

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
“AMEDEO AVOGADRO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Farmacia

TESI DI LAUREA

Titolo della tesi

*La decellularizzazione di organi e tessuti come nuova frontiera
dell'ingegneria tessutale*

Relatore

Prof.ssa Michela Bosetti

Candidato

Gabriele Moneta

SESSIONE ESTIVA A.A. 2023/2024

INDICE

INTRODUZIONE.....	3
LA DECELLULARIZZAZIONE.....	7
AGENTI CHIMICI	8
AGENTI BIOLOGICI.....	11
AGENTI ENZIMATICI	12
AGENTI FISICI.....	14
CONSERVAZIONE E STERILIZZAZIONE.....	20
VALUTAZIONE DELLA ECM DECELLULARIZZATA	29
TIPOLOGIE DI INNESTI DI ECM DECELLULARIZZATA	38
ELABORAZIONE PRE-IMPIANTO.....	44
APPLICAZIONI CLINICHE DI ORGANI INTERI	51
CONCLUSIONI	55
BIBLIOGRAFIA	59
BIBLIOGRAFIA DELLE FIGURE.....	66

INTRODUZIONE

L'ingegneria tessutale è un campo di ricerca multidisciplinare volto alla realizzazione di tessuti e/o organi che riparino, migliorino o preservino le funzioni di un tessuto/organo umano danneggiato ^[1].

Ad oggi la percentuale di persone che soffrono di disfunzioni d'organo o di danni estesi ai tessuti è elevata e il danno causato da queste malattie limita notevolmente la qualità della vita. I principali mezzi per curare queste malattie sono rappresentati da trapianti d'organo, impianti di dispositivi medici sostitutivi e ricostruzioni chirurgiche; tuttavia ciascuna di queste tecniche comporta notevoli svantaggi. I trapianti di organi da donatore della stessa specie (allograpianti) o autologhi (autotrapianti), sono principalmente caratterizzati dalla limitata disponibilità di materiale trapiantabile mentre nei trapianti con materiale biologico ottenuto da specie diversa (xenotrapianti) possono verificarsi reazioni di rigetto dovute all'incompatibilità dell'organo o della parte di tessuto impiantato con il corpo del paziente. L'impianto di dispositivi medici può invece favorire lo sviluppo di infezioni e solitamente queste strutture non soddisfano tutte le funzioni meccaniche originarie dell'organo sostituito. Infine, le ricostruzioni chirurgiche possono causare tempi di recupero lunghi e danni a lungo termine.

Per questi motivi l'ingegneria tissutale (TE) si pone come obiettivo la creazione artificiale di parti di tessuto o interi organi che possano essere impiantati per rigenerare o riparare il tessuto stesso. Idealmente la TE prevede la creazione di un tessuto o di un organo a partire dalle cellule autologhe del paziente: il costruito così ottenuto potrà essere reimpiantato nel paziente stesso senza causare problemi di rigetto o di incompatibilità.

La TE si basa sull'utilizzo di tre componenti fondamentali: le cellule, i fattori di crescita (GF) e gli scaffold (o impalcature) ^[2]. Le **cellule** sono responsabili della generazione di nuovi tessuti sotto l'influenza dei **fattori di crescita** e dell'ambiente circostante mentre gli **scaffold** sono i supporti sui quali vengono fissate le cellule e devono avere una porosità adeguata per garantire il flusso di nutrienti e ossigeno e per fornire stimoli meccanici e biochimici alle cellule stesse. I GF, infine, sono biomolecole che interagiscono con le cellule, creando degli effetti a cascata volti a generare tessuti maturi. Per poter ottenere un tessuto fisiologico e funzionale, ciascuno dei tre elementi sopra descritti deve essere attentamente selezionato.

L'ingegneria dei tessuti si concentra quindi sulla realizzazione di uno scaffold biomimetico, ossia una matrice porosa tridimensionale avente proprietà meccaniche, biochimiche e strutturali adatte alla coltura di cellule umane le quali si troveranno in un ambiente ricco di stimoli biochimici, fisici e meccanici circondate da una rete di proteine e glicolipidi chiamata matrice extracellulare (ECM) che consenta alle cellule di usufruire di questi stimoli per la loro attività. L'obiettivo principale nella realizzazione di uno scaffold è quello di imitare accuratamente l'ECM per garantire alle cellule un ambiente di crescita ottimale in grado di fornire stimoli specifici non solo per la proliferazione cellulare ma anche per la loro differenziazione^[3].

Poiché i tessuti umani variano notevolmente riguardo a componenti cellulari, densità cellulare, spessore, vascolarizzazione e proprietà meccaniche la creazione di uno scaffold deve essere progettata specificamente per il tessuto studiato e devono essere biocompatibili e citocompatibili. La citocompatibilità dimostra la capacità dello scaffold di accogliere cellule umane e promuovere la crescita di nuovi tessuti, mentre la biocompatibilità garantisce che la sua presenza nel corpo umano non provochi tossicità e non si verifichino reazioni immunitarie eccessive. Se il materiale di cui è costituito lo scaffold è biodegradabile bisogna considerare che anche i prodotti della degradazione siano biocompatibili^[4].

I materiali utilizzati per la creazione di scaffold possono essere polimeri naturali o sintetici. I primi sono generalmente ben tollerati dall'organismo e sono caratterizzati da una migliore biocompatibilità e adesività per le cellule. Sono prelevati da tessuti animali o vegetali, non disponibili in grande quantità, inoltre variano notevolmente a seconda dell'organismo da cui vengono prelevati. Come contro presentano una scarsa riproducibilità e una bassa lavorabilità. Alcuni esempi sono il collagene, l'acido ialuronico e il chitosano. I polimeri sintetici invece sono preferibili per la loro versatilità, poiché possono essere riprodotti su larga scala e essere trasformati in uno scaffold in cui la struttura di base, le proprietà meccaniche e il tasso di degradazione possono essere controllati e manipolati. Il principale svantaggio di questi materiali è rappresentato dalla mancanza di segnali specifici per il riconoscimento cellulare. A questa classe di materiali sintetici appartengono ad esempio il PLA, il PLGA e il PGA^[5].

È fondamentale che lo scaffold abbia proprietà meccaniche e strutturali adeguate per assicurare una corretta cellularizzazione. A tal proposito, sono state sviluppate svariate tecniche al fine di ottenere

architetture, dimensioni e forme adatte alla crescita di diversi tipi di tessuti classificabili in due categorie principali: tecniche convenzionali e tecniche di prototipazione rapida. Un elenco dei principali metodi utilizzati per la produzione degli scaffold e dei relativi vantaggi e svantaggi è riportato nella **Tabella 1**.

Tabella 1: Classificazione delle tecnologie di produzione degli scaffold ^[6].

Tecniche di produzione	Vantaggi	Svantaggi	
TECNICHE CONVENZIONALI	1. Freeze-drying	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Versatile ❖ Capacità di resistere ad alte temperature ❖ Dimensione dei pori facilmente regolabile 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Alto consumo energetico ❖ Tempi lunghi ❖ Utilizzo di solventi citotossici ❖ Pori irregolari e disomogenei
	2. Solvent casting and practical leaching	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Adatta per membrane sottili ❖ Elevata porosità ❖ Bassi costi 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Tempi lunghi ❖ Solventi tossici
	3. Gas foaming	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Porosità fino all' 85% 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Possibile formazione di pori chiusi o strato superficiale solido
	4. Electrospinning	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Produzione scaffold nanofibrosi ❖ Miscela omogenea composta da fibre resistenti alla tensione 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Solventi tossici ❖ Complicato ottenere strutture 3D e dimensioni dei pori sufficienti per applicazioni biomediche
	5. Thermal-induced phase separation	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Formazione polimero cristallino termoplastico ❖ Bassa temperatura ❖ Possibilità di integrare molecole bioattive ❖ Alta porosità 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Utilizzato solo per materiali termoplastici
TECNICHE DI PROTOTIPAZIONE RAPIDA	1. Stereolithography (SLA)	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Alta risoluzione ❖ Pori interconnessi e uniformi 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Limitazioni nel processo di fotopolimerizzazione ❖ Richiede enormi quantità di monomeri
	2. Selective laser sintering (SLS)	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Ottimo controllo delle microstrutture dello scaffold 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Necessari passaggi post elaborazione
	3. Solvent-based extrusion freeforming (SEF)	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Possibilità di creare parti in ceramica, metallo o compositi ❖ Controllo preciso della struttura e meccanica dello scaffold 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Complesso settaggio dei parametri che influenzano il processo
	4. Bioprinting	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Basso costo ❖ Maggiore precisione ❖ Elevata vitalità cellulare 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Dipende dalla presenza di cellule
	5. Fused deposition modeling (FDM)	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Semplice regolazione del design dello scaffold ❖ Basse temperature 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Non applicabile a polimeri biodegradabili

Fino ad ora, una delle limitazioni più importanti nel successo nella realizzazione di scaffold è rappresentata dalla loro vascolarizzazione *in vivo*; nonostante l'utilizzo di procedure pre-impianto o l'immersione dello scaffold in soluzioni contenenti fattori di crescita, il livello di vascolarizzazione rimane ancora insufficiente [7]. Un secondo limite, legato all'utilizzo di polimeri artificiali, è il forte impatto ambientale, che ha portato i ricercatori a concentrarsi sull'analisi di polimeri naturali, tra cui il polisaccaride più abbondante sul pianeta, la cellulosa.

Per superare questi limiti legati alla creazione artificiale di uno scaffold meccanicamente e strutturalmente adeguato alla rigenerazione dei tessuti umani, la ricerca scientifica si è focalizzata sullo studio di sistemi naturali già esistenti adattabili all'adesione, proliferazione e sopravvivenza di cellule umane. L'identificazione di questi sistemi ha portato allo sviluppo di nuove tecnologie tra le quali spicca la decellularizzazione, una tecnica che utilizza strutture animali o vegetali già formate rimuovendone le componenti cellulari senza compromettere l'integrità strutturale e la composizione della matrice extracellulare e, in alcuni casi, conservando la rete vascolare della struttura d'origine come viene mostrato nella **figura 1**.

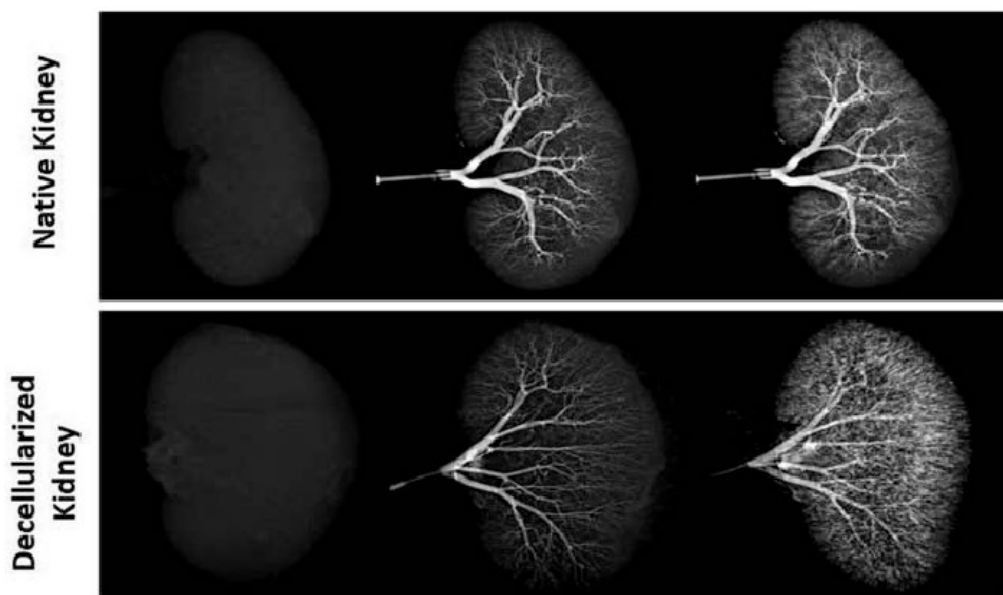


Figura 1: analisi del sistema vascolare di un rene in seguito al processo di decellularizzazione. Come illustrato, è stata mantenuta una rete vascolare intatta simile ai reni nativi.^[1]

LA DECELLULARIZZAZIONE

La decellularizzazione rappresenta una nuova frontiera nel campo dell'ingegneria biomedica [8] e consiste in un processo di eliminazione di tutte le cellule e componenti cellulari da un tessuto/organo di interesse, mantenendo però inalterata la struttura e le proprietà meccaniche della matrice extracellulare (ECM) d'origine. L'ECM decellularizzata (dECM) potrà quindi essere sottoposta ad un procedimento di ricellularizzazione attraverso il ripopolamento con cellule del paziente d'interesse per formare un tessuto/organo personalizzato.

Attualmente sono state sviluppate diverse tecniche di decellularizzazione che vengono classificate in quattro tipologie principali: metodi chimici, fisici, biologici ed enzimatici. Il principio di base di questi metodi è rimuovere il materiale cellulare e mantenere inalterata l'ultrastruttura della ECM; essi si basano sulla immersione o sulla perfusione di soluzioni contenenti agenti chimici o biologici o su stress fisici al fine di portare alla rottura della membrana cellulare, inducendo la morte cellulare e la successiva eliminazione [9]. La scelta dell'agente decellularizzante, della durata del trattamento e del livello di complessità della procedura utilizzata dipende dalle caratteristiche del tessuto/organo bersaglio, tra cui la densità cellulare, lo spessore della matrice e la morfologia dei tessuti. Uno schema dei principali metodi di decellularizzazione è rappresentato nella **figura 2**.

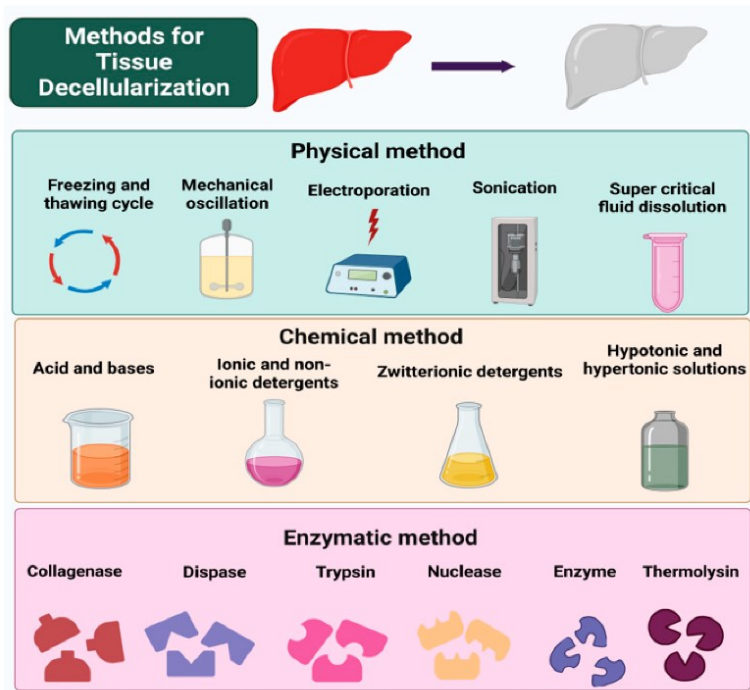


Figura 2: schema dei principali metodi di decellularizzazione [2]

AGENTI CHIMICI

Tra le strategie di decellularizzazione, gli agenti chimici sono preferiti per la loro capacità di rimuovere rapidamente ed efficacemente le cellule native dai tessuti. Tuttavia, i trattamenti chimici rischiano di non rimuovere completamente i componenti cellulari lasciando tracce di dsDNA, DNA mitocondriale, mitocondri e fosfolipidi di membrana la cui presenza può interferire con la ricellularizzazione e/o innescare una risposta immunitaria. Inoltre, le sostanze chimiche utilizzate per la decellularizzazione sono citotossiche e devono quindi essere accuratamente rimosse con diverse fasi di lavaggio per rimuovere i residui chimici dalle strutture decellularizzate. Possono essere combinati tra loro o con altre strategie di decellularizzazione per accelerarne il processo^[10]. Gli agenti chimici vengono suddivisi in detergenti (ionici, non ionici, zwitterionici), acidi, basi, alcoli, chelanti, tossine e soluzioni ipertoniche o ipotoniche.

Detergenti

I detergenti sono gli agenti chimici più comunemente utilizzati grazie alla loro economicità, rapidità ed efficacia. I detergenti più utilizzati per la decellularizzazione sono Triton X-100, un detergente non ionico, e il sodio dodecil-solfato (SDS), un detergente ionico. Triton X-100 rimuove il contenuto cellulare attraverso l'interruzione delle interazioni lipide-lipide e proteina-lipide senza influenzare le interazioni proteina-proteina, mentre l'SDS agisce interrompendo le interazioni proteina-proteina e solubilizzando le membrane cellulari. I detergenti ionici come SDS presentano il vantaggio di poter rimuovere il materiale cellulare in breve tempo rispetto ad altri trattamenti chimici. Tuttavia, il trattamento dei tessuti con SDS può alterare l'ultrastruttura della ECM e ridurne l'integrità influenzando così le proprietà biomeccaniche^[10]. Inoltre a causa della loro elevata polarità i detergenti ionici sono difficili da rimuovere dall'ECM e per questo motivo il trattamento con SDS è solitamente seguito da lavaggi con detergenti non ionici, come Triton X-100, per eliminare i residui ionici.

Oltre a queste due tipologie di detergenti esistono anche i detergenti zwitterionici, i quali presentano contemporaneamente le proprietà dei detergenti ionici e dei detergenti non ionici. Come fattore positivo mostrano una miglior preservazione dell'ECM ma hanno come limite l'eliminazione non completa del materiale cellulare pertanto prevedono un successivo trattamento con agenti enzimatici per completare la decellularizzazione. Questi detergenti svolgono la loro azione rompendo i legami proteina-proteina, come i detergenti ionici, ma con una minore aggressività. Il 3-[(3-colamidopropil)]-1-propansolfato (CHAPS) è un agente zwitterionico che decellularizza i tessuti

interrompendo i legami lipide-proteina e lipide-lipide con attività simile ai detergenti non ionici; è caratterizzato da un ridotto livello di permeazione nei tessuti che ne limita la capacità di rimuovere componenti nucleari come il DNA, per questo motivo viene maggiormente utilizzato per la decellularizzazione dei tessuti sottili. Altri agenti zwitterionici sono la solfobetaina 10 (SB-10) e la solfobetaina 16 (SB-16) i quali agiscono inducendo l'apoptosi cellulare e favorendo la rimozione dei componenti cellulari, eliminando quindi la necessità di numerose fasi successive di lavaggio.

Chelanti e tossine

Come agenti chelanti nella decellularizzazione vengono principalmente utilizzati l'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) e l'acido etilenglicole tetracetico (EGTA)^[11]. Svolgono la loro azione andando a formare un legame con cationi metallici bivalenti nel sito di adesione cellulare della ECM al fine di dissociare le cellule dalla restante ECM.

Vista la capacità di agenti citotossici nel danneggiare le cellule anche questa tipologia di sostanze chimiche potrebbe essere utilizzata nella decellularizzazione. Infatti come ci viene dimostrato da Reyna et al.^[12] una tossina chiamata latrunculina B ha mostrato una elevata efficienza nel rimuovere le cellule muscolari scheletriche distruggendo actina e miosina, danneggiando così la cellula e riducendo il contenuto di DNA a meno del 10%. È stato dimostrato che la latrunculina B presenta una maggiore efficienza rispetto ai detergenti ionici e non ionici nella decellularizzazione del muscolo scheletrico.

Acidi e basi

Sostanze acide come l'acido acetico, l'acido cloridrico e l'acido solforico possono distruggere le membrane cellulari ed essere utilizzati nei processi di decellularizzazione. Nello specifico gli acidi provocano la dissociazione del DNA nucleare dall'ECM distruggendo gli acidi nucleici e solubilizzando i componenti citoplasmatici; inoltre favoriscono la denaturazione delle biomolecole. Altri acidi che si sono dimostrati efficaci sono l'acido formico e l'acido paracetico (PAA) il quale viene principalmente utilizzato come agente sterilizzante.

Invece, sostanze basiche come solfuro di sodio, idrossido di ammonio, idrossido di calcio e idrossido di sodio vengono comunemente utilizzate nei processi di decellularizzazione di strutture anatomiche di dimensioni maggiori come gli organi. È stato dimostrato che l'utilizzo di sostanze alcaline per aumentare il PH durante la decellularizzazione può aumentare l'efficacia della rimozione di

componenti cellulari e di proteine^[13]. Tuttavia le sostanze basiche possono eliminare completamente i fattori di crescita dalla matrice extracellulare e diminuire le proprietà meccaniche dell'ECM in modo più marcato rispetto ad altri agenti chimici ed enzimatici. Questa perdita delle proprietà meccaniche è principalmente dovuta alla scissione delle fibrille di collagene e alla rottura dei legami crociati del collagene.

Alcoli (o solventi)

Gli alcoli come il glicerolo favoriscono la decellularizzazione dei tessuti disidratando e lisando le cellule sostituendo l'acqua intracellulare. Alcoli come metanolo, etanolo e isopropanolo sono invece più efficaci nel rimuovere i lipidi dai tessuti solubilizzandoli in un tempo relativamente breve. A causa del loro ruolo nella fissazione tessutale e nella precipitazione delle proteine però, metanolo e etanolo vanno utilizzati con cautela poiché potrebbero provocare dei danni all'ultrastruttura della ECM.

Un altro solvente che può essere utile per la rimozione dei lipidi è l'acetone che viene solitamente utilizzato in combinazione con l'etanolo. Tuttavia come gli alcoli presenta delle limitazioni sul proprio uso, in particolare per i quei tessuti che devono potersi contrarre o che devono sopportare carichi. Il tributilsolfato (TBP) è un solvente organico che non condivide l'effetto disidratante degli alcoli e dell'acetone, ma si è dimostrato efficace nel rimuovere il DNA della ECM quando utilizzato in associazione con altri agenti chimici o enzimatici. Il TBP inoltre presenta il vantaggio di favorire la reticolazione del collagene invece di degradarlo, a differenza di alcoli e acetone.

Soluzioni ipertoniche e ipotoniche

Differentemente dagli altri agenti chimici le soluzioni ipertoniche e ipotoniche sono caratterizzate da conseguenze negative minime sulla composizione e struttura della ECM. Per ottenere il loro massimo effetto vengono comunemente utilizzate in combinazione immergendo il tessuto da decellularizzare alternativamente in soluzioni iper e ipotoniche per diversi cicli. Le soluzioni ipertoniche causano la dissociazione del DNA dalle proteine, mentre quelle ipotoniche portano alla lisi cellulare mediante uno shock osmotico. Inoltre, entrambe le soluzioni favoriscono il risciacquo dei residui cellulari dal tessuto successivamente alla lisi.

Infine il dimetiletere (DME) e l'urea sono due agenti impiegati nella decellularizzazione non ancora ampiamente studiati. Degli studi svolti da Kanda et al.^[14] hanno dimostrato che l'uso di DME seguito

dalla frammentazione del DNA tramite DNAsi, può sostituire efficacemente l'uso dell' SDS nella decellularizzazione dell'aorta suina e dell'arteria carotide dello struzzo. Si è dimostrato inoltre efficace nel ridurre i danni strutturali alla ECM e nel ridurre la risposta immunogenica. L'urea invece appartiene alla classe degli agenti caotropici, ossia una classe eterogenea di composti organici che possiedono la capacità di rompere i legami idrofobici e idrogeno di acidi nucleici e proteine con conseguente denaturazione dei substrati. L'urea provoca quindi la denaturazione delle proteine e l'interruzione delle interazioni tra proteine e lipidi, capacità che hanno spinto a valutare il suo potenziale utilizzo come agente decellularizzante^[15]. Tuttavia si è dimostrata non essere un agente decellularizzante ideale come indicano i test svolti sulla ECM dell'osso e del pericardio bovino^[16], in quanto provocava un'alterazione grave della struttura e della composizione della ECM. Nonostante ciò l'urea rimane un potente agente solubilizzante con un'elevata affinità per la rimozione dell'antigene^[17].

