i*) MTT test; *ii*) histological staining with Haematoxylin&Eosin (H&E); *iii*) DAPI immunofluorescence combined with phase contrast images of the tissue. Those analyses were intended to assess VICs adhesion and distribution on the seeded surface and the repopulation of the inner sections of the pericardium patch.

Results

Characterization of the decellularization protocol

Figure 6 shows the histological trichrome Masson stainings of native and decellularized tissue samples.

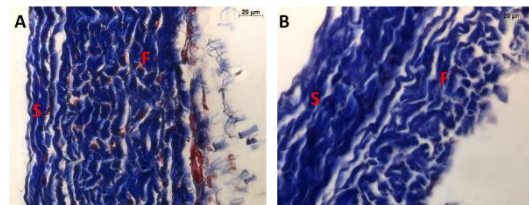


Figure 6: Histological analysis (Masson's trichrome) of native (A) and decellularized (B) pericardial tissue samples. S: serous surface F: fibrous surface. Blue: collagen fibers, Red: cellular nuclei.

The histological analysis of decellularized tissue sections (Figure 6B) allowed to verify the effective removal of cells: in fact, no cellular nuclei (red-colored nuclei are visible in native tissue, Figure 6A) were detected. In addition, through this histological staining it was possible to assess that the decellularization protocol allowed to preserve the ECM sovrastructure, as demonstrated by the maintenance of native-like structural integrity, compactness and distribution of collagen fibers (colored in blu) within the tissue.

Immunofluorescence analysis (Figure 7) confirmed the complete removal of cellular nuclei - no nuclei were detected in the decellularized tissue samples (Figure 7B) while blue-colored nuclei are visible in native tissue (Figure 7A) - and revealed the absence of cell expressing the species-dependent epitope α -gal following decellularization - in the decellularized tissue (Figure 7B) no green-colored were detected, which are visible in native tissue (Figure 7A).

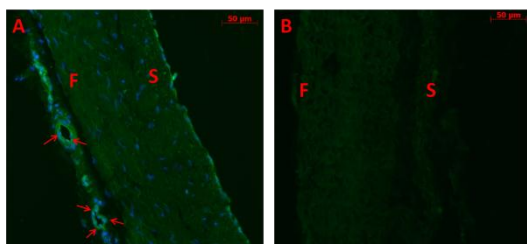


Figure 7: Immunofluorescence images of native (A) and decellularized (B) tissue. S: serous surface F: fibrous surface. Blue: cellular nuclei, Green: α -gal.

The comparison of the six parameters extracted from the uniaxial tensile loading tests showed no significant modification of decellularized tissue

mechanical performance compared to native tissue. In contrast, we observed an overall increased stiffness of GA-fixed tissue (ANOVA, $p < 0.05$).

Permeability tests (Figure 8) assessed that native tissue (N) and GA-fixed (GA) tissue were impermeable to fluid filtration: the pressure (P) increases linearly with the volume (V) delivered by the pump for the whole test duration.

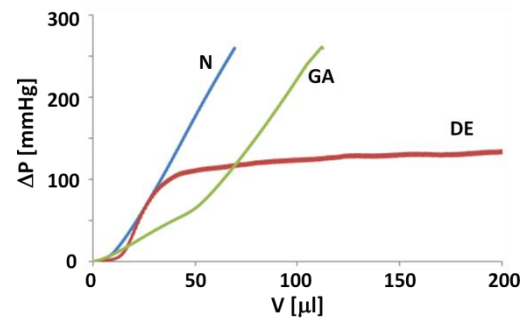


Figure 8: Representative P-V curves of native (N), decellularized (DE) and GA-fixed (GA) pericardial tissue; flow rate: 20 μ l/min.

On the other hand, the P-V curve of DE specimens revealed a different trend: DE pericardium did not respond with a sudden pressure rise as the native tissue did, rather exhibiting quasi-plateau behaviour. This occurrence is representative of filtration of the infused fluid, likely due to an increased permeability ($0.12 \pm 0.01 \mu$ l/min \cdot mmHg $^{-1}$) of DE tissue, as a consequence of the massive cell removal. This result clearly indicate the need of a tissue recellularization phase before its actual application for the manufacture of bioprosthetic heart valves leaflets: recellularization is intended to restore the impermeability properties that characterizes the native pericardium.

In addition, statistical analyses (ANOVA tests) on the four parameters extracted from P-V curves, showed that decellularized tissue retained native tissue distensibility properties ($p > 0.05$), unlike GA-fixed pericardium ($p < 0.05$).

Recellularization campaigns and characterization of the recellularized constructs

The tissue decontamination protocol, developed at the end of different tests evaluating sterility maintenance, is composed of a first incubation in BASE.128 for 72h, ensuring complete elimination of those bacteria present in the native tissue, which were not eliminated by decellularization. Furthermore, since the procedure for patch housing in the culture system is a potential source of new contamination and loss of sterility, we decided to perform a second tissue incubation in BASE. 128, for 24 hours, following the patch housing in the system.

Static seeding tests were then performed to select the most appropriate culture conditions (seeding surface, seeding density; culture time) promoting cell adhesion and optimizing scaffold repopulation.

From biological characterization of recellularized constructs, it was possible to state that the the most encouraging results were obtained culturing the VICs, seeded at a density of 3×10^3 cell/mm² on the serous pericardial surface, for 72h.

Figure 9 shows the results of MTT assay, H&E histological analysis and DAPI immunofluorescence analisis combined with phase contrast images of pericardial

acellular tissue samples seeded on the fibrous surface (Figure 9 A, C, E) and on the serous surface (Figure 9, B, D, F).

It is possible to observe how the serous surface favorably promotes VICs adhesion and proliferation, while the fibrous surface seems to inhibit the VICs adhesion, leading to cell death within 72h of culture.

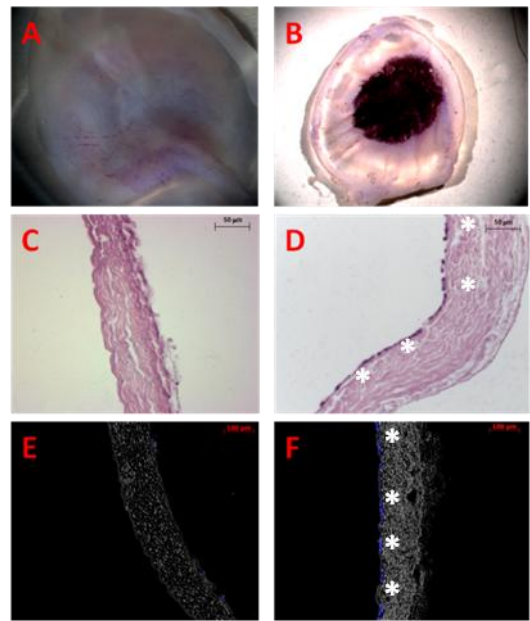


Figure 9: Biological characterization of acellular tissue samples seeded on fibrous (A, C, E, facing on left side of each image) and serous (B, D, F, facing on right side of each image) surface: MTT assay (A, B), H&E (C, D) and DAPI combined with phase contrast tissue images (E, F). Seeding density: 3×10^3 cells/mm²; culture time: 72 h. White asterisks (D, F) highlight cell nuclei clearly visible on the pericardial serous surface.

MTT images, although being a purely qualitative and preliminary analysis (quick and low-cost test) display an intense purple color indicating the presence of several live and adherent cells on the serous surface (Figure 9B), much more intense and uniform with respect to the fibrous surface (Figure 9A). This result is confirmed by histological

and immunofluorescence analyses showing, after a 72h culture period, a confluent monolayer of VICs uniformly distributed on the serous surface (Figure 9 D, F). In contrast, on the fibrous surface, VICs adhesion is weak and few isolated cells are still alive after 72h.

However, even when VICs were seeded on the serous surface, an effective and complete colonization of the tissue was not observed: the adherent cells, in fact, did not penetrate into the ECM inner layers. Probably, this may be due to a too short culture time, 72h, inadequate to allow VICs migration in the inner layers of the tissue.

Conclusions

Biological characterization of decellularized matrices showed complete removal of cells and of major xenogenic determinants (α -Gal), without severe deterioration of the structural and functional ECM proteins. In fact, mechanical characterization (uniaxial tensile tests and permeability /distensibility tests) showed no significant alteration of decellularized tissue mechanical performance compared to native tissue.

According to these results, the decellularization protocol adopted in this work represents a promising alternative to GA-fixing treatment for the production of bioprosthetic heart valves, allowing to overcome some of the limitations of GA treatment.

The cell culture system met all the specifications defined in the design stage. The defined procedures for obtaining and maintaining sterility (decellularized

pericardium decontamination and protocol for the housing of the decontaminated pericardium patch within the culture system, under sterile conditions) allowed to carry out pericardial patch recellularization experiments with the designed culture system without running into samples' loss of sterility, thus demonstrating their effectiveness.

Through biological characterization of recellularized constructs it was found that the pericardial serous surface promotes cell adhesion, proliferation and migration. In contrast, fibrous surface seems to inhibit cellular adhesion.

Even though preliminary, the results of static seeding tests may represent an encouraging starting point for the design of tissue-engineered functional pericardial tissue patches for bioprosthetic heart valves fabrication. To this purpose, future developments of this thesis should be considered, as: *i*) recellularization experiments using human VICs to assess the protocol applicability on human patients; *ii*) extension of the culture period (7, 14 and 21 days) to evaluate if the cells will be able to infiltrate the inner layers of the matrix and to colonize the tissue; *iii*) the introduction of a bioreactor piloting a dynamic conditioning phase, following the static culture, to facilitate colonization of the inner layers and new ECM synthesis, thus leading to the formation of functional tissue. This development requires a preliminary study aimed at the definition of the appropriate conditions of stimulation of the constructs.

Bibliography

1. Braga Braile, MV., et al., *In vitro properties and performance of glutaraldehyde-crosslinked bovine pericardial bioprostheses treated with glutamic acid*. Artificial organs, 2011. 35(5):p. 497-501.
2. Gilbert, T.W., et al., *Decellularization of tissues and organs*. Biomaterials, 2006; **27(19)**: p. 3675-83.
3. Crapo, P., et al., *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*. Biomaterials, 2011; 32: p. 3233-3243.
4. Galili, U., *The alpha-gal epitope (Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc-R)in xenotransplantation*. Biochimie, 2001; **83**: p. 557-563.
5. Vinci, M.C., et al., *Mechanical compliance and immunological compatibility of fixative-free decellularized/cryopreserved human pericardium*. PLoS ONE, 2013. **8(5)**: e64769.
6. Hulsmann, J., et al., *Transplantation material bovine pericardium: biomechanical and immunogenic characteristics after decellularization vs. glutaraldehyde fixing*. Xenotransplantation, 2012; **19**: p. 286-297.
7. Consolo, F., et al., *A dynamic distension protocol for whole-organ bladder decellularization: histological and biomechanical characterization of the acellular matrix*. J Tissue Eng Regen Med, 2013; doi: 10.1002/term.1767.

INTRODUZIONE

La Medicina Rigenerativa è una branca della medicina che si prefigge lo scopo di rigenerare organi o tessuti patologici sostituendoli con organi o porzioni di tessuto ricreati *ex vivo* e/o stimolando *in vivo* i meccanismi di riparazione dell'organismo. In determinate situazioni, essa rappresenta una valida alternativa agli approcci di medicina tradizionale come i trattamenti farmacologici e, soprattutto, il trapianto di organi [1]. Quest'ultimo, sebbene sia l'unico trattamento in grado di ripristinare totalmente le funzioni dell'organo patologico, presenta numerosi inconvenienti quali il rigetto, la necessità di una terapia immunosoppressiva e la scarsa disponibilità di organi in relazione ad una richiesta sempre crescente. Uno dei principali vantaggi della medicina rigenerativa è il poter impiegare, al fine di rigenerare l'organo/tessuto danneggiato, cellule autologhe (prelevate dal paziente stesso tramite biopsia), siano esse staminali o differenziate, superando così le problematiche legate al rigetto e alla terapia immunosoppressiva derivante dall'utilizzo di componente cellulare non autologa nel corpo del paziente. La medicina rigenerativa comprende diversi approcci terapeutici, anche molto diversi tra loro come la terapia cellulare, la terapia genica e l'ingegneria dei tessuti [1]. Il presente lavoro di tesi s'inserisce nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti, quindi si andrà ad analizzare più nello specifico questo ramo della medicina rigenerativa.

L'ingegneria dei tessuti (*tissue engineering*, TE) consiste nella fabbricazione, *in vitro*, di nuovi organi o porzioni di tessuto trapiantabili ottenuti dalla cultura e dalla semina di cellule - preferibilmente cellule autologhe del paziente - su appositi supporti (scaffold), in grado di favorire adesione, proliferazione e attività cellulare, con deposito di nuova matrice extracellulare (*extracellular matrix*, ECM) da parte delle cellule al fine di giungere alla formazione di tessuto funzionale ingegnerizzato da impiegarsi per la sostituzione di quello patologico, caratterizzato da funzionalità ridotta o totalmente compromessa. Si tratta quindi, per sua natura, di una disciplina multidisciplinare, in quanto si fonda su principi di biochimica, biologia, medicina, ingegneria, fisica e matematica, e considera diversi aspetti quali lo studio delle cellule staminali e lo sviluppo di materiali biocompatibili e biodegradabili, capaci di integrare molecole e cellule e rilasciare fattori di crescita. Negli ultimi vent'anni sono stati condotti molti studi per indagare quali siano, in funzione delle

diverse specifiche applicazioni, ovvero dei diversi tessuti da trattare, i materiali più adatti a svolgere il ruolo di scaffold, le tecniche più efficaci per coltivare le cellule al fine di garantirne la conservazione del fenotipo e l'attività in vitro, la tipologia cellulare più appropriata (cellule staminali *vs* cellule primarie) e i nutrienti che consentano di mantenerle vitali, ma anche (e soprattutto) per far sì che si integrino con il tessuto/organo del sito di trapianto e svolgano correttamente le loro funzioni. I primi tessuti ricostruiti in vitro e utilizzati a livello clinico sono stati l'epidermide [2] e gli altri epitelii stratificati. Interessanti progressi sono stati fatti anche per quanto riguarda l'ingegnerizzazione del tessuto osseo [3, 4]. Negli ultimi anni, a causa della forte incidenza delle patologie cardiovascolari, si studia con particolare interesse l'ingegnerizzazione del tessuto cardiaco, ed in particolare delle valvole cardiache, le cui disfunzioni sono tra le principali cause di morbidità e mortalità. Con riferimento alle protesi valvolari cardiache, a causa della scarsa durata e alle problematiche di rigetto relative alle protesi meccaniche e/o biologiche, è emersa la necessità di sviluppare un nuovo approccio al problema, ovvero quello di realizzare delle valvole cardiache ingegnerizzate, realizzate cioè tramite tecniche di TE. Numerosi studi sono stati condotti a riguardo, attraverso diversi approcci, soprattutto in termini di cellule con cui colonizzare il costrutto, supporti su cui seminarle (scaffolds sintetici *vs* matrici decellularizzate) e metodi di coltura del costrutto che ne consentano la sua funzionalizzazione (coltura statica *vs* dinamica).

Oggi giorno, il materiale "gold standard" utilizzato per la produzione dei lembi delle protesi valvolari per la sostituzione chirurgica della valvola patologica è il pericardio bovino trattato con glutaraldeide (GA). Tuttavia, le protesi ottenute tramite fissaggio in GA di tessuto pericardico sono inclini a elevata calcificazione a lungo termine dopo l'impianto nel paziente [5], che comporta un progressivo fallimento della protesi impiantata e la necessità di un re-intervento per la sua sostituzione. Per questo, sono stati condotti diversi studi al fine di trovare metodi di fabbricazione di protesi valvolari alternativi al fissaggio in GA, quali l'utilizzo di scaffold ottenuti mediante decellularizzazione di tessuti biologici.

Di recente introduzione nel campo dell'ingegnerizzazione delle valvole cardiache, le matrici decellularizzate hanno dimostrato di possedere numerosi vantaggi rispetto agli scaffold realizzati in materiali sintetici, quali la presenza di elementi biologici naturali (come proteine e fattori di crescita) tipiche del tessuto stesso e il mantenimento

dell'architettura tridimensionale nativa dell'ECM, aspetti che agevolano l'adesione e l'attività delle cellule che vi vengono seminate, permettendo così la formazione di nuovo tessuto generato grazie al deposito di nuova matrice. Tali peculiarità delle matrici decellularizzate (e successivamente ricellularizzate) favoriscono l'integrazione del tessuto ingegnerizzato con l'organismo ospite anche grazie alle proprietà meccaniche del tessuto decellularizzato stesso, analoghe a quelle del tessuto nativo. La decellularizzazione, inoltre, consente di rimuovere le componenti cellulari del tessuto responsabili della risposta infiammatoria e/o immunitaria dell'organismo ospite, garantendo quindi la possibilità di utilizzare anche tessuti biologici di origine animale per impianto sull'uomo in assenza di terapia immunosoppressiva [6].

Il presente lavoro di tesi, svolto presso il Laboratorio di Micro e Biofluidodinamica (μ BS Lab) del Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria del Politecnico di Milano in collaborazione con il Laboratorio di Ingegneria Tissutale Cardiovascolare del Centro Cardiologico Monzino, ha come obiettivo la definizione di un protocollo sperimentale volto alla realizzazione di porzioni di tessuto pericardico porcino, senza l'utilizzo di fissativi, per la produzione di bioprotesi valvolari. In particolare, le attività svolte nel corso di questa tesi hanno riguardato, principalmente, la:

- decellularizzazione di matrici biologiche di pericardio porcino
- caratterizzazione - meccanica e biologica - del tessuto pericardico decellularizzato, e confronto delle sue proprietà rispetto a quello nativo e a quello fissato, al fine di valutarne le potenzialità di utilizzo come scaffold per la produzione di valvole ingegnerizzate;
- progettazione e realizzazione di un sistema di supporto per la coltura delle cellule su pericardio decellularizzato tramite estrazione, proliferazione e semina di Valve Interstitial Cells (VICs) sulle matrici decellularizzate, così da ottenere porzioni circolari di pericardio ingegnerizzato, nella prospettiva futura di ottenimento di leaflet valvolari ingegnerizzati per la realizzazione di valvole cardiache bioprotesiche.
- caratterizzazione biologica dei costrutti cellularizzati, al fine di valutare l'efficacia della procedura di coltura progettata cellulare e funzionalizzazione del tessuto.

In accordo con gli obiettivi e le attività sopra dichiarati, si riporta la strutturazione del presente lavoro di tesi.

Nel *Capitolo 1* vengono introdotte brevemente le principali patologie delle valvole cardiache e i metodi di terapia tradizionali. In particolare, vengono descritte le tipologie di protesi utilizzate, in passato e ancora oggi, per la sostituzione della valvola patologica, classificandole in base alla natura dei materiali di cui sono composte ed evidenziandone, per ciascuna tipologia, pregi e difetti.

Nel *Capitolo 2* viene introdotta l'ingegneria tissutale delle valvole cardiache (TEHV) e viene riportata l'analisi dello stato dell'arte relativo a tale argomento. Dopo una breve panoramica generale sugli scaffold utilizzati nel campo della TE, sono discusse brevemente le principali tecniche di decellularizzazione dei tessuti biologici. Infine, vengono riportati i risultati presenti in letteratura riguardanti l'ottenimento e la caratterizzazione (meccanica e biologica) di matrici pericardiche, decellularizzate o fissate in GA, e i principali approcci per il ripopolamento degli scaffold.

Nel *Capitolo 3* sono descritte le metodologie e le procedure sperimentali utilizzate per l'ottenimento e la caratterizzazione di porzioni di pericardio porcino decellularizzato. In particolare vengono descritti i protocolli di decellularizzazione e caratterizzazione biologica del pericardio, svolti presso il Laboratorio di Ingegneria Tissutale Cardiovascolare del Centro Cardiologico Monzino, e quelli per la caratterizzazione meccanica, consistenti in prove di trazione monoassiale e prove di permeabilità, eseguite presso il μ BS Lab del Politecnico di Milano.

Nel *Capitolo 4* viene illustrata in dettaglio la progettazione delle varie fasi che hanno portato alla definizione del protocollo utilizzato per il ripopolamento cellulare degli scaffold di pericardio decellularizzato: dall'estrazione, proliferazione e coltura in vitro delle VICs alla sterilizzazione del tessuto, dalla realizzazione del sistema di montaggio alla procedura di semina.

Nel *Capitolo 5* vengono presentati e discussi tutti i risultati ottenuti nell'ambito del presente lavoro di tesi, sia per quanto riguarda il processo di decellularizzazione e caratterizzazione della matrice decellularizzata, sia per quanto riguarda la progettazione e

la realizzazione della procedura di ricellularizzazione. La presentazione dei risultati segue il percorso già descritto nei *Capitoli 3 e 4*.

Infine, vengono riportate le conclusioni cui il presente lavoro di tesi ha condotto e i potenziali sviluppi futuri di questo studio.

Capitolo 1

PATOLOGIE VALVOLARI CARDIACHE E TERAPIE TRADIZIONALI

1.1 Disfunzioni delle valvole cardiache

Le patologie cardiovascolari rappresentano oggi una delle principali cause di invalidità e mortalità in tutto il mondo. Si stima infatti che queste malattie abbiano un'incidenza media del 25%. Tra queste, le patologie che colpiscono le valvole cardiache mostrano un'incidenza del 2.5% sulla popolazione degli USA, con variazioni sensibili in base all'età dei soggetti: dallo 0.7% tra i 18 e i 44 anni al 13.3% sopra i 75 anni [7]. Per questo motivo, negli ultimi anni, la ricerca in ambito cardiovascolare si è mossa nella direzione di sviluppare tecniche e terapie innovative e maggiormente adatte a questo tipo di patologie, rispetto alle tecniche tradizionali.

Le valvole cardiache possono essere considerate dei veri e propri apparati: l'anomalia strutturale o l'alterazione della loro funzione può dare origine a diverse valvulopatie, in grado di compromettere il corretto funzionamento dell'intero organo cardiaco. Si definisce valvulopatia una malattia che colpisce una valvola cardiaca, e che può essere principalmente di due tipi:

1. **Stenosi:** la valvola, al suo massimo grado di apertura, presenta un orifizio di dimensioni minori di quello fisiologico. Il caso in cui questa patologia colpisce la valvola aortica è illustrato in Figura 1.1.

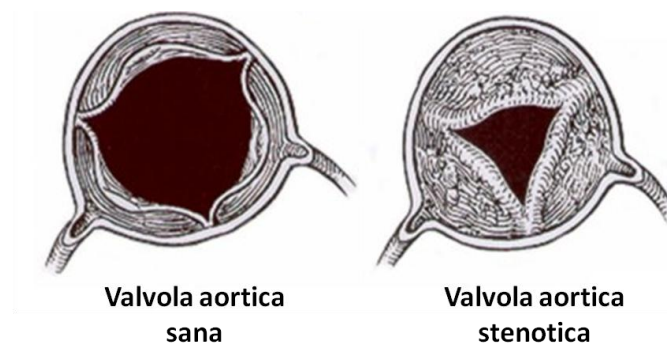


Figura 1.1: valvola aortica in fase di massima apertura: sana (sinistra) e stenotica (destra)

In tali condizioni il cuore, al fine di garantire la portata di sangue necessaria per il benessere fisiologico dell'organismo, deve fornire un'energia maggiore rispetto a quella richiesta in assenza di stenosi, e quindi produrre maggior lavoro. A tale scopo, le pareti del muscolo cardiaco subiscono modifiche strutturali in grado di consentire alle fibre che le compongono di aumentare opportunamente la pressione sistolica ventricolare. Ciò si traduce, però, in un ispessimento delle pareti (ipertrofia) e nella sfericizzazione del ventricolo. Superata una certa soglia, tuttavia, tale capacità di produrre maggior lavoro viene meno e subentrano lo scompenso cardiaco ed infine l'insufficienza cardiaca che può causare il decesso in breve tempo.

2. **Insufficienza:** in fase di chiusura, i lembi della valvola non si chiudono completamente. Questo provoca quindi la presenza di un orifizio residuo (Figura 1.2) che genera il fenomeno del reflusso ematico dalle arterie ai ventricoli (insufficienza delle valvole semilunari) oppure dai ventricoli agli atri (insufficienza delle valvole atrio-ventricolari).

La Figura 1.2 illustra una valvola aortica insufficiente.

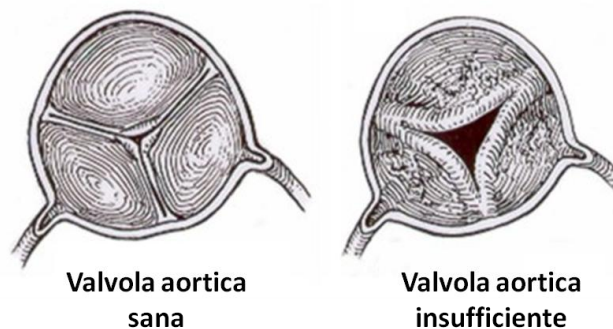


Figura 1.2: Valvola aortica in fase di chiusura: sana (sinistra) e insufficiente (destra)

La mancata chiusura è dovuta ad anomalie dei lembi o delle strutture ad essi collegate. Ad esempio nella valvola aortica, la dilatazione della radice aortica può provocare un allontanamento dei lembi, impedendone la perfetta adesione. Nel caso delle valvole atrio-ventricolari, invece, l'insufficienza può essere causata da un malfunzionamento delle capacità di tensione delle *chordae tendinae* che trattengono, così, i lembi. Nell'insufficienza aortica una parte del sangue torna al

ventricolo dopo che questo si è svuotato. Tale rigurgito causa un sovraccarico del ventricolo dovuto allo sforzo eccessivo compiuto dal cuore per sopperire al reflusso del sangue in direzione contraria a quella fisiologica. L'insufficienza causa così un aumento della pressione telediastolica, che raggiunge i valori di quella atriale sinistra, provocando la chiusura prematura della valvola mitrale.

Molto spesso stenosi e insufficienza coesistono sulla stessa valvola, causando così la cosiddetta **stenoinsufficienza**.

Le valvulopatie possono essere congenite, cioè presenti dalla nascita, o acquisite, comparse cioè nel corso della vita. La lesione valvolare congenita più frequente come causa di stenosi aortica è la bicuspidia in cui, invece di tre cuspidi, la valvola ne presenta soltanto due. Per quanto riguarda le lesioni acquisite, in passato, la causa più frequente era la febbre reumatica, conseguente ad un'infezione di origine streptococcica non curata tempestivamente (infiammazione alla gola, scarlattina, otite e altre). In realtà non è l'infezione batterica a causare il danno, ma la risposta immunitaria da parte dell'organismo che, nel tentativo di rispondere all'attacco della tossina streptococcica, danneggia anche i propri tessuti. Gli anticorpi attaccano le valvole, che vengono gradualmente degradate e sostituite da tessuto fibroso con una dinamica anche relativamente lunga (da mesi ad anni). Un'altra causa di degenerazione valvolare è l'endocardite, un'infezione, spesso da streptococco o stafilococco, che colpisce l'endocardio. È spesso dovuta ad infezioni non curate in altre parti dell'organismo; di solito si manifesta in pazienti con valvulopatie congenite, con valvole già danneggiate e in portatori di protesi valvolari. Le colonie di microrganismi che crescono sull'endocardio causano fori e distorcono la forma naturale delle valvole, compromettendone la funzionalità. Inoltre possono provocare la formazione di trombi ed emboli. Oggigiorno, probabilmente a causa del progressivo invecchiamento della popolazione nei paesi industrializzati, l'eziologia delle valvulopatie più frequenti è prevalentemente degenerativa (Tabella 1.1, [8]).

	Stenosi aortica (n = 1197)	Insufficienza aortica (n = 369)	Stenosi mitrale (n = 336)	Insufficienza mitrale (n = 877)
Degenerativa (%)	81.9	50.3	12.5	61.3
Reumatica (%)	11.2	15.2	85.4	14.2
Endocardite (%)	0.8	7.5	0.6	3.5
Infiammatoria (%)	0.1	4.1	0.0	0.8
Congenita (%)	5.4	15.2	0.6	4.8
Ischemica (%)	0.0	0.0	0.0	7.3
Altro (%)	0.6	7.7	0.9	8.1

Tabella 1.1: eziologia delle disfunzioni valvolari più frequenti [8].

Come riportato in Tabella 1.1, le disfunzioni colpiscono in misura maggiore le valvole del cuore sinistro (valvola aortica e valvola mitrale), probabilmente a causa delle maggiori sollecitazioni cui esso è sottoposto durante la propria attività.

Nei soggetti anziani le valvole possono essere colpite da degenerazione mixomatosa e da degenerazione calcifica. La prima è un processo dovuto ad una serie di alterazioni del metabolismo del soggetto e porta ad una progressiva perdita di elasticità della valvola che può causare la rottura dei legamenti che ne controllano l'apertura e la chiusura. La seconda, invece, consiste nel deposito di calcio sui lembi della valvola, che ne provoca la stenosi: può colpire, oltre alla valvola aortica, anche la mitrale che risulta indebolita e non più in grado di evitare il reflusso del sangue.

Un'altra patologia molto frequente, spesso associata alla degenerazione mixomatosa è il prolasso della valvola mitrale, che causa vari gradi di reflusso tra ventricolo e atrio (Figura 1.3). Nel caso in cui questa patologia interessi solo i lembi della valvola, l'operazione più frequente è la ricostruzione valvolare. Quando è invece l'intera struttura della valvola mitrale ad essere interessata da prolasso si ricorre alla sostituzione valvolare con una protesi meccanica o biologica.

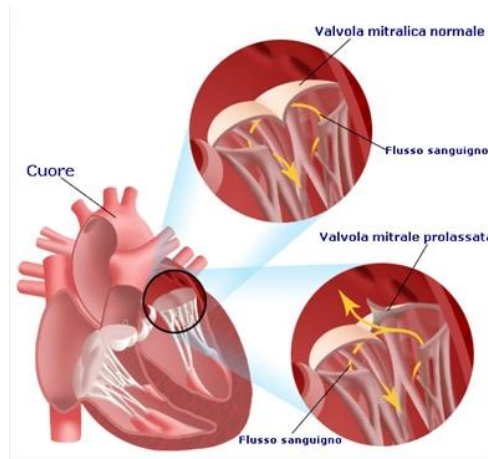


Figura 1.3: reflusso nel caso di prollasso mitralico

In Europa la stenosi aortica e l'insufficienza mitralica sono i due tipi più comuni di disfunzione valvolare [7]. In particolare, la stenosi aortica è la patologia per cui viene richiesta più comunemente una terapia, consistente nella sostituzione della valvola patologica con una protesi [8]. Per questo motivo, in questo capitolo ci si soffermerà sulla *sostituzione valvolare aortica*.

In alcuni casi, soprattutto in soggetti giovani, prima di ricorrere alla sostituzione valvolare si possono tentare terapie conservative come:

- valvuloplastica con palloncino: dilatazione della valvola stenotica effettuata con un catetere a palloncino;
- valvulotomia chirurgica: correzione chirurgica della stenosi di una valvola cardiaca, consistente nella rottura di concrescenze cicatriziali delle commissure mediante un divaricatore introdotto nella cavità cardiaca.

Queste tecniche, tuttavia, si rivelano spesso solamente palliative, richiedendo in seguito l'intervento di sostituzione della valvola stessa.

1.2 Sostituzione valvolare aortica

Nel trattamento chirurgico delle valvulopatie, la sostituzione della valvola aortica è di gran lunga l'intervento più frequente, tanto da rappresentare nell'anno 2009 il 67% di tutte le procedure di chirurgia valvolare [9]. Nella maggior parte dei casi, la sostituzione valvolare aortica è l'unico trattamento efficace per la stenosi aortica severa. L'intervento "classico"

di sostituzione valvolare viene eseguito a cuore aperto, in regime di circolazione extracorporea, condizione che prevede l'utilizzo del sistema cuore-polmone che si prende carico di pompare e ossigenare il sangue durante l'intervento. L'operazione di sostituzione valvolare, in questo regime, è poco più rischiosa di un bypass coronarico, in parte per il rischio d'infarto, in parte per la possibile formazione di microemboli gassosi (entrata di bolle d'aria nel circolo sanguigno), rischio associato del resto a tutte le operazioni a cuore aperto.

Tuttavia, in Europa, circa il 30% dei pazienti che presentano una stenosi aortica severa non sono candidabili a questo tipo di intervento, principalmente per due motivi: l'età avanzata e la presenza contemporanea di altre gravi patologie che aumentano le probabilità di fallimento dell'intervento [10]. Per questi pazienti è prevista una procedura chirurgica meno invasiva: l'impianto transcateretere della valvola aortica (transcatheter aortic valve implantation, TAVI). Fino ad oggi, più di 30mila protesi sono state impiantate seguendo questa procedura, applicabili secondo approcci classici (trans femorale) o alternativi (trans apicale, trans aortico o trans iliaco)[11]. Questa procedura non sostituisce la valvola danneggiata, in quanto la protesi (biologica) viene montata su uno stent, introdotta tramite catetere, e rilasciata in posizione aortica, dove aderisce saldamente alle pareti della radice aortica nativa, senza punti di sutura, dislocando lateralmente i lembi della valvola patologica.

Dal momento che la sostituzione valvolare aortica prevede l'uso di protesi valvolari, questo argomento verrà trattato in dettaglio nel paragrafo successivo.

1.3 Le protesi valvolari

Le protesi utilizzate per la sostituzione di una valvola patologica sono di diversi tipi:

- protesi meccaniche, costituite da materiali sintetici o non-biologici
- protesi biologiche (bioprotesi), costituite da tessuti biologici di altre specie
- homografts ed autografts, valvole provenienti rispettivamente da donatori della stessa specie o realizzate con tessuti prelevati dallo stesso individuo

Tutti i tipi di protesi valvolari cardiache sono accomunati dalla presenza, alla base della protesi, di una regione realizzata in "tessuto" che permette la sutura della protesi all'annulus valvolare nativo, a seguito della rimozione della valvola patologica. Le

caratteristiche per cui differiscono sono invece: la durata, il profilo emodinamico, il potenziale trombogenico e l'effettiva area dell'orifizio valvolare. Nel 1962 il chirurgo Dr. Harken stilò i criteri essenziali del sostituto valvolare ideale, validi anche nel caso di protesi derivate da ingegneria tissutale [12]:

- deve essere non ostruttivo e la sua chiusura deve essere tempestiva e completa
- deve essere costruito con tessuto vivente non trombogenico che duri per tutta la vita del paziente
- deve essere sottoposto a un processo di rimodellamento che faciliti lo stato funzionale omeostatico e la riparazione di danni accumulati durante la vita del paziente
- deve rimodellarsi e crescere con la crescita fisiologica del paziente

L'ultima caratteristica è particolarmente rilevante nelle sostituzioni valvolari pediatriche. Le protesi meccaniche e biologiche, infatti, non hanno la capacità di crescere, rimodellarsi e ripararsi a seguito della crescita fisiologica dei pazienti pediatrici. Inoltre, per questa fascia di popolazione, la terapia anticoagulante richiesta dalle valvole meccaniche è particolarmente pericolosa e i sostituti valvolari tissutali vanno incontro a un processo di calcificazione molto accelerato. Tutto questo porta alla necessità di continui reinterventi cardiocirurgici per la sostituzione della protesi. Nonostante i numerosi progressi fatti, attualmente, sia le protesi meccaniche che biologiche non posseggono tutte le caratteristiche di una valvola ottimale, in base ai criteri sopra enunciati. Di seguito, verranno approfondite le proprietà dei diversi tipi di protesi, evidenziandone pregi e difetti.

1.3.1 Protesi valvolari meccaniche

Tutte le protesi valvolari meccaniche (Mechanical Heart Valves, MHVs) sono costituite da tre componenti principali:

- un occlusore, che costituisce la parte mobile della protesi. Può essere di diverse forme: a sfera (nelle protesi Starr-Edwards), a disco oscillante (nelle protesi Bjork-Shiley) o a emidischi oscillanti. Questo elemento deve essere in grado di permettere l'apertura e la chiusura della valvola senza interferenze nei confronti dell'housing e di adattarsi alle differenze di pressione del flusso ematico

- Un housing, su cui è fissato l'occlusore
- Un anello di sutura, che rappresenta la base o il corpo della protesi. È il punto di congiunzione della protesi con l'annulus valvolare del paziente ed è realizzato in metallo o grafite rivestito con carbonio pirolitico.

Il movimento dell'occlusore sull'housing influenza notevolmente il flusso ematico. La protesi deve essere progettata in modo da minimizzare le turbolenze del flusso e, di conseguenza, minimizzare il lavoro compiuto dal cuore e la probabilità di formazione di trombi e di comparsa di fenomeni emolitici (danneggiamento dei globuli rossi). La maggior parte delle protesi valvolari meccaniche è progettata in modo da avere un minimo grado d'insufficienza (1-5%), in modo da consentire un flusso retrogrado di sangue che vada a rimuovere le proteine plasmatiche che aderiscono sui componenti protesici, e ridurre la formazione di trombi.

La prima valvola meccanica in commercio risale al 1960, a seguito dell'invenzione della macchina cuore-polmone. Prodotta dalla Starr-Edwards, la protesi caged-ball (Figura 1.4) era formata da un occlusore a sfera in gomma siliconica (Silastic), materiale in grado di attutire gli urti, e da una gabbia realizzata in Stellite 21, una lega composta da cobalto (61-63%), cromo (25.5 - 29%), molibdeno e nichel (1.75 - 3.75%).



Figura 1.4: Protesi caged-ball (Starr-Edwards)

Questo tipo di occlusore, trattato con solfato di bario per renderlo radio-opaco, genera un flusso ematico ai lati della sfera anziché centralmente come avviene in una valvola nativa: per questo, quando ci si riferisce alle protesi caged-ball, si parla di flusso periferico. A causa dei problemi di incremento del lavoro cardiaco e della caduta di pressione

transvalvolare, all'ingombro e al grande potenziale trombogenico ed emolitico di questo dispositivo, esso venne accantonato e rimpiazzato, a partire dal 1964, dalle valvole a singolo disco oscillante (single-tilting disc, Figura 1.5). Tuttavia i primi modelli realizzati in larga scala risalgono al 1969, ideati da Bjork e Shiley [13], e sono composti da un occlusore a disco con apertura a 60°.

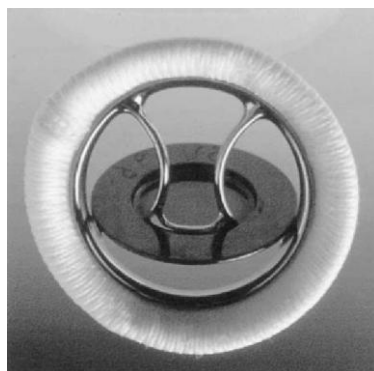


Figura 1.5: Protesi single-tilting disc (Bjork-Shiley)

L'innovazione principale introdotta nel modello a singolo disco oscillante è la riduzione della distorsione del flusso ematico rispetto al modello precedente: la pressione sanguigna fa ruotare l'occlusore circolare che consente al sangue di fluire centralmente. Il minor spessore di questa valvola rispetto alla caged-ball la rende adatta al posizionamento anche in cuori di dimensioni minori senza rischio che i tessuti vengano danneggiati. Negli anni sono stati sviluppati diversi modelli di protesi di questo tipo, con variazioni del grado di apertura e, soprattutto, dei materiali di cui è costituita, in particolare del materiale dell'occlusore. Si è infatti passati dal poliossimetilene (noto anche con il nome commerciale di Delrin) al carbonio pirolitico, ad oggi il materiale più utilizzato per le protesi meccaniche [14]. Questo perché i modelli in Delrin, nonostante la buona compatibilità e il basso potenziale trombogenico, hanno evidenziato casi di deformazione o cedimento strutturale dell'occlusore, con conseguente ritiro dal mercato della protesi. Il carbonio pirolitico possiede basso coefficiente d'attrito, che si traduce in minor rischio emolitico e riduzione delle turbolenze ed elevata resistenza all'usura. Inoltre, può essere depositato in strati molto sottili e viene considerato il miglior materiale antitrombogenico disponibile.

Nel 1977 la St. Jude Medical introdusse sul mercato il primo modello di valvola bileaflet (bileaflet-tilting disk, Figura 1.6), attualmente la tipologia di protesi meccanica più impiantata al mondo. E' costituita da due emidischi che fungono da occlusori che interferiscono minimamente col flusso sanguigno, rendendolo più simile a quello fisiologico.



Figura 1.6: Valvola bileaflet-tilting disc (St. Jude Medical Regent)

Nonostante le protesi meccaniche siano largamente utilizzate, grazie alla loro affidabilità, per la sostituzione valvolare, soprattutto in pazienti giovani o con un'aspettativa di vita superiore a 10-15 anni, presentano la necessità di una terapia anticoagulante a lungo termine, con il conseguente rischio elevato di complicazioni emorragiche. Inoltre, un difetto molto rilevante di questa tipologia di protesi valvolare rimane l'alterazione dell'emodinamica, come illustrato in Figura 1.7.

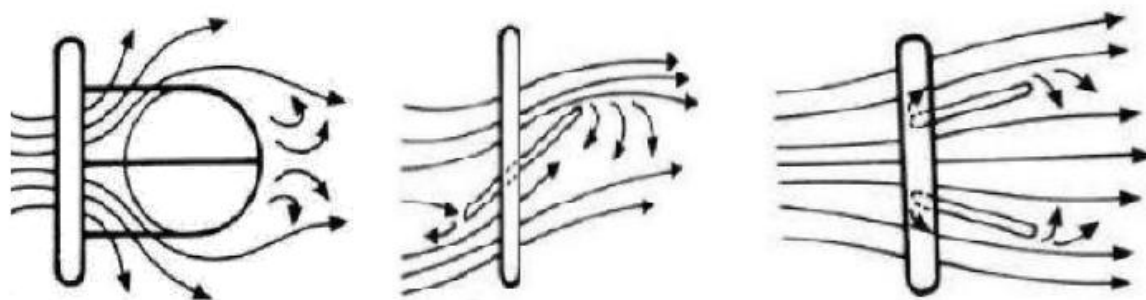


Figura 1.7: Schema del flusso ematico delle principali tipologie di protesi valvolari meccaniche: a sfera (sinistra), a disco oscillante (centro) e a emidischi oscillanti (destra).

L'emodinamica alterata può infatti causare emolisi e la formazione di zone di ristagno del sangue, con la conseguente formazione di trombi. Nel tentativo di superare queste problematiche, sono state sviluppate le protesi biologiche.

1.3.2 Protesi valvolari biologiche

Quando il paziente che necessita la sostituzione di una valvola danneggiata non può essere sottoposto ad una terapia anti-coagulante, si può ricorrere all'uso di protesi valvolari biologiche (Tissue Heart Valves, THVs). Il primo prodotto commerciale risale al 1963. Le THVs possono essere suddivise in:

- bioprotesi o xenografts, solitamente costituite da valvole aortiche porcine (Figura 1.8, sinistra) o valvole fabbricate con tessuto pericardico bovino (Figura 1.8, destra) trattato con GA, trattamento necessario per inibire la risposta immunologica del ricevente e per aumentare la resistenza meccanica del tessuto.



Figura 1.8: protesi biologica porcina (sinistra) e bovina (destra)

- valvole cardiache tissutali, rappresentate dagli homografts e dagli autografts. Gli homografts sono generalmente valvole aortiche o polmonari prelevate da cadaveri e opportunamente trattate per essere usate come protesi. Sono protesi con disponibilità limitata. Gli autografts, invece, sono valvole polmonari utilizzate per sostituire la valvola aortica patologica. La valvola polmonare utilizzata viene sostituita da un homograft polmonare, prelevato da cadavere. Questo approccio fu ideato da Ross, nel 1967 [15], ma venne presto accantonato a causa dell'inadeguata risposta del tessuto della valvola polmonare a stress meccanici, prevalentemente a lungo termine cui viene sottoposta nel sito aortico.

Le protesi biologiche sono tipicamente ottenute applicando il tessuto biologico che costituisce i lembi ad un supporto metallico (stent) che funge da sostegno del tessuto, e allo stesso tempo ne consente il corretto posizionamento in corrispondenza del sito di rilascio. Questo costrutto è in grado di mimare la struttura, la morfologia e le condizioni emodinamiche tipiche delle valvole native umane. Questo le rende maggiormente compatibili rispetto alle valvole meccaniche. Tuttavia, la presenza dello stent comporta alcune conseguenze indesiderate: la possibile ostruzione del flusso ematico da parte della struttura dello stent può causare maggiore frizione e turbolenza all'interno della valvola, compromettendone la durata e provocando stenosi residue, calcificazione e degenerazione. Per far fronte a questi problemi, sono state progettate valvole biologiche stentless (Figura 1.9) che esibiscono migliori proprietà emodinamiche.



Figura 1.9: Protesi biologica porcina stentless

Gli xenografts porcini costituiscono la maggior parte delle protesi biologiche utilizzate. Tuttavia, a causa dell'ingombro intrinseco della struttura valvolare, soprattutto delle valvole stented, la sezione di passaggio del flusso ematico è ridotta, con conseguente affaticamento del cuore.

Oltre alle protesi realizzate a partire da valvole porcine, negli ultimi 25 anni hanno trovato sempre più spazio le bioprotesi costituite da pericardio (bovino e suino) trattato con GA. Di questa tipologia di xenografts si parlerà in maniera più approfondita nel paragrafo successivo.

1.3.3 Protesi pericardiche

Prima di andare a descrivere questo tipo di protesi, verrà introdotta brevemente l'anatomia del materiale con cui esse sono realizzate, il pericardio, dal momento che rappresenta anche il tessuto utilizzato nelle attività svolte nel presente lavoro di tesi.

Il pericardio (Figura 1.10) è un sacco fibroso che avvolge il cuore e lo sostiene all'interno del mediastino ed inguaina i tratti iniziali del tronco polmonare e dell'aorta, come pure le terminazioni delle vene cave (craniale/superiore e caudale/inferiore) e delle vene polmonari. La forma e le dimensioni del pericardio corrispondono a quelle del cuore, che si sposta liberamente al suo interno coerentemente con i cambiamenti volumetrici sistodiastolici. Si distinguono due tipi di pericardio:

- il **pericardio sieroso**, un sacco chiuso che circonda il cuore, in cui si distinguono 2 foglietti: uno parietale e uno viscerale. Il foglietto parietale (Lamina Parietalis) è molto sottile e tappezza la superficie interna del pericardio fibroso, da cui non può essere staccato. È costituito da cellule mesoteliali piatte o cubiche, sostenute da un sottile strato di tessuto connettivo ricco di fibre di collagene e di fibre elastiche, in continuità con il tessuto proprio del pericardio fibroso. Il foglietto viscerale (Lamina Visceralis) è l'epicardio, che riveste esternamente il miocardio ed è formato da un unico strato di cellule mesoteliali isoprismatiche o appiattite su un sottile strato di tessuto connettivo. Tra i due foglietti è presente una cavità (Cavum Pericardii) contenente una piccola quantità di liquido pericardico (da 2 a 3 ml nell'uomo), che permette il libero scorrimento dei foglietti, l'uno rispetto all'altro. Abitualmente, il liquido pericardico è chiaro, trasparente (o leggermente citrino) e viscoso. È al tempo stesso prodotto e riassorbito dal mesotelio del pericardio sieroso.
- il **pericardio fibroso**, un sacco sottile, ma resistente e inestensibile, la cui forma riproduce praticamente quella del cuore. Il suo colore è biancastro o madreperlaceo. La superficie interna di questa lamina fibrosa è in continuità con lo strato di sostegno della lamina parietale del pericardio sieroso, dal quale non può essere separata. Al contrario, la sua faccia esterna è rivestita da epipericardio ed è unita alla lamina mediastinica della pleura, mediante un sottile strato di tessuto connettivo lasso, che in certi punti diviene adiposo, permettendone così la separazione tramite dissezione.

Il foglietto parietale del pericardio sieroso, il pericardio fibroso e l'epipericardio, insieme, formano il cosiddetto pericardio parietale [16], mostrato in dettaglio in Figura 1.10B.

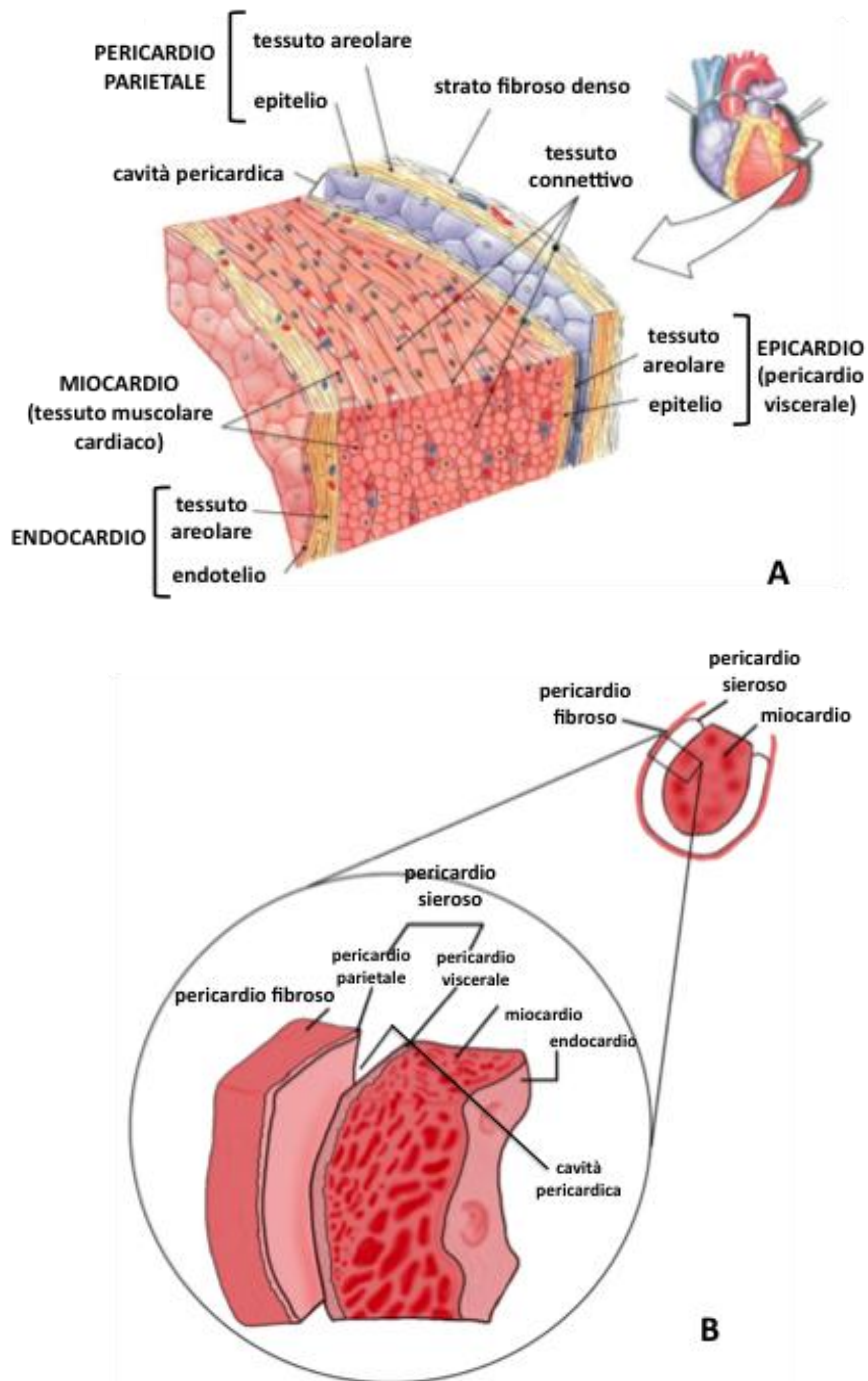


Figura 1.10: (A) Schema dell'anatomia della parete del cuore: si distinguono 3 strati *i*) epicardio (pericardio viscerale), *ii*) miocardio (muscolo cardiaco) ed *iii*) endocardio. (B) Dettaglio anatomico dell'epicardio (epicardio viscerale) in cui è possibile visualizzare lo strato fibroso e quello sieroso.

