



**Università degli Studi di Cagliari**

DOTTORATO DI RICERCA

Dottorato in Ingegneria Biomedica

**Ciclo XXVI**

TITOLO TESI

**Applicazioni Innovative dell' Ingegneria Biomedica**

Settore scientifico disciplinare di afferenza

ING-IND/34

**Presentata da: Luisa Mancuso**

**Coordinatore Dottorato Prof. Ing. Giacomo Cao**

**Tutor/Relatore Prof. Ing. Giacomo Cao**

**Esame finale anno accademico 2012 – 2013**

# INDICE

INDICE	1
LISTA DELLE ABBREVIAZIONI	6
Sommario	10
Capitolo 1 - L'Ingegneria Biomedica	13
1.1 Introduzione	13
1.2 Modelli sperimentali nell'ingegneria biomedica	15
1.2.1 Metodi matematici	16
1.2.2 Metodi biologici	18
1.3 L'Ingegneria Biomedica: soluzioni per la medicina rigenerativa	21
1.3.1 L'Ingegneria Tissutale	22
1.3.1.1 La componente cellulare	25
1.3.1.1.1 Le cellule staminali	28
1.3.1.2 Lo Scaffold	30
1.4 Decellularizzazione di organi e tessuti	31
1.4.1 La matrice extracellulare come scaffold biologico	33
1.4.2 Metodi di decellularizzazione	37
1.4.2.1 Metodi fisici	40
1.4.2.2 Metodi chimici	41
1.4.2.3 Metodi enzimatici	44
1.5 Ripopolamento di organi e tessuti	46
1.5.1 Fonti di cellule per la ricellularizzazione	47
1.5.2 Tecniche di semina cellulare	50

1.6 Stato dell'arte sulla bioingegnerizzazione degli organi interi	52
1.6.1 Fegato	52
1.6.2 Intestino	54
1.6.3 Rene	55
1.6.4 Cuore	56
1.6.5 Pancreas	58
1.6.6 Polmone	59
1.6.7 Trachea	60
1.7 Prospettive future	61
Capitolo 2 - L'ingegnerizzazione dei tessuti vascolari	63
2.1 Introduzione	63
2.1.2 Struttura e proprietà meccaniche dei vasi sanguigni	65
2.1.3 Protesi vascolari	72
2.1.3.1 Materiali	74
2.1.3.1.1 Polimeri sintetici biodegradabili	74
2.1.3.1.2 Polimeri naturali	77
2.1.3.1.3 Matrici biologiche decellularizzate	79
2.2 Materiali e metodi	81
2.2.1 Raccolta delle carotidi	81
2.2.2 Protocolli di decellularizzazione	82
2.2.3 Analisi istologica	83
2.2.3.1 Colorazione ematossilina - eosina	86
2.2.3.2 Tricromica di Masson	87
2.2.3.3 Colorazione di Verhoeff-van Gieson	88
2.2.4 Misura dello spessore della parete vasale	89

2.2.5	Immunoistochimica	89
2.2.6	Microscopia elettronica a scansione (SEM)	91
2.2.7	Caratterizzazione meccanica	91
2.2.7.1	Prove di trazione monoassiale	92
2.2.7.2	Test dinamici ad anello	93
2.2.8	Test di citocompatibilità indiretta	95
2.2.8.1	Isolamento delle cellule staminali mesenchimali umane	96
2.2.8.2	Caratterizzazione fenotipica delle hBMMSCs	97
2.2.9	Semina delle hMSCs su scaffold di Poliuretano trattato con Gelatina	98
2.3	Risultati	99
2.3.1	Analisi istologiche	99
2.3.2	Misura dello spessore della parete vasale	102
2.3.3	Analisi immunoistochimica	103
2.3.4	Analisi al SEM	105
2.3.5	Caratterizzazione meccanica	106
2.3.5.1	Prove di trazione monoassiale	106
2.3.5.2	Test dinamici ad anello	107
2.3.6	Caratterizzazione fenotipica delle hMSCs	108
2.3.7	Test di citocompatibilità indiretta	109
2.3.8	Test di biocompatibilità degli scaffold di PU	110
2.4	Discussione	112
Capitolo 3 - Utilizzo delle Cellule Staminali Mesenchimali Umane nei test di tossicità		
	orale acuta	116
3.1	Introduzione	116
3.2	Materiali e metodi	122

3.2.1. Determinazione del tempo di duplicazione delle hMCSs	122
3.2.2 Sostanze chimiche e loro preparazione	122
3.2.3 Particelle di Cuo e loro caratterizzazione	124
3.2.4 Neutral Red Uptake	124
3.2.5 Analisi statistica	126
3.3 Risultati	127
3.4 Discussione	135
Capitolo 4 - Conclusioni	142
Referenze bibliografiche	147

## LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

$\alpha$ MEM	Minimum Essential Medium
3T3	fibroblasti murini (BALB/c) 3T3
ATC	Acute Toxic Class
BSA	albumina di siero bovino
CABG	Coronary Artery Bypass Grafting
CHAPS	<i>3-[(3-colamidopropil)dimetilammonio]-1-propanosulfonato</i>
CD	Cluster of Differentiation
CTRL	campioni di controllo
DMEM	Dulbecco's Modified of Eagle's medium
DNA	acido desossiribonucleico
EC <sub>50</sub>	concentrazione che determina una risposta inibitoria intermedia fra la risposta massima e quella minima
ECM	matrice extracellulare
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternatives to Animal Testing
EDTA	acido etilendiamminotetraacetico
EGTA	acido tetracetico glicol etilene
ePTFE	politetrafluoroetilene espanso
EPCs	cellule progenitrici endoteliali
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FBS	siero fetale bovino

FDA	Food and Drug Administration
FDP	Fixed Dose Procedure
GAG	glicosamminoglicano
GHS	Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
hMSCs	cellule staminali mesenchimali umane
HRSEM	High Resolution Scanning Electron Microscopy
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
IC <sub>50</sub>	concentrazione inibente al 50%
ICCVAM	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
iPS	induced Pluripotent Stem cells
LD <sub>50</sub>	dose letale al 50%
mESCs	cellule staminali embrionali murine
hBMMSCs	cellule staminali mesenchimali midollari umane
hESCs	cellule staminali embrionali umane
MSCs	cellule staminali mesenchimali
NGS	Normal goat serum
NHK	Normal Human Keratinocytes
NICEATM	NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods

NIH	National Institute of Health
NIEHS	National Institute of Environmental Health Science
NPs	Nanoparticelle
NR	Neutral Red
NRU	Neutral Red Uptake
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
P4HB	poli (4-idrossibutirrato)
PAA	acido paracetico
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEG	polietilene glicolico
PET	polietilene tereftalato
PGA	acido poliglicolico
PHA	poliidrossialcanoato
PLA	acido polilattico
PLGA	poli(D,L-lattide-co-glicolide)
PLLA	acido poli-L-lattico
PU	poliuretano
RNA	acido ribonucleico
RC	Registry of Cytotoxicity
SB-10	Sulfobetaina 10
SB-16	Sulfobetaina 16
SD	deviazione standard

SDS	sodio dodecilsolfato
SEM	microscopio elettronico a scansione
SIS	small intestinal submucosa
TBP	Tri(n-butil)fosfato
TEM	microscopio elettronico a trasmissione
UDP	Up-and-Down Procedure
XTT	2H-Tetrazolium, 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5- [(phenylamino)carbonyl]-hydroxide
ZEBET	German National Centre for the Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments

# Sommario

---

Gli importanti progressi dell'ingegneria e della medicina a livello biomolecolare, cellulare e tissutale unitamente alle importanti variazioni nello stile di vita, all'aumento dell'età media e alla crescita delle aspettative di una migliore qualità della vita della popolazione impongono alla comunità scientifica una migliore conoscenza integrata del funzionamento del corpo umano alle scale macro, micro e nano. In questo contesto nasce una nuova disciplina, l'Ingegneria Biomedica, riconosciuta universalmente come *una disciplina emergente volta a generare una migliore comprensione dei fenomeni biologici ed a produrre tecnologie per la salute con beneficio per la società* (definizione del Massachusetts Institute of Technology, USA, 1999). L'Ingegneria Biomedica utilizza le metodologie e le tecnologie dell'Ingegneria per descrivere, comprendere e risolvere le problematiche di interesse medico-biologico, attivando una stretta collaborazione interdisciplinare tra ingegneri, biofisici, medici e biologi. L'obiettivo che essa si pone è duplice: il miglioramento delle conoscenze relative al funzionamento dei sistemi biologici e lo sviluppo di nuove metodologie e dispositivi diagnostici, terapeutici e riabilitativi.

Tra i settori tradizionalmente riconosciuti a livello internazionale come parte di questa disciplina si possono annoverare: la strumentazione biomedica, la biomeccanica, i biomateriali, l'analisi di immagini medicali, l'analisi dei segnali biomedici, l'ingegneria della riabilitazione, l'ingegneria clinica e l'informatica medica. Inoltre negli ultimi anni, in aggiunta a tali aree di tradizionale interesse nell'ambito dell'Ingegneria Biomedica, hanno avuto particolare espansione i settori dell'Ingegneria dei tessuti e quello delle nanotecnologie.

In questo lavoro di tesi verranno innanzitutto descritti i risultati ottenuti in uno dei principali settori d'interesse dell'Ingegneria Biomedica: l'Ingegneria Tissutale. Questa branca dell'Ingegneria Biomedica nasce, come dettagliatamente esposto nel Capitolo 1, dall'esigenza specifica di progettare e costruire *in vitro* tessuti biologici viventi. Nonostante i progressi della scienza in questo settore, il trapianto di organi, di tessuti e di cellule per la cura di patologie traumatiche o degenerative presenta diverse limitazioni, correlate soprattutto alle difficoltà di reperimento di donatori e alla necessità di utilizzare terapie immunosoppressive, finalizzate ad evitare il rigetto dell'organo trapiantato. L'Ingegneria Tissutale, rappresenta una promettente alternativa terapeutica al trapianto, soprattutto quando finalizzata alla crescita e utilizzo di tessuti autologhi, cioè ottenuti espandendo una piccola quantità di cellule prelevate dal paziente mediante biopsia. Questa strategia, fornendo tessuti/organi immunologicamente compatibili con il ricevente, consente di evitare terapie immunosoppressive e di sopperire alla cronica insufficienza di organi e tessuti da donatori. Fra le strategie più recenti in questo contesto, rientra la decellularizzazione di tessuti e organi complessi, come metodica per ottenere matrici biologiche acellulari da utilizzare come supporti per la realizzazione di organi idonei al trapianto. Nel Capitolo 2 verranno pertanto descritti i risultati relativi ad un lavoro in corso di pubblicazione su *Biomedical Materials*, concernente lo sviluppo di un protocollo di decellularizzazione di carotidi ovine, volto ad ottenere una matrice biologica da utilizzare per la realizzazione di protesi vascolari di piccolo calibro.

Un aspetto importante da considerare è inoltre il fatto che la nascita e lo sviluppo dell'Ingegneria Biomedica sono intimamente legati alla crescente diffusione di nuovi materiali. La necessità di materiali innovativi, dotati di proprietà specifiche, per applicazioni avanzate in tutti i settori dell'Ingegneria Biomedica, dall'Ingegneria Tissutale alle nanotecnologie, ha infatti portato negli ultimi decenni ad un vertiginoso aumento dei

materiali disponibili. Conseguentemente, per assicurare un'adeguata protezione della salute umana e dell'ambiente, è essenziale comprenderne gli eventuali effetti avversi e valutare il potenziale rischio dovuto all'esposizione a tali materiali, sia attraverso analisi tossicologiche che studi preclinici e clinici. Questo aspetto diventa particolarmente importante in uno dei più recenti settori dell'Ingegneria Biomedica, quello delle nanotecnologie, le quali trovano applicazione in numerosi settori produttivi, dalla medicina alla cosmesi, ma per le quali non esiste allo stato attuale una specifica normativa. Nel Capitolo 3 verranno descritti i risultati relativi allo sviluppo di un nuovo test di tossicità orale acuta *in vitro*, basato sull'utilizzo delle cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs), pubblicato su *Toxicology in vitro*. Nella messa a punto di tale test, sono state seguite le linee guida redatte dall'ICCVAM durante la validazione degli unici due test *in vitro* attualmente riconosciuti per la valutazione della tossicità orale acuta e la predizione della dose di partenza da utilizzare nei test di tossicità acuta *in vivo* (ICCVAM, 2006). Viene dimostrato come il test basato sulle hMSCs, abbia la stessa capacità predittiva delle due linee cellulari validate dall'ICCVAM, la linea di fibroblasti murini 3T3, e quella di cheratinociti umani NHK, pertanto, dati i promettenti risultati, viene valutata la possibilità di applicare tale test anche alla stima della citotossicità delle nanoparticelle, ottenendo i risultati descritti sempre nel Capitolo 3, e in corso di pubblicazione su *Toxicological Mechanism and Methods*.

# Capitolo 1

## L'Ingegneria Biomedica

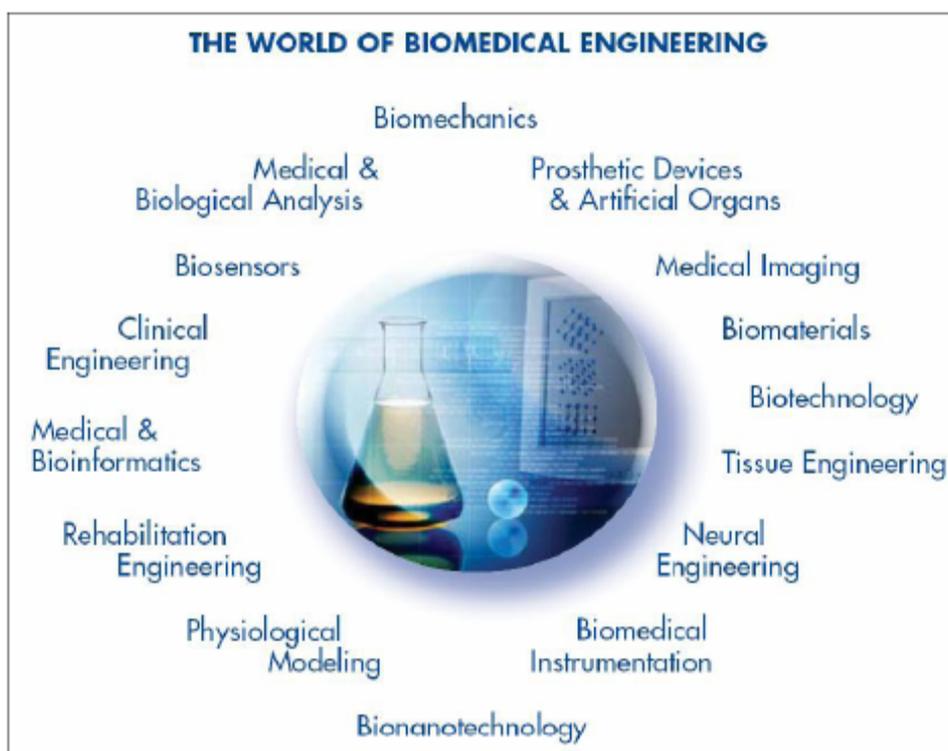
---

### 1.1 Introduzione

Nel secolo scorso, i progressi nei diversi campi delle scienze applicate hanno impresso una tale accelerazione al conseguente rinnovamento tecnologico, da permeare ogni aspetto della nostra vita di tutti i giorni, e in particolare per quanto concerne il settore della medicina. I profondi cambiamenti all'interno delle scienze mediche succedutisi a partire dagli inizi del secolo scorso, furono indotti proprio dal rapido sviluppo delle scienze applicate; un processo caratterizzato da una forte interdisciplinarietà dove si crearono le condizioni per far compiere alla ricerca in campo medico grandi passi, sviluppando le nuove tecniche per la diagnosi ed il trattamento delle malattie. Fin dalle prime fasi di questo processo ci si imbatte in figure professionali, come fisici e ingegneri, impegnate a stretto contatto con i medici e i biologi nel progettare, sviluppare e gestire tecnologie e strumenti di diagnosi nuovi, applicando al campo medico i risultati più innovativi della ricerca. Da questa sinergia è scaturita una nuova disciplina, l'Ingegneria Biomedica, riconosciuta universalmente come *una disciplina emergente volta a generare una migliore comprensione dei fenomeni biologici ed a produrre tecnologie per la salute con beneficio per la società* (definizione del Massachusetts Institute of Technology, USA, 1999).

Tradizionalmente, i principali settori di interesse dell'ingegneria biomedica riguardano: (a) le applicazioni alla diagnostica medica, con lo sviluppo della strumentazione biomedica (dai più semplici dispositivi per la misurazione di singole variabili diagnostiche fino a complesse apparecchiature di rilevazione ed elaborazione di segnali e immagini biomediche); (b) le applicazioni alla terapia medica, quali lo sviluppo di strumenti e sistemi di ausilio alla terapia, il progetto e la realizzazione di organi artificiali, lo studio della cinetica e del metabolismo di sostanze e farmaci; (c) la biomeccanica volta all'analisi del movimento umano in condizioni fisiologiche e patologiche e (d) i biomateriali, con riferimento alla ricerca di materiali compatibili con i tessuti biologici e lo sviluppo di nuovi materiali e tessuti.

Una particolare menzione merita inoltre, nell'ambito dell'Ingegneria Biomedica, la modellistica biomedica che ha rivestito nel corso degli anni un importante ruolo sia nella ricerca di base in fisiologia e patologia sia nelle applicazioni diagnostiche e terapeutiche (farmacologia, epidemiologia, neuroscienze, organi artificiali ecc.). Inoltre negli ultimi anni, in aggiunta a tali aree di tradizionale interesse dell'Ingegneria Biomedica, hanno avuto particolare espansione il settore delle applicazioni dell'informatica e della robotica in ambito sanitario e ospedaliero, e i settori della telemedicina e dell'ingegneria dei tessuti. Di particolare rilevanza per i possibili sviluppi applicativi risultano essere anche i recentissimi interessi dell'Ingegneria Biomedica nell'area della genomica e proteomica computazionale e delle micro- e nanotecnologie.



*Figura 1.1 Il mondo dell'ingegneria biomedica (Enderle / Introduction to Biomedical Engineering 2nd ed.)*

## 1.2 Modelli sperimentali nell'Ingegneria

### Biomedica

Essendo per definizione multidisciplinare, l'Ingegneria Biomedica spesso utilizza approcci integrati che si servono di modelli sperimentali molto diversi e con funzioni complementari. Per limitarci all'ambito farmacologico, l'attività biologica di una sostanza è indagabile ad almeno tre livelli: molecolare, cellulare e di organismo. Ciascuno di questi livelli si caratterizza per l'utilizzo di propri modelli in grado di dare risposte specifiche ai problemi che di volta in volta lo sperimentatore si pone. In generale è possibile raggruppare i moderni paradigmi sperimentali impiegati in biologia e medicina in due

grandi categorie: metodi e modelli matematici, basati sull'utilizzo del computer e dell'informatica, e metodi biologici, basati sull'utilizzo di molecole purificate, colture cellulari, organi isolati e perfusi, nonché organismi animali, uomo incluso. I metodi biologici sono a loro volta distinti in modelli *in vitro* e *in vivo*.

I sistemi biologici sono complessi ed è quindi importante ricordare che soltanto l'uso integrato e complementare di differenti modelli sperimentali consente di ottenere informazioni utili e globali.

### **1.2.1 Metodi matematici**

La modellistica biomedica è uno dei settori più antichi dell'ingegneria biomedica, tuttavia la diffusione dell'approccio modellistico allo studio dei sistemi biologici si è avuta solo negli ultimi decenni del secolo scorso, favorita da un lato, dallo sviluppo dell'apparecchiatura diagnostica e, dall'altro, da quello di strumenti di calcolo potenti e a basso costo. Di conseguenza è stato possibile simulare numericamente il comportamento di sistemi complessi e validarne le ipotesi e i risultati attraverso misure quantitative sempre più accurate. L'utilizzo della matematica nella biologia apre uno scenario nuovo per la comprensione di quei fenomeni biologici che si dimostrano troppo complessi da analizzare senza l'uso di rappresentazioni formali quantitative. La modellistica matematica (o computazionale) permette, infatti, una descrizione quantitativa delle osservazioni ottenute negli esperimenti di laboratorio e, grazie alla sua coerenza con il dato sperimentale, la sua capacità predittiva ed interpretativa rappresenta un valore aggiunto importante. L'obiettivo primario di questa attività è, infatti, quella di offrire risultati che abbiano un valore predittivo ed interpretativo il cui impatto si possa ripercuotere direttamente sia nella comprensione di principi biologici di base sia nei possibili suggerimenti pratici che essa

può offrire alla medicina clinica. Un secondo obiettivo, di carattere più marcatamente metodologico, è di rendere disponibile un set di strumenti matematici per descrivere e studiare le dinamiche di sistemi biologici complessi a diversi livelli di dettaglio (es. intracellulare, extracellulare, sistemico).

I modelli utilizzati in biomedicina sono prevalentemente di tipo strutturale: essi cercano cioè di riprodurre il comportamento di un determinato sistema sulla base delle leggi fisiche, chimiche e biochimiche che lo regolano (p. e. il moto del sangue nei vasi viene studiato in base alle leggi della fluidodinamica). L'utilizzazione di modelli puramente funzionali, che rappresentano le relazioni tra misure o dati ottenuti dal sistema in oggetto senza tenere conto dell'effettiva struttura del sistema, è molto meno diffusa. Tuttavia, modelli di questo tipo sono applicati nel caso di sistemi particolarmente complessi e per i quali si abbia una conoscenza incompleta e/o incerta sul modo di operare. Nello studio del sistema nervoso centrale, per esempio, si usano modelli funzionali per l'analisi delle relazioni causali che esistono fra differenti aree corticali (connettività cerebrale).

Sebbene il principale utilizzo dei modelli matematici si abbia tuttora nell'ambito degli studi di base di fisiologia e biologia, essi sono efficacemente impiegati anche in settori più strettamente connessi alle applicazioni. Modelli matematici sono diffusamente applicati in biomeccanica allo scopo di valutare la correttezza della locomozione e nella progettazione e valutazione di protesi di arti. Tali modelli sono generalmente utilizzati anche in epidemiologia per realizzare previsioni sulla diffusione di una patologia in una determinata popolazione, così come nello studio della distribuzione di un farmaco all'interno dell'organismo.

## 1.2.2 Metodi biologici

Molta della sperimentazione in ambito biomedico viene effettuata su modelli costituiti da colture cellulari di origine umana o animale. Attualmente esistono protocolli sperimentali che permettono la crescita e il mantenimento in coltura di praticamente qualsiasi tipo di cellula. È possibile mantenere 'colture primarie', per tempi più o meno lunghi, a partire da cellule appena isolate dagli appropriati tessuti od organi.

La storia delle colture cellulari è relativamente recente. Nel XIX secolo Schleiden e Schwann ipotizzarono che la cellula fosse un'unità funzionale vivente capace di vita autonoma; tuttavia, ciò non condusse subito ad effetti pratici nel campo della biologia sperimentale. Nel 1885, Wilhelm Roux condusse a termine con successo i primi esperimenti di espanto mantenendo il cervello di un embrione di pollo in una soluzione salina calda per pochi giorni. Agli inizi del XX secolo ebbero inizio i primi studi riguardanti l'ambiente cellulare; numerosi ricercatori tentarono di isolare cellule dagli organismi e di mantenere vitali in coltura frammenti di tessuto. In questi anni, ad esempio, fu effettuata per la prima volta una coltura *in vitro* di frammenti di tessuto di rana (Harrison, 1907) e fu tentato il mantenimento di tessuto linfatico di crostacei (Fischer-Piette, 1929). La scelta di questi sistemi era basata sul fatto che tessuti di animali a sangue freddo non necessitavano di temperature diverse da quella ambientale. Il passo più importante nello sviluppo di queste tecniche si ebbe però nel 1943 quando Earle riuscì ad ottenere le prime linee continue di cellule di mammifero (Earle, 1943). Successivamente, nel 1952, venne mantenuta in coltura la prima linea tumorale di origine umana (cellule HeLa) (Scherer *et al.*, 1953). Quindi, l'uso delle colture cellulari nella ricerca ha il suo effettivo punto di partenza negli anni '50, anche se soltanto negli ultimi decenni esso è divenuto pratica comune, essendo ormai possibile mantenere a lungo le cellule in coltura. Infatti, mentre i terreni di coltura utilizzati un tempo consentivano la sopravvivenza

cellulare soltanto per breve tempo, quelli attualmente in uso presentano una ben maggiore complessità nella formulazione e contengono fattori di crescita specifici per diversi tipi cellulari.

Grazie a questi fattori favorenti, le colture cellulari hanno avuto uno sviluppo rapidissimo, che ha prodotto ricadute applicative in moltissimi campi della biologia e della medicina, contribuendo, negli ultimi decenni, al rapido sviluppo di queste scienze, a una migliore comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari e a ridurre il ricorso alla sperimentazione *in vivo*.

Oggi è disponibile in commercio una notevole quantità di linee cellulari stabilizzate, derivate da numerose specie diverse, le cui caratteristiche morfologiche, di crescita, genetiche e la sensibilità sono ben conosciute; tali fattori consentono una buona standardizzazione e un corretto uso dal punto di vista della validazione. Gran parte di queste linee cellulari proviene da mammiferi; tra queste numerose sono quelle di origine umana che comprendono cellule normali e cellule tumorali. Utilizzando queste cellule è possibile studiare moltissimi aspetti della biologia cellulare, ivi compresa la biologia delle cellule trasformate.

Sulla base di quanto sopra esposto, si può affermare che le colture cellulari sono il più promettente tra i modelli biologici, in quanto mostrano caratteristiche indubbiamente vantaggiose. Tuttavia anche questi sistemi non sono esenti da limiti che devono venire attentamente considerati (Bianchi e Zucco, 1994).

Uno dei vantaggi più rilevanti nell'uso delle colture cellulari è relativo alla possibilità di studiare effetti tossici su cellule umane, ovviamente impossibile *in vivo*. Inoltre, le colture cellulari sono poco costose, forniscono risultati in tempi brevi, possono essere esposte direttamente alle sostanze da testare, possono rispondere anche a concentrazioni molto basse, poiché le sostanze nel mezzo di coltura sono a contatto diretto

con le cellule. Invece, un limite notevole riguarda la diversa organizzazione tra un sistema sperimentale costituito da cellule isolate tra loro non comunicanti, e la complessa organizzazione di un organismo nella sua interezza e complessità funzionale e strutturale. Inoltre, si verifica la perdita di componenti (soprattutto quelli del sistema nervoso ed endocrino) coinvolti nella regolazione omeostatica *in vivo*. Particolare non trascurabile infine, che può costituire a seconda dei casi un vantaggio o uno svantaggio, è la preparazione e l'esperienza dell'operatore; le colture cellulari necessitano infatti di sterilità assoluta, in quanto una contaminazione da batteri, muffe o lieviti conduce alla perdita della coltura stessa. Un altro problema delle colture cellulari può riguardare l'aneuploidia di molte linee stabilizzate, che possono presentare corredo cromosomico diverso dalle cellule di origine.

L'analisi di colture cellulari è diventata una vera e propria scienza per quanto riguarda gli studi di crescita cellulare e specialmente l'analisi di cellule *in vivo*. Le cellule procariotiche ed eucariotiche possono crescere in coltura in diversi mezzi per consentire l'analisi della crescita cellulare, del differenziamento, della morfologia, dell'apoptosi, dell'espressione proteica, della localizzazione di farmaci, dei fenomeni tossicologici e i meccanismi di interazione. È di particolare rilievo l'analisi di colture di cellule staminali che sta alla base della medicina rigenerativa.

Nel campo della tossicologia le colture cellulari offrono la possibilità di studiare i meccanismi di citotossicità e genotossicità degli inquinanti per mezzo delle metodologie biochimiche, citogenetiche e molecolari impiegate anche negli altri campi della biologia cellulare. Benchè le condizioni di esposizione *in vitro* siano molto diverse da quelle che si possono verificare negli organismi in toto, è oggi largamente accettata la validità dei test *in vitro* come mezzo per eseguire indagini preliminari sul potenziale genotossico o citotossico delle sostanze. Le informazioni raccolte *in vitro* permettono così di eseguire i successivi

saggi *in vivo* in modo più mirato. I test di tossicità *in vitro* vengono oggi considerati con favore anche in nome di principi etici sempre più condivisi negli ambienti scientifici.

## 1.3 L'Ingegneria Biomedica: soluzioni per la medicina rigenerativa

La medicina moderna rappresenta il risultato di continui progressi che si sono sviluppati a partire dall'inizio del secolo scorso. Nonostante le sofisticazioni introdotte in campo biomedico, ad oggi la sostituzione di organi danneggiati da traumi o malattie rappresenta un problema cruciale per la medicina. Le tecniche chirurgiche, inizialmente utilizzate per rimuovere tessuti o organi danneggiati, sono presto diventate tecniche di ricostruzione di quegli stessi tessuti o organi. Il trapianto di organi è tuttora limitato dalla scarsa disponibilità di donatori e da problemi seri problemi di rigetto cronico dovuto sia a incompatibilità con i materiali artificiali, sia al progressivo deterioramento o danneggiamento dell'organo impiantato e, di conseguenza, alla perdita delle sue originarie funzionalità. Questa forma di danneggiamento progressivo degli organi trapiantati implica la necessaria sostituzione degli stessi, soprattutto in pazienti giovani, per i quali l'intensità di attività e utilizzo dell'organo è maggiore. Le tecniche sviluppate per sostituire la funzionalità degli organi incontrano, in aggiunta, limiti di tipo biochimico: non si è in grado di sostituire le complesse reazioni che sono alla base del funzionamento degli organi originari con dispositivi artificiali e non è possibile, ad oggi, riprodurre la minuziosa complessità delle funzioni cellulari che sottendono a tali reazioni biochimiche.

La risposta a molti di questi problemi sembra poter venire dall'*Ingegneria Tissutale* (*Tissue Engineering*), un settore di ricerca sviluppatosi recentemente nell'ambito della medicina rigenerativa e dell'Ingegneria Biomedica.

### 1.3.1 L'Ingegneria Tissutale

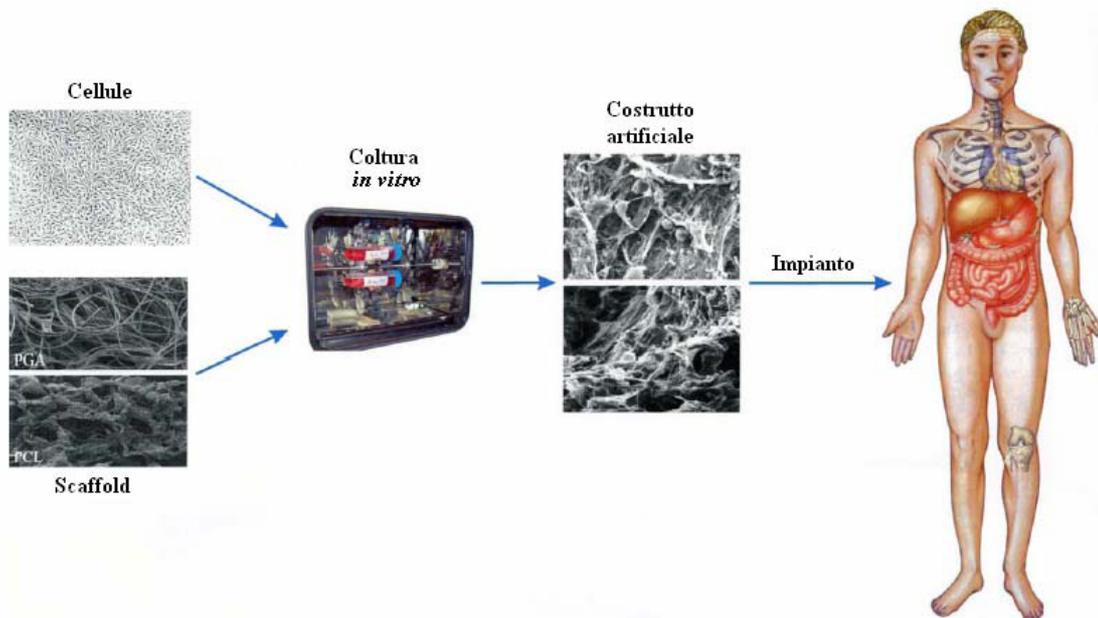
L'Ingegneria Tissutale rappresenta una delle aree più interessanti e in rapida crescita dell'ingegneria biomedica. Questa nuova scienza ad elevato contenuto tecnologico ha lo scopo di riparare i tessuti e gli organi danneggiati da malattie, traumi o semplice invecchiamento e quindi di ripristinare quelle funzioni perse degli organismi viventi. L'Ingegneria dei Tessuti è stata definita come *“quel settore interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze che studiano la vita per lo sviluppo di sistemi in grado di restituire, conservare e migliorare le funzioni del tessuto”* (Langer and Vacanti, 1993), oppure, più recentemente, come *“la comprensione dei principi della crescita dei tessuti e la sua applicazione alla produzione di un tessuto di sostituzione funzionale per l'uso clinico”* (MacArthur *et al.*, 2005). Dal punto di vista normativo l'Ingegneria Tissutale è classificata tra le terapie avanzate insieme alla terapia genica e alla terapia cellulare somatica (Regolamento CE n. 1394/2007 del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 13 Novembre 2007).