AGENTI BIOLOGICI

L'obiettivo dell'utilizzo di trattamenti biologici nella decellularizzazione è quello di indurre l'apoptosi cellulare^[18]. Questi agenti sono tuttora oggetto di studio e hanno dimostrato un'ottima capacità di facilitare la rimozione dei residui cellulari dai tessuti. Ad oggi gli agenti biologici impiegati nei processi di decellularizzazione sono: farmaci citotossici, perossido di idrogeno e l'ipossia.

Farmaci citotossici

Attualmente i farmaci citotossici vengono principalmente sfruttati per migliorare l'efficienza dei processi di decellularizzazione con detergenti zwitterionici. Un primo esempio è l'uso della camptotecina la cui funzione è quella di inibire la DNA topoisomerasi I e portare la cellula all'apoptosi facilitando la rimozione dei residui cellulari mediante l'uso di tamponi di lavaggio ipertonici, senza la necessità di utilizzare sostanze chimiche aggressive. Il trattamento con camptotecina ha dimostrato di preservare efficacemente i componenti della matrice extracellulare, come collagene e glicosaminoglicani (GAG), rimuovendo circa il 95% del DNA^[19].

Un secondo esempio di farmaco citotossico è il rotenone, un potente inibitore mitocondriale di classe I che porta all'apoptosi cellulare inducendo stress ossidativo^[20]. Il trattamento con rotenone però, non ha ancora dimostrato una significativa efficienza nella rimozione di DNA, per questo motivo è

tuttora oggetto di studio. Un altro esempio di farmaco citotossico è la latrunculina B, che come abbiamo precedentemente discusso, induce un cambiamento conformazionale di actina e miosina portando ad una efficiente rimozione del DNA nel muscolo scheletrico.

Perossido di idrogeno e ipossia

Oltre ai farmaci citotossici anche il perossido di idrogeno (H_2O_2) e l'ipossia sono due possibili agenti inducenti apoptosi utilizzati nella decellularizzazione. Il perossido di idrogeno si è dimostrato promettente anche come agente sterilizzante, motivo per il quale potrebbe risultare utile nei processi di ricellularizzazione o impianto vista la diminuzione di immunogenicità che comporta. L'ipossia invece viene prevalentemente utilizzata per favorire la rimozione dei componenti cellulari dal tessuto e l'azoto (N_2) rappresenta l'agente ipossico di maggiore utilità. Sia l' H_2O_2 che l' N_2 però, si sono dimostrati inefficienti se impiegati come componenti principali di un processo di decellularizzazione, come si deduce da alcuni test riguardanti valvole cardiache^[21] e stroma corneale^[22].

AGENTI ENZIMATICI

Gli agenti enzimatici impiegati nella decellularizzazione sono caratterizzati da una elevata specificità nel rimuovere residui cellulari o componenti della ECM indesiderati e includono nucleasi, proteasi ed esterasi. Possono essere utilizzati da soli o in associazione per consentire agli altri agenti decellularizzanti di diffondersi più facilmente attraverso i tessuti; per questo motivo trovano largo impiego nei tessuti più densi difficili da decellularizzare. Nonostante i benefici associati al loro impiego la rimozione totale delle cellule tramite il solo trattamento enzimatico rimane difficile, inoltre presentano una serie di effetti collaterali come un significativo danno alla composizione/struttura della ECM, compromissione del processo di ricellularizzazione e la frequente risposta immunitaria avversa.

Nucleasi

Le nucleasi come DNasi, RNasi e benzonasi vengono usate generalmente in seguito a trattamenti chimici, fisici o biologici e agiscono frammentando il materiale nucleare per favorirne la rimozione dalla matrice extracellulare in seguito alla lisi cellulare. Le endonucleasi, come la benzonasi, risultano essere più efficaci delle esonucleasi (DNasi, RNasi) poiché scindono i nucleotidi a metà della loro sequenza frammentandoli in maniera più efficace migliorando anche la conservazione di molecole bioattive e proprietà biomeccaniche della matrice. Un vantaggio delle esonucleasi è rappresentato

dalla loro capacità di non influenzare il contenuto proteomico della ECM. Tuttavia la ECM trattata con DNasi o RNasi necessita numerosi cicli di lavaggio successivi, in quanto si tratta di composti immunogenici ed eventuali residui potrebbero ostacolare i processi di ricellularizzazione.

Proteasi

Esistono diverse proteasi che trovano applicazione nei processi di decellularizzazione, le più comunemente utilizzate sono: tripsina, dispasi, collagenasi, fosfolipasi A2 e galattosidasi. La tripsina è un agente enzimatico aggressivo che scinde specificatamente lisina e arginina all'estremità C-terminale per distruggere la microstruttura del tessuto. Poiché le componenti della ECM come elastina e collagene sono molto sensibili alla sua azione, la tripsina viene utilizzata raramente come principale agente decellularizzante, sebbene abbia mostrato una buona preservazione dei GAG. Il suo uso è quindi limitato alle fasi iniziali del trattamento, prima della decellularizzazione con agenti chimici [23], per compromettere l'ultrastruttura dei tessuti e facilitare la penetrazione di agenti decellularizzanti utilizzati in una fase successiva; in particolare per il trattamento di tessuti densi come il derma. La dispasi è una proteasi neutra meno aggressiva della tripsina che dissocia le cellule dai tessuti tagliando specificatamente la fibronectina e il collagene IV. È ideale per la decellularizzazione della membrana basale dei tessuti ma è anche utile per prevenire l'aggregazione cellulare. Viene solitamente utilizzata per il trattamento di tessuti sottili come il polmone o la cornea, ma può anche essere associata con altri agenti chimici o enzimatici per trattare tessuti più densi [24]. La collagenasi invece, è una proteasi con la funzione di scindere il collagene II nella cartilagine e i collagene I e III nel resto dei tessuti. Il trattamento con collagenasi dunque, può essere sfruttato per degradare selettivamente il collagene della ECM come viene dimostrato da Kuljanin et al. [25] attraverso test su tessuto osseo e adiposo in cui il contenuto di collagene viene diminuito dal 90% a meno del 10%. La fosfolipasi A2 è un'altra esterasi che agisce idrolizzando i fosfolipidi nelle cellule senza alterarne il contenuto di collagene, provocando quindi un danno strutturale minimo alla ECM con però una notevole riduzione del contenuto di GAG. Anche questa proteasi risulta inefficace per la rimozione del contenuto cellulare se utilizzata come principale agente decellularizzante, perciò viene comunemente utilizzata in combinazione con altri agenti chimici come i detergenti, mentre può risultare utile nella rimozione del contenuto lipidico [26]. Infine i tessuti decellularizzati possono essere ottenuti con trattamento con γ -galattosidasi per ridurre il contenuto dell'antigene immunogenico galattosio- γ -(1,3)-galattosio (epitopo Gal) dalla superficie cellulare, un epitopo normalmente contenuto nei tessuti derivati da ECM xenogenica, il quale rappresenta la principale causa di rigetto dei trapianti di organi xenogenici.

Come viene dimostrato da uno studio effettuato sulla ECM di origine suina, sebbene l'espressione dell'epitopo Gal induca un aumento degli anticorpi anti-Gal nel siero nei riceventi, non sono state notate altre differenze nella risposta dell'ospite. Tutti gli scaffold ECM sono stati ben tollerati e hanno mostrato un rimodellamento costruttivo durante il periodo di osservazione. Questo studio mostra quindi che la presenza dell'epitopo Gal all'interno di un materiale per impalcature ECM determina una risposta anticorpale sierica, ma nessun effetto negativo sul rimodellamento dei tessuti^[27].

Esterasi

La principale esterasi che viene utilizzata nella decellularizzazione è la condroitinasi ABC la cui funzione è quella di rimuovere selettivamente le catene laterali del condroitin solfato e del dermatan solfato dai GAG, provocandone una massima riduzione e aumentando la rigidità della ECM. Queste sue proprietà la rendono l'agente ideale per la decellularizzazione dei tessuti densi come la cartilagine poiché la riduzione del contenuto di GAG può migliorare i successivi passaggi di ricellularizzazione^[28]. Oltre alla cartilagine, la condroitinasi ABC è stata sfruttata anche per la decellularizzazione del sistema nervoso periferico, come ad esempio il nervo sciatico. È infatti in grado di rimuovere i proteoglicani del condroitin solfato (CSPG) che inibiscono la riparazione neuronale in seguito ad una lesione consentendo così la crescita assonale^[29].

AGENTI FISICI

I metodi fisici per la rimozione del contenuto cellulare dai tessuti si basano sulla distruzione delle membrane cellulari creando un ambiente ostile che possa portare all'apoptosi. Il vantaggio della decellularizzazione fisica è rappresentato da un effetto uniforme su tutto il tessuto e da una migliore prevedibilità rispetto agli altri agenti decellularizzanti. Tuttavia il solo trattamento fisico risulta spesso insufficiente per ottenere una decellularizzazione completa; infatti sebbene gli agenti fisici provochino la lisi delle cellule, risultano poco efficaci nella rimozione dei residui cellulari. Pertanto possono essere utilizzati in combinazione con agenti chimici, biologici o enzimatici, anche per ridurre i tempi di esposizione e preservare il contenuto proteomico della ECM. I metodi e gli agenti fisici più comunemente utilizzati nella decellularizzazione sono: l'alta pressione idrostatica (HHP), agitazione e immersione, cicli di congelamento e scongelamento, fluidi supercritici, sonicazione, elettroporazione irreversibile non termica (NTIRE) e il vuoto.

Alta pressione idrostatica (HHP)

La pressione idrostatica è un metodo fisico che richiede relativamente poco tempo e può essere più efficace di agenti chimici ed enzimatici nella rimozione delle cellule. L'aumento della pressione idrostatica porta alla necrosi cellulare tramite pressioni superiori a 150 MPa, tuttavia pressioni superiori a 500 MPa possono potenzialmente provocare la denaturazione delle proteine della ECM e portare alla formazione di cristalli di ghiaccio che possono ulteriormente danneggiare l'ultrastruttura della ECM. Per prevenire la formazione di questi cristalli di ghiaccio è possibile aumentare la temperatura durante il processo di decellularizzazione, sebbene anche in questo caso potrebbero verificarsi delle interruzioni nella struttura della ECM dovuti ad un aumento di entropia ^[30]. Nonostante questo metodo non consenta di conservare in maniera efficace le proprietà biomeccaniche del tessuto originale, è stato dimostrato che produce delle matrici decellularizzate in grado di diminuire le risposte immunologiche dell'ospite, che aumentano le probabilità di successo dei processi di ricellularizzazione ^[31].

Agitazione e immersione

Agitazione e immersione vengono principalmente utilizzate in associazione con agenti chimici per migliorare l'esposizione della ECM ai detergenti e migliorare l'efficacia dei processi di decellularizzazione. L'agitazione trova maggiore applicazione nella decellularizzazione dei tessuti di organi con parete sottile come vescica e intestino tenue, e la durata del trattamento e l'intensità dell'agitazione dipendono dallo spessore del tessuto trattato. Il principale svantaggio di questa tecnica è che l'agitazione può causare la lisi delle cellule prima che la matrice extracellulare sia esposta ai detergenti, deteriorandone la struttura.

Cicli di congelamento e scongelamento

I cicli di congelamento-scongelamento provocano la morte cellulare per necrosi indotta da shock termico in seguito all'immersione del tessuto in azoto liquido alla temperatura di -80°C. Questo tipo di metodo non è sufficiente da solo per ottenere livelli di decellularizzazione adeguati, pertanto viene utilizzato come fase precursore la decellularizzazione seguito da successivi lavaggi con detergenti come Triton-X 100, solventi come l'isopropanolo o enzimi come la tripsina ^[32,33,34]. Sebbene risulti essere un metodo efficace nel determinare la lisi cellulare tramite la distruzione delle membrane cellulari e attraverso la formazione di cristalli intracellulari, il processo di congelamento-scongelamento si è dimostrato inefficace nel rimuovere il materiale cellulare residuo, motivo per cui

sono necessari i successivi cicli di lavaggio. È stato dimostrato che un singolo ciclo di congelamento-scongelo può ridurre le risposte immunitarie avverse come l'infiltrazione di leucociti nello scaffold della dECM vascolare^[35]. In generale i cicli multipli di congelamento-scongelo non inducono una significativa perdita delle proteine della ECM, ma possono causare delle interruzioni nell'ultrastruttura della stessa.

Fluidi supercritici

I fluidi supercritici sono sostanze che si trovano al di sopra della loro temperatura e pressione critica, condizioni in cui presentano sia proprietà di un liquido sia proprietà di un gas. Essendo caratterizzati da un'elevata permeabilità possono essere facilmente rimossi dai tessuti senza la necessità di successivi lavaggi, possono inoltre rimuovere il materiale cellulare residuo e minimizzare le alterazioni negative della ECM. Recentemente l'anidride carbonica supercritica ha attirato l'attenzione sul suo possibile utilizzo nella decellularizzazione, vista la sua capacità di operare in tempi molto più brevi rispetto alla maggior parte degli altri agenti.

Oltre alla velocità d'azione altre proprietà che caratterizzano la CO₂ supercritica sono la mancanza di tossicità, la non infiammabilità, è relativamente inerte ed economica. L'esatto meccanismo attraverso cui la CO₂ supercritica riesca a rimuovere le cellule da un tessuto è stato un argomento ampiamente discusso; precedentemente si pensava che la rottura cellulare fosse dovuta dall'alta pressione mentre recenti studi hanno portato ad affermare che agisca inducendo ipossia, sebbene ciò sia ancora oggetto di studio^[36]. Studi precedenti hanno anche dimostrato che la CO₂ supercritica era inadeguata per lo sviluppo di scaffold vitali poiché le dECM finali erano spesso troppo disidratate per consentire il processo di ricellularizzazione. Per ovviare a questa problematica e prevenire la disidratazione dei tessuti si è optato per la pre-saturazione della CO₂ supercritica con acqua^[37]. La CO₂ supercritica rimane uno dei principali metodi di decellularizzazione che può essere anche utilizzata per la sterilizzazione della dECM.

Sonicazione

La sonicazione è una tecnica che consiste nel sottoporre un tessuto all'azione degli ultrasuoni al fine di provocare la rottura delle membrane cellulari e consentire agli agenti decellularizzanti di permeare meglio il tessuto stesso. Si basa sul fenomeno della cavitazione, ossia sulla formazione di zone ad alta pressione e zone a bassa pressione in cui si creano delle bolle di vapore instabili dalla durata di alcune frazioni di secondo. Quando queste bolle raggiungono un livello di energia sufficiente per

collassare implodono determinando un forte aumento di pressione e temperatura, responsabili della rottura delle membrane cellulari. L'intensità della cavitazione è influenzata da diversi fattori come: pH, temperatura, pressione di vapore, viscosità, velocità di diffusione dell'ossigeno disciolto e solubilità del gas nel liquido. Questi fattori sono fortemente influenzati dalla concentrazione dell'agente decellularizzante. Solitamente nei processi di sonicazione vengono utilizzate basse concentrazioni di SDS, poiché in grado di solubilizzare in modo aggressivo il contenuto cellulare, ma siccome la sonicazione è già essa stessa un processo fisico aggressivo, è molto facile che ci sia un impatto negativo sulla microarchitettura e sulla biomeccanica della ECM. Per superare questa problematica sono stati sviluppati i bagni a ultrasuoni che, rispetto agli ultrasuoni semplici, causano meno danni all'ultrastruttura della ECM e consentono anche una penetrazione più agevole degli agenti chimici nei tessuti, a scapito però di protocolli più lunghi^[38].

Elettroporazione irreversibile non termica (NTIRE)

L'elettroporazione irreversibile non termica si basa sull'utilizzo di impulsi elettrici di microsecondi applicati al tessuto e alle cellule residenti che inducono la formazione di micropori nella membrana cellulare dovuti alla destabilizzazione del potenziale elettrico attraverso la membrana^[39]. La presenza di questi micropori provocherà la perdita dell'omeostasi cellulare e la successiva morte delle stesse. Come è stato dimostrato da test svolti sulle arterie carotidi di ratto *in vivo*^[40], la NTIRE è in grado di rimuovere i residui cellulari dal tessuto nell'arco di alcuni giorni mantenendo sia l'integrità sia la morfologia della ECM originale permettendo così la successiva ricellularizzazione da parte delle cellule ospiti. Tuttavia l'uso di questa tecnica è limitato a tessuti di piccole dimensioni e alle scarse possibilità di indurre una corrente elettrica *in vivo*.

Il vuoto

I metodi di decellularizzazione che utilizzano il vuoto sono quelle tecniche assistite o accelerate dall'uso di una pressione negativa. Il vantaggio di queste tecniche è rappresentato da una riduzione significativa dei tempi di decellularizzazione senza che venga alterata la composizione della ECM, consentendo quindi processi più efficienti e una ridotta esposizione ad agenti potenzialmente dannosi^[41]. Nonostante l'uso di sistemi a pressione negativa sia insufficiente da solo per ottenere una corretta decellularizzazione, si è rivelato efficace se utilizzato in combinazione con altri agenti chimici, fisici o enzimatici.

CONSIDERAZIONI

Nonostante si stiano facendo importanti progressi nello studio della decellularizzazione di organi/tessuti utilizzabili in medicina rigenerativa, il processo è ancora in fase di ottimizzazione/standardizzazione. Un metodo di decellularizzazione ideale dovrebbe produrre, con la massima resa, una dECM priva di cellule e materiale genetico che conserva le proprietà strutturali, biochimiche e biomeccaniche cruciali per la sua funzione intrinseca. Per ottenere ciò è necessario trovare un equilibrio tra il tempo di esposizione all'agente/metodo decellularizzante e il grado di decellularizzazione. Diversi metodi precedentemente descritti potrebbero essere migliorati attraverso misurazioni e valutazioni più precise sull'andamento del processo di decellularizzazione. Questi sistemi di monitoraggio permetterebbero di ottenere dati importanti su parametri come pH, temperatura e pressione capaci di influenzare significativamente la qualità del prodotto finale. Un'altra area di ricerca e sviluppo in questo ambito è l'automazione dell'intero processo di decellularizzazione. La decellularizzazione infatti, richiede generalmente molto tempo e necessita di supervisione e operazioni manuali. L'automazione e semplificazione potrebbe ridurre notevolmente i tempi di produzione sviluppando un sistema di decellularizzazione ad alto rendimento capace di produrre maggiori volumi di dECM. Sarebbero inoltre utili ulteriori ricerche sui processi su una fase più avanzata del processo per migliorare la scalabilità e l'efficienza della decellularizzazione. In particolare il grande volume di reagenti utilizzati per ogni lavaggio rende necessario l'uso di contenitori di grandi dimensioni, i quali limitano la scalabilità a causa dei maggiori requisiti di spazio e volume dei reagenti man mano che aumenta la produzione desiderata. Sebbene possa risultare difficile ridurre il volume dei reagenti richiesti, il loro riciclaggio e riutilizzo potrebbe rendere il processo di decellularizzazione più efficiente. Ciò ridurrebbe non solo i costi di produzione ma anche la quantità di rifiuti generati e i danni ambientali. È di rilevante importanza anche limitare gli effetti negativi causati dagli agenti decellularizzanti. Una soluzione efficace potrebbe essere quella di sviluppare metodi che consistono in **strategie combinate** con agenti chimici, enzimatici e tecniche meccaniche capaci di migliorare l'efficienza della decellularizzazione e limitare gli effetti negativi causati dai metodi singoli andando per esempio ad eliminare i componenti del tessuto che potrebbero causare una risposta immunogenica, mantenendo quelli che supporteranno e regoleranno la ricostruzione di nuovo tessuto.

Alcuni esempi di strategie combinate sono rappresentati nella **figura 3**.

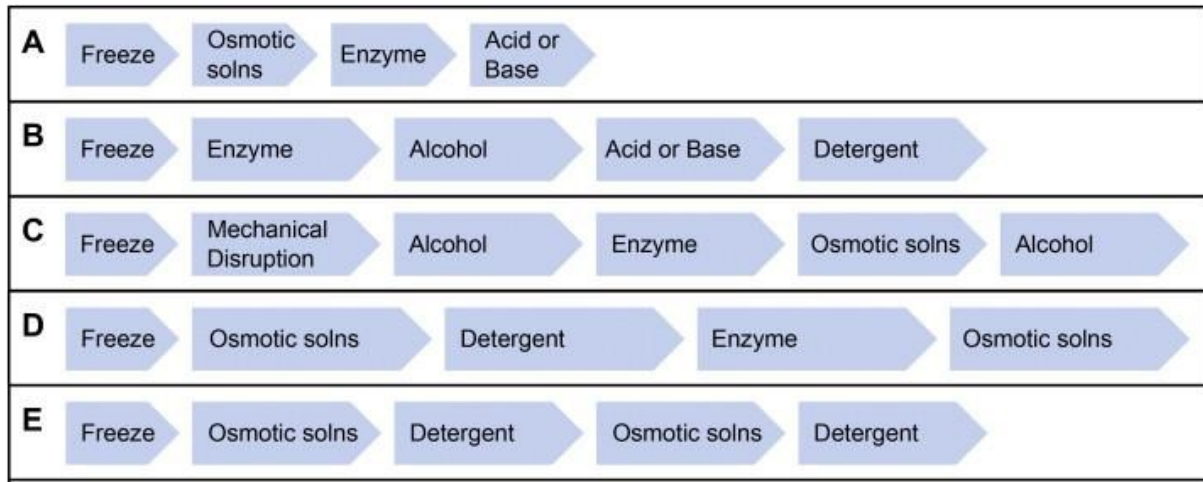


Figura 3: possibili strategie di decellularizzazione per diversi tessuti. (A) tessuti sottili (pericardio), (B) tessuti spessi (derma), (C) tessuti grassi e amorfi (tessuto adiposo), (D) tessuti compositi/organi semplici (trachea), (E) organi vitali (fegato)^[3].

Nei prossimi capitoli verranno trattate le procedure e i trattamenti a cui i tessuti/organi saranno sottoposti in seguito al processo di decellularizzazione:

- tecniche di conservazione e sterilizzazione, fondamentali per ridurre il contenuto virale e batterico residuo allo scopo di minimizzare la comparsa di reazioni immunologiche;
- l'attribuzione della forma più adatta agli innesti di ECM decellularizzata in funzione della futura applicazione desiderata, tra cui polveri, idrogel e tessuti;
- test di valutazione della dECM importanti per valutare il livello di qualità del prodotto decellularizzato attraverso test macro/microscopici, test molecolari e prove meccaniche.

CONSERVAZIONE E STERILIZZAZIONE

CONSERVAZIONE

La conservazione del campione biologico decellularizzato prima del suo utilizzo rappresenta un passaggio importante per la preparazione dei tessuti decellularizzati all'uso medico in quanto i costrutti decellularizzati appena formati non vengono utilizzati nell'immediato, richiedendo di conseguenza una conservazione a lungo termine senza la quale, a causa della mancanza di nutrienti, i campioni decellularizzati andrebbero incontro a degradazione. L'obiettivo della conservazione è quello di avere a disposizione prodotti a scaffale pronti per l'uso clinico.