Spesso ci si riferisce al pericardio parietale con il termine “pericardio”, anche se quest'ultimo comprenderebbe più propriamente anche il foglietto viscerale sieroso (l'epicardio). Fatto questo chiarimento, d'ora in poi useremo il termine “pericardio” per riferirci al solo pericardio parietale.

La prima generazione di bioprotesi realizzate a partire da tessuto pericardico fissato in GA (le valvole Ionescu-Shiley) è andata incontro a fallimenti dovuti a rottura dei lembi valvolari. Per questo fu ritirata dal mercato a metà degli anni '80. La seconda generazione di bioprotesi pericardiche (le Carpentier-Edwards Perimount) ha un'emodinamica paragonabile alle valvole stentless ed è stata a lungo considerata la migliore bioprotesi, mostrando una durata superiore a 17 anni. Tuttavia, sebbene in tempi più lunghi, anche questa generazione di protesi va incontro a degenerazione, principalmente per mineralizzazione delle cuspidi dei foglietti. Attualmente, le protesi utilizzate per la sostituzione valvolare aortica sono le Ionescu-Shiley standard e low-profile, le CE Perimount, le Mitraflow e le Sorin Pericarbon (Figura 1.11).



Figura 1.11: protesi biologiche pericardiche, Ionescu-Shiley standard (sinistra), Magna Ease Carpentier-Edwards Perimount (centro), Sorin Mitraflow (destra).

Il recente avvento della tecnica chirurgica mini-invasiva della TAVI ha richiesto protesi con un disegno diverso. Ci sono 2 dispositivi impiantati ad oggi in Europa, approvati con marchio CE nel 2007, con la tecnica appena citata:

- la Edwards SAPIEN tissue heart valve (Edwards Lifescience, Irvine, California, USA), una protesi espandibile con pallone, formata da uno stent cilindrico in acciaio inossidabile a cui sono attaccati i lembi in pericardio, inizialmente equino (Cribier-Edwards) e attualmente in pericardio bovino (Edwards-Sapien). La protesi è fissata in GA. (Figura 1.12, sinistra)

- il CoreValve ReValving System (Medtronic, Minneapolis, USA), una bioprotesi con 3 lembi in pericardio suturati su uno stent in nitinolo autoespandibile. (Figura 1.12, destra)

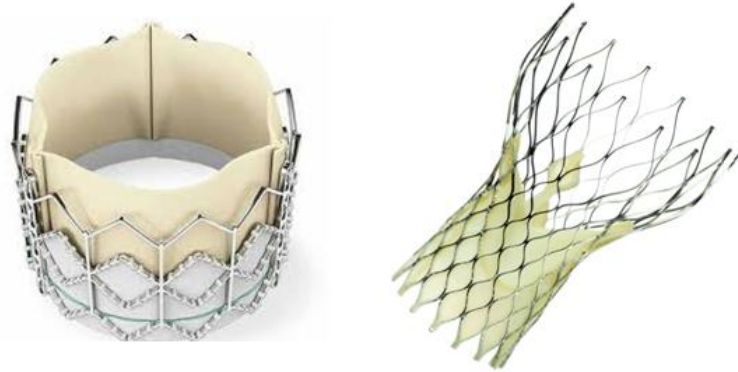


Figura 1.12: Edwards SAPIEN tissue heart valve (sinistra) e CoreValve ReValving System (destra)

Riassumendo, i principali vantaggi delle protesi biologiche, siano esse realizzate tramite valvole porcine o tramite tessuto pericardico, sono la miglior emodinamica e il minor potenziale trombogenico, rispetto alle protesi valvolari meccaniche. Questo tipo di valvole, inoltre, non richiede la terapia anticoagulante a vita, ma solamente per i primi 3-6 mesi successivi all'intervento di sostituzione valvolare. I principali limiti sono invece rappresentati dal deterioramento protesico, di cui si discuterà in dettaglio nel paragrafo successivo.

1.4 Degenerazione delle protesi valvolari biologiche

La durata media delle valvole biologiche, si aggira attorno ai 10-15 anni: processi degenerativi possono infatti insorgere a causa delle reticolazioni chimiche che avvengono a causa del fissaggio del tessuto. La reticolazione è spesso ottenuta utilizzando GA: reagente chimico non costoso, solubile in acqua, in grado di produrre reticolazioni stabili. I dettagli del protocollo di fissazione con GA, in particolare quello utilizzato nel presente lavoro di tesi e mutuato dal protocollo pubblicato da *Hulsmann et al.* [73] verrà descritto nel Capitolo 3 (*Paragrafo 3.2*).

Il lento rilascio di GA, presente nella matrice dopo il trattamento, può causare severi problemi: citotossicità, risposta infiammatoria, calcificazione. Inoltre impedisce la ri-

endotelizzazione del tessuto ostacolando l'integrazione del dispositivo con l'organismo ricevente [5].

Due sono i principali meccanismi, potenzialmente sinergici, che causano il deterioramento strutturale delle bioprotesi: la calcificazione e la degradazione non calcifica dell'ECM.

1.4.1 Calcificazione

Il processo di calcificazione avviene a livello dei lembi valvolari, con il deposito di minerali di fosfato di calcio (nucleazione) sulle cuspidi. Questi depositi calcifici (Figura 1.13) possono espandersi fino alla formazione di noduli mineralizzati visibili macroscopicamente. L'accrescimento dei nuclei di fosfato di calcio procede più o meno velocemente a seconda delle concentrazioni di calcio e di fosfato presente nel sangue del paziente e in funzione del bilancio tra acceleratori e inibitori della mineralizzazione. Infatti, la calcificazione è più rapida nei pazienti giovani, in cui il metabolismo di calcio e fosfato è accelerato. I depositi di calcio seguono la direzione delle fibre di collagene del tessuto e si concentrano nei siti di più intenso stress meccanico, quali le commissure. L'irrigidimento dei lembi provoca il malfunzionamento della protesi [17]. Il trattamento con GA sembra accelerare il processo di calcificazione [18] perché modifica la capacità delle cellule valvolari (Valve Interstitial Cells, VICs) non vitali di espellere gli ioni calcio. Per tale motivo, sono state messe a punto molte valvole pre-trattate con anticalcificanti. [19,20]

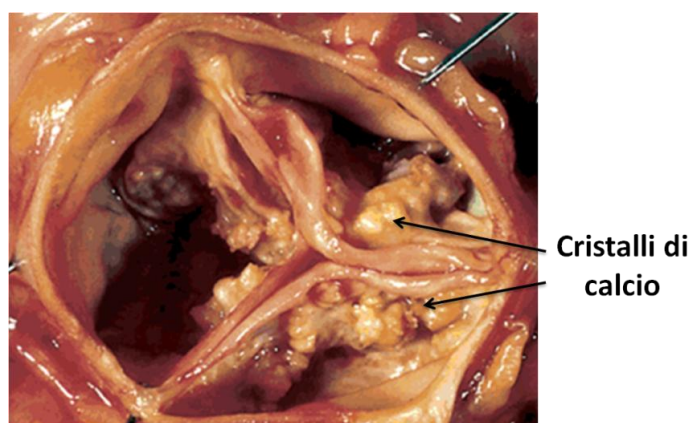


Figura 1.13: un esempio di valvola aortica calcifica

1.4.2 Degradazione non calcifica

La degradazione dell'ECM avviene a causa del trattamento con GA, che fissa il collagene e devitalizza le cellule (VICs nel caso delle bioprotesi porcine e fibroblasti nel caso delle protesi pericardiche), rendendo impossibile il rimodellamento e la riparazione di eventuali danni dell'ECM causati dagli stress meccanici a carico della valvola. Inoltre, il fissaggio delle fibre di collagene impedisce i naturali meccanismi di “riarrangiamento” della matrice delle cuspidi, che accompagnano il normale funzionamento valvolare [21, 22]. Di conseguenza, durante la chiusura e apertura della bioprotesi fissata, lo stress meccanico determina la progressiva rottura delle fibre di collagene e la deformazione delle cuspidi. Questo effetto può essere ancora più grave nelle protesi pericardiche, a causa dello spessore dei lembi di pericardio, 0.25 mm, inferiore rispetto a quello delle bioprotesi porcine, 0.40 mm.

Nella prospettiva di superare i limiti delle protesi valvolari meccaniche e biologiche discussi in questo capitolo, particolarmente promettenti sono le proprietà delle valvole cardiache costruite mediante le nuove tecniche di ingegneria tessutale, argomento trattato nel capitolo successivo.

Capitolo 2

INGEGNERIA TISSUTALE DELLE VALVOLE CARDIACHE: STATO DELL'ARTE

2.1 Ingegneria tissutale delle valvole cardiache

In considerazione dei limiti delle protesi valvolari meccaniche e di quelle biologiche, di cui si è discusso nel capitolo precedente, di recente si è fatto ricorso a tecniche d'ingegneria tissutale (*tissue engineering*, TE) per produrre valvole completamente biologiche, autologhe e dotate di una componente cellulare vitale, in grado quindi di rimodellare il tessuto in risposta agli stress meccanici durante l'utilizzo *in vivo*, con caratteristiche funzionali proprie dei tessuti nativi. L'aspetto più significativo dell'impiego di queste tecniche è la possibilità di utilizzare cellule prelevate dallo stesso paziente, eliminando la necessità di trattamento immunosoppressivo del paziente stesso. L'obiettivo finale e i principali requisiti della TE sono già stati definiti nel capitolo introduttivo del presente lavoro di tesi. Nel caso dell'ingegneria tissutale delle valvole cardiache (Tissue Engineering of Heart Valve, TEHV, Figura 2.1), questi requisiti includono:

- caratteristiche meccaniche adeguate in grado, cioè, di sopportare le sollecitazioni meccaniche e il regime pressorio cui sono sottoposte;
- adeguato grado di maturazione dell'ECM;
- proprietà emodinamiche appropriate;
- inibizione di reazioni infiammatorie/immunogeniche.

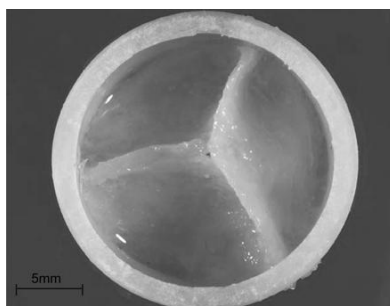


Figura 2.1: Esempio di TEHV, ottenuto mediante semina di uno scaffold biodegradabile sintetico con cellule staminali mesenchimali provenienti da cordone ombelicale umano. Il costrutto è stato condizionato in bioreattore per 21 giorni [30].

L'approccio "classico" della TE, applicato alla realizzazione di valvole cardiache bioprotesiche (Figura 2.2), prevede:

- la costruzione di un supporto (scaffold, biologico o sintetico) sul quale far aderire le cellule;
- il prelievo e l'espansione in coltura delle cellule del paziente;
- la semina delle cellule sullo scaffold;
- il condizionamento (ad esempio in un bioreattore) al fine di funzionalizzare il costruito;
- l'intervento chirurgico di sostituzione della valvola patologica del paziente con la valvola ingegnerizzata.

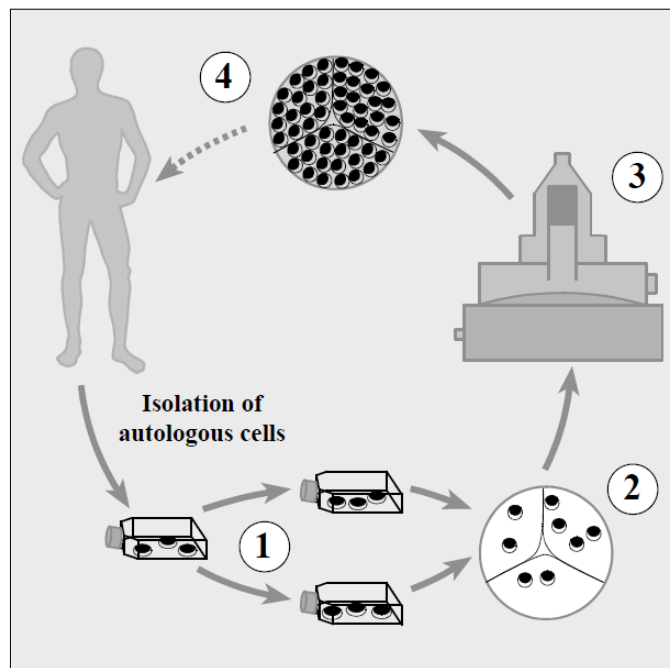


Figura 2.2: Fabbricazione di TEHV con cellule autologhe del paziente. (1) isolamento ed espansione di cellule autologhe da donatore; (2) semina su scaffold tri-dimensionali; (3) condizionamento del costruito in un bioreattore; (4) impianto nel paziente. [37]

Alcune applicazioni di TE di recente sviluppo prevedono di poter superare alcuni di questi steps. Ad esempio è stata studiata la possibilità di realizzare TEHV utilizzando strati cellulari senza supporto [23] o viceversa impiantando scaffold privi di cellule, concepiti per essere ripopolati in vivo dalle cellule del paziente [24]. In quest'ultimo caso si parla di TE in situ in cui la formazione di tessuto avviene all'interno del corpo umano, tramite

l'inserimento dello scaffold "nudo", che induca una sorta di "guarigione endogena" grazie alla funzionalizzazione con molecole specifiche che favoriscano il reclutamento cellulare [25]. La formazione di nuovo tessuto, sia in vitro che in situ, consiste di 4 fasi principali:

1. migrazione, proliferazione e differenziamento cellulare
2. produzione di nuova ECM da parte delle cellule
3. degradazione dello scaffold in-vivo
4. rimodellamento e potenziale crescita del tessuto

Lo scaffold funge quindi da matrice di supporto temporaneo per le cellule, dando loro la possibilità di crescere e proliferare fino a giungere alla produzione di nuova ECM. Per tale motivo, lo scaffold, sia esso biologico o sintetico, deve soddisfare alcuni requisiti fondamentali, di cui si parlerà nel prossimo paragrafo.

2.1.1 Scaffold per l'ingegneria tissutale delle valvole cardiache

Come anticipato, la presenza di un substrato in grado di supportare l'attività delle cellule di ricostruzione tissutale è di fondamentale importanza. Per questo motivo, gli scaffold, siano essi biologici o sintetici, devono possedere [26]:

1. adeguate proprietà meccaniche, in grado di sostenere le condizioni dinamiche del sito di impianto per tutta la vita del paziente. In particolare, deve poter garantire una chiusura ermetica durante la fase diastolica del ciclo cardiaco, non causando, cioè, reflusso. In fase di apertura, quindi durante la fase sistolica, deve invece garantire un'adeguata sezione di passaggio al sangue, senza alterazioni emodinamiche del flusso, ossia non indurre stenosi;
2. un'architettura simile a quella della valvola nativa, dato che l'orientamento delle fibre di collagene ed elastina influenza fortemente le proprietà meccaniche del costruito così come la funzionalità cellulare;
3. proprietà superficiali il più simili possibile a quelle della membrana basale della valvola nativa necessaria per lo sviluppo di uno strato confluyente di cellule endoteliali;

4. capacità di rimodellamento, con una dinamica di degradazione comparabile a quella della sintesi dell'ECM *in vivo*;
5. capacità di favorire l'adesione, la proliferazione e la differenziazione fenotipica delle Valve Interstitial Cells (VICs) o di qualsiasi altra tipologia cellulare utilizzata, così da garantire un corretto ripopolamento cellulare dello scaffold e giungere alla maturazione e alla funzionalizzazione del costruito;
6. capacità antitrombogeniche e non immunogeniche.

È possibile classificare gli scaffold utilizzati in TEHV in base alla loro natura: sintetica o biologica.

2.1.1.1 Scaffold di origine sintetica

Polimeri sintetici biodegradabili quali acido poliglicolico (PGA) [27], acido polilattico (PLA) [28], e copolimeri di PGA e PLA (PGLA) [29] sono stati studiati come possibili matrici di supporto per l'ingegnerizzazione del tessuto valvolare. Purtroppo tutti questi materiali, appartenenti alla classe dei poliesteri alifatici, presentano varie limitazioni tra cui proprietà meccaniche inadeguate (eccessiva rigidità e scarsa flessibilità) che rendono difficoltosa la realizzazione di scaffold che riproducano le funzionalità di una valvola cardiaca nativa [30].

In alternativa, è stata studiata una famiglia differente di poliesteri, i poliidrossialcanoati (PHAs), costituiti dagli idrossiacidi prodotti da vari batteri [31]. Questa generazione di biomateriali, comprendente il poliidrossiottanoato [32,33] e il poli-4-idrossibutirato (P4HB) [33,34], mostra però una dinamica di degradazione troppo lenta. Già nel 2000 *Hoerstrup et al.* [35] provarono a utilizzare il PGA rivestito di P4HB per la realizzazione di valvole trileaflet (Figura 2.3). La combinazione dell'alta porosità del PGA e delle proprietà termoplastiche del P4HB hanno permesso di ottenere risultati interessanti, tanto che questo materiale venne utilizzato in studi successivi da Rabkin [36]. Lo stesso Hoerstrup, nel 2005, seminò tali scaffold con cellule staminali mesenchimali (Mesenchymal Stem Cells) e, a seguito del condizionamento in un bioreattore (Figura 2.3, in alto) che mimasse le condizioni di flusso pulsatile cui è sottoposta una valvola *in vivo*, ottenne TEHV con proprietà meccaniche paragonabili a quelle del tessuto delle valvole semilunari native (Figura 2.3, in basso a destra) [37].

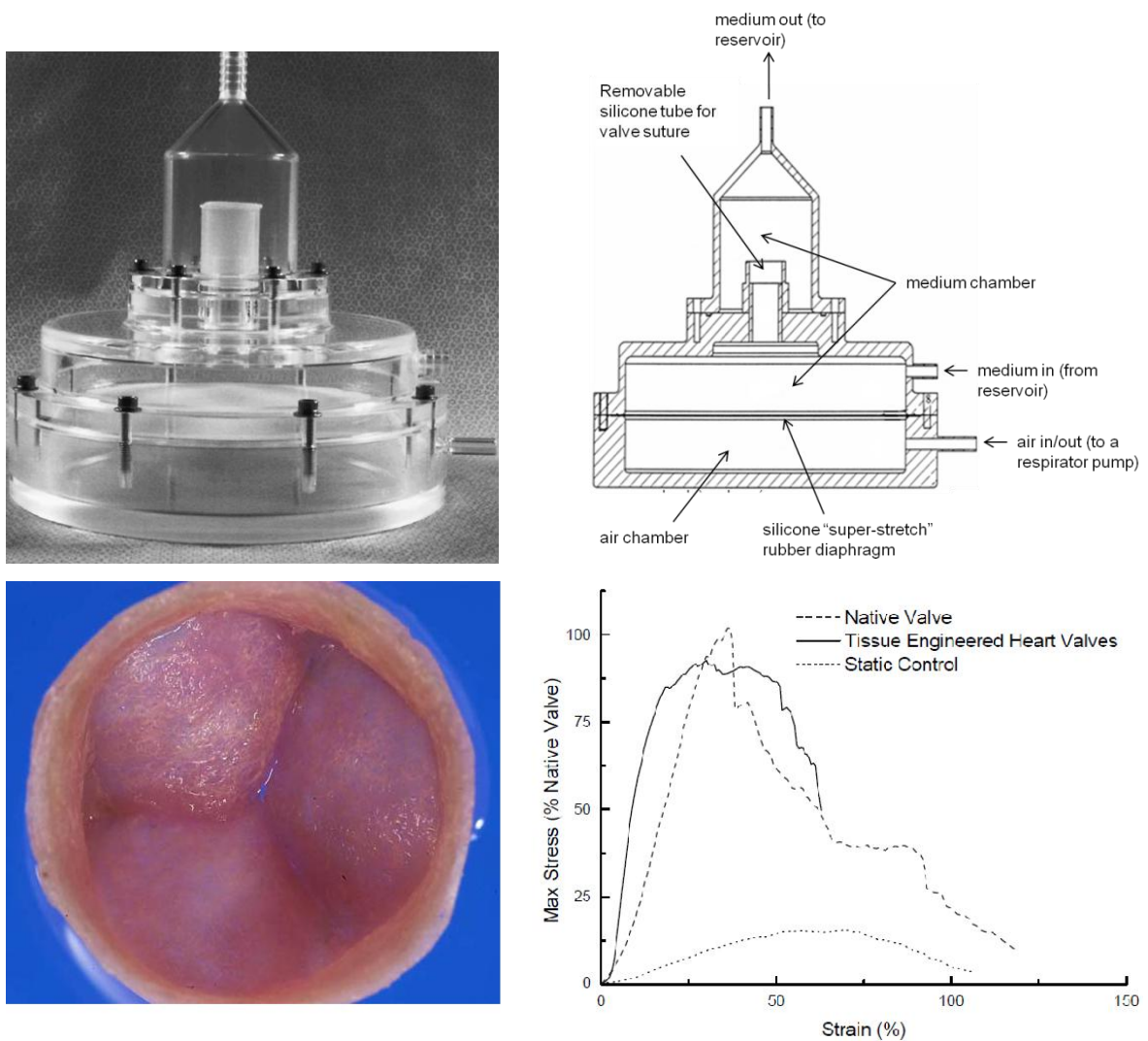


Figura 2.3: In alto: il bioreattore utilizzato per simulare le condizioni di flusso pulsatile (sinistra), e relativo schema di funzionamento (destra). In basso: a sinistra, TEHV ottenuta seminando cellule staminali mesenchimali su uno scaffold in P4HB, dopo 14 giorni di condizionamento in bioreattore; a destra, confronto delle proprietà meccaniche del tessuto delle valvole semilunari native, TEHV e scaffold seminato senza condizionamento in bioreattore (static control), in test di trazione monoassiale [37].

Nonostante qualche risultato interessante, come quello appena illustrato, sia stato conseguito, gli scaffold di origine sintetica hanno fallito come sostituti dei lembi valvolari *in vivo*, non tanto a causa di fenomeni tromboembolici ma come conseguenza dello stress meccanico subito dal materiale, correlato a microfratture, e accumulo di proteine plasmatiche e conseguente mineralizzazione [38]. Per questo motivo, le matrici biologiche fissate in GA hanno dominato l'ingegneria dei tessuti delle valvole cardiache.

2.1.1.2 Scaffold di origine biologica

I supporti di origine biologica si dividono in:

- scaffold di origine valvolare (allograft o xenograft)
- scaffold di origine non valvolare

Studi interessanti sono stati effettuati, in passato, nella TEHV a partire da scaffold di origine valvolare. Infatti nel 2001 *Zeltiger et al.* [39] mostrarono come valvole aortiche porcine decellularizzate (i dettagli della procedura di decellularizzazione verranno presentati nei paragrafi successivi del presente capitolo) potessero fungere con successo da supporto per l'adesione e la migrazione di fibroblasti (Figura 2.4), sia in condizioni di coltura statiche che dinamiche (flusso di mezzo di coltura tramite un bioreattore pneumatico, per 24h). Risultati comparabili erano stati ottenuti già in precedenza da *Bader et al.* [40], ma con cellule endoteliali umane di origine vascolare (human Vascular Endothelial Cells, hVECs).

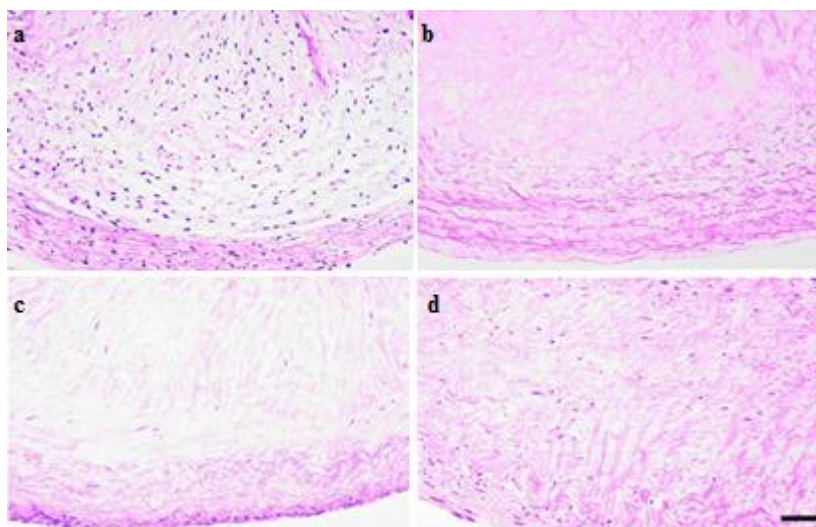


Figura 2.4: Sezioni istologiche (colorazione in Ematossilina & Eosina) di leaflet valvolari aortici porcini. (a) nativo; (b) decellularizzato; seminato con fibroblasti, dopo 4 (c) e 8 (d) giorni di coltura dinamica.

Tuttavia, oggi, l'ingegneria tissutale delle valvole cardiache è sempre più orientata verso l'utilizzo, per la ricostruzione valvolare, di scaffold biologici di origine non valvolare, in particolare il pericardio. Il primo esempio di TEHV fabbricata utilizzando tessuto pericardico è probabilmente quello dello studio di *Leukauf et al.* [41], un gruppo di ricercatori dell'università di Vienna che presentò, nel 1991, il proprio successo nell'indurre

la crescita di endotelio su pericardio bovino fissato con GA. Questo lavoro dimostrò che il trattamento, prima della semina, con acido glutammico, agente in grado di inattivare i residui aldeidici presenti nel tessuto fissato con GA, permetteva l'adesione, la proliferazione e la crescita cellulare.

L'utilizzo del pericardio umano in TEHV mostra alcuni indiscutibili vantaggi: è un materiale "a basso costo" e che non stimola la risposta immunitaria del corpo ospite in quanto viene riconosciuto come *self*, evitando così la necessità di terapia immunosoppressiva [42]. Tuttavia, la scarsa disponibilità di tessuto pericardico di origine umana ha richiesto dunque un'alternativa [43].

Si è dunque pensato all'utilizzo di pericardio xenogenico (bovino, porcino, ovino): il più utilizzato, ad oggi, in TEHV è il pericardio bovino. Sebbene questo tessuto presenti molti vantaggi, un fattore da tenere in forte considerazione è la sua intrinseca eterogeneità. Infatti, anche se macroscopicamente il tessuto può apparire omogeneo, risulta invece eterogeneo a livello istologico e biochimico, probabilmente a causa della diversa distribuzione di sollecitazione meccanica cui le varie porzioni del tessuto sono sottoposte *in vivo* [44]. Questa variabilità ha reso la caratterizzazione meccanica di questo tessuto (argomento trattato successivamente in questo lavoro di tesi) fondamentale per il suo utilizzo nell'ambito della TE. Per la produzione di TEHVs, è infatti importante selezionare le aree del pericardio caratterizzate da struttura e proprietà meccaniche il più omogenee possibile. Le porzioni ideali sono quelle a spessore uniforme, con una limitata variabilità dell'orientamento delle fibre di collagene dell'ECM, un quantitativo di tessuto adiposo trascurabile e una superficie sufficientemente ampia da poterne ricavare uno o più lembi valvolari.

La rimozione della componente cellulare degli xenografts è un'operazione fondamentale per la realizzazione di tessuti ingegnerizzati con tessuto biologico animale, senza la quale si genererebbe una rapida reazione di rigetto del tessuto, nota con il nome di rigetto iperacuto. Attualmente nelle bioprotesi utilizzate, la neutralizzazione degli antigeni specie-specifici (α 1-3 galattosio, o α -gal) che causano questa reazione, è perseguita tramite il trattamento con GA. Tuttavia, in un lavoro del 2005, *Konakci et al.* [45] hanno dimostrato la presenza dell'epitopo α -Gal (Figura 2.5) su alcune bioprotesi disponibili in commercio,

nonostante il fissaggio in GA, in grado di stimolare la risposta del sistema immunitario dei pazienti in cui la protesi era impiantata.

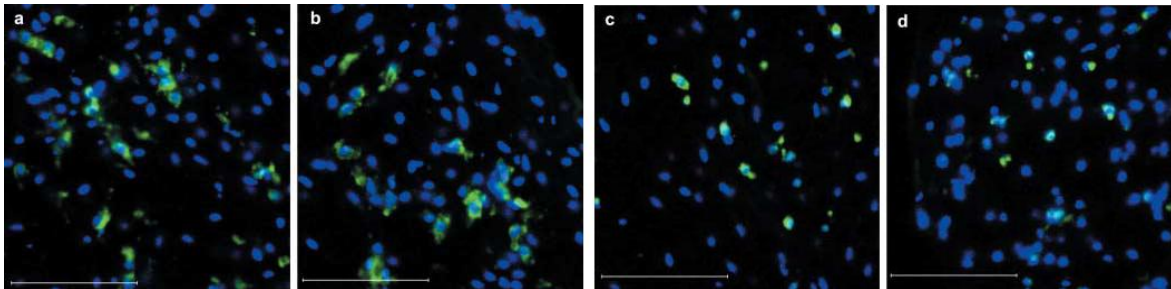


Figura 2.5: presenza dell'epitopo α -gal, marcato con IB4 (verde), in prossimità dei nuclei cellulari, marcati con DAPI (blu), su valvole in commercio. (a) Medtronic Mosaic; (b) Medtronic Freestyle 995; (c) Medtronic Freestyle 995MS; (d) Edwards Prima. Dimensione barra: 100 μ m. [45]

Lo stesso risultato è stato ottenuto anche da *van den Heever et al.* [46] e *Jorge-Herrero et al.* [47], su pericardio bovino, e da *Kasimir et al.* su valvole porcine fissate [48]. Per questo motivo, è sorta la necessità di identificare metodi di decellularizzazione veri e propri, descritti nel paragrafo successivo, in grado cioè di rimuovere completamente la componente cellulare, nucleica, e l'epitopo xenogenico α -gal.

2.2 Tecniche di decellularizzazione di tessuti biologici

Esistono differenti metodi di decellularizzazione, diversi tra loro non solo in termini di agente decellularizzante utilizzato, ma anche in termini di preservazione dell'ECM e di efficacia nella rimozione cellulare: è noto, infatti, che un metodo può risultare molto efficace nella rimozione cellulare, ma danneggiare pesantemente l'ECM o, viceversa, salvaguardare la struttura di quest'ultima, ma risultare inefficace nella rimozione della componente cellulare. Per questo motivo, un buon metodo di decellularizzazione deve soddisfare alcuni requisiti fondamentali che, nello specifico ambito della TEHV, sono:

- rimozione completa delle cellule valvolari, i loro residui nucleici e i loro epitopi antigenici
- conservazione della struttura dell'ECM, poiché dall'integrità di quest'ultima dipende una corretta funzione valvolare. Un trattamento tissutale aggressivo può alterare le proprietà meccaniche ed emodinamiche della TEHV [49]
- ottenimento di un substrato adeguato per la ricellularizzazione: il tessuto decellularizzato deve conservare quindi una struttura tridimensionale e la

membrana basale, che hanno un ruolo fondamentale nella crescita e migrazione cellulare; un aspetto fondamentale è inoltre l'eliminazione totale dei residui (citotossici) degli agenti decellularizzanti [50].

In generale, si identificano diverse fasi all'interno del processo di decellularizzazione:

1. lisi delle membrane cellulari
2. separazione delle componenti cellulari dall'ECM
3. solubilizzazione delle componenti nucleiche e del citoplasma
4. estrazione finale dei detriti cellulari dal tessuto

Al fine di ottenere una decellularizzazione in grado di soddisfare i requisiti appena definiti, un protocollo di decellularizzazione combina metodi chimici, enzimatici e fisici (Tabella 2.1).

Metodi chimici	Metodi enzimatici	Metodi fisici
Detergenti ionici (SDS, Triton X-200)	Tripsina	Congelamento/scongelamento
Acidi e basi (EDTA, EGTA)	Endonucleasi	Pressione idrostatica
Detergenti non ionici (Triton X-100)		Elettroporazione
		Agitazione meccanica
		Perfusione

Tabella 2.1: Principali metodi utilizzabili per la decellularizzazione di organi e tessuti. EDTA: acido tetracetico etilendiammine; EGTA: acido tetracetico glicoletilene; SDS: sodiododecilsolfato.

Bisogna, inoltre, tenere in considerazione il fatto che un determinato protocollo può avere risultati differenti a seconda del tessuto/organo al quale è applicato, risultando efficace in un caso e totalmente inadeguato in un altro. E' importante di conseguenza valutare, in base alla specifica applicazione (composizione, volume e densità cellulare del tessuto da decellularizzare), la combinazione delle varie fasi del processo di decellularizzazione, la scelta e la concentrazione dei detergenti da utilizzare e la durata dei tempi di lavaggio [51].

Metodi chimici

Gli agenti di tipo chimico più utilizzati sono riportati in Tabella 2.1 (prima colonna). Nessuno di questi si è dimostrato in grado di rimuovere totalmente le componenti cellulari mantenendo al tempo stesso intatta la sovrastruttura dell'ECM. Il detergente ionico *Sodio dodecilsolfato (SDS)*, tra tutti, è quello più efficace nella rimozione della componente cellulare, ma allo stesso tempo può danneggiare gravemente l'ECM di alcune tipologie di tessuto, causando alterazioni strutturali irreversibili, denaturazione delle proteine e compromissione delle proprietà meccaniche del tessuto nativo. Inoltre, è anche indicato come possibile causa di eventi citotossici e responsabile di una bassa ricellularizzazione della matrice *in vitro* [54]. Danni ingenti alla matrice sono arrecati anche da acidi e da basi che denaturano le proteine come il collagene. In applicazioni dove le proprietà meccaniche della matrice sono fondamentali per la rigenerazione del tessuto (come ad esempio nel caso delle valvole cardiache), questo annulla tutti i vantaggi derivanti dall'utilizzo di ECM acellulare come scaffold per l'ingegneria tissutale. È importante dunque identificare agenti in grado di indurre alterazioni minime di architettura e composizione della matrice in funzione del tipo di tessuto/organo che si vuole trattare. Da questo punto di vista, le soluzioni ipotoniche si sono dimostrate le più affidabili in quanto, mediante lisi delle membrane cellulari per shock osmotico, non agiscono in alcun modo sulle proteine strutturali; la loro bassa efficacia nella rimozione delle componenti cellulari può essere compensata applicando diversi cicli di lavaggio del tessuto, oppure associando l'azione di agenti più efficaci ma a più bassa concentrazione e/o per durate di trattamento più contenute. Nel caso dei detergenti, infatti, la rimozione della componente cellulare ma anche di proteine dell'ECM aumenta all'aumentare del tempo di esposizione e varia al variare dell'organo considerato. Il detergente non ionico Triton X-100 ad esempio permette una rimozione adeguata dei residui cellulari là dove l'effetto osmotico è insufficiente, con una modifica minima della sovrastruttura della matrice. Alla fine del processo di decellularizzazione, è fondamentale poi assicurarsi di aver eliminato i residui degli agenti chimici utilizzati, poichè anche a basse concentrazioni essi manifestano elevata citotossicità e porterebbero dunque al fallimento dell'impianto.

Metodi enzimatici

Le tecniche di decellularizzazione basate sui metodi enzimatici (Tabella 2.1, seconda colonna) prevedono l'impiego di enzimi di digestione (proteasi) e di nucleasi.

La tripsina è un enzima proteolitico ampiamente utilizzato nei protocolli di decellularizzazione. Essa rompe i legami peptidici all'estremità carbossilica degli amminoacidi arginina e lisina e la sua attività viene ottimizzata in condizioni di temperatura pari a 37°C e pH pari a 8 [52]. Tuttavia, la tripsina deve essere utilizzata con cautela poiché le proteine dell'ECM presentano una resistenza limitata a questo enzima. La tripsina risulta essere più distruttiva rispetto ai detergenti, soprattutto nei confronti dell'elastina e del collagene, ma i tessuti trattati mostrano una maggiore conservazione del contenuto di glicosamminoglicani (GAGs). Una completa decellularizzazione con la tripsina è quasi impossibile perché essa svolge un'azione più lenta in termini di rimozione cellulare e 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 favorisce la successiva penetrazione di altri agenti decellularizzanti [51].

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 degli acidi nucleici RNA e DNA. L'utilizzo delle nucleasi richiede accurati cicli di lavaggio del tessuto decellularizzato al fine di rimuovere i residui degli enzimi stessi, che scatenerebbero una reazione immunitaria da parte del paziente ricevente la protesi, e degli acidi nucleici degradati, che agirebbero da siti di calcificazione e contribuirebbero al prematuro fallimento della protesi [53].

Metodi fisici

I metodi fisici utilizzati per la decellularizzazione di tessuti, riportati nella Tabella 2.1 (terza colonna), includono il congelamento/scongelamento, l'applicazione di pressione idrostatica, l'elettroporazione, l'agitazione meccanica e la perfusione [51].

Cicli di congelamento/scongelamento rapido del tessuto portano alla formazione e alla successiva rottura di cristalli di ghiaccio all'interno delle cellule, provocando la lisi della

membrana. Il processo di congelamento e scongelamento distrugge in maniera efficace le cellule all'interno del tessuto, ma i contenuti intracellulari e i residui di membrana rimangono, conferendo proprietà potenzialmente immunogeniche alla matrice, a meno di procedere ad una successiva loro rimozione mediante opportuni processi. È stato anche osservato che un singolo ciclo di congelamento-scongelamento può ridurre le risposte immunitarie avverse, 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 [54]. Tale processo mostra conseguenze trascurabili sulla struttura dell'ECM e, di conseguenza, sulle proprietà meccaniche del tessuto [51], ma non è da solo efficace a garantire una completa decellularizzazione.

La pressione idrostatica richiede un tempo di applicazione relativamente basso, risultando quindi più efficiente in termini di durata del trattamento, con il conseguente vantaggio di un minor rischio di compromissione dell'ECM [51].

L'elettroporazione consiste nell'applicazione di impulsi elettrici, della durata di microsecondi, al tessuto, provocando la formazione di micropori nella membrana delle cellule a causa dell'instabilità del potenziale elettrico. La presenza di questi micropori provoca una perdita dell'omeostasi e porta quindi alla morte cellulare [54]. L'elettroporazione, tuttavia, presenta alcuni limiti: la dimensione ridotta delle sonde permette di decellularizzare solo piccole porzioni di tessuto, limitando dunque le potenziali applicazioni di questa tecnica [51].

L'agitazione meccanica può essere utilizzata in combinazione all'immersione in soluzione dei tessuti (incubazione) per favorire la penetrazione degli agenti decellularizzanti negli strati più interni del tessuto e la rimozione dei detriti cellulari. Può essere ottenuta mediante, ad esempio, un piatto magnetico mescolante o uno "shaker" basculante.

Come anticipato precedentemente, però, gli agenti usati per la rimozione cellulare possono essere dannosi per la matrice: possono degradare o denaturare le proteine dell'ECM o lasciare residui tossici, che possono influire negativamente sulla meccanica funzionale o sulla risposta cellulare. Per questo motivo, ridurre i tempi di esposizione del tessuto agli agenti decellularizzanti può essere importante per minimizzare il rischio di danneggiamento dell'ECM. A tale scopo, *Consolo et al.*, nel 2013, proposero un protocollo

dinamico, basato su perfusione dell'organo intero, per la decellularizzazione della vescica. In particolare il protocollo prevedeva una distensione ciclica dell'organo, mediante cicli di perfusione/aspirazione delle soluzioni contenenti gli agenti decellularizzanti (soluzione ipotonica e Triton X-100) tramite l'uretra. Questo metodo consente di aumentare l'efficacia nella rimozione della componente cellulare se confrontato con il tradizionale metodo di incubazione dell'organo, in quanto la perfusione facilita la penetrazione degli agenti decellularizzanti negli strati più interni della parete dell'organo, mentre l'aspirazione favorisce l'eliminazione dei detriti cellulari, riducendo inoltre il tempo di trattamento e conseguentemente il tempo di esposizione dei tessuti agli agenti decellularizzanti [62].

A seguito della procedura di decellularizzazione, uno step necessario per valutare l'efficacia del protocollo, sia in termini di rimozione cellulare che di grado di mantenimento della struttura dell'ECM, è quello della caratterizzazione delle matrici decellularizzate, argomento che verrà discusso nel prossimo paragrafo.

2.2.1 Caratterizzazione delle matrici decellularizzate

L'analisi dei tessuti a valle della decellularizzazione è di fondamentale importanza per valutare l'efficacia del protocollo utilizzato dal momento che il tessuto o l'organo decellularizzato concepito per l'utilizzo come *scaffold* biologico deve possedere proprietà e caratteristiche ben precise (Paragrafo 2.2). Diverse tecniche di analisi permettono, ad esempio, di verificare l'avvenuta rimozione della componente cellulare da parte di un determinato agente, chimico, fisico o enzimatico.

Una primo metodo di analisi, immediato ma totalmente qualitativo, è l'ispezione visiva del tessuto. Può essere un punto di partenza per verificare l'efficacia della decellularizzazione, prima di procedere ad analisi più approfondite. I tessuti e gli organi decellularizzati (Figura 2.7) mostrano, infatti, un colore bianco/trasparente.



Figura 2.7: Organi interi (cuore, rene, polmone e fegato), prima e dopo la decellularizzazione.

Un metodo sicuramente più valido per la determinazione del grado di decellularizzazione consiste nell'analisi istologica. L'istologia consente di mettere in evidenza la struttura dei tessuti e la morfologia delle cellule che li compongono, sia da un punto di vista morfologico che funzionale (ovvero la loro disposizione spaziale all'interno del tessuto). Mediante questa tecnica si ottengono delle sezioni dei campioni che possono essere osservate al microscopio in seguito alla loro colorazione con agenti in grado di colorare specifiche componenti del tessuto. Ad esempio la colorazione con Ematossilina e Eosina (H&E) può essere utile come prima ispezione per determinare la presenza di strutture nucleari residue al termine della decellularizzazione. In particolare, l'Ematossilina colora in blu/violetto i componenti cellulari carichi negativamente, principalmente presenti a livello dei nuclei (acidi nucleici, proteine di membrana e membrane cellulari); l'Eosina invece colora in rosso/rosa i componenti carichi positivamente (proteine cellulari, fibre di collagene), individuando quindi la ECM. La colorazione Tricromica di Masson (TM), invece, può rilevare la presenza di diverse proteine della ECM, come collagene ed elastina. Questa colorazione, infatti, risulta particolarmente indicata per la visualizzazione dell'orientamento e dell'organizzazione delle fibre di collagene all'interno del tessuto. In particolare, la tricromia di Masson colora in blu il tessuto connettivo, le fibre di collagene e le strutture ricche di mucopolisaccaridi, in nero i nuclei cellulari, in giallo gli eritrociti e in rosso le fibre muscolari e il citoplasma. I nuclei delle cellule possono anche essere individuati tramite colorazioni con il 4',6-diamidin-2-fenilindolo (DAPI), un colorante organico fluorescente che lega fortemente regioni del DNA ricche in sequenze A-T.

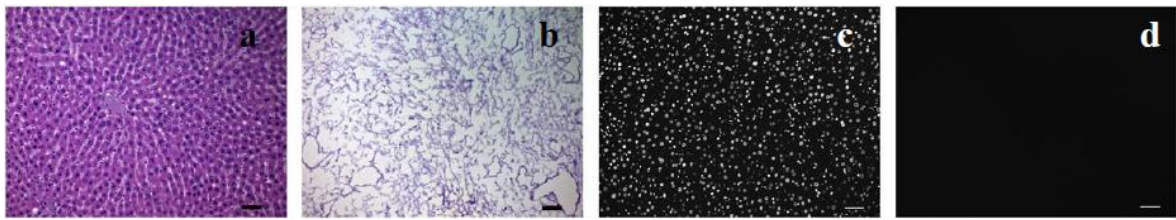


Figura 2.8: Sezioni istologiche di fegato di ratto, nativo (a,c) e decellularizzato (b,d). Le colorazioni sono state effettuate con H&E (a,b) e DAPI (c,d) [52].

Un esempio di confronto tra tessuto nativo e decellularizzato ottenuto mediante colorazioni con H&E e DAPI è mostrato in Figura 2.8 [52]. Nella colorazione in H&E i nuclei appaiono in violetto nel tessuto nativo (Figura 2.8a). L'assenza di nuclei visibili (Figura 2.8b) attesta l'avvenuta decellularizzazione. Allo stesso modo, la colorazione con DAPI conferma la presenza di nuclei cellulari nel tessuto nativo (Figura 2.8c) e la loro assenza nel tessuto decellularizzato (Figura 2.8d).

Un'analisi più precisa riguardo al grado di rimozione cellulare è la quantificazione del DNA residuo. Il vero vantaggio è rappresentato dal fatto che questo metodo è quantitativo, mentre i metodi descritti in precedenza sono metodi di valutazione dell'efficacia del protocollo di decellularizzazione utilizzati puramente qualitativi.

Tuttavia, le tecniche di decellularizzazione non possono rimuovere completamente il materiale cellulare. *Crapo et al.* hanno proposto un valore limite relativo alla quantità di DNA che permane nel tessuto: affinché il tessuto possa essere ritenuto decellularizzato è necessario che l'organo decellularizzato presenti una quantità di DNA inferiore a 50ng/mg di ECM [52].

La *Polymerase Chain Reaction (PCR)* e la microscopia elettronica sono ulteriori metodi di analisi dell'avvenuta decellularizzazione di un tessuto, ma vengono raramente utilizzati in quanto meno efficaci dei metodi descritti in precedenza [56].

Per verificare il mantenimento dell'integrità dell'ECM post decellularizzazione, si può inoltre ricorrere a test di caratterizzazione delle proprietà meccaniche. Le proprietà meccaniche del tessuto sono strettamente correlate alla struttura dello stesso. Buoni agenti decellularizzanti sono quelli che rimuovono la componente cellulare senza danneggiare eccessivamente l'ECM, in modo da ottenere matrici in grado di sostenere le sollecitazioni cui è sottoposto il tessuto che andranno a sostituire/riparare [53]. La caratterizzazione

meccanica ha dunque lo scopo di verificare quali siano le proprietà meccaniche della matrice decellularizzata e quanto queste si discostino da quelle del tessuto nativo. L'approccio universalmente utilizzato per la caratterizzazione meccanica dei tessuti è la trazione monoassiale (Figura 2.9, sinistra), prova in cui il provino è sottoposto a trazione lungo un'unica direzione e con velocità costante, fino a rottura, registrando in tempo reale la risposta del campione alla sollecitazione meccanica, rappresentata dai valori di sforzo (σ) e di deformazione (ϵ) che agiscono sul campione [57]. Queste due grandezze vengono poi riportate in un grafico, la curva σ - ϵ (Figura 2.9, destra), dalla quale è possibile estrapolare e calcolare alcuni parametri che caratterizzano in modo quantitativo il comportamento della matrice, tra cui: il modulo di Young, lo sforzo e la deformazione di transizione (sforzo e deformazione corrispondenti al passaggio da bassa pendenza ad alta pendenza della curva), lo sforzo e la deformazione a rottura [58].

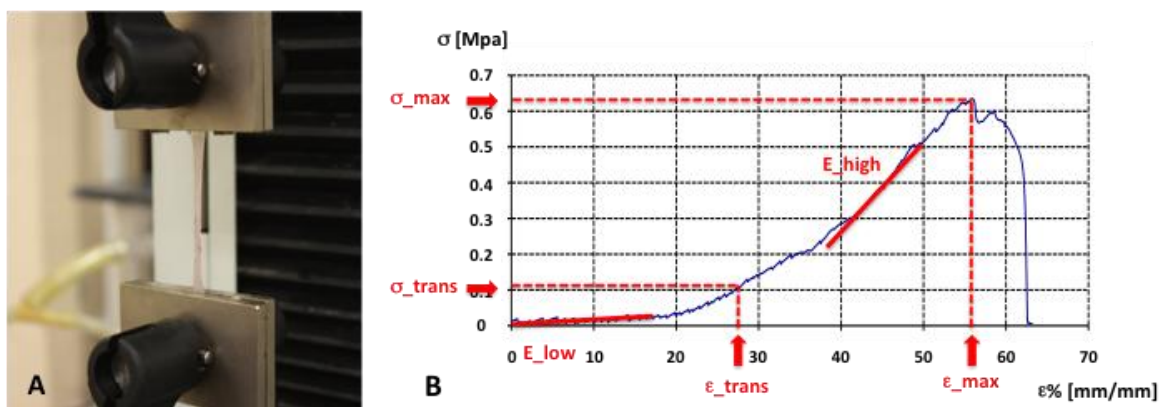


Figura 2.9: Prova di trazione monoassiale. A sinistra, provino vincolato agli afferraggi di una macchina di prova; a destra, tipica curva σ - ϵ di una prova di trazione con evidenziati i parametri caratteristici del comportamento biomeccanico del campione [62].

Ulteriori tipologie di prove meccaniche, sebbene meno utilizzate, sono il test di ball burst [59], in cui una punta metallica sollecita al centro il campione di tessuto vincolato su tutti i lati fino a rottura, e il test di burst pressure [60], specifico per organi cavi, che prevede il riempimento con un fluido (o con aria compressa) dell'organo/tessuto fino alla rottura, misurando la pressione a cui essa avviene.

Due ulteriori grandezze che possono essere utili per la valutazione di un tessuto decellularizzato sono quelle relative la compliance e la permeabilità. La compliance è un indice della distensibilità della parete di un organo o di un tessuto e quindi è funzione delle proprietà biomeccaniche dell'ECM. La prova di compliance avviene mediante infusione di

un volume noto di liquido nel tessuto/organo, durante la quale viene misurata la variazione di pressione (ΔP) corrispondente alla variazione del volume (ΔV) di fluido infuso. I valori misurati vengono riportati in un grafico pressione-volume, o curva P-V. Il valore di compliance (C nell'Equazione 2.1) è definito come il rapporto tra le due grandezze misurate:

$$C = \frac{\Delta P}{\Delta V} \quad (2.1)$$

Il test di permeabilità permette di valutare il coefficiente di permeabilità (K nell'Equazione 2.2) caratteristico della matrice, definito come il rapporto tra il valore imposto di portata di perfusione del tessuto (Q) e la differenza di pressione che si genera a cavallo del tessuto (ΔP):

$$K = \frac{Q}{\Delta P} \quad (2.2)$$

Alcuni lavori presenti in letteratura riportano questo tipo di analisi sul tessuto vescicale [60,61,62]. Il test di permeabilità è utile a valutare l'avvenuta decellularizzazione del tessuto nel momento in cui il tessuto nativo risulti impermeabile: a causa della rimozione delle cellule, infatti, il tessuto decellularizzato sarà invece caratterizzato da un coefficiente di permeabilità più alto. Inoltre, ad avvenuta ricellularizzazione, è possibile effettuare nuovamente un test di permeabilità al fine di valutare l'efficacia del ripopolamento cellulare, ovvero valutare di essere ritornati nelle condizioni tipiche di impermeabilità del tessuto nativo.