Tale scienza mira alla rigenerazione di tessuti danneggiati grazie all'utilizzo di tre fattori chiave: cellule, scaffold e fattori di crescita (Ikada, 2006). In particolare, le cellule hanno il ruolo di sintetizzare il nuovo tessuto. È stato dimostrato, tuttavia, che cellule isolate sono difficilmente in grado di organizzarsi spontaneamente per formare tessuti complessi, in assenza di strutture tridimensionali che le guidino e ne stimolino le attività (Schugens *et al.*, 1995). Il ruolo dello scaffold è quello di indurre la rigenerazione tissutale fornendo una “guida temporanea” per la crescita cellulare, sotto appropriate condizioni di coltura, per assecondare il programma di differenziazione (Ikada, 2006). Il terzo fattore chiave è rappresentato dai fattori di crescita, proteine il cui ruolo è di promuovere e guidare le cellule nella rigenerazione del neotessuto (Ikada, 2006; Porges *et al.*, 1985; Ruth e Mooney, 2003; Fuchs *et al.*, 2001; Niklason e Langer, 2001; Stock e Vacanti, 2001;

Langer e Vacanti, 1993). L'iniezione diretta in situ di fattori di crescita risulta inefficiente, a causa del rapido allontanamento del fattore dal sito d'interesse e della sua rapida digestione enzimatica o deattivazione. Al contrario, il rilascio locale e prolungato di molecole bioattive minimizza la propagazione indesiderata del segnale ad altre cellule e tessuti e assicura un'esposizione protratta nel tempo, al fine di ottenere la completa rigenerazione del tessuto (Chen e Mooney, 2003).

I tre fattori chiave dell'ingegneria dei tessuti non sono sempre simultaneamente utilizzati. Tuttavia, recenti studi clinici hanno dimostrato che il successo degli approcci terapeutici che si rifanno a tale scienza è fortemente influenzato dalla loro delicata interazione reciproca. È stato, infatti, evidenziato che la rigenerazione funzionale del tessuto danneggiato dipende dall'opportuna integrazione di tali fattori (Ikada, 2006).

La metodologia standard per generare un tessuto il più possibile omogeneo da impiantare su esseri umani prevede l'isolamento di una linea cellulare specifica tramite una biopsia, effettuata o direttamente sul paziente o su un donatore compatibile, e una successiva semina di tali cellule sullo scaffold in condizioni specifiche (e ripetibili) (**figura 1.2**). Infine il costrutto, costituito dallo scaffold e dalle cellule in esso cresciute, verrà collocato nel paziente al fine di ricostruire o riparare il tessuto danneggiato (Dutta e Dutta, 2009).



**Figura 1.2: Paradigma classico della Tissue Engineering**

Tale schematizzazione rende apparentemente molto semplice la coltivazione di tessuti biologici, la quale risulta in realtà non priva di difficoltà. Innanzitutto è necessario considerare che i tessuti biologici sono strutture tridimensionali, vascolarizzate e innervate, il che spinge alla scelta di scaffold tridimensionali e all'uso di diversi tipi cellulari per la loro realizzazione. Inoltre la crescita tissutale è un processo dinamico, nel quale l'ambiente si modifica nel tempo, rendendo indispensabile l'utilizzo di sistemi di coltura che mimino tali trasformazioni (bioreattori) garantendo la corretta maturazione del tessuto. I bioreattori sono costituiti da ambienti sterili, in cui si verificano tutti i processi necessari per la realizzazione del costrutto tissutale, e implicano, a seconda della tipologia di tessuto, l'apporto di sostanze nutritive, l'ossigenazione e la rimozione dell'anidride carbonica, il controllo del pH e delle concentrazioni ioniche della soluzione, il dosaggio dei fattori di crescita, il controllo della temperatura, l'applicazione di stimoli elettrici, meccanici, ecc.

Il processo di assemblaggio di un tessuto ingegnerizzato comincia con l'identificazione del tipo di cellule più adatto e con il loro isolamento da un tessuto nativo.

Il secondo step consiste nella crescita cellulare la quale è fortemente influenzata dal citotipo stesso; in questo processo è importante assicurarsi che la popolazione cellulare in fase di espansione mantenga le proprie caratteristiche funzionali e fenotipiche. Il fenotipo cellulare può essere condizionato dallo scaffold su cui le cellule sono state seminate in quanto, la tipologia del supporto influenza in maniera determinante i prodotti di secrezione delle cellule impiantate con conseguenti effetti sulla formazione del tessuto.

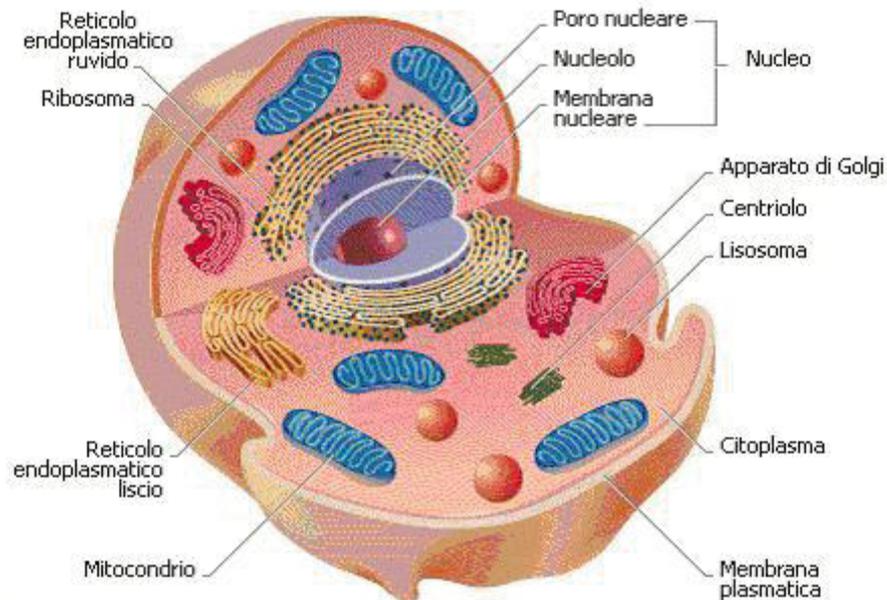
Le tecniche utilizzate nell'Ingegneria Tissutale seguono due vie differenti:

a) *in vitro*: la progettazione e la crescita dei tessuti avviene al di fuori del corpo e solo in un secondo momento si passa all'impianto dei tessuti artificiali sui tessuti danneggiati; tipico esempio è l'uso di pelle "coltivata" per il trattamento di pazienti affetti da gravi ustioni o da ulcere diabetiche;

b) *in vivo*: le cellule vengono isolate dall'ambiente biologico naturale, seminate su scaffold e infine si esegue l'impianto di questo sistema nel corpo del paziente. Durante la produzione della matrice extracellulare da parte delle cellule, lo scaffold tende a biodegradarsi e viene progressivamente sostituito dal tessuto biologico rigenerato.

### **1.3.1.1 La componente cellulare**

Le cellule sono, insieme ai materiali che costituiscono i substrati, la materia prima alla quale si attinge nell'Ingegneria dei Tessuti. Al loro interno esse presentano una struttura ben definita, caratterizzata da un nucleo centrale all'interno del quale è conservato il corredo cromosomico, che definisce il patrimonio genetico della cellula (**figura 1.3**).



**Figura 1.3: Rappresentazione di una cellula in sezione**

Esternamente esse sono rivestite da una membrana cellulare costituita da molecole lipidiche rivolte con la loro estremità idrofilica verso la matrice extracellulare esterna (Jason *et al.*, 2005). All'interno del corpo umano sono presenti circa 200 tipologie di cellule differenti, aventi tutte lo stesso corredo genetico, ma una differente programmazione della propria attività genetica. In altri termini, le cellule sono “differenziate” in relazione alla presenza di proteine regolatrici all'interno del loro corredo proteico in grado di attivare solo alcune funzioni di tale patrimonio. Parallelamente ad esso sono attivi i processi di riproduzione cellulare necessari alla loro proliferazione. Sia i meccanismi di differenziamento che quelli di riproduzione cellulare sono alla base dell'ingegneria dei tessuti e tali processi risultano fortemente influenzati dalla presenza di un substrato solido. La proliferazione cellulare, infatti, è condizionata in maniera significativa dalla più o meno favorevole adesione delle cellule al substrato; quindi, il successo dell'Ingegneria Tissutale è strettamente correlato anche alla scelta dei materiali impiegati per la realizzazione della struttura di supporto.

La selezione delle tipologie di cellule da utilizzare è basata sul tipo di tessuto da rigenerare. Le cellule svolgono un ruolo cruciale nei processi di riparazione e rigenerazione dei tessuti. Le loro caratteristiche biologico-funzionali comprendono: proliferazione, differenziamento, interazioni inter-cellulari, produzione di biomolecole, formazione di matrice extracellulare. Le fonti cellulari possono essere autologhe, singeniche, allogeniche o xenogeniche.

Le cellule ideali da utilizzare in Ingegneria Tissutale devono possedere alcune importanti proprietà:

- devono essere facilmente reperibili;
- devono facilmente moltiplicarsi senza subire alterazioni fenotipiche o funzionali;
- non devono trasmettere agenti patogeni interspecie;
- devono essere in grado di differenziarsi in una certa varietà cellulare;
- devono infine causare una risposta immunologica minima.

Alcuni tipi cellulari, come cheratinociti, fibroblasti, condrociti, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce, sono in grado di proliferare rapidamente e proprio per questo motivo sono stati maggiormente impiegati nei prodotti di Ingegneria Tissutale. Altri tipi cellulari, come epatociti o cardiomiociti, hanno un impiego decisamente più modesto poiché proliferano molto lentamente o non proliferano affatto. Negli ultimi anni la ricerca si è indirizzata verso una particolare tipologia cellulare, le cellule staminali, le quali possiedono caratteristiche peculiari, sia in termini di proliferazione che in termini di differenziamento.

### 1.3.1.1.1 Le cellule staminali

Le cellule staminali vengono definite tali poiché possiedono la capacità di auto-mantenersi, ovvero possono generare una cellula figlia identica alla madre, caratteristica fondamentale per mantenere costante il *pool* di cellule staminali, ma possono anche dar luogo a cellule con una minore potenzialità (cellule differenziate). Per potenzialità si intende la capacità di una cellula di dare origine a diversi tipi cellulari se esposta a differenti ambienti. Si può parlare di:

-totipotenza: se le cellule sono capaci di originare sia l'embrione che l'extraembrione inteso come formazione degli annessi embrionali (nei mammiferi i blastomeri sono totipotenti fino allo stadio di otto cellule);

-pluripotenza: se le cellule sono capaci di originare tutti e tre i foglietti embrionali (es. le cellule della massa cellulare interna della blastocisti);

-multipotenza: se le cellule possono originare solo una certa classe o categoria di cellule correlate (es. le cellule emopoietiche del midollo osseo, capaci di originare diversi tipi cellulari del sangue);

-unipotenza: se le cellule sono già determinate in un'unica direzione cellulare (un esempio di questo tipo sono le cellule satelliti del muscolo striato che rimangono quiescenti per lungo tempo e sono riattivate, dopo un evento traumatico o degenerativo, per fornire unicamente nuovi mioblasti che si fonderanno per dare miotubi; la staminalità di queste cellule sta nel fatto che sono capaci di auto-rinnovarsi oltre che di fornire mioblasti).

In base alle conoscenze attuali le cellule staminali vengono divise in due gruppi: cellule staminali embrionali e cellule staminali adulte. Le cellule staminali embrionali ai primi stadi di sviluppo sono totipotenti, cioè hanno conservato la capacità di differenziarsi in tutti i tessuti dell'animale (anche quelli extraembrionali); l'origine delle

cellule staminali embrionali è conosciuta, mentre quella delle cellule staminali adulte non è ancora ben chiara. Si pensa che le cellule staminali adulte riescano a evitare il processo differenziativo tipico delle cellule durante lo sviluppo embrionale e colonizzare appropriate nicchie; queste ultime avrebbero la funzione di mantenere la potenzialità delle cellule nella vita adulta sia di limitarne i processi di differenziamento (Lanza, 2004). La funzione primaria delle cellule staminali adulte è di assicurare l'omeostasi interna all'organismo e di sostituire le cellule danneggiate o morte a causa dell'invecchiamento, di disfunzioni o di danni. Le cellule staminali mesenchimali adulte (MSCs) sono caratterizzate da una morfologia simile a quella dei fibroblasti (Pittenger, 1999; Chamberlain, 2007), sono cellule multipotenti in grado di auto replicarsi, di proliferare illimitatamente e, se stimolate opportunamente, di differenziarsi in specifiche e diverse popolazioni cellulari (ossee, cartilaginee, tendinee, muscolari ecc.) (Gobbi, 2007; Horwitz, 2002). Queste caratteristiche le hanno rese particolarmente interessanti nell'ambito di strategie terapeutiche volte a promuovere la capacità rigenerativa e riparativa di organi e tessuti. Le MSCs possono essere ottenute da midollo osseo, sangue periferico, cordone ombelicale, tessuto adiposo e derma. La fonte di staminali maggiormente utilizzata è il midollo osseo, il quale contiene cellule mesenchimali e cellule staminali ematopoietiche; queste ultime risultano presenti in quantità maggiori rispetto alle MSCs e sono responsabili della genesi di tutte le cellule ematopoietiche.

Grazie a tali particolari caratteristiche, negli ultimi 10 anni la ricerca scientifica si è orientata sempre più verso lo studio delle potenzialità delle cellule staminali adulte poiché in un'ottica di terapia legata al trapianto cellulare, rispetto alle staminali embrionali, non presentano problemi di natura etica relativi all'utilizzo degli embrioni a scopo terapeutico e potendo essere isolate dal paziente stesso evitano i fenomeni di rigetto post-trapianto. Il vantaggio potenziale delle cellule staminali adulte quindi riguarda la loro capacità di essere

isolate, di duplicarsi un numero elevato di volte e di essere in grado di differenziare in altri tipi cellulari. Questo permette di avere a disposizione una popolazione di cellule progenitrici, che possono essere impiegate per la terapia rigenerativa di tessuti adulti danneggiati per i quali non esistono altre fonti endogene o sufficienti (Kim *et al.*, 2009).

### 1.3.1.2 Lo Scaffold

L'impiego di *scaffold* tridimensionali per sostituire tessuti e supportare la componente cellulare fu proposto circa venti anni fa da Robert Langer (Freed *et al.*, 1994).

Si definisce *scaffold* una struttura porosa tridimensionale, realizzata in un materiale biocompatibile e bioerodibile sul quale far avvenire l'adesione iniziale delle cellule e la successiva crescita, in maniera tale che esso si biodegradi a velocità simile a quella di neoformazione del tessuto.

Nel corso di vari studi sono stati individuati numerosi materiali adatti all'utilizzo come *scaffold* nell'ingegneria dei tessuti e questo ha permesso di definire le principali caratteristiche dei suddetti supporti; tali caratteristiche sono:

- porosità elevata e con la presenza di una rete di interconnessione fra i pori in modo da consentire la crescita cellulare, il trasporto delle sostanze nutrienti e l'eliminazione delle sostanze di scarto;
- biocompatibilità elevata in modo da non generare alcuna forma di rigetto da parte delle cellule ospiti;
- biodegradabilità controllata;
- bioriassorbibilità con un grado di riassorbimento tale da consentire la crescita cellulare *in vitro* e/o *in vivo* ;
- superficie chimicamente adatta all'adesione, alla proliferazione e alla differenziazione delle cellule;

- proprietà meccaniche simili a quelle dei tessuti che si devono riprodurre sullo scaffold;

- riproducibilità e possibilità di realizzazione, in modo semplice, in diverse forme e dimensioni;

I materiali studiati sperimentalmente per l'applicazione come *scaffold* per l'Ingegneria Tissutale si possono raggruppare in quattro categorie:

1. materiali organici sintetici (poliesteri alifatici, polietilenglicole);
2. materiali inorganici sintetici (idrossiapatite, gesso, fosfato di calcio, vetro ceramico);
3. materiali organici di origine naturale (collagene, gel di fibrina, acido ialuronico, chitosano, gelatina);
4. materiali inorganici di origine naturale (idrossiapatite corallina);

Infine, negli ultimi anni, ha acquisito sempre più importanza un approccio alternativo per la sostituzione di interi organi, basato sulla rigenerazione *in vitro* di organi geneticamente compatibili con i pazienti a cui sono destinati. Questo processo prevede una fase di *decellularizzazione* dell'organo allogenico o xenogenico per l'ottenimento di matrici extracellulari (ECM) integre da utilizzare come *scaffold* per la semina e la coltura di nuove cellule nella fase di *ricellularizzazione*.

## 1.4 Decellularizzazione di organi e tessuti

Con il termine *decellularizzazione* si definisce il processo mediante il quale si rimuove la componente cellulare da un tessuto o da un organo, riducendolo a un complesso di proteine funzionali e strutturali che costituiscono l'ECM (Badylak *et al.*, 2011).

Il tessuto da cui viene ottenuta la matrice, le specie di origine e il metodo di *decellularizzazione* costituiscono variabili con significativo impatto sulla composizione e

sull'ultrastruttura, ossia la struttura osservabile a livello microscopico, della matrice extracellulare decellularizzata, con conseguenti ripercussioni sulla risposta dell'organismo ospite, una volta che avviene l'impianto della matrice.

L'obiettivo di un protocollo di *decellularizzazione* è quello di rimuovere in maniera efficace tutto il materiale cellulare e nucleare, cercando di ridurre al minimo, o meglio di eliminare, ogni danno sulla composizione, sull'attività biologica e sull'integrità meccanica della rimanente ECM (Badylak *et al.*, 2011). Il processo di *decellularizzazione* nell'ingegneria dei tessuti costituisce quindi un'alternativa al trapianto che presenta numerosi limiti tra cui: lo sviluppo di una forma di rigetto cronico, la necessità di una terapia antirigetto a vita che provoca una maggiore incidenza di neoplasie ed infine una scarsa disponibilità di organi. Attualmente nei paesi industrializzati sono molto più numerosi i pazienti in lista d'attesa che quelli che possono beneficiare del trapianto di un organo. Il problema della disponibilità degli organi destinati al trapianto verrebbe risolto se si disponesse di una fonte alternativa, ad esempio, potendo trapiantare nell'uomo organi di animali. Il trapianto tra specie diverse, detto xenotrapianto, è in effetti una delle linee di ricerca attualmente perseguite, nonostante rimangono da risolvere importanti problematiche quali il rigetto iperacuto dello xenotrapianto e il potenziale trasferimento di agenti patogeni dall'animale all'uomo (Mantero *et al.*, 2010). Questi limiti non si presenterebbero se si pensasse di privare gli organi di animali, anatomicamente compatibili con l'uomo, della componente cellulare. A questo punto l'organo si ridurrebbe a ECM e fungerebbe da *scaffold* per la coltura di cellule del paziente ricevente. Non vi sarebbero più problemi di rigetto in quanto il biomateriale che sostituisce il tessuto patologico verrebbe coltivato con le cellule del paziente, ottenendo quella che comunemente viene definita "compatibilità biologica" (Badylak *et al.*, 2011). Quindi con la *decellularizzazione* si verrebbero a generare *scaffold* biologici, naturali e tridimensionali, che possano essere

successivamente coltivati con popolazioni cellulari selezionate per ottenere un nuovo organo compatibile con l'organismo del paziente ricevente. Inoltre questo tipo di matrice, diversamente da quelle artificiali formate da uno o più polimeri di sintesi, contiene la struttura ed i componenti ottimali per ospitare le cellule dell'organismo, fornendo un ambiente ideale per i recettori cellulari di superficie e costituendo una riserva per i fattori di crescita che modulano i processi biologici quali l'angiogenesi, la migrazione e la proliferazione cellulare (Badylak *et al.*, 2009).

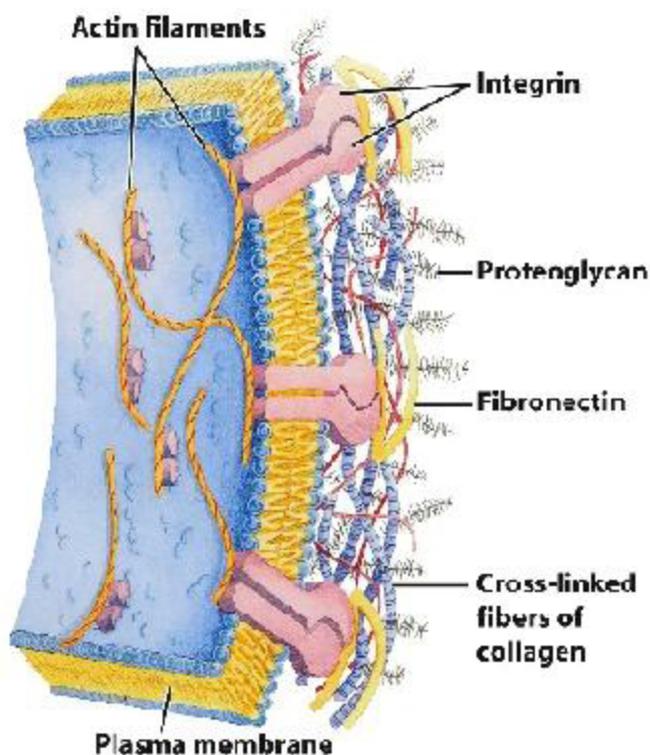
### **1.4.1 La matrice extracellulare come scaffold biologico**

Nei tessuti degli animali l'ECM è un composto eterogeneo costituito da diverse proteine strutturali e funzionali, glicoproteine e proteoglicani organizzati in una sovrastruttura tridimensionale molto complessa. Si tratta di un materiale gelatinoso, detto anche sostanza di base, che tiene unite le cellule di un tessuto e contiene numerosi pori attraverso cui le sostanze nutritive e l'ossigeno passano e si diffondono verso le singole cellule (Nelson e Cox, 2002).

L'ECM è la componente che determina le proprietà fisiche di ogni tipo di tessuto connettivo ed è costituita da tre componenti principali: matrice di sostanza organica, chiamata sostanza fondamentale, in cui sono collocati vari tipi di fibre, acqua (60-65%), e un gruppo di glicoproteine strutturali che mediano le interazioni tra le cellule e gli altri costituenti (Young e Heath, 2000). La sostanza fondamentale è un materiale amorfo e trasparente che ha le proprietà di un gel semifluido. I liquidi tissutali sono debolmente legati alla sostanza fondamentale e formano il nesso di passaggio dei materiali attraverso il tessuto connettivo, permettendo lo scambio dei metaboliti con il sistema circolatorio. La sostanza fondamentale comprende sette tipi di catene polisaccaridiche lunghe, non ramificate, ciascuna delle quali è formata dalla ripetizione di unità disaccaridiche. Una

delle unità del disaccaride è solitamente un acido ialuronico e l'altra un aminosaccaride (N-acetil glucosamina o N-acetil galattosina), da ciò il termine glicosamminoglicani (GAG) con cui queste catene sono definite (Young e Heath, 2000).

La **figura 1.4** rappresenta una sezione dell'ECM in cui sono indicati i componenti principali.



**Figura 1.4.** Sezione dell'ECM in cui sono indicati i componenti principali quali collagene, fibronectina e proteoglicani e le loro interazioni con la membrana cellulare (Badylak et al., 2009).

Tra le glicoproteine vi sono le fibre di collagene ed elastina, la fibronectina e la laminina (Nelson e Cox, 2002). Il collagene è la proteina più presente nel corpo umano; la sua importante funzione è di offrire resistenza alla trazione e viene secreta dalle cellule nell'ECM sotto forma di tropocollagene, per poi polimerizzare e dare vita al collagene. L'elastina è un'importante proteina strutturale organizzata in fibre e fogli discontinui nell'ECM della pelle, dei polmoni e dei vasi, ai quali conferisce proprietà di allungamento

e ritorno elastico. Viene sintetizzata dai fibroblasti sotto forma di precursore, la tropoelastina, che polimerizza nel liquido extracellulare. La fibronectina e la laminina sono glicoproteine strutturali, ossia un gruppo di molecole composte principalmente da catene proteiche legate a polisaccaridi (Young e Heath, 2000).

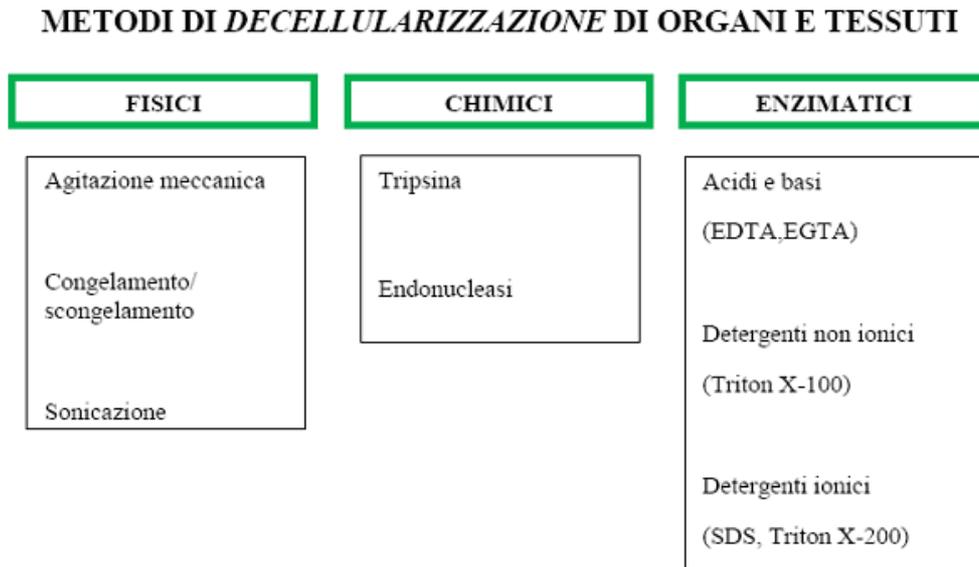
Questo connubio tra elasticità e resistenza rende quindi l'ECM un materiale ideale per la realizzazione di *scaffold* biologici, essendo inoltre stata dimostrata la sua capacità nel facilitare il rimodellamento di differenti tessuti sia in studi preclinici su animali che in applicazioni cliniche su pazienti (Badilak *et al.*, 2009). *Scaffold* biologici costituiti da ECM vengono comunemente utilizzati in una grande varietà di applicazioni chirurgiche ricostruttive e stanno trovando largo impiego nella medicina rigenerativa per la sostituzione di organi e tessuti (Badilak *et al.*, 2009). Le matrici extracellulari utilizzate per la creazione di questi *scaffold* vengono ottenute da diversi tessuti tra cui pelle, sottomucosa intestinale, vescica, vasi sanguigni e valvole cardiache e sono costituite da un complesso di molecole funzionali e strutturali che influenzano una varietà di attività cellulari. Altre proteine come la laminina, il collagene e il fibrinogeno sono state spesso usate nella generazione di *scaffold* biodegradabili per il loro ruolo strutturale e funzionale. Uno dei vantaggi di questi peptidi è la loro abbondanza nell'ambiente fisiologico di molte specie diverse, permettendo il prelievo da fonti animali senza avere intolleranze e risposte infiammatorie eccessive.

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

È noto inoltre che l'ECM riveste un ruolo nel differenziamento cellulare (ad esempio da mioblasti a miotubi): pertanto la si può definire una componente attiva dei processi che coinvolgono i tessuti. L'impiego della matrice proteica come *scaffold* per la rigenerazione dei tessuti è stato quindi una diretta conseguenza della consapevolezza della sua influenza sul comportamento cellulare. Durante la realizzazione di uno *scaffold* biologico è quindi di fondamentale importanza che la struttura dell'ECM, venga preservata in termini di ultrastruttura e di architettura tridimensionale, durante i processi utilizzati per il suo ottenimento, mantenimento e preparazione.

## 1.4.2 Metodi di decellularizzazione

In letteratura sono riportate differenti tecniche utilizzate per la *decellularizzazione* di organi e tessuti. Generalmente si fa una distinzione tra metodi fisici, chimici ed enzimatici, come riportato in **figura 1.5**.



**Figura 1.5:** Esempi di tecniche utilizzate per decellularizzare organi e tessuti. **EDTA** è l'acido tetracetico etilene diamine, **EGTA** è l'acido tetracetico glicol etilene, **SDS** è il sodio dodecilsolfato e **CHAPS** si riferisce al 3-[(3-colamidopropil)dimetilammonio]-1-propanosulfonato.

Come è chiaramente mostrato nella **figura 1.5**, tra i trattamenti fisici si possono includere agitazione, sonicazione, pressione, congelamento e scongelamento; questi metodi distruggono la membrana cellulare consentendo il rilascio del contenuto cellulare e facilitando quindi la loro rimozione dalla matrice extracellulare (Gilbert *et al.*, 2006). I trattamenti fisici, però, non sono da soli sufficienti per l'ottenimento di una completa *decellularizzazione* e devono quindi essere combinati con dei trattamenti chimici. È la

combinazione di questi differenti approcci che viene, infatti, tipicamente utilizzata per massimizzare gli effetti della *decellularizzazione*. I trattamenti enzimatici, come ad esempio l'uso della tripsina, e i trattamenti chimici, come ad esempio l'utilizzo di soluzioni ioniche e detergenti, distruggono la membrana cellulare e i legami responsabili delle connessioni intra e extracellulari (Badylak *et al.*, 2011).

I protocolli di *decellularizzazione* più efficaci prevedono pertanto una combinazione di trattamenti fisici, chimici ed enzimatici, e possono essere in genere così schematizzati:

- 1° step: lisi della membrana cellulare mediante un approccio fisico (agitazione, pressione, congelamento e successivo scongelamento) o mediante l'utilizzo di soluzioni ioniche;

- 2° step: separazione dei componenti cellulari dalla matrice extracellulare per mezzo di trattamenti enzimatici;

- 3° step: solubilizzazione del citoplasma e dei componenti nucleari grazie a detergenti chimici.

Questi step possono essere accompagnati, ad esempio, da agitazione meccanica per aumentare l'efficacia del processo.

In seguito alla *decellularizzazione* tutti i residui chimici devono essere rimossi per evitare qualunque risposta avversa da parte del tessuto ospite (Gilbert *et al.*, 2006).

La **Tabella 1** presenta un elenco dei metodi utilizzati nei processi di *decellularizzazione*; oltre ad una suddivisione delle varie tecniche in fisiche, chimiche o enzimatiche, viene riportata anche la modalità d'azione e gli effetti che tali approcci possono avere sull'ECM (Badylak *et al.*, 2011; Crapo *et al.*, 2011).

Metodi	Modalità d'azione	Effetti sulla ECM
<b>Fisici</b>		
<u>Congelamento/scongelamento</u>	Durante il congelamento, i cristalli di ghiaccio intracellulari distruggono la membrana	L'ECM può essere distrutta o danneggiata in seguito a congelamenti rapidi
<u>Pressione</u>	La pressione può distruggere le cellule e facilita la rimozione del materiale cellulare	La pressione può distruggere l'ECM
<u>Agitazione meccanica</u>	Può causare la lisi cellulare, ma viene più comunemente utilizzata per facilitare l'esposizione chimica e la rimozione del materiale cellulare	Un'agitazione aggressiva o una sonicazione può distruggere l'ECM
<u>Elettroporazione</u>	I campi elettrici pulsati possono distruggere la membrana cellulare	I campi elettrici potrebbero distruggere l'ECM
<b>Enzimatici</b>		
<u>Tripsina</u>	Rompe i legami peptidici dell'Arg e della Lys a livello del terminale C	Un contatto prolungato con la tripsina può distruggere la struttura dell'ECM, rimuovere la laminina, la fibronectina, l'elastina e i GAG
<u>Endonucleasi</u>	Catalizza l'idrolisi dei legami interni delle catene dei (deossi)ribonucleotidi	È difficile da rimuovere dai tessuti
<u>Esonucleasi</u>	Catalizza l'idrolisi dei legami terminali delle catene dei (deossi)ribonucleotidi	È difficile da rimuovere dai tessuti
<b>Chimici</b>		
<u>Acidi e basi</u>	Solubilizzano le componenti citoplasmatiche delle cellule, distruggono gli acidi nucleici e tendono a denaturare le proteine	Possibile danno al collagene e rimozione dei GAG
<u>Soluzioni ipertoniche e ipotoniche</u>	Lisi cellulare a causa di uno shock osmotico e distruzione della interazione DNA-proteina	Queste soluzioni provocano la lisi cellulare ma non rimuovono del tutto i residui cellulari
<u>Detergenti non ionici:</u> <u>- Triton X-100</u>	Distrugge l'interazione DNA-proteina, lipide-lipide e proteina-lipide; intatto il legame proteina-proteina	Danni a livello dell'ultrastruttura dell'ECM e del collagene. Rimozione dei GAG e dei fattori di crescita (GF)
<u>Detergenti ionici:</u> <u>- Sodio dodecil solfato (SDS)</u> <u>- Sodio deossilato</u>	Solubilizzano la membrana citoplasmatica e nucleare; tendenza alla denaturazione delle proteine. L'efficacia dipende dal tipo di	Rimuovono effettivamente i residui nucleari e le proteine citoplasmatiche dai tessuti. Tendono a distruggere l'ultrastruttura

<u>- Triton X-200</u>	tessuto	dell'ECM, rimuovono i GAG e i GF.
<u>Detergenti Zwitterionici:</u> <u>- CHAPS</u> <u>- Sulfobetaina 10 e 16 (SB-10, SB-16)</u>	Hanno proprietà sia di detergenti ionici che non ionici. Efficiente rimozione cellulare	Distruzione dell'ECM simile a quella del Triton-100
<u>Tri(n-butil)fosfato (TBP)</u>	Solvente organico che distrugge le interazioni proteina-proteina. Rimozione cellulare variabile	Perdita di collagene sebbene gli effetti sulle proprietà meccaniche siano minimi
<u>Agenti chelanti:</u> <u>- EDTA</u> <u>- EGTA</u>	Questi agenti si legano agli ioni metallici proibendo l'adesione cellulare all'ECM. Tipicamente associati ai metodi enzimatici. Sono inefficaci se utilizzati da soli.	Rimozione dei GAG dell'ECM

**Tabella 1:** Metodi ed agenti comunemente utilizzati per la decellularizzazione di organi e tessuti

### 1.4.2.1 Metodi fisici

I metodi fisici che possono essere utilizzati per facilitare la *decellularizzazione* dei tessuti includono il congelamento/scongelamento, l'applicazione di pressione, l'agitazione meccanica e l'elettroporazione (Badylak *et al.*, 2011).