Le principali tecniche di conservazione includono la liofilizzazione, la crioconservazione e l'utilizzo di antibiotici e antimicotici. La **liofilizzazione** permette di preservare le caratteristiche del materiale decellularizzato senza provocare danni sostanziali. Tale tecnica presenta però uno svantaggio, ossia la possibile formazione di cristalli di ghiaccio che potrebbero causare danni fisici al tessuto; per ovviare a questo problema il procedimento viene solitamente eseguito a basse pressioni per accelerare il processo di congelamento. L'uso di basse pressioni favorisce la sublimazione della maggior parte delle molecole d'acqua contenute nel tessuto, seguita da un innalzamento della temperatura con lo scopo di rompere i legami ionici che legano l'acqua al tessuto, andando ad asciugare ulteriormente il costrutto.

La crioconservazione invece, prevede l'utilizzo di dimetilsolfossido (DMSO) al 10% e una velocità di congelamento lenta oppure istantanea in azoto liquido. Anche questo metodo ha portato alla conservazione di innesti di tessuto aventi somiglianza istologica con i tessuti d'origine^[42]. Esistono altri metodi di conservazione che consentono il mantenimento dei costrutti decellularizzati in PBS (tampone fosfato salino) contenente antibiotici e antimicotici conservati a -20°C e -80°C per la conservazione a lungo termine oppure a 4°C per la conservazione a breve termine^[9]. Un campione di esofago sottoposto a crioconservazione è riportato nella **figura 4**.

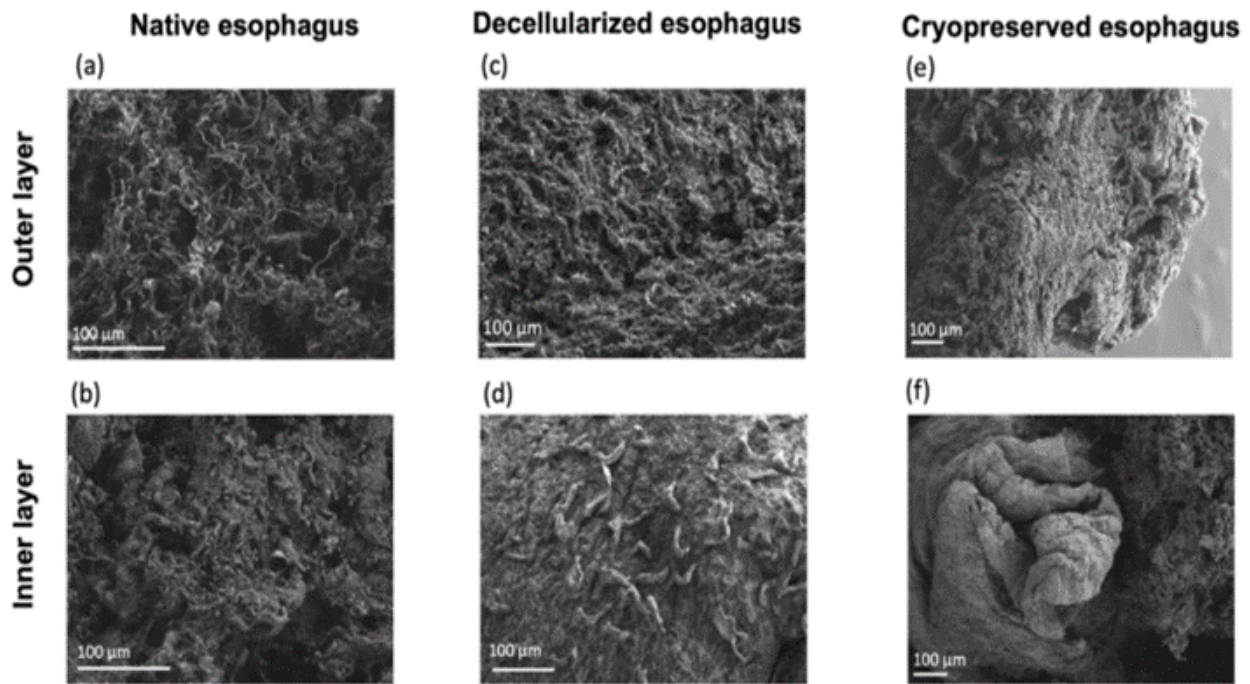


Figura 4: Microscopia elettronica a scansione dell'esofago nativo (a, b), decellularizzato (c, d) e crioconservato (e, f)^[4].

STERILIZZAZIONE

La sterilizzazione è il processo di uccisione e eliminazione di tutti i microrganismi viventi, comprese le spore batteriche. Prima dell'impianto, è fondamentale che i costrutti decellularizzati vengano sterilizzati e liberati del contenuto batterico e virale residuo e del materiale genetico esistente al fine di minimizzare il rischio di immunogenicità. Le tecniche di sterilizzazione più comunemente utilizzate sono l'irradiazione gamma o a fascio di elettroni e l'ossido di etilene; tuttavia se i biomateriali devono essere usati solo nella ricerca sperimentale piuttosto che in quella clinica, esistono diversi altri metodi di sterilizzazione come la CO₂ supercritica, l'alcol, le radiazioni ultraviolette, i perossidi e gli antibiotici.

La scelta del metodo di sterilizzazione più appropriato da utilizzare viene presa considerando le caratteristiche dello scaffold decellularizzato: le proprietà chimico-fisiche, le dimensioni, la complessità della sua struttura, il tempo necessario per sterilizzarlo e l'obiettivo dell'applicazione. Inoltre, come viene riportato in **figura 5**, per verificare se un metodo di sterilizzazione sia appropriato per un certo scaffold bisogna determinare se la dECM risulta essere sterile attraverso il test di sterilità e determinare se all'interno dei biomateriali siano presenti sostanze tossiche e nocive attraverso il test

di citotossicità; infine bisogna verificare se i cambiamenti delle proprietà chimiche e fisiche dei biomateriali in seguito al processo di sterilizzazione influiscono sulla funzione desiderata della dECM. Se le condizioni di cui sopra sono soddisfatte, la dECM potrà essere utilizzata per ulteriori esperimenti e applicazioni.

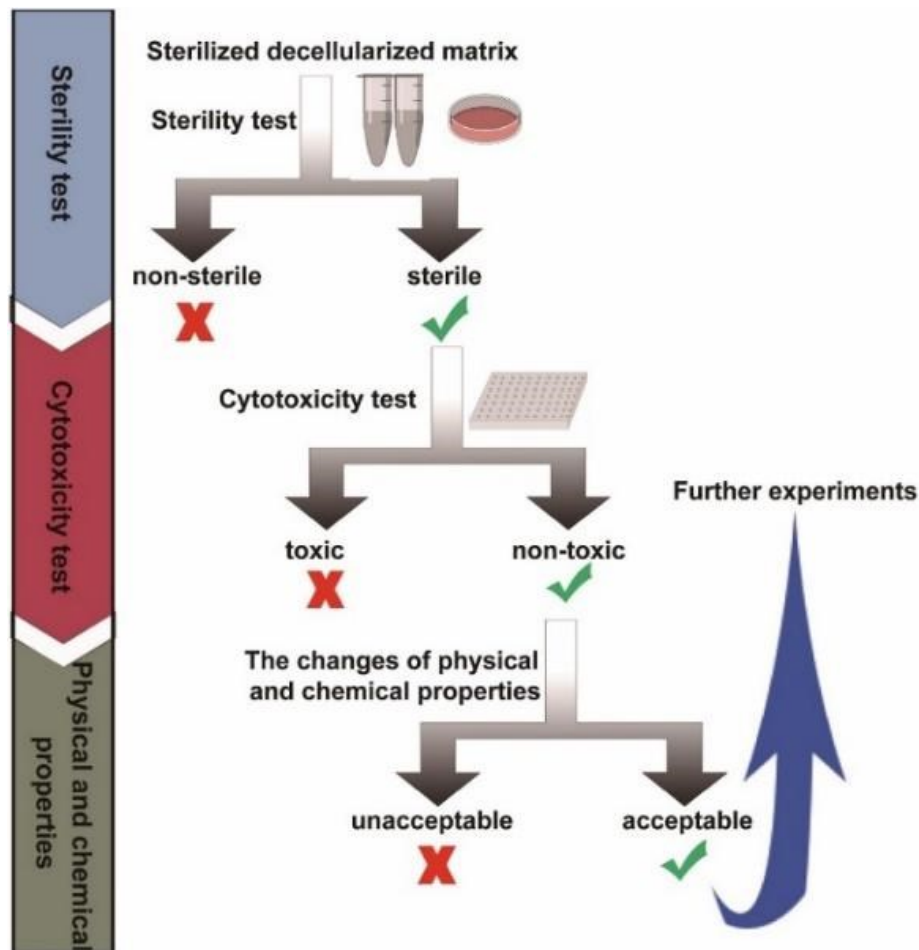


Figura 5: Il percorso tecnico per convalidare il metodo di sterilizzazione per dECM [5].

Metodi fisici

L'irradiazione è un metodo di sterilizzazione fisica spesso utilizzata per la sterilizzazione di forniture mediche usa e getta, farmaci e cibo, la cui funzione è quella di distruggere direttamente gli acidi nucleici, le proteine e gli enzimi dei microrganismi. Essa colpisce anche le molecole d'acqua all'interno del microrganismo producendo perossidi e radicali liberi che, a loro volta, portano alla distruzione di acidi nucleici, proteine ed enzimi, facendo perdere ai microrganismi la loro funzione

metabolica. È una tecnica che comprende due diverse tipologie di irradiazione: l'irradiazione gamma (GI) e l'irradiazione elettronica (EI).

La prima è un processo a freddo dove la temperatura del prodotto sterilizzato non aumenta in maniera sostanziale, rendendola un'opzione adatta per la sterilizzazione di materiali biologicamente rilevanti. La fonte utilizzata per questo tipo di irradiazione è l'isotopo radioattivo cobalto-60^[43]. I prodotti trattati con l'isotopo cobalto-60 non diventano radioattivi per via della sua bassa energia, portando solo alla distruzione dei microrganismi esistenti^[44].

L'irradiazione elettronica invece, è un altro processo di sterilizzazione a freddo che utilizza come sorgente un fascio di elettroni (E-beam) prodotto da un acceleratore di elettroni. Confrontando i due metodi si può notare che la penetrabilità dei raggi gamma è superiore a quella del fascio di elettroni. A seconda del diverso dosaggio con il quale una sorgente di radiazione viene utilizzata, il tempo richiesto per la sterilizzazione varia e solitamente viene completata nell'arco di poche ore o giorni. A dosi relativamente basse la reticolazione indotta dalle radiazioni causa un aumento della resistenza alla trazione e della rigidità della dECM, mentre a dosi più elevate la degradazione e la denaturazione dei tessuti determinano una riduzione della resistenza alla trazione e della rigidità^[45]. Oltre al dosaggio, altri fattori che possono influenzare il processo di sterilizzazione per irradiazione sono la forma e la dimensione del materiale da irradiare, i gas attorno al materiale, il contenuto di acqua e le proprietà chimico-fisiche del materiale. I principali vantaggi correlati a questa tecnica di sterilizzazione sono rappresentati dal fatto che l'irradiazione viene effettuata a temperatura ambiente ed è priva di tossicità residua. Tuttavia l'irradiazione può portare ad un cambiamento delle proprietà chimico-fisiche e della biocompatibilità dei biomateriali, come ad esempio la denaturazione delle proteine, e ad un cambiamento della resistenza meccanica.

Anche le radiazioni ultraviolette (raggi UV) vengono normalmente utilizzate come metodo per la disinfezione fisica. I raggi UV vengono trasmessi lungo una linea retta per essere assorbiti o riflessi dalla superficie di un oggetto. Possono determinare direttamente la denaturazione degli acidi nucleici e delle proteine dei microrganismi, oppure possono far sì che l'ossigeno presente nell'aria produca ozono avente effetti battericidi. Le radiazioni UV rappresentano un metodo semplice e rapido per la disinfezione dell'ambiente e degli scaffold decellularizzati aventi uno spessore sottile e un'ampia superficie specifica (a causa della loro debole penetrabilità) come fegato, intestino e vescica. Vista la loro scarsa penetrabilità vengono solitamente utilizzate in combinazione con altri metodi di disinfezione.

Metodi chimici

L'ossido di etilene (EtO) è un gas incolore dall'odore pungente simile all'etere. Viene tipicamente impiegato nella sterilizzazione di dispositivi medici, compresi materiali ad alto contenuto polimerico come cateteri di strumenti medici e strumenti con elevata affilatura. L'EtO agisce come un agente alchilante andando a interagire con i gruppi sulfidrilici, amminici e carbossilici delle proteine e degli acidi nucleici danneggiando il DNA e prevenendo il metabolismo e la divisione cellulare dei microrganismi. Poiché l'ossido di etilene è un composto organico tossico e la dECM presenta una notevole capacità di assorbimento è necessario aumentare il tempo di rimozione dei residui di EtO dopo il processo di sterilizzazione, motivo per il quale questa tecnica richiede sempre un processo di diverse settimane. Pertanto l'EtO non è raccomandato per la sterilizzazione di materiali che presentano una matrice decellularizzata sfusa e porosa. Inoltre non deve essere utilizzato su materiali contenenti acqua e cloro dato che si tratta di un composto facilmente solubile in acqua che in seguito a solubilizzazione porta alla formazione di glicole etilenico tossico, mentre in presenza di cloro produce il cloroetano ^[46], una molecola altrettanto dannosa soprattutto per il sistema nervoso centrale, il sistema cardiovascolare, reni e fegato.

I perossidi sono forti ossidanti contenenti nella struttura chimica il gruppo perossidico -OO-. I perossidi che vengono comunemente utilizzati come tecnica di sterilizzazione chimica sono l'acido paracetico e il perossido di idrogeno. L'acido paracetico (PAA) viene normalmente utilizzato come disinfettante, ma può anche esercitare un effetto sterilizzante in specifiche condizioni. Si tratta di un perossido organico ottenuto dalla reazione tra perossido di idrogeno e acido acetico, dotato di un notevole effetto ossidante avente pH inferiore a 5 (maggiore è l'acidità e maggiore sarà l'effetto sterilizzante). La sterilizzazione tramite acido paracetico consiste nell'immergere il biomateriale in una soluzione contenente PAA per alcune decine di minuti. La forte ossidazione da parte del PAA induce la distruzione del citoderma dei microrganismi e ossidando i gruppi -SH delle proteine ed enzimi porta alla distruzione del sistema enzimatico della cellula batterica ^[47]. La sterilizzazione con PAA presenta il vantaggio di non produrre alcuna sostanza tossica, i prodotti della sua decomposizione sono infatti acqua, acido acetico e ossigeno, mentre come effetto negativo, la forte capacità ossidante e acidità che lo caratterizzano potrebbero determinare un'alterazione delle proprietà chimico-fisiche di alcuni materiali.

Anche il perossido di idrogeno (H_2O_2) è un potente agente ossidante che viene solitamente impiegato nella disinfezione, ma che a determinate condizioni è in grado di uccidere le spore batteriche

ottenendo un effetto sterilizzante; ad esempio l'esposizione a H₂O₂ liquida a 30 °C per 20 minuti può effettivamente inattivare le spore di *Bacillus anthracis* [48]. H₂O₂ agisce generando un gran numero di radicali liberi ad alta energia in seguito all'eccitazione del campo magnetico come il radicale idrossile (•OH) e il radicale perossido di idrossile (•HO₂), i quali andranno a denaturare gli acidi nucleici e le proteine dei microrganismi e ad alterare l'equilibrio del potenziale tra l'interno e l'esterno della citomembrana microbica causandone la distruzione [49]. Come l'acido paracetico, il perossido di idrogeno potrebbe influenzare le caratteristiche chimico-fisiche di alcuni materiali, ad esempio provocando dei cambiamenti nella struttura terziaria delle proteine. Ma la conseguenza più seria dell'uso di H₂O₂ è rappresentata dal rapido rilascio di ossigeno che potrebbe portare facilmente alla comparsa di embolia gassosa sistemica [50], motivo per il quale è ancora necessario approfondire se esso sia adatto per la sterilizzazione della dECM.

Oltre ad essere utilizzata come metodo di decellularizzazione, l'anidride carbonica supercritica trova anche impiego come agente sterilizzante. Tuttavia il meccanismo col quale agisce non è ancora del tutto chiaro; negli ultimi anni sono state proposte diverse teorie sul suo funzionamento, tra cui l'acidificazione che rappresenta il meccanismo più plausibile [52]. Secondo questa teoria la CO₂ dissolvendosi si trasforma in acido carbonico, il quale successivamente si decomporrà in ioni bicarbonato (HCO₃⁻) e ioni idrogeno (H⁺) che provocheranno un aumento della permeabilità della citomembrana, consentendone l'accumulo all'interno della cellula. L'accumulo di queste specie ioniche porterà ad un abbassamento del pH intracellulare con conseguente inattivazione degli enzimi, inibizione del metabolismo cellulare e morte finale dei microrganismi.

Uno dei principali aspetti positivi dell'uso della CO₂ supercritica è la sua capacità di non causare delle sostanziali alterazioni dell'integrità strutturale e delle prestazioni meccaniche del tessuto decellularizzato. Inoltre risulta essere non tossica e priva della formazione di residui, il che la rende un potenziale metodo di sterilizzazione per produrre un costrutto senza immunogenicità. Viene tipicamente utilizzata per il trattamento di tessuti spessi che richiedono un elevato livello di penetrazione per ottenere una sterilizzazione efficace.

L'alcol è un disinfettante comune la cui azione è quella di causare la denaturazione delle proteine e distruggere il sistema enzimatico dei microrganismi. I disinfettanti alcolici più utilizzati sono l'etanolo e l'isopropanolo. Il metodo di disinfezione tramite alcol consiste nell'immergere i biomateriali in una soluzione alcolica per alcune decine di minuti. Nonostante abbia effetti minimi

sulla struttura della dECM, l'alcol non possiede effetto letale sulle spore batteriche, motivo per il quale può essere utilizzato solo per la disinfezione e non per la sterilizzazione^[51]. Inoltre come ulteriore effetto negativo potrebbe causare la denaturazione delle proteine e ridurre in maniera significativa il contenuto di collagene della dECM.

Nella **figura 6** e nella **figura 7** vengono schematizzati i vari metodi di sterilizzazione sopra descritti.

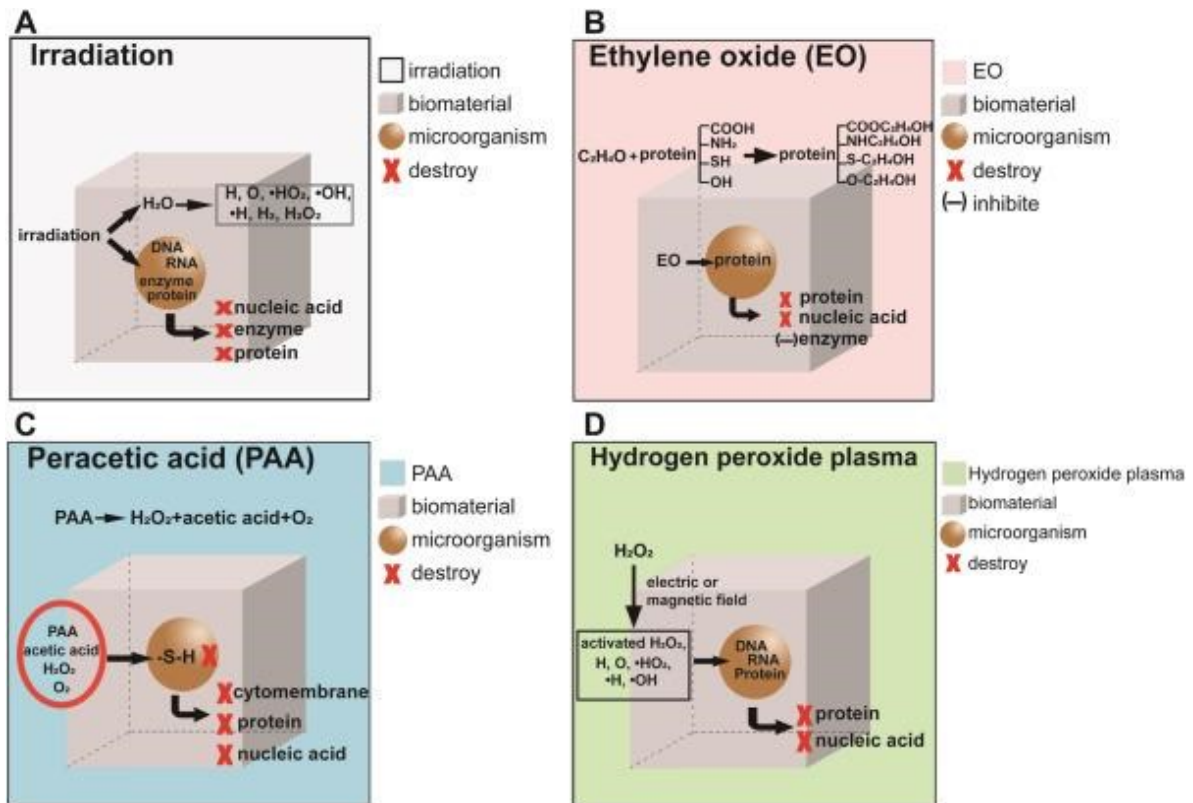


Figura 6: Meccanismi di sterilizzazione dell'irradiazione (A), dell'ossido di etilene (B), dell'acido peracetico (C) e del perossido di idrogeno (D)^[5].

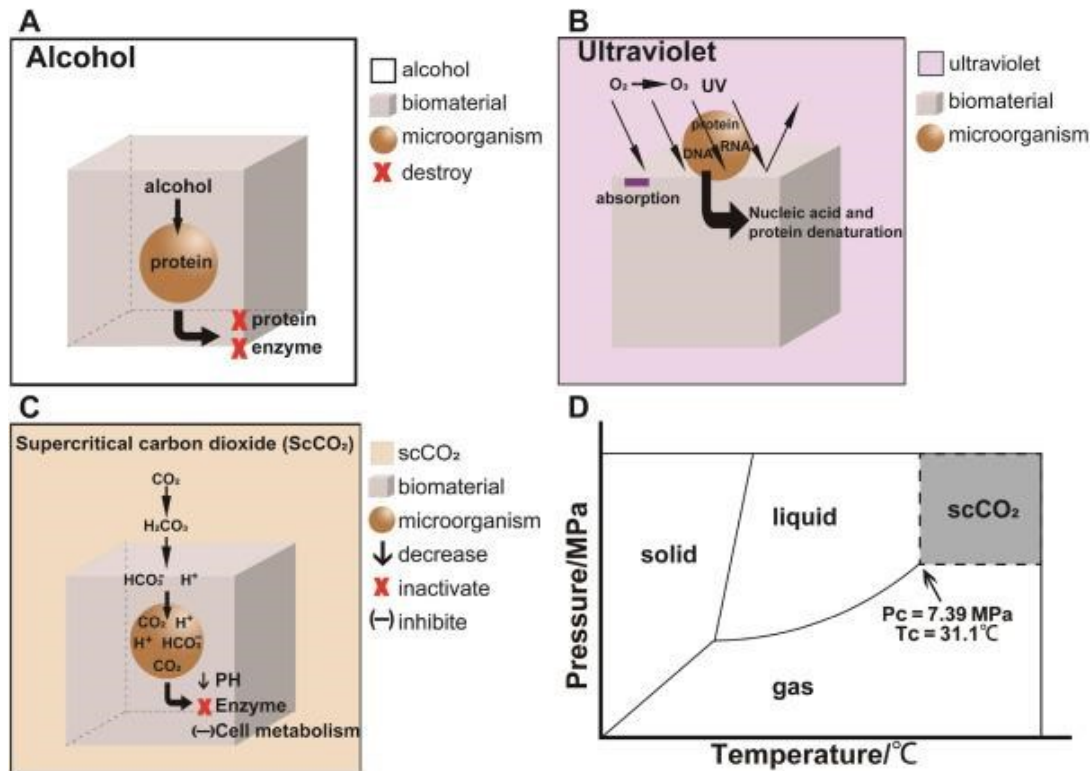


Figura 7: Meccanismi di sterilizzazione e disinfezione di alcol (A), ultravioletti (B) e anidride carbonica supercritica (C). Diagramma trifase dell'anidride carbonica supercritica (D)^[5].