2.2.2 Scaffold ottenuti da tessuti decellularizzati

Le matrici ottenute decellularizzando tessuti biologici trovano svariate applicazioni nella pratica clinica, oggi giorno, come mostrato in Tabella 2.2 [52].

Prodotto (Produttore)	Fonte tissutale	Campo di applicazione
AlloDerm® (Lifecell Corp.)	Derma umano	Tessuti molli
AlloPatch HD™, FlexHD® (Musculoskeletal Transplant Foundation)	Derma umano	Tendini, seno
NeoForm™ (Mentor Worldwide LLC)	Derma umano	Seno
GraftJacket® (Wright Medical Technology Inc.)	Derma umano	Tessuti molli, ferite croniche
Strattice™ (Lifecell Corp.)	Derma porcino	Tessuti molli
Zimmer Collagen Repair Patch™ (Zimmer Inc.)	Derma porcino	Tessuti molli
TissueMend® (Stryker Corp.)	Derma bovino	Tessuti molli
MatriStem®, Acell Vet (Acell Inc.)	Vescica porcina	Tessuti molli
Oasis®, Surgisis® (Cook Biotech Inc.)	Intestino tenue porcino	Tessuti molli
Restore™ (DePuy Orthopaedics)	Intestino tenue porcino	Tessuti molli
FortaFlex® (Organogenesis Inc.)	Intestino tenue porcino	Tessuti molli
CorMatrix ECM™ (CorMatrix® Cardiovascular Inc.)	Intestino tenue porcino	Pericardio, tessuti cardiaci
Meso BioMatrix™ (Kensey Nash Corp.)	Mesotelio porcino	Tessuti molli
IOPatch™ (IOP Inc.)	Pericardio umano	Oftalmologia
OrthoAdapt®, Unite® (Synovis Orthopaedic and Woundcare Inc.)	Pericardio equino	Tessuti molli, ferite croniche
CopiOs® (Zimmer Inc.)	Pericardio bovino	Odontoiatria
Lyoplant® (B. Braun Melsungen AG)	Pericardio bovino	Dura madre

Tabella 2.2: Esempi di prodotti commerciali, utilizzati a livello clinico, fabbricati con matrici decellularizzate [52]

Numerosi studi riguardanti la produzione di matrici decellularizzate sono stati compiuti anche nel tentativo di decellularizzare organi interi, quali cuore [63], fegato [64], esofago [65], trachea [66], rene [67], polmoni [68] e vescica [62]. Tali studi fanno sperare che, in futuro, queste matrici possano fungere da supporto per la formazione di organi interi ingegnerizzati e impiegati per la sostituzione di quelli patologici. Attualmente, tuttavia, l'utilizzo di organi interi ingegnerizzati non ha ancora ottenuto risultati tali da permetterne la sperimentazione in uso clinico, mentre alcuni tessuti sono già trattati tramite le nuove tecniche dell'ingegneria tissutale. Un esempio è l'utilizzo della submucosa dell'intestino tenue (Small Intestinal Submucosa, SIS) come scaffold per la ricostruzione tissutale in ambito vascolare, come mostrato nel lavoro di *Badylak et al*, del 1989 [69], e vescicale [70].

Per quanto riguarda invece l'ambito cardiovascolare, e nello specifico quello della sostituzione valvolare, sono stati messi a punto nuovi protocolli di decellularizzazione del pericardio per l'ottenimento di matrici per la rigenerazione delle valvole cardiache patologiche. Infatti, al fine di trovare un'alternativa al trattamento con GA, *Mirsadraee et al.*, nel 2006, proposero un nuovo protocollo di decellularizzazione per la produzione di

matrice acellulare pericardica, di origine umana [43]. La procedura prevede di trattare il tessuto, prelevato da cadavere, immergendolo sequenzialmente in un buffer ipotonico, in un buffer ipotonico contenente SDS e in una soluzione contenente nucleasi. Le analisi istologiche (Figura 2.10) hanno evidenziato la completa rimozione della componente cellulare, oltre ad un adeguato mantenimento della macrostruttura dell'ECM e delle principali proteine strutturali (collagene ed elastina). Questo studio, pioneristico per quanto riguarda l'utilizzo di protocolli di decellularizzazione senza fissativo, non ha inoltre identificato differenze nel contenuto di idrossiprolina e glicosamminoglicani prima e dopo la decellularizzazione, e nessuna alterazione significativa delle proprietà meccaniche del tessuto decellularizzato. Per questo motivo, questo protocollo venne utilizzato in seguito da *Vinci et al.* in uno studio volte a valutare le proprietà meccaniche e le caratteristiche immunologiche del pericardio umano nativo, crioconservato e decellularizzato [6].

Come detto in precedenza, tuttavia, la disponibilità di pericardio umano è limitata. Per questo motivo, molti ricercatori hanno condotto studi per indagare se i risultati ottenuti nel lavoro sopra descritto fossero replicabili anche su pericardio xenogenico, bovino e porcino. Entrambi i tessuti sembrano esibire proprietà fisiche e meccaniche che li rendono adatti alla realizzazione di valvole cardiache bioprostetiche [71]. Nel 2009, *Dong et al.* [72] studiarono gli effetti del trattamento con acido acetico (AcOH) sulla porosità del pericardio bovino decellularizzato (Decell) utilizzando il detergente Triton X-100. Il pericardio, infatti, presenta, a seguito della rimozione della componente cellulare, porosità e dimensione dei pori ridotti, caratteristiche che possono ostacolare la colonizzazione dello scaffold da parte delle cellule. Per questo motivo, a valle della decellularizzazione, una parte dei campioni è stata immersa in una soluzione di AcOH 0,2M (Decell+AcOH) per 1h, i restanti campioni sono stati utilizzati come controllo negativo nelle diverse analisi. Il trattamento con AcOH ha dimostrato la propria efficacia nell'aumentare la porosità del tessuto, tuttavia altera alcune proprietà meccaniche del tessuto, in particolare lo sforzo a rottura (Ultimate tensile strength, UTS), come mostrato in Tabella 2.3.

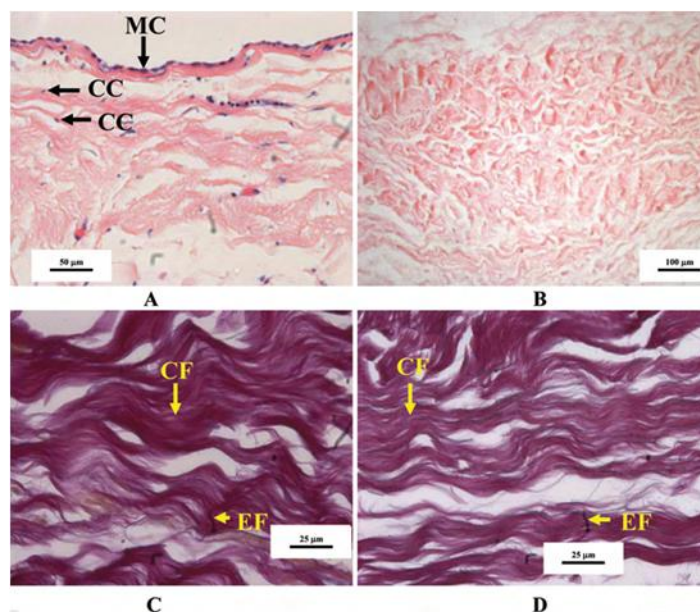


Figura 2.10: Caratterizzazione istologica del pericardio umano nativo/congelato (A, C) e decellularizzato (B, D). Le sezioni sono state colorate con Ematossilina&Eosina (A e B), e van Gieson (C e D). CC, cellule del tessuto connettivo; MC, cellule mesoteliali; CF, fibre di collagene; EF, fibre di elastina. [43]

Tessuto testato	Dimensione dei pori (mm)	Porosità (%)	Temperatura di denaturazione (°C)	Sforzo a rottura (MPa)
Nativo	N/A	58.1 ± 1.4	76.7 ± 0.74	14.4 ± 1.1
Decell	45.7 ± 10.5	67.3 ± 1.2**	74.2 ± 0.44 **	12.6 ± 0.6 *
Decell+AcOH	162.2 ± 24.3 [^]	94.7 ± 1.8 [^]	73.9 ± 0.58**	9.9 ± 0.8 ^{^^} *

Tabella 2.3: Confronto delle proprietà fisiche e meccaniche dei campioni nativi, decellularizzati e decellularizzati e trattati con AcOH. Tutti i risultati sono espressi in media ± SD di n = 5 campioni per ogni gruppo. confronto con nativo, * P < 0.05, ** P < 0.01; confronto con decell, ^ P < 0.05, ^^ P < 0.01 [72].

Hulsmann et al., nel 2011, hanno studiato l'efficacia di due diversi trattamenti di decellularizzazione su pericardio bovino [73]. Il primo (P1) combina SDS e acido desossicolico (DCA), il secondo (P2) tripsina ed EDTA. Il trattamento P1 risulta più efficace del trattamento P2 nella rimozione sia della componente cellulare, come si può vedere dall'analisi del contenuto di DNA (Figura 2.11, sinistra), che dell'epitopo xenogenico α -gal (Figura 2.11, destra). Inoltre, entrambi i trattamenti hanno dimostrato efficacia di decellularizzazione più elevata del fissaggio in GA.

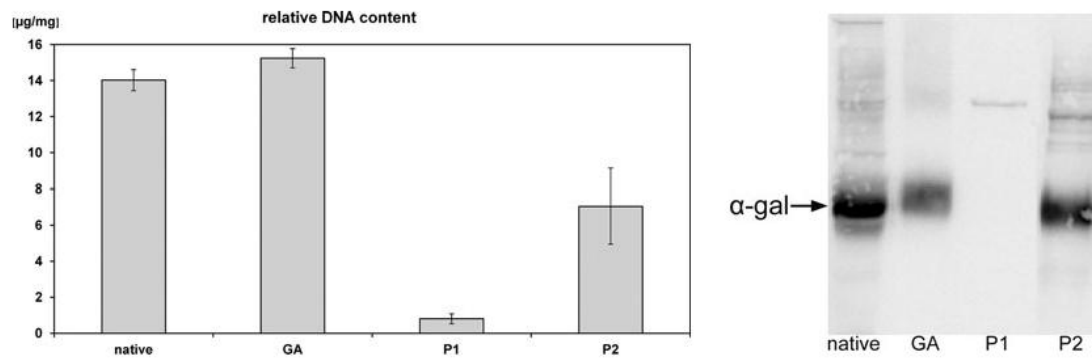


Figura 2.11: A sinistra, DNA residuo (MEDIA±SD) in pericardio bovino nativo, decellularizzato (P1 e P2), e fissato in GA (GA); a destra, detezione dell'epitopo α -gal tramite western blot [73].

Tuttavia, tutti questi trattamenti alterano le proprietà morfologiche e meccaniche del tessuto. Innanzitutto si nota un rigonfiamento del tessuto trattato, ovvero un significativo aumento dello spessore (Figura 2.12A). Tramite prove di trazione monoassiale è stato possibile invece notare una traslazione della curva σ - ϵ verso destra, cioè verso deformazioni a rottura maggiori (Figura 2.12B). Inoltre, tutti i trattamenti determinano una diminuzione del modulo elastico (Figura 2.12C) e dello sforzo a rottura (Figura 2.12D) rispetto al tessuto nativo.

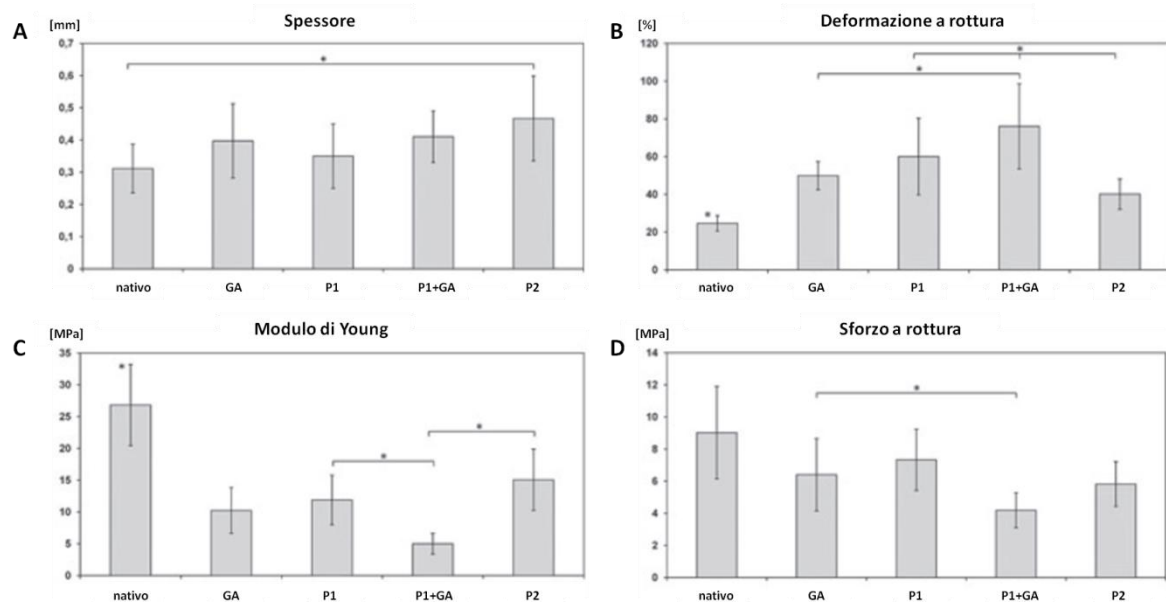


Figura 2.12: Confronto dei valori (media±SD) di modulo elastico (A), spessore (B), deformazione (C) e sforzo (D) a rottura, ricavati da prove di trazione monoassiale su pericardio bovino nativo, fissato in GA (GA), trattato con SDS/DCA (P1), trattato con SDS/DCA e fissato in GA (P1+GA) e trattato con tripsina/EDTA (P2). Tutte le differenze significative sono indicate con * ($P < 0.05$). Il solo simbolo * indica differenze statisticamente significative rispetto a tutti gli altri gruppi. [73]

Un ulteriore lavoro volto ad indagare gli effetti della decellularizzazione sulle proprietà del pericardio bovino è quello di *Yang et al.* [74]. I metodi di decellularizzazione analizzati in questo studio sono tre: il primo (DEE) si basa sull'utilizzo del detergente Triton X-100, il secondo (TS) sulla tripsina, il terzo (TSD) combina Triton X-100 e Sodio-Deossicolato. Dall'analisi del contenuto di DNA residuo (Figura 2.13), tutti i metodi sono risultati ugualmente efficaci nella rimozione della componente cellulare nucleica. Tuttavia, tramite prove di trazione monoassiale, è stato dimostrato che sia il metodo TS che quello TSD alterano in maniera significativa le proprietà meccaniche del tessuto nativo (CON), come evidenziato dalla diminuzione dei principali parametri caratteristici estratti dalle curve σ - ϵ (Tabella 2.4). Il metodo DEE, invece, associa alla rimozione cellulare un buon grado di mantenimento delle proprietà meccaniche, risultando così una procedura utilizzabile per la fabbricazione di porzioni di pericardio decellularizzato applicabili nell'ambito della TEHV.

Gruppo	Modulo elastico (MPa)	Sforzo Max (MPa)	Deformazione Max (%)	Carico Max (N)	Spostamento Max (mm)
CON	108.30 ± 17.19	26.83 ± 3.39	49.40 ± 10.36	101.26 ± 18.99	17.04 ± 3.43
DEE	104.52 ± 22.86	24.25 ± 1.62	41.08 ± 12.34	95.29 ± 4.09	17.74 ± 4.23
TS	79.05 ± 13.69*	9.79 ± 1.70*	16.44 ± 2.24 *	39.56 ± 9.37 *	5.64 ± 0.88*
TSD	80.17 ± 13.25*	12.75 ± 2.28*	16.45 ± 1.69*	48.27 ± 10.12*	7.84 ± 2.85*

Tabella 2.4: Proprietà meccaniche del pericardio bovino, nativo (CON) e decellularizzato secondo tre diversi metodi (DEE, TS, TSD). Tutti i risultati sono espressi in media ± SD. * P < 0.05 [75]

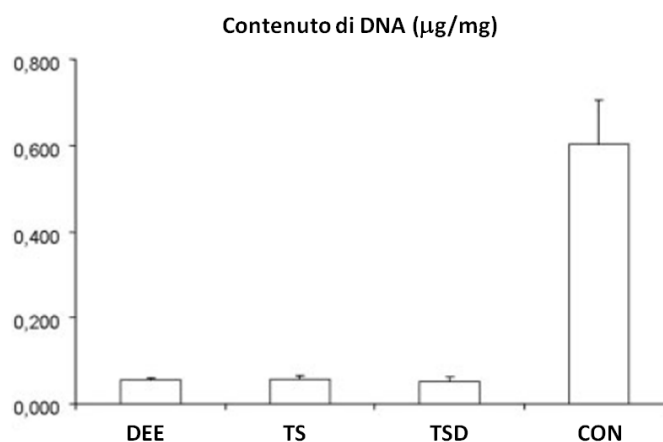


Figura 2.13: Analisi del contenuto di DNA residuo su pericardio bovino, nativo (CON) e decellularizzato secondo tre diversi metodi (DEE, TS, TSD). Tutti i risultati sono espressi in media ± SD. [75]

Nonostante il pericardio bovino sia, ad oggi, il materiale più utilizzato per la fabbricazione di protesi valvolari, quello porcino mostra proprietà altrettanto interessanti per l'applicazione in TEHV. Per questo motivo, negli ultimi anni, questo tessuto è stato studiato con attenzione sempre maggiore. *Gauvin et al.* [71], nel 2012, studiarono le proprietà fisiche e meccaniche del pericardio porcino nativo, confrontandole con quelle del corrispettivo bovino. In prima analisi, i due tessuti non mostrano differenze significative in termini di spessore, mostrando valori pari a $280 \pm 30 \mu\text{m}$ e $260 \pm 30 \mu\text{m}$, rispettivamente per il pericardio bovino e per il porcino. Prove di trazione monoassiale su porzioni di tessuto tagliate con direzioni diverse rispetto all'orientamento delle fibre di collagene della ECM hanno dimostrato che il pericardio bovino esibisce valori dei parametri meccanici lievemente più alti rispetto al porcino. Tuttavia, il tessuto bovino mostra anisotropia, in quanto lo sforzo a rottura (Figura 2.14A) e modulo lineare (Figura 2.14B) sono significativamente differenti in direzione parallela all'asse dell'ECM rispetto alla direzione perpendicolare. Al contrario, il tessuto tagliato perpendicolarmente all'asse dell'ECM si deforma maggiormente prima di arrivare a rottura (Figura 2.14C). Il pericardio porcino non mostra invece proprietà anisotrope, in quanto non si evidenziano differenze statisticamente significative delle caratteristiche meccaniche dei provini tagliati nei due diversi orientamenti.

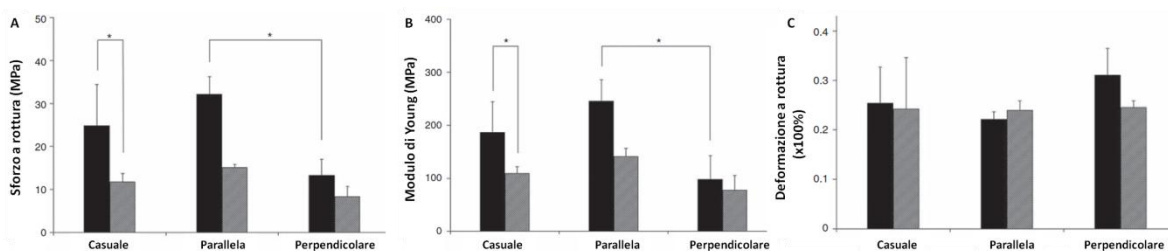


Figura 2.14: Confronto delle proprietà meccaniche del pericardio bovino (nero) e porcino (grigio), in dipendenza dall'orientamento rispetto alle fibre dell'ECM. (A) sforzo a rottura; (B) modulo di Young; (C) deformazione a rottura. Il simbolo * indica differenze statisticamente significative [71].

Un lavoro in cui il pericardio porcino è stato caratterizzato dal punto di vista fisico è la tesi di dottorato di *A. Gastaldello*, svolta presso il Dipartimento di Scienze Medico-Diagnostiche e Terapie Speciali dell'Università di Padova. In particolare, il pericardio porcino (PP) è stato analizzato in termini di spessore, densità e contenuto d'acqua, prima e dopo la decellularizzazione (TRITDOC) seguendo un protocollo decellularizzante che combina l'azione dei detergenti Triton X-100 e TauroDeOssiColato di sodio) [75].

	Nativo	Decellularizzato	n	P
Spessore (μm)	18.9 \pm 6	19 \pm 7.9	96	> 0.05
Densità (g/ml)	1.059 \pm 0.0058	1.062 \pm 0.0080	96	> 0.05
Contenuto d'acqua percentuale (%)	70.87 \pm 6.306	64.59 \pm 8.128	96	< 0.05

Tabella 2.5: Spessore, densità e contenuto d'acqua percentuale del pericardio porcino prima e dopo la decellularizzazione TRITDOC. n: numero di campioni analizzati [75].

La Tabella 2.5 riporta le caratteristiche (spessore, densità e contenuto d'acqua percentuale) misurate per il tessuto nativo e decellularizzato. Si può notare come il processo di decellularizzazione non alteri in maniera significativa spessore e densità del tessuto, mentre comporti una riduzione significativa del contenuto di acqua percentuale. In particolare, confrontando i valori di densità del pericardio porcino, nativo e decellularizzato con il protocollo TRITDOC, con quelli del pericardio bovino, risulta come il pericardio porcino sia significativamente ($P < 0.05$) più compatto del pericardio bovino, sia prima che dopo il trattamento decellularizzante. Tramite questo tipo di analisi sulle diverse aree anatomiche del pericardio decellularizzato, inoltre, è stato possibile individuare quella di maggiore potenziale interesse per la TEHV, ovvero l'area ventricolare, grazie alla sua maggior omogeneità delle proprietà fisiche.

Inoltre, nello stesso studio, la colorazione con DAPI effettuata su porzioni di pericardio porcino, nativo (Figura 2.15, sinistra) e decellularizzato con protocollo TRITDOC (Figura 2.15, destra), ha dimostrato l'avvenuta rimozione cellulare dal tessuto nativo e, quindi, l'efficacia del protocollo di decellularizzazione utilizzato.

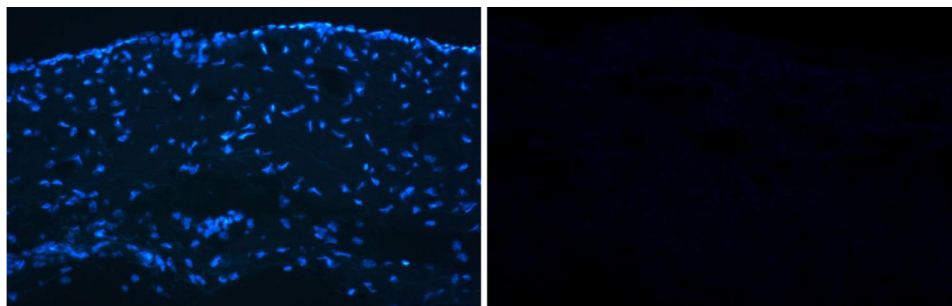


Figura 2.15: Caratterizzazione istologica mediante immunofluorescenza con DAPI su pericardio porcino nativo (sinistra) e decellularizzato con protocollo di decellularizzazione TRITDOC (destra), che evidenzia l'avvenuta rimozione cellulare [75].

2.3 Ricellularizzazione degli scaffolds

Dopo la procedura di decellularizzazione, lo step successivo per la fabbricazione di TEHV è quello di ripopolare lo scaffold biologico tridimensionale con cellule vitali, in modo da rendere il costruito capace di crescere e rinnovarsi dopo l'impianto. Un vantaggio rilevante è che il processo di *ricellularizzazione* della matrice richiede 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.

La tipologia cellulare ideale per il ripopolamento dovrebbe essere in grado di proliferare, di autorinnovarsi e di dare origine all'insieme eterogeneo di tipi cellulari che compongono il tessuto/organo nativo. Solo in rari casi, però, è possibile isolare tipi cellulari differenziati organo-specifici, espanderli *in vitro* e utilizzarli per la ricellularizzazione dello scaffold. Nelle altre situazioni devono essere valutate altre fonti cellulari che comprendono cellule autologhe o cellule allogeniche, cellule somatiche o cellule staminali [53][76]. Le condizioni della semina e della coltura cellulare (tecnica, tempistica, densità cellulare) dipenderanno dal tipo di cellule scelto e dall'obiettivo finale che si desidera ottenere.

2.3.1 Metodi di ricellularizzazione

Esistono principalmente due approcci per la colonizzazione di uno scaffold, sia sintetico che biologico:

- la semina *in vitro*, approccio tradizionale in cui le cellule vengono seminate sullo scaffold, prima dell'impianto, e sottoposte a segnali/stimoli al fine di favorirne adesione e proliferazione. Lo scaffold seminato può in seguito essere introdotto all'interno di un bioreattore per favorire la maturazione del tessuto, in termini di organizzazione e funzionalità. I bioreattori più usati nel campo della TEHV espongono il costruito ingegnerizzato in via di sviluppo ad un condizionamento meccanico, attraverso l'applicazione di cicli di perfusione che si traducono in un cambiamento ciclico nel flusso e nella pressione imposta sul tessuto che mimi le condizioni fisiologiche della valvola nativa. Nello specifico caso delle valvole cardiache, le condizioni riprodotte sono quelle caratteristiche dell'ambiente cardiocircolatorio. Una volta colonizzata la matrice, il costruito viene impiantato *in*

vivo, nel paziente, dove si integrerà adeguatamente per poter quindi crescere e rimodellarsi.

- la rigenerazione tissutale guidata, approccio che prevede l'impianto *in vivo* di una matrice decellularizzata non seminata, ma che contenga tutte le informazioni biologiche necessarie per attrarre le cellule progenitrici endogene circolanti (potenzialmente sia endoteliali sia mesenchimali) o quelle del tessuto nativo circostante. Queste cellule dovrebbero poi essere in grado di invadere lo scaffold e di differenziarsi nei fenotipi cellulari nativi, ripopolandolo completamente. In questo caso si può dire che sia l'organismo stesso del paziente a fungere da bioreattore, sottoponendo il tessuto a stimoli biomeccanici e biochimici in grado di condizionare il rimodellamento del tessuto.

Nel presente lavoro di tesi si è utilizzato un approccio tradizionale, cioè di ingegnerizzazione di tessuti *in vitro*, per valutare l'efficacia della matrice di tessuto pericardico ottenuta in termini di colonizzazione cellulare. L'analisi dello stato dell'arte riguardante la ricellularizzazione del tessuto pericardico per applicazioni in TEHV (presentata nel paragrafo successivo), ha mostrato come i pochi studi condotti fino ad oggi in questa direzione manchino di una fase di condizionamento vero e proprio in bioreattore.

2.3.2 Ricellularizzazione del pericardio

In letteratura, i lavori relativi alla ricellularizzazione del tessuto pericardico riguardano esclusivamente il pericardio bovino, fissato o decellularizzato.

Schopka et al. [77], nel 2008, hanno condotto prove di ricellularizzazione di scaffold di pericardio bovino fissato (Carpentier-Edwards Perimount Plus Perikard-Bioprothesis, CEPP) e pericardio bovino fissato e detossificato (Shelhigh No-React[®] VascuPatch[™], NR). Le cellule utilizzate erano endoteliali ricavate da vene safene umane (human Saphenous Vein Endotelial Cells, hSVECs) e miofibroblasti (FBs), isolati dai tratti aortici di cuori espantati. In questo studio, sono stati confrontati 3 diversi protocolli di semina:

1. Iperconfluente: 60×10^3 hSVECs/cm², in coltura per 1 giorno;
2. Ipoconfluente: 15×10^3 hSVECs/cm², in coltura per 5 giorni;
3. Co-coltura: 60×10^3 FBs/cm² + 15×10^3 hSVECs/cm² (dopo 24h), in coltura per 5 giorni

Nello studio in esame non viene indicata la superficie del pericardio utilizzata per la semina cellulare.

La condizione migliore si è dimostrata essere quella della semina iperconfluente su NR, che mostra uno strato di hSVECs (Figura 2.16B), mentre sulla superficie del CEPP si hanno solo aggregati di cellule, isolati e di forma sferica (Figura 2.16A), dopo un giorno in coltura.

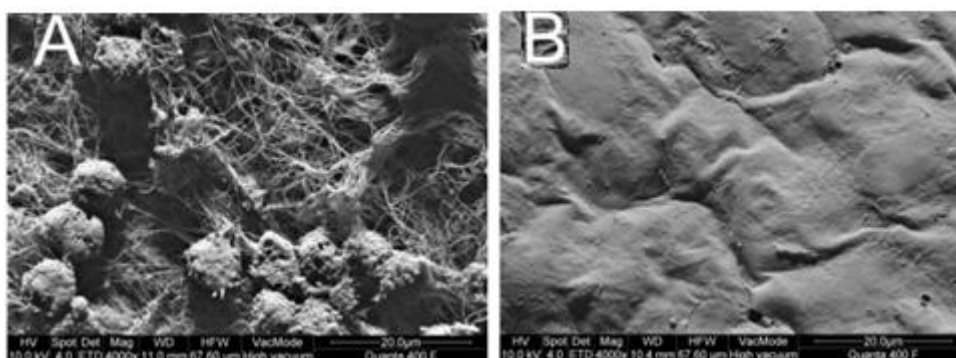


Figura 2.16: Immagine al SEM di pericardio bovino fissato in GA (A) e fissato in glutaledeide e detossificato (B), seminati con 60000hSVECs/cm², dopo un giorno di coltura. [77]

La procedura di semina ipoconfluente ha dato risultati insoddisfacenti, mentre la co-coltura di cellule endoteliali e fibroblasti ha mostrato di poter incrementare l'attività proliferativa e l'azione anti-trombogenica del costruito.

Yang et al. [78], nel 2012, proposero la semina con cellule vascolari, ricavate dalla vena safena, sul pericardio decellularizzato seguendo un protocollo differente:

- preparazione della sospensione cellulare, contenente 2milioni di cellule in 0.2ml di Dulbecco's Modified Engle's Medium (DMEM, Gibco, Grand Island, NY), contenente il 20% di siero fetale bovino (Fetal Bovine Serum, FBS; Gibco);
- semina delle cellule sul versante epipericardico dello scaffold, una volta al giorno, per 3 giorni;
- incubazione dei costrutti per 7, 14 e 21 giorni.

In Figura 2.17 vengono riportati i risultati dell'analisi istologica con H&E.

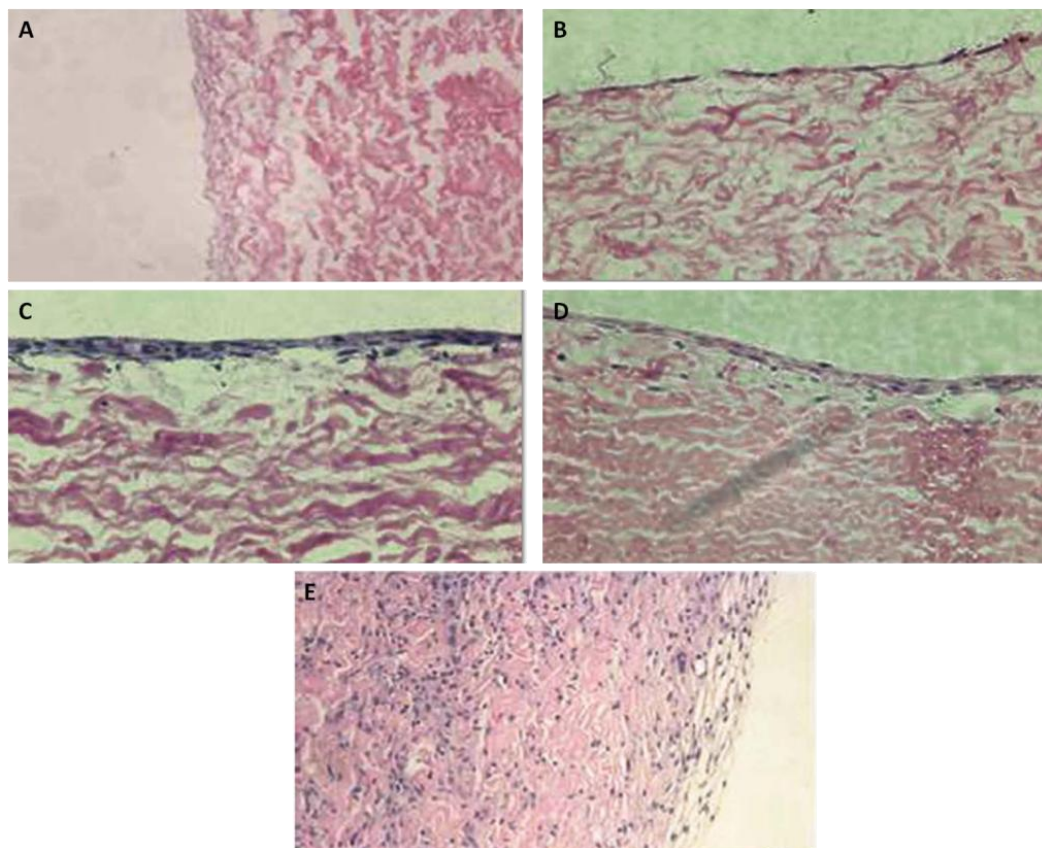


Figura 2.17: Analisi istologica con H&E di pericardio bovino decellularizzato (A) e in seguito alla semina di cellule vascolari, dopo 7 (B), 14 (C) e 21 (D) giorni di coltura *in vitro* e dopo 30 giorni dall'impianto del costruito in ratti [78].

Dopo 7 giorni di incubazione (Figura 2.17B), il tessuto mostra uno strato confluyente di cellule sulla superficie, con una sempre maggior penetrazione delle cellule all'interno del tessuto dopo 14 (Figura 2.17C) e 21 (Figura 2.17D) giorni di coltura, e dopo 30 giorni dall'impianto del costruito in ratti (Figura 2.17E).

Nella tesi di dottorato di A. *Gastaldello* [75] sono stati condotti esperimenti di semina con fibroblasti estratti da pericardio bovino (pericardiociti) e cellule endoteliali del cordone ombelicale umano (hUVECs), su pericardio bovino decellularizzato secondo due protocolli diversi: UTRITDOC (Urea, Triton X-100 e DeOssiColato di sodio) e TRICOL (Triton X-100 e COLato di sodio). In particolare, la semina è stata effettuata sulla superficie sierosa, a due differenti densità per ogni tipo cellulare (0.75×10^6 cells/cm² e 2×10^6 cells/cm² per i pericardiociti; 0.05×10^6 cells/cm² e 0.1×10^6 cells/cm² per le hUVECs). I risultati delle

semine, indagati attraverso colorazione dei campioni di tessuto con H&E, mostrano che i pericardiociti aderiscono alla superficie sierosa del pericardio bovino decellularizzato con il protocollo UTRIDOC dopo 6h e 18h dalla semina e cominciano a colonizzare l'ECM dopo 7 giorni per il pericardio decellularizzato con il protocollo TRICOL (Figura 2.18) e UTRIDOC, mantenendo un metabolismo attivo. Le hUVECs invece riescono ad aderire alla superficie sierosa del pericardio UTRIDOC se seminate e mantenute in coltura per 1h, 3h, 5h e 24h, ma non formano un monostrato continuo. Dopo un tempo di 7 giorni dalla semina invece, aderiscono più uniformemente sul pericardio UTRIDOC e formano un monostrato sul pericardio TRITDOC.

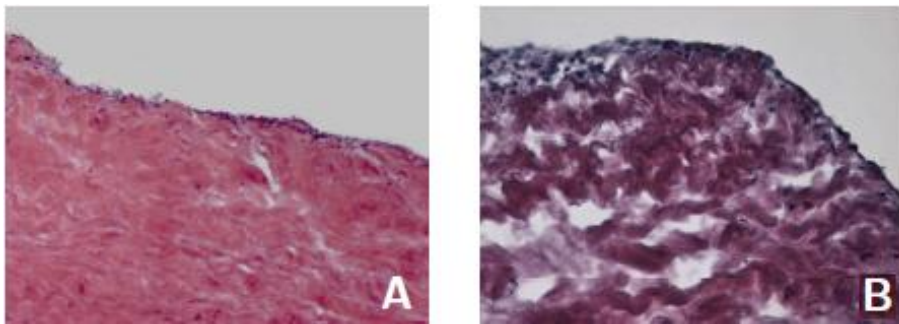


Figura 2.18: Pericardio bovino TRICOL seminato con pericardiociti, per 7 giorni, con densità 0.75×10^6 cells/cm² (A) e 2×10^6 cells/cm² (B). La superficie sierosa è rivolta verso l'alto. [75]

Lo stesso lavoro riporta i risultati di un esperimento volto ad analizzare se la funzionalizzazione della superficie da seminare possa favorire l'adesione e la proliferazione dei pericardiociti, aumentando così l'efficacia della procedura di semina. In particolare, il pericardio UTRIDOC è stato funzionalizzato tramite un dodecapeptide pro-adesivo di sintesi costituito da 4 sequenze amminoacidiche RGD (Arginina-Glicina-Acido aspartico), quindi seminato con pericardiociti alle densità di 0.05×10^6 cell/cm² e 0.1×10^6 cells/cm². I costrutti sono stati mantenuti in coltura per 30 minuti e 3h. Campioni di pericardio UTRIDOC non funzionalizzati sono stati seminati nelle stesse condizioni, rappresentando così il gruppo di controllo. Le analisi istologiche con H&E indicano che le cellule aderiscono ad entrambi gli scaffolds pericardici (funzionalizzato e non) già a 30 minuti dalla semina, anche alla densità minore (Figura 2.19 A, B). A 3h dalla semina, per entrambe le densità di semina, l'adesione cellulare porta alla formazione di un monostrato continuo di cellule sulla superficie degli scaffolds pericardici funzionalizzati (Figura 2.19

D, F) mentre sugli scaffolds pericardici di controllo (non funzionalizzati) le cellule adese mostrano una morfologia tondeggianti e un'adesione discontinua (Figura 2.19 C, E).

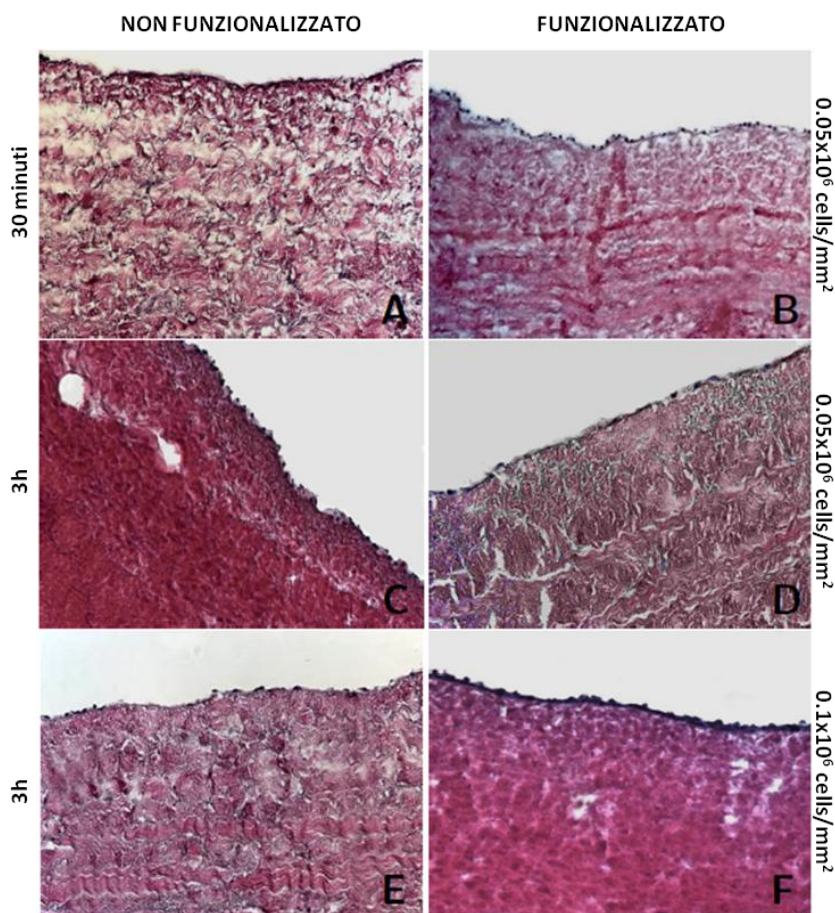


Figura 2.19: H&E su pericardio UTRIDOC seminato con pericardiociti. 0.05×10^6 cells/cm² per 30 minuti su pericardio di controllo, non funzionalizzato (A) e su pericardio funzionalizzato con peptide pro-adesivo di sintesi RGD (B); 0.05×10^6 cells/cm² per 3h su pericardio di controllo (C) e su pericardio funzionalizzato (D); 0.1×10^6 cells/cm² per 3h su pericardio di controllo (E) e su pericardio funzionalizzato (F) [75].

Un ulteriore studio, presente in letteratura, in cui la superficie del pericardio bovino viene trattata al fine di aumentare l'efficacia della procedura di semina, è quello di *Dong et al.*[72]. In questo lavoro, la metà dei campioni di pericardio decellularizzato (Decell) e decellularizzato e trattato con AcOH (Decell+AcOH) per aumentare la porosità è stata funzionalizzata con un polipeptide RGD, mentre l'altra ha rappresentato il controllo negativo. Tutti i campioni sono stati successivamente seminati con cellule staminali mesenchimali di origine umana (in sospensione alla densità di 1×10^6 cells/10ml di mezzo

di coltura) e i costrutti sono stati mantenuti in coltura per 10 giorni. Le analisi istologiche con H&E (Figura 2.20) al termine del periodo di coltura, evidenziano come la funzionalizzazione abbia effetti significativamente positivi sulla proliferazione cellulare negli strati più interni del pericardio decellularizzato solo nel caso in cui questo sia trattato con AcOH (Decell+AcOH+RGD, Figura 2.20D), mentre favorisce solamente la formazione di uno strato superficiale continuo di cellule nel caso in cui il tessuto non sia stato trattato con AcOH a seguito della decellularizzazione (Decell+RGD, Figura 2.20B). In assenza di funzionalizzazione (Figura 2.20A, C), si possono notare principalmente cellule isolate adese alla superficie.

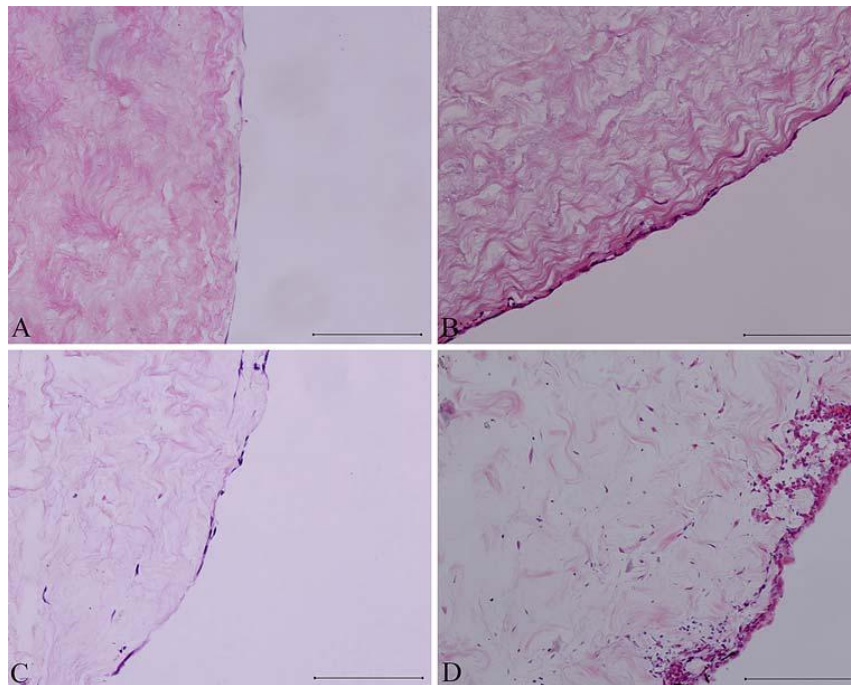


Figura 2.20: Analisi istologica con H&E dopo 10 giorni di coltura di cellule staminali mesenchimali di origine umana su pericardio Decell (A), Decell+RGD (B), Decell+AcOH (C) e Decell+AcOH+RGD [72].

Capitolo 3

DECELLULARIZZAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI MATRICI DI TESSUTO PERICARDICO DI ORIGINE PORCINA

Dall'analisi della letteratura è emerso che il tessuto pericardico di origine animale è ampiamente utilizzato nell'ambito della TEHV. In particolare, l'utilizzo di tessuto pericardico decellularizzato ha dimostrato proprietà anti-calcifiche e anti-geniche migliori rispetto a quello fissato con GA, nonostante quest'ultimo sia, ad oggi, maggiormente utilizzato per la fabbricazione di valvole cardiache bioprostetiche. Il fissaggio con GA, infatti, causa grave calcificazione dei lembi valvolari ed induce spesso una risposta avversa da parte del sistema immunitario del paziente, in quanto non è in grado di rimuovere completamente l'epitopo xenogenico α -gal (*Paragrafo 2.2.2*), il quale, come discusso nei capitoli precedenti, è tra le principali cause di rigetto iperacuto [45]. Inoltre, le matrici decellularizzate presentano proprietà meccaniche più vicine a quelle del tessuto nativo rispetto alle matrici fissate con GA, aspetto questo che le rende sicuramente maggiormente adatte a svolgere correttamente le proprie funzioni all'interno dell'organismo.

Sulla base di queste osservazioni, il presente lavoro si è concentrato sulla definizione di procedure sperimentali volte all'ottenimento di lembi valvolari ingegnerizzati, a partire da porzioni di pericardio porcino, senza l'utilizzo di GA, per la fabbricazione di bioprotesi valvolari. In particolare, tali procedure comprendono la decellularizzazione di tessuto pericardico di origine porcina, la caratterizzazione delle matrici ottenute, al fine di valutarne l'applicabilità come scaffold in applicazioni di TEHV, e infine la ricellularizzazione delle matrici ottenute e la caratterizzazione dei costrutti ricellularizzati.

In questo capitolo saranno descritti i protocolli, i set-up sperimentali e le metodologie utilizzati per ottimizzare il processo di decellularizzazione del pericardio e per la caratterizzazione, biologica e meccanica, delle matrici ottenute.

Il primo step è stato dunque quello di individuare e ottimizzare un protocollo per la decellularizzazione del tessuto pericardico, isolato della porzione parietale dal ventricolo del cuore di maiale, mirato ad ottenere una matrice priva di materiale cellulare e nucleico e priva di α -gal. Il protocollo di decellularizzazione combina metodi chimici ed enzimatici all'agitazione meccanica del tessuto incubato. Le matrici decellularizzate sono state quindi caratterizzate sia da un punto di vista meccanico che biologico. In particolare, la caratterizzazione biologica ha permesso di verificare, tramite analisi istologica e di immunofluorescenza, l'avvenuta rimozione della componente cellulare e la preservazione della sovrastruttura della ECM del tessuto, così come l'eliminazione dell'antigene specie-specifico α -gal. Tali attività (campagne di decellularizzazione e caratterizzazione biologica delle matrici) sono state effettuate presso il Laboratorio di Ingegneria Tissutale Cardiovascolare del Centro Cardiologico Monzino. La caratterizzazione meccanica (prove di trazione monoassiale e prove di permeabilità), invece, è stata eseguita presso il Laboratorio di Micro e Biofluidodinamica (μ BS Lab) del DEIB del Politecnico di Milano, ha fatto uso di set-up e protocolli messi a punto nel corso di precedenti attività di ricerca dai ricercatori del μ BS Lab, adattati e ottimizzati per questa caratterizzazione. Tramite prove di trazione monoassiale è stato possibile ricavare i parametri caratteristici del comportamento biomeccanico del tessuto pericardico, confrontando le proprietà del tessuto nativo con quello decellularizzato e fissato in GA; le prove di compliance e di permeabilità hanno invece permesso di caratterizzare le proprietà di distensibilità del tessuto delle tre differenti popolazioni (nativo, decellularizzato e fissato) e di estrapolarne il coefficiente di permeabilità. In particolare, il tessuto decellularizzato presenta un grado di porosità, dovuto alla rimozione della componente cellulare, che potrebbe permettere la filtrazione di fluido attraverso la matrice. I fenomeni di filtrazione devono essere quantificati in previsione della successiva fase di coltura finalizzata alla ricellularizzazione della matrice (descritta nel *Capitolo 4*).

3.1 Protocollo di decellularizzazione del pericardio

La prima fase del protocollo consiste nell'isolamento del tessuto pericardico dal cuore di maiale: i cuori da cui è stato estratto il pericardio sono stati espantati da maiali immediatamente dopo la macellazione (effettuata presso un macello locale) ed immersi in soluzione salina tamponata (Phosphate Buffered Saline, PBS) per il trasporto fino al

Laboratorio di Ingegneria Tissutale Cardiovascolare del Centro Cardiologico Monzino. Qui, il pericardio porcino è stato isolato utilizzando appositi strumenti chirurgici sterili, effettuando i seguenti passaggi:

- è stata individuata e prelevata da ogni cuore la porzione di interesse del pericardio, ossia quella che ricopre il ventricolo sinistro. La scelta di quest'area, come discusso nel Capitolo 2 (*Paragrafo 2.2.2*), è dovuta alla maggiore omogeneità del tessuto e alla presenza di una minore quantità di tessuto adiposo;
- è stato rimosso il tessuto adiposo presente dalla superficie fibrosa del pericardio;
- ciascun foglietto di pericardio è stato poi suddiviso in frammenti di forma quadrata di circa 15mm di lato;
- i campioni ottenuti sono stati trasferiti in tubi da 15ml (FalconTM), contenenti PBS sterile e conservati fino alla fase successiva del protocollo (decellularizzazione).

Tutte le operazioni sopra riportate sono state eseguite sotto cappa a flusso laminare.

Il protocollo di decellularizzazione, messo a punto dai ricercatori del Centro Cardiologico Monzino, era inizialmente stato concepito per la decellularizzazione di matrici di pericardio umano [6]. Nell'ambito di questo progetto di tesi, vista la natura xenogenica (porcina) e il diverso spessore del tessuto da trattare, il protocollo è stato opportunamente adattato, variando principalmente la concentrazione di alcuni degli agenti decellularizzanti utilizzati.