Mediante un congelamento rapido del tessuto si vengono a formare dei cristalli di ghiaccio all'interno delle cellule che causano la lisi cellulare in seguito alla rottura della membrana. I processi di congelamento e scongelamento distruggono in maniera efficace le cellule all'interno di organi e tessuti, ma i contenuti intracellulari e i residui di membrana rimangono se non si procede ad una loro rimozione mediante processi successivi. È stato anche osservato che un singolo ciclo di congelamento-scongelamento può ridurre le risposte immuni avverse, come ad esempio le infiltrazioni di leucociti, e cicli ripetuti minimizzano la risposta immunitaria senza aumentare in maniera significativa la perdita di proteine di membrana dal tessuto (Badylak *et al.*, 2011). Quindi tale processo ha delle

minime conseguenze sull'ultrastruttura, sulle proprietà meccaniche dell'ECM e quindi sul mantenimento delle proprietà meccaniche dei tessuti (Crapo *et al.*, 2011).

L'utilizzo della pressione idrostatica richiede tempi relativamente bassi, risultando quindi più efficiente di detergenti o enzimi per la rimozione delle cellule (Crapo *et al.*, 2011).

L'elettroporazione prevede l'applicazione di pulsazioni elettriche della durata di microsecondi attraverso il tessuto e quindi attraverso le cellule del tessuto, provocando la formazione di micropori nella membrana cellulare a causa di un'instabilità del potenziale elettrico. La presenza di questi micropori provoca una perdita dell'omeostasi e quindi la morte cellulare (Phillips *et al.*, 2010). L'elettroporazione ha però alcuni limiti: le sonde limitano la dimensione del tessuto che può essere decellularizzato. Inoltre, poiché il meccanismo di rimozione cellulare è mediato dal sistema immunitario, il processo di *decellularizzazione* deve avvenire *in vivo*, limitando dunque le potenziali applicazioni. È sempre meglio associare una tecnica di perfusione per l'eliminazione dei residui lasciati dall'elettroporazione (Crapo *et al.*, 2011).

L'agitazione meccanica e la sonicazione sono state utilizzate in concomitanza a trattamenti chimici per l'eliminazione dei detriti cellulari in seguito a lisi cellulare. L'agitazione meccanica può essere ottenuta utilizzando, ad esempio, un piatto magnetico mescolante o uno "shaker". In entrambi i casi la velocità, la quantità di reagenti e la durata dell'agitazione meccanica dipendono dalla composizione, dal volume e dalla densità del tessuto da decellularizzare (Badylak *et al.*, 2011).

#### **1.4.2.2 Metodi chimici**

L'efficacia di un processo di *decellularizzazione* dipende da molti fattori tra cui la densità cellulare, il contenuto lipidico e lo spessore del tessuto. Poiché tutti gli agenti per la

rimozione cellulare alterano la composizione dell'ECM, uno degli obiettivi della *decellularizzazione* è la minimizzazione di questi effetti indesiderati (Crapo *et al.*, 2011).

Gli acidi e le basi provocano o catalizzano la degradazione idrolitica delle biomolecole, solubilizzano la componente citoplasmatica delle cellule, rimuovono gli acidi nucleici come DNA e RNA. Ad esempio l'acido acetico, l'acido paracetico (PAA), l'acido solforico e l'idrossido di ammonio (NH<sub>4</sub>OH) possono effettivamente distruggere le membrane cellulari e gli organelli intracellulari, ma allo stesso tempo dissociano importanti molecole come i GAG dai tessuti ricchi di collagene.

Le soluzioni ipertoniche saline dissociano il DNA dalle proteine, mentre quelle ipotoniche possono causare la lisi cellulare per osmosi con minime conseguenze sull'architettura della matrice. Per ottenere un aumento dell'effetto osmotico è possibile sottoporre il tessuto a diversi cicli di immersione in una soluzione ipertonica e ipotonica in maniera alternata; tali soluzioni permettono inoltre un risciacquo del tessuto dai residui cellulari (Crapo *et al.*, 2011).

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

Il sodio dodecilsolfato (SDS), il sodio deossicolato e il Triton X-200 sono invece i detergenti ionici di maggior impiego: l'SDS rimuove la componente cellulare dal tessuto in maniera soddisfacente, ma tende a distruggere la struttura nativa del tessuto, provocando

una diminuzione della concentrazione dei GAG e una perdita dell'integrità del collagene, nonostante non sia stata dimostrata nessuna rimozione del collagene dal tessuto (Crapo *et al.*, 2011).

Anche il deossicolato ha effetti positivi sulla rimozione cellulare e dei residui, ma provoca una maggiore distruzione dell'architettura nativa del tessuto rispetto all'SDS che risulta essere il detergente che garantisce una maggiore rimozione della componente nucleare e cellulare, insieme ad un'eliminazione dei residui (Crapo *et al.*, 2011).

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

Il Tri(n-butil)fosfato (TBP) è un solvente organico che viene comunemente utilizzato per inattivare i virus presenti nel sangue senza però compromettere l'attività dei fattori coinvolti nella coagulazione. Solo recentemente è stato usato come agente decellularizzante: presenta una buona capacità di rimozione delle componenti nucleari, senza apportare danni, ad esempio alle fibre di collagene, e senza provocare effetti negativi sul comportamento meccanico dell'ECM. È per tale motivo che viene visto come un agente decellularizzante promettente (Badylak *et al.*, 2011).

Infine gli agenti chelanti, come EDTA e EGTA, formano un complesso molecolare a forma di anello che lega e isola uno ione metallico centrale; vengono utilizzati nel distacco delle cellule dal substrato proteico. Questo avviene grazie al sequestro da parte delle molecole strutturate ad anello, dei cationi bivalenti metallici, come ad esempio  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , necessari per i legami di adesione cellulare al collagene e alla fibronectina. Legando questi cationi divalenti, gli agenti chelanti facilitano la rimozione del materiale cellulare dal tessuto (Badylak *et al.*, 2011). Sono tipicamente combinati ad altre sostanze in quanto,

se operano da soli, la loro azione è inefficace. Ad esempio l'EDTA viene utilizzato in combinazione alla tripsina, potenziandone l'azione.

Quando si procede con i metodi chimici è di primaria importanza assicurarsi di aver eliminato e rimosso qualunque residuo chimico dall'ECM in seguito al processo di *decellularizzazione*. Questi agenti potrebbero infatti risultare tossici per le cellule del tessuto ospite in seguito ad un impianto *in vivo* dello *scaffold* (Crapo *et al.*, 2011).

### 1.4.2.3 Metodi enzimatici

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

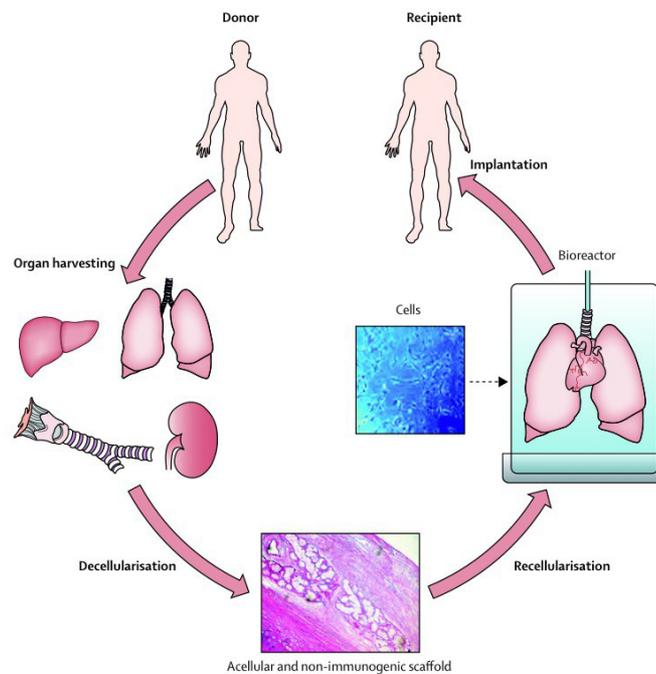
La tripsina è uno degli enzimi proteolitici maggiormente presente nei protocolli di *decellularizzazione*. Rompe i legami peptidici all'estremità carbossilica dell'Arginina e della Lisina e la sua attività è ottimizzata a 37°C e a pH= 8 (Badylak *et al.*, 2011). Poiché le proteine della matrice presentano una resistenza limitata alla tripsina, questa deve essere utilizzata con cautela. Rispetto ai detergenti risulta essere più distruttiva soprattutto nei confronti dell'elastina e del collagene, ma i tessuti trattati mostrano una maggiore conservazione del contenuto glicosamminoglicanico. Svolge un'azione più lenta in termini di rimozione cellulare e una *decellularizzazione* completa con la tripsina è quasi impossibile perché richiederebbe lunghi tempi di incubazione, anche in presenza di tessuti molto sottili. È per questo motivo che la tripsina viene utilizzata in combinazione ad altri agenti: l'enzima distrugge l'ultrastruttura del tessuto e migliora la successiva penetrazione di altri agenti decellularizzanti (Crapo *et al.*, 2011).

Le nucleasi, come le endonucleasi, catalizzano l'idrolisi dei legami interni delle catene ribonucleotidiche e deossiribonucleotidiche, mentre le esonucleasi catalizzano l'idrolisi dei legami terminali di deossiribonucleotidi e ribonucleotidi, provocando la degradazione di RNA e DNA (Badylak *et al.*, 2011).

È necessario assicurarsi che gli agenti enzimatici vengano rimossi in seguito al processo di *decellularizzazione*, in quanto una loro permanenza nel tessuto potrebbe provocare una risposta immunitaria avversa da parte dell'organismo ospite (Badylak *et al.*, 2011).

## 1.5 Ripopolamento di organi e tessuti

Una volta ottenuta la matrice extracellulare decellularizzata, il passo successivo è la sua ricellularizzazione. Con questo termine si indica il processo attraverso il quale si tenta di ripopolare una matrice precedentemente decellularizzata con delle popolazioni cellulari, ricreando *in vitro* le condizioni ottimali per l'adesione, per la crescita, per il differenziamento e per la proliferazione cellulare. L'obiettivo è dunque l'ottenimento di un organo funzionante e pronto per un ipotetico trapianto.



**Figura 1.6. Bioingegnerizzazione di tessuti ed organi.** Il primo passo è la raccolta di organi che vanno poi decellularizzati per ottenere dei bioscaffold. Questi ultimi sono a loro volta ripopolati in ambienti adeguati (bioreattori) per essere infine impiantati nel ricevente

Il primo obiettivo della *ricellularizzazione* è il ripopolamento degli organi decellularizzati con una popolazione cellulare adeguata in termini di tipi cellulari coinvolti

e numero di cellule utilizzate. L'ingegnerizzazione di un tessuto complesso o di un organo richiede la ricostruzione del parenchima e delle strutture vascolari e di sostegno, le quali differiscono, a seconda del tipo di organo, per numero e tipologia cellulare.

### 1.5.1 Fonti di cellule per la ricellularizzazione

I tipi e il numero di cellule necessarie nel processo di *ricellularizzazione* variano significativamente in base all'organo trattato: le cellule parenchimali sono le cellule responsabili delle specifiche funzioni dell'organo, come ad esempio gli epatociti nel fegato, i cardiomiociti nel cuore e le cellule epiteliali nei polmoni, mentre le cellule non parenchimali, come ad esempio i fibroblasti e le cellule endoteliali intensificano il fenotipo funzionale delle cellule parenchimali e contribuiscono all'organizzazione dell'architettura della matrice e del tessuto (Morin e Normand, 1986; Brutsaert, 2003; Hermanns *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2004). Di primario interesse per l'Ingegneria Tissutale sono soprattutto le cellule endoteliali e i fibroblasti.

Le cellule endoteliali sono indispensabili per fornire una barriera antitrombogenica per la matrice dell'organo decellularizzato e per assicurare che il flusso sanguigno *in vivo* sia confinato negli spazi vascolari e pertanto che le cellule parenchimali siano protette dagli sforzi di taglio creati dal flusso (Vunjak-Novakovic *et al.*, 2010; Nahmias *et al.*, 2007). La trombosi è infatti un importante problema da affrontare nel caso delle matrici decellularizzate, relativamente gestibile p.e. nel caso di valvole cardiache decellularizzate dove solo la superficie esterna della struttura è in contatto col flusso sanguigno (Lichtenberg *et al.*, 2006; Kasimir *et al.*, 2005), ma trattabile solo farmacologicamente nel caso p.e di uno scaffold ottenuto da fegato decellularizzato (Uygun *et al.*, 2010). Si consideri che il principale vantaggio nell'utilizzo di scaffold ottenuti dalla decellularizzazione di organi interi, è proprio la presenza di un network intatto di vasi

sanguigni, che però, per poter essere utilizzato per dirigere il flusso nel tessuto *in vivo*, richiede un'endotelizzazione. Un'endotelizzazione funzionale a lungo termine purtroppo non è stata ancora dimostrata, anche se i tentativi sinora eseguiti si sono mostrati molto promettenti in termini di adesione endoteliale (Ott *et al.*, 2008; Uygun *et al.*, 2010). Si stanno cercando nuove strategie di endotelizzazione, considerando anche il fatto che questa si verifica spontaneamente *in vivo* dopo trapianto nel caso di alcuni tessuti decellularizzati, come p.e. la pelle (Menon *et al.*, 2003; Schechner *et al.*, 2003), il che fa ragionevolmente ipotizzare che l'endotelizzazione iniziale *in vitro* sia necessaria solo fintanto che non si verifichi la riendotelizzazione spontanea *in vivo*.

I fibroblasti sono indispensabili nella secrezione di molte delle proteine dell'ECM e nel suo rimodellamento, e favoriscono le funzioni delle cellule parenchimali nelle co-culture. Per esempio la co-cultura di epatociti con fibroblasti o cellule endoteliali incrementa significativamente le funzioni fegato-specifiche delle singole tipologie cellulari (Bhatia *et al.*, 1998; Jindal *et al.*, 2009). Recentemente è stato dimostrato che i fibroblasti sono anche coinvolti nel mantenimento delle proprietà elettriche del miocardio grazie all'accoppiamento con i cardiomiociti e agevolando la propagazione degli stimoli elettrici nelle lunghe distanze (Kamkin *et al.*, 2003; Kamkin *et al.*, 2005). Pertanto, oltre al loro ruolo determinante *in vivo*, sono fondamentali anche nelle colture d'organo *in vitro* per consentire o facilitare il rimodellamento e l'organizzazione strutturale.

A seconda dell'organo, potrebbero ovviamente essere importanti, se non necessarie, altre tipologie cellulari, anche se a causa dell'estrema complessità nel loro isolamento e mantenimento in coltura, gli studi si sono finora concentrati principalmente sulle co-culture di fibroblasti e cellule endoteliali. Per ovviare a queste problematiche la rigenerazione cellulare-tissutale e la produzione di organi per il trapianto vedono principalmente l'utilizzo di cellule staminali. Si tratta, come precedentemente esposto, di cellule non

specializzate, in grado di replicarsi per lunghi periodi senza andare incontro a differenziamento. Possiedono quindi la capacità di auto-rinnovamento ma possono anche dare origine a cellule progenitrici, con capacità proliferativa limitata, dalle quali discendono popolazioni di cellule altamente differenziate (p.e. nervose, muscolari, ematiche).

Non vi sono pertanto dubbi sul fatto che le cellule staminali siano i migliori candidati per la *ricellularizzazione*, tuttavia è importante scegliere la fonte e il tipo cellulare più appropriato.

La prima scelta da effettuare riguarda la loro provenienza. Le cellule autologhe vengono prelevate dal paziente ricevente. In questo caso non ci sono fenomeni di rigetto, di avvio di una risposta immunitaria avversa e di obbligo di una terapia immunosoppressiva a vita (Halloran, 2004). Le cellule allogene sono definite “*not self-derived*” e possono essere raccolte in grandi quantità da individui giovani e in salute e mantenute ed espanse con successo. In molte applicazioni della medicina rigenerativa la scelta tra fonti autologhe e allogene dipende da numerosi fattori tra i quali il numero di cellule richieste, la facilità di raccolta, di espansione e di differenziamento *in vitro*. Per esempio nel caso di una lesione grave dove il tempo è critico, un prodotto basato su cellule allogene potrebbe essere vantaggioso rispetto ad un prodotto autologo che richiederebbe settimane per la preparazione. Una situazione opposta, invece, potrebbe essere la sostituzione articolare in cui i costrutti potrebbero crescere *in vitro* per lunghi periodi (settimane o addirittura mesi): in questo caso l'alternativa autologa potrebbe essere contemplata.

Oltre alla scelta del tipo cellulare, un altro parametro di fondamentale importanza è il numero di cellule da utilizzare, che dipende strettamente dal tipo di organo che si vuole ricellularizzare (Badylak *et al.*, 2011). Ad esempio il cuore e i polmoni possiedono una funzione biomeccanica ed è quindi necessario che al momento dell'impianto siano già

degli organi funzionali, il che richiede che sia già presente un'alta percentuale di cellule. Esistono, però, altri organi con funzioni metaboliche primarie, come ad esempio il fegato e il pancreas, che possono essere impiantati anche quando presentano solo una piccola percentuale della loro massa cellulare nativa. Si è stimato che il fegato di un adulto (70 kg) possa contenere circa  $2,8 \times 10^{11}$  epatociti (Sussman e Kelly, 1993); sebbene la massa cellulare richiesta per supportare un modello animale utilizzabile in caso di fallimento epatico, non sia stata ancora determinata, studi clinici hanno dimostrato che la massa cellulare minima necessaria per supportare un paziente con una compromissione epatica è di circa il 5-10% del peso totale del fegato, il che richiederebbe circa  $10^{10}$  cellule nell'uomo e  $50-100 \times 10^6$  cellule in un modello animale di ratto (Badylak *et al.*, 2011).

Il cuore, invece, è un organo che presenta un'alta densità cellulare ( $\approx 10^8$  cardiomiociti/cm<sup>3</sup>) (Vunjak-Novakovic *et al.*, 2010); per generare un cuore che sia completamente funzionante è necessario che la matrice tridimensionale sia totalmente ricellularizzata nel momento dell'impianto (Badylak *et al.*, 2011).

### 1.5.2 Tecniche di semina cellulare

Una volta selezionato il tipo cellulare e compreso il numero di cellule necessario, bisogna procedere con la loro iniezione nella matrice. Le tecniche di semina attualmente utilizzate nei processi di *ricellularizzazione* sono un adattamento di quelle in uso nelle terapie cellulari. Queste tecniche includono l'iniezione intramurale, ossia direttamente nell'organo (Ott *et al.*, 2008), o l'infusione delle cellule nel sistema vascolare seguita da una continua perfusione (Uygun *et al.*, 2010; Petersen *et al.*, 2010).

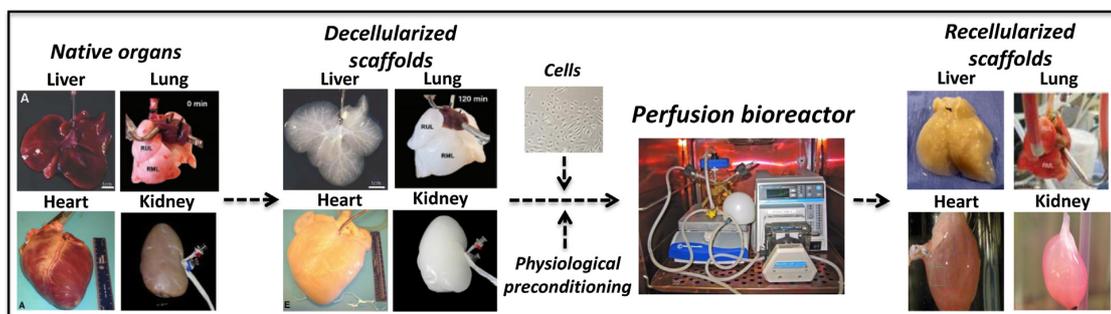
Affinché si ottenga un ripopolamento adeguato, con una giusta differenziazione delle cellule, è importante che venga riprodotto *in vitro* un ambiente che mimi il più possibile l'ambiente fisiologico, in termini di temperatura, concentrazione di gas e stimoli:

è quindi importante che l'ambiente di coltura venga fortemente controllato da un dispositivo. Il ruolo di riproduttore di un ambiente di coltura ottimale viene rivestito dal bioreattore. Il bioreattore è un dispositivo che consente lo svolgimento dei processi biologici e/o biochimici in condizioni ambientali e operative monitorate, automatizzate e controllate (pH, temperatura, apporto di nutrienti, rimozione di cataboliti, ecc.).

Genericamente un bioreattore è costituito da una camera di coltura in cui viene posto l'organo in fase di ricellularizzazione che sarà sottoposto ad una perfusione. L'ambiente di coltura deve essere sterile in quanto la camera rappresenta la parte più delicata del sistema, essendo la zona a diretto contatto con le cellule. Inoltre per il mantenimento cellulare è necessaria una temperatura pari a 37°C, una concentrazione di anidride carbonica del 5% e un'umidità relativa del 95%. Vi sono particolari bioreattori che posseggono già al loro interno un controllo della temperatura e della CO<sub>2</sub>. È inoltre necessario riprodurre un condizionamento chimico fisico che abbia l'obiettivo di far rispondero l'organo in via di ricellularizzazione nel modo più fisiologico possibile. Dal punto di vista chimico vengono determinati e controllati i seguenti parametri: la concentrazione di gas quali ossigeno e anidride carbonica, l'umidità relativa che si deve sempre aggirare intorno al 95% (il nostro corpo è per la maggior parte costituito di acqua), il pH che dovrà mantenersi sempre sul valore neutro. Per quanto riguarda invece il condizionamento fisico, gli stimoli applicati dipendono principalmente dal costruito in questione. Come prima cosa bisogna vedere che funzioni ha l'organo *in vivo*, dopodiché si cerca di far riprodurre tali funzioni all'organo *in vitro*, mediante l'applicazione di differenti stimoli che possono essere elettrici, meccanici, fluidodinamici, eccetera. A titolo esemplificativo se si vuole *ricellularizzare* un cuore, bisognerà applicare degli stimoli elettrici mediante degli elettrodi, affinché le cellule che sono state seminate acquisiscano capacità contrattili.

## 1.6 Stato dell'arte sulla bioingegnerizzazione degli organi interi

Nei casi di malattie cardiache, epatiche, renali e polmonari allo stadio terminale, il trapianto è l'unica soluzione ad oggi ritenuta valida. In questo contesto si inserisce l'ambiziosa proposta dell'ingegneria dei tessuti di rigenerare gli organi *in vitro*. In letteratura si trovano numerosi studi che si pongono come obiettivo la rigenerazione di questi organi attraverso le tecniche sopra descritte, come schematizzato nella **figura 1.7**.



*Figura 1.7. Paradigma della bioingegnerizzazione degli organi. Gli organi interi vengono decellularizzati tramite perfusione per ottenere scaffold che possono essere ripopolati con diverse tipologie cellulari e in appropriate condizioni fisiologiche all'interno di un bioreattore a perfusione. (Moran et al., 2014)*

### 1.6.1 Fegato

L'insufficienza epatica, soprattutto nella forma acuta, è una patologia che può portare al decesso in pochi giorni ed attualmente le possibilità di trattamento sono limitate. I pazienti spesso non sopravvivono per il tempo necessario al reperimento di un organo per il trapianto. Nel passato sono stati sviluppati sistemi passivi per la sostituzione temporanea

della funzione epatica (emodialisi, plasmaferesi, emofiltrazione), senza ottenere però sostanziali miglioramenti della sopravvivenza di pazienti affetti da epatite fulminante.

Più recentemente sono stati sviluppati sistemi extracorporei per la sostituzione della funzione epatica basati sull'impiego di cellule epatiche. Si tratta del fegato bioartificiale che viene utilizzato per supportare pazienti in condizioni critiche, in attesa di trapianto. È un sistema extracorporeo di supporto epatico all'interno del quale viene inserita una componente biologica, ossia cellule epatiche sane messe in coltura su una matrice sintetica. Il principio di funzionamento del sistema è il seguente: il sangue intero, o il plasma, del paziente viene convogliato in un secondo circuito extracorporeo dove entra in contatto con cellule epatiche, umane o xenogeniche; passando attraverso questo sistema il sangue si detossifica e acquista proteine e glucosio, contribuendo così alla riparazione del fegato umano danneggiato. Questa non può però essere considerata un'alternativa al trapianto in quanto vi sono delle complicazioni legate al mantenimento della funzionalità degli epatociti nella matrice e ai costi elevati.

Il fegato bioingegnerizzato è diventato una possibilità grazie ai recenti progressi nell'ambito della decellularizzazione tissutale (Ott *et al.*, 2008; Baptista *et al.*, 2009; Uygun *et al.*, 2010; Baptista *et al.*, 2011; Soto-Gutierrez *et al.*, 2011). Numerosi gruppi hanno riportato studi in cui viene dimostrata l'efficace ricellularizzazione di scaffold epatici decellularizzati utilizzando cellule fetali epatiche umane ed epatociti di ratto (Uygun *et al.*, 2010; Baptista *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). Questi fegati bioingegnerizzati si sono dimostrati capaci di svolgere anche numerose funzioni metaboliche, quali la sintesi dell'albumina, la secrezione di urea, e il metabolismo di farmaci. Sebbene questi lavori abbiano dimostrato risultati molto promettenti, le sfide da affrontare restano numerose. Queste sfide includono l'identificazione della specie appropriata che funga da donatrice di fegati da decellularizzare, l'identificazione della

tipologia ideale di cellule da utilizzare durante il ripopolamento, l'ottimizzazione della tecnologia di perfusione tramite bioreattore, la risoluzione delle problematiche relative alla vascolarizzazione dell'organo e al suo eventuale rigetto (Soto-Gutierrez *et al.*, 2011; Duncan e Soto-Gutierrez, 2013; Fukumitsu *et al.*, 2011; Uygun *et al.*, 2012; Wertheim *et al.*, 2012).

## 1.6.2 Intestino

La bioingegnerizzazione dell'intestino tenue ha riscontrato particolare interesse per il trattamento della sindrome dell'intestino corto, un'insufficienza intestinale dovuta a difetto congenito, infarto intestinale o resezione chirurgica estesa dell'intestino, che si caratterizza per diarrea, malassorbimento delle sostanze nutritive, dilatazione dell'intestino e alterata motilità. Tale patologia presenta un elevato tasso di mortalità, e le attuali opzioni terapeutiche, fra le quali la ricostruzione chirurgica, si sono dimostrate non risolutive (Orlando *et al.*, 2013; Levin e Grikscheit, 2012;). Grikscheit (Grikscheit *et al.*, 2004;) è stato il primo a riportare lo sviluppo di un intestino tenue ingegnerizzato ottenuto seminando unità organoidi intestinali su scaffold polimerici che sono stati successivamente trapianti nell'omento di ratti. Negli ultimi anni, col crescente interesse nei confronti dei tessuti decellularizzati, numerosi gruppi hanno tentato di creare una matrice intestinale acellulare da utilizzare nell'ingegnerizzazione dell'intestino tenue (Nowocin *et al.*, 2012; Patil *et al.*, 2013; Totonelli *et al.*, 2012). Questi studi hanno dimostrato una buona conservazione della microarchitettura intestinale e il mantenimento delle unità funzionali intestinali. Il gruppo di Patil (Patil *et al.*, 2013) ha recentemente dimostrato lo sviluppo di un intestino tenue ingegnerizzato basato sull'utilizzo di un intestino tenue umano decellularizzato ripopolato con cellule (epiteliali, endoteliali e muscolari lisce) derivate da midollo osseo allogenico. In seguito a decellularizzazione con dimetilsolfossido al 6% in

buffer ipotonico, Triton X-100 all'1% e DNasi, tutti i componenti cellulari e nucleari vengono rimossi mantenendo inalterata la struttura dell'ECM con le sue principali componenti proteiche. Per quanto riguarda l'ingegnerizzazione intestinale sono stati compiuti grandi passi avanti, ma resta comunque ancora da definire la fonte ottimale delle cellule per il ripopolamento, la strategia ottimale di semina e la valutazione funzionale di tali costrutti.

### 1.6.3 Rene

Sebbene la dialisi rappresenti un trattamento disponibile per le patologie renali croniche, essa rimpiazza solo la funzione filtrante del rene, è associata al manifestarsi di numerose complicazioni e non può essere considerata una soluzione permanente. L'unica soluzione definitiva è il trapianto di rene, con l'ovvia limitazione della disponibilità di donatori. Anche in questo caso l'ingegneria dei tessuti offre delle speranze, e in particolare le moderne tecniche di decellularizzazione.

Numerosi gruppi hanno riportato successi nella decellularizzazione di reni di ratti (Song *et al.*, 2013; Ross *et al.*, 2009; Ross *et al.*, 2012), maiali (Orlando *et al.*, 2012; Sullivan *et al.*, 2012), macachi (Nakayama *et al.*, 2013; Nakayama *et al.*, 2010) e persino umani (Orlando *et al.*, 2013). Ross e colleghi (Ross *et al.*, 2009) perfondendo Triton X-100 in concentrazioni crescenti dallo 0,5% al 10%, CaCl<sub>2</sub> 5mM, MgSO<sub>4</sub> 5mM, NaCl 1M, DNasi e sodio deossicolato al 4%, hanno ottenuto reni di ratto completamente acellulari che hanno successivamente ripopolato con cellule staminali embrionali murine (mESCs) attraverso l'arteria renale e l'uretere. Le mESCs si sono dimostrate capaci di proliferare con successo all'interno delle strutture glomerulari, vascolari e tubulari, esprimendo i marker indicatori del loro differenziamento. In un lavoro successivo da parte dello stesso gruppo viene inoltre dimostrata la capacità delle mESCs di differenziare a cellule

endoteliali mature nelle arterie e nei glomeruli, raggiungendo un risultato fondamentale nell'ambito dei trapianti (Ross *et al.*, 2012).

Utilizzando scaffold ottenuti da reni di macaco decellularizzati, Nakayama e collaboratori (Nakayama *et al.*, 2010) hanno dimostrato la capacità di differenziamento e di migrazione delle cellule fetali epatiche, e più recentemente (Nakayama *et al.*, 2013) la positività alla citocheratina dei tubuli renali in seguito a ripopolamento con cellule staminali embrionali umane (hESCs). I progressi più promettenti nell'ottica di un futuro utilizzo per il trapianto sono però quelli compiuti dal gruppo di Song (Song *et al.*, 2013). Reni di ratto decellularizzati sono stati ripopolati con cellule endoteliali e cellule renali di ratto neonato, sono stati mantenuti in un bioreattore a perfusione per 3-5 giorni per permettere l'endotelizzazione e per ulteriori 12 giorni per permettere la maturazione delle cellule neonatali renali. In seguito al trapianto in ratti, tali reni hanno permesso la produzione di urina e l'eliminazione dei metaboliti nonostante la loro immaturità funzionale. Sebbene la produzione di urina possa essere considerata un risultato altamente incoraggiante, restano da dimostrare lo svolgimento di funzioni più avanzate, quali la filtrazione sanguigna e il mantenimento della pressione del sangue, prima che tali risultati possano essere trasferiti alla pratica clinica.

### **1.6.4 Cuore**

Il trapianto cardiaco rimane tuttora l'unico trattamento possibile in presenza di gravi patologie che vedono la compromissione del cuore, che non è dunque più in grado di svolgere la propria funzione. Anche in questo caso uno dei problemi principali è la scarsa disponibilità di organi e la qualità della vita del paziente in seguito ad un trapianto, in termini di rischio di rigetto e di necessità di una terapia immunologica a vita. Una delle alternative è la generazione di un organo "nuovo" e funzionante, ricavato applicando i

principi dell'ingegneria dei tessuti, ottenendo quindi uno *scaffold* biologico mediante un processo di *decellularizzazione* da coltivare con le cellule autologhe del paziente, al fine di evitare qualunque problema legato al rigetto e garantendo una migliore qualità della vita per il ricevente dell'organo stesso. Per l'ottenimento di uno *scaffold* cardiaco, avente una geometria tridimensionale e un sistema di vascolarizzazione intatto, Ott *et al.* (Ott *et al.*, 2008) hanno sottoposto cuori di cadaveri di ratto a perfusione coronarica anterograda, per circa 12 ore, utilizzando tre differenti soluzioni: sodio dodecilfosfato (SDS), polietilene glicolico (PEG) e Triton X-100. I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'SDS permette di ottenere una migliore rimozione del DNA, delle strutture proteiche intracellulari e di tutte le componenti cellulari rispetto al PEG e al Triton X-100. In tutti e tre i casi, permangono intatte le fibre di collagene di tipo I e III, la laminina, la fibronectina del cuore originale, sia in termini di composizione che di orientamento. I cuori in tal modo decellularizzati sono stati successivamente ripopolati tramite iniezione di cardiomiociti di ratto neonato e perfusione di cellule endoteliali. Dopo 8 giorni di coltura all'interno di un bioreattore in grado di riprodurre le condizioni fisiologiche del flusso sanguigno, i cuori ricellularizzati hanno mostrato capacità contrattili e risposta elettrica agli stimoli.