Sebbene non siano un metodo chimico tipicamente usato di sterilizzazione, anche gli antibiotici possono essere utilizzati per il trattamento dei biomateriali al fine di raggiungere lo stato asettico. Esistono svariate classi di antibiotici che a seconda del proprio meccanismo inibiscono o uccidono i microrganismi^[53]. I diversi meccanismi d'azione delle diverse classi di antibiotici sono rappresentati nella **figura 8**. Un primo esempio sono i β -lattamici come la penicillina, il cui meccanismo è quello di inibire la sintesi della parete cellulare batterica. Gli aminoglicosidi come streptomina e gentamicina invece, agiscono legandosi alla subunità 30S dei ribosomi andando ad ostacolare la sintesi proteica nei batteri. Un'altra classe con meccanismo simile agli aminoglicosidi è rappresentata dai macrolidi, i quali si legano alla subunità 50S dei ribosomi al fine di interferire con la traduzione proteica della cellula batterica, alcuni esempi di macrolidi sono l'azitromicina e l'eritromicina.

I chinoloni, come la ciprofloxacina e l'ofloxacina, sono caratterizzati da un ulteriore meccanismo, essi infatti sono in grado di interagire con la DNA girasi e inibire la sintesi di DNA della cellula batterica. Infine, antibiotici antifungini come l'amfotericina B possono inibire la crescita dei funghi

andando ad alterare la permeabilità della membrana cellulare. Nonostante gli antibiotici non abbiano effetti collaterali evidenti sulla struttura o sulle proprietà meccaniche della dECM, presentano comunque degli svantaggi. A tal proposito lo spettro d'azione di ciascun antibiotico è limitato ad alcune specie batteriche e anche se vengono utilizzati più antibiotici in combinazione esistono dei microrganismi che non risultano influenzati dalla loro azione sinergica. Pertanto è buona prassi eseguire il test di sterilità in seguito al trattamento della dECM con antibiotici. Inoltre alcuni antibiotici potrebbero avere un effetto negativo sulle cellule del corpo umano determinando la comparsa di reazioni avverse. In particolare antibiotici come i β -lattamici e i chinoloni possono determinare reazioni di ipersensibilità, mentre streptomina ed altri aminoglicosidi sono responsabili della comparsa di reazioni tossiche nel corpo umano come ototossicità e nefrotossicità. Considerando gli effetti tossici che gli antibiotici possono avere sulle cellule del corpo è consigliabile rilevare i relativi residui attraverso il test di citotossicità.

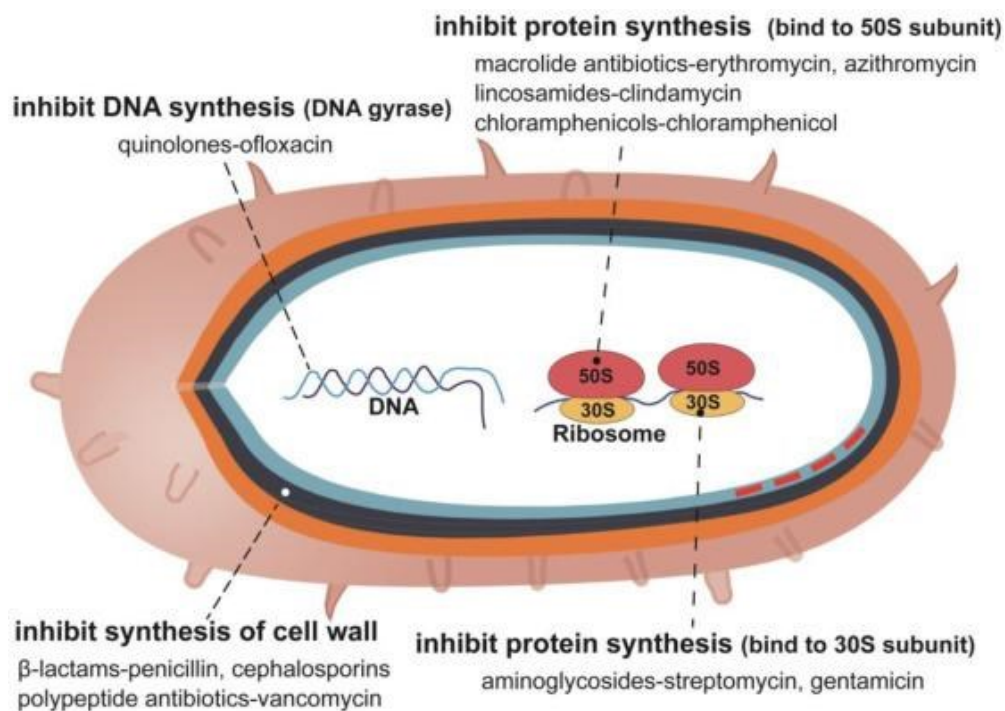


Figura 8: Il meccanismo d'azione delle diverse classi di antibiotici [5].

VALUTAZIONE DELLA ECM DECELLULARIZZATA

Il metodo di decellularizzazione ideale dovrebbe preservare le proprietà biochimiche e meccaniche del tessuto/organo nativo con il tasso di tossicità più basso affinché possa verificarsi la successiva fase di ricellularizzazione. Le tecniche di decellularizzazione però non sono in grado di eliminare il 100% del materiale cellulare il quale può contribuire all'insorgere di problemi di citocompatibilità *in vitro* e a reazioni avverse nell'ospite *in vivo* in seguito al processo di ricellularizzazione. La valutazione quantitativa dei residui cellulari, come mitocondri, DNA a doppio filamento e molecole associate alla membrana come i fosfolipidi, risulta essere un criterio cruciale per garantire l'efficacia del metodo di decellularizzazione. La concentrazione minima di materiale cellulare residuo contenuto nella dECM necessaria per suscitare una risposta di rimodellamento negativa può variare a seconda di diversi fattori: la fonte della ECM, il tipo di tessuto in cui è impiantata la ECM e la risposta immunitaria dell'ospite. Per determinare che il processo di decellularizzazione sia avvenuto con successo sono stati quindi definiti tre criteri minimi che certificano la perdita di materiale nucleico [59].

- Il contenuto di DNA a doppio filamento deve essere inferiore a 50 ng per mg di ECM secca
- La lunghezza del frammento di DNA deve essere inferiore a 200 bp
- Non deve esserci materiale nucleico visibile in seguito a colorazione con 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI) o ematossilina e eosina (H&E)

Viene posta particolare attenzione al materiale nucleico poiché il DNA è direttamente collegato con le reazioni avverse dell'ospite, è ubiquitario in tutti i tipi di tessuti e cellule ed è facilmente analizzabile. I primi due criteri sono quantificabili utilizzando rispettivamente intercalanti del dsDNA (double strand DNA) ed elettroforesi su gel. Il terzo criterio invece, viene valutato tramite colorazione istologica e immunofluorescenza e serve principalmente come verifica qualitativa dei primi due. Nella **figura 9 (immagini b-c)** viene illustrato l'utilizzo di DAPI e H&E su un campione di pelle umana. Ad oggi sono stati introdotti ulteriori test e metodi di valutazione per studiare le caratteristiche della dECM prodotta che verranno di seguito descritti.

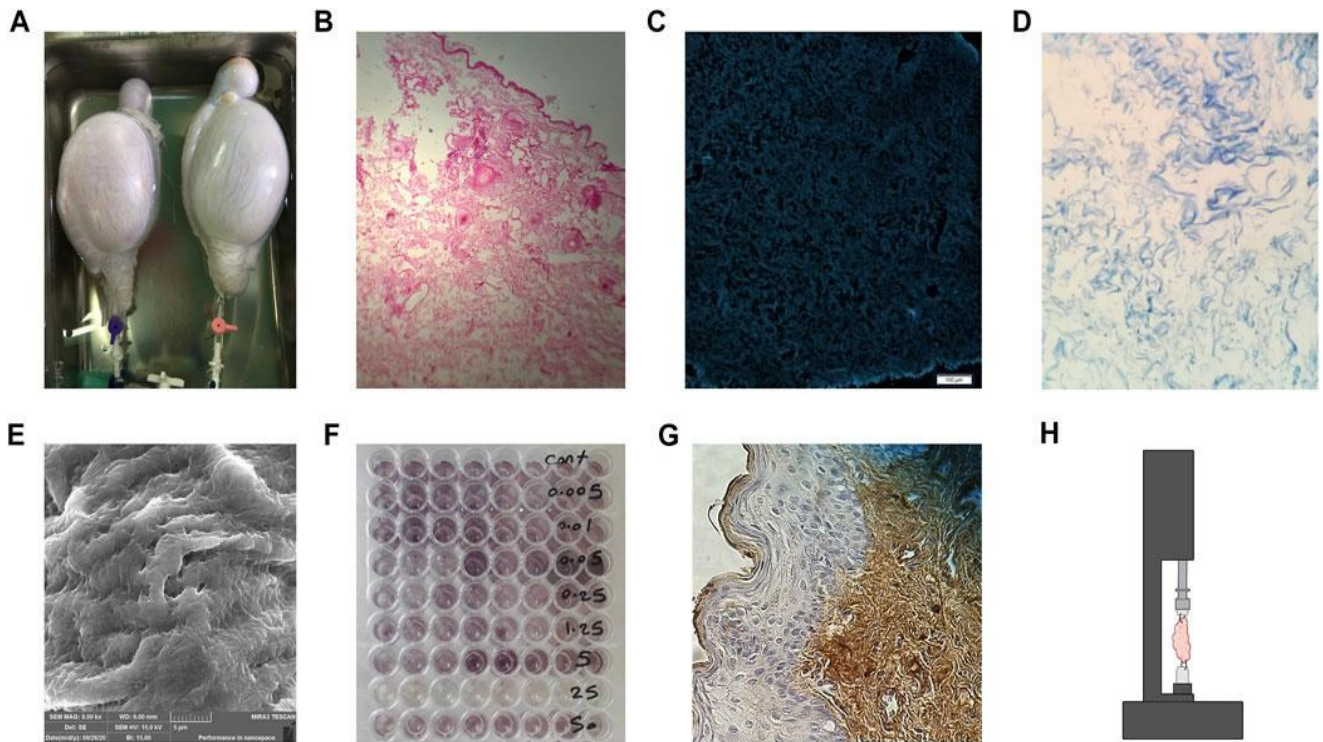


Figura 9: Valutazione del dECM. (A) Ispezione dei testicoli ovini decellularizzati. (B) Colorazione con ematosilina ed eosina H&E della pelle decellularizzata, (C) Colorazione con 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI) di pelle umana decellularizzata. (D) Colorazione Tricromica di Masson dell'ovaio umano, che mostra fibre di collagene preservate mentre non si vede alcun nucleo. (E) SEM del tessuto ovarico ovino decellularizzato. (F) Analisi del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT), che mostra la vitalità e l'attività cellulare dove si osserva il colorante viola. (G) Colorazione immunostochimica (IHC) utilizzando anticorpi contro il collagene I nella pelle umana dopo la ricellularizzazione. (H) Imaging schematico della prova di trazione (valutazione proprietà meccaniche), il tessuto viene posizionato al centro dell'apparato e trascinato in direzioni opposte per valutare la resistenza meccanica del dECM^[6].

Valutazione macroscopica

L'analisi macroscopica rappresenta il primo passo di valutazione dello scaffold decellularizzato. Solitamente l'analisi di imaging macroscopico viene utilizzata come metodo per determinare il livello di trasparenza della dECM rispetto al tessuto nativo, come viene rappresentato nella **figura 9** (**immagine a**) e nella **figura 10**. La trasparenza viene misurata posizionando i campioni su una superficie modellata e successivamente viene calcolata l'intensità valutando la luce trasmessa elaborando le immagini con un software^[60]. L'ispezione macroscopica rimane tuttavia un metodo di valutazione non del tutto affidabile, motivo per cui viene normalmente seguito da metodi di valutazione più accurati.

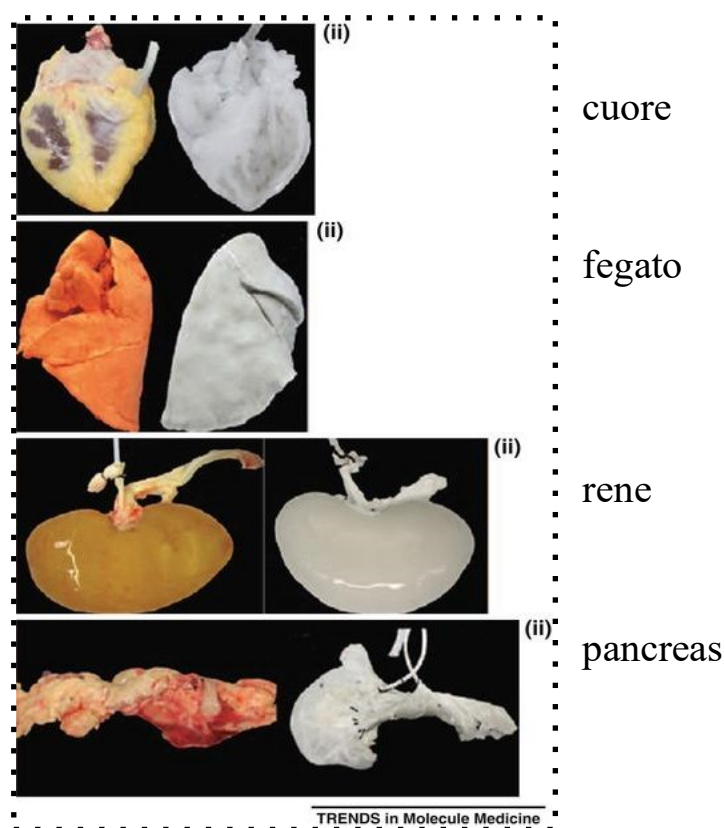


Figura 10: scaffold di organi interi decellularizzati per perfusione in cui è possibile valutare macroscopicamente il livello di trasparenza della dECM ottenuta. Sul lato sinistro l'organo prelevato, sul lato destro l'organo decellularizzato.^[7]

Valutazione dell'ultrastruttura

La conservazione dell'architettura tridimensionale e della struttura dell'impalcatura d'origine può essere valutata utilizzando microscopi elettronici a scansione (SEM) oppure a trasmissione (TEM). La funzione di un microscopio elettronico a scansione è quella di rivelare la topografia superficiale dello scaffold decellularizzato, mentre la microscopia elettronica a trasmissione viene utilizzata per fornire una valutazione dettagliata dell'orientamento di materiali e organelli cellulari. Entrambe queste valutazioni vengono utilizzate per indicare l'efficacia del trattamento di decellularizzazione nel conservare la struttura nativa dell'ECM, inoltre possono mostrare i detriti e i componenti cellulari rimanenti nel tessuto decellularizzato. Un esempio di scaffold decellularizzato e analizzato utilizzando SEM e TEM è riportato nella **figura 9 (immagine e)** e nella **figura 11**.

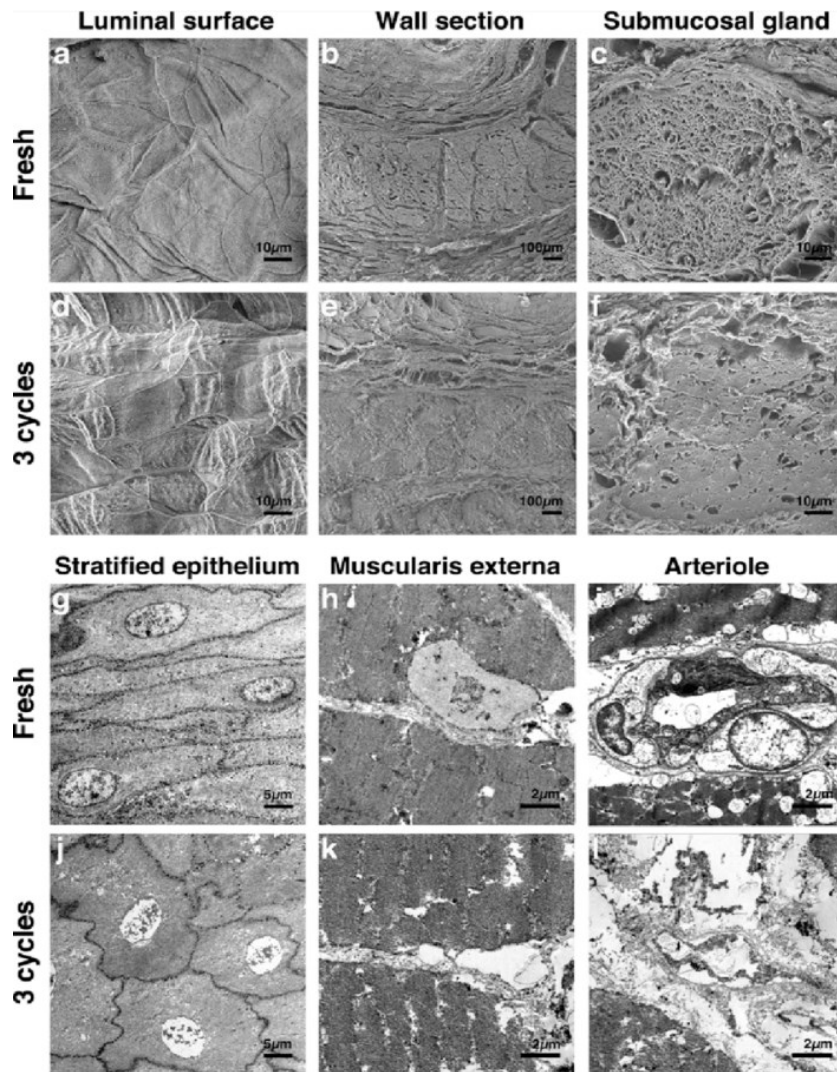


Figura 11: Microscopia elettronica a scansione SEM (a-f) e microscopia elettronica a trasmissione TEM (g-l) di esofago fresco e decellularizzato [8].

Citocompatibilità

Prima dell'utilizzo *in vivo* è fondamentale studiare l'interazione cellulare con l'impalcatura decellularizzata e valutare gli effetti dannosi del metodo o dell'agente decellularizzante per poter garantire l'efficacia clinica della dECM. A tal proposito, il passo iniziale è quantificare le sostanze chimiche rimanenti dopo il processo di decellularizzazione e sterilizzazione. Il test di citocompatibilità più comunemente utilizzato è la coltura cellulare *in vitro*, diretta o indiretta. Questo perché le cellule coltivate *in vitro* sono generalmente più sensibili alle sostanze tossiche rispetto ai tessuti *in vivo*. Pertanto, un materiale tossico *in vitro* può risultare non particolarmente tossico per

i tessuti *in vivo*, mentre un materiale innocuo per le cellule, anche in saggi di lunga durata, risulta sicuramente inerte anche *in vivo* ^[61]. Nel saggio per contatto indiretto (o metodo di estrazione) la proliferazione cellulare e l'attività metabolica vengono valutate dopo l'estrazione dei campioni cellulari dalla superficie decellularizzata. Gli obiettivi sono valutare i cambiamenti nella morfologia cellulare, l'inibizione della proliferazione e determinare se le cellule sono metabolicamente attive. Nel saggio per contatto diretto invece le cellule vengono coltivate e studiate per i parametri precedentemente descritti direttamente sulla superficie decellularizzata. Nella maggior parte dei casi la citocompatibilità degli scaffold decellularizzati viene valutata utilizzando il test del contatto diretto poiché consente di studiare l'adesione, la migrazione e la distribuzione delle cellule all'interno degli scaffold.

Analisi biochimica

Successivamente alla decellularizzazione è necessario quantificare i componenti rimanenti della ECM nativa, quali GAG, fibre elastiche, collagene e proteine di adesione come fibronectina e laminina. Una quantità adeguata di queste sostanze nella dECM permette infatti di mantenere la normale funzione, struttura e proprietà meccaniche del tessuto/organo d'origine. Per rilevare queste molecole possono essere utilizzati vari coloranti, kit e marcatori immunoistochimici (IHC). Degli esempi sono la colorazione tricromia di Masson, che viene utilizzata per la colorazione delle fibre di collagene; la laminina e la fibronectina possono essere rilevate con anticorpi in IHC mentre il colorante blu di toluidina, un colorante metacromatico tiazinico basico con elevata affinità per i componenti tissutali acidi, è capace di colorare i tessuti ricchi di DNA e RNA ed evidenziare componenti quali granuli di mastociti, mucine e cartilagine ^[62]. Nella **figura 9 (immagine d)** e nella **figura 12** sono rappresentate diverse dECM su cui sono stati utilizzati questi coloranti.

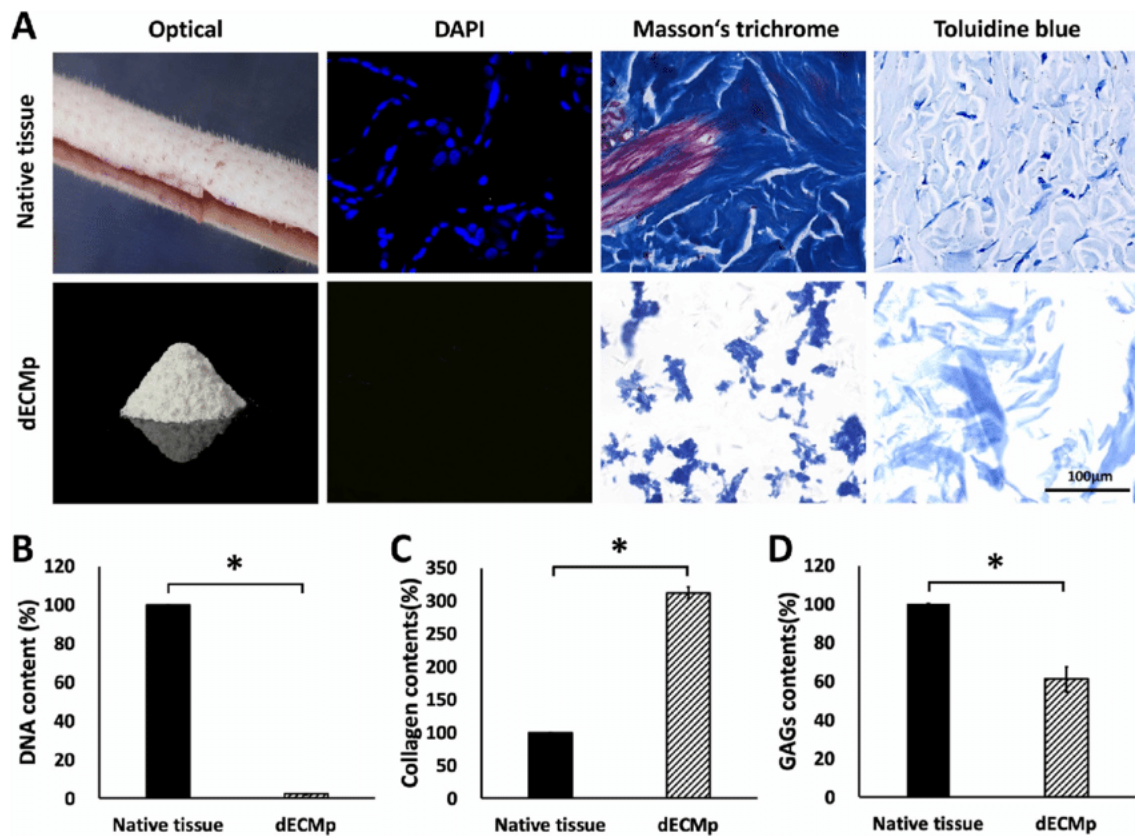


Figura 12: (A) Immagini in microscopia ottica di pelle suina nativa e della dECM colorata con DAPI, tricromia di Masson e blu di toluidina. (B-C-D) che evidenziano rispettivamente il contenuto di DNA, di collagene e di GAG nei tessuti nativi e nella dECM^[9].