Come accennato in precedenza, la procedura si compone di un metodo combinato di tipo fisico-chimico-enzimatico.

Lo stimolo *fisico*, rappresentato dall'agitazione meccanica del tessuto in soluzione, ha come scopo quello di facilitare la penetrazione degli agenti decellularizzanti negli strati più profondi del tessuto, aumentando così l'efficacia dei vari "lavaggi".

Gli agenti *chimici* utilizzati nel presente protocollo sono:

- buffer ipotonico (Tris-HCl, pH 8.0) che provoca lisi cellulare per shock osmotico;

- Sodio-Dodecil-Solfato (SDS), detergente ionico che solubilizza la membrana citoplasmatica e nucleare, permettendo così la rimozione di residui cellulari e delle proteine citoplasmatiche dal tessuto;
- EDTA (BDH, Lutterworth, Regno Unito), agente chelante che si lega a ioni metallici, quali Ca^{2+} e Mg^{2+} , inibendo l'adesione cellulare all'ECM. Tali cationi bivalenti metallici, infatti, sono necessari per la formazione dei legami di adesione cellulare al collagene e alla fibronectina in corrispondenza dei recettori RGD. Legando questi cationi divalenti, l'EDTA facilita la rimozione del materiale cellulare dal tessuto.

Gli agenti *enzimatici* utilizzati sono invece:

- Aprotinina (Trasylol, Bayer, Germania), inibitore di proteasi utilizzato al fine di ridurre il danneggiamento dell'ultrastruttura dell'ECM nativa del tessuto durante il processo di decellularizzazione: le cellule lisate, infatti, rilasciano una grande quantità di proteasi che, se non inibite, potrebbero deteriorare il tessuto, con conseguente deterioramento delle proprietà meccaniche e del potenziale di ripopolamento della matrice durante la successiva ricellularizzazione.
- Deossiribonucleasi I (DNase, Sigma-Aldrich, Germania), endonucleasi ottenuta da pancreas bovino. Le nucleasi sono divise in endonucleasi ed esonucleasi. Le prime catalizzano l'idrolisi dei legami interni della catena di ribonucleotidi o deossiribonucleotidi mentre le seconde catalizzano l'idrolisi dei legami terminali. In ogni caso, l'effetto ottenuto è quello della degradazione del DNA e dell'RNA. L'eliminazione di DNA ed RNA, oltre a garantire l'utilizzo di tessuto xenogenico su paziente umano, è assolutamente necessario nella specifica applicazione (fabbricazione leaflet valvolari) in quanto eventuali residui degli acidi nucleici sembrano agire da siti di calcificazione, contribuendo quindi al prematuro fallimento della protesi [74, 79].

In ciascuna fase del protocollo (descritto nel dettaglio qui di seguito) sono state utilizzate soluzioni sterili o rese tali tramite filtrazione su membrane MilliporeTM con pori di dimensione 0.22 μm . Per ridurre ulteriormente il rischio di contaminazioni, ad ogni soluzione è stato aggiunto l'1% di penicillina-streptomina (Pen-Strep, Lonza, Belgio).

La decellularizzazione è avvenuta secondo il seguente protocollo:

1. Lavaggio con agitazione, durata 90min, del tessuto in PBS sterile senza Ca^{2+} e Mg^{2+} e contenente EDTA (0.1%w/v) e inibitore di proteasi (aprotinina, 1x). Cambio della soluzione ogni 30min.
2. Incubazione del tessuto, durata 16h, a 4°C con agitazione, in un buffer ipotonico sterile con 10mM di Tris-HCl, contenente inibitore di proteasi (aprotinina, 1x) e EDTA (0.1%w/v).
3. Incubazione per 24h in una soluzione allo 0.1%w/v di SDS in acqua distillata sterile, a temperatura ambiente.
4. Lavaggio con agitazione del tessuto in acqua distillata sterile, per 90min. Cambio dell'acqua ogni 30min.
5. Lavaggio di 30 minuti in PBS sterile contenente Ca^{2+} e Mg^{2+} (pH 7.4).
6. Digestione enzimatica per 3h con DNase (100U/ml) in PBS sterile contenente Ca^{2+} e Mg^{2+} (pH 7.4), con lieve agitazione su gyrorocker a 37°C.
7. Lavaggio finale con agitazione, per 90min, in PBS sterile senza Ca^{2+} e Mg^{2+} . Cambio soluzione ogni 30min.

I lavaggi del tessuto al termine di ogni passaggio, sono stati effettuati al fine di rimuovere i detriti cellulari e gli agenti decellularizzanti. I campioni decellularizzati sono stati conservati a 4°C in PBS sterile senza Ca^{2+} e Mg^{2+} fino all'avvio della fase di caratterizzazione. L'assenza di Ca^{2+} e Mg^{2+} nelle soluzioni contenenti gli agenti decellularizzanti, ad eccezione della DNase (punto 6 del presente protocollo), è necessaria in quanto la presenza di questi ioni favorirebbe l'adesione cellulare, rendendo più difficoltosa la rimozione della cellule dal tessuto, riducendo l'effetto dei vari lavaggi. Al contrario, nella soluzione contenente DNase gli ioni Ca^{2+} devono essere presenti in elevate concentrazioni, in modo tale da favorire l'attività dell'enzima.

3.2 Fissaggio in GA

La glutaraldeide (GA) utilizzata è disponibile in commercio (Sigma-Aldrich, Germania) in soluzione acquosa a varie concentrazioni. La soluzione madre di GA è stata conservata sempre ad una temperatura di 4°C prima del suo utilizzo. Infatti, è consigliabile preparare la soluzione in tampone non più di 12h prima dell'uso per evitare variazioni di pH, inquinamenti ed alterazioni chimiche.

Le porzioni di pericardio destinate al fissaggio in GA, isolate secondo la procedura descritta nel *Paragrafo 3.1*, sono state trattate seguendo il seguente protocollo [73], applicato su pericardio di origine bovina, consistente in due step:

- incubazione delle porzioni di tessuto in soluzione di GA 0.6% a 4°C per 48h;
- lavaggio del tessuto in acqua distillata, per 48h, per eliminare eventuali residui del fissativo.

I campioni sono poi stati conservati in PBS a 4°C fino alla loro successiva caratterizzazione o utilizzo.

3.3 Caratterizzazione del tessuto

Per verificare l'efficacia del protocollo di decellularizzazione (*Paragrafo 3.1*), le matrici ottenute sono state caratterizzate dal punto di vista biologico e meccanico, per verificare l'effettiva rimozione della componente cellulare e valutare eventuali alterazioni delle proprietà meccaniche del tessuto dovute al processo di decellularizzazione. Nella caratterizzazione del tessuto, i campioni decellularizzati sono stati confrontati con i corrispondenti campioni nativi. Tuttavia, nell'ambito della caratterizzazione meccanica, si è ritenuto necessario un ulteriore confronto con campioni fissati in GA allo 0.6%. Questo perché, dall'analisi della letteratura, è emerso che il fissaggio in GA, oltre a indurre calcificazione a lungo termine del tessuto, ne altera le proprietà biomeccaniche [73]. A tal proposito, dunque, il confronto si è reso utile per verificare che le matrici decellularizzate presentino proprietà più simili a quelle del tessuto nativo rispetto alle matrici fissate, dimostrando così l'effettiva validità del loro impiego per applicazioni di TEHV.

In dettaglio, sono state eseguite le seguenti analisi:

- **caratterizzazione istologica e immunofluorescenza** (nativo vs. decellularizzato): *Tricromia di Masson e Immunofluorescenza anti- α -gal (FITC+DAPI)*
- **caratterizzazione meccanica** (nativo vs. decellularizzato vs. fissato): *prove di trazione monoassiale e prove di permeabilità/compliance*

Per evitare che i risultati ottenuti fossero influenzati dalla specificità di un singolo “donatore”, sono stati utilizzati campioni provenienti da pericardi estratti da cuori di diversi maiali. In Figura 3.1 è mostrato lo schema a blocchi che riassume il processo di ottenimento dei campioni per la caratterizzazione. Per ogni gruppo analizzato (nativo, decellularizzato e fissato) sono elencate le analisi effettuate.



Figura 3.1: Schema a blocchi del flusso di lavoro per la caratterizzazione del pericardio nativo, decellularizzato e fissato. Per ogni gruppo sono indicate le analisi effettuate.

Nelle sezioni seguenti del presente capitolo saranno descritti nel dettaglio i metodi utilizzati per caratterizzare il tessuto.

3.3.1 Caratterizzazione istologica

3.3.1.1 Preparazione dei campioni

I campioni di pericardio, 6 nativi e 6 decellularizzati, destinati alla caratterizzazione istologica, sono stati fissati in ParaFormAldeide 4% (PFA 4%) overnight e inclusi in paraffina seguendo il seguente protocollo:

1. 2 passaggi in tampone fosfato 0.18M di durata pari a 1h ciascuno
2. Passaggio in etanolo 50% per 1h
3. Passaggio in etanolo 75% per 1h
4. Passaggio in etanolo 95% per 1h
5. Passaggio in etanolo 100% per 30 min
6. Passaggio in etanolo 100% overnight
7. Passaggio in xilene per 1h
8. Passaggio in paraffina liquida per 1h, a 65°C
9. Passaggio in paraffina liquida overnight, a 65°C
10. I campioni sono stati inseriti in vaschette metalliche, quindi ricoperti da una colata di paraffina liquida
11. Una volta solidificata la paraffina, i campioni sono stati tagliati al microtomo in sezioni di 7µm.
12. I vetrini con le sezioni sono stati posti in stufa a 37°C overnight.

I vetrini così ottenuti sono poi stati conservati in appositi contenitori fino alla colorazione delle sezioni.

3.3.1.2 Colorazione istologica tricromica di Masson

Per verificare che la procedura di decellularizzazione, oltre a rimuovere la componente cellulare dal tessuto, non abbia danneggiato la sovrastruttura della ECM, sono state effettuate colorazioni tricromiche di Masson (con blu di anilina) su campioni nativi e decellularizzati. Questa colorazione, infatti, risulta particolarmente indicata per la visualizzazione dell'orientamento e dell'organizzazione delle fibre di collagene all'interno del tessuto. In particolare, la tricromia di Masson colora in blu il tessuto connettivo, le fibre di collagene e le strutture ricche di mucopolisaccaridi, in viola i nuclei cellulari, in giallo gli eritrociti e in rosso le fibre muscolari e il citoplasma. Per la realizzazione di quest'analisi ci si è serviti del Trichrome Stain Masson Kit (Sigma-Aldrich, Germania), composto da 6 boccette diverse, contenenti rispettivamente:

- Contenitore A: Ematossilina ferrica di Weigert, sol. B (reattivo)
- Contenitore B: Ematossilina ferrica di Weigert, sol. A (reattivo)
- Contenitore C: Acido picrico (soluzione alcolica)

- Contenitore D: Ponceau BS (soluzione)
- Contenitore E: Acido fosfomolibdico (soluzione)
- Contenitore F: Blu di anilina secondo Masson (soluzione)

La colorazione delle sezioni di pericardio (nativo e decellularizzato) è avvenuta secondo il seguente protocollo:

1. 2 passaggi in Xilene di durata pari a 6 min ciascuno
2. Passaggio in Etanolo assoluto (100%) per 3 min
3. Passaggio in Etanolo 96% per 3 min
4. Passaggio in Etanolo 75% per 3 min
5. Passaggio in Etanolo 50% per 3 min
6. Passaggio in acqua distillata per 3 min
7. Porre sulla sezione 4 gocce di reattivo A e aggiungervi 4 gocce del reattivo B: lasciare agire per 10 minuti.
8. Senza lavare, lasciar gocciolare il vetrino e porre sulla sezione 8 gocce della soluzione C: lasciare agire 4 minuti.
9. Lavare rapidamente (3-4 secondi) in acqua distillata e porre sul vetrino 8 gocce della soluzione D: lasciare agire 4 minuti.
10. Lavare in acqua distillata e porre sulla sezione 8 gocce della soluzione E: lasciare agire per 10 minuti.
11. Senza sciacquare, lasciar gocciolare il vetrino e porvi 8 gocce della soluzione F: lasciare agire 5 minuti.
12. Passaggio in Etanolo 80% per 30 sec
13. Passaggio in Etanolo 96% per 30 sec
14. Passaggio in Etanolo assoluto (100%) per 1 min
15. 2 passaggi in Xilene di durata pari a 5 min ciascuno
16. Montaggio del vetrino copri-oggetto con balsamo montante

I passaggi 1-6 del protocollo permettono la rimozione della paraffina, sciolta dallo Xilene, e l'idratazione (tramite la scala decrescente di etanolo) dei vetrini contenenti le sezioni, che

possono essere così colorate. I passaggi finali (12-16) portano, invece, alla completa disidratazione del tessuto, condizione necessaria per il montaggio del vetrino copri-oggetto (Figura 3.2).

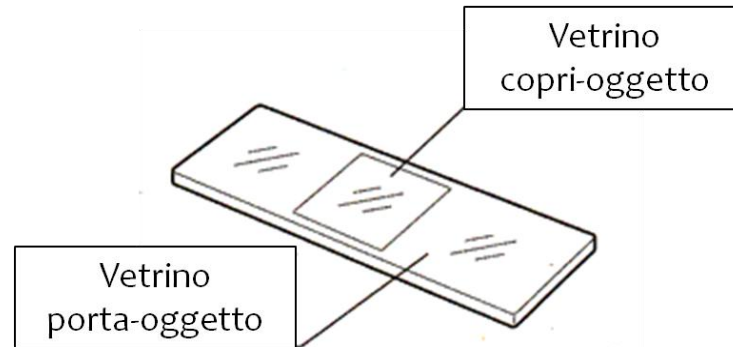


Figura 3.2: Vetrino copri-oggetto, montato sul vetrino porta-oggetto.

I campioni sono stati poi analizzati al microscopio a luce polarizzata ZEISS Axio-Scope per l'acquisizione delle immagini. In particolare, sono stati analizzati 3 campi per ciascun campione, a due ingrandimenti differenti (20X e 40X).

3.3.1.3 Immunofluorescenza anti- α -gal

L'epitopo α -gal è una struttura dei carboidrati comune nei mammiferi. È stato inizialmente caratterizzato sulla superficie dei globuli rossi di coniglio [80] e successivamente ne è stata dimostrata la presenza in glicolipidi e glicoproteine di varia dimensione in eritrociti di coniglio, maiale, mucca, topo ed in diversi altri mammiferi; al contrario le scimmie del vecchio mondo (Asia e Africa) e l'uomo perdono questo epitopo ma producono un'elevata quantità di anticorpi specifici contro di esso. Questo ha generato una barriera immunologica fra l'uomo e i mammiferi con cellule che esprimono questo epitopo. Di conseguenza, visto che la maggior parte delle cellule contenute nei tessuti di origine xenogenica (porcina, nello specifico ambito del presente lavoro di tesi) esprime l'epitopo α -gal, il trapianto di tessuto pericardico porcino in cui tale epitopo non sia stato rimosso adeguatamente porterebbe al fallimento dell'impianto a causa di reazioni del sistema immunitario del paziente. Lavori presenti in letteratura hanno infatti dimostrato che il legame *in vivo* di anticorpi anti- α -gal sulle cellule endoteliali dello xenotrapianto da maiale porta alla lisi cellulare indotta dal sistema del complemento, che porta al collasso

del letto vascolare e, quindi, al rigetto iper-acuto dello xenotrapianto [81]. Per questo motivo, la verifica dell'avvenuta rimozione nella componente cellulare dal tessuto pericardico è uno step di fondamentale importanza per la validazione del protocollo di decellularizzazione, al fine di valutarne l'effettivo utilizzo per la fabbricazione di TEHV a partire da lembi di pericardio porcino decellularizzato.

Nel presente lavoro, l'avvenuta rimozione dell'epitopo xenogenico α -gal è stata valutata in maniera semi-quantitativa tramite immunofluorescenza. L'immunofluorescenza è, infatti, una delle tecniche più utilizzate in biologia cellulare, immunologia, o nei laboratori biomedici, per rilevare in un certo campione la presenza di specifici antigeni, utilizzando anticorpi marcati con traccianti fluorescenti (fluorocromi). Gli anticorpi sono in grado di legarsi alle strutture cellulari in maniera altamente specifica, consentendo la valutazione semi-quantitativa delle strutture bersaglio tramite un microscopio a fluorescenza. L'immunofluorescenza è una tecnica vantaggiosa perché coniuga buona sensibilità e specificità a semplicità e rapidità di esecuzione e permette di indagare contemporaneamente la presenza di più anticorpi rivolti contro antigeni distinti.

Esistono due principali tipi di immunofluorescenza:

- **Diretta:** le sezioni vengono incubate con un anticorpo primario, marcato con un fluorocromo, che riconosce l'antigene e lo lega specificamente (Figura 3.3, sinistra).
- **Indiretta:** è composta da due fasi. Nella prima, un anticorpo non marcato (primario) viene incubato con le sezioni e si lega all'antigene formando il complesso antigene-anticorpo. Nella seconda, viene aggiunto un anticorpo secondario, marcato con un fluorocromo e specifico contro il primo anticorpo. Gli anticorpi secondari si legano al complesso antigene-anticorpo primario, rivelando attraverso il fluorocromo coniugato la presenza dell'antigene. L'amplificazione del segnale fluorescente risulta quindi funzione del numero di anticorpi secondari che si legano al complesso (Figura 3.3, destra).

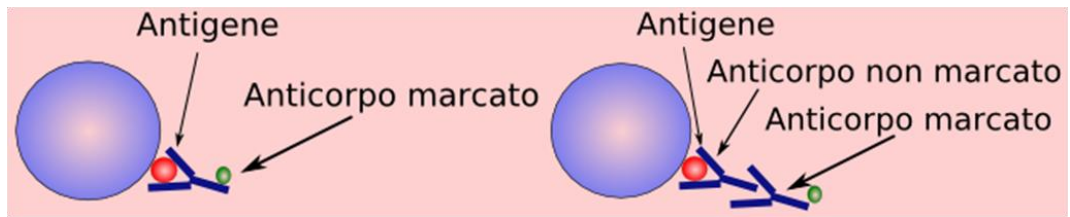


Figura 3.3: tecniche di immunofluorescenza, diretta (sinistra) e indiretta (destra).

Quando i campioni vengono osservati al microscopio a fluorescenza (Figura 3.4), vengono eccitati da una radiazione di appropriata lunghezza d'onda ed emettono fluorescenza. Il fascio luminoso prodotto dalla sorgente passa attraverso un filtro di eccitazione, che ha la funzione di trasmettere la sola radiazione necessaria per l'eccitazione. La luce filtrata viene convogliata, mediante uno specchio, all'interno dell'obiettivo e va infine a colpire il campione. La fluorescenza emessa da quest'ultimo, di lunghezza d'onda superiore rispetto a quella di eccitazione, attraversa di nuovo l'obiettivo e giunge a un filtro di emissione che garantisce la completa trasmissione all'oculare della luce fluorescente emessa dal campione, trattenendo la radiazione di eccitazione propria della lampada.

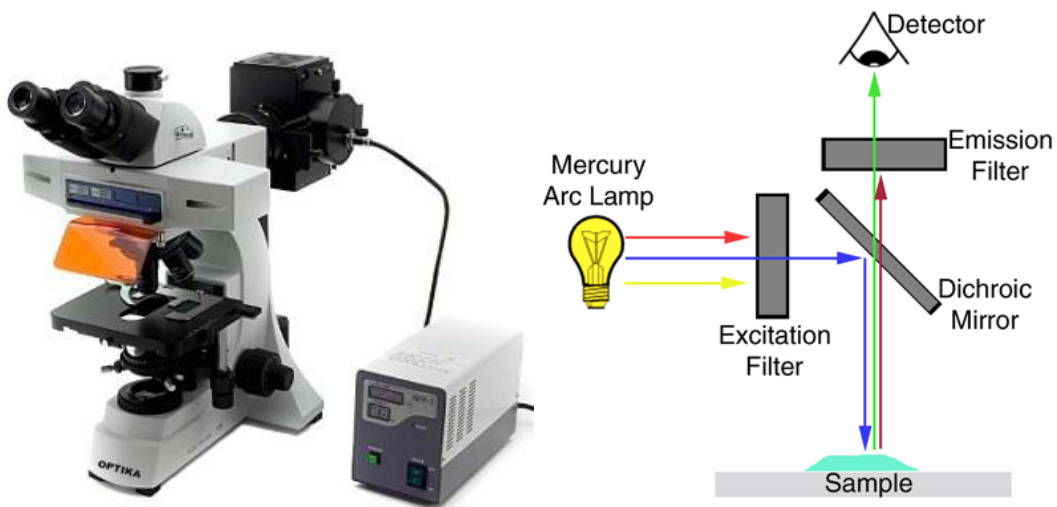


Figura 3.4: Un esempio di microscopio a fluorescenza (sinistra) e il relativo schema di funzionamento (destra).

Nella preparazione dei campioni per l'immunofluorescenza, nel presente lavoro di tesi si è scelto di seguire l'approccio *indiretto* per la marcatura dell'epitopo α -gal. Inoltre, per visualizzare i nuclei delle cellule, è stata inclusa nel protocollo anche la colorazione con 4',6-diamidin-2-fenilindolo (DAPI). In particolare, i vetrini contenenti le sezioni, a seguito

della rimozione della paraffina (si veda l'elenco numerato contenuto nel Paragrafo 3.3.1.2, punti 1-6), sono stati trattati seguendo il seguente protocollo:

1. i vetrini sono stati immersi in tampone citrato 0.1M alla temperatura di 90-95°C, per 20 min
2. i vetrini sono stati fatti raffreddare a temperatura ambiente, immersi nel tampone citrato 0.1M, per 20min
3. i vetrini sono stati rimossi dalla soluzione tampone, asciugati e ricoperti con una soluzione di Albumina Sierica Fetale Bovina (Bovine Serum Albumin, BSA) all'1% in PBS, per 40min
4. nel frattempo, gli anticorpi primari anti- α -gal sono stati diluiti con un rapporto di 1:50 in una soluzione di BSA all'1% in PBS
5. la soluzione di BSA 1% è stata rimossa dai vetrini e sostituita con la soluzione contenente gli anticorpi primari
6. i vetrini sono stati lasciati in incubazione con l'anticorpo primario, al buio, in camera umida a temperatura ambiente, per 1h
7. i vetrini, in seguito alla rimozione della soluzione di anticorpo primario, hanno subito 2 lavaggi in PBS e 1 in acqua distillata, di durata pari a 5min ciascuno
8. nel frattempo, gli anticorpi secondari, marcati con fluorocromi (Fluoresceina-Isotiocianato, FITC), sono stati diluiti con un rapporto di 1:200 in una soluzione di BSA all'1% in PBS
9. i vetrini sono stati ricoperti con la soluzione di anticorpo secondario, posti in camera umida e lasciati incubare al buio, a temperatura ambiente, per 1h
10. i vetrini, in seguito alla rimozione della soluzione di anticorpo secondario, hanno subito 2 lavaggi in PBS e 1 in acqua distillata, di durata pari a 5min ciascuno
11. nel frattempo, il DAPI è stato diluito con un rapporto di 1:500 in acqua distillata
12. rimossa la soluzione di anticorpo secondario, i vetrini sono stati ricoperti con la soluzione di DAPI, ed incubati in camera umida al buio, a temperatura ambiente, per 15min
13. i vetrini, hanno subito 3 lavaggi in acqua distillata, di durata di 5min ciascuno per la rimozione dell'eccesso di soluzione di DAPI

14. i campioni sono stati montati su vetrini copri-oggetto tramite un agente montante acquoso

I campioni sono stati analizzati tramite il microscopio a fluorescenza ZEISS Apotome, analizzando due campi per ciascun campione, a due ingrandimenti diversi (20X e 40X). In particolare, le immagini sono state ottenute mediante sovrapposizione delle immagini provenienti da due canali diversi per la fluorescenza del DAPI (visualizzazione dei nuclei cellulari, blu) e del FITC (visualizzazione dell' α -gal, verde).

3.3.2 Caratterizzazione meccanica

3.3.2.1 Prove di trazione monoassiale

Il test di trazione monoassiale consente di eseguire la caratterizzazione del comportamento meccanico di un tessuto biologico (o in generale di un qualunque tipo di materiale). L'obiettivo principale di questa analisi è di quantificare l'eventuale grado di alterazione delle proprietà meccaniche della matrice indotte dalla procedura di decellularizzazione; per questo motivo le prove di trazione monoassiale sono state condotte sia su campioni nativi che su campioni decellularizzati e fissati in GA. La procedura di esecuzione delle prove prevede prima la preparazione dei provini di tessuto pericardico, in seguito la sollecitazione e la misura della conseguente risposta dei campioni, infine la raccolta ed elaborazione dei risultati ottenuti (riportata e discussa nel *Capitolo 5*). Per la realizzazione dei provini, le porzioni di pericardio porcino (nativo, decellularizzato e fissato), conservate in PBS a 4°C fino al momento dell'esecuzione delle prove, sono state ritagliate con l'utilizzo di una dima (larghezza e lunghezza dei provini ottenuti pari a 4 e 15 mm, rispettivamente). Dal momento che il pericardio porcino, come riportato dalla letteratura riguardante la caratterizzazione meccanica di questo tessuto (*Paragrafo 2.2.2*), è isotropico [71], i provini non sono stati ricavati seguendo una specifica direzione di taglio rispetto all'orientamento delle fibre di collagene della ECM. Per avere una numerosità dei dati adeguata ad eseguire un test statistico per il confronto dei dati tra le varie popolazioni in esame, sono stati ricavati da ciascuno dei pericardi utilizzati il maggior numero di campioni possibili, in base alle dimensioni delle porzioni di tessuto di partenza. In Tabella

3.1 viene riportato il numero di provini che è stato ricavato per ogni pericardio e gruppo (nativo, decellularizzato e fissato).

Gruppo Pericardio	Gruppo		
	NATIVO	DECELLULARIZZATO	FISSATO
P1	4	4	4
P2	4	5	4
P3	-	4	5
P4	-	5	5
P5	5	-	-
P6	5	-	-
TOTALE	18	18	18

Tabella 3.1: Numero di provini ricavati per i test di trazione monoassiale, suddivisi per pericardio e gruppo di provenienza.

I provini sono stati ancorati ad un apposito supporto di carta vetrata (Figura 3.5, sinistra) per facilitare l'afferraggio del campione nella macchina di prova (MTS hydraulic testing machine, MTS System Corporation, MN, USA) e per evitare scivolamenti del campione durante le prove di trazione, come suggerito in letteratura [82]. Dopo il montaggio dei provini nella macchina, il supporto di carta vetrata viene tagliato (Figura 3.5, destra), prima dell'inizio della prova di trazione, in modo che esso non contribuisca alla resistenza a trazione del provino, alterando quindi la misura dei parametri d'interesse.

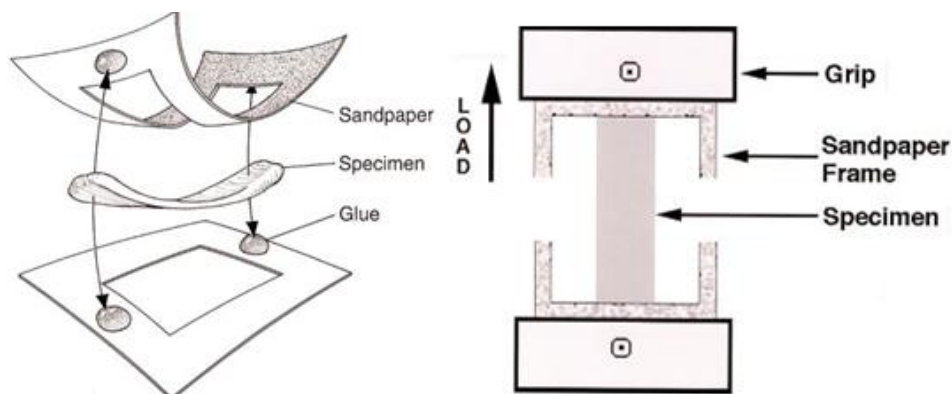


Figura 3.5: il provino viene incollato ad un apposito supporto in carta vetrata (sinistra), tagliato poi nella parte centrale (destra) a seguito dell'ancoraggio dei provini nella macchina di prova [82].

Il protocollo utilizzato per i test di trazione monoassiale prevede, in accordo con la letteratura [58, 59], le seguenti operazioni:

1. Posizionamento del campione montato sull'apposito supporto nella macchina di prova
2. Pretensionamento del campione fino ad un valore di 0.02 N di carico, operazione effettuata tramite il software di controllo della traversa della macchina utilizzata per il test (Testworks®, Testworks group, Hitchin, Inghilterra) il quale fornisce in tempo reale il valore del carico letto dalla cella di carico; la cella di carico utilizzata ha un fondo scala pari a 100N.
3. Misurazione tramite calibro della lunghezza del campione (l_0) e del suo spessore in tre punti (apice, centro e base) e calcolo dei relativi valori medi.
4. Pre-condizionamento dei campioni con 4-6 cicli di carico/scarico dei provini fino a che le curve di carico e scarico non risultassero sovrapposte: deformazione applicata: 15%; velocità di deformazione: 3mm/min.
5. Al termine del pre-condizionamento, nuovo pretensionamento del campione a 0.02 N di carico.
6. Misurazione della lunghezza del campione (l), eseguita come descritto nel punto 3.
7. Esecuzione della prova di trazione fino a rottura del provino, in controllo di spostamento, ad una velocità di deformazione costante pari a 3 mm/min.

Durante la trazione, il software acquisisce ed elabora in tempo reale i dati della prova, espressi in termini di carico applicato sul campione (F in N) e allungamento del campione (Δl in mm): tali valori sono stati poi convertiti in fase di elaborazione dei dati (attraverso foglio di lavoro Excel) in valori di sforzo (σ in MPa) e deformazione (ε in mm/mm); in dettaglio, σ è ricavato dividendo F per l'area della sezione trasversale del campione (ossia il prodotto tra larghezza e spessore del campione), ε è ricavato dividendo Δl per il valore di lunghezza iniziale l del campione. Riportando i valori su un grafico σ - ε , si ottiene la curva caratteristica della prova di trazione monoassiale. Sulla base di questa curva sono stati quindi calcolati i parametri rappresentativi del comportamento meccanico del tessuto pericardico. In particolare, in accordo con alcuni lavori presenti in letteratura (Paragrafo 2.2.2) [58, 62], per ciascun provino sono stati calcolati 6 parametri caratteristici, riportati in Figura 3.6 e descritti brevemente di seguito:

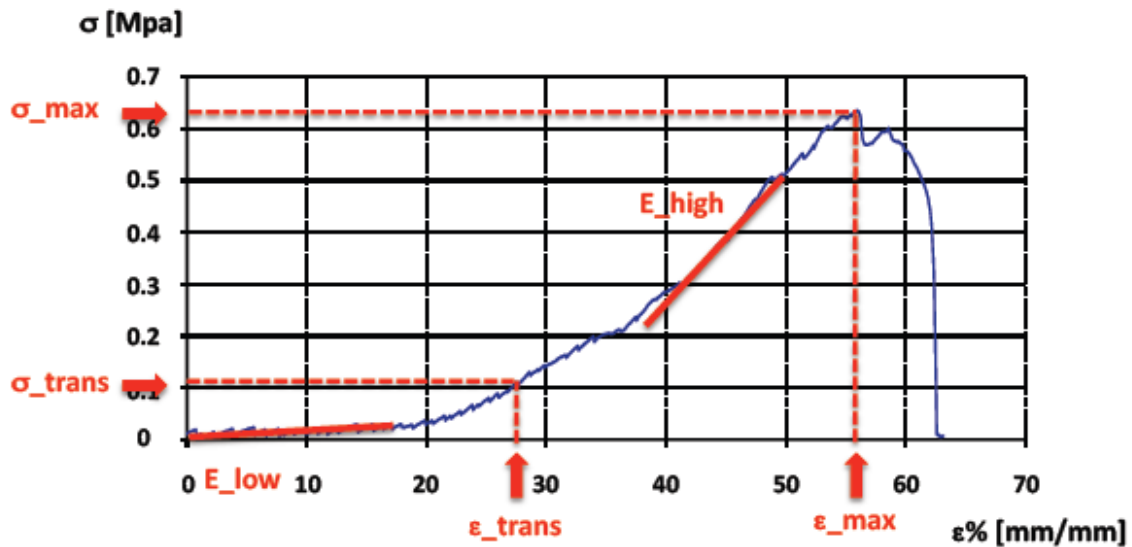


Figura 3.6: Grafico σ - ϵ ricavato da prove di trazione monoassiale. Vengono riportati in rosso i 6 parametri calcolati caratteristici del comportamento biomeccanico del provino [62].

- E_{low} : modulo di Young a basse deformazioni, ossia la pendenza della curva σ - ϵ in corrispondenza di bassi valori di deformazione, caratterizzata da un piccolo incremento dello sforzo in seguito all'incremento della deformazione del provino; tale parametro è indicativo principalmente della risposta delle fibre di elastina del tessuto;
- E_{high} : modulo di Young ad alte deformazioni, ossia la pendenza della curva σ - ϵ in corrispondenza di alti valori di deformazione, caratterizzata da un grande incremento dello sforzo in seguito all'incremento della deformazione del provino; tale parametro è indicativo principalmente della risposta delle fibre di collagene del tessuto;
- ϵ_{trans} : deformazione di transizione, stimata come il valore dell'intercetta fra la retta con pendenza E_{high} e l'asse delle ascisse; va a identificare il valore di deformazione per il quale la curva σ - ϵ mostra il cambiamento di pendenza, ovvero la transizione dal contributo delle fibre di elastina a quello delle fibre di collagene.
- σ_{trans} : sforzo di transizione, ossia il valore di sforzo sulla curva in corrispondenza di ϵ_{trans} .
- σ_{max} : sforzo massimo, calcolato come il valore di sforzo corrispondente al punto di massimo della curva σ - ϵ .

- ε_{max} : deformazione massima, ossia la deformazione in corrispondenza di σ_{max} .

3.3.2.2 Prove di permeabilità

A seguito della decellularizzazione del pericardio, la matrice ottenuta presenta un grado di porosità dovuto alla rimozione della componente cellulare del tessuto. I fenomeni di filtrazione connessi alla permeabilità della matrice devono essere quantificati anche in previsione della successiva fase del presente lavoro di tesi, ovvero la coltura cellulare finalizzata alla ricellularizzazione della matrice.

Il coefficiente di permeabilità (K , *Paragrafo 2.2.2*, Equazione 2.2) del tessuto pericardico decellularizzato, è stato quindi ricavato tramite le prove di permeabilità. Queste sono state eseguite su porzioni utili di tessuto circolari di circa 8 mm di diametro, ottenute a partire dalle sezioni con geometria quadrata di lato pari a circa 15 mm precedentemente conservati in PBS a 4°C (*Paragrafo 3.1*). Come nel caso delle prove di trazione, anche in questa tipologia di prove il comportamento del pericardio decellularizzato è stato confrontato con quello del tessuto nativo e fissato in GA. Sono stati utilizzati campioni provenienti da 6 pericardi differenti. In Tabella 3.2 viene riportato il numero di provini testati, indicando il pericardio e il gruppo di provenienza. Nel caso in cui, durante una prova, il campione risultasse danneggiato a causa di manovre errate da parte dell'operatore, esso non è stato considerato per la determinazione delle proprietà del tessuto.

Gruppo Pericardio	Gruppo		
	NATIVO	DECELLULARIZZATO	FISSATO
P1	-	1	2
P2	-	2	1
P3	1	1	1
P4	2	1	2
P5	3	5	3
P6	3	3	3
P13	3	3	-
P14	3	3	-
TOTALE	9	13	11

Tabella 3.2: Numero di provini ricavati per prove di permeabilità, suddivisi per pericardio e gruppo di provenienza.

Il setup sperimentale per le prove di permeabilità, concepito e sviluppato in precedenza presso il μ BS Lab, è mostrato in Figura 3.7:

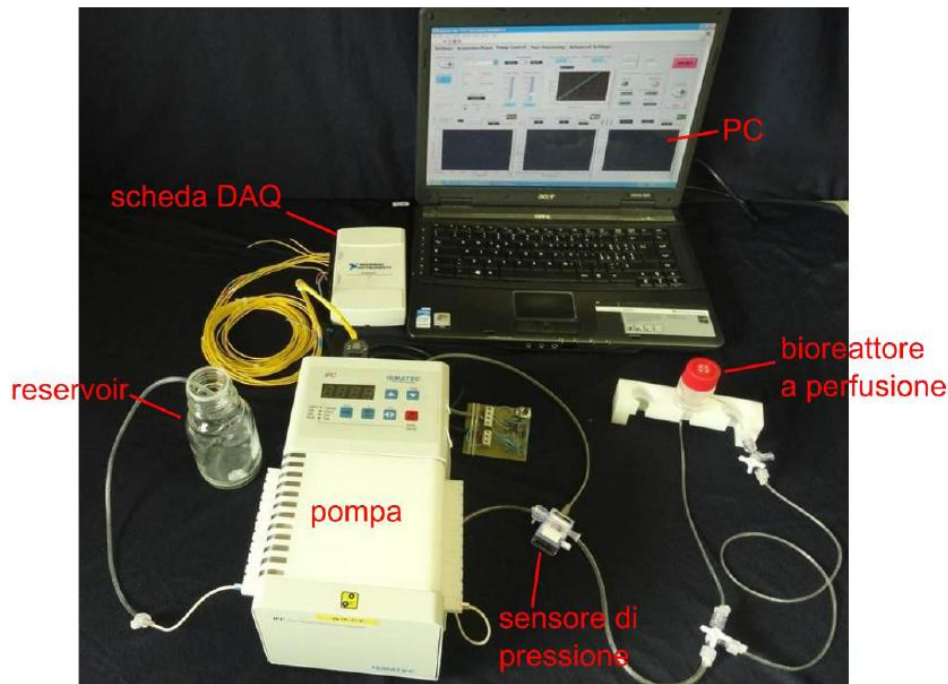


Figura 3.7: Set-up sperimentale per i test di permeabilità, composto da: reservoir, pompa volumetrica, scheda NI DAQ, sensore di pressione, bioreattore a perfusione, PC con software di controllo [83].

Il sistema è composto da:

- un PC su cui è installato il software (SW) di controllo della stimolazione, sviluppato in un precedente lavoro di tesi volto alla progettazione di un sistema monitoraggio e di controllo della stimolazione in pressione per applicazioni di ingegneria dei tessuti [83];
- una pompa peristaltica (IPCN-12, Ismatec), utilizzata per infondere il fluido all'interno della camera e stimolare in pressione il patch di tessuto. La portata erogata dalla pompa è determinata tramite il SW di controllo;
- un sensore di pressione di tipo *flow-through* (Pendotech Press-S-000), comprensivo di circuito di amplificazione, e connesso tramite scheda NI DAQ USB-6211 al PC su cui viene eseguito il SW di controllo. Il sensore permette il monitoraggio in tempo reale della caduta di pressione ai capi del campione;
- una camera a perfusione che permette di alloggiare il campione circolare di pericardio e mantenerlo in sede durante la perfusione del fluido. È stata impiegata una camera a perfusione disponibile presso il μ BS Lab, realizzato in un precedente lavoro di tesi [84] e riadattato, relativamente al componente che alloggia il patch di

tessuto in questo tipo di prova, in un altro lavoro di tesi [85] svolto sempre presso il μ BS Lab.

- un circuito idraulico, di cui è riportato uno schema in Figura 3.8, che consente un facile riempimento e debollamento del sistema e di ottimizzare le operazioni di alloggiamento e ancoraggio del patch di pericardio nella camera a perfusione [83].

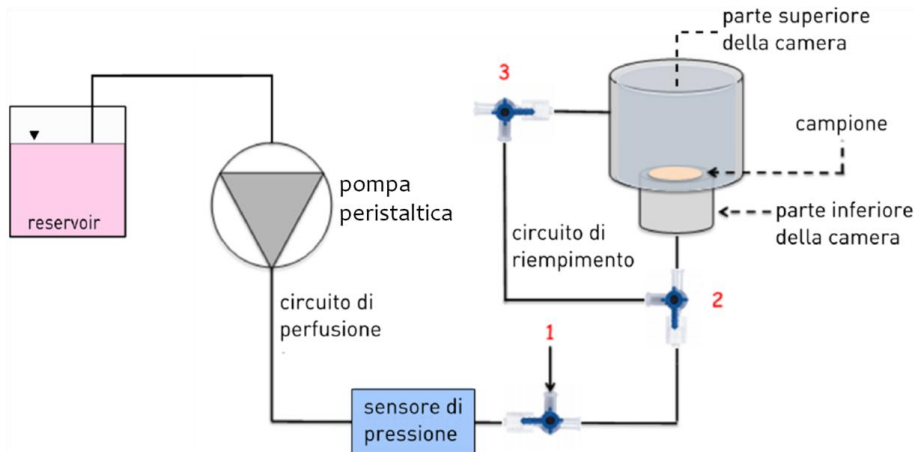


Figura 3.8: Schema del circuito idraulico per le misure di permeabilità. Sono indicati i due elementi che compongono la camera a perfusione (camera inferiore e superiore), il sensore di pressione, la pompa, il reservoir e i rubinetti a tre-vie utilizzati per direzionare opportunamente il fluido durante il riempimento del circuito e l'esecuzione della prova [83].

Il sistema per il vincolo del patch di pericardio e l'alloggiamento di quest'ultimo nella camera è un elemento di grande importanza, in quanto permette di imporre una perfusione confinata del tessuto e avere quindi una misura diretta della caduta di pressione a cavallo del provino. Il sistema è costituito da una cartuccia portasccaffold, realizzata per colata di polidimetilsilossano (PDMS) in un apposito stampo, e da un o-ring in gomma siliconica che, inserito all'interno del profilo cavo di cui è provvista la cartuccia, permette di fissare il patch di pericardio, mantenendolo ben disteso e permettendo così di applicare efficacemente la sollecitazione meccanica. Inoltre, l'assenza di spigoli vivi e l'utilizzo di materiali elastici "morbidi" ha evitato di causare lacerazioni del tessuto, che porterebbero al fallimento della prova. Il sistema e la procedura di ancoraggio del patch di pericardio sono illustrati in Figura 3.9.

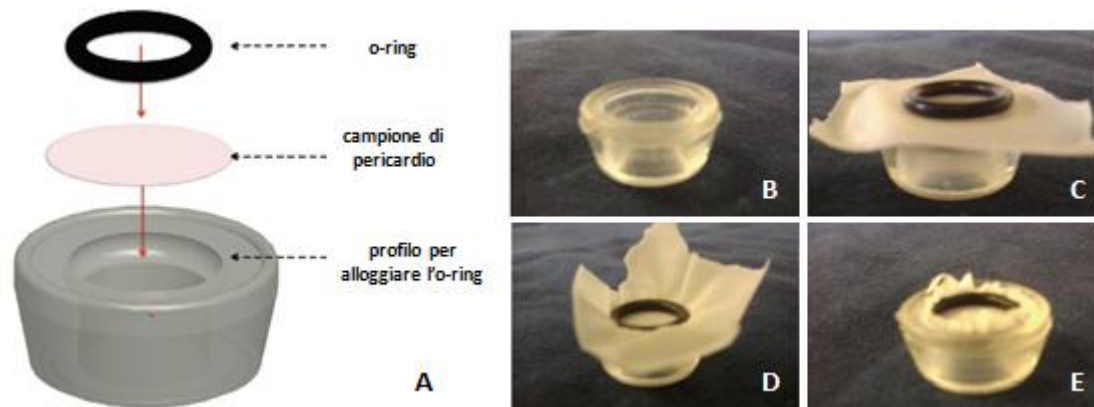


Figura 3.9: Disegno CAD (A), realizzato tramite il software CAD ProEngineer®, del sistema di fissaggio del campione di pericardio e fasi che portano all'alloggiamento e al fissaggio del patch: (B) cartuccia vuota; (C) posizionamento del patch sopra la cartuccia e dell'o-ring sopra il patch; (D) l'o-ring alloggiato nella sua sede sulla cartuccia vincola il patch, lasciando all'esterno le parti sovrabbondanti del campione; (E) patch vincolato alla cartuccia dopo aver rimosso le parti in eccesso tramite forbice.

Le prove sono state eseguite, mediante il setup descritto, in controllo di portata ovvero imponendo una portata costante di fluido (acqua deionizzata) e monitorando la pressione esercitata sul provino [62]. La motivazione di questa scelta è principalmente rappresentata dal fatto che il controllo in portata risulta più accurato e automatizzabile rispetto al controllo in pressione: infatti, la portata con cui si perfore il campione viene mantenuta costante dalla pompa volumetrica, a sua volta controllata dal SW, senza cioè necessità di interventi manuali da parte dell'operatore.

Il riempimento del circuito e l'alloggiamento del campione all'interno della camera di perfusione sono stati effettuati seguendo il seguente protocollo, sviluppato in un precedente lavoro di tesi [85]:

- **Riempimento della camera e del circuito idraulico:** il rubinetto 3 (Figura 3.8) è sempre configurato in modo da mettere in comunicazione la parte superiore della camera con il circuito di riempimento. Il rubinetto 1 è l'accesso per il riempimento iniziale: tramite una siringa l'acqua deionizzata è immessa in tutto il circuito. Questa fase prevede prima il riempimento del circuito di perfusione e della parte inferiore della camera. Durante questa fase il rubinetto 2 è posizionato in modo da escludere il circuito di riempimento. In seguito, il rubinetto 2 viene configurato in modo da escludere la parte inferiore della camera e mettere in comunicazione il

ramo del circuito di perfusione con il circuito di riempimento e completare così la prima fase.

- **Alloggiamento del campione:** in questa fase, il rubinetto 2 viene configurato in maniera da isolare la camera dal circuito di perfusione, mettendo in comunicazione la parte inferiore della camera e il circuito di riempimento, per posizionare correttamente la cartuccia che contiene il campione di pericardio. L'alloggiamento del campione prevede l'inserimento della cartuccia all'interno della parte inferiore della camera piena d'acqua deionizzata; in seguito, viene prima montata e poi riempita di acqua deionizzata la parte superiore della camera, che chiude il sistema e va in battuta sulla cartuccia, fissandola. La configurazione dei rubinetti 2 e 3, in questa fase, evita che la parte superiore della camera, comprimendo il campione sul fluido presente nella parte inferiore, generi una pressione iniziale non desiderata (dovuta all'azione del fluido sul patch); in questa maniera il fluido compresso entra nel circuito di riempimento e sbocca nel reservoir, mantenendo così nullo il ΔP iniziale a cavallo del provino.
- **Condizioni di prova:** una volta alloggiato il patch, il rubinetto 2 viene configurato in modo da escludere il circuito di riempimento e permettere così la perfusione del campione tramite pompa (circuito di perfusione) e l'inizio della prova.

Nelle prime campagne di caratterizzazione, eseguite su campioni provenienti dai pericardi P1-P6 (Tabella 3.2), ciascuno dei provini è stato sollecitato con tre differenti valori di portata (Q), pari a 10, 20 e 30 $\mu\text{l}/\text{min}$. La sollecitazione è stata applicata per una durata di tempo variabile in funzione del segnale di pressione acquisito. La prova, infatti, è terminata una volta raggiunto un plateau del segnale di pressione (campioni decellularizzati effettivamente permeabili in cui avviene un'effettiva filtrazione del fluido) o una volta raggiunto il valore di pressione di saturazione del sensore di pressione, pari a 250mmHg (campioni nativi e fissati, del tutto impermeabili). Il raggiungimento di un plateau della pressione (valore costante della P), in risposta ad una continua infusione di fluido, è rappresentativo di un effettivo fenomeno di filtrazione, ovvero la condizione in cui si ha l'uguaglianza tra il volume di fluido infuso dalla pompa che "investe" il provino e quello che filtra attraverso i pori della parete del provino stesso [83]. Un continuo incremento della P fino al raggiungimento del valore di saturazione del sensore, invece, indica che il

tessuto ha un coefficiente di permeabilità prossimo allo zero: in questa condizione il valore della pressione a cavallo del patch aumenta linearmente con l'aumento del volume infuso della pompa. Il tempo di durata della prova, variabile rispetto ai 3 valori di portata utilizzati, è inoltre caratterizzato da un certo grado di variabilità tra i differenti campioni.

In una seconda campagna di caratterizzazione, condotta su provini di tessuto pericardico ricavati mediante l'arrivo di due ulteriori cuori (P13 e P14), si è scelto di sollecitare i campioni a 10, 15 e 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. La motivazione di questa scelta è consistita nel fatto che, durante le prove su alcuni provini di tessuto decellularizzato, sollecitati con portata in ingresso pari a 30 $\mu\text{l}/\text{min}$, la pressione raggiungesse la zona di plateau del segnale in prossimità del valore di saturazione del sensore (250 mmHg), non permettendo di osservare completamente la dinamica del segnale, non essendo ancora giunto al termine del transitorio. Dal momento che il valore di plateau del segnale di pressione è proporzionale alla portata imposta in ingresso (*Paragrafo 5.1.2.2*) si è scelto di sostituire tale valore di portata in ingresso con 15 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Durante la prova, il volume erogato dalla pompa (V) e la caduta di pressione (P) a cavallo del campione vengono registrati automaticamente dal SW di monitoraggio e controllo. Una volta terminata la prova, tali valori sono stati riportati su una curva pressione-volume (P-V). Nell'ambito del presente lavoro di tesi, come detto, l'esecuzione della prova di permeabilità ha consentito anche di analizzare le proprietà di distensibilità del patch: traendo spunto dall'analisi effettuata attraverso test di trazione monoassiale ed in particolare dall'estrazione dei 6 parametri caratteristici delle curve σ - ε (*Paragrafo 3.3.2.1*), si è proceduto a calcolare 4 parametri caratteristici del comportamento P-V dei campioni (Figura 3.10).