Un altro protocollo di decellularizzazione del cuore intero è stato messo a punto dal gruppo di Wainwright (Wainwright *et al.*, 2010), il quale descrive l'utilizzo di diverse soluzioni decellularizzanti e un protocollo di perfusione applicabile a modelli animali di grandi dimensioni (maiale). L'aorta dei cuori porcini isolati è stata incannulata, e utilizzata per perfondere, in maniera anterograda, tripsina, EDTA, NaN<sub>3</sub>, Triton X-100 e acido deossicolico, determinando una completa rimozione di tutto il materiale cellulare e nucleico, preservando il contenuto di collagene I, III, IV ed elastina, e le caratteristiche meccaniche della matrice.

Anche in questo caso comunque, nonostante i progressi fatti in pochi anni nell'ambito della creazione di un intero cuore bioingegnerizzato, restano da effettuare ulteriori studi sulla funzionalità meccanica in seguito al ripopolamento e rimane da valutare la funzionalità di tali organi dopo il trapianto.

### 1.6.5 Pancreas

Secondo l'Organizzazione Mondiale per la Sanità, almeno 285 milioni di persone nel mondo soffrono di diabete (Shaw *et al.*, 2010) ma il trattamento per tale patologia risulta ancora insoddisfacente. Sebbene la terapia con insulina risulti efficace nel prevenire le crisi acute del diabete di tipo I, tale trattamento non fornisce una cura e anzi può causare delle complicazioni a lungo termine (Mirmalek-Sani *et al.*, 2013; Goh *et al.*, 2013). Il solo trattamento disponibile in grado di stabilizzare a lungo termine la glicemia nei pazienti con diabete di tipo I è rappresentato dal trapianto delle isole pancreatiche (Mirmalek-Sani *et al.*, 2013) che ha però un limitato potenziale di attecchimento e un effetto terapeutico a breve termine (Vaithilingam e Tuch 2011). L'alternativa è rappresentata dallo sviluppo di pancreas bioingegnerizzati, ottenuti combinando pancreas decellularizzati con l'opportuna tipologia cellulare. Il gruppo di Goh (Goh *et al.*, 2013) ha dimostrato un efficiente attecchimento cellulare nei pancreas decellularizzati, che hanno inoltre determinato una sovraespressione del gene per l'insulina. Pertanto tali scoperte supportano la possibilità di utilizzare come biomateriali pancreas decellularizzati per aumentare la funzionalità delle cellule pancreatiche.

Nello stesso anno il gruppo di Mirmalek-Sani (Mirmalek-Sani *et al.*, 2013) ha ulteriormente confermato l'utilità degli scaffold ottenuti da pancreas decellularizzati, in questo caso particolare utilizzando pancreas porcini ripopolati con cellule staminali umane e isole pancreatiche di suino. Tali scaffold si sono dimostrati efficaci nel supportare

l'adesione cellulare e le isole pancreatiche seminate sugli scaffold hanno determinato un incremento significativo della secrezione di insulina.

Pertanto anche per quanto riguarda la bioingegnerizzazione del pancreas questi studi offrono notevoli speranze, ma come per gli altri casi, rimane da risolvere il problema della rivascularizzazione e del trapianto.

## 1.6.6 Polmone

Le patologie polmonari sono tuttora una delle principali cause di morbidità e mortalità in tutto il mondo. Allo stato attuale non esistono cure a lungo termine per pazienti con patologie polmonari croniche, a parte il trapianto di polmone. Comunque, come per il trapianto di altri organi, vi è sempre il problema della ridotta disponibilità di donatori, è spesso frequente il rigetto, per cui risulta indispensabile una terapia immunosoppressiva a lungo termine (Prakash e Stenmark 2012). Pertanto anche la bioingegnerizzazione del polmone offre numerose speranze.

Recentemente sono stati pubblicati numerosi lavori riguardanti la produzione di matrici polmonari acellulari (Ott *et al.*, 2010; Petersen *et al.*, 2010; Cortiella *et al.*, 2010) ripopolate con differenti tipologie cellulari e reimpiantate in ratti, dimostrando la sopravvivenza a breve termine degli animali. Ott e Petersen (Ott *et al.*, 2010; Petersen *et al.*, 2010) dopo aver decellularizzato polmoni di ratto tramite perfusione li hanno poi ripopolati con pneumociti e cellule endoteliali. I polmoni sono stati perfusi tramite un bioreattore che ne ha simulato l'ambiente fisiologico. Successivamente sono stati trapiantati in ratti, e perfusi dalla circolazione dell'organismo ricevente hanno permesso uno scambio di gas *in vivo* a breve termine per almeno 6 ore. Nel 2011 Song ha incrementato la sopravvivenza di tali organi bioingegnerizzati, mantenendo in vita i ratti per 2 settimane (Song *et al.*, 2011). I risultati descritti sono sicuramente incoraggianti, ma

sono necessari esperimenti su modelli animali di taglia maggiore prima di poter pensare alla pratica clinica.

### 1.6.7 Trachea

La trachea è un organo relativamente semplice e cavo, e per questi motivi è stato il punto di partenza ideale per l'ingegnerizzazione del sistema respiratorio. Inoltre nessun polimero biodegradabile sintetico o biomateriale ha avuto successo nelle applicazioni cliniche per la ricostruzione del sistema respiratorio (Grillo, 2002). In uno studio del 2008 (Macchiarini *et al.*, 2008) viene descritto il ripopolamento di una trachea umana decellularizzata con cellule dell'epitelio respiratorio autologhe e condrociti derivati dal differenziamento di cellule staminali mesenchimali autologhe all'interno di un bioreattore. Tale costrutto ingegnerizzato è stato poi impiantato con successo in una paziente che non ha necessitato di alcun farmaco immunosoppressivo. Tale procedura è stata migliorata dal 2008, accorciando p.e. i tempi necessari per la decellularizzazione della trachea e utilizzando l'organismo ricevente come bioreattore: le cellule (cellule dell'epitelio respiratorio autologhe e cellule mononucleari autologhe del midollo osseo) sono state seminate nella trachea decellularizzata direttamente nel momento dell'operazione (Laurence, 2010). Questo approccio è stato utilizzato successivamente in nove pazienti con tumori all'interno di un trial clinico approvato dal Ministero della Salute (Curcio *et al.*, 2010; Baiguera *et al.*, 2012), senza riscontrare, dopo 12-42 mesi di follow-up, alcuna mortalità correlata al trapianto.

## 1.7 Prospettive future

I recenti progressi nello sviluppo di protocolli per la decellularizzazione di organi interi hanno consentito la produzione di scaffold biologici con i componenti funzionali e strutturali dell'ECM praticamente inalterati. Anche se tali studi preliminari hanno dimostrato numerosi successi, questi sono perlopiù limitati ad animali di piccole dimensioni, pertanto devono essere affrontate ancora diverse sfide prima di arrivare alle applicazioni cliniche. È necessario innanzitutto definire la fonte ottimale di organi da decellularizzare e successivamente mettere a punto dei processi di ricellularizzazione efficienti, utilizzando p.e. le cellule autologhe del paziente.

La decellularizzazione potrà permettere la rigenerazione tissutale su scala clinica: le necessità metaboliche verranno garantite dalla vascolarizzazione che rimane intatta; inoltre verranno mantenute le proprietà della matrice extracellulare nativa. Sebbene studi attualmente in corso e passati su diversi organi quali cuore, fegato, polmoni e pancreas testimonino la bontà di questo approccio, esistono ancora alcuni ostacoli. Tutti i tentativi di rigenerazione di organi effettuati ad oggi sono stati realizzati su piccola scala (animale), utilizzando cellule di limitata applicabilità clinica, e mostrando solo una parziale funzionalità *in vivo* a breve termine. Il primo passo nella generazione di tessuto funzionale, che potrebbe essere direttamente trapiantato negli esseri umani, sarà la realizzazione di scaffold corrispondenti agli organi umani in termini di dimensioni e struttura. Anche se si è dimostrato che la decellularizzazione può essere applicata a cuore, polmoni, pancreas, e reni di maiale, primati non umani ed umani, i protocolli dovranno essere ulteriormente migliorati per adattarsi, non solo a forma, tipo, e specie degli organi in questione, ma anche ai parametri del donatore come l'età, il tempo di ischemia dell'organo, e la zona della superficie corporea interessata. Gli scaffold risultanti dovranno essere clinicamente

riproducibili, sterili, e conservabili per le successive elaborazioni. Oltretutto, la loro immunogenicità dovrà essere attentamente valutata per avvicinarsi il più possibile alla realtà clinica.

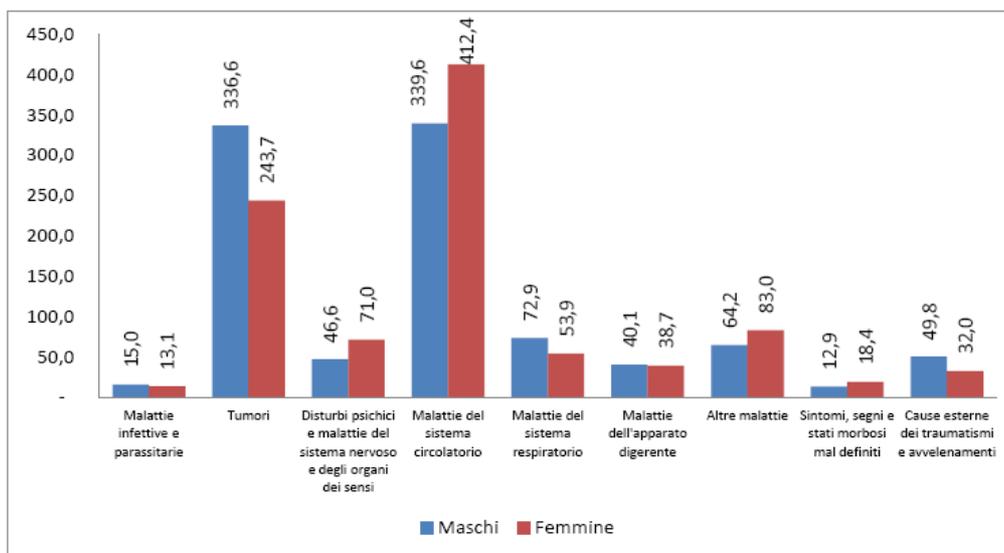
Le proteine della matrice extracellulare sono tra le più conservate (Hutter *et al.*, 2000), alcuni componenti degli scaffold di matrice extracellulare decellularizzata come il collagene di tipo I bovino hanno riscontrato un ampio successo in applicazioni terapeutiche (Badylak *et al.*, 2002), nonostante questo la decellularizzazione può creare o lasciare epitopi antigenici residui (Badylak e Gilbert 2008). Gli organi animali potrebbero diventare una valida alternativa per quanto riguarda la fonte dei tessuti da utilizzare nella rigenerazione di organi umani, tuttavia gli antigeni specifici della specie dovrebbero essere rimossi (Badylak e Gilbert 2008; Raeder *et al.*, 2002). I tessuti di donatori umani usati per i prodotti di matrice dermica e gli allotrapianti ossei sono considerati relativamente sicuri data la rigorosa selezione dei donatori ed elaborazione del materiale che riducono drasticamente il rischio di trasmissione di malattie e/o di contaminazione da agenti patogeni (Boyce *et al.*, 1999). L'FDA (Food and Drug Administration) ha approvato l'uso su larga scala di osso decellularizzato e di trapianti cutanei; ciò dimostra che i protocolli di decellularizzazione possono essere applicati all'uso clinico ed essere disponibili per un gran numero di pazienti. Assicurarsi della qualità e della scala cliniche degli scaffold è solo uno dei molti passi verso la rigenerazione di organi vitali e funzionali.

# Capitolo 2

## L'ingegnerizzazione dei tessuti vascolari

### 2.1 Introduzione

Le malattie cardiovascolari rappresentano la principale causa di morte nell'Unione Europea e sono all'origine del 40% circa dei decessi, per un totale di 2 milioni all'anno. Anche nel nostro Paese le malattie cardiovascolari rappresentano la principale causa di morte, essendo responsabili del 44% di tutti i decessi (377 morti ogni 100.000 abitanti). Distinguendo per genere, si riscontrano 339,6 morti nei maschi e 412,4 per le femmine ogni 100.000 abitanti (**figura 2.1**).



*Figura 2.1: Mortalità per gruppi di cause – Anno 2008 (quozienti per 100.000 residenti)*

*Fonte: Annuario ISTAT 2011*

Queste patologie sono principalmente conseguenza dell'*aterosclerosi*, una malattia che colpisce la parete delle arterie, causandone un restringimento parziale ma progressivo e che può condurre a una loro totale occlusione. È un complesso e lento processo degenerativo vascolare che colpisce tutti i distretti e, in particolare, le coronarie. La lesione caratteristica è l'ateroma o placca aterosclerotica, un ispessimento della tonaca intima delle arterie causato dalla deposizione di materiale lipidico e dalla proliferazione di tessuto connettivo (Schoen e Cotran, 2000). Ad oggi non sono ancora note le reali cause dell'aterosclerosi, è però indubbio che lo stile di vita abbia una notevole influenza sullo sviluppo della malattia e la comparsa delle complicanze. Non a caso, l'aterosclerosi è considerata la malattia del benessere per antonomasia.

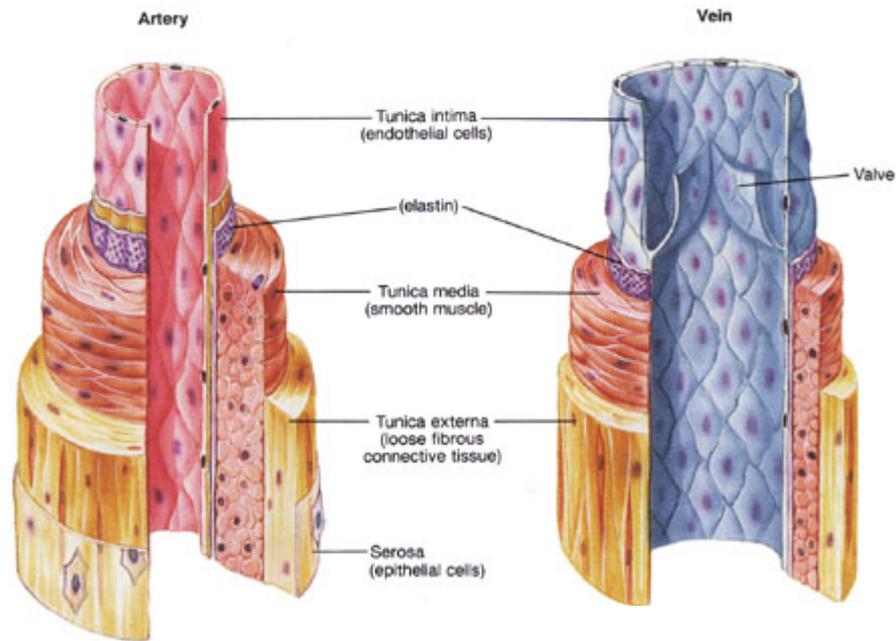
L'approccio medico per la prevenzione di questa patologia è incentrato inizialmente sulla riduzione dei fattori di rischio che ne contribuiscono all'eziologia. Questi fattori di rischio comprendono l'ipercolesterolemia, il fumo, il diabete, l'ipertensione e l'obesità. Non sempre la riduzione dei fattori di rischio è però sufficiente, anzi nella maggior parte dei casi è richiesto un intervento chirurgico atto a ripristinare il lume del vaso occluso per riportare la portata sanguigna a livelli di sicurezza.

La tecnica chirurgica che prende il nome di bypass aorto-coronarico (CABG - Coronary Artery Bypass Grafting), è finalizzata a ripristinare il corretto apporto di sangue al tessuto cardiaco a valle dell'occlusione mediante la realizzazione di un bypass tramite il quale un tratto di vaso sano viene anastomizzato con la coronaria a valle del restringimento, in modo da creare un ramo pervio, parallelo al vaso originario. I vasi più utilizzati come bypass sono l'arteria mammaria interna, che decorre all'interno della cassa toracica, subito dietro lo sterno, e la grande vena safena, che decorre nel versante interno degli arti inferiori. Talvolta, nei casi in cui questi vasi non siano disponibili, si ricorre all'impiego dell'arteria radiale, collocata nell'avambraccio. Sebbene i risultati di CABG

con vasi autologhi siano molto positivi, questa procedura presenta alcuni limiti che spingono verso la ricerca di un approccio differente. Infatti, alcuni pazienti (circa il 10-25%) non possiedono vasi autologhi utilizzabili per il bypass; i problemi possono essere legati sia a possibili precedenti asportazioni, sia alla presenza di patologie, sia alle dimensioni. Inoltre, anche qualora siano disponibili vasi autologhi con caratteristiche adeguate, è importante considerare che per ogni paziente la disponibilità di vasi utilizzabili è limitata e che la durata dell' intervento è maggiore, richiedendo un duplice campo operatorio, prima, per l'estrazione del vaso e, successivamente, per il suo reinnesto (Lyman *et al.*, 1977). Inoltre, va evidenziato che l'affidabilità a lungo termine dei graft venosi autologhi non è ottima: a un anno dall'intervento la percentuale di restenosi dei graft venosi è del 15%, a tre anni del 20%, a sei anni del 30% e del 40-50% a dieci anni. Per quanto concerne i graft arteriosi le percentuali sono 1%, 5%, 7% e 13% in corrispondenza degli stessi intervalli temporali (Goldman *et al.*, 2004). Pertanto la ricerca è indirizzata verso la realizzazione di valide alternative, considerando il fatto che un graft vascolare efficiente dovrebbe possedere una serie di caratteristiche, tra cui la biocompatibilità, la compatibilità dal punto di vista delle proprietà meccaniche, fisiche e chimiche, il mantenimento della pervietà a lungo termine, la facilità di ottenimento ed impiego e la sterilità.

## 2.1.2 Struttura e proprietà meccaniche dei vasi sanguigni

La parete vascolare è una struttura a tonache sovrapposte che presenta notevoli differenze in relazione alla tipologia di vaso. In generale, la parete vascolare è costituita da tre strati concentrici che, procedendo dall'interno verso l'esterno, sono: la tonaca intima, la tonaca-media e la tonaca avventizia (**figura 2.2**).



*Figura 2.2. Schema della struttura di vasi arteriosi e venosi. Tratto da Fox, Stuart I. Human Physiology 4th Brown Publishers*

La **tonaca intima** è costituita da un singolo strato di cellule endoteliali direttamente in contatto con il sangue che scorre nel vaso, e da un sottile strato di connettivo subendoteliale contenente fibre di collagene. Fra l'intima e la media, è interposta la lamina (o membrana) elastica interna costituita da fibre di elastina. Dato il suo esiguo spessore, la tonaca intima contribuisce in modo trascurabile alle caratteristiche meccaniche delle arterie.

La **tonaca media** rappresenta lo strato più spesso della parete ed ha strutture differenti nelle diverse parti del sistema vascolare: in base alla sua costituzione condiziona il comportamento funzionale delle arterie. Nelle grandi arterie più prossime al cuore, la media è costituita da lamine elastiche fenestrate, alternate a strati di tessuto connettivo ricco di fibre di collagene e a strati di fibre muscolari lisce. Nelle arterie più piccole invece, la media è costituita soprattutto da cellule muscolari lisce e da una piccola parte di tessuto

connettivo, contenente collagene ed elastina. Le cellule muscolari sono organizzate in una struttura a strati, avvolta ad elica con passo variabile

La **tonaca avventizia** può, in alcuni casi, avere lo stesso spessore della media ed è composta da fasci di fibre di collagene in direzione longitudinale al vaso. Sono presenti anche fibre di elastina. È un tessuto altamente vascolarizzato e tramite una rete di vasi fornisce la maggior parte del nutrimento alla media. Inoltre la tonaca avventizia è separata dalla media da un'ulteriore lamina elastica. Questo strato protegge il vaso e ne permette l'ancoraggio ai tessuti circostanti. La tonaca avventizia è attraversata, inoltre, da fibre nervose e vasi linfatici. Nel caso di vasi di grandi dimensioni, essa è perfusa da un sistema di piccoli vasi, detti *vasa vasorum*, deputati al trasporto di ossigeno e sostanze nutritive ai tessuti della parete (Redaelli e Montecvecchi, 2007).

Gli elementi strutturali che, in proporzioni diverse a seconda del tipo di vaso, vanno a comporre gli strati sono: le cellule endoteliali, le fibre di elastina, le fibre di collagene e le fibre muscolari lisce.

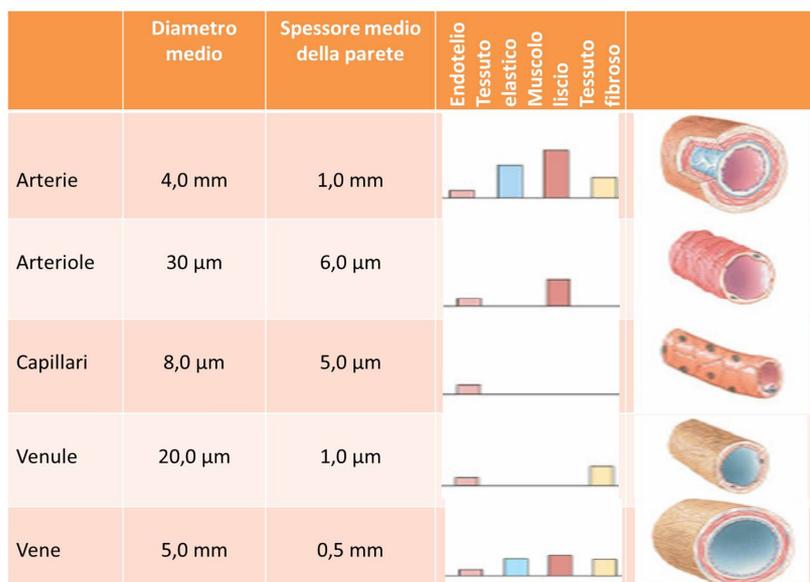
L'**endotelio** forma il rivestimento interno delle arterie e di tutti gli altri organi cavitari dell'apparato vascolare sanguigno. È composto da cellule appiattite, disposte in un unico strato, di forma poligonale o allungate secondo l'asse del vaso, unite tra loro da giunzioni occludenti. Oltre a provvedere ai fenomeni nutritivi della parete arteriosa, l'endotelio svolge compiti di grande importanza nella fisiologia dell'apparato vascolare sanguigno grazie ai sistemi enzimatici localizzati sulla superficie delle cellule. In condizioni di lesione della parete vascolare, l'endotelio contribuisce rilasciando sostanze che intervengono nei meccanismi di coagulazione, emostasi e riparazione del danno. Questi stessi meccanismi tuttavia sono anche alla base dei processi di trombosi endoarteriosa in caso di lesione patologiche della parete vasale (aterosclerosi). L'endotelio

ha capacità rigenerative e, in caso di ricanalizzazione del tratto trombotico di una arteria, partecipa ai fenomeni ricostruttivi.

Alle **cellule muscolari** lisce invece, spetta la capacità di modificare attivamente l'ampiezza del lume arterioso. Queste cellule sono orientate in direzione circonferenziale e la loro contrazione fa variare, ovviamente, la rigidità del tessuto. Le cellule muscolari lisce sono inoltre importanti, perchè producono la matrice extracellulare.

Le **fibre elastiche** e le **fibre collagene** rappresentano le strutture responsabili delle proprietà di resistenza e di deformabilità delle arterie. Sono gli elementi costitutivi dell'elastina e del collagene, proteine strutturali insite in quasi tutti i tessuti biologici. La combinazione del collagene e dell'elastina presenti nel vaso produce, nel complesso, una struttura di natura anisotropa viscoelastica che mostra un'elasticità maggiore a pressioni basse e una maggior rigidità a pressioni (Baguneid *et al.*, 2006; Isenberg *et al.*, 2006).

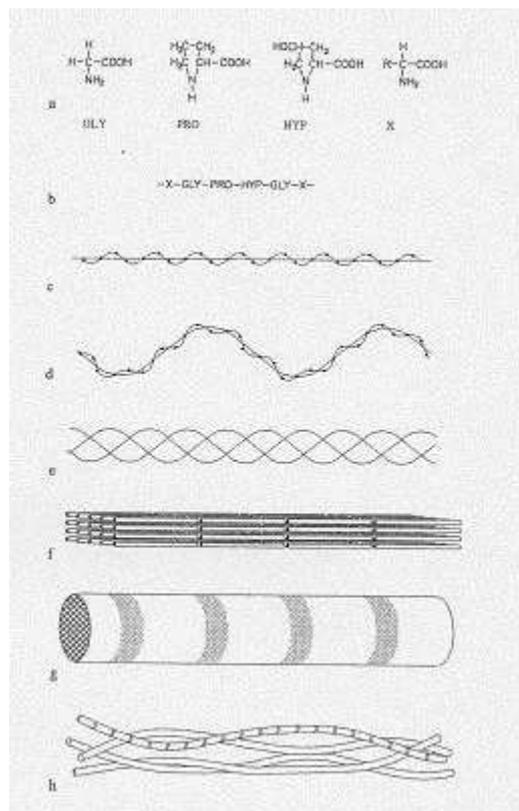
Le proprietà meccaniche del vaso sono determinate dalle proprietà meccaniche degli elementi che costituiscono la parete del vaso (elastina, collagene, fibre muscolari), presenti in proporzioni diverse in vene e arterie. In **figura 2.3** sono schematizzate le quantità degli elementi strutturali nelle diverse tipologie di vaso al variare del calibro; si nota come nelle grandi arterie il contenuto di elastina sia molto più significativo rispetto alle vene nelle quali, invece, è maggiore il contenuto di fibre di collagene.



**Figura 2.3 I vasi sanguigni. Dimensioni e struttura**

Il **collagene** è una proteina strutturale presente nella maggior parte dei tessuti biologici. Questi tessuti comprendono la pelle, i tendini, la cartilagine, i tessuti vascolari, ecc. La struttura chimica di base del collagene è costituita da tre amminoacidi fondamentali [glicina (GLY), prolina (PRO), idrossiprolina (HYP)] più un quarto amminoacido (X), arrangiati nella sequenza tipica GLY, PRO, HYP, GLY, X. La presenza dell'idrossiprolina è specifica nel collagene, tanto che la determinazione del suo contenuto in un tessuto, consente di calcolare le quantità di collagene nel tessuto stesso. I polimeri liberi di collagene, come mostrato in **figura 2.4**, interagiscono tra di loro sotto forma di tripla elica. Le triple supereliche del collagene sono fra loro legate da legami idrogeno e da veri e propri legami (cross-links) fra le eliche. Si formano pertanto fibrille di collagene che si combinano a loro volta in fibre di diametro pari a 0,2-1,2 µm, molto stabili chimicamente. La particolare struttura delle sue fibre è responsabile del comportamento meccanico del collagene. Infatti, l'arrangiamento elicoidale delle catene proteiche ed i legami intramolecolari fanno sì che nella prima parte dell'allungamento a trazione, le fibre di collagene siano molto deformabili; durante questa fase le fibre ruotano e si flettono

modificando la loro geometria spaziale dalla forma elicoidale a quella lineare. Quando le catene proteiche sono distese, le proprietà meccaniche di resistenza aumentano, diventando dipendenti dai legami intra e intermolecolari. Il collagene è pertanto la fibra dei tessuti biologici responsabile della capacità di resistenza a trazione: avendo un elevato rapporto tra lunghezza e diametro (circa 200), è altamente resistente ma incapace di sopportare le sollecitazioni di compressione.



**Figura 2.4:** a: amminoacidi; b: catena molecolare; c: singola elica; d: singola elica avvolta; e: tripla elica avvolta; f: minifibrille; g: fibrilla di collagene; h: fibre di collagene.

L'**elastina**, il principale componente delle fibre elastiche (70-90%), è una proteina altamente idrofobica estremamente ricca in prolina e glicina ma, a differenza di quanto accade per il collagene, non glicosilata e contenente idrossiprolina ma non idrossilisina. Il precursore è la tropoelastina le cui molecole, dopo essere state secrete all'interno degli

spazi intercellulari, subiscono un cross-linking generando una rete elastica di fibre di elastina a livello di invaginazioni delle membrane cellulari. Sembrerebbe che la desmosina abbia un ruolo come molecola stabilizzatrice del reticolo. L'elastina è anche il maggior componente della matrice extracellulare delle arterie, con funzione strutturale ma non solo. La rottura dell'elastina può, infatti, indurre la proliferazione delle fibre muscolari lisce e, agendo sul tessuto muscolare liscio subendoteliale, può contribuire alla progressione delle patologie arteriose ostruttive. Sembra inoltre avere un'importante funzione regolatoria durante lo sviluppo dei vasi arteriosi, operando il controllo sulla proliferazione delle cellule muscolari lisce e stabilizzando la struttura delle arterie. Durante il funzionamento pulsatile delle arterie, gioca un ruolo fondamentale, agendo come secondo ventricolo: il sangue espulso dal ventricolo viene in parte immagazzinato durante la sistole dalla dilatazione delle grandi arterie, per poi venire messo in circolazione durante la diastole. Grazie ai legami fra le catene proteiche, ha un'altissima elasticità e la sua funzione è quella di produrre, senza spesa energetica, una tensione elastica che si oppone alla forza distensiva della pressione sanguigna.

La **muscolatura liscia** svolge una funzione di vasoregolazione attiva che permette la variazione del diametro del lume del vaso in funzione dei fattori chimici rilasciati dalle cellule endoteliali vascolari. Le cellule muscolari lisce collaborano nella produzione di matrice extracellulare, sono orientate in direzione circonferenziale e il loro numero, la loro distribuzione e la loro capacità contrattile influenzano la rigidità del tessuto.

I diversi rapporti tra gli elementi costitutivi della parete vasale determinano le diverse proprietà meccaniche di arterie e vene: l'abbondanza di elastina e fibre di collagene rende le arterie consistenti, comprimibili e dotate di grande deformabilità elastica; viceversa, la predominanza di strutture fibrose e fasci muscolari, rispetto agli elementi

elastici, rende le vene più soggette al collasso per effetto di pressioni esercitate dall'esterno (Redaelli e Montecvecchi, 2007).

L'indice di *compliance* rende possibile quantificare queste differenze biomeccaniche. La *compliance* esprime la capacità dei vasi sanguigni di dilatarsi elasticamente per effetto di una pressione crescente, per poi tornare al volume iniziale, restituendo il volume di sangue accumulato, per effetto di una pressione decrescente. La *compliance* (C) definisce, quindi, la misura del rapporto tra l'aumento pressorio ( $\Delta P$ ) e il conseguente aumento di volume ( $\Delta V$ ) del vaso. Le fibre elastiche presentano elevata *compliance*, mentre, le fibre di collagene sono fibre a bassa *compliance*; i diversi rapporti tra elastina e collagene all'interno di vene e arterie determinano i diversi valori di *compliance* nei due tipi di vasi.

### 2.1.3 Protesi vascolari

L'indisponibilità di vasi autologhi da utilizzare come protesi in chirurgia vascolare ha reso necessario l'utilizzo di vasi artificiali che purtroppo, allo stato attuale, non garantiscono lo stesso livello di prestazioni e hanno un tasso di fallimento ancora abbastanza elevato dovuto principalmente alla mancata crescita di cellule endoteliali all'interno del vaso artificiale e alla diversa risposta meccanica fra arteria elastica e innesto rigido. Lo studio di materiali sintetici atti alla fabbricazione di vasi artificiali è in corso ormai da cinquant'anni. L'iniziale fallimento di materiali come il metallo, il vetro, l'avorio, la seta ed il nylon hanno portato all'attenzione criteri come durezza e assenza di trombogenesi; la ricerca è stata quindi indirizzata a materiali inerti che interagiscano in modo minimo con i tessuti, in particolare con il sangue (Xue *et al.*, 2003). I principali materiali sintetici utilizzati per realizzare protesi vascolari sono il polietilene tereftalato (PET), comunemente noto come Dacron<sup>®</sup>, e il politetrafluoroetilene espanso (ePTFE).

Attualmente le protesi vascolari di grande diametro interno (superiore ai 10 mm) utilizzate in clinica sono realizzate in Dacron<sup>®</sup>, mentre le protesi di medio diametro (da 6 a 10 mm) sono nel 75% dei casi in ePTFE non tessuto (Goretex<sup>®</sup>) e nel 25% in Dacron<sup>®</sup>. Infine, le protesi vascolari di piccolo diametro (inferiore ai 6 mm), sia in Dacron<sup>®</sup> che in ePTFE, non sono allo stato attuale utilizzate in clinica poiché la loro pervietà non è soddisfacente. Le cause del fallimento dei graft vascolari sintetici di piccolo diametro sono prevalentemente la trombosi e l'iperplasia intimale alle anastomosi. L'occlusione precoce di un graft di piccolo diametro, specialmente nei distretti a basso flusso, si verifica nei primi 6 mesi dall'impianto ed è correlata alla trombogenicità della superficie interna della protesi. Nel caso di innesti vascolari di grosso diametro, infatti, il sangue scorre velocemente e quindi è a contatto con le pareti del vaso per breve tempo. Questo dà luogo a minori problemi di compatibilità e fenomeni trombotici meno accentuati rispetto ai vasi di piccolo diametro. In questi ultimi invece il flusso è più lento, per cui è maggiore la quantità di sangue che entra a contatto con le pareti ed è pertanto maggiore l'attrito. L'elevato attrito può dar luogo a sforzi locali di taglio con conseguenti perturbazioni del flusso ematico in prossimità della parete del vaso, perturbazioni che possono a loro volta generare zone di ristagno con innesco del processo di aggregazione piastrinica e formazione di trombi. L'insuccesso tardivo dei graft vascolari di piccolo diametro, che avviene fra i 6 mesi e i due anni dall'impianto, è associato all'iperplasia intimale, cioè alla proliferazione e migrazione di cellule muscolari lisce dalla tonaca media all'intima in corrispondenza del sito di anastomosi, con sintesi e deposizione di proteine della matrice extracellulare; questo fenomeno induce il progressivo restringimento del lume del graft e infine la sua occlusione (Sottiurai *et al.*, 1983). Si ritiene che le diverse proprietà elastiche tra protesi vascolare e vaso nativo (*compliance mismatch*) e la mancanza di endotelizzazione del lume dei graft siano responsabili dell'iperplasia intimale (Greenwald e Berry, 2000; Salacinski *et al.*,

2001). Infatti la diversa compliance determina cambiamenti emodinamici a livello del graft sintetico, quali un alterato flusso ematico, un aumento del gradiente di velocità e della tensione ciclica; eventi che causano il rilascio di fattori di crescita stimolanti l'iperplasia intimale (Howard *et al.*, 1997).