Prove meccaniche

Successivamente alla verifica della completa rimozione cellulare, è importante valutare l'impatto che il processo di decellularizzazione ha avuto sulle proprietà meccaniche della ECM. La struttura della ECM è formata da una rete di molecole che conferiscono al tessuto un'adeguata architettura meccanica necessaria per far proliferare la popolazione cellulare desiderata durante il rimodellamento tessutale. È stato dimostrato che l'elasticità della ECM gioca un ruolo fondamentale nel determinare la specificazione del lignaggio delle cellule staminali, poiché matrici con elasticità simile a quella del cervello, dei muscoli o delle ossa inducono rispettivamente la differenziazione neurogenica, miogenica e osteogenica delle cellule staminali mesenchimali (MSC)^[63]. Per misurare e confrontare la resistenza meccanica tra il tessuto/organo decellularizzato e quello nativo, la microscopia a forza atomica (AFM) è una delle possibili tecniche utilizzabili. Questa tecnica utilizza una sonda estremamente sottile che scansiona la superficie del campione muovendosi sopra di essa dalla quale si ottengono curve di stress da indentazione che verranno analizzate e confrontate con il

tessuto/organo nativo. Con l'AFM, non solo è possibile ottenere immagini topografiche tridimensionali della superficie dei campioni con una precisione nanometrica, rivelando dettagli come la disposizione delle fibre di collagene e altre componenti della matrice, ma è anche possibile ottenere informazioni sulle interazioni molecolari e sui legami chimici presenti nella ECM. Nello specifico l'AFM può identificare la presenza di determinate proteine o glicosaminoglicani nella matrice e valutare in che modo i diversi metodi di rimozione cellulare influenzano la composizione chimica della matrice.

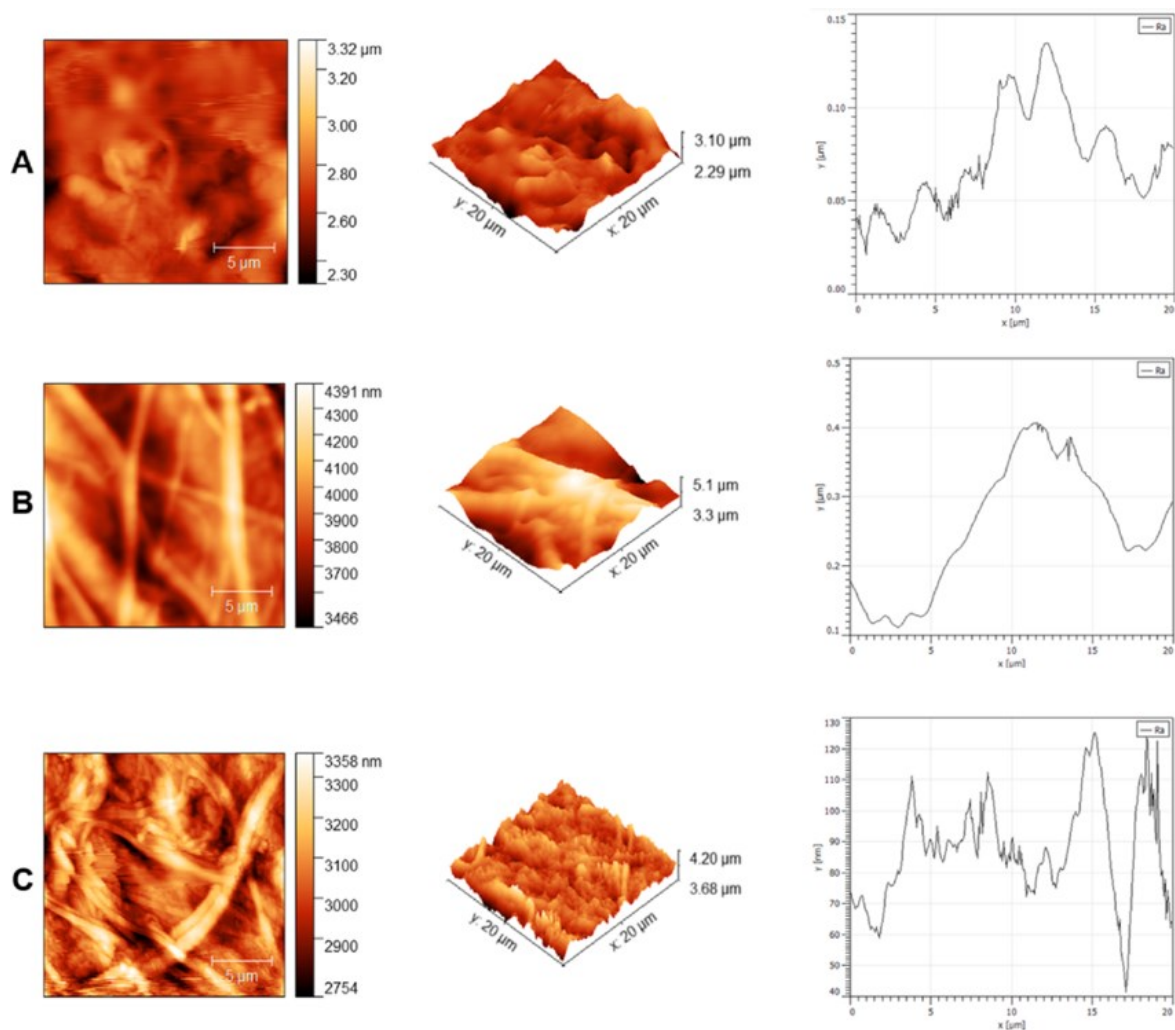


Figura 13: Immagini AFM di pericardio nativo (A), decellularizzato (B) e composito (C)^[10].

Alternativamente alla tecnica AFM le proprietà meccaniche tra il tessuto/organo decellularizzato e quello nativo possono essere confrontate mediante la prova di trazione. Questo test si concentra sulla relazione tra lo stress applicato al materiale e la sua deformazione. Lo stress è definito come la forza applicata per unità di area, mentre la deformazione è la misura del cambiamento di forma o dimensione del materiale in risposta a tale forza. Durante la procedura, un campione del materiale viene posizionato tra due morsetti collegati a una macchina di prova universale, che applica una forza di trazione progressiva a una velocità costante fino a quando il campione non si rompe. Durante il test, i dati vengono raccolti da un software e utilizzati per tracciare una curva di stress-deformazione, che fornisce informazioni dettagliate sulle proprietà meccaniche del materiale, come il modulo di elasticità e la resistenza alla rottura. Il modulo di elasticità (o modulo di Young) misura la rigidità del materiale, indicandone la capacità di deformarsi elasticamente quando sottoposto a stress, mentre la resistenza alla rottura rappresenta la forza massima che il campione può sopportare prima di rompersi. Questi dati forniscono informazioni dettagliate sulle proprietà meccaniche del tessuto/organo decellularizzato, consentendo ai ricercatori di confrontare diversi metodi di decellularizzazione e ottimizzare il processo per ottenere scaffold di alta qualità.

Immagini relative alla misurazione della resistenza meccanica del tessuto/organo decellularizzato sono riportate nella **figura 9 (immagine h)** e nella **figura 13**.

Test aggiuntivi

Sulla base dello scopo dello studio e della funzione futura della dECM prodotta, potrebbero essere necessari ulteriori test per valutare le varie componenti e caratteristiche dell'impalcatura interessata. Uno di questi test è l'analisi proteomica della dECM il cui scopo è quello di mostrare e confrontare con precisione il proteoma della ECM prima e dopo il trattamento di decellularizzazione. Viene utilizzata per valutare il profilo proteico completo dell'ECM, inclusi gli enzimi e i fattori di crescita rimanenti e può essere effettuata mediante diverse tecniche, come la nanocromatografia liquida o la spettrometria di massa tandem.

Altri test aggiuntivi sono rappresentati dalla angiografia con tomografia computerizzata, riportata in **figura 14**, e dal saggio di gelificazione. Questi due test consentono rispettivamente di analizzare la vascolarizzazione dopo il processo di decellularizzazione e valutare la capacità della dECM di formare un gel durante il processo di produzione dell'idrogel^[60].

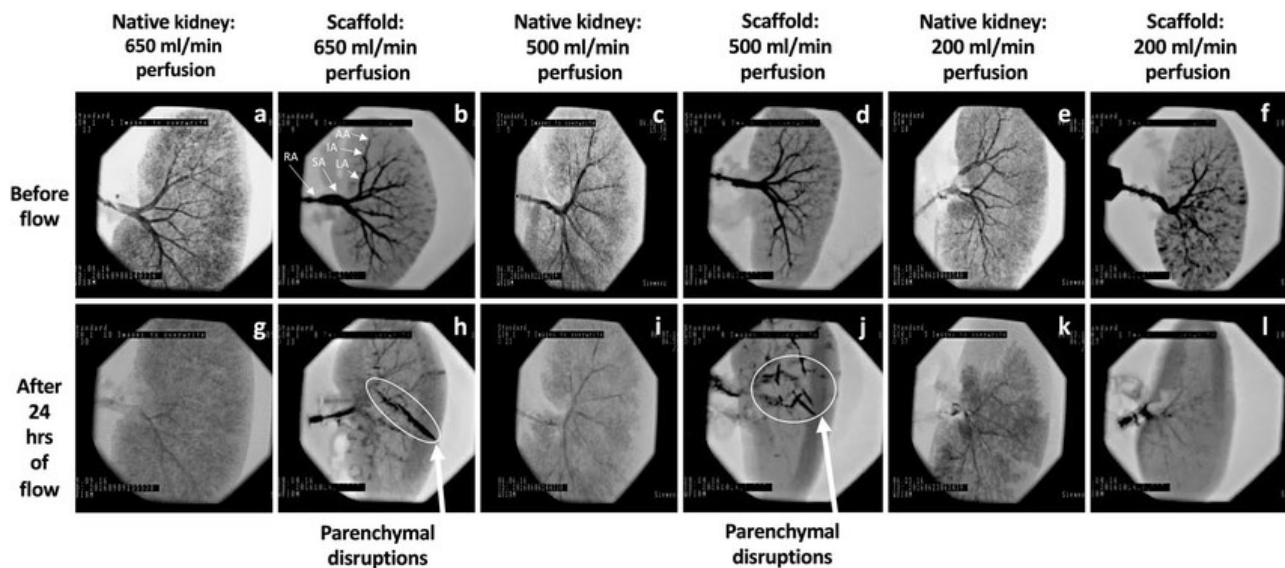


Figura 14: Angiografia fluoroscopica che mostra l'impatto della perfusione continua di sangue per 24 ore sul sistema vascolare renale nativo e decellularizzato. Gli angiogrammi effettuati dopo 24 ore di perfusione sanguigna mostrano interruzioni della rete vascolare precedentemente ai trattamenti di decellularizzazione intatta. Le frecce nelle immagini (h) e (j) vengono utilizzate per indicare rotture del parenchima dell'impalcatura rivelate dall'angiografia che non erano visibili dalla superficie ^[11].

TIPOLOGIE DI INNESTI DI ECM DECELLULARIZZATA

Analogamente alla diversità dei possibili metodi di decellularizzazione esistono anche numerose tipologie di innesto che possono essere ottenute da tessuto decellularizzato. Tra le più comunemente utilizzate troviamo il tessuto intatto, le polveri ECM, gli innesti compositi, gli idrogel e gli organi interi. Per determinare quale utilizzare, è fondamentale conoscere la struttura anatomica, la funzionalità e le proprietà chimico-fisiche della parte da sostituire per individuare l'innesto più adatto. Negli anni sono stati raggiunti diversi traguardi riguardo l'applicazione di innesti più semplici come gli innesti cutanei e i vasi sanguigni, mentre per forme di innesti più complessi come interi organi, rimangono tuttora molte sfide da affrontare per produrre un organo autologo pienamente funzionale, ossia un organo decellularizzato e ricellularizzato con cellule dello stesso individuo, che possa essere trapiantato in modo simile a un organo donatore^[54].

Tessuto intatto

In seguito al processo di decellularizzazione, frammenti di tessuto possono essere utilizzati come forma di innesto per il rimodellamento e la rigenerazione, a condizione che la dECM mantenga la sua funzionalità originaria e fornisca gli stimoli necessari per supportare la proliferazione e la differenziazione cellulare. Per poter sfruttare questa forma di innesto è di fondamentale importanza quindi che la maggior parte della ECM nativa non venga distrutta o alterata durante il procedimento. In ambito clinico rappresentano la forma di innesto più comunemente utilizzata e i prodotti dermici sono il tipo di tessuto più diffuso^[58]. Gli innesti dermici sono per la maggior parte costituiti da collagene il che li rende molto versatili sia per innesti cutanei sia nella riparazione dei tendini, nella rigenerazione ossea, nella riparazione di menischi e dischi intervertebrali. Un esempio di ferita suina cutanea trattata con diverse matrici di collagene è riportato nella **figura 15**.

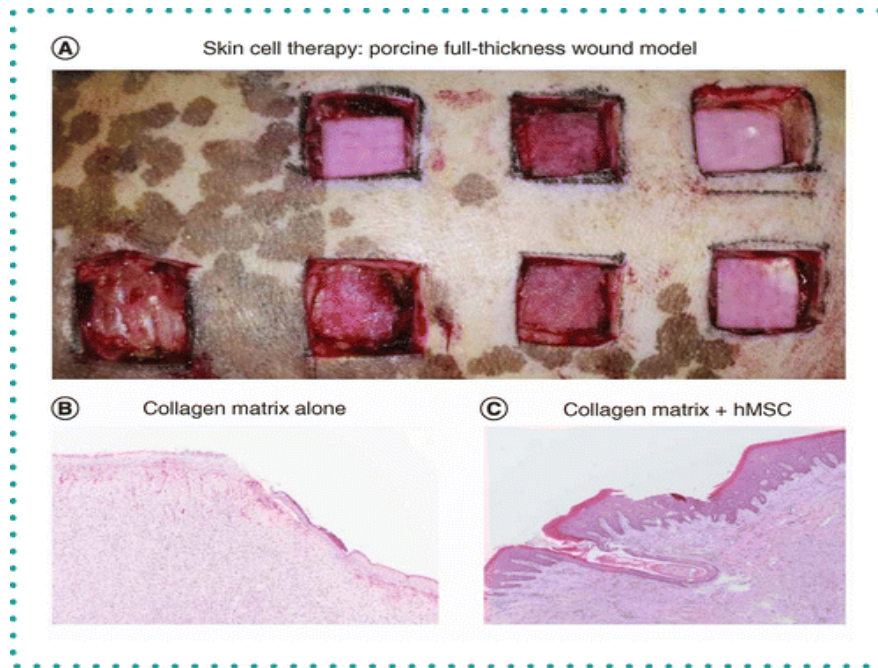


Figura 15: (A) Modello di ferita suina cutanea a tutto spessore trattato con (B) matrice di collagene senza cellule e (C) impalcatura ECM di matrice di collagene con cellule staminali mesenchimali ^[12].

Polveri ECM

Mentre i tessuti integri permettono di mantenere la struttura vascolare e la forma dei tessuti originali con le relative proprietà meccaniche, le polveri ottenute da tessuto decellularizzato presentano una serie di proprietà diverse che le rendono più adatte ad applicazioni differenti. Sono caratterizzate da strutture omogenee di dimensioni programmate per riempire i difetti strutturali presenti nella sede del difetto/danno tissutale; questa capacità di conformarsi ad una determinata forma consente di utilizzare procedure minimamente invasive per l'impianto. Il processo di fabbricazione delle polveri ECM consiste nel congelamento e liofilizzazione del tessuto decellularizzato seguiti da un successivo processo di polverizzazione e macinazione anche se in alternativa il tessuto decellularizzato può essere sottoposto a congelamento tramite azoto liquido e successiva macinazione. Quando vengono prodotte le polveri ECM bisogna tenere in considerazione diversi fattori come le dimensioni delle particelle, il grado di solubilizzazione delle polveri e la reticolazione della ECM. In particolare la dimensione e la morfologia delle particelle possono influenzare la proliferazione cellulare, la differenziazione e lo sviluppo dei tessuti quando impiantati *in vivo*. Durante la produzione della polvere, l'umidità residua può provocare la formazione di grumi e agglomerati di polvere, con conseguente formazione di particelle di varie dimensioni. La separazione degli agglomerati è difficile

e i grumi possono rimanere intrappolati nel processo di macinazione. Sebbene le particelle con forma e dimensione diverse siano substrati soddisfacenti per l'adesione e la crescita cellulare, particelle con morfologia uniforme consentono un maggiore controllo dello sviluppo dei tessuti in vivo^[55].

Idrogel

Gli idrogel sono definiti come materiali polimerici altamente idratati, che mantengono l'integrità strutturale mediante legami incrociati fisici e chimici tra le catene polimeriche che possono essere sintetiche (polietilene ossido, poli (alcol vinilico), poli (acido acrilico), poli (propilene fumarato-co-etilenglicole), o naturali (alginato, chitosano, collagene, acido ialuronico). Avendo avuto ottimi risultati per riempire spazi irregolari, fornire molecole/farmaci bioattivi e/o fornire cellule per stimolare la crescita dei tessuti^[56], la ricerca si è concentrata sulla possibilità di solubilizzare una polvere ECM al fine di formare un **idrogel ECM** con l'obiettivo di riempire in modo minimamente invasivo i difetti di forma irregolare di un tessuto e creare degli innesti di tessuto decellularizzato controllati con attenzione.

Il processo di formazione di idrogel derivati da tessuto/organo decellularizzato comporta tipicamente la solubilizzazione con pepsina della dECM seguita da metodi di reticolazione fisica oppure dall'autoassemblaggio delle fibre di collagene con lo scopo di creare una rete 3D^[56]. Gli idrogel a base di ECM hanno la capacità di imitare l'ambiente fisiologico della matrice, promuovere l'adesione la migrazione e la proliferazione cellulare, oltre a fornire fattori di crescita e migliorare la ritenzione di cellule eventualmente aggiunte al gel stesso prima dell'impianto. Nonostante questa serie di vantaggi, gli idrogel risultando caratterizzati da una scarsa resistenza meccanica seguita da una rapida degradazione e una bassa stabilità soprattutto se formati tramite autoassemblaggio che genera prodotti con una reticolazione più sottile, sono suggeriti nel loro utilizzo solo in certi tipi di applicazioni. Per superare queste limitazioni gli idrogel vengono quindi sottoposti a processi di reticolazione chimica o biologica. I trattamenti con metodi di reticolazione chimica hanno dimostrato migliori proprietà dell'idrogel come una resistenza meccanica regolabile e un'elevata citocompatibilità. La reticolazione chimica può essere ottenuta utilizzando agenti come la glutaraldeide e le carbodiimmidi per sviluppare biomateriali e innesti dECM con le caratteristiche fisico-chimiche desiderate. La ricerca si è focalizzata anche sull'utilizzo di metodi di reticolazione biologici che risultano essere meno tossici. I reticolanti biologici sono agenti chimici disponibili in natura che possono creare legami incrociati e formare legami covalenti con la dECM. A causa della loro origine biologica, è

stato dimostrato che mostrano una migliore biocompatibilità rispetto agli altri metodi di reticolazione e gli agenti biologici più comunemente utilizzati sono la genipina e la transglutaminasi (TG).

La reticolazione fisica è indotta dalla temperatura con la formazione di legami idrogeno e l'autoassemblaggio del collagene mentre con agenti reticolanti chimici/biologici si sfrutta la formazione di legami covalenti.

Una schematizzazione del processo di ottenimento di un idrogel è rappresentata nella **figura 16**.

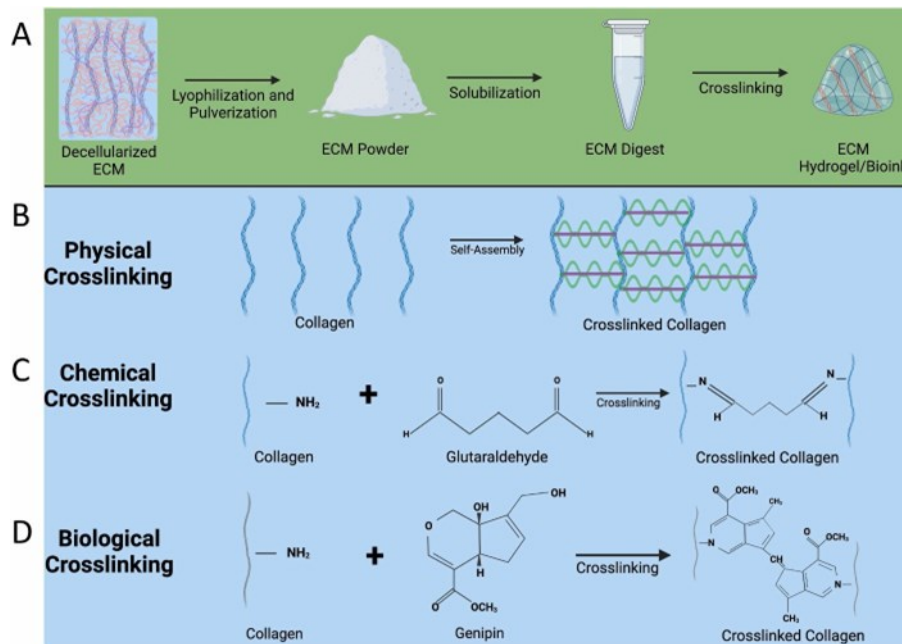


Figura 16: Sviluppo di idrogel dECM. Nella rappresentazione schematica (A), il tessuto decellularizzato subisce una serie di fasi di lavorazione per formare l'idrogel. Inizialmente, il tessuto viene decellularizzato, seguito dalla conversione in polvere. Successivamente, la polvere viene solubilizzata e digerita per ottenere l'idrogel dECM. nelle rappresentazioni (B, C, D) vengono schematizzati i diversi metodi di reticolazione che possono essere impiegati per la reticolazione della dECM.^[13]

Innesti compositi

Un ulteriore forma di innesto è rappresentata dagli innesti compositi, ossia una combinazione di materiali incorporati alla dECM per assistere il tessuto decellularizzato. Il loro scopo è quello di affrontare la perdita di resistenza meccanica o il comportamento meccanico inadeguato degli scaffold prodotti. Inoltre vengono progettati per assicurare un ambiente in cui le interazioni cellula-cellula e

matrice circostante possano essere controllate, in termini di composizione biochimica, al fine di regolare il comportamento e le prestazioni delle cellule desiderate.