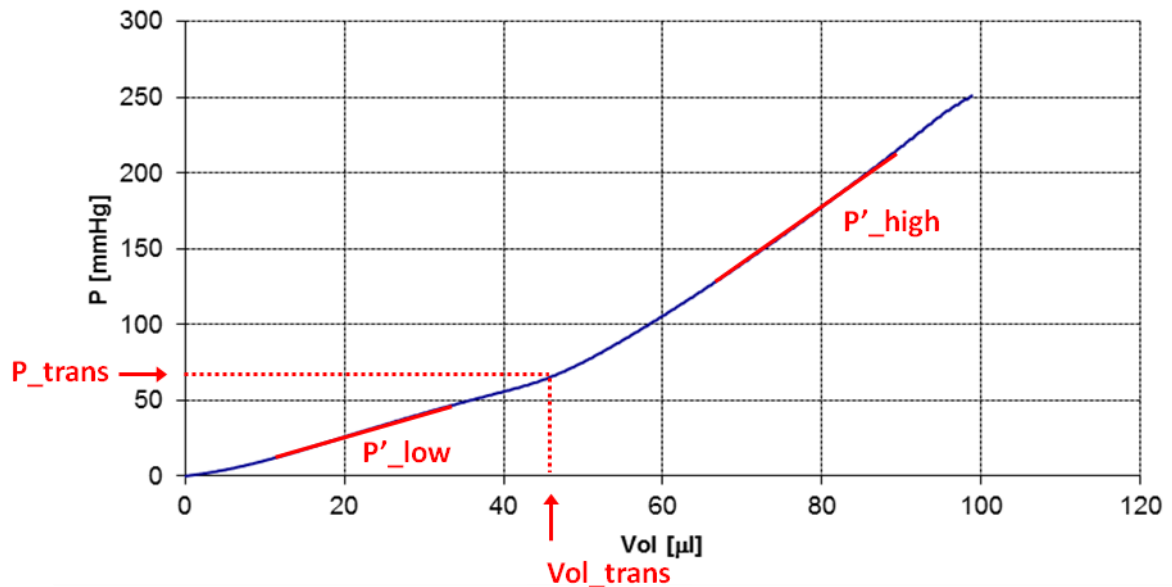


Figura 3.10: Curva P-V con i parametri caratteristici del comportamento del campione. In figura, è stato riportato, a titolo esemplificativo, il caso di un campione di tessuto nativo in cui la pressione raggiunge il valore di saturazione del sensore e quindi il coefficiente di permeabilità è nullo.

I parametri estratti dalla curva P-V sono descritti brevemente qui di seguito:

- P'_{low} : pendenza iniziale della curva P-V, caratterizzata da un piccolo incremento del valore di pressione a seguito dell'infusione di fluido da parte della pompa. E' rappresentativa del comportamento dovuto alle fasi iniziali di deformazione del patch a seguito dell'infusione di fluido;
- P'_{high} : pendenza della curva P-V in corrispondenza di alti valori di deformazione del patch dovuta all'infusione del fluido, caratterizzata da un più elevato incremento del valore di pressione a seguito di piccole variazioni di volume;
- V_{trans} : volume di transizione, stimato come il valore dell'intercetta fra la retta con pendenza P'_{high} e l'asse delle ascisse; va a identificare il valore di volume per il quale la curva P-V mostra il cambiamento di pendenza.
- P_{trans} : pressione di transizione, ossia il valore di pressione sulla curva in corrispondenza di V_{trans} .

Nel caso in cui, durante il test, un campione raggiunga, per tutti i valori di portata imposti, un plateau di pressione, caso tipico dei provini di tessuto decellularizzato, dalla curva P-V viene estrapolato un ulteriore parametro, la $P_{plateau}$. I 3 valori di $P_{plateau}$ ottenuti per ciascun

valore di Q vengono poi utilizzati per il calcolo del valore di permeabilità del campione. Plottando, infatti, su un grafico P-Q i valori di $P_{plateau}$ misurati alle varie portate, è possibile interpolare tali punti sperimentali tramite una retta di regressione lineare (*retta P-Q*). Il calcolo dell'inverso del coefficiente angolare della retta *P-Q* rappresenta il valore di K , misurato quindi in $\mu\text{l min}^{-1} \text{mmHg}^{-1}$.

3.3.2.3 *Analisi statistica*

L'analisi statistica dei dati ottenuti dalle prove di trazione monoassiale e di permeabilità è volta a indagare se vi siano differenze *statisticamente significative* tra campioni appartenenti a gruppi differenti (pericardio nativo *vs.* decellularizzato *vs.* fissato), al fine di valutare se i trattamenti subiti dal tessuto ne alterino significativamente le proprietà meccaniche.

Per prima cosa, sono stati eseguiti test di normalità Shapiro-Wilk per discriminare tra popolazioni di dati normali e non-normali. In seguito, sono stati condotti i test di omogeneità della varianza (ANalysis Of VAriance, ANOVA), con il seguente criterio:

- Popolazione di dati normale: ANOVA parametrica a una via (one-way ANOVA), seguita da test *post-hoc* di Newman-Keuls;
- Popolazione di dati non-normale: ANOVA non parametrica (test di Kruskal-Wallis), seguita da test *post-hoc* di Dunn.

In tutti i test, un valore di $p\text{-value} < 0.05$ è stato considerato come identificativo di differenze statisticamente significative.

Capitolo 4

PROCEDURE SPERIMENTALI PER LA RICELLULARIZZAZIONE DELLE MATRICI DI PERICARDIO DECELLULARIZZATE

Dall'analisi della letteratura (*Capitolo 2*) è emerso che la maggior parte degli approcci di TEHV basati sull'utilizzo di matrici di tessuto biologico decellularizzate per la fabbricazione dei leaflet valvolari della bioprotesi prevede una fase di ricellularizzazione *in vitro* delle matrici stesse prima dell'impianto *in vivo*. Questa fase consiste nella semina e nella coltura di cellule sugli scaffold al fine di ottenere un costrutto ingegnerizzato che sia efficace nel ripristino della funzionalità della valvola patologica. Seguendo quindi le indicazioni della letteratura, nel presente lavoro si è proceduto alla definizione di opportuni setup e procedure sperimentali per la semina e la coltura di cellule volta al ripopolamento del tessuto pericardico porcino decellularizzato (*Capitolo 3*).

Il primo step è stato la progettazione, la realizzazione ed il collaudo di un sistema che permettesse di eseguire una semina confinata (ovvero su una specifica superficie del foglietto di pericardio) e la coltura statica delle cellule sulle matrici da ricellularizzare. In particolare, si è giunti alla realizzazione di un elemento di contenimento della sospensione cellulare seminata e del terreno di coltura in cui le cellule sono mantenute durante la coltura che è stato integrato, insieme alla cartuccia portascaffold in PDMS (*Paragrafo 3.3.2.2*), in un sistema di coltura cellulare standard, costituito da una *multiwell* da 6 pozzetti.

Inoltre, è stato definito un protocollo di decontaminazione delle porzioni di pericardio porcino decellularizzato da effettuarsi prima della coltura cellulare: bisogna infatti ricordare che il tessuto pericardico porcino utilizzato non può essere considerato privo di contaminazioni da parte di agenti patogeni, dal momento che i cuori da cui vengono isolati i pericardi sono prelevati presso un macello e, quindi, non in condizioni di sterilità. La contaminazione del tessuto da parte di agenti patogeni impedirebbe la ricellularizzazione, danneggiando le cellule deputate alla colonizzazione della matrice e inficiando quindi

l'efficacia della semina. In questa fase del lavoro sono stati effettuati opportuni test volti ad indagare la carica batterica iniziale del tessuto nativo, al termine della procedura di decellularizzazione, ed in seguito al processo di decontaminazione, per valutare l'efficacia della procedura di decontaminazione effettuata.

In seguito, si è proceduto alle operazioni di estrazione di Valve Interstitial Cells (VICs) da seminare per il ripopolamento del tessuto e dunque alla loro semina. La definizione del protocollo di ricellularizzazione dei patch ha previsto lo svolgimento di test di espansione delle VICs su piastra per definire la densità di semina ottimale. La semina delle VICs sul tessuto decellularizzato è avvenuta seminando, in esperimenti differenti, sia la superficie fibrosa che quella sierosa del pericardio, al fine di definire quale fosse la superficie più adatta al ripopolamento del tessuto. Inoltre, per ciascuna delle due superfici del foglietto di pericardio, sono state considerate due densità cellulari di semina e due tempi di coltura, con lo scopo di definire un protocollo ottimale di semina che consentisse un adeguato ripopolamento del tessuto. La caratterizzazione biologica dei costrutti ricellularizzati ha permesso di valutare l'effetto dei diversi parametri di coltura.

Nel presente capitolo verranno descritte nel dettaglio tutte le procedure sperimentali adottate nell'esecuzione delle prove di ricellularizzazione sopradescritti. Tutti i protocolli sono stati sviluppati in collaborazione tra il μ BS Lab del Politecnico di Milano e il Laboratorio di Ingegneria Tissutale Cardiovascolare del Centro Cardiologico Monzino.

4.1 Sistema per la semina e la coltura confinata di patch di pericardio decellularizzato

4.1.1 Progettazione e realizzazione del sistema di coltura

Nel definire il protocollo di ricellularizzazione del patch ci si è scontrati spesso con la mancanza di dati di letteratura che permettano di definire quale sia la superficie del foglietto di pericardio (fibroso vs. sieroso, *Paragrafo 2.3.2*) che favorisca l'adesione delle cellule seminate e la colonizzazione del tessuto. Nell'ambito del presente lavoro di tesi si è reso pertanto necessario eseguire degli opportuni test. Questo ha comportato la necessità di progettare un sistema che permettesse la semina e la coltura confinata delle cellule sulla specifica superficie che si desidera ricellularizzare.

Nella fase di progettazione di tale sistema sono state definite le specifiche di progetto qui sotto elencate:

- Il sistema deve consentire di effettuare l'alloggiamento del patch di tessuto senza che questo venga inciso/lacerato/danneggiato durante le operazioni manuali da svolgersi.
- Tutti gli elementi che compongono il sistema devono essere sterilizzabili, in modo che questi possano essere resi sterili prima del loro utilizzo. Il metodo di sterilizzazione deve essere scelto in modo da non compromettere e danneggiare i materiali di cui sono costituiti i componenti.
- Il sistema deve garantire facilità di montaggio e assemblaggio dei vari elementi sotto cappa, affinché il mantenimento della sterilità del sistema non sia compromesso da manovre complesse da parte dell'operatore.
- Il sistema deve garantire compatibilità con le buone procedure di laboratorio (*GLP*, *Good Laboratory Practice*), ossia quell'insieme di regole volte a promuovere la qualità della ricerca non clinica, al fine di avere dati sperimentali affidabili che possano essere poi diffusi a livello scientifico.
- Il volume di priming del sistema, quindi il volume di medium di coltura da utilizzare per le colture, deve essere minimizzato al fine di ridurre i costi dei materiali utilizzati per gli esperimenti, ma allo stesso tempo sufficiente a garantire una corretta ossigenazione delle cellule per tutta la durata della coltura.
- Il sistema deve garantire la tenuta idraulica del mezzo di coltura e della sospensione cellulare seminata.
- Le operazioni di montaggio/assemblaggio/utilizzo del sistema devono poter essere standardizzate, condizione necessaria per garantire la ripetibilità degli esperimenti.

Il sistema per la coltura confinata progettato secondo queste specifiche consiste in 3 elementi: 1) elemento di alloggiamento del patch (cartuccia portasccaffold e o-ring), 2) elemento di confinamento della sospensione cellulare seminata (reservoir), 3) *multiwell* da 6 pozzetti.

1. L'elemento di alloggiamento del patch di tessuto è composto da *i*) cartuccia portasccaffold realizzata in PDMS (Figura 4.1 già descritta nel *Paragrafo 3.3.2.2*) e

da *ii*) o-ring in gomma siliconica [85]. Oltre alla sede prevista per l'alloggiamento dello scaffold, la cartuccia presenta un foro interno di diametro 8 mm, utilizzato per l'accoppiamento con le altre componenti del sistema (reservoir);

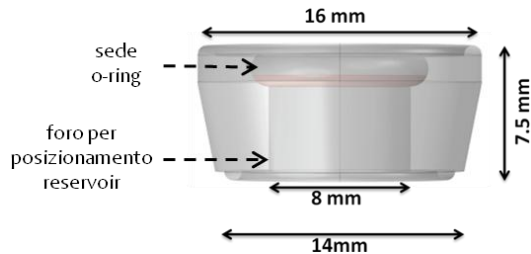


Figura 4.1: Disegno CAD, realizzato tramite il software ProEngineer®, della cartuccia portasccaffold con il patch (in rosa) alloggiato al suo interno [85]. La cartuccia viene accoppiata agli elementi che costituiscono il sistema di coltura mediante un foro passante di diametro 8mm.

2. Un elemento, chiamato reservoir, realizzato in poliossimetile (POM, commercialmente noto come Delrin®), utilizzato per il confinamento della sospensione cellulare e del mezzo di coltura in cui le cellule sono mantenute (Figura 4.2), che è stato progettato e realizzato nel presente lavoro di tesi.

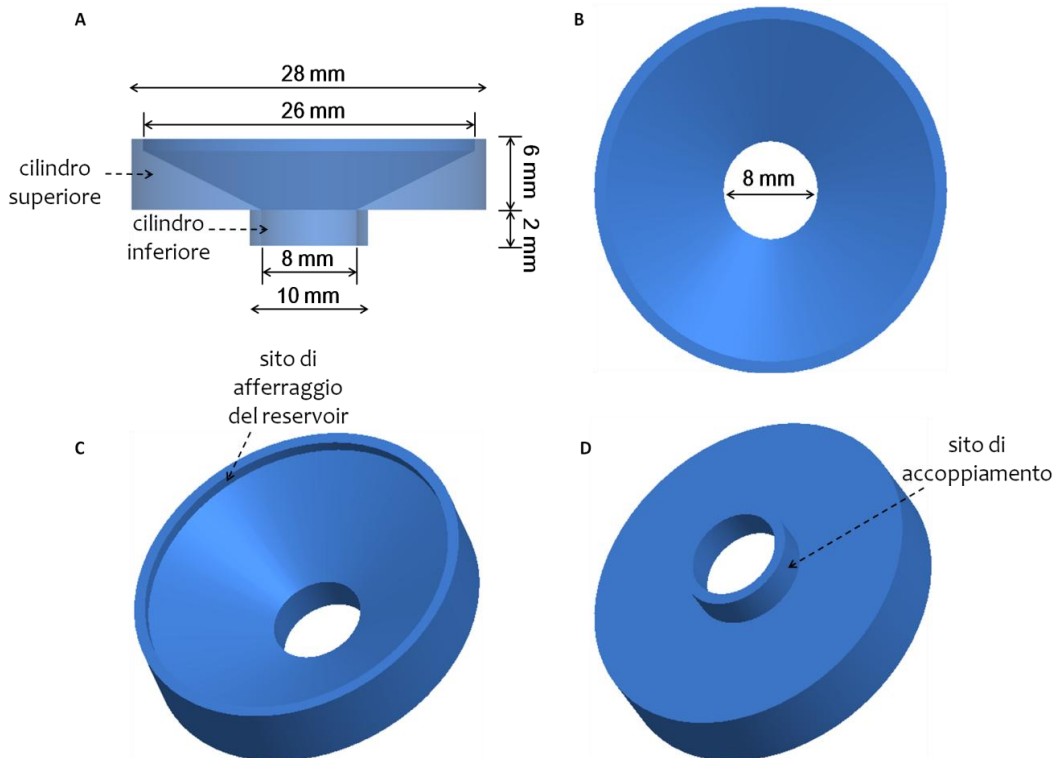


Figura 4.2: Disegno CAD, realizzato tramite il software ProEngineer®, del reservoir progettato nel presente lavoro di tesi: vista frontale (A), vista dall'alto (B) e viste isometriche (C, D) che permettono di

visualizzare il profilo interno conico della parte superiore del reservoir (A, C), il sito per l'afferraggio dell'elemento (C) e il sito di accoppiamento dell'elemento con la cartuccia portascaffold (D).

Il reservoir è costituito da due cilindri coassiali cavi che si sviluppano attorno ad un foro centrale. Il cilindro superiore (Figura 4.2A, diametro esterno: 28 mm) presenta, internamente, un profilo conico (Figura 4.2C) che funge da elemento di contenimento del terreno di coltura necessario per l'apporto di ossigeno e nutrienti alle cellule: è in comunicazione con il patch seminato attraverso il foro centrale (Figura 4.2B, diametro 8mm); è dotato inoltre di un profilo cilindrico (Figura 4.2C), progettato per facilitare l'afferraggio dell'elemento tramite l'uso di pinze chirurgiche ed eseguire agevolmente le fasi di manipolazione del sistema, riducendo il rischio di introduzione di contaminazione. Il cilindro inferiore (Figura 4.2A,D, diametro esterno: 10 mm) rappresenta il sito di accoppiamento del reservoir con la cartuccia portascaffold: l'accoppiamento avviene per interferenza geometrica; in dettaglio, il cilindretto cavo del reservoir viene inserito nel foro della cartuccia portascaffold: il profilo interno della cartuccia, in materiale elastico (PDMS), viene così dilatato, comprimendosi sul profilo esterno del cono del reservoir e garantendo la tenuta idraulica del sistema.

Il reservoir è stato realizzato mediante tecnica di prototipazione rapida: il disegno CAD dell'elemento, realizzato con software Pro/Engineer Wildfire 4.0 (PTC, Needham, MA), è stato inviato come file di input al software che controlla la fresa a controllo numerico (Modela MDX-40, Roland DG Corporation, Giappone), tramite la quale, effettuando una lavorazione per asportazione di materiale, si è giunti all'ottenimento del componente finale. Il profilo esterno del cilindro inferiore è stato poi ricavato al tornio tramite lavorazione per asportazione di materiale.

3. Una piastra multi-pozzetto per colture cellulari (*multiwell* da 6 pozzetti, Corning®, Sigma-Aldrich, Germania, Figura 4.3) all'interno della quale vengono inseriti i due elementi sopra descritti.

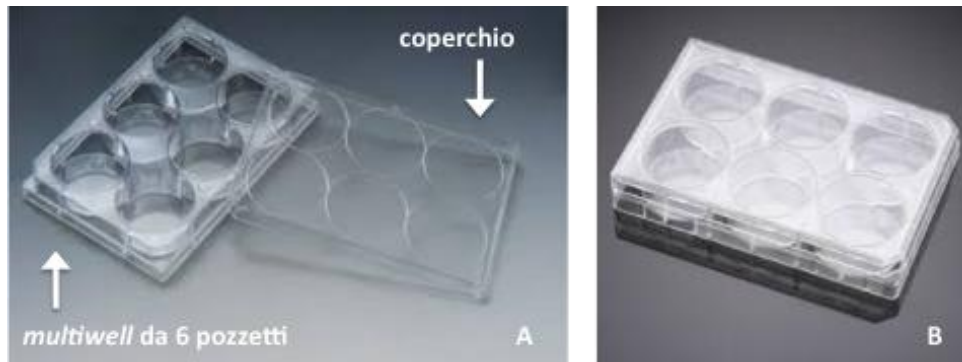


Figura 4.3: *Multiwell* da 6 pozzetti e coperchio (A). Una volta inseriti i campioni all'interno dei pozzetti, il coperchio viene appoggiato sulla base garantendo il mantenimento della sterilità e lo scambio di gas necessario ad ossigenare i costrutti cellulari in coltura all'interno dell'incubatore (B).

La *multiwell*, che consente di eseguire fino a 6 colture in parallelo, funge da elemento per l'alloggiamento dei campioni in condizioni di sterilità nell'incubatore. Il reservoir e la cartuccia sono stati dimensionati in modo tale da poter essere inseriti all'interno della *multiwell*: in particolare, le dimensioni dei due elementi assemblati sono compatibili con quelle dei pozzetti (diametro: 34.8 mm; altezza: 16 mm).

L'accoppiamento tra i vari elementi costituenti il sistema per la ricellularizzazione del patch viene schematizzato in Figura 4.4.

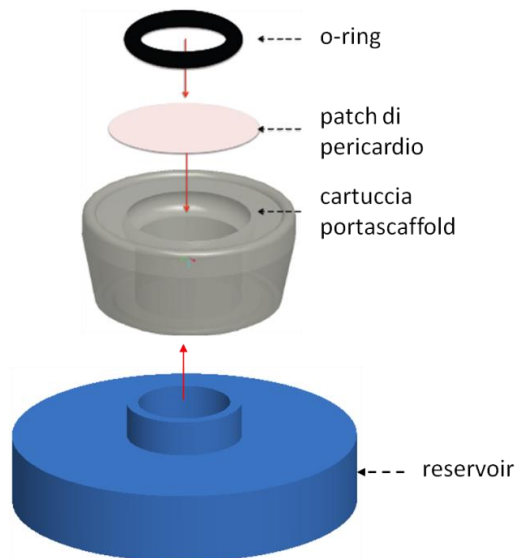


Figura 4.4: Disegno CAD, realizzato tramite il software ProEngineer®, delle componenti per la semina del patch di pericardio decellularizzato. Le frecce rosse indicano come assemblare i diversi elementi del sistema.

Una volta assemblati gli elementi e vincolato il patch di pericardio decellularizzato nella cartuccia portasccaffold, il sistema viene capovolto, esponendo verso l'alto la superficie del patch che si intende seminare, ed inserito nel pozzetto della *multiwell* (l'intera sequenza di operazioni viene descritta in dettaglio in Figura 4.5) permettendo la semina confinata delle cellule sulla superficie del patch delimitata dal profilo interno della cartuccia in PDMS ed il contenimento di un volume di mezzo di coltura pari a circa 1.5 ml all'interno del cono del reservoir.

4.1.2 Collaudo del sistema di coltura: prove di tenuta

Al fine di verificare che il sistema di coltura non provocasse trafilamento del mezzo di coltura contenuto nel reservoir e, quindi, assicurasse il confinamento della sospensione cellulare seminata sul patch e il mantenimento di un adeguato volume di mezzo di coltura, sono state effettuate delle prove di collaudo volte a verificare la tenuta idraulica del sistema:

- all'interfaccia tra o-ring e cartuccia ovvero la sede di ancoraggio del tessuto al sistema;
- all'interfaccia tra reservoir e cartuccia portasccaffold (accoppiati per interferenza geometrica);
- a cavallo del tessuto decellularizzato: il processo di decellularizzazione genera infatti, un certo grado di porosità del tessuto che potrebbe causare fenomeni di filtrazione delle cellule o del medium attraverso la matrice.

La presenza di eventuali trafiletti a carico di uno o più siti tra quelli appena elencati provocherebbe una progressiva "perdita" delle VICs in sospensione, appena seminate, che andrebbero a depositarsi poi sul fondo del pozzetto, inficiando così la ricellularizzazione del tessuto. Inoltre, è necessario verificare che non avvengano trafiletti di medium, con conseguente disidratazione del tessuto e morte cellulare.

Le prove di tenuta sono state condotte utilizzando 2 porzioni di pericardio nativo e 2 di pericardio decellularizzato: l'utilizzo delle due tipologie di tessuto (il tessuto nativo è impermeabile, come dimostrato dalle prove di permeabilità effettuate e descritte nel *Paragrafo 3.3.2.2*) ha consentito di analizzare separatamente la presenza di eventuali

trafilamenti dovuti alla porosità del tessuto decellularizzato da quelli che potrebbero avvenire all'interfaccia tra i vari elementi che costituiscono il sistema.

La prova di tenuta ha previsto:

1. il montaggio del patch di tessuto (pericardio nativo/decellularizzato) sul sistema di coltura e l'inserimento del sistema all'interno dei pozzetti della *multiwell*.
2. il riempimento del reservoir con 1.5 ml di mezzo di coltura (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, Lonza, Belgio), contenente il 10% di siero fetale bovino (HyClone, Thermo Scientific, USA) ed incubazione a 37°C del campione fino al mattino seguente (*overnight*).
3. Al termine della prova, misura del volume del mezzo contenuto nel reservoir

4.2 Uso del sistema di coltura per la ricellularizzazione del pericardio in condizioni di sterilità

Prima dell'utilizzo del sistema per la semina e coltura confinata delle VICs sui patch di pericardio decellularizzato, sono stati definiti i protocolli per il raggiungimento, ed il successivo mantenimento in particolare durante le operazioni di allestimento dei campioni, delle condizioni di sterilità necessarie per la sopravvivenza delle cellule per tutta la durata degli esperimenti.

Il raggiungimento di questi obiettivi ha previsto diverse fasi, descritte nei paragrafi successivi:

- la sterilizzazione di tutti i componenti del sistema per la semina e coltura confinata progettato;
- la definizione di un trattamento decontaminante del tessuto pericardico decellularizzato;
- la definizione di un protocollo per l'alloggiamento del patch di pericardio decontaminato nel sistema di coltura, sotto cappa, in condizioni di sterilità;
- la valutazione dell'efficacia delle procedure sopracitate in termini di mantenimento della sterilità del sistema.

4.2.1 Sterilizzazione del sistema di coltura

La sterilizzazione è una procedura che ha come obiettivo la rimozione, mediante metodi chimici o fisici (o una combinazione dei due), di tutti i microrganismi (patogeni e non) presenti in un determinato elemento. A tale scopo, il metodo più utilizzato nei laboratori biologici è la sterilizzazione in autoclave. La sterilizzazione in autoclave è infatti una procedura rapida e dai costi relativamente bassi ed è basata sull'esposizione degli elementi da sterilizzare ad un flusso di vapore saturo in pressione ad alta temperatura per un certo intervallo di tempo. Questa tecnica permette la sterilizzazione di una vastissima gamma di materiali, eccezion fatta per i materiali termolabili, che verrebbero danneggiati dall'elevata temperatura che si genera in autoclave. In questi casi, si utilizzano tecniche di sterilizzazione differenti, quali la sterilizzazione mediante gas (ossido di etilene, EtO), o radiazioni (radiazioni gamma o beta). Tuttavia, dal momento che tutti i componenti del sistema per la coltura cellulare realizzato nel presente lavoro di tesi (*Paragrafo 4.1*) sono composti da materiali resistenti alle alte temperature, si è dunque utilizzata la tecnica di sterilizzazione in autoclave, le cui procedure vengono descritte brevemente qui di seguito.

Prima della sterilizzazione in autoclave, gli elementi da sterilizzare devono essere posti e sigillati all'interno di appositi contenitori (buste) permeabili al vapore. Questi permetteranno di preservare la sterilità degli elementi dopo la rimozione dall'autoclave e fino al momento del loro utilizzo. Una volta che i contenitori con gli oggetti da sterilizzare sono stati posti nella camera di sterilizzazione, l'autoclave viene chiusa ermeticamente e l'acqua distillata contenuta nel serbatoio dello strumento viene portata ad ebollizione ad alta pressione, creando vapore saturo che va a condensare sull'elemento da sterilizzare, riscaldandolo. Per garantire che il vapore investa in maniera efficace tutte le superfici dell'elemento, è necessario rimuovere l'aria dalla camera di sterilizzazione, in quanto questa creerebbe delle zone a temperatura minore, potenzialmente al di sotto di quella necessaria per un'efficace sterilizzazione. Se l'elemento da sterilizzare presenta delle cavità o delle porosità è inoltre necessario rimuovere l'aria da questi volumi, in modo che vi possa penetrare il vapore. Per la rimozione dell'aria esistono diverse tecniche, quali l'utilizzo di un flusso di vapore che attraversa la camera di sterilizzazione o l'utilizzo di una pompa da vuoto. Al termine della sterilizzazione, è prevista poi una fase di asciugatura degli elementi sterilizzati, per la rimozione della condensa.

Il protocollo di sterilizzazione dei componenti del sistema (ad eccezione della *multiwell*, prodotto commerciale già sterile) utilizzato nel presente lavoro di tesi prevede 4 fasi principali:

1. Lavaggio: tutti i componenti (cartuccia portascaffold, o-ring e reservoir, tra loro disassemblati) e tutti gli strumenti (pinze e forbici chirurgiche) che verranno usati per la manipolazione del sistema e dei patch di pericardio, sono stati decontaminati per immersione in detergente antibatterico (Anyosime, Anios, Francia) per 20 minuti. Dopo la decontaminazione, i componenti del sistema sono stati accuratamente lavati con acqua distillata, asciugati mantenendoli sotto cappa fino a completa evaporazione dell'acqua usata per il lavaggio e immersi poi in una soluzione di etanolo 70%. I vari componenti sono stati poi di nuovo mantenuti per circa 10 minuti sotto cappa per consentire l'evaporazione dell'etanolo. Lo scopo di queste operazioni è quello di rimuovere eventuali sostanze inorganiche presenti sulla superficie degli elementi e di diminuire la carica batterica iniziale presente in tutti i componenti del sistema di coltura.

2. Assemblaggio cartuccia-reservoir: l'accoppiamento tra cartuccia e reservoir si è dimostrata essere una manovra caratterizzata da elevato potenziale di introduzione di contaminazione del sistema, specialmente se effettuata da operatori non esperti; pertanto, si è deciso di assemblare i due elementi, precedentemente decontaminati, sotto cappa, prima della sterilizzazione, così da evitare un'ulteriore manipolazione dei componenti una volta sterilizzati, con il rischio di reintrodurre contaminazione. Per tale ragione, in fase di lavaggio degli elementi (punto 1 del presente protocollo), è necessario prestare particolare attenzione alla decontaminazione delle superfici d'interfaccia tra cartuccia portascaffold e reservoir che, una volta assemblato il sistema, potrebbero essere raggiunte con maggior difficoltà dal vapore dell'autoclave.

3. Preparazione dei contenitori per l'autoclave: tutti i componenti del sistema sono stati suddivisi in contenitori per la sterilizzazione in autoclave. I contenitori sono stati organizzati in modo da separare i componenti del sistema dagli strumenti chirurgici e da rendere agevole il prelievo dei vari elementi dai contenitori al momento del loro utilizzo:

- *Contenitori_sistema*: ogni *Contenitore* contiene i componenti (reservoir e cartucce portasccaffold assemblati ed i relativi o-ring) utili a condurre 6 test di coltura;
- *Contenitore_strumenti*: contiene gli strumenti per la manipolazione dei componenti e dei campioni di pericardio (una forbice e due pinze chirurgiche).

4. Sterilizzazione: i contenitori sono stati posti in autoclave e sterilizzati secondo il protocollo standard per laboratori biologici che consiste in un ciclo di autoclave di durata pari a 20 min con vapore in pressione a 2 bar ed alla temperatura di 121°C.

Terminato l'ultimo passaggio si attende che gli elementi sterilizzati si siano raffreddati e completamente asciugati.

4.2.2 Decontaminazione del pericardio

Come discusso in precedenza, le porzioni di tessuto pericardico da cui vengono ricavati i patch per la decellularizzazione e la successiva ricellularizzazione con VICs vengono isolate da cuori di maiale prelevati presso un macello, ed è pertanto plausibile dedurre che queste presentino una carica batterica non trascurabile. Ciò è dovuto al fatto che, oltre ad una possibile carica batterica intrinseca nell'organo del donatore, la procedura e l'ambiente in cui esso viene prelevato non sono sterili. Esperimenti preliminari di semina di porzioni di tessuto pericardico decellularizzato, hanno infatti evidenziato contaminazioni da parte di batteri e lieviti ascrivibile con un buon grado di sicurezza alla non-sterilità del tessuto piuttosto che agli altri componenti del sistema (sistema di coltura e/o VICs) o ad operazioni errate da parte dell'operatore che abbiano compromesso la sterilità di alcuni elementi. Questo ha portato ad ipotizzare che la procedura di decellularizzazione utilizzata non sia sufficiente ad abbattere la carica batterica iniziale del tessuto. Per questo motivo si è resa necessaria la definizione di un protocollo di decontaminazione del tessuto, da eseguirsi dopo la fase di decellularizzazione, e la messa a punto di analisi volte ad indagare l'efficacia del protocollo (analisi della carica batterica del tessuto a seguito del trattamento di decontaminazione).

Il trattamento di decontaminazione, messo a punto presso il Centro Cardiologico Monzino, consiste nell'incubazione delle porzioni di pericardio porcino decellularizzato all'interno di

una soluzione decontaminante (BASE.128, AL.CHI.MIA S.R.L., Italia), costituita dalla combinazione di 4 antibiotici (Vancomicina, Gentamicina, Cefotaxima e Amfotericina B Desossicolato) a concentrazioni non rese note dal produttore), attiva contro i più frequenti agenti contaminati (batteri Gram+ e Gram-, muffe e lieviti). La soluzione BASE.128 è ampiamente utilizzata in clinica per la decontaminazione, ad esempio, di tessuti/organi umani destinati al trapianto, oltre che per il loro trasporto e stoccaggio all'interno della banca dei tessuti, immediatamente dopo il prelievo da donatore. Il tempo d'immersione nella soluzione, generalmente compreso tra le 24h e le 72h, dipende dalla specifica tipologia di tessuto e dalla carica batterica che lo interessa. Nel decontaminare il pericardio porcino decellularizzato, si è deciso di valutare l'efficacia dell'azione del BASE.128 dopo 24h e 72h di incubazione. Al termine del trattamento di decontaminazione, devono essere effettuati dei lavaggi dei tessuti incubati per rimuovere i residui di BASE.128, i quali potrebbero compromettere la colonizzazione da parte delle VICs in fase di coltura dei patch.

4.2.3 Alloggiamento del patch di pericardio decellularizzato nel sistema di coltura in condizioni di sterilità

Una volta sterilizzati i componenti del sistema di coltura e decontaminate le porzioni di pericardio decellularizzate, è stato necessario definire un protocollo che permetta un agevole alloggiamento dei patch di tessuto biologico all'interno del sistema. L'alloggiamento deve essere effettuato sotto cappa, così da minimizzare il rischio di reintroduzione di contaminazioni e perdita della sterilità.

La procedura è stata messa a punto durante il presente progetto di tesi e consiste nelle seguenti operazioni che l'operatore effettua indossando guanti sterili (Figura 4.5):

1. Prelevare dall'autoclave i contenitori con i componenti sterilizzati (*Contenitore_sistema e Contenitore_strumenti, Paragrafo 4.2.1*) e porli sotto cappa a flusso laminare;
2. Individuare il *Contenitore_strumenti* e prelevare una pinza con cui manipolare i vari componenti del sistema, facendo attenzione a preservarne la sterilità;
3. Individuare il *Contenitore_sistema*, prelevare mediante la pinza il reservoir assemblato con la cartuccia portasccaffold ed il relativo o-ring e porli all'interno di

- un piatto Petri (Figura 4.5A), all'interno del quale verranno effettuate le successive manovre di assemblaggio del sistema;
4. Porre all'interno del piatto Petri un patch di tessuto pericardico decellularizzato e decontaminato e, aiutandosi con una seconda pinza prelevata dal *Contenitore_strumenti*, distendere il patch sopra l'o-ring (Figura 4.5B), esponendo verso l'alto la superficie che si intende seminare con le VICs;
 5. Afferrando con le pinze il complesso formato da reservoir e cartuccia portasccaffold, posizionarlo al di sopra del patch di pericardio, in corrispondenza dell'o-ring (Figura 4.5C) ed applicare una leggera pressione (Figura 4.5D, freccia rossa), forzando l'o-ring ad entrare nella sua sede all'interno della cartuccia, così da vincolare il patch;
 6. Rimuovere tramite forbici, prelevate dal *Contenitore_strumenti*, le porzioni di tessuto che fuoriescono dall'o-ring, ovvero le porzioni di tessuto esterne al sistema di confinamento e non utili ai fini della coltura (Figura 4.5E);
 7. Dopo averlo idratato disponendo una goccia (circa 0.2ml) di mezzo di coltura sulla sua superficie, disporre il campione montato all'interno del pozzetto della *multiwell* (Figura 4.5G);
 8. Riempire il reservoir con 1.5 ml di mezzo di coltura, andando così a idratare la superficie del patch destinata alla semina cellulare (Figura 4.5H).

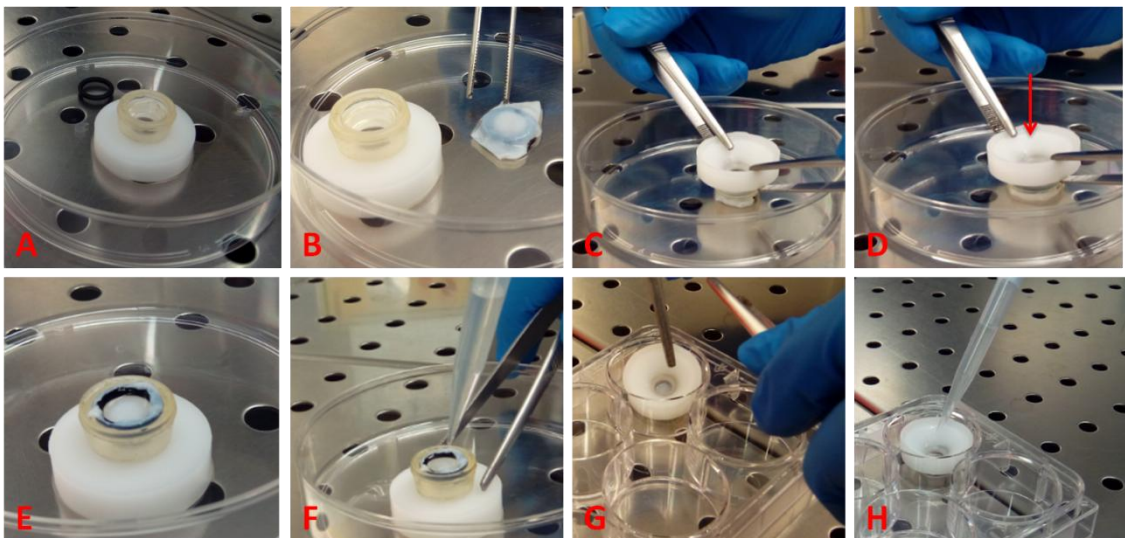


Figura 4.5: Sequenza di operazioni da eseguire per l'allestimento del sistema di coltura: (A) sistema di coltura pre-assemblato; (B) posizionamento del campione di tessuto sull'o-ring; (C) posizionamento del sistema sopra il campione e (D) fissaggio del campione, spingendo il reservoir lungo la direzione

indicata dalla freccia rossa; (E) patch vincolato alla cartuccia mediante l'o-ring dopo aver rimosso le parti in eccesso tramite forbice; (F) idratazione della superficie del campione mediante mezzo di coltura; (G) alloggiamento del campione montato all'interno del pozzetto della *multiwell*, capovolgendo il campione; (H) riempimento del reservoir con mezzo di coltura.

La fase 7 del protocollo sopradescritto (posizionamento del campione nel pozzetto), si compone in realtà di diversi passaggi, descritti qui di seguito, utili a facilitare l'alloggiamento del campione all'interno dei pozzetti senza che rimangano intrappolate bolle d'aria tra il patch di tessuto e la superficie del pozzetto: la presenza d'aria porterebbe infatti il tessuto a disidratarsi e quindi danneggiarsi; al contrario, il patch deve rimanere idratato con mezzo di coltura per tutta la durata dell'esperimento. Per far ciò:

7.1 Depositare una piccola quantità di medium (circa 0.2ml) sul fondo del pozzetto: il materiale idrofobico di cui sono realizzati i pozzetti (polistirene non trattato) consente la formazione di una goccia ben confinata di medium (ovvero non si osserva dispersione del medium sulla superficie del pozzetto);

7.2 Idratare la superficie del patch rivolta verso l'alto depositando su di essa ulteriori 0.2 ml di medium;

7.3 Alloggiare il sistema all'interno del pozzetto, afferrandolo con le pinze in corrispondenza del sito di afferraggio del reservoir (Figura 4.2), in posizione leggermente inclinata (Figura 4.5G) e raddrizzandolo poi lentamente consentendo la progressiva fuoriuscita dell'aria presente nel pozzetto e garantendo così la continuità di fluido tra il medium depositato sul fondo del pozzetto (7.1) e quello che bagna la superficie del patch (7.2).

La procedura appena descritta può essere utilizzata per predisporre, in successione, cinque ulteriori campioni di pericardio decellularizzato che verranno inseriti nei rimanenti pozzetti della *multiwell*: è necessario tuttavia risterilizzare gli strumenti (pinze e forbici) al termine di ciascuna procedura di montaggio, al fine di evitare eventuale cross-contaminazione dei diversi campioni. La sterilizzazione degli strumenti in questo caso avviene mediante una sterilizzatrice per uso ambulatoriale a sfere di quarzo (Ministeril, Carlo De Giorgi S.R.L., Milano, Italia): gli strumenti da sterilizzare vengono inseriti, per 15 secondi, all'interno di

una cavità contenente sfere di quarzo alla temperatura di 230-250°C. Questo permette la rapida e completa risterilizzazione degli strumenti.

Nel caso il numero di campioni desiderato per l'esperimento fosse superiore a 6, si può procedere all'apertura di un'ulteriore *Contenitore_sistema* precedentemente sterilizzato in autoclave e all'allestimento degli ulteriori campioni, ripetendo la procedura fin qui descritta utilizzando una nuova *multiwell*.

4.2.4 Prove di mantenimento della sterilità: test del tioglicolato

Una volta definite e testate le varie fasi preliminari alla ricellularizzazione (sterilizzazione del sistema di coltura, decontaminazione del pericardio e protocollo per l'alloggiamento dei patch in condizioni di sterilità), sono state condotte alcune analisi volte ad indagare, rispettivamente:

- *Esperimento 1*: l'effetto del trattamento di decontaminazione del tessuto con BASE.128, in funzione della durata dell'incubazione (24h e 72h) e l'efficacia del protocollo di alloggiamento del patch nel mantenimento della sterilità del sistema di coltura;
- *Esperimento 2*: l'effetto di una nuova fase di decontaminazione effettuata a valle della procedura di montaggio del campione nel sistema di coltura.

La tecnica d'analisi utilizzata per questi esperimenti è il test del tioglicolato. Il Tioglicolato Brodo (Biolife) è un terreno di coltura, limpido e di colore giallo paglierino, utilizzato comunemente per prove di sterilità batterica su prodotti per uso farmaceutico e materiali di origine biologica e per coltivare microrganismi aerobi, anaerobi e microaerofili [86, 87]. Ciò è permesso dalla presenza di due elementi, sodio tioglicolato e cistina, che agendo come agenti riducenti eliminano le molecole di ossigeno dal terreno; in questo modo si mantiene nel mezzo un basso potenziale di ossidoriduzione che previene la formazione di perossidi, letali per i microrganismi aerobi e anaerobi, amplificando così il loro potenziale proliferativo.

La prova consiste principalmente di 3 fasi:

1. Inserimento del campione all'interno della provetta di Tioglicolato Brodo (10ml di terreno);
2. Incubazione delle provette a 37°C per 7 giorni;
3. Controllo giornaliero del grado di limpidezza del mezzo. L'intorbidimento del terreno di coltura indica la presenza di contaminazione batterica. Se al termine del periodo d'incubazione il terreno risulta invece ancora limpido, il campione è, in prima analisi, considerato sterile. Un confronto tra il risultato di un test del tioglicolato negativo (campione sterile) e uno positivo (campione contaminato) è riportato, a titolo esemplificativo, in Figura 4.6.

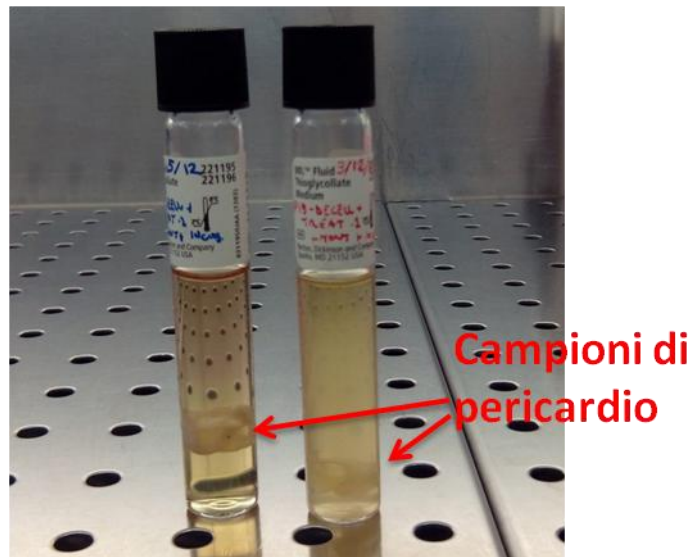


Figura 4.6: Test del tioglicolato: confronto della limpidezza del mezzo tra un campione sterile (sinistra) e uno contaminato (destra). Si noti l'evidente intorbidimento in caso di contaminazione batterica.

Nel caso di test positivo, il terreno di coltura può essere prelevato per analisi microbiologiche più specifiche, ovvero per classificare gli agenti contaminanti del campione. Nell'ambito di questo lavoro di tesi, tuttavia, si è scelto di non eseguire questa tipologia di analisi, essendo il test volto a valutare puramente la presenza di agenti contaminanti all'interno del pericardio porcino (nativo e decellularizzato), i quali, di qualunque natura essi siano, dovranno essere necessariamente eliminati prima di procedere

alla ricellularizzazione del patch. I protocolli per le due diverse prove di sterilità effettuate vengono riportati qui di seguito.

4.2.4.1 Esperimento 1

Questo esperimento ha come principale scopo quello di valutare quale sia la durata d'incubazione del tessuto in BASE.128 utile a garantire la decontaminazione del campione (24h vs 72h). Viene inoltre indagato se la procedura di montaggio del sistema di coltura (Paragrafo 4.2.3) garantisca il mantenimento della sterilità.

Il presente esperimento è stato effettuato in duplicato: sono stati utilizzati infatti due pericardi (P15 e P16), per aumentare la numerosità dei campioni ed evitare che i risultati siano polarizzati dalla specificità di un tessuto proveniente da singolo donatore.

Il protocollo per l'ottenimento dei diversi campioni da sottoporre al test del tioglicolato è schematizzato in Figura 4.7:

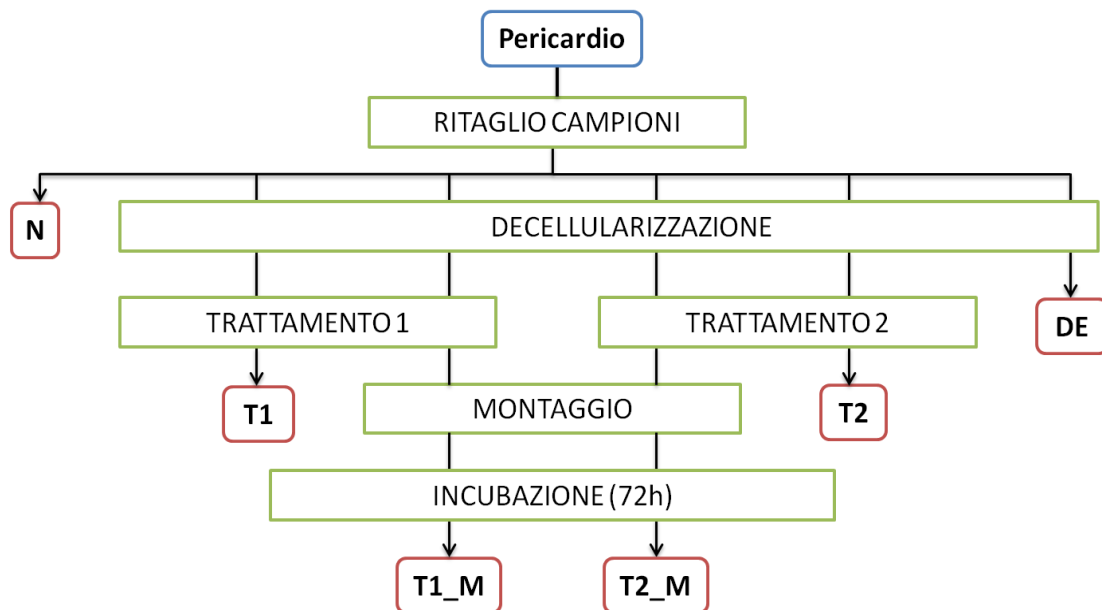


Figura 4.7: Schema riassuntivo delle varie condizioni allestite nelle prove di verifica di decontaminazione e mantenimento della sterilità mediante test del tioglicolato. N: tessuto nativo, DE: tessuto decellularizzato, T1: tessuto decellularizzato e sottoposto al Trattamento 1, T2: tessuto decellularizzato e sottoposto al Trattamento 2, T1_M: tessuto decellularizzato, sottoposto al Trattamento 1, montato sul sistema di coltura e incubato per 72h, T2_M: tessuto decellularizzato, sottoposto al Trattamento 2, montato sul sistema di coltura e incubato per 72h.

In riferimento allo schema presentato in Figura 4.7, le operazioni effettuate sono state:

1. Ricavare 6 campioni di tessuto nativo da ogni pericardio, seguendo la procedura descritta nel *Paragrafo 3.1* e disporli all'interno di 2 differenti tubi Falcon™ da 50 ml contenenti PBS con aggiunta di 1% di pen-strep, separando i campioni provenienti da donatori differenti;
2. Prelevare un campione di tessuto nativo (**N**) da ciascun tubo e sottoporlo al test del tioglicolato per quantificare la carica batterica iniziale del tessuto, e sottoporre i campioni rimanenti (n=5) al protocollo di decellularizzazione (*Paragrafo 3.1*);
3. Al termine della decellularizzazione, prelevare un campione (**DE**) per ciascun pericardio su cui effettuare il test del tioglicolato al fine di valutare la carica batterica presente al termine della decellularizzazione, ed incubare, suddividendoli in ugual numero, i rimanenti campioni (n=4) nella soluzione decontaminante BASE.128 a 4°C per 24h (Trattamento 1) e 72h (Trattamento 2);
4. Al termine dei due trattamenti, prelevare un campione per ciascun gruppo (**T1** e **T2**) su cui effettuare il test del tioglicolato, al fine di valutare l'efficacia dei due trattamenti utilizzati;
5. Montare i restanti campioni (n=2) sul sistema di coltura statico (*Paragrafo 4.2.3*) e porli in incubatore con mezzo di coltura completo (DMEM contenente l'1% di pen-strep, l'1% di L-glutamina e il 10% di siero fetale bovino, Hyclone) per 72h;
6. Al termine delle 72h d'incubazione, sottoporre i campioni (**T1_M** e **T2_M**) al test del tioglicolato. I campioni T1 e T2 precedentemente analizzati (punto 4 del protocollo) fungono inoltre da controllo rispetto ai campioni T1_M e T2_M: il confronto tra i risultati delle due popolazioni (montati/non montati sul sistema di coltura) consente di stabilire se l'eventuale perdita di sterilità dei campioni T1_M e T2_M sia dovuta alle operazioni di montaggio o conseguenza della non sterilità, in partenza, del tessuto utilizzato.

4.2.4.2 Esperimento 2

In base ai risultati ottenuti nell'Esperimento 1 (*Paragrafo 5.2.2.1*), si è deciso di introdurre una seconda fase di decontaminazione del tessuto pericardico decellularizzato, da eseguirsi successivamente al montaggio dei campioni sul sistema di coltura statico: tali risultati

infatti hanno dimostrato che l'incidenza di re-introduzione di contaminazione durante le operazioni di montaggio del sistema non è trascurabile, soprattutto in caso di operatore non esperto. Questa seconda fase consiste in un nuovo trattamento decontaminante con BASE.128, della durata di 24h, secondo le modalità illustrate nel protocollo riportato qui di seguito.

Per questo test sono stati utilizzati 2 ulteriori pericardi (P17 e P18), isolati e poi decellularizzati secondo il protocollo riportato nel *Paragrafo 3.1*.