Per aumentare le possibilità di successo dei graft vascolari negli ultimi anni la ricerca ha investito grandi risorse per progettare la protesi vascolare ideale, che teoricamente dovrebbe essere costituita da un materiale non trombogenico ed avere proprietà viscoelastiche simili a quelle dei vasi nativi. I graft disponibili in commercio sono lontani da questi requisiti principalmente a causa della loro rigidità.

### **2.1.3.1 Materiali**

I materiali utilizzati sinora per la realizzazione di protesi vascolari possono essere riuniti nella seguente classificazione:

1. polimeri sintetici biodegradabili
2. proteine naturali
3. matrici biologiche decellularizzate

#### **2.1.3.1.1 Polimeri sintetici biodegradabili**

L'utilizzo di biopolimeri sintetici per la creazione di scaffold è senz'altro una scelta vantaggiosa, in quanto risulta semplice modificare un polimero, riuscendo a controllare le proprietà finali dello scaffold come la struttura, la dimensione e l'orientazione dei pori. La composizione polimerica può essere inoltre adattata per creare adeguata resistenza meccanica e degradazione controllabile. I **polimeri biodegradabili** sono materiali che forniscono prestazioni per un periodo di tempo programmabile dopo il quale scompaiono dall'organismo senza richiedere ulteriori interventi chirurgici. I più conosciuti ed utilizzati sono quelli derivanti dalla polimerizzazione dell'acido glicolico e lattico, rispettivamente

PGA e PLA, i loro co-polimeri (quali l'acido poliglicolico, l'acido polilattico, il policaprolattone), e i poliuretani (Tiwari *et al.*, 2002).

L'**acido poliglicolico** (PGA), ampiamente utilizzato come materiale per le suture chirurgiche, viene lentamente idrolizzato dall'acqua e conseguentemente, si degrada in ambiente fisiologico fino ad essere assorbito in circa 4 settimane dall'impianto ed escreto in 4-6 mesi (Yang *et al.*, 2001). Utilizzando scaffold di PGA su cui sono state seminate cellule muscolari lisce porcine tramite un bioreattore a perfusione, Niklason *et al.* hanno ottenuto un sostituto vascolare con caratteristiche istologiche simili a quelle dei vasi nativi (Niklason *et al.*, 1999). L'acido poliglicolico si degrada però troppo velocemente, e sebbene presenti una buona biocompatibilità, i suoi prodotti acidi di degradazione possono causare una risposta infiammatoria. Higgins *et al.* hanno successivamente dimostrato che i prodotti della degradazione del PGA possono causare dedifferenziamento e diminuzione delle capacità mitotiche nelle cellule muscolari lisce (Higgins *et al.*, 2003).

Sono stati inoltre testati altri polimeri sintetici a degradazione lenta quali l'acido polilattico (PLLA) (Mooney *et al.*, 1996), copolimeri del poli(D,L-lattide-co-glicolide) (PLGA) (Mooney *et al.*, 1996), del poli (4-idrossibutirrato) (P4HB) (Opitz *et al.*, 2004), e copolimeri dell'acido poliglicolico e del poliidrossialcanoato (PHA) (Shum-Tim *et al.*, 1999). La biocompatibilità degli scaffold è stata spesso incrementata da modificazioni chimico-fisiche della superficie (McGlohorn *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2000), e nel 2001 è stato condotto in Giappone il primo studio per testare la validità dei polimeri sintetici biodegradabili in pazienti pediatrici affetti da patologie cardiovascolari congenite (Shinoka e Breuer, 2008; Hibino *et al.*, 2010; Naito *et al.*, 2011; Shin'oka *et al.*, 2001). Le protesi vascolari utilizzate erano costituite da PGA e policaprolattone, su cui sono state seminate cellule mononucleari isolate da sangue midollare. Un mese dopo l'impianto, tutti i 25 pazienti reclutati, di età compresa fra 1 e 24 anni, erano vivi e senza

sintomi di stenosi o trombosi e dopo 4 anni di follow-up si è verificata la morte di 4 dei 25 pazienti. Questo primo trial clinico sull'uomo ha dato quindi degli ottimi risultati, nonostante 6 dei pazienti sopravvissuti siano stati successivamente sottoposti ad angioplastica a causa della stenosi sviluppatasi nel graft, non c'è stato comunque alcun caso di emorragia o infezioni secondarie.

I **poliuretani** sono elastomeri termoplastici con eccellenti proprietà fisiche e rappresentano un'importante classe di materiali impiegati nel settore biomedicale. Sono definiti poliuretani (PU) tutte le sostanze polimeriche contenenti legami uretanici [R – NH – CO – O – R]. A questa categoria appartengono numerosi materiali con caratteristiche, quali densità e rigidità, che possono essere molto diverse tra loro, il che li rende potenzialmente utilizzabili per una vasta gamma di applicazioni. A seconda della loro struttura e composizione, questi materiali possono esistere in forma lineare (PU termoplastici, in genere a segmenti) oppure reticolata (PU termoindurenti), o anche espansa (schiume rigide o flessibili) (Tanzi, 2006). In ambito biomedico i PU lineari trovano applicazione nella realizzazione di dispositivi impiantabili a contatto con il sangue e con i tessuti molli, quali protesi cardiovascolari (ventricoli artificiali, protesi vascolari di piccolo calibro, valvole cardiache biomorfe, cateteri, guide di *pace-makers*), membrane, cannule, tubi endotracheali (Tanzi, 2006). I maggiori limiti dell'impiego di questi materiali in applicazioni a lungo termine sono la scarsa stabilità *in vivo* e la suscettibilità alla calcificazione *in vivo*. I fenomeni di idrolisi e di ossidazione costituiscono, infatti, un limite per impianti a lungo termine, in quanto possono comprometterne il successo; al contrario questi processi possono essere sfruttati per progettare materiali biodegradabili utilizzabili nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti (Gorna e Gogolewski, 2002, 2006). Il grande vantaggio offerto dall'impiego dei PU per la realizzazione di *scaffold*, rispetto ad altri

materiali polimerici, risiede nella grande versatilità di questi polimeri: attraverso un'appropriata selezione dei reagenti di base e dei loro rapporti stechiometrici, è possibile infatti ottenere materiali con differenti proprietà meccaniche (rigidezza o flessibilità) e di biocompatibilità e di biodegradabilità (Anderson *et al.*, 1998; Tanzi *et al.*, 2003). In fase di sintesi, quindi, è possibile progettare materiali con proprietà meccaniche e strutturali desiderate per la specifica applicazione, che possiedano contemporaneamente adeguate cinetiche di degradazione, per permettere la rigenerazione di un tessuto sano e maturo.

Grazie alla loro flessibilità, forza tensile e allungamento, i PU sono stati utilizzati per realizzare palloni coronarici ed intra-aortici e componenti del cuore artificiale (Hergenrother *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1991). Le protesi vascolari microporose in poliuretano possiedono una compliance simile alle arterie naturali, caratteristica che le rende adatte all'utilizzo nelle procedure di by-pass (Hsu *et al.*, 2000; Tiwari *et al.*, 2000). Tuttavia ad oggi le protesi in poliuretano hanno dato risultati clinici variabili a causa della loro trombogenicità e velocità di degradazione che possono portare alla formazione di aneurisimi (van der Lei *et al.*, 1987). Negli ultimi anni si è pertanto tentato di mettere in atto diverse strategie per ridurre la suscettibilità alla degradazione e la trombogenicità dei PU, p.e. combinandoli con altri polimeri in modo da aumentarne la stabilità, o modificandone la superficie con molecole bioattive in modo da ridurre la trombogenicità, fra cui in particolare la Gelatina di tipo A, ossia collagene denaturato tramite trattamento acido.

#### **2.1.3.1.2 Polimeri naturali**

Un'alternativa all'utilizzo di materiali sintetici per la realizzazione di protesi vascolari è data dalla possibilità di utilizzare proteine che naturalmente costituiscono la matrice extracellulare delle pareti vasali native, le quali rappresentano i substrati ideali per

l'adesione e la segnalazione cellulare. Una di queste proteine è il collagene di tipo I, uno dei principali componenti dell'ECM dei vasi sanguigni (Alberts *et al.*, 1994), utilizzato per realizzare la prima protesi vascolare ingegnerizzata da Weinberg e Bell nel 1986 (Weinberg e Bell, 1986). Tale protesi è stata realizzata seminando cellule endoteliali, muscolari e fibroblasti bovini, su strutture tubulari di collagene rinforzato da una maglia di Dacron®, posta all'esterno in modo da supplire all'altrimenti scarsa resistenza meccanica. I fibroblasti infatti, interagendo con le fibrille di collagene, si contraggono e compattano la matrice del gel, aumentandone così la densità. Sono stati eseguiti successivamente tentativi atti ad incrementare la resistenza meccanica dei gel di collagene con discreto successo (Tranquillo *et al.*, 1996; Girton *et al.*, 1999; Seliktar *et al.*, 2000).

Altri tentativi sono stati eseguiti utilizzando gel di fibrina. La fibrina è la principale proteina strutturale presente in un coagulo sanguigno e può facilmente essere isolata dal plasma (Gilbert *et al.*, 2001). All'interno di un gel di fibrina le cellule sono in grado di proliferare e sintetizzare collagene e fibre elastiche in misura maggiore rispetto a quanto accade in un gel di collagene (Grassl *et al.*, 2002; Long *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 2003) determinando la produzione di un tessuto più rigido e resistente (Grassl *et al.*, 2003). Un esempio di graft vascolare realizzato utilizzando gel di fibrina è quello descritto dal gruppo di Swartz, dove vengono incorporate nel gel cellule muscolari lisce ed endoteliali ovine (Swartz *et al.*, 2005). Il graft è stato successivamente impiantato nella giugulare di alcuni agnelli ed è rimasto pervio per 15 settimane. In seguito ad analisi istologica, è stata rivelata nel costrutto la presenza sia di collagene che di elastina, e proprietà meccaniche comparabili a quelle dei vasi nativi.

Altri tentativi sono stati condotti esplorando anche il potenziale di altre proteine dell'ECM, quali l'elastina (Patel *et al.*, 2006; Lillie e Gosline, 2002; Silver *et al.*, 2001; Silver *et al.*, 2003), che risulta però più difficile da isolare e purificare rispetto al collagene

o alla fibrina. Studi più recenti si sono concentrati sull'utilizzo di proteine ricombinanti e ingegnerizzate che mimano le funzioni delle proteine strutturali dell'ECM (Nagapudi *et al.*, 2005; Cappello *et al.*, 1990; McGrath *et al.*, 1990; Meyer e Chilkoti, 2002) ovviando il problema dell'isolamento e purificazione delle proteine native.

### **2.1.3.1.3 Matrici biologiche decellularizzate**

L'approccio più recente per la realizzazione di sostituti funzionali dei vasi di piccolo calibro è certamente quello che prevede l'utilizzo di matrici biologiche decellularizzate. Sono stati effettuati studi utilizzando matrici provenienti da tessuti e organi di differenti specie animali (Allaire *et al.*, 1997; Chow e Zhang, 2011; Conklin *et al.*, 2002; Conklin *et al.*, 2002; Goissis *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2004; Schaner *et al.*, 2004; Sheridan *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010), e differenti protocolli di decellularizzazione (Gilbert *et al.*, 2006). Nel 1999, il gruppo di Sullivan (Huynh *et al.*, 1999) ha sviluppato un costrutto vascolare ingegnerizzato utilizzando la sottomucosa di intestino tenue suino (SIS) e il collagene bovino di tipo I. Nello specifico la sottomucosa dell'intestino suino è stata decellularizzata e successivamente il lume è stato impregnato col collagene di tipo I. Tali costrutti sono stati poi impiantati in carotidi di coniglio per 90 giorni, dimostrando un'eccellente pervietà senza iperplasia né formazione di aneurismi. Nel 2000 il gruppo di Haverich (Bader *et al.*, 2000) ha sviluppato un protocollo di decellularizzazione basato sull'utilizzo della tripsina per rimuovere le cellule da aorte porcine, e successivamente un protocollo di ricellularizzazione perfondendo, tramite bioreattore, cellule endoteliali umane e miofibroblasti. Per valutare la risposta immunitaria *in vivo* generata da tali costrutti, questi sono stati impiantati sottocute in ratti, dimostrando di innescare una minore produzione di leucociti e linfociti T rispetto ai controlli rappresentati dalle aorte suine non decellularizzate. Nel 2001, Mayer e collaboratori (Kaushal *et al.*, 2001) hanno decellularizzato chimicamente vasi iliaci suini, che hanno

successivamente ripopolato, tramite bioreattore, con progenitori endoteliali (EPCs) ovini. Dopo 4 giorni all'interno del bioreattore i costrutti sono stati impiantati in carotidi ovine tramite anastomosi termino-terminale. I vasi hanno mantenuto la pervietà per 120 giorni grazie alla presenza dei progenitori endoteliali; nei vasi di controllo, che sono stati decellularizzati ma non ripopolati con EPCs, si è infatti riscontrata occlusione entro 15 giorni. Inoltre le matrici ripopolate con EPCs hanno mostrato un'attività contrattile, e una capacità di rilassamento vascolare mediata dal nitrossido, simili a quelle dei vasi nativi.

Più recentemente i gruppi di Soker e di Chaudhuri hanno ottenuto dei sostituti vascolari ingegnerizzati con buone proprietà meccaniche seminando cellule endoteliali e miofibroblasti, rispettivamente su vene safene umane e aorte di suino (Amiel *et al.*, 2006; McFetridge *et al.*, 2004), ed è del 2012 il primo utilizzo in clinica di vasi decellularizzati. In uno studio pubblicato su Lancet viene infatti descritto il primo trapianto di vena allogenica cadaverica decellularizzata, ripopolata con cellule staminali autologhe, eseguito su una paziente pediatrica affetta da ostruzione extraepatica della vena porta, tuttora sotto controllo (Birchall e Hamilton, 2012).

La ridotta disponibilità di vasi umani, di cui già discusso nel capitolo 1, rende quest'ultimo approccio però poco utilizzabile, per questo l'obiettivo della ricerca è quello di approfondire gli studi relativi alla realizzazione di sostituti vascolari a partire da matrici xenogeniche.

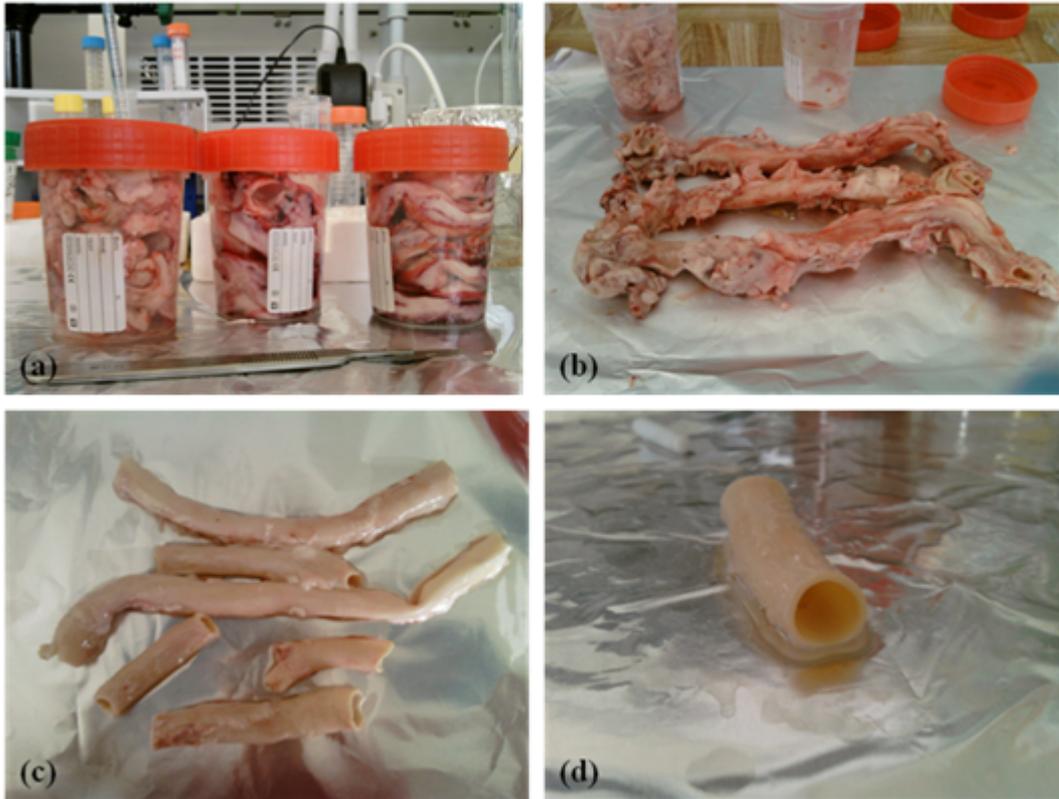
Pertanto durante il presente lavoro di tesi mi sono occupata della messa a punto di un protocollo di decellularizzazione di arterie carotidi ovine, vasi dal diametro interno inferiore ai 6 mm, caratterizzando la matrice ottenuta sia dal punto di vista morfologico, sia da quello meccanico, con lo scopo di ottenere uno scaffold funzionale da utilizzare nella realizzazione di sostituti vascolari ingegnerizzati di piccolo calibro. Inoltre ho valutato la biocompatibilità *in vitro* di uno scaffold, prodotto, tramite la tecnologia spray ad inversione

di fase, dal gruppo del Dott. Soldani dell'Istituto di Fisiologia Clinica del CNR di Massa, costituito da poliuretano trattato con gelatina di tipo A.

## 2.2 Materiali e metodi

### 2.2.1 Raccolta delle carotidi

Le arterie carotidi ovine sono state prelevate presso un mattatoio locale (CO.AL.BE. dei F.lli Contu & C.s.n.c., Cagliari) da pecore adulte destinate al macello. I vasi sanguigni sono stati immediatamente trasportati in laboratorio in ghiaccio, evitando la coagulazione del sangue e facendo attenzione a limitare il tempo di ischemia a non oltre un'ora dal prelievo. Dopo essere stati trasportati in laboratorio, i vasi sanguigni sono stati ripuliti dal grasso e dal connettivo in eccesso, e successivamente tagliati in frammenti di lunghezza di circa 5 cm, come mostrato in **figura 2.5**. Un frammento è stato immediatamente fissato in formaldeide al 4% per 4 ore, al termine delle quali è stato conservato in tampone fosfato (PBS) a 4°C, in modo da poter essere utilizzato come controllo non trattato. Gli altri frammenti sono stati posti in agitazione per 30 minuti in una soluzione contenente penicillina/streptomomicina all'1% e amfotericina al 2% in PBS per evitare le contaminazioni batteriche e fungine, e successivamente congelati a -20°C sino al processamento. Inoltre, dal momento dell'arrivo in laboratorio, tutte le fasi del processamento sono state eseguite all'interno di una cappa a flusso laminare e utilizzando soluzioni sterili.



**Figura 2.5.** *Campioni di carotidi ovine.* (a) e (b) mostrano le carotidi prima della rimozione del grasso e del connettivo in eccesso; (c) mostra le carotidi dopo la pulizia; (d) mostra i frammenti tagliati prima del congelamento.

## 2.2.2 Protocolli di decellularizzazione

I frammenti di carotide da sottoporre ai trattamenti decellularizzanti sono stati scongelati a temperatura ambiente; al termine dello scongelamento un frammento è stato immediatamente fissato in formaldeide al 4 % per 4 ore e successivamente conservato in PBS a 4°C, in modo da ottenere un controllo per valutare gli eventuali effetti dello scongelamento.

Le carotidi sono state decellularizzate secondo due differenti protocolli, entrambi eseguiti in agitazione all'interno di un agitatore termostato a 37 °C:

1. Il primo gruppo di vasi è stato posto in agitazione per 36 ore in una soluzione di PBS contenente sodio dodecilsolfato (SDS) all'1%, penicillina/streptomicina all'1% e amfotericina al 2 %.

2. Il secondo gruppo di carotidi è stato trattato per 24 ore con una soluzione di PBS contenente lo 0,05 % di Tripsina, lo 0,02% di EDTA (acido etilendiamminotetracetico) e, anche in questo caso, l'1% di penicillina e streptomicina e il 2 % di amfotericina. Dopo 24 ore sono stati eseguiti 3 lavaggi da 20 minuti ciascuno in PBS, al termine dei quali le carotidi sono state incubate per ulteriori 24 ore in PBS contenente Triton X-100 all'1%, 1% di penicillina/streptomicina e il 2% di amfotericina.

Ciascun trattamento è stato eseguito in triplicato, e per ciascun gruppo sperimentale sono stati considerati come controlli dei frammenti di carotide sottoposti, per gli stessi tempi, all'agitazione nel solo PBS contenente gli antibiotici e l'amfotericina.

Infine, i campioni sono stati lavati in PBS per 30 minuti e successivamente incubati in una soluzione di PBS contenente 1,2 mg/ml di DNasi e RNasi per 2 ore, al termine delle quali tutti i campioni sono stati sottoposti a 5 lavaggi in PBS da 20 minuti ciascuno, per rimuovere ogni residuo di detergenti, antibiotici ed enzimi.

### **2.2.3 Analisi istologica**

Per rendere il campione adatto all'analisi morfologica è necessario innanzitutto procedere alla sua fissazione. La fissazione è una procedura che porta alla morte rapida del tessuto tramite l'interruzione dei processi cellulari e stabilizza le strutture cellulari e tissutali poiché rende insolubili i componenti citosolici e inattiva gli enzimi autolisanti.

I campioni sono stati fissati con un fissativo aldeidico, la formaldeide, in grado di formare legami chimici con il gruppo amminico delle proteine. A seconda della tipologia di tessuto e delle sue dimensioni è possibile seguire diversi protocolli di fissazione per

l'allestimento dei campioni per la microscopia ottica. Nel nostro caso i frammenti di carotide sono stati immersi in una soluzione di formaldeide al 4% diluita in PBS 0,1 M pH 7,4 per 4 ore a temperatura ambiente. I campioni sono stati poi immersi in PBS e conservati a 4°C fino all'inizio della procedura finalizzata all'inclusione in paraffina.

La paraffina è un mezzo d'inclusione idrofobo ottenuto da residui della distillazione del petrolio. È insolubile in acqua, ma è in grado di sciogliersi in solventi quali etere, xilolo, cloroformio. Dal punto di vista chimico consiste in una miscela di idrocarburi alifatici e proprio per le sue caratteristiche chimiche è necessario provvedere a una serie di procedimenti che preparino il campione all'immersione in paraffina. Il primo di questi è la fase di disidratazione durante la quale il campione viene immerso in miscele di acqua e alcool etilico (Merck) in concentrazione crescente fino all'alcool assoluto. In questo modo viene eliminata lentamente e progressivamente l'acqua dal campione senza provocare l'alterazione né la coartazione del tessuto che acquisisce così le proprietà chimiche adatte all'interazione con il solvente del mezzo d'inclusione, lo xilolo (Merck). Lo xilolo è ben miscibile con l'alcool assoluto a cui si sostituisce nel corso di tre passaggi successivi ed essendo un buon solvente della paraffina aumenta l'idrofobicità del campione e lo prepara alla successiva inclusione. L'immersione dei campioni in xilolo è definita chiarificazione per l'aspetto diafano assunto dai frammenti di tessuto; ad esso seguono 2 passaggi successivi in paraffina liquida (Merck, punto di fusione a 56-58 °C). Durante questa fase di infiltrazione la paraffina penetra uniformemente nei tessuti e si sostituisce gradualmente allo xilolo.

Il protocollo seguito, completo di disidratazione, chiarificazione e infiltrazione in paraffina, è stato il seguente:

- ▶ immersione in etanolo 70% per una notte a temperatura ambiente;
- ▶ 3 passaggi da 30 minuti ciascuno in etanolo 96% a temperatura ambiente;

- ▶ 3 passaggi da 30 minuti in etanolo 100% a temperatura ambiente;
- ▶ 3 passaggi da 30 minuti in xilolo a temperatura ambiente;
- ▶ 2 passaggi da 60 minuti in paraffina fusa a 60°C.

I campioni sono stati a questo punto trasferiti in vaschette di metallo riempite di paraffina fusa e posizionati con la superficie di interesse per il taglio rivolta verso il fondo delle vaschette. Su di esse sono stati poi posizionati dei supporti in plastica anch'essi riempiti di paraffina così che il lento raffreddamento delle vaschette permettesse la solidificazione della paraffina intorno al frammento e all'interno del supporto. Una volta raffreddato e rimosso dalla vaschetta metallica, si è ottenuto un blocchetto in paraffina pronto per il taglio al microtomo.

Per poter procedere al taglio del campione, la superficie di taglio del blocchetto di paraffina è stata adeguatamente ridotta a formare un trapezio con il campione al centro e il blocchetto è stato posizionato sul supporto di un microtomo a rotazione con la base minore del trapezio rivolta verso l'alto. Sono state effettuate delle sezioni da 4 µm, per facilitare la messa a fuoco durante l'osservazione dei campioni in microscopia. Tali sezioni sono state raccolte su vetrini polarizzati, i quali grazie alla carica elettrostatica garantiscono l'adesione della sezione tagliata, e lasciate in stufa per una notte per ottenere una migliore adesione al vetrino.

Sui vetrini così ottenuti è stato possibile eseguire un'indagine morfologica tramite colorazione con ematossilina-eosina, tricromica di Masson, tricromica di Verhoeff-van Gieson e analisi immunoistochimica.

Tutti i coloranti utilizzati sono in soluzioni acquose e per questo è stato necessario eseguire prima passaggi in xilolo per rimuovere la paraffina e poi immersioni in soluzioni di etanolo e acqua distillata a concentrazioni decrescenti al fine di reidratare i tessuti del campione. Il protocollo seguito prevede:

- ▶ 2 passaggi da 10 minuti ciascuno in xilene;
- ▶ lavaggi da 5 minuti in etanolo a concentrazione decrescente (100%, 96%, 70%, 50%);
- ▶ passaggio in acqua distillata per 5 minuti.

Al termine delle procedure di sparaffinatura e reidratazione è possibile immergere i campioni nelle soluzioni coloranti previste dalle diverse metodiche.

### 2.2.3.1 Colorazione ematossilina - eosina

L'ematossilina-eosina è una colorazione progressiva che prevede l'utilizzo di due tipi di coloranti acquosi per aumentare il contrasto dei vari componenti del tessuto e ottenere un quadro generale della sua composizione.

L'**ematossilina** è un composto naturale estratto dal legno di campeggio che sviluppa proprietà coloranti una volta ossidato a ematina. Quest'ultima sfrutta le proprietà di un mordente, cioè di un intermedio, per legare i componenti carichi negativamente del tessuto: trattandosi di un colorante con proprietà basiche ha, infatti, grande affinità per le componenti acide del campione e determina per questo la colorazione blu dei nuclei. A seconda del mordente usato, alluminio, ferro, cromo, ecc., si distinguono ematossiline alluminiche (o emallumi), ematossiline ferriche, ematossiline cromatiche, ecc. In laboratorio è stata usata ematossilina di Mayer già pronta per l'uso (Merck).

L'**eosina** è invece un colorante artificiale con caratteristiche acide che comportano il suo legame alle strutture basiche abbondanti nel citoplasma, che acquisisce così una colorazione rosa-arancione. Una soluzione acquosa contenente l'1% di eosina è stata preparata a partire dalla polvere (eosina gialla - Merck) sciolta in acqua distillata e successivamente diluita per ottenere una soluzione allo 0,3%. Poiché l'eosina richiede un ambiente acido per lavorare, alla soluzione madre sono state aggiunte poche gocce di acido acetico glaciale al 100% (Merck).

Dopo le procedure di sparaffinatura e reidratazione del campione i vetrini sono stati immersi nell'ematossilina di Mayer (Merck) per 10 minuti circa, al termine dei quali le sezioni hanno assunto un'intensa colorazione violacea dovuta a un eccesso di colorante. Al fine di differenziare il colorante i vetrini sono stati messi sotto l'acqua corrente per circa 8 minuti. Si è poi proseguito con un passaggio in eosina allo 0,3% per 3 minuti, con la fissazione del colorante al tessuto tramite passaggi veloci in miscele di alcool e acqua (50%, 70%, 96%) e alcool assoluto e infine immergendo i vetrini in 2 cambi di xilolo. Quest'ultimo passaggio è reso necessario dall'idrofobicità della resina, Eukitt (Bio-Optica), contenente xilene, utilizzata per il montaggio del vetrino copri-oggetto sul vetrino porta-oggetto.

### **2.2.3.2 Tricromica di Masson**

La colorazione tricromica di Masson rappresenta un metodo di elezione per la rivelazione del tessuto connettivo; permette di visualizzare in nero i nuclei, in rosso le fibre muscolari e in blu il collagene. Per la colorazione è stato utilizzato un kit commerciale (Bio-Optica, Milano). Dopo essere state sparaffinate ed idratate, le sezioni sono state trattate per 10 minuti con ematossilina ferrica di Weigert. A differenza dell'ematossilina di Mayer utilizzata nella colorazione ematossilina-eosina, questa lacca ferrica è in grado di conferire al nucleo una colorazione più resistente ai coloranti acidi e ai differenzianti. I vetrini sono stati sgocciolati e sulle sezioni è stato posto acido picrico in soluzione alcolica e lasciato agire per 4 minuti. In seguito ad un rapido lavaggio in acqua distillata è stata posta sulle sezioni fucsina di Ponceau per 4 minuti. Sia il Ponceau sia la fucsina sono coloranti con proprietà acide, in grado di legare quindi le componenti citoplasmatiche delle cellule conferendo una colorazione rossa ai citoplasmici. I vetrini sono stati lavati in acqua distillata e subito sono stati trattati con acido fosfomolibdico all'1% per 10 minuti. L'acido fosfomolibdico è un mordente che agisce da ponte fra il blu di anilina (colorante anfotero)

e le strutture tissutali, a cui selettivamente si lega (fibre del collagene, membrane cellulari). Senza sciacquare, i vetrini sono stati sgocciolati e trattati blu di Anilina per 5 minuti. Le sezioni sono state lavate in acqua distillata e quindi disidratate rapidamente attraverso la serie ascendente di alcol sostando 1 minuto nell'ultimo assoluto. L'ultimo passaggio è stato effettuato in xilene ed i vetrini sono poi stati montati con Eukitt.

### **2.2.3.3 Colorazione di Verhoeff-van Gieson**

La colorazione di Verhoeff-van Gieson combina il metodo di Verhoeff specifico per le fibre elastiche (in particolare per la proteina elastina) e la colorazione di Van Gieson specifica per il collagene. In questo metodo le sezioni sono colorate regressivamente con ematossilina usando un eccesso di mordente, il cloruro ferrico, in modo da aumentare l'affinità della stessa ematossilina ferrica per le fibre elastiche rispetto agli altri elementi. Dopo la sparaffinatura e la reidratazione, le sezioni sono state trattate per 60 minuti con l'ematossilina di Verhoeff (ematossilina ferrica a cui si aggiungono iodio e ioduro di potassio). Al termine dei 60 minuti sono stati effettuati dei rapidi lavaggi con acqua del rubinetto e successivamente i vetrini sono stati posti in cloruro ferrico al 2% per circa 2 minuti per rimuovere il colorante in eccesso. Dopo un breve lavaggio in acqua distillata, i vetrini sono stati posti in tiosolfato di sodio al 5% per un minuto per la stabilizzazione della colorazione, lavati in acqua corrente per 5 minuti e successivamente controcolorati con una soluzione costituita da fucsina acida all'1% in acqua distillata e acido picrico in soluzione acquosa. Le sezioni sono state poi lavate in acqua distillata e quindi disidratate rapidamente attraverso la serie ascendente di alcol sostando 1 minuto nell'ultimo assoluto. L'ultimo passaggio è stato effettuato in xilene ed i vetrini sono poi stati montati con Eukitt.

## 2.2.4 Misura dello spessore della parete vasale

I vetrini preparati per le colorazioni istologiche con ematossilina e eosina sono stati utilizzati anche per acquisire immagini da utilizzare per la misura delle variazioni nello spessore delle pareti vasale in seguito alla decellularizzazione. Le immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio ottico Leica DM IL LED fornito di telecamera digitale (Leica Microsystems) e analizzate tramite il software ImageJ (sviluppato da Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD; disponibile su <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). Dopo aver opportunamente impostato il rapporto pixel/ $\mu\text{m}$ , sono state tracciate delle linee rette perpendicolari alla superficie luminale dell'arteria, a partire dalla lamina elastica interna sino a quella esterna. Il calcolo automatico della lunghezza di tali rette dato dal software, permette di ottenere una misura affidabile dello spessore della parete vasale. Sono state prese in considerazione almeno 6 sezioni per ciascun campione, effettuando un minimo di 30 misurazioni per ciascuna sezione. I dati sono poi stati espressi come lunghezze medie  $\pm$  deviazione standard (SD).