Tra i materiali utilizzati per formare questi innesti trovano maggiore impiego i polimeri naturali e sintetici. Essi infatti permettono di migliorare le proprietà meccaniche dell'innesto e di regolarne la porosità, il tasso di degradazione e la formazione di siti di legame. L'interazione tra i diversi polimeri porta alla formazione di fibre polimeriche il cui scopo è di andare ad imitare la natura fibrosa della ECM. La creazione di queste fibre polimeriche viene eseguita attraverso metodi come l'elettrofilatura in cui caratteristiche come il diametro e l'orientamento delle fibre possono essere attentamente controllate. La principale situazione in cui è necessario l'uso di innesti compositi è la formazione di trombi nella vascolarizzazione dei tessuti decellularizzati. Come viene dimostrato da uno studio sperimentale e illustrato nella **figura 17**, l'incorporazione di un elastomero poliestere, il poli (citrate di ottanediolo 1,8) (POC) ha permesso una maggiore interazione tra le molecole di eparina e l'impalcatura della ECM, determinando così una diminuzione della trombosi ^[57]. È stato anche dimostrato che la presenza di eparina in seguito all'incorporazione di POC all'interno del tessuto decellularizzato, determina un aumento della proliferazione delle cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVEC). Oltre alla proliferazione cellulare e al legame con l'eparina, il POC offre anche integrità meccanica alla vascolarizzazione del tessuto, fornendo un supporto meccanico nell'ingegneria tissutale delle valvole cardiache. Nonostante gli innesti compositi siano caratterizzati da un certo grado di degradazione, è fondamentale che l'integrità dell'innesto non sia compromessa sia durante il processo di decellularizzazione che durante la ricellularizzazione. Per ottenere risultati ottimali, il tasso di degradazione degli innesti dovrebbe essere a un ritmo sufficientemente lento da poter mantenere la proliferazione cellulare, consentendo al tempo stesso la produzione della nuova ECM per creare tessuto de novo. Per questo motivo sono state studiate diverse composizioni polimeriche con diversi gradi di degradazione per determinare quale fosse il tasso di degradazione più adeguato. È stato riscontrato che i polimeri con un alto tasso di degradazione erano caratterizzati da una perdita significativa di integrità meccanica e da un'elevata fragilità alla fine del ciclo di ricellularizzazione. I polimeri con velocità di degradazione media invece, consentivano una deposizione di ECM ideale mantenendo al contempo la struttura dell'ECM nativa. I principali vantaggi dell'incorporazione di polimeri naturali e sintetici negli innesti ECM sono espressi dalla loro biocompatibilità, biofunzionalità e controllo sulle proprietà chimico-fisiche. Gli scaffold compositi

consentono inoltre l'incorporazione di peptidi e fattori di crescita (GF) legati o immobilizzati per migliorare ulteriormente la bioattività e le prestazioni della dECM.

Alternativamente all'incorporazione di fibre polimeriche, è possibile introdurre componenti osteoinduttivi, come idrossiapatiti e fosfati di calcio, per potenziare sinergicamente le prestazioni osteogeniche degli innesti compositi per l'ingegneria del tessuto osseo.

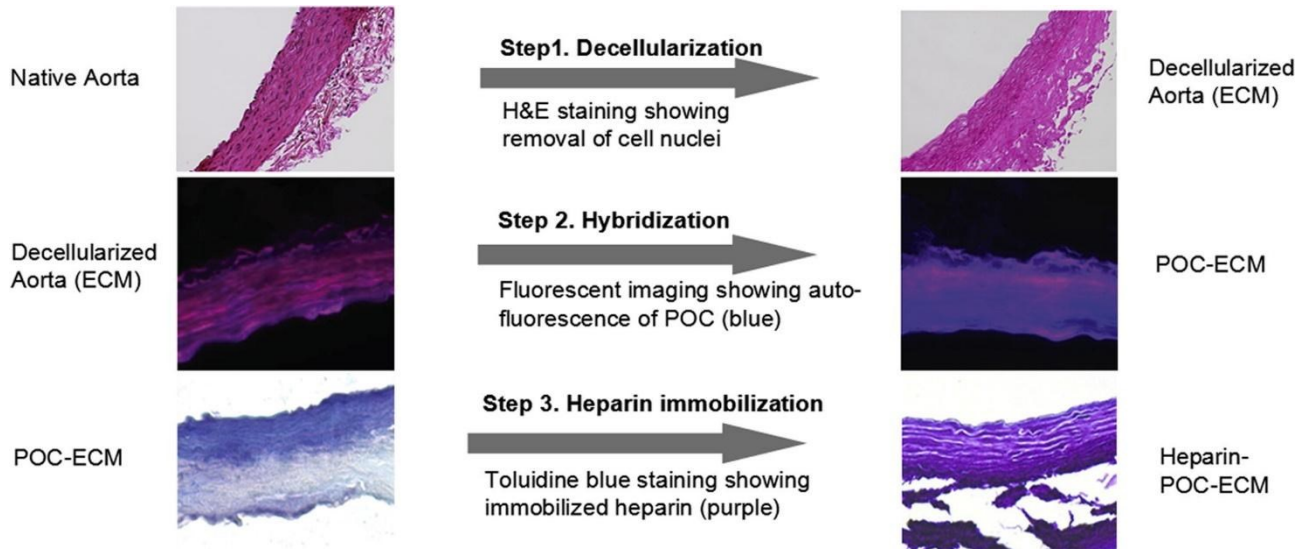


Figura 17: decellularizzazione, incorporazione POC e funzionalizzazione con eparina di aorte di ratto. Il processo ha portato ad una diminuzione dell'adesione piastrinica e ad una inibizione della coagulazione del sangue^[14].

ELABORAZIONE PRE-IMPIANTO

Prima della sua applicazione *in vivo* un tessuto/organo decellularizzato può essere sottoposto ad una serie di procedure *in vitro* che ne migliorano la capacità di innesto e la capacità di rigenerare i tessuti danneggiati senza causare reazioni avverse. Queste procedure sono rappresentate da processi di modifica e perfezionamento, come ad esempio la vascolarizzazione, l'elettrofilatura e la modifica della superficie e dal processo di ricellularizzazione.

Modifica e perfezionamento

Uno dei più importanti trattamenti pre-impianto è rappresentato dalla vascolarizzazione. L'apporto di ossigeno ai tessuti risulta essere uno dei principali ostacoli che limitano l'applicazione *in vivo* degli scaffold decellularizzati assieme alla difficoltà di preservare i componenti della ECM e della struttura vascolare del tessuto/organo d'origine. In questo senso, una valutazione dei componenti e della struttura dello scaffold in seguito al processo di decellularizzazione potrebbe essere utile per stimare l'entità dell'afflusso di sangue. I recenti progressi nel campo dell'ingegneria tessutale hanno condotto a delle soluzioni che possono essere classificate in due categorie: l'aggiunta di fattori di crescita angiogenici (a-GF) alla matrice e la pre-vascolarizzazione della matrice. I GF comprendono una classe di proteine capaci di manipolare l'attività cellulare, incluso il metabolismo, la differenziazione, la proliferazione, il reclutamento e la morfogenesi. I GF angiogenici agiscono con una sequenza che inizia con la destabilizzazione dei vasi, seguita dalla migrazione e/o proliferazione delle cellule endoteliali (EC) per formare nuovi vasi sanguigni e infine dalla maturazione dei vasi per completare il processo angiogenico. Tra i principali fattori di crescita utilizzati per migliorare l'angiogenesi troviamo il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF-A), il principale GF che regola l'angiogenesi nel corpo umano attraverso la stimolazione della proliferazione delle EC. Le angiopoietine, ossia un gruppo di GF aventi un ruolo chiave nella neovascolarizzazione. Ang-1 infatti, rafforza le interazioni delle EC con le cellule muscolari lisce, portando alla maturazione di capillari e vasi sanguigni appena formati. Infine troviamo il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), il quale promuove la maturazione e la stabilizzazione dei vasi sanguigni appena formati e previene la regressione dei vasi attraverso il reclutamento e l'attivazione di periciti e cellule muscolari lisce^[64]. I ruoli dei principali GF utilizzati sono riportati nella **figura 18**.

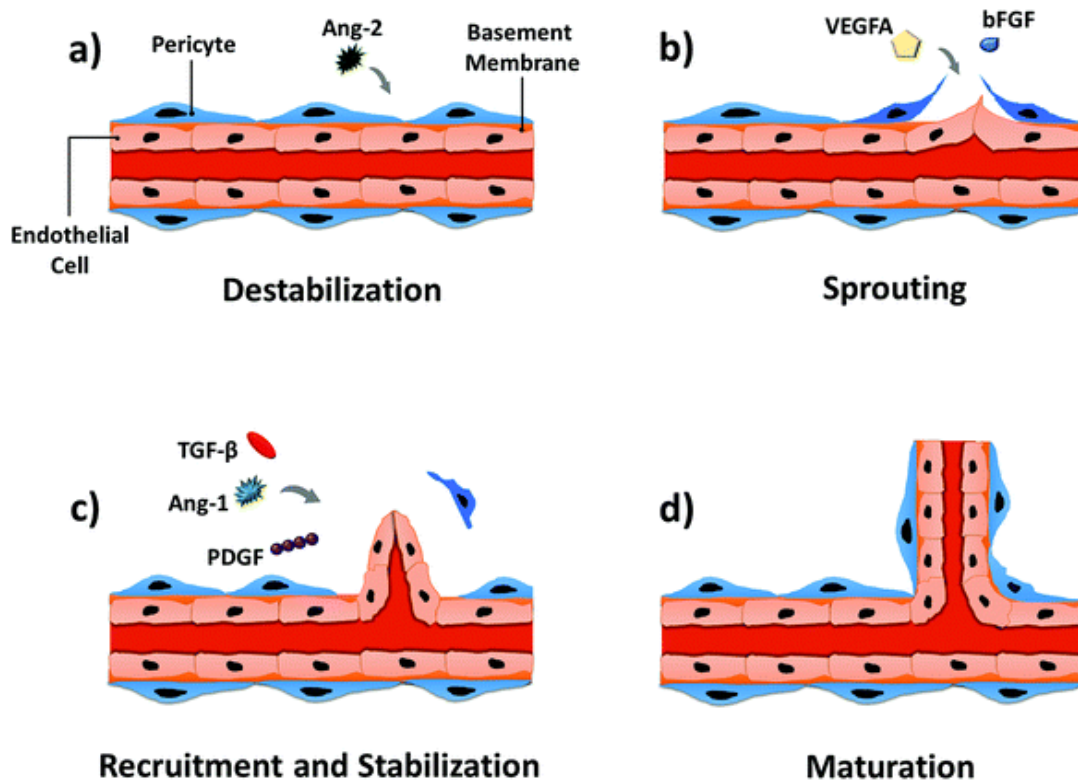


Figura 18: Ruoli sequenziali dei GF durante l'angiogenesi; (a) L'Ang-2 rilasciato a seguito dell'ipossia destabilizza le interazioni periciti/EC, portando al distacco dei periciti; (b) VEGF-A e bFGF stimolano la germinazione e la proliferazione delle EC esposte, creando un nuovo ramo; (c) Il rilascio di PDGF porta al reclutamento di periciti, mentre Ang-1 stabilizza le interazioni periciti/EC e TGF-β aumenta la deposizione della membrana basale, promuovendo la maturazione dei vasi sanguigni nascenti; (d) vaso sanguigno maturo^[15].

Sebbene i fattori di crescita angiogenici possano promuovere efficacemente la vascolarizzazione, hanno dei limiti nella loro funzionalità dovuti ad una lenta crescita dei vasi sanguigni. Per ovviare a questo problema la tecnica della pre-vascolarizzazione potrebbe risultare vantaggiosa facilitando il rilascio di nutrienti e ossigeno alle cellule. L'obiettivo di questa tecnica è quello di creare microvasi all'interno dei biomateriali prima di essere utilizzati *in vivo*. Gli scaffold pre-vascolarizzati dovrebbero possedere un sistema vascolare organizzato e funzionale, formato da arterie, vene e capillari. Inoltre, dopo l'impianto *in vivo*, la rete vascolare degli scaffold pre-vascolarizzati dovrebbe essere rapidamente anastomizzata con il sistema vascolare ospite, migliorando così le possibilità di promuovere l'integrazione della struttura con i tessuti circostanti^[64].

Le principali strategie di prevascolarizzazione sono rappresentate nella **figura 19**.

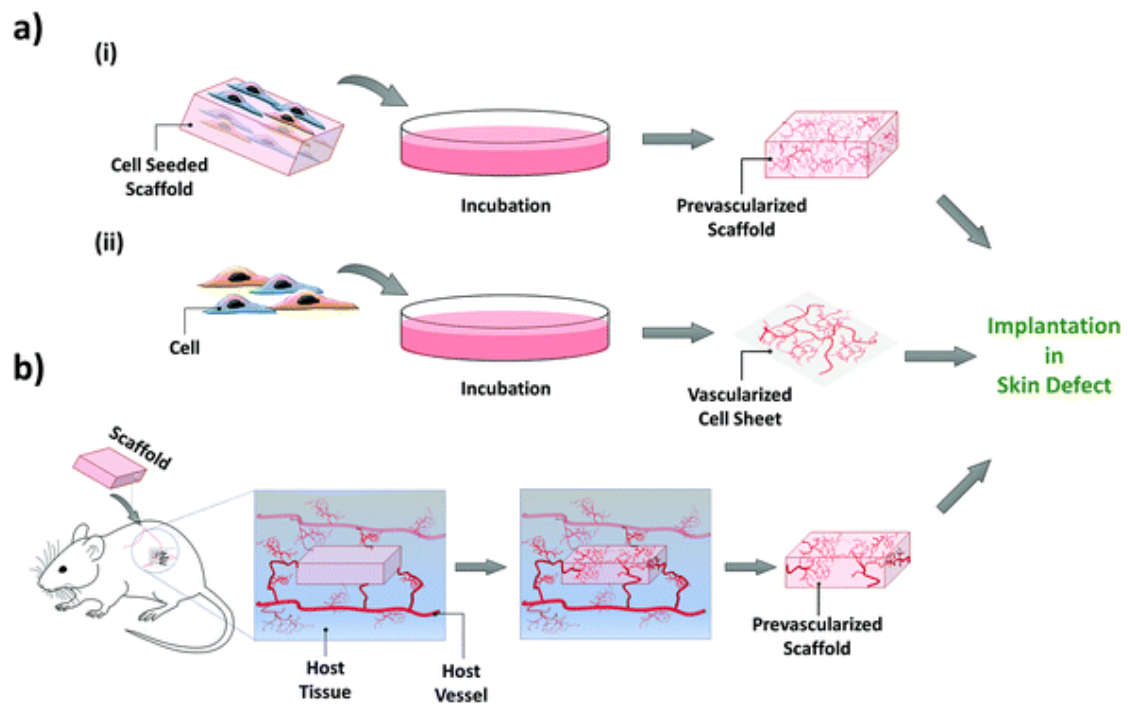


Figura 19: principali strategie di pre-vascolarizzazione nell'ingegneria dei tessuti cutanei. (a) Strategie *in vitro*: (i) le cellule vengono seminate su un'impalcatura e coltivate per formare una rete vascolare in 3D e (ii) utilizzando la tecnologia dei fogli cellulari, le cellule vengono coltivate in due dimensioni per produrre un foglio di tessuto pre-vascolarizzato. (b) Approccio *in vivo*: gli scaffold vengono introdotti per via sottocutanea nel corpo per promuovere la neovascolarizzazione [15].

Recentemente la tecnica dell'elettrofilatura (o elettrospinning) ha trovato impiego come ulteriore trattamento pre-impianto. Questa tecnica consiste nell'ottenere fibre polimeriche di diametro estremamente ridotto compreso tra i micron e i nanometri. Il processo si basa principalmente sul flusso e allungamento di una soluzione polimerica elettrificata, tramite l'applicazione di alte tensioni, dall'ago di una siringa, in cui è contenuto il materiale da elettrofilare. Il flusso polimerico, nel percorso verso il collettore e sotto l'influenza del campo elettrico che si instaura, viene rapidamente allungato e assottigliato. Durante questo tragitto avviene l'evaporazione del solvente con la conseguente solidificazione e deposizione di nanofibre solide sul collettore [65]. L'elettrofilatura fornisce quindi un metodo efficiente per combinare materiali naturali e sintetici per ottenere scaffold ibridi simili al tessuto nativo con architettura e proprietà biomeccaniche migliorate. Adesione cellulare, proliferazione e modifiche morfologiche sono degli esempi di effetti biologici che le nanofibre esercitano sugli scaffold. L'adesione cellulare è direttamente correlata dall'adsorbimento delle proteine sulla superficie dello scaffold.

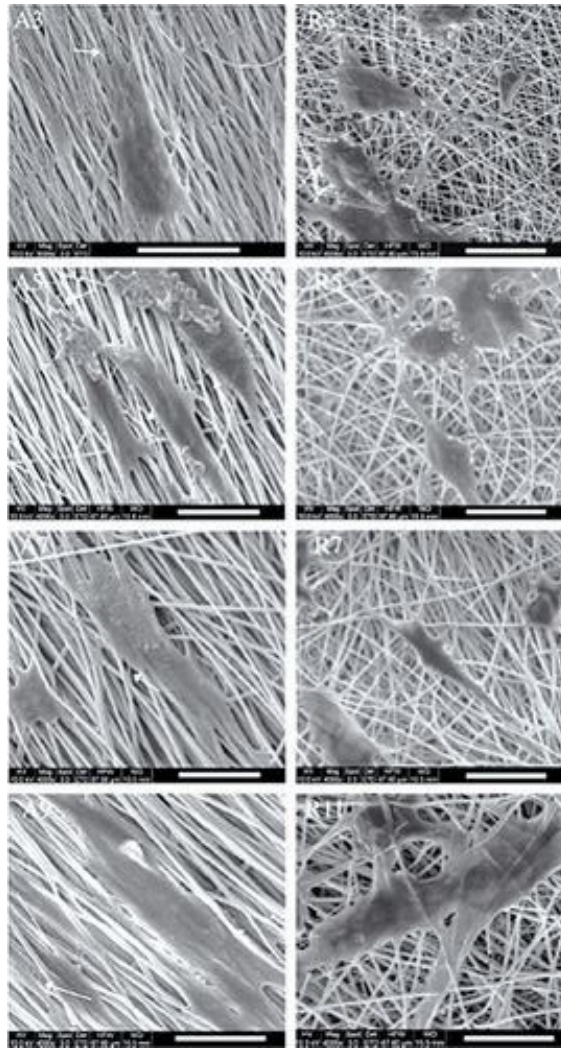


Figura 20: immagini SEM di cellule seminate su nanofibre allineate (A) e casuali (B). I numeri indicano il diametro delle nanofibre, ad esempio A3 indica nanofibre allineate con diametro di circa 300nm^[16].

È stato dimostrato che diverse proteine sieriche come albumina, fibronectina e fibrinogeno presentano un adsorbimento molte volte maggiore su scaffold nanofibrosi rispetto a scaffold a pareti solide, determinando in questo modo un aumento dell'adesività cellulare. È stato inoltre dimostrato che la proliferazione e la modulazione della morfologia cellulare sono rispettivamente correlate alla miscelazione di polimeri naturali e sintetici per la produzione di scaffold ibridi e alla capacità delle cellule di interagire e integrarsi in maniera ottimale con le nanofibre crescendo nella loro direzione di orientamento, formando una rete tridimensionale della struttura nanofibrosa^[66], come è possibile osservare nella **figura 20**.

Per migliorare la citocompatibilità, le proprietà meccaniche e le funzioni biologiche degli scaffold decellularizzati senza indurre reazioni infiammatorie, la tecnica della modificazione della superficie potrebbe essere eseguita come ulteriore trattamento pre-impianto utilizzando diversi biomateriali e metodi. Uno di questi metodi consiste nell'immersione di tendini decellularizzati in una soluzione di acido ialuronico derivatizzato con carbodiimmide e gelatina al fine di diminuire la resistenza allo scivolamento del tendine e aumentare la levigatezza della sua superficie [67]. Un secondo metodo consiste nella reticolazione UV mediata dalla riboflavina, la quale può riparare i danni causati dal processo di decellularizzazione e aumentare la levigatezza e la resistenza meccanica della dECM trovando potenzialmente utilizzo come rivestimento superficiale nelle protesi vascolari [68]. Infine il rivestimento della superficie degli scaffold utilizzando eparina potrebbe ridurre la trombogenicità e rendere la loro superficie adatta per essere utilizzata come innesti vascolari [69].

Ricellularizzazione

La ricellularizzazione viene definita come il processo di ripopolamento di scaffold ECM acellulari con tipi cellulari specifici. Ogni impalcatura infatti, richiede specifiche linee cellulari per essere funzionale e trapiantabile in base alla funzione dell'organo/tessuto in esame [70]. Ad oggi sono stati studiati diversi tipi di cellule tra cui linee cellulari, cellule primarie, cellule staminali embrionali, cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) e cellule staminali mesenchimali (MSC). Le cellule di linea sono ottenute da un paziente o da un individuo sano e vengono rese immortali per poter proliferare indefinitamente. Tuttavia presentano degli ostacoli che ne limitano l'utilizzo per il ripopolamento come una limitata capacità differenziativa e un'alta probabilità di causare una risposta immunitaria dopo il trapianto. Le cellule primarie invece vengono isolate direttamente da un tessuto vivente senza alcuna modifica. Il vantaggio principale dell'utilizzo di queste cellule è che possono essere isolate, coltivate *ex vivo* e trapiantate nuovamente nello stesso paziente, garantendo che non ci sia una alcuna risposta immunitaria. Come le linee cellulari, anche le cellule primarie presentano delle limitazioni; in questo caso sono rappresentate dal loro limitato potenziale di proliferazione e differenziazione; nonostante ciò sono state utilizzate con successo per la ricellularizzazione e il trapianto di scaffold renali e polmonari. Le cellule staminali embrionali (ESC) sono cellule staminali pluripotenti in grado di originare tutti e tre gli strati germinali (endoderma, mesoderma, ectoderma) e quindi di generare la maggior parte delle cellule e dei tessuti che si trovano nel corpo. Questa loro capacità differenziativa è però spesso associata alla formazione di teratomi, motivo per cui le ESC non rappresentano una fonte cellulare ideale per la ricellularizzazione. Le cellule staminali

pluripotenti indotte (iPSC) sono un tipo di cellula staminale creata artificialmente attraverso la riprogrammazione di una cellula somatica adulta in grado di correggere i difetti genetici in pazienti portatori di mutazioni. Tuttavia anche in questo caso le iPSC potrebbero innescare una risposta immunitaria o portare alla formazione di teratomi^[71]. Infine le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono cellule stromali multipotenti che possiedono capacità di autorinnovamento e differenziazione. Vengono facilmente ottenute da diverse fonti tessutali come midollo osseo, tessuto adiposo, placenta e cordone ombelicale^[70]. Grazie alle loro caratteristiche sono uno dei tipi cellulari più ampiamente studiati nella ricellularizzazione sulle quali vale la pena soffermarsi ed approfondire.