Il protocollo per l'ottenimento dei diversi campioni da sottoporre al test del tioglicolato è schematizzato qui di seguito (Figura 4.8):

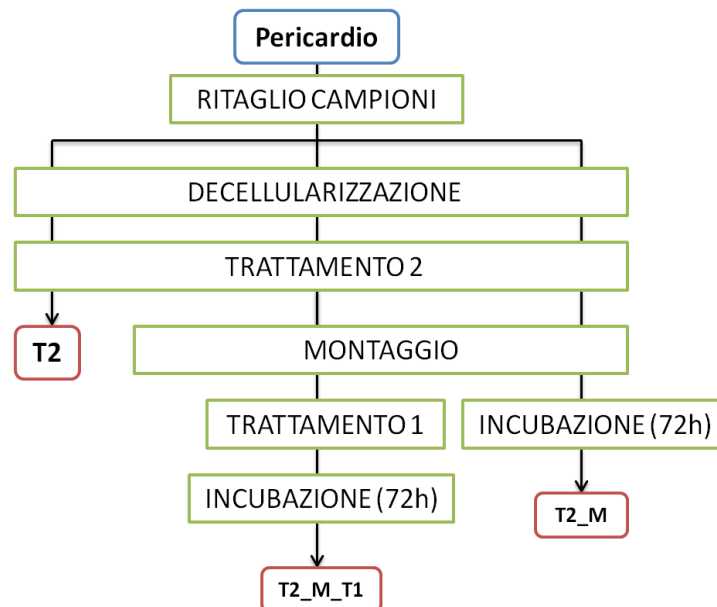


Figura 4.8: Schema riassuntivo delle varie condizioni allestite nelle prove di verifica di mantenimento della sterilità mediante test del tioglicolato su campioni di tessuto a seguito dell'introduzione di una seconda fase di trattamento decontaminante successiva al montaggio dei campioni sul sistema di coltura. T2: tessuto decellularizzato e sottoposto al Trattamento 2, T2_M: tessuto decellularizzato, sottoposto al Trattamento 2, montato sul sistema di coltura e incubato per 72h, T2_M_T1: tessuto decellularizzato, sottoposto al Trattamento 2, montato sul sistema di coltura, sottoposto al Trattamento 1 e incubato per 72h.

In riferimento allo schema riportato in Figura 4.8, sono state eseguite le seguenti operazioni:

1. Ricavare 3 porzioni di tessuto nativo da ogni pericardio, seguendo la procedura descritta nel *Paragrafo 3.1* e disporli all'interno di 2 tubi Falcon™ da 50 ml contenenti PBS con aggiunta di 1% di pen-strep, separando i campioni provenienti da donatori differenti;
2. Sottoporre tutti i campioni al protocollo di decellularizzazione (*Paragrafo 3.1*);
3. Al termine della decellularizzazione, immergere i campioni in BASE.128 per 72h (Trattamento 2), a 4°C;
4. Al termine del Trattamento 2, prelevare un campione (**T2**) per ciascun pericardio su cui eseguire il test del tioglicolato e montare i restanti campioni (n=2) sul sistema di coltura. Il campione T2 funge da controllo rispetto ai campioni montati sul sistema.
5. Porre uno dei campioni montati in incubatore con mezzo di coltura completo (DMEM contenente l'1% di pen-strep, l'1% di L-glutamina e il 10% di siero fetale bovino, Hyclone), per 72h. Al termine delle 72h, effettuare il test del tioglicolato sul campione (**T2_M**).
6. Incubare nuovamente i restanti campioni in BASE.128 per 24h a 4°C (Trattamento 1); il campione T2_M funge da controllo rispetto alla condizione dei campioni montati e sottoposti al nuovo trattamento di decontaminazione;
7. Al termine del Trattamento 1, porre i campioni in incubatore con mezzo di coltura completo per 72h. Al termine delle 72h, effettuare il test del tioglicolato sui campioni (**T2_M_T1**).

4.3 Ricellularizzazione e caratterizzazione dei patch di pericardio decellularizzato

4.3.1 Isolamento delle Valve Interstitial Cells

Le Valve Intestitial Cells (VICs) sono una popolazione di cellule eterogenee che popola la struttura delle valvole cardiache e che gioca un ruolo fondamentale nel mantenimento della funzionalità valvolare [88]. Tra le principali funzioni espletate da questa popolazione di cellule (Figura 4.9), oltre alla modulazione della risposta immunitaria e la produzione di citochine, vi sono infatti la produzione di tutti i costituenti della ECM (collagene, elastina,

proteoglicani e glicosamminoglicani) dei foglietti della valvola e il rimodellamento della stessa, mediante la produzione di metalloproteasi di matrice (MMPs) e i relativi inibitori (TIMPs) che modulano il rilascio dei fattori di crescita prodotti dalle cellule stesse. Mediante questa serie di azioni, le VICs sono in grado di provvedere alla riparazione delle valvole cardiache in caso di danneggiamento dovuto agli sforzi meccanici cui esse sono sottoposte durante il funzionamento *in vivo*.

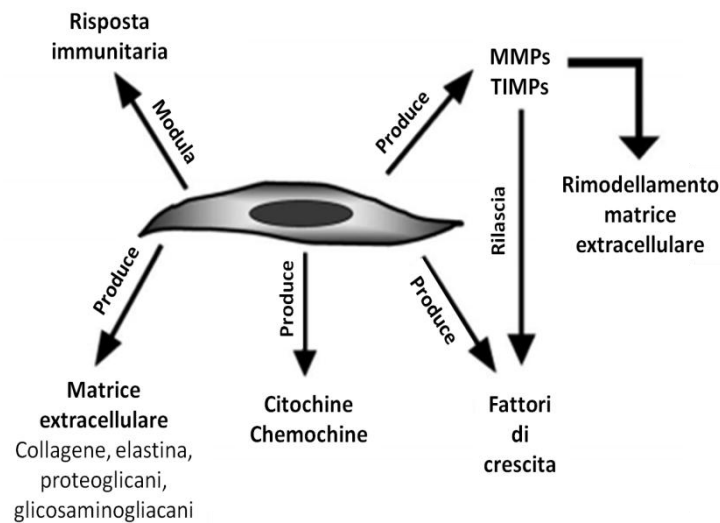


Figura 4.9: Principali funzioni delle Valve Interstitial Cells (VICs) [88].

Nell'ambito del presente lavoro di tesi, si è dunque scelto di utilizzare le VICs porcine per il ripopolamento delle matrici di pericardio decellularizzato, in modo da colonizzare lo scaffold con cellule proprie del tessuto che andrà a sostituire, così da rendere il costrutto ingegnerizzato potenzialmente in grado di svolgere correttamente tutte le funzioni svolte dalla valvola nativa.

Le VICs sono state isolate dalla valvola aortica del cuore da cui è stato isolato il pericardio P1 (utilizzato per la caratterizzazione del tessuto pericardico, *Paragrafo 3.3*). In particolare, l'isolamento è avvenuto tramite digestione enzimatica del tessuto dei leaflet della valvola aortica, secondo il protocollo descritto in *Taylor et al.* [89]:

1. isolare la valvola aortica dal cuore, estrarre i lembi valvolari mediante l'uso di forbici chirurgiche sterili ed eliminare il tessuto adiposo ed eventuali zone calcificate dai lembi valvolari;

2. incubare i lembi ripuliti - con agitazione per 5 min a 37°C - in una soluzione contenente collagenase tipo II (1000U/ml, Sigma) ad una concentrazione di 8mg/ml in DMEM (Lonza) per rimuovere le cellule endoteliali;
3. tagliare i lembi valvolari per ottenere porzioni di tessuto ridotte (frammenti);
4. incubare i frammenti di tessuto - in agitazione per 90 min a 37°C – in una soluzione contenente collagenase tipo II (1000U/ml, Sigma) ad una concentrazione di 8mg/ml in DMEM (Lonza) per estrarre le VICs dal tessuto;
5. filtrare la soluzione contenente i frammenti di tessuto - 2 cicli di filtraggio successivi - con filtro con diametro dei pori pari a 100µm e 40µm e centrifugare - a 2300 giri/min per 5 min - la sospensione cellulare contenente le VICs;
6. risospendere il pellet di cellule ottenuto in DMEM contenente l'1% di pen-strep, l'1% di L-glutamina e il 10% di siero fetale bovino (HyClone);
7. seminare le cellule in una piastra di diametro 85mm e posizionare la piastra in incubatore (37°C, 5%CO₂);
8. raggiunta la confluenza, staccare le cellule utilizzando una soluzione di tripsina allo 0.25% in EDTA 1mM, centrifugarle - a 2300 giri/min per 5 min - e risospendere il pellet ottenuto in DMEM;
9. contare le VICs mediante l'uso di una camera di Burker [90];
10. congelare e conservare in azoto liquido le VICs, sospese in freezing medium (FM) alla densità di 1×10^6 cells/ml, fino al momento del loro utilizzo;

4.3.2 Calcolo della densità ottimale di semina delle Valve Interstitial Cells

Isolate le VICs dalla valvola aortica porcina seguendo il protocollo descritto nel paragrafo precedente, prima di procedere alla semina delle cellule sulle porzioni di pericardio decellularizzato è stato necessario valutare quale potesse essere la densità ottimale di semina. A tale scopo sono stati condotti alcuni esperimenti di espansione cellulare su piastra. I test sono stati effettuati su piastre di due diversi diametri: 34.8mm (ossia il diametro di un pozzetto di una 6-well plate) e 85mm (dish Petri), la cui superficie utile è pari a, rispettivamente, 0.95×10^3 e 5.73×10^3 mm².

Il protocollo per il calcolo della densità di semina sul patch di pericardio è il seguente:

1. le VICs, conservate in azoto liquido, sono state scongelate e risospese in DMEM contenente l'1% di pen-strep, l'1% di L-glutamina e il 10% di siero fetale bovino (HyClone);
2. le cellule sono state piastrate in 3 pozzetti di una 6-well plate (0.1×10^6 VICs per ciascuno ciascun pozzetto) e in 3 dish Petri da 85mm (0.5×10^6 VICs per ciascuno ciascun dish);
3. una volta giunte a confluenza, le cellule sono state staccate e contate come già illustrato nel *Paragrafo 4.3.1*, punti 8-9;
4. il numero di cellule a confluenza (n^*) è stato diviso per la superficie del pozzetto/dish (S), ottenendo la densità cellulare a confluenza (ρ^* espressa in cells/mm², Equazione 4.1):

$$\rho^* = \frac{n^*}{S} \quad (4.1)$$

Nota ρ^* si calcola il numero di cellule necessario (n^s) per la semina di un patch circolare di pericardio decellularizzato con diametro pari a 8mm (Equazione 4.2):

$$n^s = \rho^* \cdot S_{\text{patch}} \quad (4.2)$$

4.3.3 Protocollo di semina delle Valve Interstitial Cells su patch di pericardio decellularizzato

Una volta progettato e collaudato il sistema di coltura statico, definito e validato il protocollo di decontaminazione del pericardio e stabilita la densità cellulare di semina ottimale per gli scaffold, si è proceduto agli esperimenti di semina delle VICs sui patch di pericardio decellularizzato.

Come già accennato, nel definire gli esperimenti di semina, ci si è chiesti quale fosse la superficie del foglietto di pericardio (fibrosa, più densa e compatta vs sierosa, con una minore densità di fibre di collagene) che favorisse l'adesione delle VICs e la colonizzazione degli strati più interni del tessuto. Sono stati condotti dunque due diversi

esperimenti (24 campioni per ciascun esperimento) seminando, rispettivamente, la superficie fibrosa e quella sierosa. Inoltre, per ciascuna delle due superfici seminate sono state selettivamente variate due condizioni, in particolare:

- **densità di semina:** 0.6×10^3 cells/mm² vs. 3×10^3 cells/mm²; la prima è la densità (ρ^*) ricavata dagli esperimenti di espansione delle VICs in piastra (*Paragrafo 4.3.2*); la seconda, 5 volte maggiore di ρ^* , è stata scelta in base alla considerazione che il tessuto pericardico è una struttura tridimensionale (a differenza della superficie di un dish per coltura cellulare) che, idealmente, deve essere colonizzata anche negli strati più profondi;
- **tempo di coltura:** 24h vs 72h.

I due esperimenti hanno seguito il medesimo protocollo di semina, riportato qui di seguito:

1. Decellularizzare 24 campioni di pericardio seguendo il protocollo riportato nel *Paragrafo 3.1*, decontaminare i campioni di tessuto decellularizzato (*Paragrafo 4.2.2*), provvedere al montaggio dei campioni sul sistema di coltura (*Paragrafo 4.2.3*) e decontaminare nuovamente i campioni all'interno del sistema di coltura (*Paragrafo 4.2.4.2*);
2. Effettuare un lavaggio dei campioni, aspirando la soluzione decontaminante contenuta nel reservoir del sistema di coltura e sul fondo dei pozzetti della *multiwell* e sostituirla con PBS;
3. Incubare i campioni per 1h, sotto cappa a flusso laminare;
4. Staccare, centrifugare, risospendere in mezzo di coltura completo (DMEM contenente l'1% di pen-strep, l'1% di L-glutamina e il 10% di siero fetale bovino) e contare le VICs (*Paragrafo 4.3.1*, punti 8-9) scongelate e poste in coltura 4-5 giorni prima dell'inizio dell'esperimento di semina (*Paragrafo 4.3.2*, punti 1-2);
5. Aspirare il PBS dal reservoir del sistema di coltura statico e dai pozzetti della *multiwell*, sollevando il campione per rimuovere completamente il liquido dal fondo;
6. Alloggiare nuovamente i campioni nei pozzetti, evitando di intrappolare bolle d'aria in fase di alloggiamento (*Paragrafo 4.2.3*, punti 7.1-7.3);

7. Seminare i campioni con le VICs alla densità desiderata, sospesa in 500µl di mezzo di coltura completo: in particolare, 12 campioni sono stati seminati con 0.6×10^3 cells/mm², l'altra metà con 3×10^3 cells/mm²;
8. Porre in incubatore i campioni seminati a 37°C per 2h, in modo da permettere alle VICs di aderire alla superficie del pericardio;
9. Aggiungere 1ml di mezzo di coltura completo nel reservoir ed incubare i campioni a 37°C per il tempo prestabilito (24h o 72h).

La predisposizione dei campioni è stata realizzata in maniera che ciascuna *multiwell* contenesse 6 campioni seminati alla stessa densità ed incubati per lo stesso periodo di tempo (Tabella 4.1).

	N	Densità di semina (cells/mm ²)	Tempo di incubazione (h)
<i>multiwell_1</i>	6	0.6×10^3	24
<i>multiwell_2</i>	6	3×10^3	24
<i>multiwell_3</i>	6	0.6×10^3	72
<i>multiwell_4</i>	6	3×10^3	72

Tabella 4.1: Condizioni testate nell'esperimento di semina delle VICs su pericardio porcino decellularizzato: ciascuna *multiwell* contiene 6 campioni seminati alla stessa densità e incubati per lo stesso tempo; n = numero di campioni.

Al fine di valutare l'efficacia del protocollo di semina in funzione delle 8 condizioni testate (due superfici di semina, due densità cellulari, due tempi di coltura), si è proceduto alla caratterizzazione (biologica) dei patch di pericardio ricellularizzati, argomento trattato nel paragrafo successivo.

4.3.4 Caratterizzazione biologica dei campioni di pericardio ricellularizzati

La caratterizzazione biologica dei costrutti ricellularizzati ha lo scopo di valutare la reale efficacia del protocollo di semina utilizzato, in funzione delle tre diverse variabili considerate (superficie di semina, densità di semina, durata della coltura). In particolare è stato indagato quale sia la quota parte di VICs, tra quelle seminate, che hanno aderito

saldamente alla superficie del tessuto e, quante di queste siano invece riuscite a colonizzare gli strati più interni del pericardio decellularizzato.

Le analisi effettuate sono state, in particolare:

- Saggio colorimetrico: test MTT
- Istologie: colorazione con H&E
- Immunofluorescenza: DAPI
- Acquisizione di immagini del tessuto in contrasto di fase (microscopia in contrasto di fase, MCF)

In Figura 4.10 viene riportato uno schema che descrive, per ciascun campione seminato, la specifica tipologia di analisi svolta al termine della coltura:

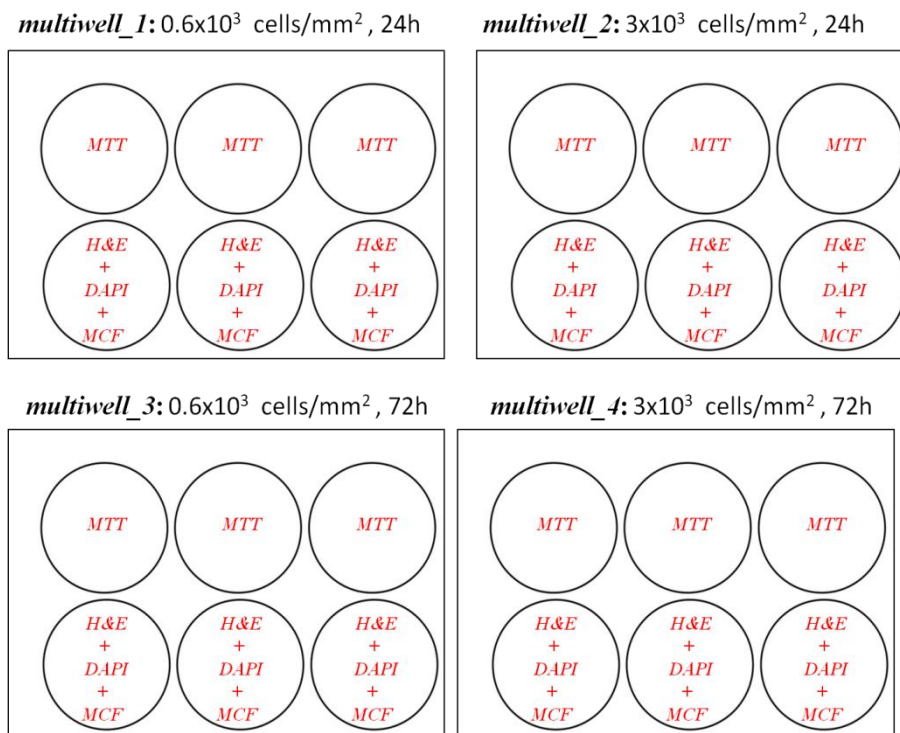


Figura 4.10: Schema delle analisi effettuate al termine della coltura sui 24 campioni di pericardio seminati.

Come descritto in Figura 4.10, tutte le tipologie di analisi sono state effettuate in triplicato per ciascuna delle condizioni testate.

I protocolli utilizzati per la svolgimento di queste analisi sono riportati nei paragrafi successivi.

4.3.4.1 Test del MTT

Il saggio con MTT (bromuro di dimetil-tiazolil-difenil-tetrazolio) è un test colorimetrico basato sulla capacità delle cellule vitali, grazie agli enzimi succinato deidrogenasi presenti a livello mitocondriale, di trasformare il sale MTT tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazolo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, di color giallo, in cristalli di formazano, mediante rottura dell'anello tetrazolico (Figura 4.11). I cristalli hanno una colorazione porpora e sono insolubili in soluzioni acquose [91].

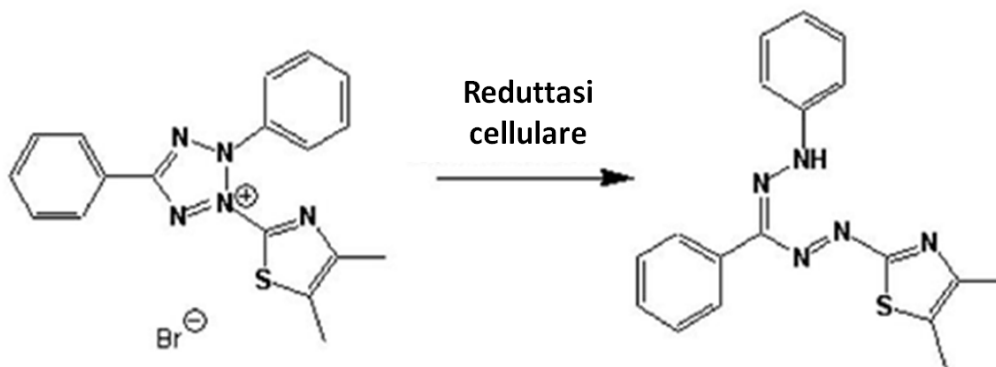


Figura 4.11: Reazione di riduzione dell'MTT (sinistra) in formazano (destra), che avviene all'interno dei mitocondri delle cellule vitali.

Questo test è generalmente utilizzato per valutare l'effetto citotossico di una sostanza nei confronti di cellule poste in coltura. Tuttavia, dal momento che esso fornisce anche indicazioni relative alla popolazione vitale di cellule, nel presente lavoro di tesi si è scelto di utilizzarlo per una valutazione preliminare, immediata e a basso costo, dell'efficacia del protocollo di semina e coltura di VICs.

Il protocollo utilizzato per l'esecuzione del test MTT è il seguente:

1. Sciogliere il sale di MTT (Sigma) in PBS 10X (Lonza) alla concentrazione finale di 5mg/ml e diluire con fattore 1:10 la soluzione ottenuta in PBS (Lonza) contenente il 10% di HyClone (Sigma);

2. Rimuovere i campioni di tessuto seminati dal sistema di coltura e porli in pozzetti di una 12-well plate;
3. Ricoprire i campioni con la soluzione di MTT;
4. Incubare a 37°C e 5% di CO₂ per 3h;
5. Procedere all'osservazione dei campioni: la presenza di una colorazione purpurea nelle zone seminate del campione indica la presenza di VICs vitali. Maggiore è l'intensità della colorazione, maggiore è il numero di cellule presente.

In parallelo ai campioni seminati, sono stati sottoposti al test dell'MTT dei campioni di tessuto non seminato e di VICs coltivate su piastra, utilizzati come controlli negativo e positivo:

- 1 porzione di pericardio decellularizzato;
- VICs seminate ed incubate (analoghe condizioni di quelle seminate su pericardio decellularizzato: 2 densità, 2 tempi di coltura) in pozzetti di una 48-well plate. La scelta della 48-well plate è giustificata dal fatto che la superficie dei pozzetti ha dimensioni simili a quella del patch di pericardio su cui viene eseguita la semina.

L'MTT ha il limite di non permettere la visualizzazione delle cellule penetrate all'interno del tessuto ma solo di quelle adese sulla superficie del pericardio: per questo motivo, sono state condotte ulteriori analisi, descritte qui di seguito.

4.3.4.2 Colorazione istologica con Ematossilina&Eosina

Rilevata, tramite il saggio MTT, l'effettiva presenza delle cellule sui patch di pericardio ricellularizzato, si è proceduto ad effettuare delle ulteriori analisi di caratterizzazione dei costrutti al fine di valutare in maniera più dettagliata l'efficacia della procedura di ricellularizzazione.

Un primo test effettuato ha previsto la colorazione dei campioni con Ematossilina&Eosina (H&E). Questa colorazione istologica permette la visualizzazione dei nuclei cellulari in colore blu/violetto, che risaltano dunque rispetto alla ECM del tessuto, colorata in rosa (*Paragrafo 2.2.1*). La colorazione viene eseguita su campioni ottenuti da sezioni trasversali del tessuto, consentendo di visualizzare, oltre le cellule adese sulla superficie del patch di pericardio, anche le cellule che sono penetrate negli strati più interni del patch.

Si è proceduto alla colorazione delle sezioni di pericardio ricellularizzato e di 1 campione di pericardio decellularizzato, utilizzato come controllo negativo, seguendo il seguente protocollo:

1. Eliminazione della paraffina in cui sono fissati i campioni e idratazione delle sezioni (*Paragrafo 3.3.1.2*, punti 1-6);
2. Immersione dei campioni in Ematossilina (Emallume sol. sec. MAYER) per 2 min;
3. Lavaggio in acqua distillata per 5 min;
4. Immersione in Eosina per 2 min;
5. Lavaggio in acqua distillata per 5 min;
6. Disidratazione dei campioni e montaggio del vetrino copri-oggetto (*Paragrafo 3.3.1.2*, punti 12-16).

I campioni colorati in H&E sono stati poi analizzati al microscopio a luce polarizzata ZEISS Axio-Scope per l'acquisizione delle immagini. In particolare, sono stati analizzati 3 campi per ciascun campione, a due ingrandimenti differenti (20X e 40X).

4.3.4.3 Immunofluorescenza con DAPI

L'immunofluorescenza con DAPI permette la visualizzazione dei nuclei cellulari (*Paragrafo 2.2.1*).

Il protocollo utilizzato per l'analisi in immunofluorescenza è il seguente:

- Eliminazione della paraffina in cui sono fissati i campioni e idratazione delle sezioni (*Paragrafo 3.3.1.2*, punti 1-6);
- Diluzione del DAPI con rapporto 1:500 in acqua distillata;
- Colorazione dei vetrini mediante dosaggio con pipetta della soluzione di DAPI;
- Incubazione in camera umida, al buio, a temperatura ambiente, per 10min;
- 3 lavaggi dei vetrini, di 5min ciascuno, in acqua distillata;
- Montaggio dei vetrini copri-oggetto tramite un agente montante acquoso.

Le immagini sono state acquisite al microscopio a fluorescenza ZEISS Apotome, analizzando due campi per ciascun campione, a due ingrandimenti diversi (20X e 40X).

4.3.4.4 Analisi della struttura del pericardio tramite immagini a contrasto di fase

La microscopia a contrasto di fase (MCF) è una tecnica comunemente utilizzata per l'osservazione di strutture biologiche all'interno dei tessuti, invisibili utilizzando la microscopia in campo chiaro, ma senza l'ausilio di una specifica colorazione. La tecnica sfrutta l'effetto ottico dello sfasamento del raggio di luce che colpisce il campione: le radiazioni luminose, in fase prima di attraversare il campione, subiscono dei cambiamenti di fase che dipendono sia dallo spessore, sia dal diverso indice di rifrazione della strutture colpite dalla luce. L'ottica a contrasto di fase del microscopio è in grado di rilevare queste differenze di fase delle onde luminose e convertirle in differenza di luminosità ottenendo immagini in scala di grigi [92].

Nell'ambito del presente lavoro di tesi, è stato possibile visualizzare la struttura interna del pericardio ricellularizzato mediante acquisizione di immagini in contrasto di fase con il microscopio ZEISS Apotome.

Capitolo 5

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nel presente capitolo saranno presentati e discussi tutti i risultati ottenuti nell'ambito del presente lavoro di tesi. La presentazione dei risultati seguirà un percorso cronologico in analogia con il contenuto dei capitoli riguardanti i materiali e metodi (*Capitoli 3 e 4*). In particolare, il presente capitolo è suddiviso in due macro-sezioni: la prima riguardante il processo di decellularizzazione e la caratterizzazione del tessuto pericardico decellularizzato (*Paragrafo 5.1*) e la seconda riguardante le procedure sperimentali volte alla ricellularizzazione delle matrici di tessuto decellularizzato, attraverso la semina delle VICs, ed alla loro caratterizzazione (*Paragrafo 5.2*).

Per ciascuna delle due sezioni, i risultati ottenuti vengono confrontati con i dati presenti in letteratura riguardanti l'utilizzo di tessuti biologici di origine animale per la fabbricazione di bioprotesi valvolari.

5.1 Decellularizzazione del tessuto pericardico

Come già evidenziato nei capitoli precedenti, il processo di decellularizzazione del tessuto pericardico di origine porcina ha come scopo la rimozione delle componenti cellulari e nucleiche e degli epitopi specie-dipendenti presenti nel tessuto nativo, che sono i principali responsabili di fenomeni di immunogenicità *in vivo*, con conseguente rigetto del tessuto impiantato [45]. È stato infatti dimostrato che la presenza di residui nucleici nelle matrici di tessuto utilizzate per la costruzioni di bioprotesi valvolari è causa di fenomeni di calcificazione dei lembi della protesi valvolare, fenomeni che portano, a lungo termine, al fallimento della protesi e alla necessità di un nuovo intervento per la sua sostituzione [5]. Allo stesso tempo, il processo di decellularizzazione deve garantire un adeguato mantenimento dell'organizzazione strutturale delle proteine che costituiscono la ECM del tessuto, e quindi del comportamento biomeccanico del tessuto decellularizzato.

Sulla base di queste considerazioni, si è pertanto proceduto alla definizione di un protocollo di decellularizzazione che consentisse di soddisfare tali requisiti. Il protocollo di decellularizzazione, ottenuto dalla combinazione di un metodo fisico, chimico ed enzimatico, (*Paragrafo 3.1*) è stato adattato opportunamente a partire da un protocollo precedentemente sviluppato, in collaborazione tra i ricercatori del μ BS Lab e del Centro

Cardiologico Monzino, volto alla decellularizzazione di matrici pericardiche di origine umana [6].

Attraverso i test di caratterizzazione biologica e meccanica delle porzioni di tessuto pericardico decellularizzato, è stato possibile dimostrare che il protocollo utilizzato nel presente lavoro di tesi risulta efficace:

- nella rimozione delle componenti cellulari e nucleiche del tessuto pericardico;
- nella rimozione dell'epitopo α -gal
- nella preservazione dell'integrità della sovrastruttura della ECM del tessuto e delle sue proprietà meccaniche.

I risultati ottenuti vengono descritti nei paragrafi successivi.

5.1.1 Caratterizzazione biologica del tessuto pericardico decellularizzato

La prima analisi effettuata volta alla verifica della effettiva rimozione delle cellule dal tessuto pericardico nativo, di tipo puramente qualitativo e da intendersi come analisi preliminare, è l'ispezione visiva delle matrici di tessuto a valle della decellularizzazione.

In Figura 5.1 vengono confrontate due porzioni di pericardio porcino, prima e dopo la decellularizzazione.

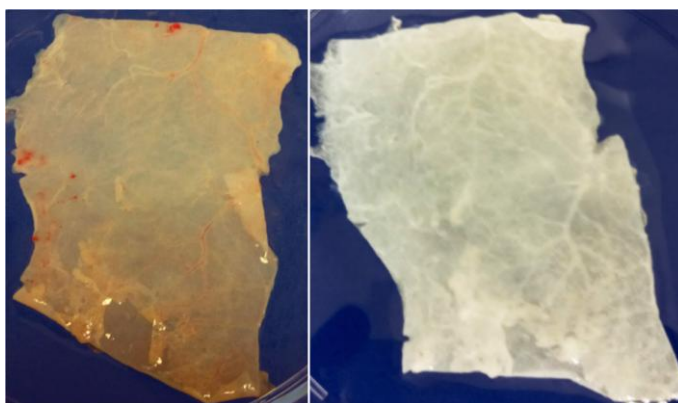


Figura 5.1: Porzione di pericardio porcino, nativo (sinistra) e decellularizzato (destra).

Il tessuto pericardio decellularizzato (Figura 5.1, destra) appare bianco, quasi trasparente (è possibile ad esempio osservare la rete vascolare del tessuto), caratteristiche che, in prima analisi, confermano l'avvenuta rimozione della componente cellulare che conferisce al tessuto nativo (Figura 5.1, sinistra) la tipica colorazione rossastra.

Tale analisi non è però da sola sufficiente ad assicurare la completa decellularizzazione del tessuto, pertanto, si è proceduto alla caratterizzazione delle matrici decellularizzate attraverso analisi istologica e di immunofluorescenza.

In Figura 5.2 vengono mostrati i risultati dell'analisi istologica (tricromica di Masson, *Paragrafo 3.3.1.2*) dei campioni di tessuto pericardico nativo e decellularizzato.

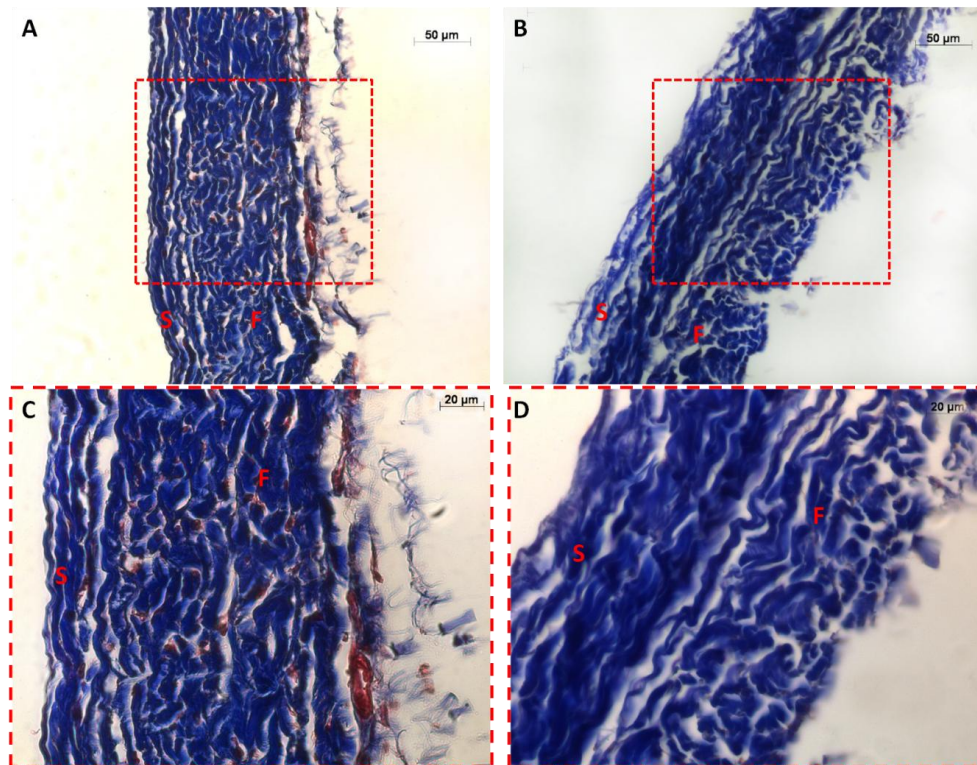


Figura 5.2: Analisi istologica (tricromia di Masson) di campioni di tessuto pericardico nativo (A, C) e decellularizzato (B, D); S: superficie sierosa; F: superficie fibrosa. Barra dimensionale: 50µm (A, B) e 20µm (C, D). Le fibre di collagene sono visualizzate in blu, mentre i nuclei cellulari in rosso.

L'analisi istologica delle sezioni di tessuto decellularizzato (Figura 5.2 B e D) conferma l'effettiva rimozione delle cellule dal tessuto: a differenza del tessuto nativo (Figura 5.2 A e C), infatti, non sono osservabili nuclei cellulari, colorati in rosso. Inoltre, attraverso tale colorazione istologica è stato possibile stabilire che il protocollo di decellularizzazione utilizzato ha consentito di preservare la sovrastruttura della ECM nativa, aspetto testimoniato dalla visualizzazione delle fibre di collagene, colorate in blu, che si presentano strutturalmente integre conservando la compattezza e la distribuzione all'interno della ECM tipiche del tessuto nativo.

In Figura 5.3 vengono riportate le immagini in immunofluorescenza, acquisite per campioni di tessuto nativo (Figura 5.3 A) e decellularizzato (Figura 5.3 B). L'analisi in immunofluorescenza per la detezione del materiale nucleico e dell'epitopo xenogenico α -gal, è basata sulla colorazione delle matrici di tessuto con:

- DAPI, intercalante del DNA, per la visualizzazione, in blu, dei nuclei cellulari.
- FITC, fluorocromo legato all'anticorpo secondario, per la visualizzazione dell' α -gal espresso dalle cellule, in verde acceso rispetto allo sfondo verde scuro del tessuto, quest'ultimo visualizzabile senza l'utilizzo di coloranti grazie all'autofluorescenza delle proteine strutturali (collagene ed elastina) dell'ECM;

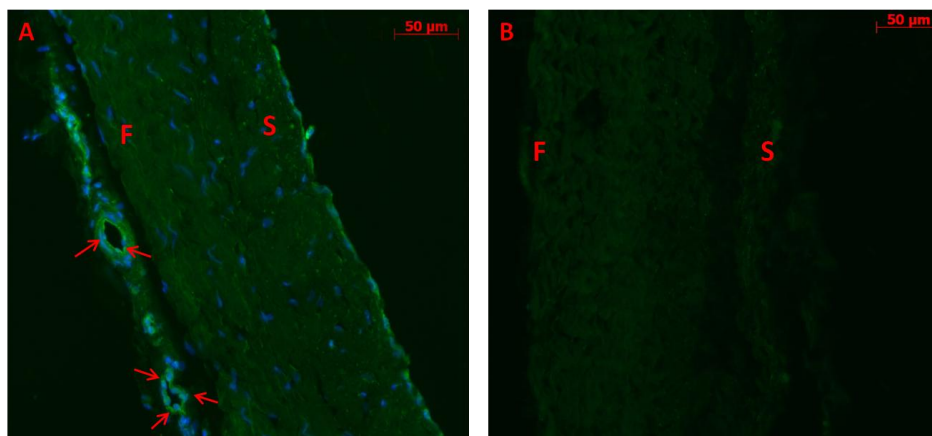


Figura 5.3: Immagini in immunofluorescenza che confermano l'avvenuta rimozione dei nuclei cellulari (colorati in blu, DAPI) e dell' α -gal (colorato in verde, FITC), presenti nel tessuto nativo (A), a seguito del processo di decellularizzazione (B). S: superficie sierosa; F: superficie fibrosa; le frecce indicano le cellule endoteliali che circondano il lume dei vasi sanguigni; barra dimensionale: 50 μ m.

Dall'analisi delle immagini riportate in Figura 5.3 è possibile rilevare la presenza dell' α -gal nel tessuto nativo (Figura 5.3A) espresso dalle cellule endoteliali, presenti in corrispondenza di entrambe le superfici del pericardio (sieroso e fibroso) e sulla superficie che delimita il lume dei vasi sanguigni (frecce in Figura 5.3°), mentre non viene espresso dalle cellule negli strati più interni del tessuto, ovvero i pericardiociti. Nelle immagini relative al tessuto decellularizzato (Figura 5.3B), al contrario, non è possibile individuare nuclei cellulari né la presenza di cellule che esprimono α -gal.

In conclusione, la caratterizzazione biologica delle matrici di pericardio porcino decellularizzato ha confermato l'efficacia del protocollo di decellularizzazione, che ha

consentito di raggiungere tutti gli obiettivi prefissatisi in questa fase del lavoro. Tale approccio rappresenta quindi una valida alternativa al fissaggio con GA per l'ottenimento di tessuto pericardico da impiegare in applicazioni di TEHV. Infatti la decellularizzazione permette di superare alcuni dei principali limiti che caratterizzano i tessuti fissati con GA, quali

- la generazione di risposta immunitaria avversa e rigetto iperacuto, causato dalla mancata rimozione della componente cellulare e dell' α -gal, e dal lento rilascio dei residui di GA [45];
- la formazione, a lungo termine, di calcificazioni dei lembi delle bioprotesi valvolari, causate dalla mancata rimozione degli acidi nucleici dal tessuto [17, 18];
- la modifica della sovrastruttura dell'ECM del tessuto: il trattamento con GA fissa il collagene e devitalizza le cellule proprie del tessuto, rendendo impossibile il rimodellamento del tessuto *in vivo* e/o i processi di naturale riparazione del tessuto in seguito ad eventuale danneggiamento strutturale causato dagli stress meccanici cui la protesi è sottoposta [21, 22].

E' inoltre importante sottolineare come il protocollo utilizzato si sia rivelato più efficace, in termini di preservazione della sovrastruttura della ECM, rispetto ad altri protocolli di decellularizzazione presenti in letteratura (*Paragrafo 2.2.2*): ad esempio, i due protocolli di decellularizzazione presentati nello studio di *Hulsmann et al.* [74], basati rispettivamente sull'utilizzo di agenti chimici più aggressivi quali tripsina e sulla combinazione di Triton X-100 e Sodio-Deossicolato, hanno indotto una rilevante alterazione dell'ECM del tessuto pericardico, consistente in particolare nella rottura delle fibre di collagene ed elastina.

5.1.2 Caratterizzazione meccanica del tessuto pericardico decellularizzato

La caratterizzazione meccanica del tessuto decellularizzato ha previsto lo svolgimento di prove meccaniche di trazione monoassiale e test di permeabilità/distensibilità del tessuto, volte a individuare e quantificare eventuali differenze del comportamento biomeccanico dei tessuti decellularizzati (DE) rispetto al tessuto nativo (N) ed al tessuto trattato (GA).

5.1.2.1 Prove di trazione monoassiale

Il test di trazione monoassiale (*Paragrafo 3.3.2.1*) permette di ricavare le curve sforzo-deformazione dei campioni sottoposti al test, a partire dai valori di carico con cui il provino risponde alla sollecitazione applicata dalla macchina di prova e dell'allungamento del provino stesso.

Prima di procedere al calcolo e all'analisi dei sei parametri descrittivi del comportamento biomeccanico del tessuto (modulo di Young a basse deformazioni: E_{low} ; modulo di Young ad alte deformazioni: E_{high} ; deformazione di transizione: ϵ_{trans} ; sforzo di transizione: σ_{trans} ; sforzo massimo: σ_{max} ; deformazione massima: ϵ_{max} ; *Paragrafo 3.3.2.1*), è stata effettuata un'analisi comparativa del valore di spessore medio dei provini per le 3 popolazioni testate (N, DE e GA). Tale valore, t_M , è stato ottenuto mediando tre valori di spessore (t_1 , t_2 e t_3) misurati in corrispondenza dell'apice, del centro e della base di ciascun provino montato nella macchina di prova. Tale analisi è mirata a valutare l'impatto dei due trattamenti (decellularizzazione e fissaggio con GA) sulla struttura e di conseguenza sullo spessore del pericardio rispetto al tessuto nativo. Per ciascuna delle 3 popolazioni, i valori di t_M vengono riportati in Tabella 5.1.

t_M [mm]		
N	DE	GA
0.32 ± 0.16	0.22 ± 0.11	0.19 ± 0.10
$n=18$, 4 donatori P1, P4-P6	$n=20$, 4 donatori P1-P4	$n=19$, 4 donatori P1-P4

Tabella 5.1: Valori di t_M calcolati per ciascun provino testato: per ciascuna popolazione viene riportato il valore della media \pm deviazione standard.

Tutti i valori di spessore da cui sono stati ricavati quelli riportati in Tabella 5.1 sono stati elaborati tramite il software Prism (GraphPad, USA) che consente di rappresentare graficamente i dati e di effettuare i test statistici (ANOVA ad una via con valore di p -value significativo fissato a $p < 0.05$, *Paragrafo 3.3.2.3*) per confrontare i valori ottenuti per le tre popolazioni analizzate. Per la rappresentazione grafica dei risultati si è utilizzato il grafico di tipo "box&whiskers": il grafico (Figura 5.4) è costituito da un rettangolo, delimitato inferiormente e superiormente dal 1° e dal 3° quartile della distribuzione dei dati, da cui si estendono due linee orizzontali che rappresentano i valori del 10° e del 90° percentile.

All'interno del *box*, la linea orizzontale rappresenta la mediana, mentre con il simbolo + è indicata la media. I valori al di fuori del range 10°-90° percentile, rappresentati con ●, vengono considerati dati anomali (*outliers*): tali valori vengono esclusi ai fini delle valutazioni statistiche. Infine, in caso di differenze statisticamente significative tra le popolazioni di dati, esse vengono evidenziate nel grafico attraverso delle linee con frecce: in dettaglio la freccia indica differenza statisticamente significativa tra la popolazione da cui essa “inizia” e quella in cui essa “termina”.

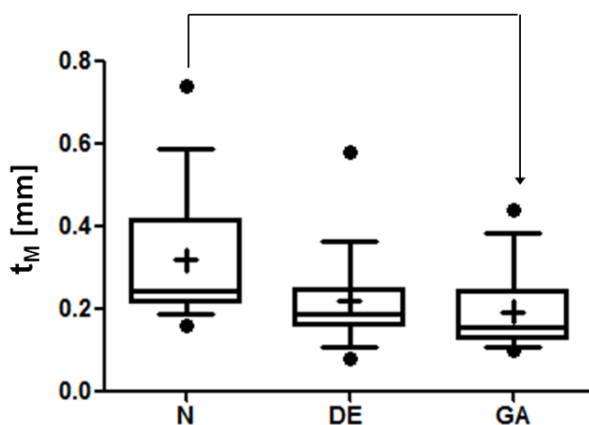


Figura 5.4: Risultati dell’analisi statistica effettuata sui dati di spessore medio (t_M) dei provini ricavati da tessuto pericardico nativo (N), decellularizzato (DE) e fissato in (GA).

L’analisi comparativa del valore di t_M (Tabella 5.1 e Figura 5.4) ha dimostrato che lo spessore del tessuto nativo è maggiore rispetto ai campioni di tessuto sottoposti al protocollo di decellularizzazione o al fissaggio con GA. Tuttavia, è risultato che solamente il trattamento con GA induce una riduzione di spessore statisticamente significativa rispetto al tessuto nativo (Figura 5.4). Tale risultato conferma ulteriormente la bontà del protocollo di decellularizzazione ed indica come il fissaggio in GA induca invece delle sostanziali alterazioni del tessuto.

I risultati ottenuti trovano riscontri contrastanti rispetto ai dati di letteratura: infatti, mentre *Gastaldello* [75] non ha evidenziato, coerentemente con i risultati del presente studio, differenze statisticamente significative tra lo spessore del pericardio nativo e decellularizzato, *Hulsmann et al.* [73] affermano invece che la procedura di decellularizzazione (avvenuta seguendo due protocolli differenti, *Paragrafo 2.2.2*) induca un aumento significativo dello spessore del tessuto. Bisogna d’altro canto considerare che i protocolli presentati in quest’ultimo studio siano stati applicati su pericardio di origine

bovina. Inoltre, l'incubazione di 48h in una soluzione contenente SDS allo 0.5% (valori di durata e concentrazioni molto superiori a quelli del protocollo utilizzato nel presente lavoro, *Paragrafo 3.1*) in un protocollo e l'utilizzo della tripsina, agente molto aggressivo, nell'altro potrebbero spiegare il fenomeno di rigonfiamento irreversibile del tessuto, dovuto al danneggiamento della ECM [53].

Successivamente si è proceduto al calcolo dei sei parametri caratteristici del comportamento biomeccanico dei provini testati sulla base dei dati sforzo-deformazione (σ - ϵ). In Figura 5.5 viene riportata, a titolo esemplificativo, per ciascuna popolazione, una curva σ - ϵ ricavata dall'elaborazione dei dati ottenuti dalle prove di trazione monoassiale.

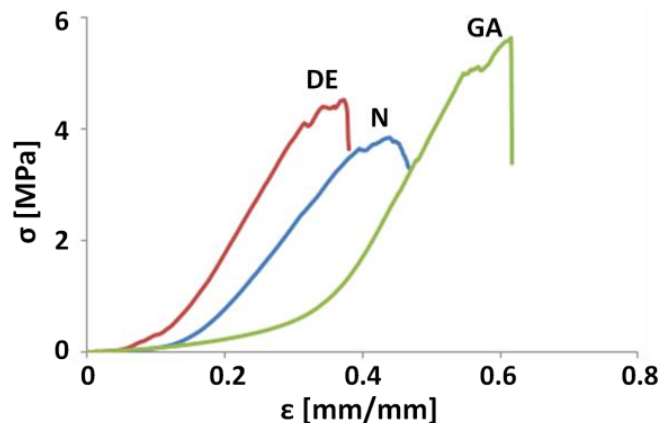


Figura 5.5: Esempi di curva σ - ϵ di rappresentativi del comportamento trazione monoassiale di provini di pericardio nativo (N), decellularizzato (DE) e fissato (GA).

Le curve in Figura 5.5 mostrano un primo tratto a bassa pendenza seguito da un tratto lineare a pendenza maggiore che si estende sino alla rottura del provino, indicando quindi che i tessuti esaminati seguono un comportamento di tipo elastico non lineare. L'estrazione dei 6 parametri meccanici descrittivi delle proprietà meccaniche del tessuto, è stata effettuata utilizzando un foglio di calcolo: l'interfaccia del foglio di calcolo, sviluppato in ambiente Excel in un precedente lavoro di tesi [85], è mostrata in Figura 5.6.

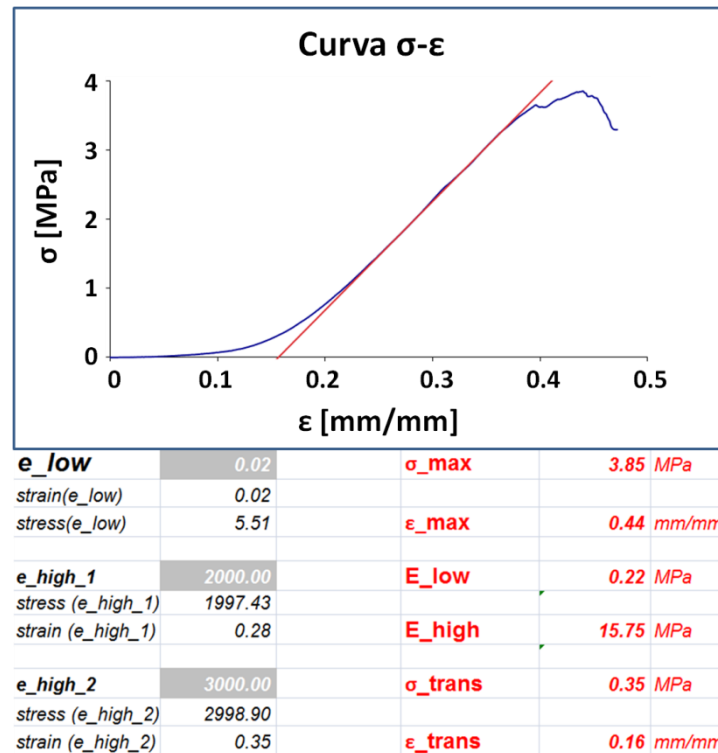


Figura 5.6: Interfaccia grafica del foglio di calcolo Excel che permette di calcolare i 6 parametri meccanici (E_{low} , E_{high} , σ_{max} , ϵ_{max} , σ_{trans} , ϵ_{trans}) a partire valori dalla curva σ - ϵ (curva in blu). La retta rossa rappresenta l'interpolante lineare del tratto ad alta pendenza, il cui coefficiente angolare rappresenta il valore di E_{high} ; l'intercetta di tale retta con l'asse delle ascisse identifica il valore di ϵ_{trans} .

In particolare, il foglio di calcolo (Figura 5.6), consente di identificare in maniera automatica il valore di σ_{max} (valore massimo nella colonna dei dati di σ) e di ϵ_{max} (valore di ϵ associato a σ_{max}). Il calcolo dei valori di E_{low} ed E_{high} avviene invece in maniera semi-automatica: *i*) l'utente fornisce come input (valori su sfondo grigio in Figura 5.6) i valori di ϵ corrispondenti alla fine del tratto della curva a bassa pendenza (e_{low}) e i valori di σ corrispondenti all'inizio e alla fine del tratto lineare della curva ad alta pendenza (e_{high_1} e e_{high_2}); *ii*) il software interpola tali valori, e restituisce rispettivamente i valori di E_{low} e di E_{high} ; il valore di ϵ_{trans} viene individuato automaticamente dal foglio di calcolo come il valore dell'intercetta della retta con pendenza E_{high} sull'asse delle ϵ ; infine, σ_{trans} viene identificato come il valore di σ corrispondente a ϵ_{trans} .

I valori dei 6 parametri meccanici calcolati per ciascuna curva di ciascuna popolazione (N, DE, GA) sono stati elaborati, ricavando per ciascun parametro il valore medio \pm la deviazione standard, come riportato in Tabella 5.2.