## 2.2.5 Immunoistochimica

Una parte delle sezioni in paraffina, ottenute col taglio al microtomo, è stata utilizzata per effettuare delle analisi immunoistochimiche volte a verificare lo stato delle principali proteine costituenti la matrice extracellulare delle carotidi decellularizzate, ossia il collagene di tipo I, la laminina e la fibronectina. Come nel caso dell'analisi istologica le sezioni sono state inizialmente sparaffinate e sottoposte a reidratazione, successivamente si è proceduto allo smascheramento dei siti antigenici in maniera differente a seconda dell'anticorpo primario utilizzato. Gli anticorpi primari utilizzati e le condizioni di incubazione sono riportati nella **tabella 2.1**.

<b>Anticorpo</b>	<b>Tipo</b>	<b>Ditta</b>	<b>Incubazione</b>
<b>Anti collagene I</b>	Policlonale di coniglio	Novus Biologicals	1:100 1 ora TA
<b>Anti laminina</b>	Policlonale di coniglio	Novus Biologicals	1:500 O/N 4 °C
<b>Anti fibronectina</b>	Policlonale di coniglio	Dako	1:1600 1 ora TA

***Tabella 2.1** Anticorpi primari utilizzati e condizioni di incubazione (O/N overnight, TA temperatura ambiente).*

Per la rivelazione del collagene e della fibronectina, lo smascheramento è stato effettuato tramite l'utilizzo di un tampone citrato 0,01 M pH=6 in bagnetto termostato a 95°C per 30 minuti; per la rivelazione della laminina è stato invece effettuato utilizzando tripsina allo 0,1% in PBS per 20 minuti a 37°C. Successivamente è stato effettuato il bloccaggio dei siti aspecifici con Normal Goat Serum (NGS) 1:10 in PBS pH=7,4 per 45 minuti a temperatura ambiente in camera umida, al termine dei quali le sezioni sono state incubate con l'anticorpo primario diluito in PBS contenente NGS 10% alle condizioni descritte in **tabella 2.1**.

Al termine dell'incubazione sono stati effettuati alcuni lavaggi in PBS e successivamente le sezioni sono state incubate con l'anticorpo secondario coniugato con la fosfatasi alcalina (Goat anti-rabbit, Millipore) diluito 1:200 in PBS contenente NGS al

10% per 30 minuti a temperatura ambiente. La rivelazione della reazione è stata eseguita tramite incubazione con Fast Red (Sigma Aldrich) per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo il blocco della reazione in acqua distillata, i nuclei sono stati contrastati mediante colorazione con ematossilina di Carazzi per circa 1 minuto a temperatura ambiente. È seguito il montaggio dei vetrini con gelatina liquida.

## 2.2.6 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

Le carotidi ovine decellularizzate, con i rispettivi controlli, sono state analizzate tramite microscopia elettronica a scansione ad alta risoluzione (HRSEM), per caratterizzare in maniera più approfondita la superficie luminale dei vasi. I campioni sono stati fissati utilizzando una miscela di glutaraldeide all'1,25% e paraformaldeide all'1% in tampone cacodilato 0,1 M pH 7,2 per 2 ore a temperatura ambiente. Al termine delle due ore sono stati effettuati alcuni lavaggi in tampone fosfato, i campioni sono stati tagliati in frammenti di 1 mm<sup>3</sup> e successivamente sottoposti alla macerazione osmica in tetrossido di osmio all'1% e ferrocianuro di potassio all'1,25% in proporzione 1:1 per 2 ore al buio come descritto dettagliatamente da Riva. (Riva *et al.*, 1999; Riva *et al.*, 2007). I campioni sono stati successivamente disidratati in acetone, essiccati al punto critico attraverso un Critical Point Drying, montati su supporti in alluminio (stubs) e ricoperti con uno strato di Platino di 2 nm, per mezzo di un metallizzatore turbo Emitech K 575 ad alto vuoto.

L'osservazione finale è stata compiuta utilizzando un microscopio elettronico ad emissione di campo HRSEM Hitachi S4000.

## 2.2.7 Caratterizzazione meccanica

Per valutare eventuali alterazioni nelle proprietà elastiche e di resistenza dei vasi decellularizzati, rispetto a quelli nativi, sono stati eseguiti due tipi di test:

- prove di trazione monoassiale

- test dinamici ad anello

Entrambi i test sono stati eseguiti, grazie alla collaborazione della Professoressa Federica Boschetti del Politecnico di Milano, utilizzando la macchina elettromagnetica Enduratec Elf 3200 della Bose mostrata in **figura 2.6**, la quale è costituita da 3 elementi essenziali:

1. un'attrezzatura per l'applicazione del carico e il fissaggio del provino;
2. un sistema elettronico di controllo e di visualizzazione dei parametri meccanici durante la prova;
3. un calcolatore per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati.



*Figura 2.6. Macchina di prova elettromagnetica Enduratec Elf 3200 Series Bose*

### **2.2.7.1 Prove di trazione monoassiale**

Per eseguire le prove di trazione monoassiale, i vasi sono stati tagliati longitudinalmente. Successivamente sono stati ottenuti dei provini sia in direzione longitudinale che circonferenziale. Questi sono stati fissati ai morsetti del macchinario, sottoposti a forze unidirezionali crescenti che ne hanno determinato l'allungamento, in controllo di spostamento, ad una velocità costante di 0,1% / sec sino alla rottura, dopo 10

cicli di preconditionamento alla stessa velocità. Lo sforzo è stato calcolato dividendo la forza misurata dal macchinario per la superficie su cui essa agisce. La deformazione è stata calcolata normalizzando lo spostamento dell'attuatore della macchina con la lunghezza iniziale del provino. I dati misurati vengono riportati tramite un diagramma sforzo ( $\sigma$ ) – deformazione ( $\varepsilon$ ), nel quale lo sforzo è dato dal rapporto fra il carico applicato e l'area iniziale del provino

$$\sigma = F/A_0$$

ed è espresso in MPa (mega Pascal), mentre la deformazione dal rapporto fra allungamento totale e lunghezza iniziale

$$\varepsilon = \Delta L/L_0$$

spesso espresso in forma percentuale.

Il rapporto fra tensione applicata e deformazione è una costante tipica del materiale che prende il nome di modulo elastico o modulo di Young

$$E = \sigma / \varepsilon$$

direttamente proporzionale alla rigidità del campione, maggiore sarà il valore di E, più il campione risulterà rigido e meno deformabile.

### 2.2.7.2 Test dinamici ad anello

Le prove dinamiche ad anello sono state effettuate tagliando degli anellini di circa 10 mm dagli stessi campioni sottoposti alle prove di trazione monoassiale. Queste prove permettono di ottenere la **compliance**, la grandezza che esprime la capacità dei vasi sanguigni, o di una protesi, di dilatarsi elasticamente sotto l'effetto di pressioni sanguigne crescenti, espressa come variazione di diametro su variazione di pressione. Più è bassa, più il campione risulta rigido, meno deformabile, ed è inversamente proporzionale al modulo elastico circonferenziale.

Come rappresentato schematicamente nella **figura 2.7** all'interno dell'anello vengono inseriti dei perni circolari (pins) e i provini vengono sottoposti alla tensione sinusoidale di 1 Hertz e a 4 differenti ampiezze che permettono l'incremento del diametro iniziale del 8, 16, 24, and 32%. Conoscendo lo spostamento della macchina  $\delta(t)$ , la distanza fra i due perni  $h(t)$  viene calcolata come segue:

$$h(t) = H + \delta(t)$$

dove H è la distanza iniziale fra i due perni.

Conseguentemente, il diametro equivalente  $D_e$  può essere ottenuto come segue:

$$D_e(t) = 2/\pi [h(t) + \pi r]$$

dove r rappresenta il raggio del perno.

Considerando la forza applicata  $F(t)$ , nell'ipotesi di una distribuzione uniforme della pressione nel vaso sanguigno considerato come un cilindro a parete sottile, la pressione equivalente è definita da:

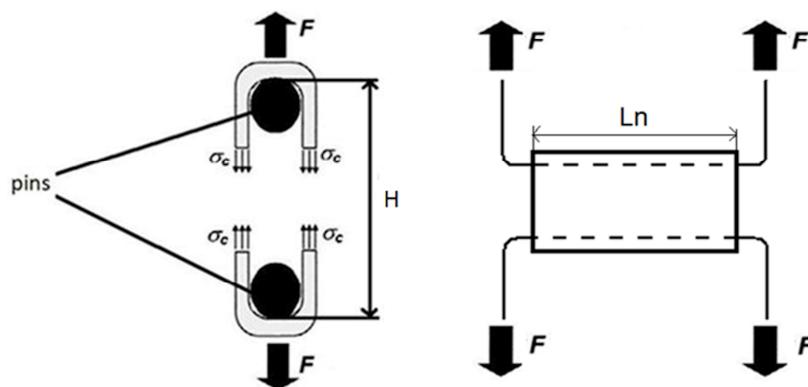
$$P_e(t) = F(t) / (D_e(t) L_n)$$

dove  $L_n$  è la lunghezza dell'anello.

In tal modo, la compliance è data da:

$$C = (D_{e \max}^2 - D_{e \min}^2 / D_{e \min}^2) / \Delta P_e$$

dove  $\Delta P_e$  rappresenta la differenza fra la pressione massima e quella minima applicate durante il ciclo sinusoidale.



**Figura 2.7. Rappresentazione schematica del test ad anello.**  $H$  è la distanza iniziale fra i due perni,  $L_n$  è la lunghezza dell'anello,  $F$  è la forza misurata dal macchinario,  $\sigma_c$  è la deformazione circonferenziale che agisce sulla parete del vaso.

## 2.2.8 Test di citocompatibilità indiretta

Questa prova è stata eseguita per verificare l'eventuale permanenza di residui di detergenti, antibiotici ed enzimi, nelle carotidi decellularizzate, al termine di ciascun trattamento. Tali residui, se presenti, potrebbero infatti risultare tossici sia per le cellule nel caso di un successivo ripopolamento, sia per l'organismo ricevente nel caso di un eventuale impianto della protesi. Per effettuare tali prove, al termine dei lavaggi previsti dai protocolli di decellularizzazione, un frammento di ciascun campione è stato incubato in alpha Minimum Essential Medium ( $\alpha$ MEM, Sigma Aldrich) per 4 giorni a  $4^\circ\text{C}$ , in modo da ottenere dei terreni condizionati. Al termine dei 4 giorni, tali terreni, a cui è stato aggiunto il 20% di siero fetale bovino (FBS, Sigma Aldrich), l'1% di antibiotici (Penicillin-Streptomycin Solution, Sigma Aldrich) e L-glutamina 2mM, sono stati testati su colture di cellule staminali mesenchimali midollari umane (hBMMSCs) al 6° passaggio, preventivamente seminate su piastre multiwell da 96 pozzetti, alla concentrazione di 4500

cellule/ pozzetto, utilizzando come controllo hBMMSCs fatte crescere in terreno  $\alpha$ MEM completo, non condizionato. Dopo 1, 2, 6 e 7 giorni sono state valutate le eventuali differenze nella capacità proliferativa delle hBMMSCs tramite saggio dell'XTT (Cell Proliferation Kit II Roche Diagnostic SpA, Milano, Italia).

### **2.2.8.1 Isolamento delle cellule staminali mesenchimali umane**

Le cellule staminali mesenchimali umane sono state isolate a partire da campioni di sangue midollare ottenuti dalla cresta iliaca di donatori sani iscritti al registro nazionale dei donatori volontari di midollo osseo, previo consenso informato scritto, presso il Centro Trapianti di Midollo Osseo (CTMO) dell'ospedale Binaghi di Cagliari. Il campione di sangue è stato diluito 1:1 con PBS e da questo le cellule mononucleate sono state isolate tramite un gradiente di densità con Histopaque-1077 (soluzione a base di polisaccarosio e diatrizoato di sodio corretti ad una densità di 1,077 g/ml), sulle quali è stato stratificato lentamente il campione di sangue diluito in rapporto 2:1 (sangue: Histopaque). Effettuata la stratificazione i campioni sono stati centrifugati a 800 x g per 30 minuti in modo che alla fine della centrifugata si ottengano tre strati: quello sovrastante, da eliminare, rappresentato dal plasma; quello intermedio costituito dall'Histopaque e da un anello in cui sono contenute le cellule mononucleate; quello sottostante costituito da un pellet formato da eritrociti. L'anello intermedio è stato recuperato, diluito con PBS e centrifugato a 400 x g per 10 minuti. Alla fine della centrifugata si è ottenuto un pellet, ancora ricco di eritrociti che sono stati lisi aggiungendo 8 volumi di ammonio cloruro (Pharmlyse) per 15 minuti al buio. La reazione di lisi dell'ammonio cloruro è stata bloccata aggiungendo PBS con l'1% di FBS. Le cellule sono state successivamente lavate tramite centrifugazione a 300 x g per 5 minuti; il pellet risultante è stato risospeso nell'appropriato terreno di coltura ( $\alpha$ MEM + 20% FBS+ 1% di antibiotici + 2mM glutammina); le cellule sono state contate tramite emocitometro, piastrate alla densità di  $0,6-1 \times 10^6$  cellule/cm<sup>2</sup> in piastre petri e

incubate a 37°C in aria umidificata contenente il 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo 48-72 ore di coltura, tramite sostituzione del terreno, sono state eliminate le cellule non aderenti rappresentate essenzialmente da macrofagi e da altre cellule del sangue, mentre le mesenchimali rimangono aderenti alla plastica della petri. A questo punto il terreno è stato cambiato due volte alla settimana finchè le cellule, duplicandosi tramite mitosi, non hanno raggiunto una confluenza pari al 70-80%. A questo punto sono state staccate dalla petri utilizzando lo 0,1% di tripsina e lo 0,02% di EDTA per 6 minuti a 37 °C e ripiastrate alla densità di 1,5 x 10<sup>4</sup> cellule/cm<sup>2</sup>. Il terreno è stato sostituito ogni due giorni e sono state utilizzate per gli esperimenti cellule al 6° passaggio.

### **2.2.8.2 Caratterizzazione fenotipica delle hBMMSCs**

Le cellule in tal modo isolate ed espanse sino al sesto passaggio, sono state successivamente caratterizzate fenotipicamente, tramite analisi citofluorimetrica. Una volta staccate dalla piastra petri come precedentemente descritto, le cellule sono state fissate in paraformaldeide al 4% per 20 minuti, lavate con PBS, risospese in PBS contenente lo 0,1% di albumina di siero bovino e incubate con i seguenti anticorpi primari:

- anticorpi monoclonali coniugati con la fluoresceina: mouse anti-human CD44 (MACS), mouse anti-human CD34 (Immunotech) e mouse anti-human CD45 (Immunotech)
- anticorpi monoclonali non coniugati: mouse anti-human CD73 (BD Pharmingen), mouse anti-human CD90 (BD Pharmingen) e mouse anti-human CD105 (DakoCytomation)

per 20 minuti a temperatura ambiente. Nel caso degli anticorpi non coniugati, all'incubazione con l'anticorpo primario ha fatto seguito quella con l'anticorpo secondario, sheep anti-mouse coniugato con la fluorescina (Chemicon International, Milano, Italy), per ulteriori 20 minuti a temperatura ambiente.

L'analisi citofluorimetrica è stata eseguita tramite un BD FACS Calibur (BD Biosciences) fornito di software CellQuest Pro (BD Biosciences) per l'analisi.

## **2.2.9 Semina delle hMSCs su scaffold di Poliuretano**

### **trattato con Gelatina**

I costrutti di poliuretano trattato con gelatina A e i graft di controllo costituiti da poliuretano senza gelatina, provenienti dal laboratorio dell'Istituto di Fisiologia Clinica del CNR di Massa, sono stati tagliati in modo da ottenere campioni circolari di area pari a 2 cm<sup>2</sup>. Successivamente sono stati fissati, tramite un anello di teflon, all'interno dei pozzetti di multiwell da 24, e preconditionati per 30 minuti in incubatore con 300 µl di αMEM. Successivamente, hMSCs al 6° passaggio, sono state seminate sugli scaffold alla densità di 1,4 x 10<sup>4</sup> cellule/ cm<sup>2</sup> in αMEM supplementato con il 20% di FBS, l'1% di antibiotici e glutammina 2 mM. Dopo 24, 48 e 72 ore la vitalità cellulare è stata determinata tramite test dell'XTT, seguendo le istruzioni del fornitore. Ogni prova è stata condotta in triplicato e i risultati sono stati espressi come media ± SD.

Agli stessi time point (24, 48 e 72 ore), le cellule sono state fissate in metanolo al 70%, colorate con Giemsa per 30 minuti e osservate allo stereomicroscopio.

## **2.2.10 Analisi statistica**

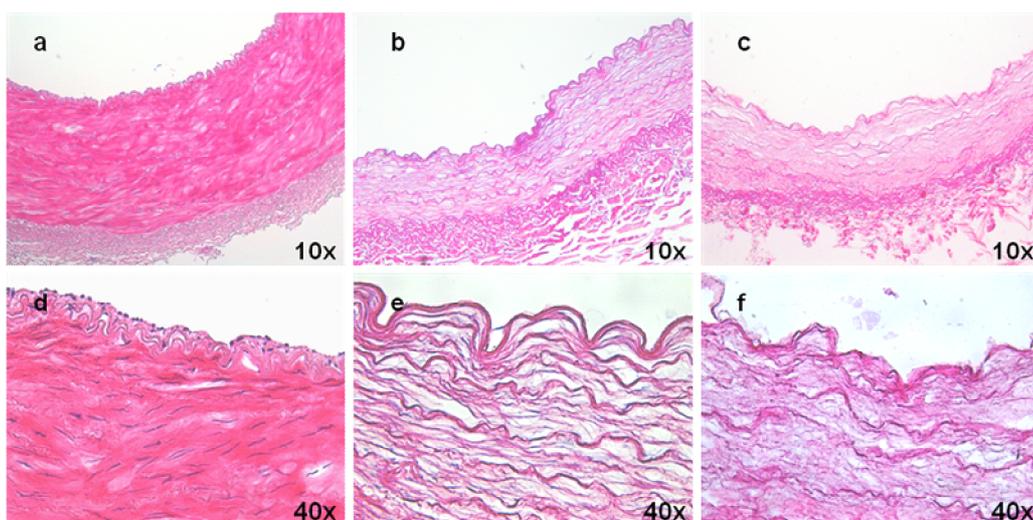
Tutti gli esperimenti sono stati condotti almeno in triplicato e i risultati sono stati espressi come media ± SD. I dati sono stati elaborati tramite ANOVA ad una via, utilizzando come soglia per la significatività statistica un valore p<0,05.

## 2.3 Risultati

### 2.3.1 Analisi istologiche

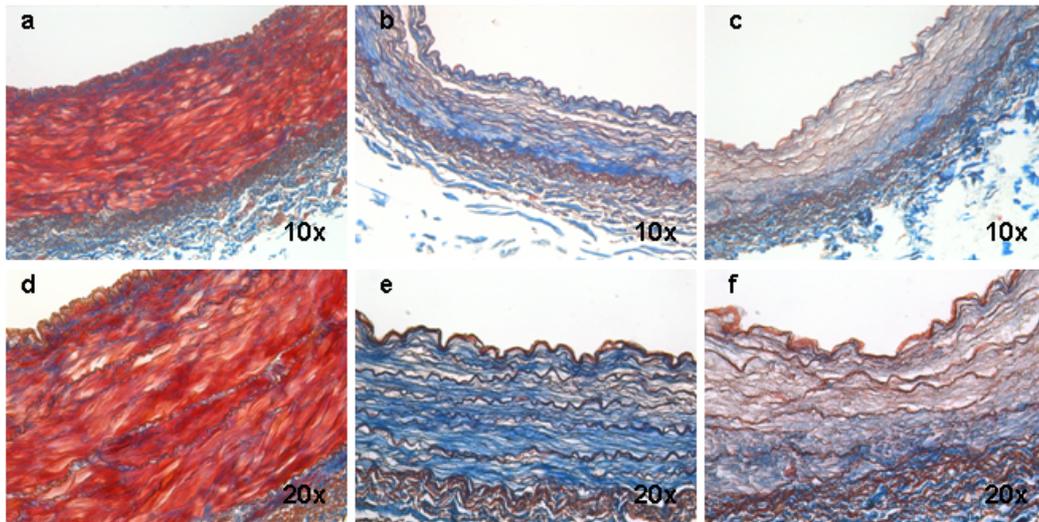
La colorazione istologiche delle carotidi native e decellularizzate sono riportate nelle **figure 2.8, 2.9 e 2.10**.

La colorazione con ematossilina e eosina, come si può notare nella **figura 2.8**, mostra chiaramente la completa rimozione dei componenti cellulari e nucleici nei vasi trattati con entrambi i protocolli decellularizzanti (b, c, e, f). Nei vasi nativi (a) sono ben evidenti le cellule in tutto lo spessore della parete vasale, ed è particolarmente evidente, a ingrandimenti maggiori (40X), il monostrato di cellule endoteliali nel lume del vaso (d). Non è più presente alcun residuo cellulare né nelle carotidi trattate con SDS per 36 ore (b, e), né in quelle trattate con Tripsina e Triton X-100 (c, f) a nessuno degli ingrandimenti mostrati.



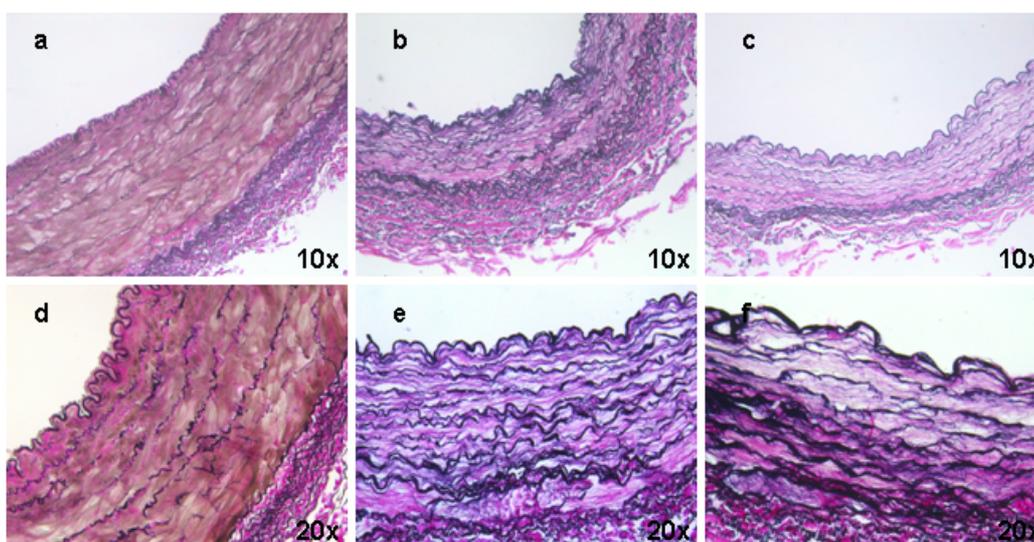
**Figura 2.8.** Colorazione con ematossilina e eosina delle carotidi native (a,d) e di quelle decellularizzate con SDS (b,e) e con Tripsina e TritonX-100 (c, f). In (a) e (d) i nuclei cellulari sono rappresentati in blu-violaceo, le fibre extracellulari e i citoplasmici in rosa. In (b, e) e (c, f) è evidente la completa rimozione cellulare e nucleare. Le immagini (a), (b) e (c) sono state acquisite con un obiettivo 10X; (d), (e) e (f) con un obiettivo a 40X.

La tricromica di Masson, mostrata in **figura 2.9**, è stata eseguita per mettere in evidenza lo stato di conservazione delle fibre collagene in seguito alla decellularizzazione. Tale colorazione permette di evidenziare in blu le fibre collagene, in rosso le cellule muscolari e in marrone le fibre elastiche. Come si può osservare nelle **immagini 2.9** (a) e **2.9** (d), nelle carotidi native è presente un abbondante strato di cellule muscolari in tutto lo spessore della parete vasale. Tale strato scompare sia in seguito al trattamento con SDS (figure 2.9 b, e), sia in seguito al trattamento con Tripsina e Triton X-100 (figure 2.9 c, f), confermando ulteriormente l'avvenuta decellularizzazione. Permangono, in seguito ad entrambi i trattamenti decellularizzanti, lo strato ben conservato di fibre collagene e le numerose fibre elastiche nella tonaca media.



**Figura 2.9. Tricromica di Masson delle carotidi native (a,d) e di quelle decellularizzate con SDS (b,e) e con Tripsina e Triton X-100 (c,f).** In (a) e (d) le fibre collagene sono evidenziate in blu, le cellule muscolari in rosso, i nuclei e le fibre elastiche in marrone. Non sono presenti nuclei e cellule muscolari nè in (b,e) nè (c,f), confermando la buona riuscita della decellularizzazione, mentre permangono le fibre collagene e le fibre elastiche in seguito ad entrambi i trattamenti. Le immagini (a), (b) e (c) sono state acquisite con un obiettivo 10X; (d), (e) e (f) con un obiettivo 20X.

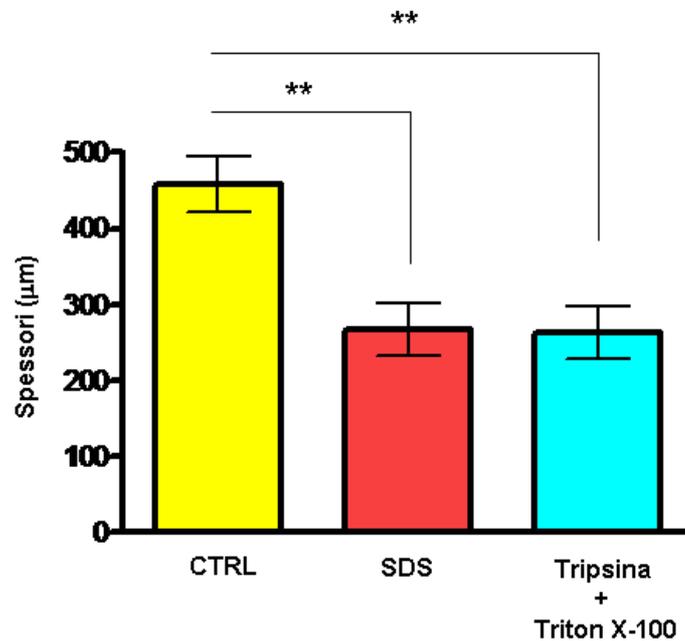
La colorazione di Verhoeff-van Gieson è un metodo combinato che permette di evidenziare in nero le fibre elastiche, in rosso-rosa le fibre collagene, e il citoplasma in marrone. Come si può osservare nella **figura 2.10** e le fibre elastiche rimangono ben conservate e organizzate in maniera analoga a quanto avviene nei vasi nativi (figura 2.10 a, d), in seguito ad entrambi i trattamenti decellularizzanti (figura 2.10 b, c, e, f). In particolare si può inoltre notare come permangano inalterate sia la lamina elastica interna che quella esterna, strutture fondamentali per la consistenza meccanica del vaso e per l'adesione delle cellule endoteliali. La colorazione marrone, relativa alla presenza del citoplasma è visibile solo nelle immagini relative alle carotidi native (figura 2.10 a, d), confermando ulteriormente la buona riuscita dei trattamenti decellularizzanti.



**Figura 2.10.** *Colorazione di Verhoeff-van Gieson delle carotidi native (a,d) e di quelle decellularizzate con SDS (b, e) e con Tripsina e Triton X-100 (c,f). In (a) e (d) le fibre elastiche sono evidenziate in nero, il collagene in rosa e il citoplasma in marrone. In (b), (e), (c) ed (f) le fibre elastiche e quelle collagene risultano ben conservate, ma non è più presente la colorazione marrone relativa alla presenza del citoplasma. Le immagini (a), (b) e (c) sono state acquisite con un obiettivo 10X; (d), (e) e (f) con un obiettivo 20X.*

### 2.3.2 Misura dello spessore della parete vasale

Un'ulteriore conferma dell'avvenuta decellularizzazione delle carotidi trattate sia con SDS, sia con Tripsina e Triton X-100, è mostrata in **figura 2.11**, dove è rappresentato l'istogramma relativo alla misura dello spessore delle pareti vasali nelle carotidi di controllo e in quelle decellularizzate. Come conseguenza della rimozione dello strato di cellule muscolari lisce dalla tonaca media infatti, lo spessore delle pareti delle carotidi decellularizzate subisce una significativa riduzione, pari al  $41,8\% \pm 7,5\%$  nelle carotidi trattate con SDS e pari al  $42,6\% \pm 7,6\%$  in quelle trattate con Tripsina e Triton X-100.

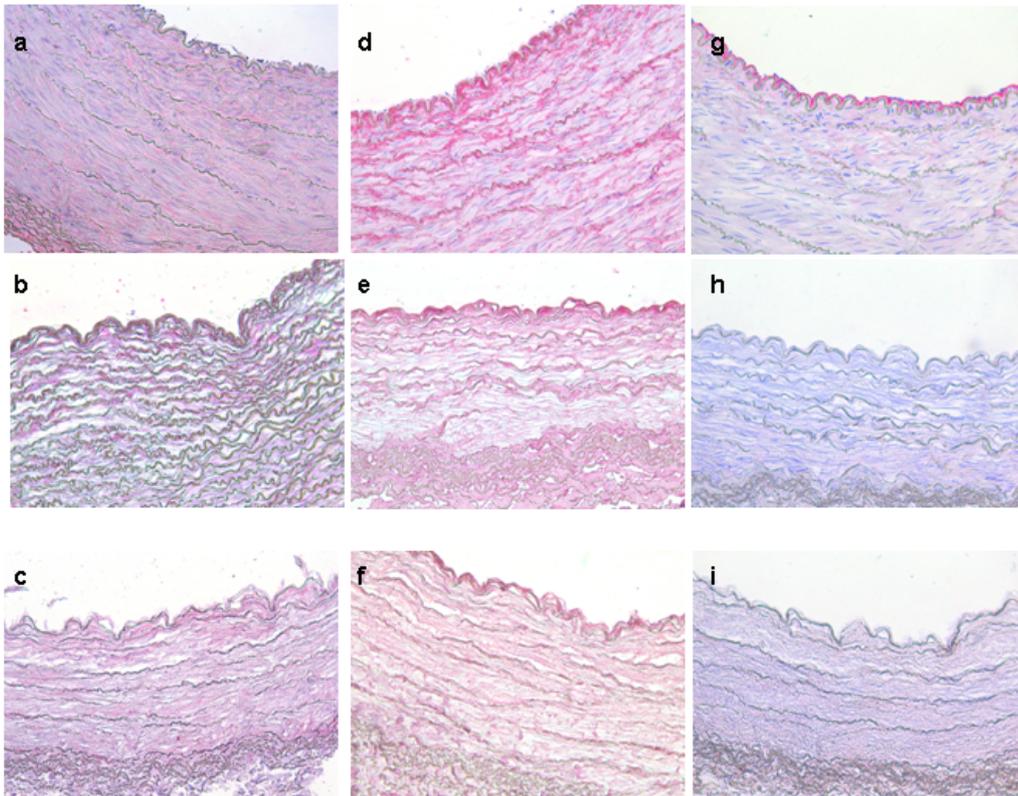


*Figura 2.11. Misura dello spessore della parete vasale. L'analisi morfometrica mostra una significativa riduzione nello spessore delle pareti carotidiche sia dopo trattamento con SDS (n=8) sia dopo trattamento con Tripsina e Triton X-100 (n=8) rispetto alle carotidi native (n=6). I dati rappresentano la media ± SD. \*\* p<0,01. CTRL: campioni di controllo non trattati.*

### 2.3.3 Analisi immunoistochimica

L'analisi immunoistochimica rappresentata in **figura 2.12**. mostra un segnale debole ma uniforme relativo al collagene di tipo I in tutto lo spessore della parete vasale sia nelle carotidi native (figura 2.12 a) sia in quelle decellularizzate (figura 2.12 b, c). La fibronectina è evidenziata da un segnale rosa intenso nel controllo (Figura 2.12 d), sia a livello subendoteliale che in tutto lo spessore della tonaca intima, segnale che seppur più debole permane anche in seguito a decellularizzazione con SDS (figura 2.12 e) e con

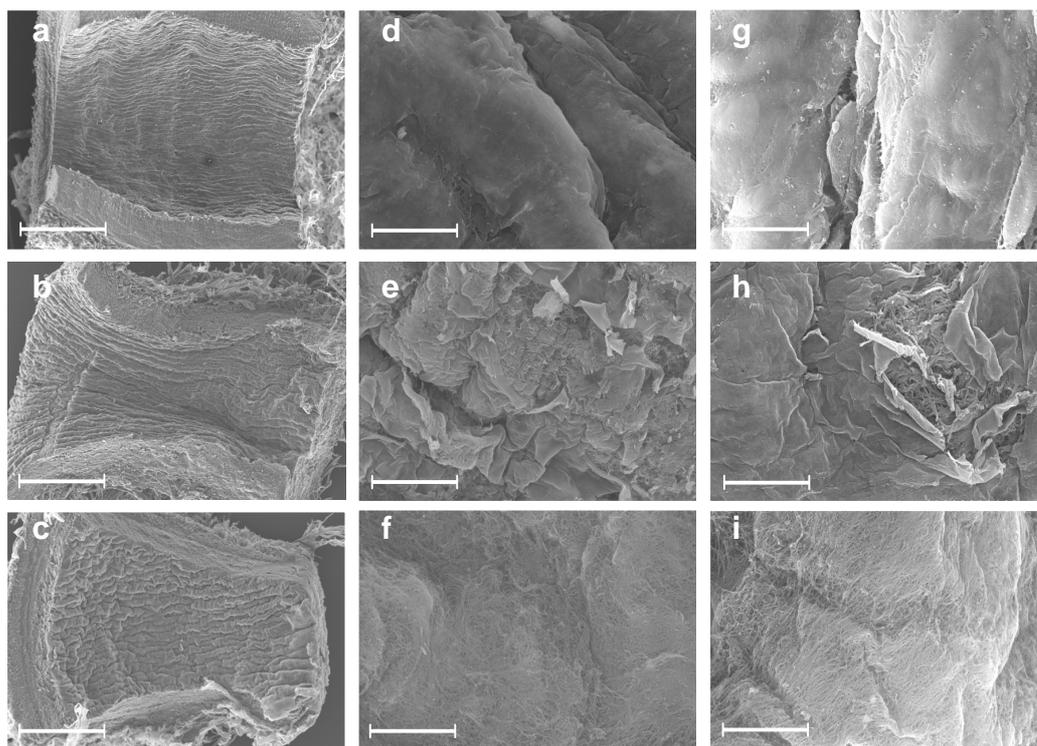
Tripsina e Triton X-100 (figura 2.12 f). Per quanto riguarda la laminina, questa si trova localizzata a livello della membrana basale nel controllo (figura 2.12 g), ma viene completamente persa in seguito ad entrambi i trattamenti decellularizzanti (figura 2.12 h, i).