Il legame delle MSC allo scaffold risulta dall'interazione di specifiche molecole di adesione cellulare chiamate integrine con altre proteine della ECM. Le MSC possono aderire a regioni specifiche negli scaffold decellularizzati, specialmente in quelli ricchi di collagene I e IV, laminina e fibronectina. Queste interazioni possono regolare il comportamento delle MSC e consentirgli di acquisire le proprietà delle cellule native dello scaffold adattandosi in termini di morfologia cellulare, differenziazione, proliferazione e migrazione verso le diverse composizioni della ECM. Le MSC possiedono inoltre un effetto immunomodulatore tramite il quale possono alterare la risposta immunitaria dell'ospite consentendo un efficace rimodellamento dei tessuti, ritardando qualsiasi biodegradazione e prolungando la sopravvivenza del tessuto/organo trapiantato. Infine, le MSC svolgono un ruolo di rilevante importanza nel supportare il rimodellamento dei tessuti e nel migliorare la neovascolarizzazione negli scaffold decellularizzati migliorando la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule endoteliali attraverso la secrezione di fattori di crescita, che assicurano ai vasi sanguigni un'adeguata copertura endoteliale per prevenire la trombosi e migliorano la proliferazione e l'infiltrazione delle cellule ospiti circostanti all'interno degli scaffold stimolando l'angiogenesi nell'area impiantata^[70]. Per questi motivi le cellule staminali mesenchimali potrebbero risultare fondamentali nell'utilizzo di scaffold dECM per mediare la rigenerazione di organi e/o tessuti. Per ricellularizzare uno scaffold acellulare con questo tipo di cellule esistono tre strategie utilizzabili, in base allo stadio di differenziazione delle MSC. La prima strategia consiste inizialmente nel seminare le MSC in uno stato indifferenziato ed eseguire una coltura *in vitro* per consentire l'adesione e la proliferazione cellulare e successivamente trapiantarle per un'ulteriore differenziazione e maturazione *in vivo*. L'obiettivo di questa strategia è quello di ridurre il tempo necessario affinché le cellule seminate raggiungano la piena maturazione e funzione dopo l'impianto *in vivo*. Tuttavia questo metodo di coltura potrebbe sottoporre le cellule impiantate a ipossia e far

perdere loro alcune proprietà positive come quelle antinfiammatorie e immunomodulatorie. La seconda strategia consiste nell'iniettare MSC indifferenziate in scaffold decellularizzati immediatamente prima del trapianto. La semina cellulare in situ ha il vantaggio di migliorare la differenziazione e la distribuzione cellulare e di proteggere le cellule dagli effetti negativi associati alla fase di coltura *in vitro*. La terza strategia prevede invece la semina di scaffold decellularizzati con MSC già differenziate, seguita dalla coltura di organi *in vitro* prima del trapianto. Questa strategia permette di ottenere scaffold complessi il cui ripopolamento è ancora ad oggi impegnativo soprattutto negli organi parenchimatosi complessi come il fegato e i reni^[70].

Sebbene le MSC siano il tipo di cellule più utilizzato per il ripopolamento degli scaffold decellularizzati, il loro utilizzo comporta talvolta delle limitazioni legate alla sicurezza. Infatti, le cellule staminali mesenchimali indifferenziate potrebbero essere influenzate dai tessuti/cellule circostanti del donatore le quali potrebbero alterare il processo di corretta differenziazione delle MSC e portare alla formazione di diversi tipi di cellule indesiderate, tra cui cellule tumorali aumentando anche la tumorigenicità di eventuali cellule tumorali vicine^[70]. Pertanto, la terapia con MSC non è raccomandata per quei pazienti che hanno o tendono ad avere tumori, poiché è difficile controllare completamente il destino delle cellule dopo il trapianto. In conclusione la ricellularizzazione di scaffold acellulari utilizzando MSC ha mostrato risultati promettenti ma deve ancora essere studiata a fondo ed eseguita in fase preclinica per ottimizzare tutti i fattori e superare le diverse potenziali limitazioni.

APPLICAZIONI CLINICHE DI ORGANI INTERI

Al giorno d'oggi il trapianto di organi umani continua ad essere l'intervento chirurgico di elezione per molti soggetti (nel 2023 in Italia sono stati realizzati 4.462 trapianti di organi, 586 in più rispetto al 2022^[72]) nonostante la morbilità associata al rigetto cronico e l'assunzione di immunosoppressori. L'insufficienza di organi disponibili per il trapianto rappresenta un limite che la ricerca scientifica sta cercando di colmare. Infatti l'elevata domanda di organi trapiantabili, la grave carenza di organi donati e l'alto rischio di rigetto immunologico richiedono lo sviluppo di nuove tecniche per la creazione di organi trapiantabili. Tra i settori di ricerca coinvolti nello studio dell'ingegneria tissutale che mira alla creazione di organi funzionali *in vitro*, il ramo di ricerca che studia il processo di decellularizzazione come possibile soluzione per generare organi destinati al trapianto, sembra essere molto promettente. Diversi studi hanno dimostrato che la strategia di produzione basata sull'utilizzo di matrice decellularizzata e successivamente ricellularizzata ha portato all'ottenimento di costrutti che corrispondono agli organi umani in termini di struttura e dimensione. Tuttavia gli organi interi attualmente prodotti presentano degli ostacoli da superare che ne limitano l'uso clinico, come la conservazione della struttura funzionale dell'ECM, la formazione di una rete vascolare funzionale e la realizzazione dell'integrazione funzionale a lungo termine ^[73]. In questo capitolo verranno esaminati alcuni organi decellularizzati come cuore, polmone e reni analizzandone dettagliatamente uno in particolare: il fegato.

L'insufficienza cardiaca continua a rappresentare un crescente problema di sanità pubblica in tutto il mondo che può avere un impatto irreversibile sui pazienti. Ad oggi, i cuori interi decellularizzati, si sono rivelati materiali promettenti per questa condizione in quanto la struttura, l'albero vascolare e le funzionalità specifiche del cuore vengono mantenute dopo la decellularizzazione^[74]. Le impalcature cardiache intatte decellularizzate mediante perfusione preservano la geometria ventricolare e la competenza valvolare. Il mantenimento delle reti vascolari del cuore d'origine può essere fondamentale per garantire un adeguato apporto sanguigno di ossigeno e sostanze nutritive. Inoltre, le proprietà preservate assicurano che gli scaffold resistano alle forze durante la continua contrazione/rilassamento del cuore, con conseguente stabilizzazione della regione interessata^[75].

Come l'insufficienza cardiaca anche le malattie respiratorie costituiscono un serio problema sanitario rappresentando la terza causa di morte a livello mondiale. Attualmente i polmoni interi decellularizzati hanno un grande potenziale nel trattamento di queste patologie, come la

broncopneumopatia cronica ostruttiva, grazie alla loro capacità di mantenere intatta l'architettura e la struttura alveolare del materiale di partenza offrendo un'elevata area superficiale per lo scambio di gas [76].

Parallelamente alle malattie polmonari e cardiache anche le patologie renali come la malattia renale cronica e la malattia renale allo stadio terminale costituiscono un grave problema sanitario. I reni interi decellularizzati rappresentano una possibile terapia per i pazienti affetti da tali patologie in quanto sono in grado di preservare sia la composizione che la struttura renale di partenza, nonché le funzioni caratteristiche del rene come filtrazione, secrezione e riassorbimento. In particolare è di fondamentale importanza preservare strutture microvascolari come glomeruli e capillari peritubulari poiché cruciali per la pervietà vascolare [77].

Scaffold epatici dECM: un'analisi dettagliata

Il fegato è il più grande organo interno del corpo umano. Oltre a funzioni essenziali come l'emocateresi, la sintesi proteica, la disintossicazione del sangue e la biotrasformazione dei farmaci, la produzione della bile, possiede un'importante capacità rigenerativa. Una delicata interazione tra epatociti e la matrice extracellulare circostante mantiene queste funzioni metaboliche in normali condizioni omeostatiche. Tuttavia, danni epatici estrinseci come infezioni virali, farmaci tossici, abuso di alcol a lungo termine e alcuni disturbi metabolici e genetici possono alterare l'omeostasi epatica. Se il danno è persistente potrebbe arrivare a superare la capacità del fegato di rigenerarsi, portando a una progressiva degenerazione epatica. La conseguente perdita di funzionalità, chiamata malattia epatica allo stadio terminale (ESLD), provoca due milioni di morti ogni anno in tutto il mondo [78]. Attualmente il trapianto di fegato è l'unica terapia curativa disponibile per i pazienti affetti da insufficienza epatica cronica o acuta. Tuttavia, l'enorme divario tra organi trapiantabili disponibili e il numero di pazienti in attesa di trapianto rende necessario lo sviluppo di validi sostituti del fegato. Per sopperire a questa mancanza l'ingegneria tissutale, tramite la decellularizzazione, è giunta alla creazione di scaffold epatici dECM clinicamente rilevanti, completamente funzionali ed impiantabili. Nonostante costituisca meno del 3% del volume totale del tessuto epatico, la matrice extracellulare epatica è formata da varie componenti, tra cui collagene, elastina, fibronectina e laminina. la decellularizzazione del fegato utilizza un approccio top-down per produrre un'impalcatura acellulare basata sulla ECM epatica di partenza rimuovendo il contenuto cellulare nativo mediante la perfusione

di reagenti decellularizzanti chimici e/o enzimatici attraverso l'albero vascolare, preservando la struttura originale della ECM^[78].

Sebbene non esista ancora un metodo standardizzato per la decellularizzazione del fegato, viene utilizzata principalmente la combinazione di tripsina con detergenti come Triton X-100 o SDS. L'assenza di materiale nucleare visibile nelle sezioni di tessuto decellularizzato e la quasi assenza di DNA a doppio filamento sono segni generalmente accettati di una decellularizzazione riuscita. La quantificazione dei componenti primari della ECM epatica, come collagene, elastina, glicosaminoglicani (GAG) e fattori di crescita, è stata spesso utilizzata per valutare l'entità della conservazione della ECM dopo la decellularizzazione. La fase successiva per la creazione di un innesto epatico trapiantabile e funzionale consiste nel ripopolamento dell'impalcatura decellularizzata, effettuabile utilizzando diverse fonti cellulari tra cui cellule staminali epatiche adulte, cellule staminali pluripotenti indotte umane (iPSC) e cellule staminali mesenchimali (MSC). Sebbene non siano state ampiamente studiate per il ripopolamento del fegato, le cellule staminali epatiche hanno il potenziale per essere una fonte cellulare interessante grazie alla loro elevata capacità proliferativa e alla differenziazione bipotenziale verso epatociti e cellule del dotto biliare. Pertanto questa linea cellulare potrebbe essere utilizzata per fornire una fonte cellulare autologa per il ripopolamento del compartimento epatocitario e delle cellule biliari degli scaffold epatici acellulari. Per quanto riguarda le iPSC, esse possono essere ottenute da qualsiasi cellula nucleata attraverso la riprogrammazione cellulare e in seguito differenziate in cellule simili agli epatociti (HLC). Il loro principale vantaggio è rappresentato da un'elevata capacità di autorinnovamento, il che permette la creazione di grandi dosi cellulari sufficienti per la ricellularizzazione di un innesto epatico acellulare di dimensioni umane. Le MSC infine, sono ottenute da varie fonti come il midollo osseo e il tessuto adiposo e possono supportare la funzione e la rigenerazione parenchimale del fegato tramite la prevenzione dell'apoptosi, la stimolazione della proliferazione e dell'angiogenesi degli epatociti e l'attivazione delle cellule staminali residenti^[78].

Oltre a un efficace ripopolamento parenchimale, un ulteriore criterio altrettanto importante per una corretta funzionalità epatica è la rigenerazione del sistema vascolare in modo tale che il fegato possa essere collegato al sistema vascolare endogeno. Per raggiungere questo obiettivo è necessaria l'endotelizzazione dell'intero sistema vascolare ottenibile tramite la perfusione di cellule endoteliali attraverso il tratto venoso e/o arterioso degli scaffold decellularizzati. La completa endotelizzazione dell'albero vascolare consente inoltre di prevenire la coagulazione del sangue impedendo il contatto tra il sangue e i componenti della ECM sottostanti e la successiva manifestazione di trombosi dopo il

trapianto. Per ottimizzare l'attaccamento delle cellule endoteliali alla ECM vascolare è stato sviluppato un metodo che consiste nella eparinizzazione del lume vascolare. Il rivestimento eparinico del lume vascolare può essere ottenuto mediante un processo di immobilizzazione elettrostatica dell'eparina strato per strato o alternativamente attraverso la coniugazione covalente dell'eparina al lume vascolare e ha come obiettivo quello di mascherare la proprietà protrombotiche del collagene. È stato dimostrato che gli scaffold epatici acellulari eparinizzati mostrano un'ostruzione circolatoria minima, mentre sono stati osservati coaguli di sangue in tutti gli scaffold non modificati^[78]. Quindi, la combinazione di endotelizzazione ed eparinizzazione si è dimostrata essere una strada promettente da seguire per migliorare la pervietà vascolare degli scaffold epatici dECM per un loro futuro innesto *in vivo*. Esistono ancora numerosi ostacoli tra gli attuali progressi nell'ingegneria dell'intero organo e le potenziali applicazioni cliniche. I problemi principali consistono nel determinare quale fonte di cellule utilizzare e nel garantire che il rivestimento endoteliale dei vasi sanguigni grandi e piccoli sia completamente ripopolato con cellule endoteliali e non induca ostruzione del flusso sanguigno. Dal punto di vista clinico è inoltre importante poter prevedere efficacemente il fallimento precoce del trapianto. Questa previsione può essere effettuata sfruttando sistemi di perfusione sanguigna *ex vivo*, i quali permettono di testare efficacemente vari parametri di ricellularizzazione prima dell'innesto dell'organo in vivo che influiscono sulla pervietà vascolare, come il tipo di cellule, il percorso di semina e la durata della perfusione^[78]. In conclusione possiamo affermare che gli scaffold epatici dECM hanno il potenziale per ricostruire accuratamente il tessuto epatico, consentendo autentiche interazioni cellula-cellula e cellula-matrice importanti per la differenziazione cellulare e il mantenimento delle funzioni specifiche dell'organo. Questi scaffold epatici posseggono inoltre il potenziale per diventare il miglior sistema di coltura di cellule epatiche per la farmacologia, la tossicologia e lo sviluppo di farmaci imitando da vicino la struttura tridimensionale naturale del tessuto epatico. In questo senso potrebbero rappresentare uno strumento promettente per lo studio del normale sviluppo di tessuti e/o organi e delle malattie del fegato come l'insufficienza epatica e il danno epatico acuto o cronico^[79].

CONCLUSIONI

Il processo di decellularizzazione è una tecnologia promettente che può fornire soluzioni innovative per la rigenerazione di tessuti e organi. La rimozione di componenti cellulari dai tessuti determina la formazione di scaffold/substrati/strutture di matrice extracellulare che preservano la struttura tridimensionale, la composizione biochimica e le proprietà meccaniche del tessuto originale. Queste matrici decellularizzate possono essere utilizzate per ricostruire tessuti e organi funzionali quando ripopolate con cellule appropriate.

Durante la stesura di questa tesi sono state esaminate varie tecniche di decellularizzazione tra cui metodi chimici, fisici ed enzimatici, descritti dal punto di vista procedurale con evidenziazione per ciascuno di essi di vantaggi e svantaggi. La scelta del metodo più appropriato sembra quindi dipendere dal tipo di tessuto da trattare e dall'applicazione finale desiderata. I trattamenti chimici, nonostante la loro efficacia nell'eliminare le cellule, possono compromettere l'integrità della ECM. I trattamenti fisici ed enzimatici, invece, preservano meglio la struttura della ECM, ma possono richiedere un tempo di trattamento più lungo. Come dimostrato attraverso la sperimentazione, la combinazione di vari metodi e trattamenti fisici mirati con sostanze chimiche meno aggressive può migliorare la rimozione delle cellule. Inoltre, l'importanza di una caratterizzazione approfondita della ECM dopo la decellularizzazione è stata evidenziata come fattore critico nella previsione del comportamento dello scaffold *in vivo*.

La decellularizzazione ha diverse applicazioni, comprese applicazioni nella medicina rigenerativa e nella modellazione dei tessuti. Studi clinici e sperimentali hanno dimostrato che i tessuti decellularizzati possono essere ripopolati con cellule autologhe o allogeniche, portando ad una corretta rigenerazione dei tessuti. Nonostante i numerosi progressi però, il processo di decellularizzazione presenta ancora diversi limiti e sfide che devono essere affrontati e superati per garantirne il pieno potenziale. Uno dei principali limiti della decellularizzazione è caratterizzato dall'incompleta conservazione della matrice extracellulare, che può compromettere la funzione e l'integrità del tessuto rigenerato. Ciò potrebbe essere dovuto alla composizione della matrice originale e ai diversi protocolli di decellularizzazione utilizzati, che potrebbero non essere ottimizzati per mantenere la struttura tridimensionale originale. Un'altra sfida importante è legata al rischio di immunogenicità residua dopo la rimozione delle cellule. Anche dopo la rimozione delle cellule, residui di antigeni cellulari e molecole immunogeniche possono rimanere nella matrice, innescando

una risposta immunitaria quando il tessuto rigenerato viene impiantato *in vivo*. Ciò può portare a reazioni infiammatorie e rigetto di tessuti/organi, mettendo a repentaglio il successo della procedura di rigenerazione.

La decellularizzazione può influenzare negativamente anche le proprietà biomeccaniche dello scaffold rigenerato. La rimozione delle cellule e dei loro componenti può infatti indebolire la matrice extracellulare, compromettendone la capacità di resistere a carichi meccanici e mantenere la forma e la stabilità del tessuto/organo originale. Ciò è particolarmente importante nelle applicazioni che richiedono la riproduzione di tessuti sottoposti a elevato stress biomeccanico, come il muscolo cardiaco o il tessuto osseo. Le sfide tecniche associate alla decellularizzazione includono anche la necessità di sviluppare protocolli di decellularizzazione standardizzati più efficienti, accettabili per ogni tessuto specifico, garantendo la conservazione della matrice extracellulare e la completa eliminazione delle cellule.

Un'ulteriore sfida importante è rappresentata dalla ricellularizzazione degli scaffold decellularizzati. Sebbene la decellularizzazione crei uno scaffold biocompatibile, la ricellularizzazione con cellule appropriate è essenziale per ripristinare la corretta funzionalità del tessuto. Tuttavia, il processo di ricellularizzazione presenta anch'esso delle sfide da superare, come la selezione delle cellule più adatte per il tessuto bersaglio, il controllo della distribuzione cellulare nello scaffold e la promozione dell'adesione, della proliferazione e della differenziazione cellulare all'interno dello scaffold.

La vascolarizzazione infine, rappresenta uno dei principali ostacoli della decellularizzazione. La rigenerazione tessutale richiede un adeguato apporto di nutrienti e ossigeno, che spesso dipende da una vascolarizzazione funzionale. La creazione di una rete vascolare artificiale all'interno del tessuto decellularizzato rimane un'ardua sfida da superare, poiché la rete vascolare originale è intricata e ramificata, con vasi di varie dimensioni che devono essere ricostruiti in modo preciso per garantire un corretto flusso sanguigno. Le tecniche attuali per favorire la rivascolarizzazione, come la semina di cellule endoteliali o l'uso di fattori di crescita angiogenici, hanno mostrato risultati promettenti in laboratorio, ma spesso mancano di successi clinici. Le interazioni tra le cellule seminate e la matrice extracellulare non corrispondono esattamente alle condizioni naturali, e le condizioni *in vitro* non replicano fedelmente il complesso ambiente del corpo umano. Inoltre, il costo e la complessità delle tecniche necessarie per la rivascolarizzazione di tessuti decellularizzati possono limitare la loro diffusione. Le procedure sono spesso laboriose e richiedono attrezzature e competenze specialistiche,

rendendo difficile la loro applicazione su larga scala. Infine, la standardizzazione di queste tecniche è ancora un obiettivo lontano a causa della variabilità dei risultati ottenuti con differenti tipi di tessuti e organi.

Nonostante questi limiti, i vantaggi della decellularizzazione nel campo della medicina rigenerativa e dei trapianti restano significativi, rendendola una tecnologia promettente per il futuro.

Sebbene la decellularizzazione abbia un potenziale terapeutico innegabile, è fondamentale considerare le implicazioni etiche del suo utilizzo. Uno dei principali interrogativi etici riguarda l'origine dei tessuti decellularizzati. Se da un lato la disponibilità di organi da donatori umani ha il potenziale per salvare vite e migliorare la qualità della vita, dall'altro il processo di ottenimento e utilizzo di tessuti/organi da fonti non umane solleva preoccupazioni circa la parità di accesso agli organi. Inoltre, la questione della provenienza dei tessuti fa emergere anche un dibattito più ampio sulle considerazioni etiche che circondano gli animali e le loro pratiche di allevamento. Un altro punto importante da considerare è la sicurezza e l'efficacia dei costrutti decellularizzati. Sebbene sia stato dimostrato che le tecniche di decellularizzazione rimuovano efficacemente le cellule dai tessuti, esiste il rischio che residui cellulari, proteine o corpi estranei possano innescare una risposta immunitaria o causare effetti collaterali indesiderati nei pazienti. Pertanto, è fondamentale condurre studi preclinici e clinici completi per verificare la sicurezza e l'efficacia di questi prodotti prima della loro commercializzazione.

Allo stesso tempo, è essenziale considerare l'impatto ambientale della produzione di scaffold decellularizzati. Le risorse necessarie per l'isolamento dei tessuti/organi, il trattamento con agenti decellularizzanti e la manipolazione dei materiali possono avere un impatto ecologico significativo, soprattutto se non gestite in modo sostenibile. Gli sviluppi futuri nell'ingegneria tessutale dovrebbero quindi mirare a ridurre l'impatto ambientale di queste tecnologie ed a promuovere pratiche più ecocompatibili.

Infine, non può essere trascurata la questione dell'equità nell'accesso alle terapie di decellularizzazione. Poiché tali trattamenti possono essere costosi e richiedono risorse sanitarie complesse, rischiano di rivelarsi utili solo i pazienti più abbienti, creando disparità sanitarie e aumentando la disuguaglianza sociale. È pertanto necessario considerare attentamente le implicazioni socioeconomiche delle terapie basate sulla decellularizzazione e stabilire politiche che garantiscano parità di accesso a tali terapie per tutti i pazienti, indipendentemente dallo status economico.

In conclusione, sebbene la decellularizzazione rappresenti un'enorme promessa nel campo dell'ingegneria tissutale, è importante affrontare in modo responsabile le questioni etiche coinvolte. Solo attraverso un dialogo aperto e collaborativo tra ricercatori, medici e la società nel suo insieme possiamo garantire che la decellularizzazione e l'ingegneria dei tessuti siano utilizzate in modo etico e responsabile per migliorare la salute e il benessere umano.