	N	DE	GA
σ_{\max} [MPa]	4.52 ± 2.16	8.23 ± 4.00	9.29 ± 5.52
ε_{\max} [mm/mm]	0.42 ± 0.16	0.47 ± 0.25	0.79 ± 0.48
σ_{trans} [MPa]	0.56 ± 0.35	0.83 ± 0.40	1.40 ± 0.82
$\varepsilon_{\text{trans}}$ [mm/mm]	0.14 ± 0.04	0.14 ± 0.05	0.38 ± 0.13
E_{low} [MPa]	0.21 ± 0.13	0.21 ± 0.12	0.92 ± 0.45
E_{high} [MPa]	27.30 ± 12.70	42.51 ± 24.27	34.86 ± 21.02
	$n=18, 4$ donatori P1, P4-P6	$n=20, 4$ donatori P1-P4	$n=19, 4$ donatori P1-P4

Tabella 5.2: Valori medi dei 6 parametri che descrivono il comportamento meccanico dei provini di tessuto nativo (N), decellularizzato (DE), fissato (GA). Per ciascun parametro, viene riportato il valore medio \pm deviazione standard.

I risultati dell'analisi statistica effettuata sui valori dei 6 parametri meccanici da cui sono stati ricavati i valori mostrati Tabella 5.2 sono riportati nei grafici in Figura 5.7.

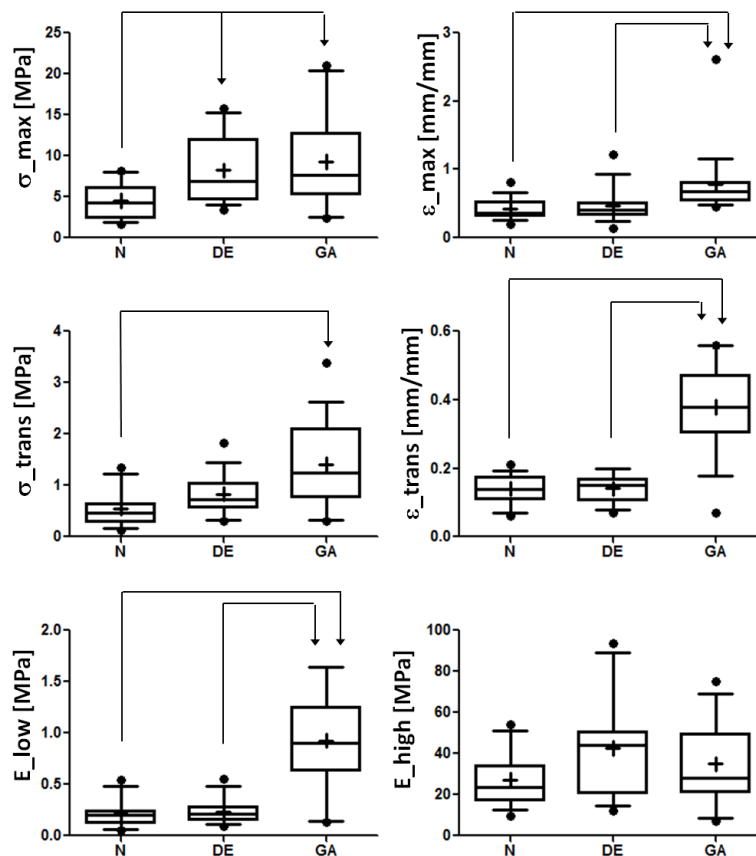


Figura 5.7: Parametri meccanici (σ_{\max} , ε_{\max} , $\varepsilon_{\text{trans}}$, σ_{trans} , E_{low} , E_{high}) ottenuti per tessuto nativo (N), decellularizzato (DE), e fissato (GA). In figura, le frecce indicano le differenze significative tra le popolazioni individuate dall'analisi statistica effettuata per ciascuno dei 6 parametri.

Dall'analisi della risposta biomeccanica del pericardio nativo, decellularizzato e fissato (Figura 5.7), è possibile ricavare le seguenti osservazioni:

- il tessuto decellularizzato dimostra proprietà meccaniche comparabili con quelle del tessuto nativo, confermando quindi che il protocollo di decellularizzazione ed in particolare gli agenti decellularizzanti utilizzati non inducono alcuna alterazione significativa della struttura e delle proprietà del tessuto. Differenze statisticamente significative sono state riscontrate solamente nel caso del valore di sforzo massimo a rottura (σ_{\max}): tali differenze possono essere però frutto dei diversi valori di spessore (seppur non statisticamente differenti) osservati per le due popolazioni (Figura 5.4) e non causati da effettive alterazioni delle proprietà meccaniche
- il trattamento con GA induce un'alterazione non trascurabile delle proprietà meccaniche del tessuto nativo. Infatti, si riscontrano differenze rispetto al tessuto nativo per tutti i parametri considerati (ad eccezione di E_{high}). In particolare, si osserva un irrigidimento del tessuto, particolarmente evidente nel tratto a bassa deformazione. Inoltre, il tessuto fissato con GA presenta proprietà meccaniche significativamente differenti anche rispetto al tessuto decellularizzato.

In accordo con i risultati ottenuti, dunque, il protocollo di decellularizzazione utilizzato in questo lavoro di tesi è efficace nel preservare le proprietà meccaniche del pericardio (in quanto confrontabili al tessuto nativo): tale risultato suggerisce quindi che le matrici decellularizzate sono effettivamente adatte per essere utilizzate come scaffold per il processo di ricellularizzazione mirato alla fabbricazione di *leaflet* per bioprotesi valvolari.

Come già accennato nel *Capitolo 2* della tesi, nel confrontare i risultati ottenuti rispetto ai dati presenti in letteratura, ci si è scontrati con la mancanza di dati relativi alla caratterizzazione meccanica del pericardio porcino: per tale motivo, il confronto è stato effettuato rispetto a dati ricavati da tessuto pericardico di origine bovina, ad oggi il più utilizzato in applicazioni di ingegneria tissutale delle valvole cardiache. Inoltre, non è stato possibile reperire relativi ad alcuni dei parametri meccanici analizzati in questo lavoro di tesi (σ_{trans} , $\varepsilon_{\text{trans}}$ ed E_{low}). Per quanto riguarda σ_{\max} , ε_{\max} ed E_{high} , il confronto ha fornito risultati contrastanti, sia per quanto riguarda le proprietà del tessuto nativo, data la diversa origine dei due pericardi confrontati (porcino vs bovino), sia per quanto riguarda il tessuto

decellularizzato (differenti protocolli di decellularizzazione) e fissato, come riportato in Tabella 5.3.

	Tesi		Dong et al. [72]		Hulsmann et al. [73]		Yang et al. [74]		Gauvin et al [71]					
		porcino	bovino	bovino	bovino	bovino	bovino	bovino	bovino	porcino				
	N	DE	GA	N	DE⁽¹⁾	N	DE⁽²⁾	N	DE⁽⁴⁾	GA⁽¹⁾	GA⁽²⁾			
σ_{max} [MPa]	4,52	8,23	9,29	14,40	12,60	9,00	7,00	6,00	26,83	24,25	9,79	12,75	25,00	12,00
ϵ_{max} [mm/mm]	0,42	0,46	0,92	-	-	0,25	0,60	0,40	0,49	0,41	0,16	0,16	0,26	0,25
E_high [MPa]	27,30	42,51	34,86	-	-	27,00	12,00	15,00	108,30	104,52	79,05	80,17	180,00	110,00

Tabella 5.3: Confronto tra i risultati della caratterizzazione meccanica ottenuti nel presente lavoro di tesi (vengono riportati i valori medi calcolati per ciascun parametro) con i dati riportati in letteratura. N: tessuto nativo; DE: tessuto decellularizzato; GA: tessuto fissato; DE⁽¹⁾: Triton X-100 e DNase I; DE⁽²⁾: DCA e SDS; DE⁽³⁾: Tritina; DE⁽⁴⁾: Tris-HCl, Triton X-100 e DNase I; DE⁽⁵⁾: Tritina e DNase I; DE⁽⁶⁾: Triton X-100 e DNase I; GA⁽¹⁾: 0,65%; GA⁽²⁾: 0,5%.

Con riferimento alla Tabella 5.3, si può osservare come, nonostante le differenze tra il presente studio e gli studi di letteratura evidenziate precedentemente, alcuni dati sono tra loro confrontabili: ad esempio il valore di E_{high} del tessuto nativo ottenuto in questo lavoro su pericardio porcino (27.30 MPa) è confrontabile con quello riportato da *Hulsmann et al.* per pericardio bovino (pari a 27 MPa, [73]); allo stesso tempo però tale valore è fortemente diverso da quello ottenuto da *Yang et al.* (pari a 108.30 MPa, [74]). Nel caso del tessuto decellularizzato, il valore di σ_{max} (8.23 MPa) risulta confrontabile con quelli ottenuti da *Hulsmann et al.* (pari a 7 MPa, [73]) e *Yang et al.* (pari a 9.79 MPa [74]) su pericardio bovino. La variabilità dei dati è altresì più marcata considerando il tessuto fissato in GA: ciò potrebbe essere dovuto all'utilizzo di protocolli di fissaggio differenti in termini di concentrazioni di GA e durata del trattamento. Ciononostante, in generale, i risultati ottenuti in questo studio concordano con i dati in letteratura che dimostrano una significativa alterazione delle proprietà meccaniche del tessuto pericardico provocato dal trattamento con GA.

Infine, l'assenza di differenze statisticamente significative tra le proprietà meccaniche del tessuto nativo e del tessuto decellularizzato emersa dalle prove effettuate nel presente lavoro di tesi, suggerisce che il protocollo di decellularizzazione utilizzato sia più efficace di quelli presenti in letteratura nel mantenimento delle proprietà meccaniche del tessuto a valle del processo di decellularizzazione.

5.1.2.2 Prove di permeabilità/distensibilità del tessuto

In Figura 5.7 vengono riportate a titolo esemplificativo le curve P-V ottenute durante la prova di distensione su campioni di pericardio nativo (N), decellularizzato (DE) e fissato (GA), imponendo un valore di portata pari a 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ in ingresso alla camera di perfusione in cui viene alloggiato il patch di pericardio. Si rammenta che le prove sono state effettuate utilizzando 3 diversi valori di portata, in particolare *i*) 10, 20 e 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ per la prima campagna di caratterizzazione (donatori: P1-P6; gruppi: N, DE, GA); *ii*) 10, 15 e 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ per la seconda campagna (donatori: P13-P14; gruppi: N, DE). Le motivazioni alla base di tale scelta sono riportate nel *Paragrafo 3.3.2.2*.

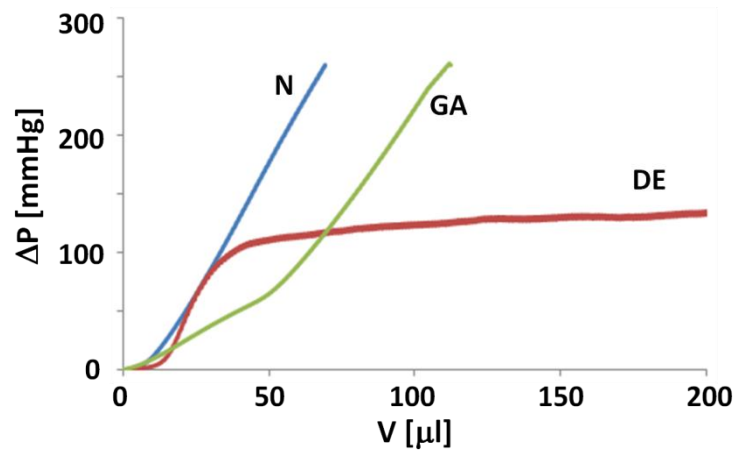


Figura 5.7: Curve P-V per rappresentativi del comportamento di provini di tessuto nativo (N), decellularizzato (DE) e fissato (GA), testati ad un valore di portata di 10μl/min in ingresso alla camera di perfusione.

Per tutte e tre le popolazioni di campioni (Figura 5.7), la curva P-V mostra un primo tratto a bassa pendenza, più o meno esteso, seguito da un tratto lineare a pendenza maggiore, caratterizzato da un rapido incremento del valore di pressione registrato. Tale tratto lineare ad alta pendenza prosegue fino a: *i*) raggiungimento dei valori di saturazione del sensore di pressione (250 mmHg), condizione che comporta la fine della prova confermando l'impermeabilità del tessuto nativo e fissato con GA, *ii*) raggiungimento del valore di plateau della pressione, comportamento osservato per i campioni decellularizzati, che conferma che il processo di decellularizzazione rende il pericardio permeabile, conseguenza questa dell'aumento di porosità del tessuto causata dalla rimozione della componente cellulare, consentendo la filtrazione di fluido a cavallo del patch di tessuto.

Dalle prove effettuate è stato possibile quantificare il valore del coefficiente di permeabilità K che caratterizza la matrice del pericardio. Per quanto riguarda il tessuto nativo e quello fissato con GA tale valore è risultato nullo: per ciascun valore di portata definito dal protocollo, infatti, i campioni hanno risposto con un repentino aumento della pressione fino al rapido raggiungimento del valore di fondo scala del sensore utilizzato (pari a 250 mmHg), a conferma del fatto che sia il tessuto nativo che quello trattato con GA sono impermeabili. Nel caso del tessuto decellularizzato, invece, per ciascuno dei valori di portata in ingresso è stato misurato il corrispondente valore di plateau della pressione (P_{plateau} , Figura 5.8, sinistra, rappresentativa del comportamento di tutti i campioni sottoposti alla prova): i risultati ottenuti sono riportati in un grafico caduta di

pressione-portata (ΔP -Q, Figura 5.8, destra, rappresentativa del comportamento di tutti i campioni sottoposti alla prova) e interpolati mediante un retta di regressione lineare.

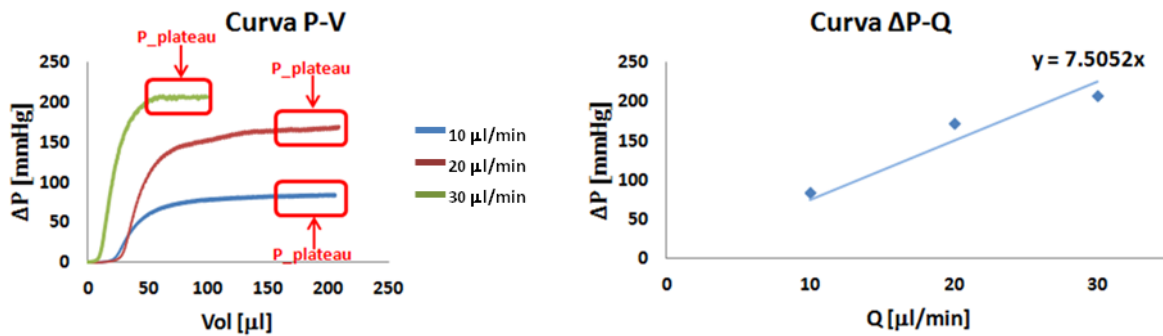


Figura 5.8: Curva P-V (sinistra) rappresentativa del comportamento dei campioni decellularizzati per le 3 portate analizzate (10, 20 e 30 $\mu\text{l}/\text{min}$): si evidenziano i tratti della curva corrispondenti al plateau del segnale di pressione, utilizzati per il calcolo della K del tessuto. Calcolo del coefficiente angolare della rette di regressione lineare (destra) dei valori di P_{plateau} corrispondenti a ciascun valore di portata imposta, riportati nel grafico ΔP -Q: l'inverso di tale valore coincide con la K del campione testato.

Il valore del coefficiente di permeabilità K calcolato per ciascun campione, pari all'inverso del coefficiente angolare della retta interpolante i punti sperimentali, espresso in $\mu\text{l min}^{-1}\text{mmHg}^{-1}$, è riportato in Tabella 5.4.

campione	provino	K [$\mu\text{l min}^{-1}\text{mmHg}^{-1}$]
P2	s1	0.12
P3	s1	0.10
P5	s1	0.14
P5	s2	0.12
P5	s3	0.08
P5	s4	0.12
P5	s5	0.14
P6	s1	0.13
P6	s2	0.14
P13	s1	0.13
P13	s2	0.12
P13	s3	0.12
P14	s1	0.11
P14	s2	0.11
P14	s3	0.12

0.12 ± 0.01

Tabella 5.4: Valore del coefficiente di permeabilità K del pericardio decellularizzato per ciascun provino testato sottoposto alla prova di permeabilità: viene riportato in rosso il valore medio \pm deviazione standard ottenuto da tutti i campioni.

Partendo dai dati di Tabella 5.4, si è proceduto al calcolo della media dei valori ottenuti per estrapolare un coefficiente K caratteristico del tessuto pericardico porcino decellularizzato, astruendo così dalle singole specificità di ciascun donatore. In particolare, il valore di K trovato è pari a $0.12 \pm 0.01 \mu\text{l min}^{-1}\text{mmHg}^{-1}$. Il valore della deviazione standard (0.01) associata a tale valore, essendo inferiore di un ordine di grandezza rispetto alla media dei valori di K , indica una ridotta dispersione dei dati e quindi conferma la consistenza e la ripetibilità dei risultati ottenuti.

Il confronto diretto dei risultati ottenuti dalle prove di permeabilità su pericardio porcino decellularizzato con la letteratura non è stato possibile, in quanto non sono presenti lavori di letteratura riguardanti prove di permeabilità su tessuto pericardico, né di origine porcina né di qualsiasi altra specie. Discorso analogo può esser fatto per il tessuto nativo e il tessuto fissato.

A partire dalle curve P-V, si è proceduto poi alla caratterizzazione delle proprietà di distensibilità del tessuto pericardico nativo, decellularizzato e fissato: per far ciò (in analogia con la procedura descritta per l'analisi dei sei parametri caratteristici del comportamento meccanico in prove di trazione monoassiale) sono stati calcolati 4 parametri: P_{trans} , V_{trans} , P'_{low} e P'_{high} a partire dalle curve P-V ottenute per ciascun campione (*Paragrafo 3.3.2.2*). Per questa analisi è stato implementato *ad hoc* un foglio di calcolo analogo a quello descritto in precedenza per le prove di trazione monoassiale (*Paragrafo 5.1.2.1*) che consente di estrarre in maniera semi-automatica i parametri in funzione dei "valori soglia" inseriti come input dall'utente. L'interfaccia del foglio di calcolo è mostrata in Figura 5.9.

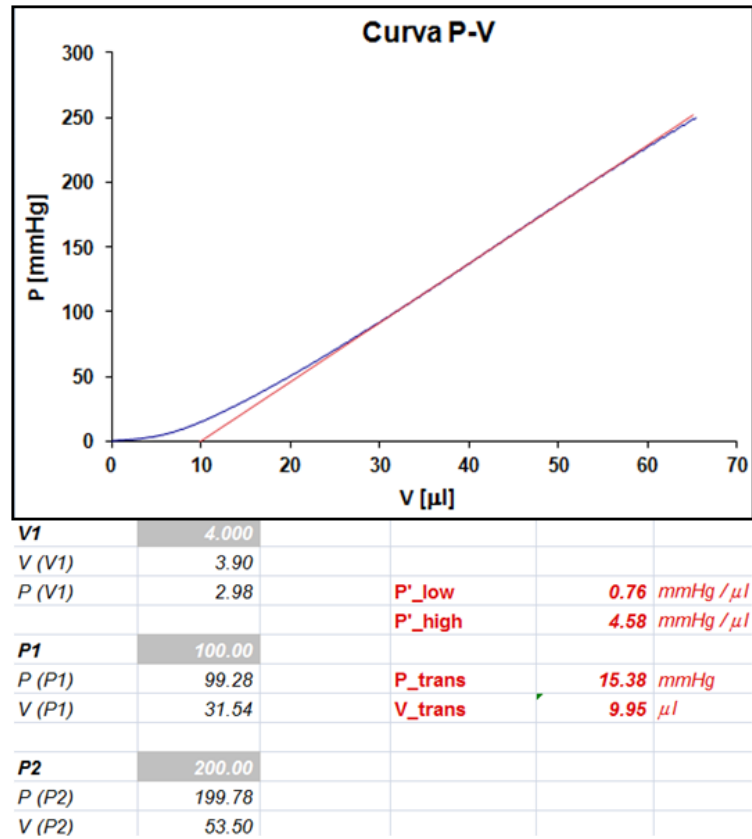


Figura 5.9: Interfaccia grafica del foglio di calcolo implementato per il calcolo dei 4 parametri utilizzati per la caratterizzazione delle proprietà di distensibilità di patch di tessuto pericardico decellularizzato: la retta in rosso calcolata rappresenta l'interpolante utilizzata per il calcolo di P'_{high} ; l'intercetta di tale retta con l'asse delle ascisse identifica il valore di V_{trans} .

In particolare: *i*) l'utente fornisce in ingresso (valori su sfondo grigio in Figura 5.9) i valori di volume corrispondenti alla fine del tratto della curva a bassa pendenza ($V1$) e i valori di pressione corrispondenti all'inizio e alla fine del tratto della curva ad alta pendenza ($P1$ e $P2$); *ii*) il software interpola questi valori e restituisce rispettivamente i valori di P'_{low} e di P'_{high} (coefficiente angolare della retta interpolante la curva P-V nel tratto a bassa e ad alta pendenza). Il valore di V_{trans} viene individuato come intercetta della retta con pendenza P'_{high} con l'asse dei volumi; infine, P_{trans} equivale al valore della P corrispondente a V_{trans} .

In Tabella 5.5 vengono riportati i valori medi dei 4 parametri caratteristici della curva P-V ottenuti per i diversi valori di portata imposti (10, 15, 20 e 30 $\mu\text{l}/\text{min}$) su provini di pericardio nativo, decellularizzato e fissato.

	10 μ l/min			15ml/min			20 μ l/min			30 μ l/min		
	N	DE	GA	N	DE	GA	N	DE	GA	N	DE	GA
P_{trans} [mmHg]	5.66 \pm 5.05	5.71 \pm 1.82	41.83 \pm 12.79	5.85 \pm 1.50	8.95 \pm 5.81		6.32 \pm 4.24	9.54 \pm 5.11	29.42 \pm 11.55	8.25 \pm 4.81	7.83 \pm 2.23	29.33 \pm 5.97
V_{max} [μl]	8.98 \pm 5.77	14.82 \pm 4.61	31.38 \pm 5.33	7.78 \pm 1.15	12.64 \pm 3.70		7.41 \pm 1.68	12.69 \pm 6.83	18.24 \pm 7.06	6.77 \pm 3.16	11.17 \pm 3.52	16.71 \pm 3.84
P'_{high} [mmHg/μl]	0.39 \pm 0.24	0.26 \pm 0.18	1.22 \pm 0.35	0.40 \pm 0.14	0.29 \pm 0.19		0.50 \pm 0.32	0.27 \pm 0.32	0.89 \pm 0.31	0.53 \pm 0.25	0.26 \pm 0.07	1.29 \pm 0.45
P'_{high} [mmHg/μl]	2.85 \pm 1.30	2.59 \pm 1.69	3.55 \pm 0.64	3.11 \pm 0.98	3.48 \pm 0.37		4.24 \pm 1.70	6.67 \pm 2.02	4.72 \pm 1.14	5.80 \pm 2.91	9.26 \pm 2.52	5.04 \pm 1.07
	n=14 5 donatori P3, P5-P6, P13-P14	n=19 8 donatori P1- P6, P13-P14	n=11 6 donatori P1-P6	n=6 2 donatori P13-P14	n=6 2 donatori P13-P14		n=14 5 donatori P3, P5-P6, P13-P14	n=19 8 donatori P1- P6, P13-P14	n=12 6 donatori P1-P6	n=18 3 donatori P3, P5-P6	n=13 6 donatori P1- P6	n=12 6 donatori P1- P6

Tabella 5.5: Valori dei 4 parametri calcolati dalla curva P-V su patch di pericardio nativo (N), decellularizzato (DE) e fissato (GA), al variare dei diversi valori di portata in ingresso: 10, 15, 20, 30 μ l/min. Per ciascun parametro, viene riportato il valore medio \pm la deviazione standard; n: numero di provini sottoposti alla prova.

Sono stati poi svolti i test statistici per valutare se ci fossero differenze significative tra le 3 popolazioni a parità di parametro analizzato: i test statistici sono stati condotti sui dati ottenuti alla portata di 10 $\mu\text{l}/\text{min}$; i risultati sono riportati in Figura 5.10.

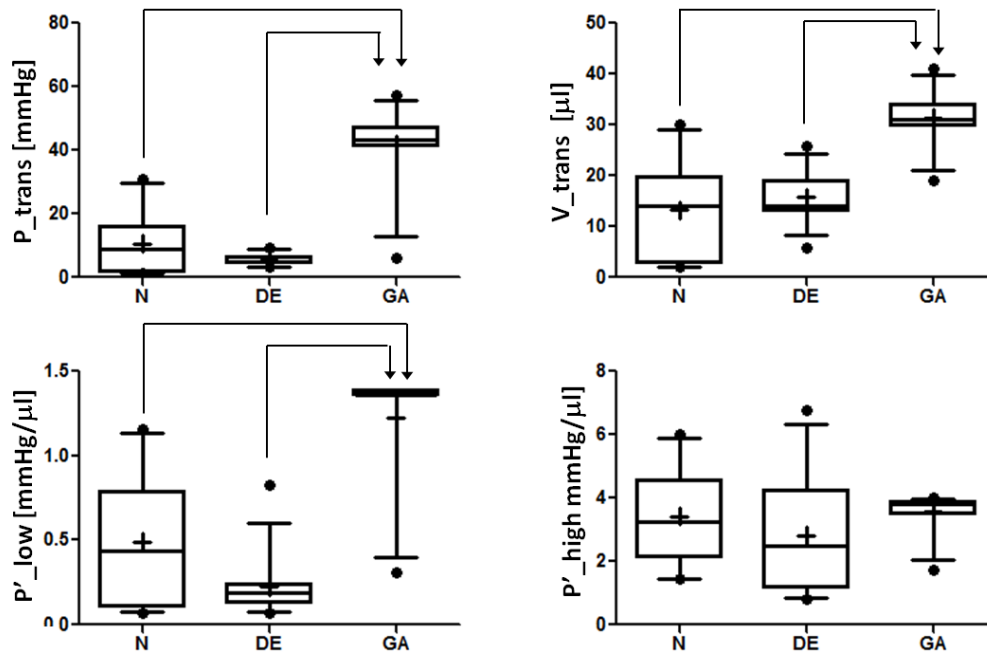


Figura 5.10: Risultati dell'analisi statistica condotta sui 4 parametri estratti dalle curve P-V su campioni di tessuto nativo (N), decellularizzato (DE) e fissato (GA), per la portata di 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Analizzando i risultati dell'analisi statistica (Figura 5.10) è possibile osservare come il trattamento con GA induce un'evidente alterazione delle proprietà di distensibilità del tessuto, che è testimoniato da un significativo incremento dei valori di P_{trans} , V_{trans} e P'_{low} , rispetto al tessuto nativo. Il tessuto fissato con GA, quindi, è caratterizzato da una maggiore rigidità particolarmente evidente nel tratto a bassa pendenza della curva P-V: questo risultato conferma le indicazioni ricavate dall'analisi delle prove di trazione monoassiale.

Al contrario, il tessuto decellularizzato replica in maniera fedele il comportamento del tessuto nativo osservato nei tratti di curva a bassa pendenza e nel tratto iniziale ad alta pendenza: il confronto tra tessuto nativo e decellularizzato non ha evidenziato alcuna differenza statisticamente significativa per i 4 parametri calcolati.

Dall'analisi statistica dei dati è possibile quindi concludere, in accordo con quanto osservato nelle prove di trazione monoassiale, che il trattamento di decellularizzazione, a differenza del trattamento con GA, permette di ottenere matrici di tessuto pericardico decellularizzato con un comportamento simile al tessuto nativo che, previa ricellularizzazione dello scaffold, sono idonee ad essere utilizzate per la fabbricazione di *leaflet* di valvole cardiache bioprotesiche. Il ripopolamento cellulare degli scaffold decellularizzati è infatti uno step necessario al fine di ripristinare la condizione di sostanziale impermeabilità tipica del tessuto nativo.

5.2 Ricellularizzazione delle matrici pericardiche decellularizzate

Come discusso nel dettaglio nel *Capitolo 4*, la ricellularizzazione delle matrici di pericardio decellularizzato ha previsto la semina e la coltura di cellule proprie del tessuto che costituisce i lembi delle valvole cardiache, ovvero le VICs. Tale procedura è volta alla cosiddetta *funzionalizzazione in vitro* dello scaffold al fine di ottenere un costrutto ingegnerizzato che sia efficace nel ripristinare la funzionalità della valvola patologica. Per far ciò, il tessuto decellularizzato deve essere ripopolato dalle cellule seminate ricostituendo così quel complesso sistema che proprio grazie all'interazione dinamica tra tessuto e cellule rende possibili, *in vivo*, fenomeni quali il rimodellamento e/o l'adattamento della funzionalità della valvola a differenti condizioni di lavoro cui essa viene sottoposta nell'arco dell'intera vita dell'organismo.

Nel corso del presente lavoro di tesi ci si è quindi concentrati sulla definizione di opportuni protocolli e sulla progettazione di specifici set-up sperimentali che consentissero di ottimizzare la procedura di ripopolamento *in vitro* dei patch di pericardio. In particolare:

- è stato progettato e realizzato un sistema che consentisse la semina *confinata* delle VICs, al fine di determinare quale sia la superficie del pericardio (sierosa *vs* fibrosa) che favorisce il ripopolamento del tessuto;
- sono state condotte diverse campagne sperimentali, variando la densità di semina e/o la durata della coltura, in modo da ottimizzare il protocollo di ricellularizzazione;

- è stata effettuata una fase di caratterizzazione dei tessuti ricellularizzati per valutare l'efficacia dei diversi protocolli.

I risultati ottenuti a valle delle campagne sperimentali di coltura e caratterizzazione vengono descritti nelle sezioni successive del presente capitolo.

5.2.1 Collaudo del sistema per la semina e la coltura confinata

Dopo aver progettato e realizzato il sistema per la semina e la coltura confinata su patch di pericardio decellularizzato (descritto nel *Paragrafo 4.1.1*), è stato eseguito un test di collaudo del sistema.

Il collaudo è consistito nella verifica della tenuta idraulica dei vari elementi che costituiscono il sistema - reservoir, cartuccia portasccaffold con o-ring e *multiwell* - condizione necessaria a garantire che durante la fase di coltura delle VICs non si verificano trafileamenti del mezzo di coltura che causerebbero la perdita delle VICs appena seminate, che andrebbero a depositarsi sul fondo del pozzetto della *multiwell*, inficiando così l'efficacia del protocollo di semina, e/o la disidratazione del tessuto con conseguente morte delle VICs seminate, private dei nutrienti necessari alla loro sopravvivenza.

Le prove di tenuta hanno permesso di verificare, per tutti i campioni testati (2 porzioni di tessuto nativo e 2 di tessuto decellularizzato, *Paragrafo 4.1.2*), l'assenza di trafileamenti di medium di coltura in tutte le regioni "critiche" del sistema, ossia all'interfaccia tra *i*) cartuccia portasccaffold e o-ring (sede di alloggiamento del patch di tessuto), *ii*) reservoir e cartuccia e *iii*) a cavallo del patch. Al termine dell'incubazione *overnight* a 37°C, infatti, non si è osservata nessuna significativa riduzione del volume di mezzo contenuto nel reservoir, pari a 1.5ml.

In merito alla non-filtrazione del mezzo a cavallo del patch decellularizzato, è importante sottolineare come tale risultato sia in accordo con quanto osservato nelle prove di permeabilità (*Paragrafo 5.1.2.2*), in cui il fenomeno della filtrazione di fluido a cavallo del patch sottoposto a regime di perfusione confinata, è stato osservato per valori di pressione superiori ai 50mmHg (Figura 5.8, *Paragrafo 5.1.2.2*), condizione in cui il fluido in pressione sollecita e deforma il patch causando la dilatazione dei pori del tessuto. Nel caso delle prove di collaudo (che riproducono in sostanza la condizione che si genera durante la

coltura cellulare), al contrario, il fluido non viene pressurizzato e l'esiguo volume di mezzo di coltura (1.5ml) non esercita una pressione tale da generare filtrazione di fluido.

I risultati ottenuti dalle prove di tenuta dimostrano dunque l'efficacia del sistema di coltura progettato nel consentire la coltura confinata delle VICs.

5.2.2 Prove di mantenimento della sterilità: test del tioglicolato

5.2.2.1 Esperimento 1

Il presente esperimento è stato effettuato ai fini di valutare:

- la durata dell'incubazione del tessuto in BASE.128 (24h - Trattamento 1 - vs 72h - Trattamento 2) utile a garantire la completa eliminazione della carica batterica iniziale che caratterizza i campioni di pericardio nativo;
- l'eventuale re-introduzione di contaminazione a valle della procedura di assemblaggio del sistema di coltura (*Paragrafo 4.2.3*).

In Tabella 5.6 viene riportato l'esito del test del tioglicolato effettuato su diversi campioni, in duplicato, come descritto nel *Paragrafo 4.2.4.1*. In particolare, la positività del test indica contaminazione batterica del campione; al contrario, il test ha esito negativo quando il campione risulta *sterile*.

campione	P15	P16
N	POSITIVO	POSITIVO
DE	POSITIVO	POSITIVO
T1	NEGATIVO	NEGATIVO
T2	NEGATIVO	NEGATIVO
T1_M	POSITIVO	NEGATIVO
T2_M	POSITIVO	NEGATIVO

Tabella 5.6: Risultati del test del tioglicolato, eseguito per analizzare gli effetti dei trattamenti decontaminanti. L'esperimento è stato effettuato in duplicato, utilizzando due pericardi differenti (P15 e P16).

Dall'analisi dei risultati riportati in Tabella 5.6 è possibile effettuare le seguenti considerazioni:

- la positività del test osservata per i campioni nativi (N) conferma che la carica batterica iniziale del tessuto non è affatto trascurabile: è stato osservato l'intorbidimento del terreno di coltura già dopo poche ore dall'inizio del test;
- il protocollo di decellularizzazione non è di per sé sufficiente a neutralizzare la carica batterica del tessuto, come mostrato dalla positività del test effettuato su campioni decellularizzati (DE);
- la negatività ottenuta per i campioni T1 e T2 conferma l'efficacia del trattamento decontaminante (incubazione del tessuto in BASE.128). In particolare, la sterilità viene raggiunta già dopo 24h di incubazione (Trattamento 1);
- la procedura di assemblaggio del sistema può causare una nuova contaminazione batterica, come evidenziato dalla positività dei campioni T1_M e T2_M ricavati da P15. Tuttavia, il fatto che i due campioni risultati positivi provenissero dallo stesso pericardio, non ha permesso di escludere con certezza che tale risultato dipendesse in realtà dalla specificità del pericardio di provenienza. Infatti, il test eseguito sul pericardio P16 è risultato negativo per entrambi i campioni.

In base a tali considerazioni, l'incubazione in BASE.128 per 24h (Trattamento 1) dimostra di essere un metodo efficace per la decontaminazione del tessuto pericardico decellularizzato. Tuttavia, dal momento che non è possibile adottare precauzioni sulla procedura di isolamento dei cuori presso il macello, condizione che concorre a determinare l'elevata carica batterica iniziale del tessuto, si è deciso di adottare, nell'esecuzione dei successivi esperimenti di semina cellulare, il Trattamento 2 (72h), così da permettere al mix di antibiotici contenuti nella BASE.128 di eliminare anche gli agenti contaminanti più resistenti.

Inoltre, visto che la procedura di assemblaggio si è rivelata critica dal punto di vista del mantenimento della sterilità (positività dei campioni T1_M e T2_M provenienti da P15), si è deciso di effettuare un'ulteriore fase di decontaminazione del tessuto successiva all'assemblaggio del sistema, consistente in una nuova incubazione del campione in BASE.128 per 24h. L'efficacia di questo secondo trattamento è stata valutata mediante l'Esperimento 2, i cui risultati vengono presentati nel paragrafo successivo.

5.2.2.2 Esperimento 2

La seconda fase di decontaminazione del tessuto (successiva all'assemblaggio del sistema di coltura) è volta ad eliminare eventuali contaminazioni che possono essere re-introdotte durante la procedura manuale di assemblaggio.

I risultati dei test del tioglicolato su campioni estratti dai pericardi P17 e P18 (*Paragrafo 4.2.4.2*), sono riportati in Tabella 5.7.

CAMPIONE	P17	P18
T2	NEGATIVO	NEGATIVO
T2_M	NEGATIVO	NEGATIVO
T2_M_T1	NEGATIVO	NEGATIVO

Tabella 5.7: Risultati del test del tioglicolato per l'analisi degli effetti della seconda decontaminazione a valle dell'assemblaggio del sistema di coltura. L'esperimento è stato effettuato in duplicato, utilizzando due pericardi differenti (P17 e P18).

In riferimento ai risultati riportati in Tabella 5.7, è possibile effettuare le seguenti considerazioni:

- il tessuto, in seguito al Trattamento 2 (72h), risulta privo di contaminazioni (test su campioni T2 negativi). Ciò conferma quanto osservato nell'Esperimento 1 (*Paragrafo 5.2.2.1*). I campioni T2 hanno la funzione di controllo negativo rispetto ai campioni montati (T2_M e T2_M_T1);
- la procedura di montaggio non ha inficiato la sterilità dei campioni montati sul sistema e non sottoposti alla seconda fase di decontaminazione (T2_M);
- l'ulteriore fase di decontaminazione (24h) assicura il mantenimento della sterilità dei campioni (T2_M_T1).

Basandosi sull'osservazione dei risultati relativi al presente esperimento, la seconda fase di decontaminazione potrebbe sembrare superflua. Tuttavia, tenendo in considerazione anche i risultati dell'Esperimento 1, in cui si è evidenziata contaminazione di alcuni dei campioni montati (P15), si è scelto di applicare comunque il trattamento di decontaminazione dopo la fase di montaggio del patch di pericardio sul sistema prima di procedere con la semina

delle VICs. Inoltre, tale protocollo è cautelativo anche rispetto alla manipolazione del sistema da parte di operatori meno esperti.

5.2.3 Campagne sperimentali di semina e coltura confinata di VICs su patch di pericardio decellularizzato

5.2.3.1 Calcolo della densità ottimale di semina delle VICs

Nella definizione del protocollo di semina delle VICs, sono stati effettuati test di espansione cellulare su piastra per determinare la densità ottimale di semina, rappresentata dal valore di densità delle cellule a confluenza (ρ^* , *Paragrafo 4.3.2*, Eq. 4.1). I risultati dei 6 test effettuati (3 su piastra Petri con diametro pari a 85 mm e 3 su pozzetto di una 6-well plate con diametro di 34.8 mm) sono riportati in Tabella 5.8.

		diametro [mm]	S [mm ²]	n* [cells]	ρ^* [cells/mm ²]
Petri	Piastra 1	85	5.73x10 ³	3.25x10 ⁶	0.57x10³
	Piastra 2			3.30x10 ⁶	0.58x10³
	Piastra 3			3.65x10 ⁶	0.64x10³
6-well plate	pozzetto 1	34.8	0.95x10 ³	0.67x10 ⁶	0.70x10³
	pozzetto 2			0.52x10 ⁶	0.54x10³
	pozzetto 3			0.64x10 ⁶	0.67x10³
					0.57x10³ ± 0.06x10³

Tabella 5.8: Calcolo della densità ottimale di semina (ρ^*): il valore è stato calcolato in funzione del numero di cellule a confluenza (n^*) sulla superficie (S) di 3 piastre Petri e 3 pozzetti di una 6-well plate. In rosso viene evidenziata la media dei valori calcolati (media±deviazione standard).

Il valore ρ^* pari a 0.57x10³ cellule/mm² (Tabella 5.8, in rosso), è stato utilizzato per il calcolo della numero di cellule ottimale (n^s , *Paragrafo 4.3.2*, Eq. 4.2) per la semina dei patch circolari di pericardio decellularizzato di diametro pari a 8 mm ($S_{\text{patch}} = 50.2 \text{ mm}^2$). Il valore di n^s ottenuto, pari a 28.6 x10³ cellule, è stato arrotondato a 30x10³ cellule, valore utilizzato nelle campagne sperimentali di semina.

5.2.3.2 Caratterizzazione biologica dei campioni di pericardio ricellularizzati

La caratterizzazione biologica dei costrutti ricellularizzati, effettuata con lo scopo di valutare la reale efficacia dei protocolli di semina utilizzati, in funzione delle tre diverse

variabili considerate (superficie di semina, densità di semina, durata della coltura), è consistita in:

- test MTT;
- colorazione istologica con H&E;
- immunofluorescenza con DAPI, combinata all'acquisizione di immagini in contrasto di fase.

I risultati ottenuti per ciascuna analisi effettuata verranno riportati e discussi nelle successive sezioni.

Test MTT

Lo scopo del saggio colorimetrico MTT è di valutare in maniera qualitativa ma immediata l'effettiva adesione e vitalità delle VICs seminate. Come già illustrato nel *Paragrafo 4.3.4.1*, la presenza di cellule vitali sulla superficie del tessuto viene testimoniata da una colorazione purpurea, d'intensità direttamente proporzionale al numero di cellule marcate.

Per questo test, sono stati inoltre predisposti dei controlli, eseguendo la colorazione con MTT su:

- VICs seminate in pozzetti di una 48-well plate (controllo positivo, Figura 5.11A-D) e coltivate nelle medesime condizioni di quelle seminate su pericardio decellularizzato (2 densità - 3×10^3 e 0.6×10^3 cell/mm² - e 2 tempi di coltura - 24h e 72h);
- 1 porzione di pericardio decellularizzato non seminato con VICs (controllo negativo, Figura 5.11E).

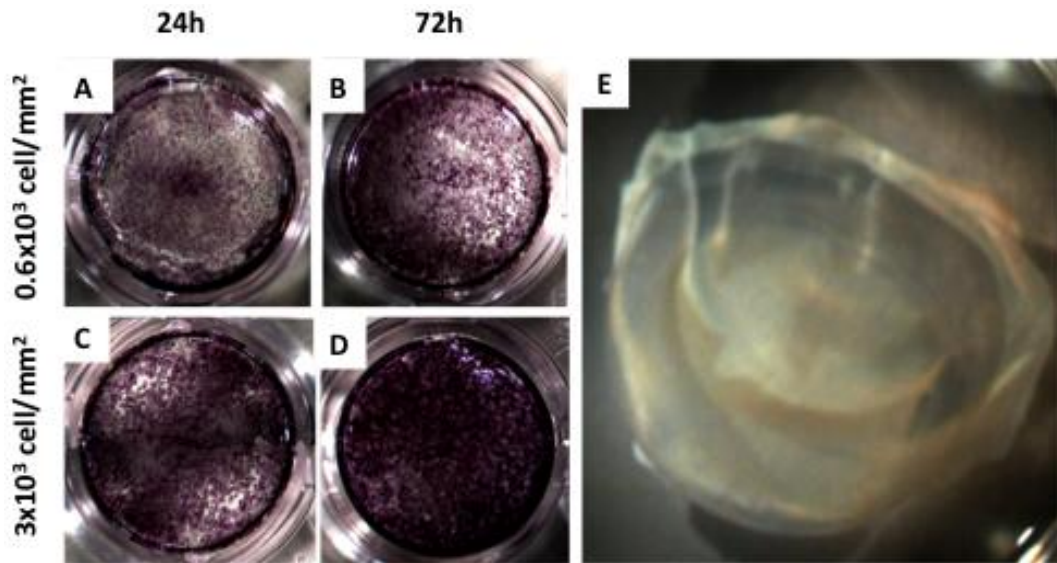


Figura 5.11: Test dell'MTT su VICs seminate in pozzetti di una 48-well plate (controllo positivo, A-D) e su una porzione di pericardio decellularizzato non seminato (controllo negativo, E).

Il controllo positivo permette di valutare il grado di proliferazione e la distribuzione delle VICs all'interno dei pozzetti nelle diverse condizioni di semina e coltura (Figura 5.11 A-D). Con riferimento al test MTT effettuato sul pericardio decellularizzato ma non seminato (Figura 5.11E, controllo negativo), la decontaminazione del tessuto ha consentito di evitare di incorrere in un *falso positivo*, rappresentato dalla colorazione degli agenti contaminanti presenti sul patch: ad eccezione dei batteri, infatti, i principali agenti contaminanti (muffe e lieviti) possiedono i mitocondri, e verrebbero pertanto colorati in seguito alla trasformazione del sale di MTT in cristalli di formazano.

In Figura 5.12 vengono riportati risultati del test dell'MTT sui campioni di pericardio di cui è stata seminata la superficie fibrosa (Figura 5.12 A-D) e su campioni in cui è stata seminata la superficie sierosa (Figura 5.12 E-H). Le immagini riportate sono rappresentative di quanto osservato in tutti i campioni per ciascuna condizione.

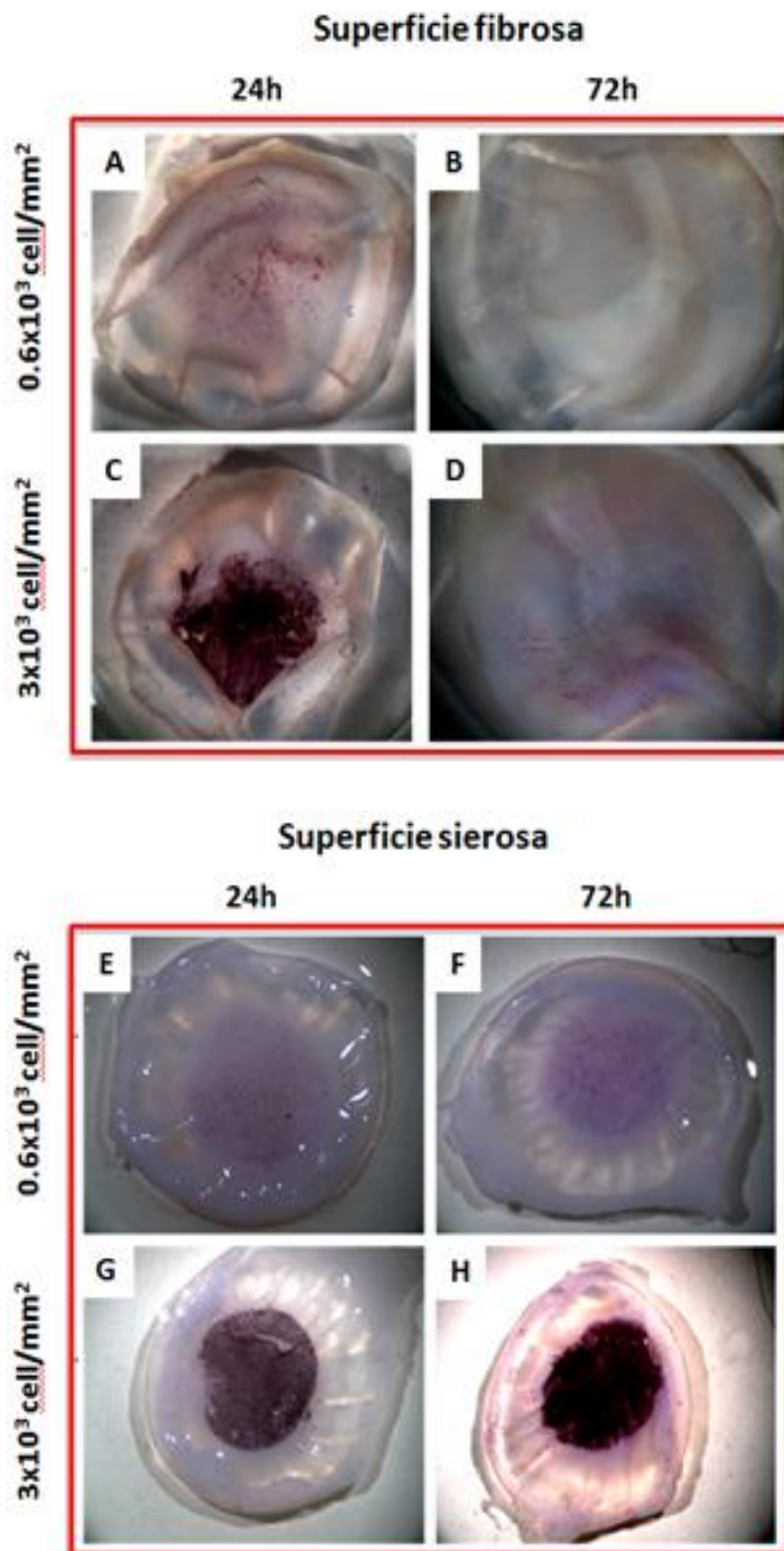


Figura 5.12: Test MTT: risultati dell'esperimento di semina delle VICs sulla superficie fibrosa (A-D) e sierosa (E-H) del pericardio decellularizzato. Sono state considerate 2 densità di semina, pari a $0.6 \times 10^6 \text{ cell/mm}^2$ (A, B e E, F) e $3 \times 10^6 \text{ cells/mm}^2$ (C, D e G, H), e due tempi di coltura, 24h (A, C e E, G) e 72h (B, D e F, H).

Dall'analisi delle immagini in Figura 5.12, è possibile osservare che:

- la superficie *fibrosa* (A-D) non sembra favorire l'adesione delle VICs: l'adesione alla superficie del pericardio è debole per entrambe le due densità di semina ed entrambi i due tempi di durata della coltura. In dettaglio, dopo 24h alla densità di 3×10^3 cell/mm² (Figura 5.12C) nonostante le cellule abbiano raggiunto la confluenza esse non sono saldamente adese al tessuto. La mancata adesione alla superficie del tessuto causa distacco e morte di un gran numero di cellule all'aumentare del tempo di coltura (72h, Figura 5.12D), tanto che si è osservato il loro distacco dal campione a 24h durante l'estrazione del campione per l'acquisizione delle immagini.
- sulla superficie *sierosa*, alla densità inferiore, le VICs sono ancora adese debolmente dopo 24h di coltura (Figura 5.12E); dopo 72h riescono ad aderire e a distribuirsi in maniera più omogenea su tutta la superficie circolare seminata (Figura 5.12F), ma senza mai raggiungere la confluenza, il che suggerisce che tali condizioni di coltura non siano ottimali per un completo ripopolamento del patch. Alla densità di semina superiore, la proliferazione cellulare è maggiore: le cellule formano uno strato confluyente già dopo 24h (Figura 5.15G) aderendo al tessuto in maniera salda e proliferano, giungendo alla formazione di uno strato iperconfluyente (Figura 5.12H) dopo 72h.

In sintesi, la morfologia della superficie fibrosa del pericardio, probabilmente a causa della compattezza delle fibre costituenti il tessuto, non ha consentito una buona adesione delle VICs e ha causato elevata mortalità cellulare al termine del periodo di coltura di 72h: le cellule tendano a formare aggregati rimanendo però in sospensione nel mezzo di coltura. Dall'analisi congiunta dei risultati ottenuti dalla semina sui lati fibroso e sieroso del pericardio, è possibile concludere che la superficie sierosa è quella che favorisce l'adesione delle VICs: ciò è evidente soprattutto nel caso in cui le VICs siano seminate alla densità di semina maggiore e mantenute in coltura per almeno 72h.