**Figura 2.12. Immunoistochimica.** *a-c:* distribuzione del Collagene di tipo I nelle carotidi native (a), decellularizzate con SDS (b) e con Tripsina e Triton X-100 (c). La marcatura specifica è evidente in tutto lo spessore delle pareti vasali in tutti i campioni. **d-f:** l'espressione della fibronectina è confinata alla tonaca intima nelle carotidi native (d), in quelle decellularizzate con SDS (e) e in quelle con Tripsina e Triton X-100 (f). **g-i:** localizzazione della laminina nelle carotidi native (g) in quelle decellularizzate con SDS (h) e in quelle con Tripsina e Triton X-100 (i). Nel controllo (g), la laminina è ben evidente nello strato subendoteliale, ma il segnale scompare sia in (h) sia in (i). Tutte le immagini sono state acquisite utilizzando un obiettivo 20X.

### 2.3.4 Analisi al SEM

Le micrografie effettuate con il microscopio elettronico a scansione, mostrate in **figura 2.13**, hanno permesso di analizzare in maniera più approfondita l'ultrastruttura delle matrici carotidee decellularizzate a livello del lume vasale. Si può notare, infatti, che mentre il controllo presenta un lume liscio (figura 2.13 a), quello di entrambi i campioni trattati appare rugoso e irregolare, proprio a causa dell'assenza dello strato liscio endoteliale (figura 2.13 b, c). A maggiore ingrandimento, nel controllo (figura 2.13. d, g) sono ben visibili le cellule dell'endotelio, mentre scompaiono del tutto lasciando dei buchi e rivelando il sottostante network di fibre; nel campione trattato con Tripsina e Triton X-100 (figura 2.13 f, i). Nel campione trattato con SDS permangono alcuni residui di membrana che lasciano intravedere la sottostante membrana basale (figura 2.13 e, h).

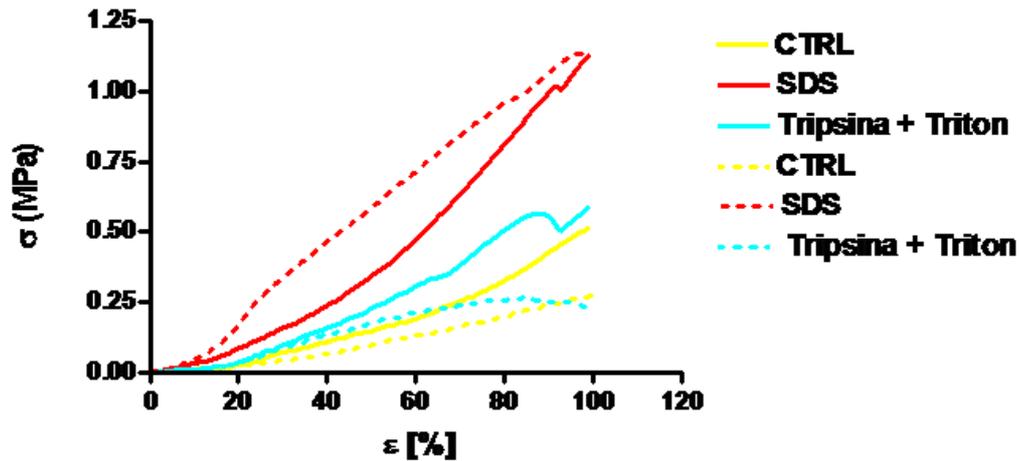


**Figura 2.13. Microscopia elettronica a scansione.** Ultrastruttura delle carotidi native (a, d, g), decellularizzate con SDS (b, e, h), e con Tripsina e Triton X-100 (c, f, i). Le barre rappresentano 600  $\mu\text{m}$  (a-c), 16,7  $\mu\text{m}$  (d-f) and 10  $\mu\text{m}$  (g-i).

## 2.3.5 Caratterizzazione meccanica

### 2.3.5.1 Prove di trazione monoassiale

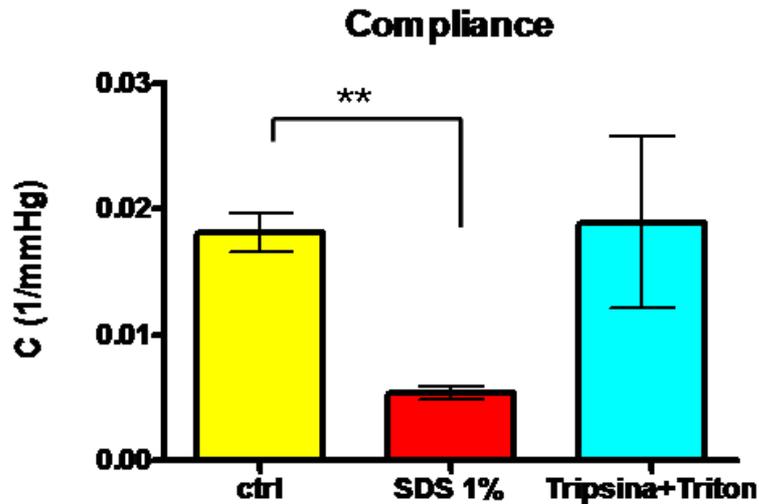
Le curve sforzo-deformazione, relative al comportamento meccanico delle carotidi ovine native e decellularizzate, sono mostrate in **figura 2.14**. I campioni trattati per 36 ore con SDS manifestano un modulo di Young più elevato, sia in direzione longitudinale sia in direzione circonferenziale, rispetto a quello delle carotidi native. Al contrario, le curve sforzo-deformazione relative alle carotidi trattate con Tripsina e con Triton X-100 sono simili e quasi sovrapponibili a quelle dei controlli.



*Figura 2.14. Curve sforzo-deformazione delle carotidi native e di quelle decellularizzate. Le linee tratteggiate rappresentano le curve relative ai moduli elastici ottenuti in direzione circonferenziale, le linee continue quelle relative ai moduli elastici ottenuti in direzione longitudinale. I dati relativi alle carotidi native sono rappresentati in giallo, quelli relativi alle carotidi decellularizzate con SDS in rosso, e quelli relativi alle carotidi decellularizzate con Tripsina e Triton X-100 in ciano.*

### 2.3.5.2 Test dinamici ad anello

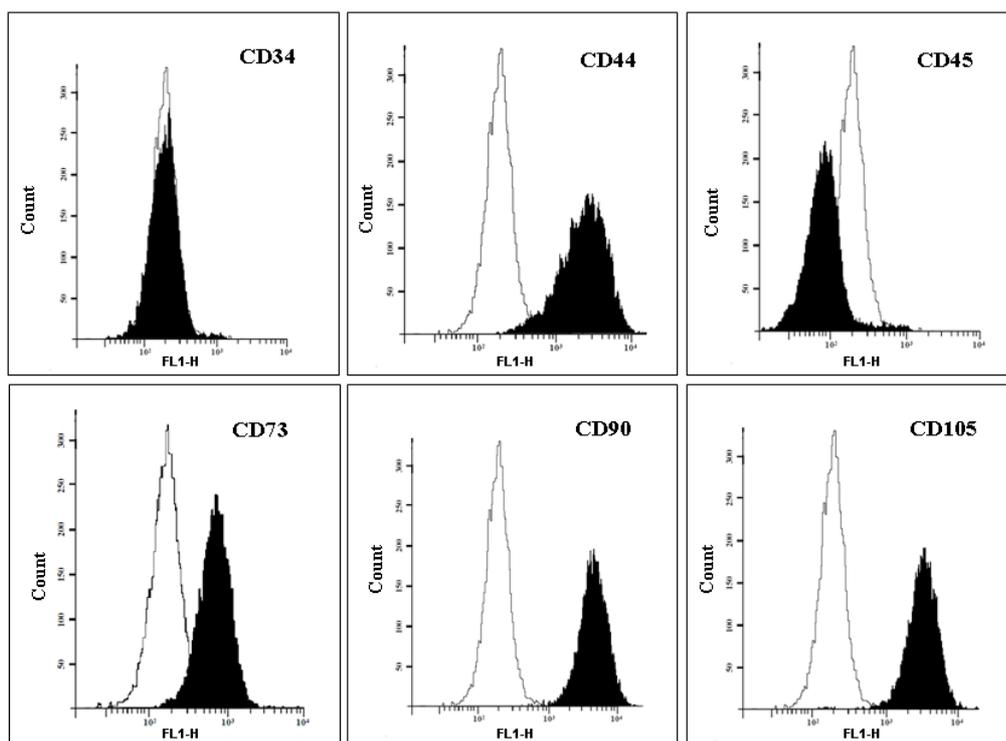
I dati relativi all'analisi della compliance, ottenuti effettuando dei test dinamici ad anello, sono mostrati in **figura 2.15**. Come si può notare non vi è alcuna differenza statisticamente significativa fra il valore di compliance dei controlli ( $0,018083 \pm 0,001564$ ) e quello delle carotidi decellularizzate con Tripsina e Triton X-100 ( $0,018917 \pm 0,006775$ ); al contrario, anche in questo caso il comportamento meccanico dei campioni decellularizzati con SDS risulta diverso rispetto a quelle delle carotidi native, mostrando un valore di compliance significativamente più basso ( $0,00533 \pm 0,000492$ ).



*Figura 2.15 Compliance. L'analisi della compliance mostra una differenza statisticamente significativa fra i valori relativi ai campioni trattati con SDS e i vasi nativi; nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata fra i vasi nativi e quelli decellularizzati con Tripsina e Triton X-100. I dati sono stati rappresentati come media  $\pm$  SD (standard deviation) di 3 esperimenti indipendenti. I dati sono stati analizzati mediante ANOVA. \*\*  $p < 0,01$  rispetto ai controlli (CTRL).*

### 2.3.6 Caratterizzazione fenotipica delle hMSCs

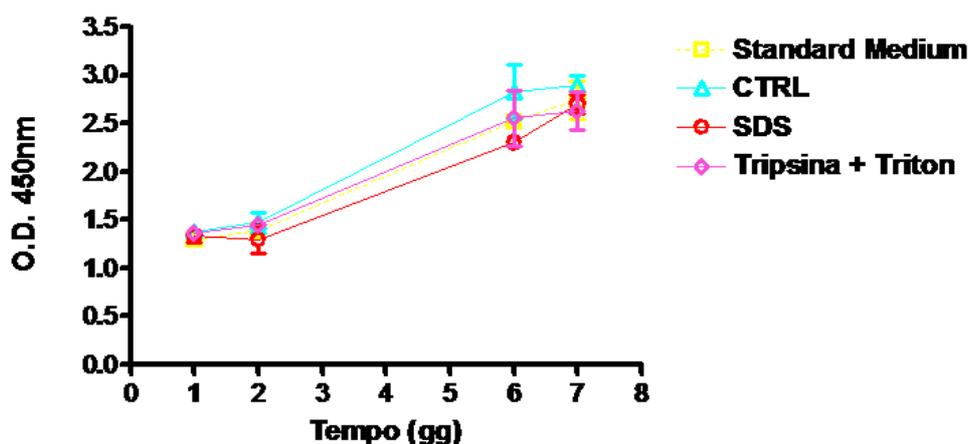
Come si può osservare nella **figura 2.17**, l'analisi fenotipica al citofluorimetro ha permesso di confermare la mesenchimalità delle cellule staminali isolate ed espanse secondo il protocollo descritto nella **sezione 2.2.8.1**. Le cellule, infatti, non esprimono né il CD34, né il CD45, marker caratteristici delle cellule ematopoietiche, e risultano al contrario positive per il CD44, il CD90, il CD73 e il CD105.



*Figura 2.17. Caratterizzazione fenotipica delle cellule staminali mesenchimali midollari umane. L'istogramma bianco rappresenta il controllo, quello nero il segnale relativo alla marcatura effettuata con l'anticorpo primario.*

### 2.3.7 Test di citocompatibilità indiretta

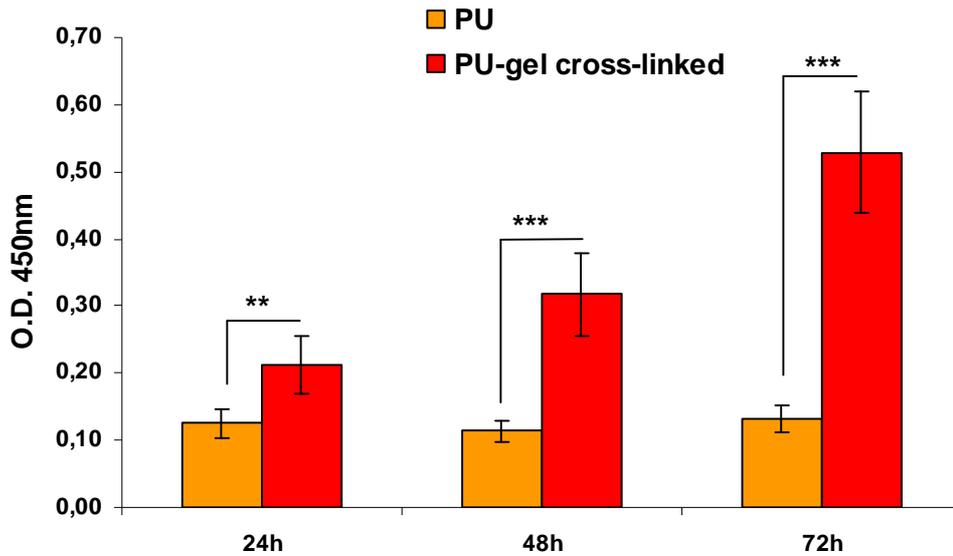
L'effetto dei terreni condizionati, preparati come descritto nella **sezione 2.2.8**, è mostrato in **figura 2.18**. Come si può osservare, le curve relative alla proliferazione delle hMSCs coltivate utilizzando terreni incubati per 4 giorni con ciascuno dei campioni trattati, risultano praticamente sovrapposte a quella delle hMSCs cresciute in terreno standard di coltura. Pertanto nessuno dei terreni condizionati altera la capacità di proliferazione delle hMSCs.



*Figure 2.18. Effetto dei terreni condizionati sulla proliferazione di colture di hMSCs dopo 1, 2, 6, 7 giorni di coltura. I dati sono espressi come media  $\pm$  SD (standard deviation).*

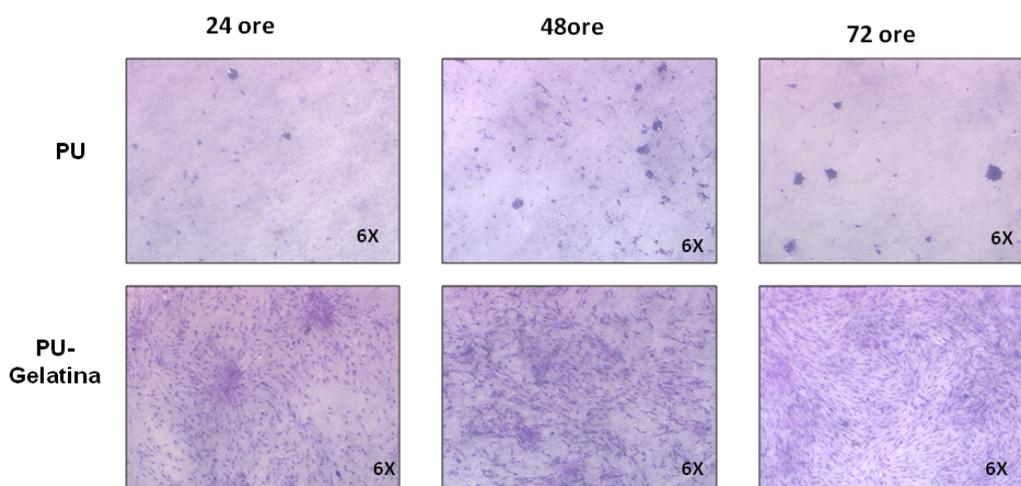
### 2.3.8 Test di biocompatibilità degli scaffold di PU

Questo test è stato effettuato per valutare la capacità degli scaffold di PU trattati con Gelatina di tipo A di supportare l'adesione e proliferazione delle hMSCs. I risultati del test dell'XTT sono mostrati in **figura 2.19**, e come si può osservare sono presenti differenze statisticamente significative a ciascuno dei tempi considerati, fra la proliferazione delle hMSCs sullo scaffold trattato con gelatina (PU-gel crosslinked), e quello non trattato (PU). Le hMSCs aderiscono e proliferano bene sul PU trattato con gelatina, ma non sono in grado di proliferare senza la presenza della gelatina.



**Figura 2.19.** Proliferazione delle hMSCs sugli scaffold di Poliuretano (PU), e di Poliuretano trattato con gelatina (PU-gel crosslinked). I dati sono stati rappresentati come media  $\pm$  SD (standard deviation) di 6 esperimenti indipendenti. I dati sono stati analizzati mediante T-test. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

La buona capacità di adesione delle hMSCS sullo scaffold PU-gel crosslinked è stata ulteriormente confermata dalla colorazione con Giemsa, come mostrato in **figura 2.20**, la quale permette di visualizzare le cellule sullo scaffold colorando i nuclei in viola. Possiamo vedere che vi è una ridottissima adesione cellulare negli scaffold non trattati (PU) senza nessuna variazione nei 3 giorni di incubazione, mentre troviamo molte cellule adese e in proliferazione negli scaffold trattati (PU-gelatina).



**Figura 2.20.** Colorazione con Giemsa delle hMSCs seminate sugli scaffold di poliuretano non trattatao (PU) e su quelli di poliuretano trattato con Gelatina di tipo A.

## 2.4 Discussione

I risultati ottenuti in questo studio dimostrano che entrambi i trattamenti proposti determinano una completa decellularizzazione delle carotidi ovine. Questo è confermato dalla totale assenza di materiale cellulare e nucleico visibile nelle carotidi decellularizzate sia con SDS sia con Tripsina e Triton X-100, in seguito a colorazione istologica con ematossilina e eosina. Inoltre, la tricromica di Masson e la colorazione di Verhoeff-van Gieson dimostrano una buona conservazione sia delle fibre collagene sia di quelle elastiche in seguito ad entrambi i trattamenti decellularizzanti. Le immagini istologiche mostrano l'ottima conservazione anche delle lamine elastiche interna ed esterna, due strutture fondamentali sia per l'adesione delle cellule endoteliali, e conseguentemente per l'antitrombogenicità del vaso, sia per la consistenza meccanica del vaso (Wilshaw *et al.*, 2012). Questi risultati sono ulteriormente confermati dall'analisi tramite microscopia elettronica a scansione, grazie alla quale è stato possibile confermare sia l'avvenuta

rimozione del monostrato endoteliale, sia lo stato di conservazione del network di fibre sottostanti.

L'efficienza di entrambi i protocolli di decellularizzazione è stata inoltre confermata dalla significativa riduzione dello spessore delle pareti delle carotidi trattate sia con SDS, sia con Tripsina e successivamente con Triton X-100. È infatti ragionevole ipotizzare che questa riduzione sia dovuta alla rimozione dello spesso strato di cellule muscolari lisce.

L'analisi immunostochimica non rivela alcuna significativa alterazione né nella distribuzione del collagene di tipo I, né in quella della fibronectina in seguito ad entrambi i trattamenti di decellularizzazione, rispetto alle carotidi di controllo. Al contrario, sia il trattamento con SDS per 36 ore, sia quello eseguito incubando le carotidi per 24 ore con Tripsina, e successivamente con Triton X-100 per ulteriori 24 ore, hanno determinato una perdita totale dell'espressione della laminina. La laminina, così come la fibronectina, è una proteina cruciale nell'adesione cellulare e risulta anche coinvolta nella crescita e migrazione delle cellule endoteliali (Kleinman *et al.*, 1984). Studi precedenti comunque mostrano che sia il trattamento con SDS che l'uso della Tripsina, possono causare la rimozione di alcune proteine importanti della ECM, fra cui appunto la laminina (Gilbert *et al.*, 2006).

In un recente lavoro del gruppo di Cortiella (Cortiella *et al.*, 2010), in seguito a decellularizzazione tramite SDS di polmoni murini, vengono riportate la perdita totale del collagene di tipo I, della fibronectina e della laminina. I polmoni decellularizzati vengono ripopolati con cellule staminali embrionali murine, e dopo 14 giorni si ha nuovamente la presenza della laminina, prodotta in seguito al differenziamento delle staminali embrionali. Conseguentemente, nonostante il ruolo cruciale della laminina nell'adesione cellulare, è

ragionevole ipotizzare che la sua perdita non precluda la possibilità di ripopolare la matrice precedentemente decellularizzata.

Per quanto riguarda la caratterizzazione meccanica, i risultati presentati nel presente lavoro di tesi, dimostrano come non vi sia alcuna differenza significativa né relativamente al modulo elastico, né rispetto alla compliance, fra i vasi di controllo e le carotidi decellularizzate utilizzando la Tripsina e il Triton X-100. D'altra parte, le carotidi decellularizzate con SDS mostrano un modulo elastico più alto e valori di compliance significativamente più bassi rispetto ai vasi nativi, risultati che indicano un incremento della rigidità e una perdita di distensibilità da parte dei vasi trattati con il suddetto protocollo. Risultati simili sono stati ottenuti in precedenza da Roy (Roy *et al.*, 2005.), che analizza le proprietà biomeccaniche di carotidi porcine decellularizzate con SDS, riscontrando un incremento del modulo elastico e una riduzione della compliance in seguito a tale trattamento.

La protesi vascolare ideale dovrebbe essere biocompatibile, antitrombogenica e resistente alle infezioni, ma dovrebbe anche possedere delle caratteristiche biomeccaniche simili a quelle dei vasi che deve sostituire (Bergmeister *et al.*, 2013). Caratteristiche meccaniche differenti fra vaso nativo e protesi possono infatti causare variazioni a livello locale del flusso sanguigno e innescare la formazione di trombi. È stato infatti dimostrato in studi precedenti che l'iperplasia endoteliale, causa frequente del fallimento di una protesi, è spesso determinata da quello che viene definito “*compliance mismatch*”, a livello dell'anastomosi (Okuhn *et al.*, 1989; Ballyk *et al.*, 1998; Greenwald *et al.*, 2000).

I risultati descritti dimostrano quindi che entrambi i protocolli di decellularizzazione testati durante il presente lavoro di tesi sono in grado di rimuovere efficacemente il materiale cellulare e nucleico dalla matrice extracellulare delle carotidi ovine, lasciandone apparentemente inalterate le principali componenti. Tuttavia, il

trattamento per 36 ore con SDS determina significative alterazioni a livello delle proprietà meccaniche dei vasi e in particolare nella loro capacità di sopportare gli sbalzi pressori. Pertanto, è possibile affermare che la combinazione di un detergente non-ionico, qual è il Triton X-100, con un trattamento enzimatico, la tripsina, alle concentrazioni qui utilizzate, risulta più efficiente del trattamento ionico (SDS) per l'ottenimento di una matrice extracellulare da carotide ovina da utilizzare per la realizzazione di una protesi vascolare di piccolo calibro. Inoltre tali risultati dimostrano anche che i detergenti, gli enzimi e gli antibiotici utilizzati nei protocolli descritti, possono essere efficacemente rimossi tramite i lavaggi, dal momento che non permangono nei vasi trattati tracce di agenti chimici che possano influenzare la proliferazione di hMSCs.

Per quanto concerne il test preliminare di biocompatibilità *in vitro* sullo scaffold di PU, i risultati ottenuti dimostrano che il trattamento con Collagene denaturato è essenziale per permettere l'adesione cellulare sullo scaffold sintetico di poliuretano. Sono attualmente in corso ulteriori esperimenti di caratterizzazione dello scaffold.

# Capitolo 3

## Utilizzo delle Cellule Staminali Mesenchimali Umane nei test di tossicità orale acuta

---

### 3.1 Introduzione

La nascita e lo sviluppo dell'Ingegneria Biomedica sono intimamente legati alla crescente diffusione di nuovi materiali. La necessità di materiali innovativi, dotati di proprietà specifiche, per applicazioni avanzate in tutti i settori dell'ingegneria biomedica, dall'ingegneria tissutale alle nanotecnologie, ha infatti portato negli ultimi decenni ad un vertiginoso aumento dei materiali disponibili. Conseguentemente, per assicurare un'adeguata protezione della salute umana e dell'ambiente, è essenziale comprenderne gli eventuali effetti avversi e valutare il potenziale rischio dovuto all'esposizione a tali materiali, sia attraverso analisi tossicologiche che studi preclinici e clinici. Questo aspetto diventa particolarmente importante in uno dei più recenti settori dell'Ingegneria Biomedica, quello delle nanotecnologie, le quali trovano applicazione in numerosi settori produttivi, dalla medicina alla cosmesi, ma per le quali non esiste allo stato attuale una specifica normativa. Le nanotecnologie sono infatti un campo ampio e complesso che ha in comune il solo elemento della "scala dimensionale", ossia l'utilizzo di sostanze su scala nanometrica; perciò è difficile adottare un'unica regolamentazione valida per un'ampia

varietà di materiali, sostanze e applicazioni che interessano quasi tutti gli ambiti della scienza.

In generale, i test tossicologici designati per valutare la tossicità sia di sostanze chimiche sia di preparati chimici vengono effettuati *in vivo* sui roditori e sono volti ad individuare una singola dose che causi tossicità. Questi test, noti come test di tossicità acuta sistemica, consistono nella somministrazione di una singola dose fino ad un limite di 2000 mg/kg, e in taluni casi di 5000 mg/kg. Se da una parte però i test di tossicità acuta soddisfano le esigenze dei requisiti di regolamentazione incentrati principalmente sull'identificazione della pericolosità della sostanza, quali p.e. la classificazione, dall'altra è stata spesso messa in discussione l'utilità dei dati ottenuti in questi test al fine di predire la probabilità di effetti sull'uomo (Balls, 1991; Basketter *et al.*, 1997; Langley, 2005; York *et al.*, 1996; York e Steiling, 1998). L'applicabilità delle informazioni derivanti dagli studi *in vivo* di tossicità acuta è in genere molto limitata, in quanto tali dati forniscono solo una stima della dose letale minima o di quella non letale massima senza la valutazione di altri parametri comunemente impiegati nella previsione del rischio. Al contrario le informazioni necessarie si potrebbero ottenere da altri test che non utilizzano come "endpoint" la letalità e che vengono in genere condotti nell'ambito del processo di sviluppo della sostanza (Robinson *et al.*, 2008). La campagna mediatica intensificatasi negli ultimi anni contro la sperimentazione animale non ha quindi solo ragioni di carattere etico, ma è supportata da obiezioni di tipo scientifico, in quanto i risultati ottenuti da studi di tossicità acuta negli animali non sono sempre utilizzabili per supportare i "trial" clinici nell'uomo.

Il concetto di alternativa alla sperimentazione animale risale alla definizione elaborata da Russel e Burch nel 1959 e comunemente definita delle 3R: Refinement (Raffinamento), Reduction (Riduzione) e Replacement (Rimpiazzamento). Con **raffinamento** si intende il miglioramento delle tecniche sperimentali, compiute pur sempre

su animali, in modo da ridurne la sofferenza. Con **riduzione** si intende la riduzione degli animali utilizzati, o l'aumento delle informazioni ottenibili con lo stesso numero di animali. Con **rimpiazzamento** si intende la sostituzione dell'animale con l'utilizzo di metodi alternativi.

Negli ultimi 20 anni sono state istituite due organizzazioni che coordinano e finanziano studi di validazione di saggi *in vitro*, supportano ricerche in diverse aree della tossicologia inerenti la sicurezza di sostanze chimiche, cosmetici, farmaci ecc., e promuovono sia la salute umana, sia il benessere degli animali, attraverso lo sviluppo di metodi avanzati sempre più affidabili. La prima di queste organizzazioni è l'ECVAM (European Centre for Validation of Alternative Methods) istituita nel 1991 dall'Unione Europea, seguita nel 1994 dall'ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods), la quale opera col supporto dell'NIH (National Institute of Health) e dell'NIEHS (National Institute of Environmental Health Science). Dopo l'istituzione nel 1998 del NICEATM (the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods), ad opera dell'ICCVAM, entrambe le istituzioni cooperano per promuovere la validazione di metodi alternativi ai test tossicologici sull'animale.

Dal 1998 ad oggi sono stati validati numerosi test *in vitro* che permettono di ridurre il numero di animali utilizzati nei test di tossicità acuta. In particolare per quanto riguarda la tossicità orale acuta nel 2006 sono stati validati dall'ICCVAM due test di citotossicità *in vitro*: il test del Neutral Red Uptake (NRU) applicato alle BALB/c 3T3 (linea cellulare di fibroblasti murini) e quello applicato alle NHK (cheratinociti umani) (ICCVAM, 2006b). Utilizzando questi test è possibile non solo determinare la citotossicità delle sostanze chimiche da testare, ma anche utilizzare i dati ottenuti per determinare la dose di partenza per i test di tossicità orale acuta sistemica *in vivo* basandosi sulla relazione fra i valori di

IC<sub>50</sub> (concentrazione inibente al 50%) ottenuti dal saggio del NRU e i valori di LD<sub>50</sub> (dose letale al 50%) stabiliti dal Registro di Citotossicità (RC). La formula di regressione lineare originaria, chiamata “*RC millimole regression*”, è stata proposta dallo ZEBET, il Centro Nazionale Tedesco per la Documentazione e la Valutazione dei Metodi Alternativi alla Sperimentazione Animale, come metodo per ridurre l’utilizzo degli animali attraverso l’identificazione della dose di partenza più appropriata nei test di tossicità orale acuta. Durante gli studi di validazione dell’ICCVAM, sono state sviluppate due nuove regressioni, con l’obiettivo di migliorare la capacità della “*RC millimole regression*” di predire correttamente i valori di LD<sub>50</sub> a partire da quelli di IC<sub>50</sub>, ma anche con l’obiettivo di rendere questo metodo adatto a testare miscele o sostanze di peso molecolare sconosciuto.

Lo studio mostra però che entrambi questi test non possono completamente sostituire i test sull’animale, in quanto non sono sufficientemente accurati nel predire la tossicità orale acuta, ma devono comunque essere utilizzati per predire la dose iniziale da utilizzare nei test di tossicità orale acuta nei roditori, riducendo conseguentemente il numero di animali da utilizzare. Questi ed altri test *in vitro* in corso di validazione vengono comunque condotti con linee cellulari trasformate o immortalizzate, o con cellule primarie. Le cellule immortalizzate sono prontamente disponibili e facilmente mantenibili in coltura, ma spesso manifestano un comportamento e un fenotipo anomali, non sovrapponibili a quelli delle cellule normali. Al contrario le cellule primarie possono essere considerate un miglior modello *in vitro* per la tossicologia predittiva, ma sono disponibili in quantità limitata e non sono sempre facilmente mantenibili in coltura. Inoltre, quando vengono isolate da animali, non rappresentano un modello sufficientemente predittivo per l’uomo ed è spesso necessario il sacrificio dell’animale da cui vengono prelevate. La ricerca è conseguentemente indirizzata verso la realizzazione di nuovi modelli *in vitro* basati su

cellule umane che possano essere facilmente isolate tramite metodiche non invasive, e che possano essere facilmente mantenute in coltura, in modo da ottenere un modello *in vitro* il più possibile predittivo per l'organismo umano.

Negli ultimi anni sono stati fatti enormi progressi nel campo delle cellule staminali, spinti dalla possibilità che tali cellule possano rappresentare una risorsa per riparare e rigenerare tessuti e organi danneggiati. Tali cellule presentano due caratteristiche fondamentali: sono capaci di auto propagarsi e possono dare origine a diversi tipi cellulari rappresentativi di vari organi e tessuti. Attualmente la ricerca è concentrata in particolare sull'utilizzo delle cellule staminali embrionali ed è già disponibile un protocollo per l'utilizzo delle cellule embrionali staminali di topo a scopi tossicologici (Genschow *et al.*, 2002). Sono tuttora in corso studi finalizzati alla messa a punto di un protocollo simile basato sull'utilizzo delle cellule staminali embrionali umane. L'obiettivo di tale ricerca è duplice: creare un metodo di laboratorio che sia predittivo degli effetti tossici sull'embrione umano e promuovere lo sviluppo e l'utilizzo di test tossicologici alternativi all'uso degli animali da esperimento, sfruttando le potenzialità delle moderne biotecnologie. L'utilizzo di cellule staminali embrionali umane pone però inevitabili questioni di carattere etico, per questo l'attenzione si sta attualmente concentrando sulla possibilità di utilizzare come alternativa le cellule staminali pluripotenti indotte (iPS), le quali presentano caratteristiche simili alle cellule staminali embrionali, ovviando alle problematiche di carattere etico. La loro scoperta è recentissima e risale al 2006 ad opera di Shinja Yamanaka (Takahashi e Yamanaka, 2006), grazie alla riprogrammazione di fibroblasti murini tramite trasfezione virale di 4 geni associati alla pluripotenza: Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc; e solo un anno più tardi il protocollo è stato applicato con successo ai fibroblasti umani (Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). La ricerca in questo campo sta facendo enormi progressi ma rimangono ancora numerosi problemi da risolvere, primi

fra tutti la modalità e l'efficienza della riprogrammazione, e il problema della loro precoce senescenza (Feng *et al.*, 2010).