BIBLIOGRAFIA

- [1] R. Langer e JP Vacanti. “Tissue Engineering”, *Science*, vol. 260, n. 5110, 1993, pp. 920-926.
- [2] F. Akter. “Principles of tissue engineering”, *Tissue engineering made easy*, 2016, pp. 3-16.
- [3] P. D. Benya e J. D. Shaffer. “Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels”, *Cells*, vol. 30, n. 1, 1982, pp. 215-224.
- [4] Eltom, A. E. Farid et al. “Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review”, *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019, pp. 2-3.
- [5] S. Yi, L. Xu e X. Gu. “Scaffolds for peripheral nerve repair and reconstruction”, *Experimental neurology*, n. 319, 2019, pp. 2-5.
- [6] Eltom, Abdalla, Zhong, Gaoyan, Muhammad, Ameen. “Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review”, *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019, p. 5.
- [7] J. Rouwkema, N. C. Rivron e C. A. van Blitterswijk. “Vascularization in tissue engineering”, *Trends in biotechnology*, vol. 26, n. 8, 2008, pp. 434-441.
- [8] García-Gareta E, Pérez MÁ, García-Aznar JM. “Decellularization of tumours: A new frontier in tissue engineering”, *Journal of Tissue Engineering*, Vol. 13, 2022, pp. 1-16.
- [9] Aleksandra A. Golebiowska, Jonathon T. Intravaia, Vinayak M. Sathe, Sangamesh G. Kumbar, Syam P. Nukavarapu. “Decellularized extracellular matrix biomaterials for regenerative therapies: Advances, challenges and clinical prospects”, *Bioactive Materials*, Vol. 32, 2024, p. 99.
- [10] Moffat D, Ye K, Jin S. “Decellularization for the retention of tissue niches.”, *Journal of Tissue Engineering*, 2022, pp. 3-4.
- [11] Neishabouri Afarin, Soltani Khaboushan Alireza, Daghigh Faezeh, Kajbafzadeh Abdol-Mohammad, Majidi Zolbin Masoumeh. “Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Evaluation, Modification, and Application Methods”, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Vol. 10, 2022, pp. 3-4.
- [12] Reyna WE, Pichika R, Ludvig D, Perreault EJ. “Efficiency of skeletal muscle decellularization methods and their effects on the extracellular matrix.”, *Journal of Biomechanics*, Vol. 110, 2020, pp. 1-7.
- [13] Neishabouri Afarin, Soltani Khaboushan Alireza, Daghigh Faezeh, Kajbafzadeh Abdol-Mohammad, Majidi Zolbin Masoumeh. “Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Evaluation, Modification, and Application Methods”, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Vol. 10, 2022, p. 4.

- [14] Kanda H, Ando D, Hoshino R, Yamamoto T, Wahyudiono, Suzuki S, Shinohara S, Goto M. “Surfactant-Free Decellularization of Porcine Aortic Tissue by Subcritical Dimethyl Ether.”, *ACS Omega*, 2022, pp. 34449–34453.
- [15] Wang Xinyu, Chan Vincent, Corridon Peter R. “Decellularized blood vessel development: Current state-of-the-art and future directions”, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Vol. 10, 2022, pp. 1-19.
- [16] Wong ML, Wong JL, Horn RM, Sannajust KC, Rice DA, Griffiths LG. “Effect of Urea and Thiourea on Generation of Xenogeneic Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering.”, *Tissue Engineering Part C: Methods*, Vol. 22, 2016, pp. 700-707.
- [17] Wong ML, Wong JL, Athanasiou KA, Griffiths LG. “Stepwise solubilization-based antigen removal for xenogeneic scaffold generation in tissue engineering.”, *Acta Biomaterialia*, Vol. 9, 2013, pp. 6492-6501.
- [18] Moffat D, Ye K, Jin S. “Decellularization for the retention of tissue niches.”, *Journal of Tissue Engineering*, 2022, p. 9.
- [19] Cornelison RC, Wellman SM, Park JH, Porvasnik SL, Song YH, Wachs RA, Schmidt CE. “Development of an apoptosis-assisted decellularization method for maximal preservation of nerve tissue structure.”, *Acta Biomaterialia*, Vol. 77, 2018, Pages 116-126.
- [20] Jiang D, Gao F, Zhang Y, Wong DS, Li Q, Tse HF, Xu G, Yu Z, Lian Q. “Mitochondrial transfer of mesenchymal stem cells effectively protects corneal epithelial cells from mitochondrial damage.”, *Cell Death and Disease*, 2016, pp. 1-10.
- [21] Hennessy RS, Jana S, Tefft BJ, Helder MR, Young MD, Hennessy RR, Stoyles NJ, Lerman A. “Supercritical carbon dioxide-based sterilization of decellularized heart valves.”, *jaac: basic to translational science*, vol. 2, 2017, pp. 71-84.
- [22] Amano S, Shimomura N, Yokoo S, Araki-Sasaki K, Yamagami S. “Decellularizing corneal stroma using N₂ gas.”, *Molecular Vision*, 2008, pp. 878-882.
- [23] Dal Sasso E, Menabò R, Agrillo D, Arrigoni G, Franchin C, Giraudo C, Filippi A, Borile G, Ascione G, Zanella F, Fabozzo A, Motta R, Romanato F, Di Lisa F, Iop L, Gerosa G. RegenHeart. “A Time-Effective, Low-Concentration, Detergent-Based Method Aiming for Conservative Decellularization of the Whole Heart Organ.”, *ACS Biomaterial Science and Engineering*, 2020, pp. 5493-5506.
- [24] Asadi M, Khalili M, Lotfi H, Vaghefi Moghaddam S, Zarghami N, André H, Alizadeh E. “Liver bioengineering: Recent trends/advances in decellularization and cell sheet technologies towards translation into the clinic.”, *Life Sciences*, Vol. 276, 2021, pp. 1-22.
- [25] Kuljanin M, Brown CFC, Raleigh MJ, Lajoie GA, Flynn LE. “Collagenase treatment enhances proteomic coverage of low-abundance proteins in decellularized matrix bioscaffolds.”, *Biomaterials*, Vol.144, 2017, pp. 130-143.

- [26] Wu Z, Zhou Y, Li N, Huang M, Duan H, Ge J, Xiang P, Wang Z. "The use of phospholipase A(2) to prepare acellular porcine corneal stroma as a tissue engineering scaffold.", *Biomaterials*. Vol. 30, 2009, pp. 3513-3522.
- [27] Daly KA, Stewart-Akers AM, Hara H, Ezzelarab M, Long C, Cordero K, Johnson SA, Ayares D, Cooper DK, Badylak SF. "Effect of the alphaGal epitope on the response to small intestinal submucosa extracellular matrix in a nonhuman primate model.", *Tissue Engineering Part A*, 2009, pp. 3877-3888.
- [28] Bautista CA, Park HJ, Mazur CM, Aaron RK, Bilgen B. "Effects of Chondroitinase ABC-Mediated Proteoglycan Digestion on Decellularization and Recellularization of Articular Cartilage.", *Plos One*, 2016, pp. 1-15.
- [29] Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW, McMahon SB. "Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury.", *Nature*, 2002, pp. 636-640.
- [30] Funamoto S, Nam K, Kimura T, Murakoshi A, Hashimoto Y, Niwaya K, Kitamura S, Fujisato T, Kishida A. "The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels.", *Biomaterials*, Vol. 31, 2010, pp. 3590-3595.
- [31] Watanabe N, Mizuno M, Matsuda J, Nakamura N, Otabe K, Katano H, Ozeki N, Kohno Y, Kimura T, Tsuji K, Koga H, Kishida A, Sekiya I. "Comparison of High-Hydrostatic-Pressure Decellularized Versus Freeze-Thawed Porcine Menisci.", *Journal of orthopaedic research*, 2019, pp. 2466-2475.
- [32] Roth SP, Erbe I, Burk J. "Decellularization of Large Tendon Specimens: Combination of Manually Performed Freeze-Thaw Cycles and Detergent Treatment.", *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1577, 2017, pp. 227-237.
- [33] Jiang X, Lai XR, Lu JQ, Tang LZ, Zhang JR, Liu HW. "Decellularized adipose tissue: A key factor in promoting fat regeneration by recruiting and inducing mesenchymal stem cells.", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 541, 2021, pp. 63-69.
- [34] Rahman S, Griffin M, Naik A, Szarko M, Butler PEM. "Optimising the decellularization of human elastic cartilage with trypsin for future use in ear reconstruction.", *Scientific Reports*, 2018, pp. 1-11.
- [35] Lehr EJ, Rayat GR, Chiu B, Churchill T, McGann LE, Coe JY, Ross DB. "Decellularization reduces immunogenicity of sheep pulmonary artery vascular patches.", *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2010, pp. 1056-1062.
- [36] White A, Burns D, Christensen TW. "Effective terminal sterilization using supercritical carbon dioxide.", *Journal of Biotechnology*, 2006, pp. 504-515.

- [37] Casali DM, Handleton RM, Shazly T, et al. "A novel CO₂-based supercritical decellularization method to maintain scaffold hydration and mechanical properties.", *J Supercrit Fluids*, 2018, pp. 72–81.
- [38] Forouzes F, Rabbani M, Bonakdar S. "A Comparison between Ultrasonic Bath and Direct Sonicator on Osteochondral Tissue Decellularization.", *Journal of Medical Signals & Sensors*, 2019, pp. 227-233.
- [39] Lee RC, Kolodney MS. "Electrical injury mechanisms: electrical breakdown of cell membranes.", *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1987, pp. 672-679.
- [40] Phillips M, Maor E, Rubinsky B. "Nonthermal irreversible electroporation for tissue decellularization.", *Journal of Biomechanical Engineering*, Vol. 132 n°9, 2010, 8 pp.
- [41] Butler CR, Hynds RE, Crowley C, Gowers KH, Partington L, Hamilton NJ, Carvalho C, Platé M, Samuel ER, Burns AJ, Urbani L, Birchall MA, Lowdell MW, De Coppi P, Janes SM. "Vacuum-assisted decellularization: an accelerated protocol to generate tissue-engineered human tracheal scaffolds.", *Biomaterials*, Vol 124, 2017, pp. 95-105.
- [42] Zouhair, Sabra; Aguiari, Paola; Iop, Laura; Vasquez-Rivera, Andres; Filippi, Andrea; Romanato, Filippo; et al. "Preservation strategies for decellularized pericardial scaffolds for off-the-shelf availability.", *Acta Biomaterialia*, Vol. 84, 2019, pp. 208-221.
- [43] Dai Z, Ronholm J, Tian Y, Sethi B, Cao X. "Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications.", *Journal of Tissue Engineering*, Vol. 7, 2016, pp. 1-13.
- [44] Chou JW, Skornicki M and Cohen JT. "Unintended consequences of the potential phase-out of gamma irradiation", *F1000Research*, 2018, pp. 1-15.
- [45] Wendell Q. Sun, Patrick Leung. "Calorimetric study of extracellular tissue matrix degradation and instability after gamma irradiation.", *Acta Biomaterialia*, Vol. 4, 2008, pp. 817-826,
- [46] Meihan Tao, Tianrang Ao, Xiaoyan Mao, Xinzhu Yan, Rabia Javed, Weijian Hou, Yang Wang, Cong Sun, Shuang Lin, Tianhao Yu, Qiang Ao. "Sterilization and disinfection methods for decellularized matrix materials: Review, consideration and proposal.", *Bioactive Materials*, Vol. 6, 2021, pp. 2927-2945.
- [47] Philip A. Clapp, Michael J. Davies, Madeline S. French e Bruce C. Gilbert. "The Bactericidal Action of Peroxides; An E.P.R. Spin-Trapping Study.", *Free Radical Research*, 1994, pp. 147-167.
- [48] Hasmik Hayrapetyan, Louise Nederhoff, Martijntje Vollebregt, Hennie Mastwijk, Masja Nierop Groot. "Inactivation kinetics of *Geobacillus stearothermophilus* spores by a peracetic acid or hydrogen peroxide fog in comparison to the liquid form.", *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 316, 2020, pp. 1-9.

- [49] Ezra Linley, Stephen P. Denyer, Gerald McDonnell, Claire Simons, Jean-Yves Maillard. “Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action.”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 67, 2012, pp. 1589–1596.
- [50] M.A. Akuji, D.J. Chambers. “Hydrogen peroxide: more harm than good?”, *British Journal of Anaesthesia*, Vol. 118, 2017, pp. 958-959.
- [51] Thomas P. “Long-Term Survival of Bacillus Spores in Alcohol and Identification of 90% Ethanol as Relatively More Spori/Bactericidal.”, *Current Microbiology*, Vol. 64, 2012, pp. 130–139.
- [52] Soo Rin Kim, Min Suk Rhee, Byoung Chul Kim, Kyoung Heon Kim. “Modeling the inactivation of Escherichia coli O157:H7 and generic Escherichia coli by supercritical carbon dioxide.”, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 118, 2007, pp. 52-61.
- [53] Jorge Calvo, Luis Martínez-Martínez. “Antimicrobial mechanisms of action.”, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Vol. 27, 2009, pp. 44-52.
- [54] Tapias, Luis F.; Ott, Harald C. “Decellularized scaffolds as a platform for bioengineered organs.”, *Current Opinion in Organ Transplantation*, 2014, pp. 145-152.
- [55] Lauren Edgar, Afnan Altamimi, Marta García Sánchez, Riccardo Tamburrinia, Amish Asthana, Carlo Gazia & Giuseppe Orlando. “Utility of extracellular matrix powders in tissue engineering.”, *Organogenesis*, 2018, Vol. 14, pp. 172-186.
- [56] Lindsey T. Saldin, Madeline C. Cramer, Sachin S. Velankar, Lisa J. White, Stephen F. Badylak. “Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function.”, *Acta Biomaterialia*, Vol. 49, 2017, pp. 1-15.
- [57] Bin Jiang, Berke Akgun, Ryan C. Lam, Guillermo A. Ameer, Jason A. Wertheim. “A polymer–extracellular matrix composite with improved thromboresistance and recellularization properties.”, *Acta Biomaterialia*, Vol. 18, 2015, pp. 50-58.
- [58] Aleksandra A. Golebiowska, Jonathon T. Intravaia, Vinayak M. Sathe, Sangamesh G. Kumbar, Syam P. Nukavarapu. “Decellularized extracellular matrix biomaterials for regenerative therapies: Advances, challenges and clinical prospects.”, *Bioactive Materials*, Vol. 32, 2024, pp. 98-123.
- [59] P.M. Crapo, T.W. Gilbert, S.F. Badylak. “An overview of tissue and whole organ decellularization processes.”, *Biomaterials*, Vol. 32, 2011, pp. 3233–3243.
- [60] Neishabouri Afarin, Soltani Khaboushan Alireza, Daghigh Faezeh, Kajbafzadeh Abdol-Mohammad, Majidi Zolbin Masoumeh. “Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Evaluation, Modification, and Application Methods.”, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Vol. 10, 2022, p. 6.
- [61] Kamal Hany Hussein, Kyung-Mee Park, Kyung-Sun Kang, Heung-Myong Woo. “Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application.”, *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 67, 2016, pp. 766-778.

- [62] Sridharan G, Shankar AA. "Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility.", *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 2012, pp. 251-255.
- [63] Engler, AJ, Sen, S., Sweeney, HL e Discher, DE. "Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification.", *Cell*, Vol. 126, 2006, pp. 677–689.
- [64] Amirsadeghi, Armin and Jafari, Arman and Eggermont, Loek J. and Hashemi, Seyedeh-Sara and Bencherif, Sidi A. and Khorram, Mohammad. "Vascularization strategies for skin tissue engineering.", *Biomaterial Science*, Vol. 8, 2020, pp. 4073-4094.
- [65] Wikipedia contributors, "Electrospinning," Wikipedia, The Free Encyclopedia, (accessed June 19, 2024). <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Electrospinning&oldid=1216127238>
- [66] Kai, D., Jin, G., Prabhakaran, MP, e Ramakrishna, S. "Electrospun synthetic and natural nanofibers for regenerative medicine and stem cells.", *Biotechnology Journal*, Vol. 8, 2013, pp. 59–72.
- [67] Ozasa, Y., Amadio, P. C., Thoreson, A. R., An, K.-N., and Zhao, C. "The Effect of Surface Modification on Gliding Ability of Decellularized Flexor Tendon in a Canine Model In Vitro.", *The Journal of Hand Surgery*, Vol. 38, 2013, pp. 1698-1704.
- [68] Karl H. Schneider, Sabrina Rohringer, Barbara Kapeller, Christian Grasl, Herbert Kiss, Stefan Heber, Ingrid Walter, Andreas H. Teuschl, Bruno K. Podesser, Helga Bergmeister. "Riboflavin-mediated photooxidation to improve the characteristics of decellularized human arterial small diameter vascular grafts.", *Acta Biomaterialia*, Vol. 116, 2020, pp. 246-258.
- [69] Wu Q, Li Y, Wang Y, Li L, Jiang X, Tang J, Yang H, Zhang J, Bao J, Bu H. 2016. "The effect of heparinized decellularized scaffolds on angiogenic capability.", *Journal of Biomedical Material Research Part A*, Vol. 104, 2016, pp. 3021–3030.
- [70] Ahmed E, Saleh T, Xu M. "Recellularization of Native Tissue Derived Acellular Scaffolds with Mesenchymal Stem Cells.", *Cells*, Vol. 10, 2021, pp. 1-16.
- [71] Bilodeau C, Goltsis O, Rogers IM, Post M. "Limitations of recellularized biological scaffolds for human transplantation.", *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Vol. 14, 2020, pp. 521-538.
- [72] Sanità24. "Trapianti: 2023 da record, superati i 4mila interventi (+15,1%)." (2024, 24 gennaio) <https://www.sanita24.ilsole24ore.com/art/dal-governo/2024-01-24/trapianti-2023-record-superati-4mila-interventi-151percento-150325.php?uuid=AFbc1DSC>
- [73] Zheng C-X, Sui B-D, Hu C-H, Qiu X-Y, Zhao P, Jin Y. "Reconstruction of structure and function in tissue engineering of solid organs: Toward simulation of natural development based on decellularization.", *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Vol. 12, 2018, pp. 1432–1447.

- [74] Nguyen, D.T., O'Hara, M., Graneli, C. et al. "Humanizing Miniature Hearts through 4-Flow Cannulation Perfusion Decellularization and Recellularization.", *Scientific Reports*, Vol. 8, 2018, pp. 1-10.
- [75] Xuwei Zhang, Xi Chen, Hua Hong, Rubei Hu, Jiashang Liu, Changsheng Liu. "Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering.", *Bioactive Materials*, Vol. 10, 2022, pp. 15-31.
- [76] Skolasinski, S. D., & Panoskaltsis-Mortari, A. "Lung tissue bioengineering for chronic obstructive pulmonary disease: overcoming the need for lung transplantation from human donors.", *Expert Review of Respiratory Medicine*, Vol. 13, 2019, pp. 665–678.
- [77] Joao Paulo Zambon, In Kap Ko, Mehran Abolbashari, Jennifer Huling, Cara Clouse, Tae Hyoung Kim, Charesa Smith, Anthony Atala, James J. Yoo. "Comparative analysis of two porcine kidney decellularization methods for maintenance of functional vascular architectures.", *Acta Biomaterialia*, Vol. 75, 2018, pp. 226-234.
- [78] Toprakhisar, B.; Verfaillie, C.M.; Kumar, M. "Advances in Recellularization of Decellularized Liver Grafts with Different Liver (Stem) Cells: Towards Clinical Applications.", *Cells*, Vol. 12, 2023, pp. 1-24.
- [79] Baptista, P.M., Siddiqui, M.M., Lozier, G., Rodriguez, S.R., Atala, A. and Soker, S. "The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid.", *Hepatology*, Vol. 53, 2011, pp. 604-617.

BIBLIOGRAFIA DELLE FIGURE

- [1] Hussein, Kamal & Saleh, Tarek & Ahmed, Ebtehal & Kwak, Ho-Hyun & Park, Kyung-Mee & Yang, Se-Ran & Kang, Byung-Jae & Choi, Ki-Young & Kang, Kyung-Sun & Woo, Heung-Myong. “Biocompatibility and hemocompatibility of efficiently decellularized whole porcine kidney for tissue engineering: biocompatibility of decellularized kidney.”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2018, pp. 2034-2047.
- [2] Allu, I.; Sahi, A.K.; Koppadi, M.; Gundu, S.; Sionkowska, A. “Decellularization Techniques for Tissue Engineering: Towards Replicating Native Extracellular Matrix Architecture in Liver Regeneration.”, *Journal of Functional Biomaterials*, 2023, Vol. 14, pp. 1-26.
- [3] Peter M. Crapo, Thomas W. Gilbert, Stephen F. Badylak. “An overview of tissue and whole organ decellularization processes.”, *Biomaterials*, Vol. 32, 2011, pp. 3233-3243.
- [4] Godefroy, W., Faivre, L., Sansac, C. *et al.* “Development and qualification of clinical grade decellularized and cryopreserved human esophagi.”, *scientific reports*, Vol. 13, 2023, p. 10.
- [5] Meihan Tao, Tianrang Ao, Xiaoyan Mao, Xinzhu Yan, Rabia Javed, Weijian Hou, Yang Wang, Cong Sun, Shuang Lin, Tianhao Yu, Qiang Ao. “Sterilization and disinfection methods for decellularized matrix materials: Review, consideration and proposal.”, *Bioactive Materials*, Vol. 6, 2021, pp. 2927-2945.
- [6] Neishabouri Afarin, Soltani Khaboushan Alireza, Daghigh Faezeh, Kajbafzadeh Abdol-Mohammad, Majidi Zolbin Masoumeh. “Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Evaluation, Modification, and Application Methods.”, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Vol. 10, 2022, p. 6.
- [7] “Decellularization.”, *Abdominal Key*, <https://abdominalkey.com/decellularization/#Fig2>
- [8] Totonelli, Giorgia & Maghsoudlou, Panayiotis & Georgiades, Fanourios & Garriboli, Massimo & Koshy, Kiron & Turmaine, Mark & Ashworth, Michael & Sebire, Neil & Pierro, Agostino & Eaton, Simon. “Detergent enzymatic treatment for the development of a natural acellular matrix for oesophageal regeneration.”, *Pediatric surgery international*, 2012, p. 7.
- [9] Lei Chen, Zhiyong Li, Yongtai Zheng, Fei Zhou, Jingling Zhao, Qiyi Zhai, Zhaoqiang Zhang, Tianrun Liu, Yongming Chen, Shaohai Qi. “3D-printed dermis-specific extracellular matrix mitigates scar contraction via inducing early angiogenesis and macrophage M2 polarization.”, *Bioactive Materials*, Vol. 10, 2022, pp. 236-246.
- [10] Seyrek, Ahsen & Günal, Gülçin & Aydin, Halil. “Development of Antithrombogenic ECM-Based Nanocomposite Heart Valve Leaflets.”, *ACS Applied Bio Materials*, Vol. 5, 2022, pp. 3883-3895.

- [11] Corridon, Peter. “In vitro investigation of the impact of pulsatile blood flow on the vascular architecture of decellularized porcine kidneys.”, *Scientific Reports*, Vol. 11, 2021, p. 3.
- [12] Hsieh, D. J., Srinivasan, P., Yen, K. C., Yeh, Y. C., Chen, Y. J., Wang, H. C., & Tarng, Y. W. “Protocols for the Preparation and Characterization of Decellularized Tissue and Organ Scaffolds for Tissue Engineering.”, *BioTechniques*, Vol. 70, 2020, pp. 1–9.
- [13] Aleksandra A. Golebiowska, Jonathon T. Intravaia, Vinayak M. Sathe, Sangamesh G. Kumbar, Syam P. Nukavarapu. “Decellularized extracellular matrix biomaterials for regenerative therapies: Advances, challenges and clinical prospects.”, *Bioactive Materials*, Vol. 32, 2024, pp. 98-123.
- [14] Bin Jiang, Berke Akgun, Ryan C. Lam, Guillermo A. Ameer, Jason A. Wertheim. “A polymer–extracellular matrix composite with improved thromboresistance and recellularization properties.”, *Acta Biomaterialia*, Vol. 18, 2015, pp. 50-58.
- [15] Amirsadeghi, Armin and Jafari, Arman and Eggermont, Loek J. and Hashemi, Seyedeh-Sara and Bencherif, Sidi A. and Khorram, Mohammad. “Vascularization strategies for skin tissue engineering.”, *Biomaterial Science*, 2020, Vol. 8, pp. 4073-4094.
- [16] Kai, D., Jin, G., Prabhakaran, M.P. and Ramakrishna, S. (2013). “Electrospun synthetic and natural nanofibers for regenerative medicine and stem cells.”, *Biotechnology Journal*, Vol. 8, 2013, pp. 59-72.