Inoltre, da queste immagini è possibile notare l'efficacia del sistema di coltura nel confinamento della sospensione cellulare: la porzione di tessuto positiva al test MTT ha infatti un profilo circolare abbastanza regolare, corrispondente con la porzione di tessuto esposta (disponibile) alla semina delle cellule all'interno del sistema di coltura.

Colorazione istologica con Ematossilina&Eosina

Dal momento che il saggio MTT non permette di valutare la penetrazione delle VICS all'interno del tessuto, sono state acquisite immagini istologiche di sezioni del pericardio ricellularizzato, colorate mediante H&E (*Paragrafo 4.3.4.2*) Le immagini acquisite vengono confrontate rispetto ad un immagine del controllo negativo, rappresentato da un campione di tessuto decellularizzato ma non seminato e visualizzato in Figura 5.13.

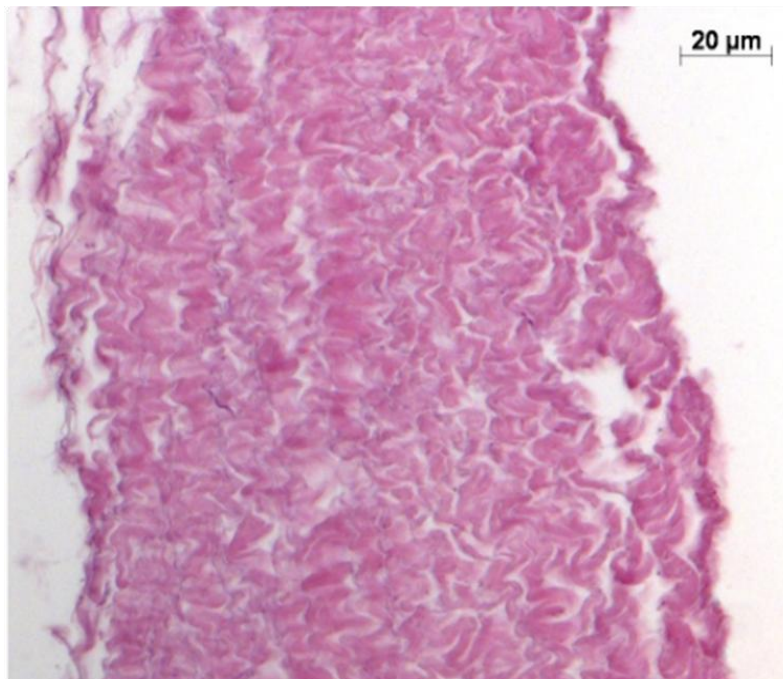


Figura 5.13: Colorazione istologica con H&E di un campione di pericardio decellularizzato e non seminato, che funge da controllo negativo rispetto ai campioni ricellularizzati. La superficie sierosa è rivolta verso sinistra, quella fibrosa verso destra.

In Figura 5.13 non si osservano nuclei cellulari colorati in blu. Al contrario, essi vengono marcati e quindi visualizzati nelle immagini dei campioni seminati, riportate in Figura 5.14.

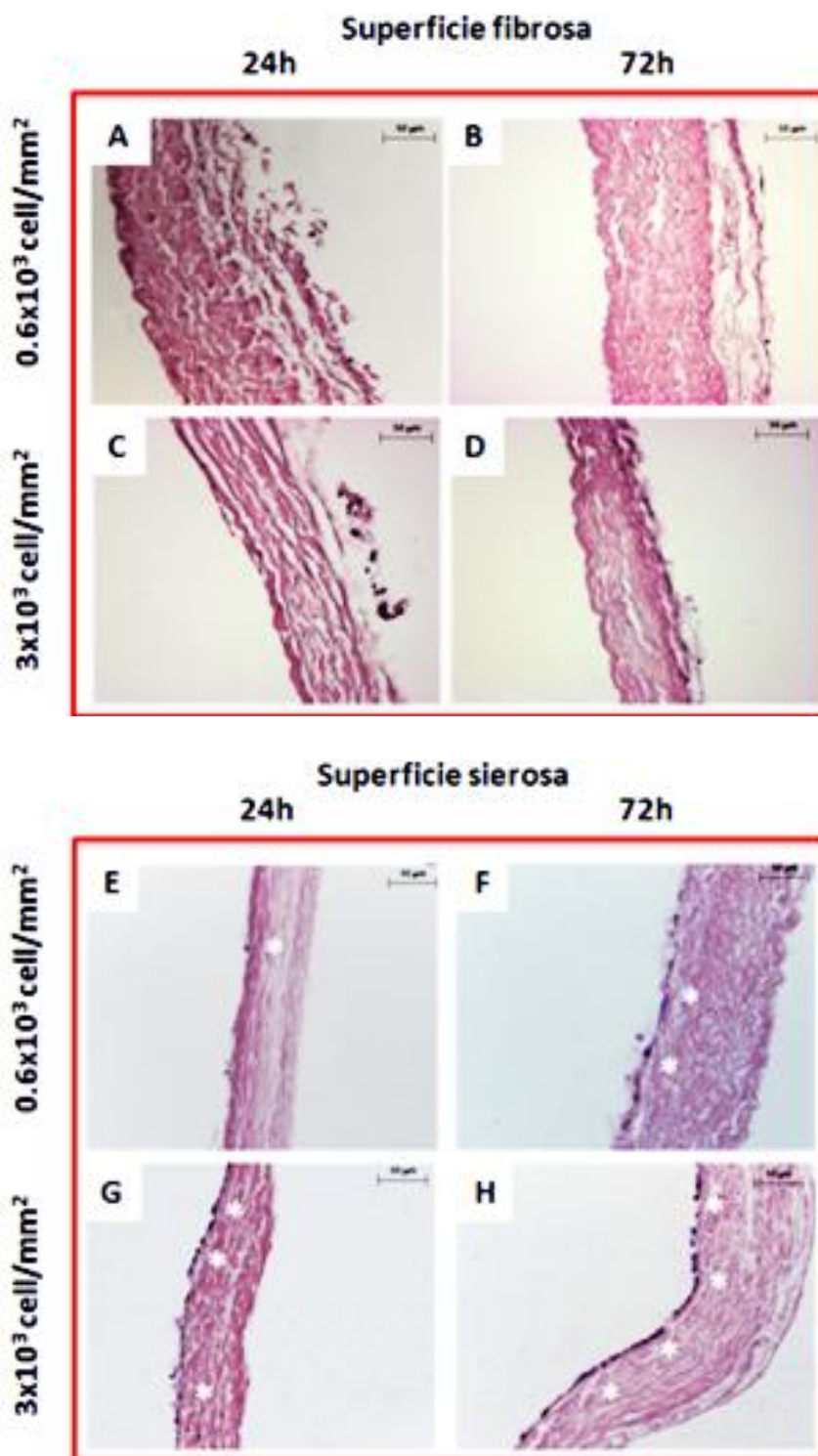


Figura 5.14: Colorazione istologica con H&E di campioni di pericardio decellularizzati e seminati con cellule VICs: superficie fibrosa: A-D; superficie sierosa: E-H; Gli asterischi bianchi (F, H) evidenziano nuclei cellulari chiaramente visibili sulla superficie sierosa del pericardio. In ciascuna immagine, la superficie sierosa è rivolta verso sinistra, quella fibrosa verso destra.

I risultati riportati in Figura 5.14 confermano quanto osservato con il test MTT: mentre le cellule non aderiscono sulla superficie fibrosa (Figura 5.14A-D), alla densità maggiore di semina, esse formano uno strato ben adeso sulla superficie sierosa dopo 72h di coltura (Figura 5.14H, l'adesione delle VICs è confermata dalla forma allungata assunta di nuclei).

Tuttavia, l'analisi con H&E dimostra anche che le VICs, dopo 72h, non hanno colonizzato gli strati interni del tessuto: non sono stati infatti osservati nuclei cellulari all'interno del tessuto. Tale risultato è stato ulteriormente confermato dall'analisi in immunofluorescenza, i cui risultati vengono descritti nella prossima sezione.

Immunofluorescenza con DAPI e immagini a contrasto di fase

Il microscopio a fluorescenza utilizzato per l'analisi dei campioni ricellularizzati ha permesso l'acquisizione simultanea di immagini provenienti da due differenti canali:

- canale di immunofluorescenza per il DAPI, che permette la visualizzazione dei nuclei cellulari, in blu, su sfondo nero (Figura 5.15 A);
- canale per l'acquisizione in contrasto di fase, che permette di visualizzare la struttura del tessuto senza il bisogno di nessuna colorazione (Figura 5.15 B).

Le immagini ottenute dai due canali vengono poi sovrapposte (Figura 5.15 C).

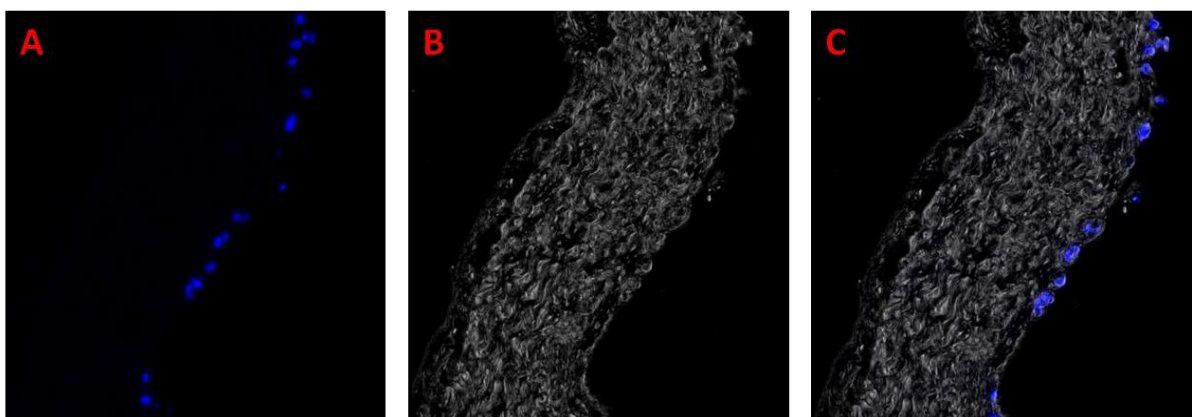


Figura 5.15: Immagini di campioni di tessuto pericardico ricellularizzato ottenute con microscopio a fluorescenza: immunofluorescenza con DAPI (A), immagine a contrasto di fase (B), sovrapposizione dei due canali (C).

Le immagini acquisite al termine delle campagne di semina sulla superficie fibrosa e sierosa del pericardio sono riportate in Figura 5.16.

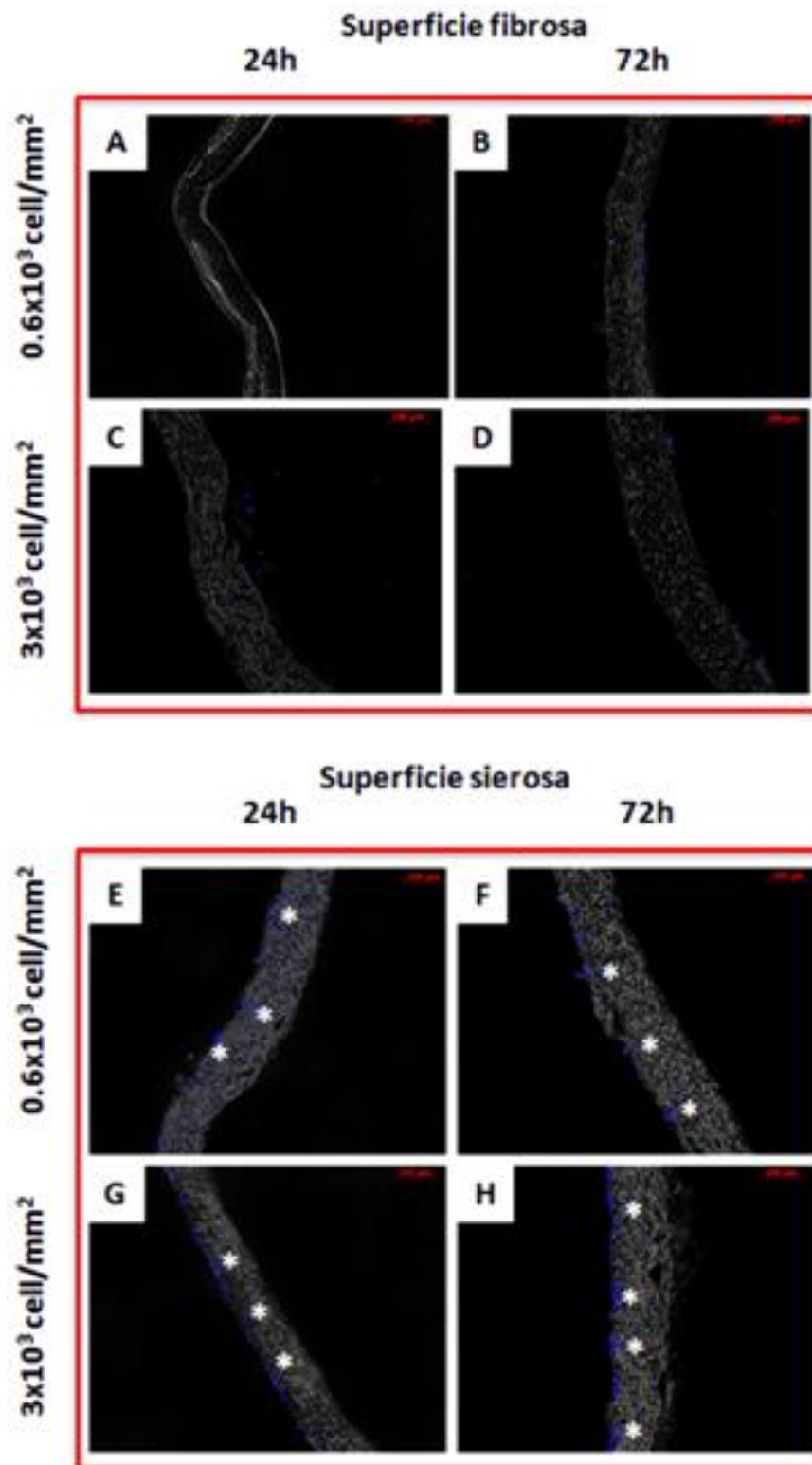


Figura 5.16: Immagini di immunofluorescenza con DAPI sovrapposte ad immagini acquisite in contrasto di fase di campioni di pericardio ricellularizzati: superficie fibrosa (A-D); superficie sierosa (E-H). Gli asterischi bianchi (E-H) evidenziano nuclei cellulari chiaramente visibili sulla superficie sierosa del pericardio. In ciascuna immagine, la superficie sierosa è rivolta verso sinistra, quella fibrosa verso destra.

L'analisi delle immagini riportate in Figura 5.16 conferma quanto osservato mediante i test precedentemente descritti.

A conclusione della fase di caratterizzazione biologica delle porzioni di pericardio ricellularizzate mediante l'utilizzo del sistema di coltura progettato in questo lavoro di tesi e la definizione di opportuni protocolli di semina e coltura, è possibile fare le seguenti considerazioni:

- la superficie fibrosa del pericardio decellularizzato, non permette l'adesione cellulare, causando quindi la morte di una consistente quantità di VICs dopo 72h di semina coltura. Ciò è ragionevolmente dovuto sia alle caratteristiche intrinseche di tale superficie del pericardio (denso in fibre di collagene), sia al fatto che le operazioni di pulizia del pericardio, descritte nel *Paragrafo 3.1* e consistenti principalmente nella rimozione del tessuto adiposo in continuità con la superficie fibrosa, vadano a danneggiare la superficie del tessuto;
- la superficie sierosa, al contrario, favorisce l'adesione delle VICS, già dopo 24h dalla semina, che proliferano dopo 72h. Tuttavia, le VICs non hanno colonizzato gli strati più interni del tessuto. Ciò è probabilmente dovuto al tempo di coltura considerato, pari a 72h, sufficiente a far aderire le cellule ma non a consentire la loro migrazione negli strati interni del pericardio.
- tra tutte le condizioni testate, quella che ha consentito di ottenere i risultati più promettenti, nella prospettiva di esperimenti futuri volti a migliorare il ripopolamento del patch di pericardio, è stata quella rappresentata dalla semina delle VICs sul versante sieroso, alla densità di 3×10^6 cells/mm², e dal loro mantenimento in coltura per 72h: in tali condizioni si è infatti riscontrata la presenza di uno strato confluyente di VICs adese sulla superficie del pericardio.

Un confronto diretto dei risultati ottenuti rispetto alla letteratura si è rivelato impossibile, in quanto non sono stati reperiti in letteratura lavori analoghi. Tuttavia, nonostante alcune differenze tra i protocolli sperimentali (utilizzo di tipologie cellulari differenti dalle VICs e tempi di coltura diversi), i risultati ottenuti trovano riscontro favorevole se confrontati con quelli riportati in diversi studi sulla ricellularizzazione del pericardio di origine bovina [72, 74, 75, 78], confermando le potenzialità dell'utilizzo del tessuto pericardico in applicazioni di TEHV.

CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

L'obiettivo principale del presente lavoro di tesi, svolto presso il μ BS Lab del Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria del Politecnico di Milano in collaborazione con il Laboratorio di Ingegneria Tissutale Cardiovascolare del Centro Cardiologico Monzino, è consistito nella definizione di opportuni protocolli e procedure sperimentali volti al ripopolamento cellulare di porzioni di tessuto di pericardio di origine porcina, precedentemente decellularizzate. Tali attività sono da intendersi come parte di un progetto più ampio, ad oggi in corso di sviluppo presso il μ BS Lab ed inserito nell'ambito dell'ingegneria tissutale delle valvole cardiache, che prevede la progettazione di una bioprotesi valvolare ingegnerizzata i cui lembi saranno costituiti dalle matrici di pericardio ricellularizzato.

Nel dettaglio, il progetto ha previsto lo svolgimento di differenti macro-attività, tra le quali:

- i)* campagne sperimentali di decellularizzazione di foglietti di pericardio parietale estratti da cuori di origine porcina, per la rimozione delle componenti immunogeniche del tessuto (cellule ed epitopi specie-dipendenti);
- ii)* caratterizzazione, biologica e meccanica, dei tessuti decellularizzati con lo scopo di valutare l'efficacia del protocollo in termini di rimozione delle cellule e di mantenimento delle proprietà meccaniche del tessuto decellularizzato rispetto al tessuto nativo;
- iii)* definizione di un protocollo per la decontaminazione del pericardio decellularizzato per garantire la sterilità del tessuto da sottoporre alla fase di ricellularizzazione (colture cellulari);
- iv)* progettazione e realizzazione di un sistema per la coltura *confinata* delle cellule seminate su una specifica superficie del foglietto di pericardio decellularizzato e definizione della procedura, da effettuare sotto cappa in condizioni di sterilità, per l'alloggiamento del patch di tessuto all'interno del sistema;
- v)* campagne sperimentali di coltura cellulare di VICs sul pericardio decellularizzato e decontaminato;

vi) caratterizzazione biologica dei costrutti ricellularizzati, con lo scopo di verificare l'effettivo ripopolamento dello scaffold a valle della fase di coltura cellulare.

Ciascuna di queste fasi è stata condotta e portata a compimento durante lo svolgimento del progetto di tesi, giungendo all'ottenimento di risultati positivi, che seppur preliminari hanno dimostrato di poter essere di grande interesse dal punto di vista della ricerca scientifica nel campo dell'ingegneria tissutale delle valvole cardiache, come discusso nel seguito del presente capitolo.

Il protocollo per decellularizzazione del pericardio porcino, adattato partendo da un protocollo precedentemente sviluppato dai ricercatori del Centro Cardiologico Monzino per la decellularizzazione di pericardio di origine umana [6], è costituito da un metodo combinato di tipo fisico-chimico-enzimatico. Attraverso specifiche analisi istologiche e di immunofluorescenza è stato possibile evidenziare come tale protocollo, oltre a garantire la completa rimozione delle componenti immunogeniche del tessuto, ha consentito di preservare le proprietà strutturali e funzionali delle componenti della ECM del tessuto. Dalla caratterizzazione meccanica (analisi dei parametri caratteristici della risposta meccanica ricavati tramite test di trazione monoassiale e di distensibilità del tessuto) è emerso, infatti, come il tessuto decellularizzato presenti un comportamento biomeccanico molto simile al tessuto nativo.

Tale risultato rappresenta un promettente passo in avanti nella ricerca nel campo dell'ingegneria tissutale delle valvole cardiache: i risultati ottenuti suggeriscono infatti che la decellularizzazione, ed in particolare il protocollo messo a punto nell'ambito del presente lavoro, rappresenta una valida alternativa al trattamento di fissaggio con GA (ad oggi ampiamente utilizzato per la fabbricazione di protesi valvolari biologiche) consentendo di superare alcuni dei principali limiti che caratterizzano tale trattamento quali *i*) la generazione di risposta immunitaria avversa (causata dalla mancata eliminazione degli agenti immunogenici) in seguito all'impianto su paziente ed *ii*) il fallimento (a lungo termine, dopo 10-15 anni) della protesi a causa della calcificazione dei lembi con conseguente necessità di re-intervento, garantendo, inoltre, la possibilità di realizzare una protesi in grado di rimodellarsi, "crescere" ed adattarsi durante la vita del paziente, in quanto costituita da tessuti cellulari biologicamente vivi ed attivi. Inoltre, le analisi

condotte hanno messo in luce come il trattamento con GA comporti una significativa alterazione delle proprietà morfologiche, strutturali e meccaniche del tessuto fissato, caratterizzato da una rigidità maggiore rispetto al pericardio nativo e decellularizzato. L'insieme dei dati collezionati tramite la caratterizzazione meccanica colma, inoltre, l'assenza di dati di letteratura relativi al comportamento biomeccanico del pericardio di origine porcina.

Le prove di permeabilità hanno permesso poi di osservare che proprio a causa della rimozione delle cellule il tessuto decellularizzato diventa permeabile, caratteristica questa che rende necessaria una fase di ricellularizzazione al fine di ristabilire le proprietà di impermeabilità che caratterizzano il tessuto nativo. D'altro canto, come discusso nel dettaglio in diverse sezioni del presente elaborato, la ricellularizzazione è da intendersi come uno step fondamentale per giungere alla *funzionalizzazione* dei costrutti volta all'ottenimento di una protesi in grado di ripristinare le funzionalità della valvola nativa patologica. Tale funzionalità, come suggerito da diversi lavori di letteratura nel campo dell'ingegneria dei tessuti ed in particolare della ingegneria tissutale delle valvole cardiache, può essere ottenuta andando a ricreare *in vitro* quel complesso sistema che grazie all'interazione dinamica tra le il tessuto e cellule conferisce alla valvola nativa le sue caratteristiche funzionali.

In una seconda fase del lavoro si è proceduto dunque alla definizione di un protocollo di ricellularizzazione delle matrici decellularizzate, utilizzando cellule proprie del tessuto valvolare, ovvero le VICs. Tale attività ha previsto lo svolgimento di test di coltura statica delle VICs ed ha richiesto la progettazione e la realizzazione di un sistema che permettesse di eseguire la semina delle VICs su una specifica superficie del foglietto di pericardio (coltura *confinata*). Il sistema realizzato ha soddisfatto tutti i requisiti definiti in fase di progettazione (*Paragrafo 4.1.1*) ed ha dimostrato la sua efficacia nel consentire di svolgere le campagne sperimentali in maniera agevole, ovvero senza richiedere manovre particolarmente complesse da parte dell'operatore. Il sistema è stato cioè facilmente integrato con gli strumenti tipicamente utilizzati nel laboratorio biologico di colture cellulari senza comportare la necessità di modificare le procedure utilizzate dal personale del laboratorio né ha comportato un significativo aumento dei costi di realizzazione degli esperimenti. Ad esempio, il sistema è stato ideato per poter essere inserito all'interno dei

pozzetti di una *multiwell* ed essere sterilizzato tramite un protocollo standard di sterilizzazione in autoclave.

La successiva fase del lavoro è consistita nella definizione di un protocollo per l'ottenimento e il mantenimento della sterilità del tessuto decellularizzato. Dopo aver verificato (attraverso il saggio del tioglicolato) la presenza di una carica non trascurabile di agenti patogeni contaminanti il tessuto nativo (il cuore da cui viene estratto il pericardio è prelevato in un macello, in condizioni quindi di non sterilità) ed aver constatato che la sola decellularizzazione non è in grado di abatterla totalmente, è stata messa a punto una procedura di decontaminazione del tessuto pericardico, consistente nell'incubazione del tessuto in una soluzione (BASE.128) contenente un mix di antibiotici attivi contro gli agenti contaminanti più comuni. I test condotti hanno evidenziato che un trattamento decontaminante della durata di 72h assicura la decontaminazione completa del pericardio. È emerso inoltre che l'alloggiamento del patch di tessuto biologico all'interno del sistema di coltura rappresenta una fase critica del protocollo, in quanto potenzialmente rischiosa dal punto di vista della possibile reintroduzione di contaminazioni, soprattutto se svolta da un utente non esperto. Per questo motivo si è scelto di introdurre nel protocollo un'ulteriore fase di decontaminazione del tessuto da eseguirsi a valle dell'alloggiamento del patch di pericardio nel sistema di coltura, consistente in una nuova incubazione in BASE.128, della durata di 24h. Un secondo test del tioglicolato ha dimostrato l'efficacia di questa procedura nel mantenimento della sterilità del tessuto.

Infine, si è proceduto agli esperimenti di coltura delle VICs. Il sistema di coltura realizzato ha consentito di indagare in maniera selettiva quale fosse la superficie del foglietto di pericardio (fibrosa vs sierosa) più adatta al ripopolamento: tale studio si propone, nuovamente, di collezionare dati sperimentali che, ad oggi, non sono presenti (in maniera dettagliata e/o esaustiva) in letteratura. Nel tentativo di ottimizzare il protocollo di coltura delle VICs sono state condotte differenti campagne sperimentali al variare della densità cellulare di semina e del tempo di coltura andando così di effettuare un'analisi completa mirata a valutare l'influenza dei principali parametri di processo. Dalla caratterizzazione biologica (test MTT, colorazione con H&E, immunofluorescenza con DAPI) eseguita sui costrutti ricellularizzati è emerso che la superficie sierosa del pericardio favorisce l'adesione e la proliferazione delle VICs, al contrario della superficie fibrosa che sembra inibire l'adesione delle cellule, causando la morte di una notevole quantità di cellule

seminate dopo 72h in coltura. La condizione testata che ha fornito i risultati migliori in termini di efficienza dell'esperimento di semina è stata quella che combina la coltura delle cellule seminate al valore di densità maggiore (3×10^3 cell/mm², valore stimato a partire dal numero di cellule a confluenza in esperimenti di espansione delle VICs su piastra Petri) sulla superficie sierosa del pericardio per un tempo di coltura di 72h. Tale condizione permette di osservare, al termine del periodo di coltura, la formazione di uno strato confluyente di cellule adese ed uniformemente distribuite su tutta la superficie del pericardio.

La coltura delle VICs sul versante sieroso del pericardio non ha tuttavia portato (al termine delle 72h di coltura) ad una colonizzazione degli strati più profondi del tessuto. Tale risultato potrebbe essere dovuto sia alla struttura propria della ECM del pericardio, eccessivamente compatta e densa in fibre di collagene, che non permette l'infiltrazione delle cellule all'interno della matrice, sia ad un periodo di coltura eccessivamente ridotto. A tal proposito, un immediato sviluppo futuro del progetto realizzato potrà essere la conduzione di nuovi esperimenti mantenendo le cellule in coltura per un periodo di durata maggiore (ad esempio 7, 14, 21 giorni): il rationale dei nuovi esperimenti proposti è quello di valutare se le VICs riescano, in un lasso di tempo maggiore, a penetrare la struttura del tessuto, ripopolandolo al suo interno, giungendo così alla formazione di un costrutto *funzionalizzato*.

Analizzando nel loro insieme le varie fasi che hanno caratterizzato il lavoro fin qui svolto, un ulteriore sviluppo che è emerso durante lo svolgimento delle attività riguarda la caratterizzazione biologica della matrice decellularizzata. In dettaglio, si è pensato di predisporre lo svolgimento di test in grado di quantificare il contenuto di DNA residuo nel tessuto decellularizzato per verificare che il protocollo rispetti le indicazioni presenti in letteratura, che suggeriscono che una quantità di DNA residua < 50 ng/mg di tessuto, garantendo la completa non immunogenicità e minimizzando la possibilità di calcificazione del tessuto stesso, in quanto i residui di DNA costituiscono i siti di calcificazione; successivamente, analisi immunologiche più approfondite - *in vitro* attraverso esperimenti di coltura di cellule di altra origine animale (ad esempio umane) sul pericardio decellularizzato e/o *in vivo* procedendo all'impianto di una porzione di pericardio decellularizzato in un modello animale differente dal maiale - consentiranno di

verificare l'effettiva traslabilità del protocollo sviluppato in applicazioni di TEHV su paziente umano.

Un ulteriore sviluppo a breve termine per quanto riguarda la caratterizzazione della matrice potrebbe consistere in un'analisi più approfondita della composizione del tessuto in seguito al processo di decellularizzazione, in particolare andando a verificare tramite analisi di immunoistochimica *fibronectina* e *laminina*, componenti proteiche della matrice d'interesse per la fase di ricellularizzazione, in quanto svolgono un ruolo centrale nell'adesione, proliferazione e migrazione cellulare.

In fase di analisi dei dati ottenuti a valle delle campagne di ricellularizzazione del patch, si è inoltre programmato di condurre nuovi esperimenti di coltura con VICs introducendo una fase di condizionamento dinamico in bioreattore; l'idea è quella di sottoporre il costrutto ricellularizzato a dei cicli di sollecitazioni meccaniche tessuto che *i)* favoriscano la migrazione delle cellule negli strati più interni della matrice del tessuto per giungere ad un completo ripopolamento dei patch di pericardio, *ii)* stimolino la sintesi da parte delle VICs di nuova matrice e quindi la formazione di un costrutto ingegnerizzato del tutto funzionale. Il sistema di coltura dinamico potrebbe essere un sistema basato sulla perfusione del tessuto in coltura, ovvero un dispositivo con caratteristiche simili alla camera di perfusione utilizzata per le prove di permeabilità. La camera di perfusione permetterebbe infatti una perfusione confinata del patch da eseguirsi a valle di un periodo di coltura statica: la perfusione, traducendosi in una pressurizzazione del tessuto ed in ultima analisi nella distensione del tessuto, potrebbe favorire la penetrazione negli strati più interni delle cellule che hanno aderito in superficie al termine del periodo di coltura statica. Certamente, l'introduzione di una fase di condizionamento dinamico prevederebbe, a monte, la definizione di un opportuno protocollo di stimolazione. Inoltre, la perfusione del tessuto durante la coltura garantirebbe un adeguato apporto di ossigeno e nutrienti anche alle cellule migrate in profondità del tessuto.

Infine, in caso il protocollo di stimolazione definito risultasse efficace, uno sviluppo a lungo termine potrebbe essere lo scale-up della camera di perfusione. Al momento, infatti, il sistema consentirebbe l'alloggiamento del patch da ricellularizzare con diametro di 8 mm. Ricordando che l'obiettivo ultimo del presente lavoro sarà quello di generare costrutti ingegnerizzati per la fabbricazione dei lembi di bioprotesi valvolari umane, le dimensioni

dei costrutti in coltura dovranno essere compatibili con l'anatomia delle valvole cardiache. In tal modo, le bioprotesi, realizzate utilizzando tessuto pericardico di origine porcina ricellularizzato con VICs di origine umana senza trattamento di fissaggio con GA, potrebbero rappresentare una valida alternativa alle protesi (meccaniche e biologiche) ad oggi disponibili in commercio.

Bibliografia

1. Atala, A., *Engineering organs. Curr Opin Biotechnol*, 2009. **20**(5): p. 575-92.
2. Boyce, S.T., et al., *Comparative assessment of cultured skin substitutes and native skin autograft for treatment of full-thickness burns. Ann Surg.*, 1995. **222**(6): p 743-52.
3. Kon, E., et al., *Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bone. Journal of Biomedical Materials Research*, 2000. **49**(3): p. 328-337.
4. Marcacci, M., et al., *Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6-to-7-year outcome of a pilot clinical study. Tissue Eng*, 2007. **13**(5):p. 947-55.
5. Braga Braile, MV., et al., *In vitro properties and performance of glutaraldehyde-crosslinked bovine pericardial bioprostheses treated with glutamic acid. Artificial organs*, 2011. **35**(5):p. 497-501.
6. Vinci, M.C., et al., *Mechanical compliance and immunological compatibility of fixative-free decellularized/cryopreserved human pericardium. PLoS ONE*, 2013. **8**(5): e64769.
7. Nkomo, V.T., et al., *Burden of valvular heart diseases: a population-based study. Lancet*, 2006; **368**: p. 1005-1011.
8. Iung, B., et al., *A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. European Heart Journal*, 2003; **24**: p. 1231-1243.
9. *The society of Thoracic Surgeons. Adult cardiac surgery database, executive summary, 10 years sts report-period ending 12/31/2009.*
10. Bramstedt, K.A., et al., *Aortic valve replacement in the elderly: frequently indicated yet frequently denied. Gerontology*, 2003; **49**: p. 46-49.
11. Agrifoglio, M., *57° Congresso Società Italiana di Gerontologia e Geriatria*, 2003.
12. Harken, D.E., *Heart valves: ten commandments and still counting. Ann Thorac Surg*, 1989; **48**: p. 18-19.
13. Badak, M.I., et al., *Replacement of a Bjork-Shiley Delrin Aortic valve still functioning after 25 years (case report). Tex Heart Inst*, 2004; **31**:p. 303-5.

14. Kalyani, N., et al., *Developments in mechanical heart valve prosthesis. Sadhana*, 2003; **28**: p. 575-587.
15. Ross, D.N., et al., *Homografts replacement of the aortic valve. Lancet*, 1962; **280**: p. 487.
16. Spodick, D.H., *The Pericardium. Dekker M eds*, 1997; p. 7-26.
17. Schoen, F.J., et al., *Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. Ann Thorac Surg*, 2005; **79**: p. 1072-1080.
18. Valente, M., *Ultrastructural substrates of dystrophic calcification in porcine bioprosthetic valve failure. Am J Pathol*, 1985; **119**: p. 12 - 21.
19. Thiene, G., and Valente, M., *Anticalcification strategies to increase bioprosthetic valve durability. J Heart Valve Dis*, 2011; **20**: p. 37- 44.
20. Lim, H.G., et al., *Anticalcification effects of decellularization, solvent and detoxification treatment for genipin and glutaraldehyde fixation of bovine pericardium. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2012; **41**: p. 383-390.
21. Vesely, I., et al., *Tissue buckling as a mechanism of bioprosthetic valve failure. Ann Thorac Surg*, 1988; **46**: p. 302-308.
22. Fisher, J., and Davies, G.A., *Buckling in bioprosthetic valves. Ann Thorac Surg*, 1989; **48**: p. 147-148.
23. Shimuzu, T., et al., *Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. Biomaterials*, 2003; **24**: p. 2309-2316.
24. Dai, W., et al., *Thickening of the infarcted wall by collagen injection improves left ventricular function in rats: a novel approach to preserve cardiac function after myocardial infarction. J Am Col Cardiol*, 2005; **46**: p. 714-719.
25. Bouten, C.V.C., et al., *Substrates for cardiovascular tissue engineering. Adv Drug Deliv Rev*, 2011; **63**: p. 221-241.
26. Brody, S., and Pandit, A., *Approaches to heart valve tissue engineering scaffold design. J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2007; **83**: p. 16-43.
27. Shinoka, T., et al., *Tissue-engineered heart valves. Autologous valve leaflet replacement study in a lamb model. Circulation*, 1996; **94**: p. 164-168.
28. Shinoka, T., et al., *Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering. J Thorac Cardiovasc Surg*, 1998; **115**: p. 536-546.

29. Zund, G., et al., *The in vitro construction of a tissue engineered bioprosthetic heart valve. Eur J Cardiothorac Surg*, 1997; **11**: p. 493-497.
30. Schmidt, D., et al., *Engineering of Biologically Active Living Heart Valve Leaflets Using Human Umbilical Cord-Derived Progenitor Cells. Tissue Engineering*, 2006; **11**: p. 3223-3232.
31. Kessler, B., and Withold, B., *Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. Journal of Biotechnologies*, 2001; **86**: p. 97-104.
32. Sodian, R., et al., *Early in vivo experience with tissue-engineered trileaflet heart valves. Circulation*, 2000; **102**: p. 22-29.
33. Sodian, R., et al., *Evaluation of biodegradable, three-dimensional matrices for tissue engineering of heart valves. ASAIO*, 2000; **46**: p. 107-110.
34. Sodian, R., et al., *Fabrication of trileaflet heart valves from polyhydroxyalkanoate biopolyester for use in tissue engineering. Tissue Engineering*, 2000; **6**: p. 183-188.
35. Hoerstrup, S.P., et al., *Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. Circulation*, 2000; **102**: p. 44-49.
36. Rabkin, E., and Schoen, F.J., *Cardiovascular tissue engineering. Cardiovasc Pathol*, 2002; **11**: p. 305-31.
37. Hoerstrup, S.P., *Autologous heart valve tissue engineering. 2005*; p. 50-59.
38. Alferiev, I., et al., *Prevention of polyurethane valve cusp calcification with covalently attached bisphosphonate diethylamino moieties. J Biomed Mater Res*, 2003; **66**: p. 385-395.
39. Zeltiger, Z., et al., *Development and Characterization of Tissue-Engineered Aortic Valves. Tissue Engineering*, 2001; **1**: p. 9-22.
40. Bader, A., et al., *Tissue engineering of heart valves-human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. Eur J Cardiothorac Surg*, 1998; **14**: p. 279-284.
41. Leukauf, C., et al., *In vitro and in vivo endothelialization of glutaraldehyde treated bovine pericardium. J Heart Valve Dis*, 1993; **2**: p. 230-235.
42. Duran, C.G., and Gometza, B., *New uses of pericardium for valve surgery. In LC D'Alessandro (Ed), editor, In Heart Surgery 1993, Proceedings of the 5th International Symposium on Cardiac Surgery, Rome, Italy, pages 69-82. Casa Editrice Scientifica Internazionale, Rome, Italy.*

43. *Mirsadraee, S., et al., Development and characterization of an acellular human pericardial matrix for tissue engineering. Tissue Engineering, 2004; 4: p. 763-773.*
44. *Trowbridge, E.A., Mechanical characteristics of pericardial tissue and their relevance to bioprosthetic design. Biocompatibility, 1989; 5: p. 105-172.*
45. *Konakci, K.Z., et al., Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery. European Journal of Clinical Investigation, 2005; 35: p. 17-23.*
46. *van den Heever, J.J., et al., The effect of different treatment modalities on the calcification potential and cross-linking stability of bovine pericardium. Cell Tissue Bank, 2013; 14: p. 53-63.*
47. *Jorge-Herrero, E., et al., Biocompatibility and calcification of bovine pericardium employed for the construction of cardiac bioprostheses treated with different chemical crosslink methods. Artificial organs, 2010; 34(5): p. 168-176.*
48. *Kasimir, M.T., et al., Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue - engineered porcine heart valves. J Heart Valve Dis, 2006; 15: p. 278-286.*
49. *Rieder, E., et al., Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. J Thorac Cardiovasc Surg, 2004; 172: p. 399-405.*
50. *Grauss, R.W., Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. Eur J Cardiothorac Surg, 2005; 27: p. 566-571.*
51. *Steinhoff, G., et al., Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits. Circulation, 2000; 102: p. 50-55.*
52. *Crapo, P., et al., An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials, 2011; 32: p. 3233-3243.*
53. *Gratzer, P.F., et al., Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix. Tissue Eng, 2006; 12(10): p. 2975-83.*
54. *Badylak, S.F., et al., Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. Ann Rev Biomed Eng, 2011; 13: p. 27-53.*
55. *Phillips, M., et al., Non thermal irreversible electroporation for tissue decellularization. J. Biomech Eng, 2010; 132(9).*

56. Gilbert, T.W., et al., *Decellularization of tissues and organs*. *Biomaterials*, 2006; **27(19)**: p. 3675-83.
57. Freytes, D.O., et al., *Uniaxial and biaxial properties of terminally sterilized porcine urinary bladder matrix scaffolds*. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2008; **84B(2)**: p. 408-414.
58. Korossis, S., et al., *Regional biomechanical and histological characterisation of the passive porcine urinary bladder: Implications for augmentation and tissue engineering strategies*. *Biomaterials*, 2009; **30**: p. 266-275.
59. Bolland, F., et al., *Development and characterisation of a full-thickness acellular porcine bladder matrix for tissue engineering*. *Biomaterials*, 2007; **28(6)**: p. 1061-1070.
60. Farhat, W., et al., *Porosity of porcine bladder acellular matrix: Impact of ACM thickness*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2003; **67A(3)**: p. 970-974.
61. Cartwright, L.M., et al., *Porcine bladder acellular matrix porosity: impact of hyaluronic acid and lyophilization*. *J Biomed Mater Res A*, 2006; **77(1)**: p. 180-184.
62. Consolo, F., et al., *A dynamic distension protocol for whole-organ bladder decellularization: histological and biomechanical characterization of the acellular matrix*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2013; doi: 10.1002/term.1767.
63. Ott, H.C., et al., *Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart*. *Nat Med*, 2008; **14(2)**: p. 213-221.
64. Baptista, P.M., et al., *The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid*. *Hepatology*, 2011; **53(2)**: p. 604-617.
65. Ozeki, M., et al., *Evaluation of decellularized esophagus as a scaffold for cultured esophageal epithelial cells*. *J Biomed Mater Res A*, 2006; **79(4)**: p. 771-778.
66. Asnaghi, M.A., et al., *A double-chamber rotating bioreactor for the development of tissue-engineered hollow organs: From concept to clinical trial*. *Biomaterials*, 2009; **30(29)**: p. 5260-5269.
67. Taylor, D.A. and M.J. Robertson, *The Basics of Cell Therapy to Treat Cardiovascular Disease: One Cell Does Not Fit All*. *Revista Española de Cardiología*, 2009; **62(09)**: p. 1032-1044.
68. Petersen, T.H., et al., *Tissue-engineered lungs for in vivo implantation*. *Science*, 2010; **329(5991)**: p. 538-41.

69. *Badylak, S.F., et al., Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog. J Surg Res, 1989; 47(1): p. 74-80.*
70. *Badylak, S.F., et al., Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. Acta Biomater, 2009; 5(1): p. 1-13.*
71. *Gauvin, R., et al., A comparative study of bovine and porcine pericardium to highlight their potential advantages to manufacture percutaneous cardiovascular implants. Journal of Biomaterials Applications, 2012; 0(0): p. 1-14.*
72. *Dong, X., et al., RGD-modified acellular bovine pericardium as a bioprosthetic scaffold for tissue engineering. J Mater Sci: Mater Med, 2009; 20: p. 2327-2336.*
73. *Hulsmann, J., et al., Transplantation material bovine pericardium: biomechanical and immunogenic characteristics after decellularization vs. glutaraldehyde-fixing. Xenotransplantation, 2012; 19: p. 286-297.*
74. *Yang, M., Favorable effects of the detergent and enzyme extraction method for preparing decellularized bovine pericardium scaffold for tissue engineered heart valves. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater, 2009; 91B: p. 354-361.*
75. *Gastaldello, A., Ingegneria Tissutale delle Valvole Cardiache: valutazione di metodi di decellularizzazione e semine cellulari su Pericardio Bovino e Porcino, Relatore: Gerosa, G., in Tesi di dottorato di ricerca in Scienze Mediche, Cliniche E Sperimentali, 2012; Università degli Studi di Padova.*
76. *Mendelson, K., and Schoen, F.J., Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges. Ann Biomed Eng, 2006; 12: p. 1799-1819.*
77. *Schopka, S., et al., Recellularization of biological heart valves with human vascular cells: in vitro hemocompatibility assessment. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater, 2009; 88B: p. 130-138.*
78. *Yang, M., et al., Preseeding of human vascular cells in decellularized bovine pericardium scaffold for tissue-engineered heart valve: an in vitro and in vivo feasibility study. J Biomed Mater Res Part B, 2012; 100B: p. 1654-1661.*
79. *Zhou, J., et al., Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity. Biomaterials, 2010; 31: p. 2549-2554.*
80. *Stellner, K., et al., Determination of aminosugar linkages in glycolipids by methylation. Aminosugar linkages of ceramide pentasaccharides of rabbit erythrocytes and of Forssman antigen. Arch Biochem Biophys, 1973; 155: p. 464-472.*
81. *Galili, U., The alpha-gal epitope (Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc-R) in xenotransplantation. Biochimie, 2001; 83: p. 557-563.*

82. Dahms, et al., *Composition and biomechanical properties of the bladder acellular matrix graft: comparative analysis in rat, pig and human. British Journal of Urology*, 1998. **82(3)**: p. 411-419.
83. Dal Dosso, F., *Sviluppo di un sistema per il monitoraggio e il controllo della stimolazione in pressione in applicazioni di ingegneria dei tessuti*, Relatore: Soncini, M., in *Tesi di laurea magistrale in Ingegneria Biomedica*, 2013; Politecnico di Milano.
84. Piola, M., *Sviluppo e test preliminare di un bioreattore a perfusione destinato all'espansione di cellule staminali ematopoietiche*, Relatori: Fiore G.B., Soncini, M., in *Tesi di laurea in Ingegneria Biomedica*, 2009; Politecnico di Milano.
85. Urban, A., *Ingegneria del tessuto urovescicale: caratterizzazione della matrice decellularizzata e sviluppo di un sistema di coltura per la sua sollecitazione meccanica in fase di ricellularizzazione in vitro*, Relatore: Soncini, M., in *Tesi di laurea magistrale in Ingegneria Biomedica*, 2012; Politecnico di Milano.
86. Villegas, N.A., et al., *Relevance of biofilms in the pathogenesis of shiga-toxin-producing Escherichia Coli infection. The scientific world journal*, 2013;
87. Ahmed, M., et al., *Effects of sterilization treatments on bulk and surface properties of nanocomposite biomaterials. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, 2013; **101B**: p. 1182–1190.
88. Taylor, P.M., et al., *The cardiac valve interstitial cells. The international journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2003; **35**: p. 113-118.
89. Taylor, P.M., et al., *Phenotypic and functional characterization of interstitial cells from human heart valves, pericardium and skin. J Heart Valve Dis*, 2000; **9(1)**: p. 150-158.
90. Gunetti, M., et al., *Validation of analytical methods in GMP: the disposable Fast Read 102® device, an alternative practical approach for cell counting. Journal of Translation Medicine*, 2012; **10**: p. 112.
91. Visentin, S., *Utilizzo di test di vitalità cellulare nella determinazione di citotossicità di dispositivi medici*, Relatore: Baroni, M.D., in *Tesi di laurea in Biotecnologie*, 2009; Università degli Studi di Padova.

... e dopo i 5 anni più importanti, più significativi e più difficili della mia vita, eccomi a scrivere quelle pagine che medito da tanto tempo e che, in certi momenti, ho creduto non sarei mai arrivare a scrivere. È giunto dunque il momento di ringraziare tutti coloro che hanno permesso che io mi trovi qui, ora. L'emozione è tanta, ma spero mi permetta comunque di tirar fuori qualcosa di leggibile e poco retorico, per quanto possibile.

Andrò a braccio sperando di non dimenticare nessuno, ma se tu, mio caro lettore, non dovessi trovare il tuo nome nelle prossime righe... dimmelo e ti ringrazierò di persona, anche per il solo fatto che tu abbia interesse a leggere.

Per prima cosa, un sentito ringraziamento va alla Prof.ssa Monica Soncini per la disponibilità e la gentilezza con cui mi ha seguito durante tutto il percorso di tesi e per la vicinanza espressa nei momenti più difficili.

Un fondamentale ringraziamento va all'Ing. Filippo Consolo che ha respirato con me questa tesi e ha sudato con me e per me perché tutto andasse per il verso giusto. Ha inoltre il merito di aver reso questa tesi comprensibile a tutti, grazie alle sue provvidenziali correzioni, togliendo tempo prezioso alle sue attività e ai suoi impegni.

Un ringraziamento va a tutti i componenti del gruppo di ricerca del μ BS Lab per la disponibilità ed in particolare all'Ing. Marco Piola per i suoi preziosi consigli quando mi sono trovato "in trasferta" al Monzino e per le sue recensioni di tutti i ristoranti di Chiavari e dintorni.

Un ringraziamento dovuto va inoltre al Dott. Maurizio Pesce e a tutto lo staff del Laboratorio di Ingegneria Tissutale Cardiovascolare del Centro Cardiologico Monzino. E quindi grazie a Rosaria Santoro, Francesca Prandi e Cristina Vinci per avermi fatto crescere all'interno di un gruppo di lavoro e per aver insegnato a un povero ingegnere le basi della coltura cellulare.

Devo ringraziare anche tutti gli amici e colleghi che hanno condiviso con me il percorso universitario, contribuendo a renderlo indimenticabile. Elencarvi tutti senza dimenticare nessuno sarebbe impossibile. Perdonatemi. Grazie di cuore, a tutti voi.

Grazie anche, e soprattutto, ai miei genitori, che non mi hanno fatto mancare mai nulla. Mai. E non solo dal punto di vista materiale. Hanno riposto in me speranze e aspettative,

supportandomi sempre affinché riuscissi a portare a termine con successo questi 5 anni di studio. Spero di non averli mai delusi. I risultati che ho ottenuto, i traguardi che ho raggiunto, li dedico a voi, perché se oggi sono quello che sono il merito è vostro. Sono un figlio fin troppo fortunato.

E insieme ai miei genitori, un sentito ringraziamento va alla mia famiglia, sempre al mio fianco: mio fratello, mia sorella, Stefano (un fratello, più che un cugino) e tutti gli altri cugini, gli zii e i nonni. Grazie di avermi sempre fatto sentire la vostra fondamentale presenza.

Grazie anche ai membri della mia “seconda famiglia”, Monica e Massimo, per avermi praticamente adottato, accogliendomi in casa vostra come fossi sempre stato uno di voi, fin dal primo giorno in cui vi ho conosciuto. Siete delle persone speciali.

Un ringraziamento speciale va anche a Tep, Cristine, Martina, Edo, il piccolo Ics e Cito, amici di “una vita” che sono sempre stati presenti, aiutandomi ad alleggerire i momenti più difficili e ricordandomi quanto sia utile staccare la spina, ogni tanto... Bisognerebbe farlo un po’ di più.

L’ultimo ringraziamento, il più commosso, va a Marghe, la persona più importante della mia vita. Sei la persona che più di tutti mi è stata sempre vicina, nei momenti migliori e, soprattutto, in quelli peggiori, sostenendomi ed incoraggiandomi a combattere e ad andare avanti per raggiungere i miei obiettivi. In questi 3 anni insieme mi hai insegnato ad amare, facendomi capire la differenza tra il “tu ed io” e il “NOI”. Purtroppo, non posso dilungarmi, perché per esprimerti tutto ciò che sento non basterebbero neanche tutte le pagine di questa tesi. Tutto quello che ho da dirti, te lo dirò a voce.

Grazie infinite a tutti.

Marco