Una possibilità per ovviare sia a queste problematiche, sia a quelle di carattere etico riguardanti le cellule staminali embrionali, potrebbe essere rappresentata dall'utilizzo di cellule staminali adulte, le quali sono facilmente isolabili, e allo stadio indifferenziato possiedono un'eccellente capacità proliferativa. Il loro utilizzo in campo tossicologico è già in fase di analisi nell'ambito dell'epatotossicità, ma nessuno studio è stato finora condotto per valutare il loro possibile utilizzo, allo stadio indifferenziato, come modello *in vitro* per test di tossicità acuta. Le staminali adulte, facilmente isolabili da qualsiasi individuo, potrebbero dare un importante contributo allo studio della suscettibilità individuale alle sostanze chimiche e alle nanoparticelle.

Pertanto durante il presente lavoro di tesi, mi sono occupata dello sviluppo di un nuovo test *in vitro* per la valutazione della tossicità orale acuta, seguendo le linee guida fornite dal Test Methods Evaluation Report dell'ICCVAM (ICCVAM, 2006b), basato sulle cellule staminali mesenchimali umane, che abbia la stessa capacità dei test basati sulle 3T3 e sulle NHK nel predire la dose di partenza per i test di tossicità orale acuta *in vivo*, e nel predire la categoria di rischio secondo la classificazione del Globally Harmonized System of Classification – GHS (ONU, 2009). Ho inoltre analizzato la possibilità di applicare tale test alla valutazione delle tossicità delle nanoparticelle, in particolare delle nanoparticelle di ossido di rame (CuO). Le nanoparticelle di CuO hanno infatti un ampio utilizzo, p.e. come semiconduttori o all'interno di dispositivi contraccettivi intrauterini (Aruoja *et al.*, 2009). Nonostante le loro numerose applicazioni, ne è già stata dimostrata ampiamente la tossicità in batteri, lieviti, microalghe, crostacei, zebrafish (Aruoja *et al.*, 2009; Griffit *et al.*, 2007; Heinlaan *et al.*, 2008; Kasemets *et al.*, 2009), così come in cellule umane

(Karlsson *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012) ed esistono dati riguardanti la loro IC<sub>50</sub> e confronti con la loro controparte micrometrica (Karlsson *et al.*, 2008).

## **3.2 Materiali e metodi**

### **3.2.1. Determinazione del tempo di duplicazione delle hMSCs**

Il Test Methods Evaluation Report dell'ICCVAM (ICCVAM, 2006b) raccomanda di utilizzare linee cellulari, o cellule primarie, di mammifero capaci di duplicarsi rapidamente in meno di 30 ore in condizioni di coltura standard. Le cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs), isolate e caratterizzate come descritto nelle sezioni **2.2.8.1** e **2.2.8.2**, sono state seminate in piastre petri da 8 cm<sup>2</sup> (Corning, Corning, NY, USA) alla densità di 1 x 10<sup>4</sup> cellule/cm<sup>2</sup> e incubate a 37°C in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO<sub>2</sub>, utilizzando terreno di coltura completo (alpha minimum essential medium Sigma Aldrich) contenente il 20% di siero fetale bovino. Dopo 5, 24, 48 e 72 ore sono state tripsinizzate 3 petri, utilizzando lo 0,1% di tripsina e lo 0,04% di EDTA per 7 minuti a 37 °C. Le cellule sono state contate elettronicamente tramite Coulter Counter (Beckman Dickinson, Fullerton, CA, USA) in modo da realizzare delle curve di crescita che hanno permesso di verificare che il tempo di duplicazione delle hMSCs utilizzate è pari a 24 ore.

### **3.2.2 Sostanze chimiche e loro preparazione**

Tutte le sostanze chimiche testate sono state fornite dalla Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Come suggerito dall'ICCVAM, sono state scelte 12 fra le 30 sostanze di riferimento, 2 per ciascuna delle 5 classi GHS di classificazione delle sostanze chimiche, e

due sostanze non classificate (ICCVAM, 2006b). Come controllo positivo è stato utilizzato il sodio dodecilsolfato (SDS). Le sostanze chimiche scelte sono riportate in **Tabella 3.1**.

<i>Reagente chimico</i>	<i>Peso molecolare (g/mol)</i>	<i>Numero CAS</i>
<b>Controllo positivo</b>		
Sodio dodecilsolfato	288,38	151-21-3
<b>LD<sub>50</sub> ≤ 5 mg/kg (classe GHS 1)</b>		
Cloruro di Mercurio (II)	271,5	7487-94-7
Cicloesimide	281,39	66-81-9
<b>5 &lt;LD<sub>50</sub> ≤ 50 mg/kg (classe GHS 2)</b>		
Arsenito di sodio	129,91	7784-46-5
Sodio dicromato diidrato	298	7789-12-0
<b>50 &lt;LD<sub>50</sub> ≤ 300 mg/kg (classe GHS 3)</b>		
Cloruro di Cadmio (II)	183,32	10108-64-2
Fluoruro di sodio	41,99	7681-49-4
<b>300 &lt;LD<sub>50</sub> ≤ 2000 mg/kg (classe GHS 4)</b>		
Propranololo HCl	295,8	3506-09-0
Atropina solfato monoidrato	694,83	5908-99-6
<b>2000 &lt;LD<sub>50</sub> ≤ 5000 mg/kg (classe GHS 5)</b>		
Cloruro di potassio	74,56	7447-40-7
Acido tricloroacetico	163,39	76-03-9
<b>LD<sub>50</sub> &gt; 5000 mg/kg - non classificato (classe GHS 6)</b>		
Sodio ipoclorito	74,443	7681-52-9
Glicerolo	92,09	56-81-5

**Tabella 3.1** Indicazione dei 12 reagenti chimici scelti per lo studio tra i trenta suggeriti come riferimento dall'ICCVAM, divisi in funzione della categoria di rischio GHS, del peso molecolare e del numero CAS associato ad ognuno.

### 3.2.3 Particelle di CuO e loro caratterizzazione

Sono state utilizzate due tipologie di particelle di CuO: microparticelle (< 5µm, purezza pari al 98%) e nanoparticelle (< 50 nm purezza pari al 98%), entrambe fornite dalla Sigma Aldrich (Cat. no. 208841 and Cat. no. 544868, rispettivamente). Le soluzioni madri sono state preparate, alla concentrazione di 300 µg/ml, in terreno standard di coltura senza supplementi tramite sonicazione per 2 ore. Per ottenere le differenti concentrazioni utilizzate in questo studio, la soluzione madre è stata diluita con terreno di coltura supplementato con il 5% di FBS, l'1% di antibiotici e L-glutammina 2mM.

Le dimensioni delle particelle sono state analizzate utilizzando un microscopio elettronico a trasmissione (JEOL TEM-100S operating at 80–100 kV). Brevemente, una goccia di soluzione madre (30 µl) è stata depositata su un retino precedentemente coperto con un sottile (80-90nm) strato di resina EPON (Glycide Ether 100, Merk, Darmstadt Germany), in modo da evitare la perdita delle particelle attraverso le maglie della griglia, e lasciata asciugare per tutta la notte a temperatura ambiente. Le immagini ottenute tramite TEM sono state utilizzate per determinare la dimensione approssimativa delle particelle utilizzando il software NIH ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.htm>).

### 3.2.4 Neutral Red Uptake

Il saggio del Neutral Red Uptake (NRU) è stato eseguito secondo il protocollo standard di Borenfreund e Puerner (1985) modificato dall'ICCVAM (2006a, 2006b). Cellule staminali mesenchimali umane al 6° passaggio sono state seminate in piastre multiwell da 96 pozzetti alla concentrazione di  $3,5 \times 10^3$  cellule/100µl in ciascun pozzetto, in terreno di coltura  $\alpha$ MEM (supplementato con il 20% di FBS, l'1% di penicillina e

streptomicina e L-glutammina 2 mM, Sigma Aldrich), e successivamente incubate (37 °C/5% CO<sub>2</sub>) per 24 ore, in modo da permetterne l'adesione. Questa densità di semina è stata determinata effettuando dei test del NRU con differenti concentrazioni di cellule (1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, e 4.5 x 10<sup>3</sup> cellule) in modo da identificare il numero di cellule che permetta una crescita esponenziale durante l'esecuzione del test.

Al termine delle 24 ore di incubazione, il terreno delle hMSCs è stato sostituito con 100 µl di terreno αMEM supplementato con il 5% di FBS, l'1% di penicillina e streptomicina e L-glutammina 2 mM, in cui sono state disciolte le 8 differenti concentrazioni di ciascuna sostanza chimica scelta. Tutte le sostanze chimiche sono state disciolte senza l'utilizzo di alcun solvente, pertanto sono stati utilizzati come controlli hMSCs trattate con il terreno standard αMEM supplementato con il 5% di FBS. Le cellule sono state successivamente incubate (37 °C/5% CO<sub>2</sub>) con le 8 concentrazioni delle sostanze per ulteriori 48 ore, al termine delle quali il terreno contenente le sostanze chimiche è stato aspirato, le cellule sono state lavate con 250µl di PBS pre-riscaldato, e successivamente sono stati aggiunti, ad ogni pozzetto, 250 µl di NR medium (1 ml di NR Stock Solution, 79 ml di αMEM; Stock Solution: 0,4 g NR, 100 ml milliQ H<sub>2</sub>O). Le cellule sono state incubate per 3 ore a 37°C in modo da permettere l'incorporazione del colorante nei lisosomi delle cellule vive e ancora adese alla piastra. Al termine delle 3 ore il NR incorporato nelle cellule vive è stato estratto mediante aggiunta di 100 µl di una miscela all'1% di acido acetico in etanolo al 50% (Desorbing solution). Per facilitare l'estrazione del colorante le multiwell sono state poste in agitazione per 20 minuti e l'assorbanza del NR è stata rilevata tramite un lettore di piastre BioTek EL800 plate reader, (BioTek Instrument Inc, Winooski, VT, USA) alla lunghezza d'onda di 540nm.

### 3.2.5 Analisi statistica

I dati ottenuti con il lettore di piastre sono stati trasferiti in un foglio di lavoro di Microsoft Office Excell 2007<sup>®</sup> in modo da determinare la vitalità cellulare (espressa come percentuale rispetto ai controlli non trattati ) e in modo da verificare i criteri di accettazione del test stabiliti dall'ICCVAM (ICCVAM, 2006b).

I valori di IC<sub>50</sub> di ciascuna sostanza da testare sono stati calcolati secondo i criteri proposti dall'ICCVAM utilizzando la seguente funzione di Hill riadattata, ossia un modello matematico logistico a 4 parametri, tramite il software statistico GraphPad Prism<sup>®</sup> 4.0:

$$\log IC_{50} = \log EC_{50} - \frac{\log\left(\frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{Y - \text{Bottom}} - 1\right)}{\text{HillSlope}} \quad (1)$$

dove IC<sub>50</sub> rappresenta la concentrazione che determina l'inibizione della crescita del 50% delle cellule, EC<sub>50</sub> è la concentrazione che determina una risposta inibitoria intermedia fra la risposta massima (Top = massima sopravvivenza) e quella minima (Bottom = massima tossicità), Y = 50 (ossia risposta al 50%), e la Hill slope, adimensionale, descrive la pendenza della curva. Il parametro Top è stato fissato a 100, quello Bottom è stato fissato a zero nel caso in cui sia stato raggiunto lo 0% di vitalità durante l'esperimento e lasciato libero nel caso in cui non sia stato raggiunto il 100% di tossicità.

Per verificare la bontà della regressione ottenuta è stato utilizzato il coefficiente di determinazione R<sup>2</sup>.

È stata utilizzata l'equazione (1) in quanto questa viene raccomandata dall'ICCVAM (2006a, 2006b) come l'equazione più comune per l'analisi di dati concentrazione-risposta ottenuti *in vitro*, dal momento che vengono utilizzati tutti i dati concentrazione-risposta ottenuti, anziché pochi punti intorno al valore di IC<sub>50</sub>. Infatti

utilizzando la funzione di Hill riadattata è possibile valutare la pendenza della curva, la quale è estremamente importante nella predizione della tossicità di una sostanza a specifiche concentrazioni, e mostra come la risposta incrementi rapidamente all'aumentare delle concentrazioni.

I dati di IC<sub>50</sub> ottenuti sono stati riportati come media  $\pm$  SD di almeno 2 esperimenti indipendenti, condotti in esaplicato, ossia 12 valori per ciascuna concentrazione. Gli stessi dati sono stati utilizzati per effettuare un'analisi tramite regressione lineare utilizzando i corrispondenti valori di LD<sub>50</sub> forniti dal Test Methods Evaluation Report dell'ICCVAM (ICCVAM, 2006b). Per verificare la bontà delle regressioni lineari ottenute è stato utilizzato il coefficiente di determinazione lineare  $r^2$ . Le regressioni risultanti sono state successivamente comparate con quelle delle 3T3 e delle NHK, eseguendo un *F*-test tramite il software statistico GraphPad Prism<sup>®</sup> 4.0. I dati di IC<sub>50</sub> ottenuti sono stati utilizzati anche per predire i valori di LD<sub>50</sub> e le categorie di rischio GHS utilizzando le regressioni *RC rat-only millimole* e *RC rat-only weight*, come raccomandato dall'ICCVAM (2006b).

### 3.3 Risultati

La caratterizzazione fenotipica delle hMSCs effettuata tramite analisi citofluorimetrica, ha permesso innanzitutto di dimostrare che le cellule al 6° passaggio, utilizzate per questo studio, sono cellule mesenchimali, essendo positive per il CD44, CD105, CD90 e CD73 e negative per il CD34 e il CD45. Conseguentemente sono state utilizzate per i successivi esperimenti in modo da verificarne il possibile utilizzo per la stima dei valori di LD<sub>50</sub> e per predire la categoria di rischio GHS per ciascuna delle sostanze testate.

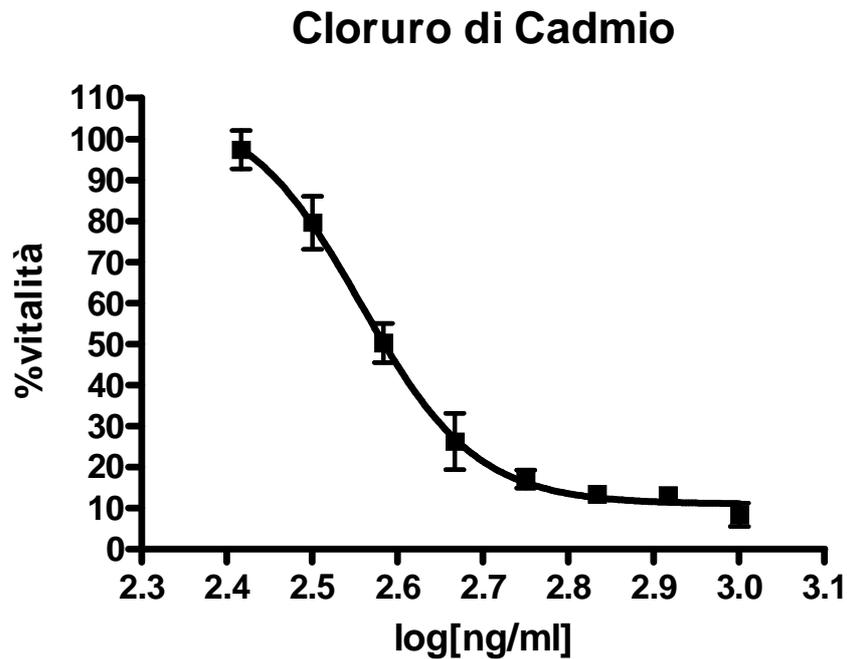
Il test di valutazione delle hMSCs è stato condotto utilizzando le 12 sostanze scelte come suggerito dall'ICCVAM (2006b), e la vitalità correlata ad ogni sostanza è stata

misurata tramite il test del NRU. Sono state seguite accuratamente tutte le raccomandazioni dell'ICCVAM, e sono stati presi in considerazione soltanto gli esperimenti che hanno soddisfatto tutti i criteri di accettazione stabiliti dalle linee guida.

Tali criteri sono riportati di seguito:

- La media dei controlli della colonna di destra e la media dei controlli della colonna di sinistra non devono differire più del 15% dalla media di tutti i controlli
- Dev'essere presente almeno un valore di vitalità  $>0\%$  e  $\leq 50\%$  e almeno un valore  $>50\%$  e  $<100\%$
- Il valore di  $IC_{50}$  del controllo positivo (SDS) dev'essere compreso in un intervallo dato dalla media dei valori di  $IC_{50}$  ottenuti in precedenza in laboratorio  $\pm 2,5$  volte la deviazione standard di tale media
- La curva concentrazione-risposta del controllo positivo (SDS) deve avere un coefficiente di determinazione  $R^2 \geq 0,85$ .

La concentrazione di ciascuna sostanza che determina il 50% di inibizione della crescita cellulare ( $IC_{50}$ ) è stato calcolato utilizzando l'equazione (1), come precedentemente descritto nella sezione **3.2.5**. Un esempio delle curve ottenute utilizzando l'equazione (1) è mostrato in **figura 3.1**.



**Figura 3.1.** *Dati di vitalità cellulare. Curva concentrazione-risposta del Cloruro di Cadmio somministrato alle hMSCs per 48 ore. I dati sono espressi come media  $\pm$  SD della vitalità percentuale di 2 esperimenti indipendenti condotti in esaplicato per ciascuna delle 8 concentrazioni. La linea continua rappresenta il fitting della curva ottenuto tramite la funzione di Hill riadattata, riportata nell'equazione (1). Il valore di  $IC_{50}$  ottenuto è pari a 386,55 ng/ml.*

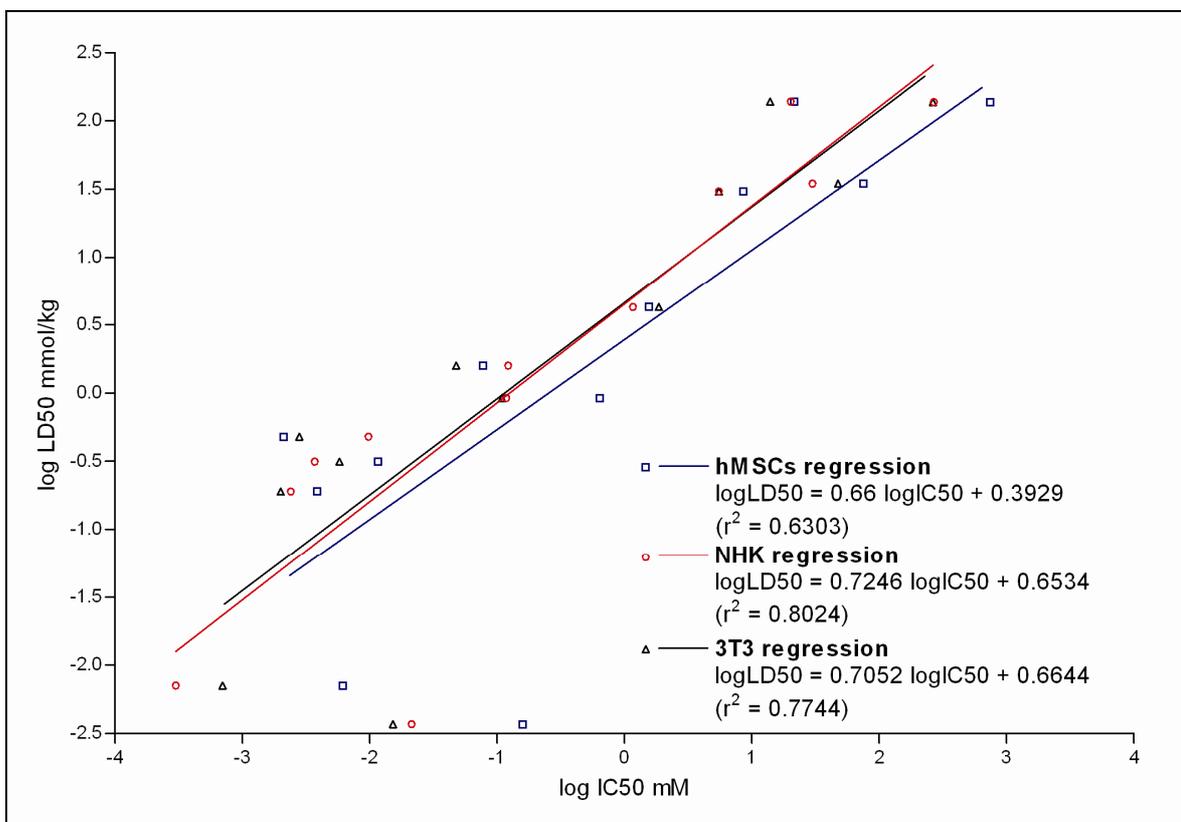
I valori di  $IC_{50}$  ottenuti, espressi come media geometrica, sono riportati in **tabella 3.2**, insieme ai corrispondenti valori dei coefficienti di determinazione delle funzioni di Hill riadattate ( $R^2$ ). Ogni valore di  $IC_{50}$  è stato successivamente convertito in unità millimolari, e conseguentemente correlato linearmente al corrispondente valore di  $LD_{50}$  del Registro di Citossicità, come mostrato nella **tabella 3.2**. La regressione risultante è stata

comparata con quelle ottenute, per le stesse sostanze, durante lo studio di validazione delle 3T3 e delle NHK condotto dall'ICCVAM (2006b).

<i>Reagente Chimico</i>	<i>LD<sub>50</sub> (mmole/kg) (Registro della citotossicità orale per i roditori )</i>	<i>IC<sub>50</sub> (µg/mL)</i>	<i>IC<sub>50</sub> (mM)</i>	<i>R<sup>2</sup></i>
Sodio dodecilsolfato	4,4663	53,85	0,19	0,96
Cloruro di mercurio II	0,0037	43,10	0,16	0,97
Cicloesamide	0,0071	1,72	0,006	0,96
Arsenito di sodio	0,3156	1,52	0,01	0,89
Sodio dicromato diidrato	0,1908	1,15	0,004	0,95
Cloruro di cadmio II	0,4801	0,39	0,002	0,98
Fluoruro di sodio	4,29	65,51	1,56	0,98
Propranololo HCl	1,589	22,99	0,08	0,98
Atropina solfato monoidrato	0,9204	445,14	0,64	0,98
Cloruro di potassio	34,9	5592,89	75,01	0,92
Acido tricloroacetico	30,59	1408,43	8,62	0,89
Ipoclorito di sodio	138,7	1601,40	21,51	0,91
Glicerolo	137,8	68391,33	742,66	0,98

**Tabella 3.2.** Sostanze chimiche scelte per il test di citotossicità, valori di LD<sub>50</sub> ottenuti dal RC (Registro di Citossicità) e valori di IC<sub>50</sub> ottenuti nel presente studio con le hMSCs, espressi sia come µg/ml sia come mmol/l, con i corrispondenti valori dei coefficienti di determinazione (R<sup>2</sup>) (I valori di IC<sub>50</sub> dell'SDS rappresentano la media di 20 esperimenti indipendenti precedentemente condotti nel nostro laboratorio).

La regressione lineare ottenuta e il suo confronto con entrambe le regressioni validate sono mostrate in **figura 3.2**. L'F-test è stato eseguito comparando le pendenze e le intercette delle tre regressioni lineari. I risultati mostrano che la regressione lineare relativa alle hMSCs non è statisticamente differente da quella relativa alle 3T3 (valore della pendenza = 0,8231, valore dell'intercetta = 0,4834) ed alle NHK (valore della pendenza = 0,7445, valore dell'intercetta = 0,5095).



**Figura 3.2.** Confronto tra la regressione relativa alle hMSCs ottenuta nel presente studio e quelle relative alle 3T3 e NHK, riportate nel report dell'ICCVAM per le 12 sostanze chimiche selezionate.

In accordo col report dell'ICCVAM (2006b), l'accuratezza del metodo del NRU e delle regressioni  $IC_{50}$ - $LD_{50}$  ad esso associate, possono essere valutate calcolando i valori di

LD<sub>50</sub> previsti per ciascuna sostanza testata, utilizzando la media geometrica dell'IC<sub>50</sub> nelle seguenti regressioni:

- $\log LD_{50} \text{ (mmol/kg)} = 0.439 \log IC_{50} \text{ (mM)} + 0,621$
- $\log LD_{50} \text{ (mmol/kg)} = 0.372 \log IC_{50} \text{ (}\mu\text{g/ml)} + 2,024$

I valori di LD<sub>50</sub> ottenuti dall'analisi della regressione sono riportati in **Tabella 3.3** e sono stati utilizzati per predire le categorie di rischio GHS, riportate in **Tabella 3.1**, ed incluse anche in **Tabella 3.3**.

<i>Reagente chimico</i>	<i>Classe GHS</i>	<i>LD<sub>50</sub> (mmole/kg)  Registro della citotossicità orale per i roditori</i>	<i>LD50 Previsto (mg/kg)  utilizzando la regressione RAT-only MILLIMOLE dal Registro della citotossicità</i>			<i>LD50 Previsto (mg/kg)  utilizzando la regressione RAT-only WEIGHT dal Registro della citotossicità</i>		
			<i>hMSCs</i>	<i>3T3</i>	<i>NHK</i>	<i>hMSCs</i>	<i>3T3</i>	<i>NHK</i>
<b>Cloruro di mercurio II</b>	<i>LD<sub>50</sub> ≤ 5 mg/kg (classe GHS 1)</i>	1	506 <sup>a</sup>	181 <sup>a</sup>	209 <sup>a</sup>	429 <sup>a</sup>	179 <sup>a</sup>	203 <sup>a</sup>
<b>Cicloesamide</b>	<i>LD<sub>50</sub> ≤ 5 mg/kg (classe GHS 1)</i>	2	125 <sup>a</sup>	48 <sup>a</sup>	33 <sup>a</sup>	129 <sup>a</sup>	57 <sup>a</sup>	40 <sup>a</sup>
<b>Arsenito di sodio</b>	<i>5 &lt; LD<sub>50</sub> ≤ 50 mg/kg (classe GHS 2)</i>	41	77 <sup>a</sup>	57 <sup>a</sup>	46	123 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>	80 <sup>a</sup>
<b>Sodio dicromato diidrato</b>	<i>5 &lt; LD<sub>50</sub> ≤ 50 mg/kg (classe GHS 2)</i>	50	109 <sup>a</sup>	81 <sup>a</sup>	88 <sup>a</sup>	111 <sup>a</sup>	87 <sup>a</sup>	93 <sup>a</sup>
<b>Cloruro di cadmio II</b>	<i>50 &lt; LD<sub>50</sub> ≤ 300 mg/kg (classe GHS 3)</i>	88	51	58	101	74	83	131
<b>Fluoruro di sodio</b>	<i>50 &lt; LD<sub>50</sub> ≤ 300 mg/kg (classe</i>	180	213	230	188	501 <sup>a</sup>	534 <sup>a</sup>	449

	<i>GHS 3)</i>							
<b>Propranololo HCl</b>	300 <LD <sub>50</sub> ≤ 2000 mg/kg (classe GHS 4)	470	403	325	492	339	283 <sup>b</sup>	402
<b>Atropina solfato monoidrato</b>	300 <LD <sub>50</sub> ≤ 2000 mg/kg (classe GHS 4)	639	2388 <sup>a</sup>	1099	1135	1022	529	544
<b>Cloruro di potassio</b>	2000 <LD <sub>50</sub> ≤ 5000 mg/kg (classe GHS 5)	2602	2073	1699 <sup>b</sup>	1387 <sup>b</sup>	2619	2213	1862 <sup>b</sup>
<b>Acido tricloroacetico</b>	2000 <LD <sub>50</sub> ≤ 5000 mg/kg (classe GHS 5)	4999	1758 <sup>b</sup>	1445 <sup>b</sup>	1026 <sup>b</sup>	1568 <sup>b</sup>	1328 <sup>b</sup>	994 <sup>b</sup>
<b>Ipoclorito di sodio</b>	LD <sub>50</sub> > 5000 mg/kg - nc (classe GHS 6)	10328	1196 <sup>b</sup>	990 <sup>b</sup>	1163 <sup>b</sup>	1645 <sup>b</sup>	1401 <sup>b</sup>	1606 <sup>b</sup>
<b>Glicerolo</b>	LD <sub>50</sub> > 5000 mg/kg -nc (classe GHS 6)	12691	7006	4452 <sup>b</sup>	4482 <sup>b</sup>	6647	4526 <sup>b</sup>	4553 <sup>b</sup>

**Tabella 3.3.** Previsione della Categoria GHS di Tossicità Orale Acuta mediante i metodi del NRU basati sulle hMSCs, sulle 3T3 e sulle NHK attraverso le regressioni Rat-Only Millimole e Rat-Only Weight. (a- sottostimato; b- sovrastimato).

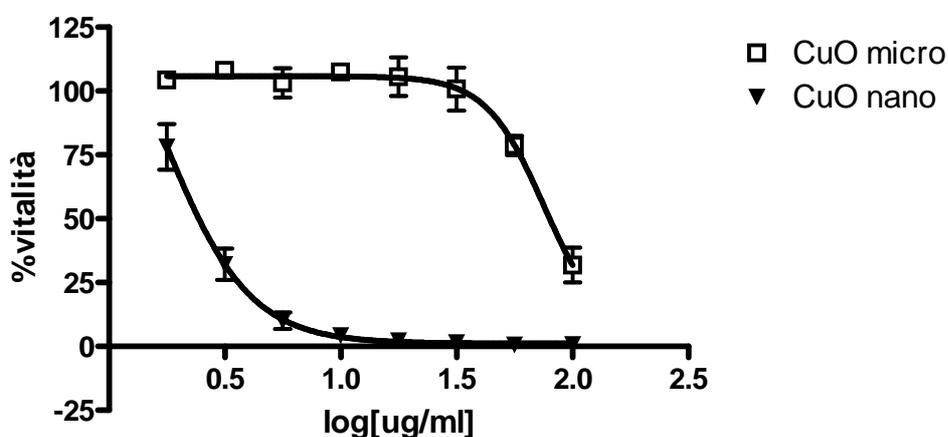
Utilizzando la regressione RC rat-only Millimole si può osservare come il metodo basato sulle hMSCs predica correttamente la categoria GHS per i vari reagenti chimici testati in 5 casi su 12, corrispondente a circa il 41,7%; il test del NRU basato sulle 3T3 ha invece una percentuale di previsione corretta del 33,3%, pari a 4 casi su 12, mentre quello

delle NHK presenta la stessa percentuale delle hMSCs. Più in dettaglio, la tossicità *in vivo* è stata sottostimata per il 41,7%, 33,3% e 25% e sovrastimata per il 16,7%, 33,3% e 33,3% rispettivamente dai metodi basati sulle hMSCs, 3T3 e NHK.

D'altra parte, osservando i risultati forniti dalla regressione *RC rat-only Weight* si ha che le hMSCs predicono correttamente le categorie GHS nel 41,7% dei casi (5/12), mentre sia le 3T3 sia le NHK non vanno oltre il 25% (3/12). La tossicità *in vivo* pertanto è stata sottostimata per tutte le linee cellulari del 41,7% ed è stata sovrastimata per il 16,7%, 33,3% e 33,3% dalle hMSCs, 3T3 e NHK, rispettivamente. La maggiore difficoltà per le hMSCs nel predire correttamente la categoria di rischio, utilizzando entrambi i tipi di regressione, la si è osservata in particolare considerando i reagenti chimici maggiormente tossici (GHS 1 e GHS 2), per i quali la tossicità *in vivo* risulta invariabilmente sottostimata. Le stesse conclusioni si raggiungono con entrambe le regressioni per le prime due classi GHS anche nel caso delle 3T3 e delle NHK. Al contrario, l'utilizzo delle hMSCs porta a sovrastimare la tossicità *in vivo* di soli due dei reagenti chimici selezionati, ossia l'acido tricloroacetico (classe GHS 5) e il sodio ipoclorito (classe GHS 6). Invece, i metodi validati basati sulle 3T3 e sulle NHK sovrastimano per tutti i reagenti chimici leggermente tossici. Si noti inoltre che il test del NRU basato sulle 3T3, mostra un buon grado di predizione solo per il caso del potassio cloruro (classe GHS 5) e solo nel caso in cui si usi la regressione *RC rat-only Weight*.

Come specificato nell'introduzione, è stata presa in considerazione anche la possibilità di applicare tale test per la valutazione della tossicità orale acuta di NPs di CuO. I risultati mostrati in **figura 3.3** mostrano chiaramente come le nanoparticelle di CuO siano molto più tossiche della corrispondente controparte micrometrica. Infatti il CuO nanometrico risulta tossico per tutto l'intervallo di concentrazioni testate (1,78-100 µg/ml),

con un valore di  $IC_{50}$  pari a  $2,5 \pm 0,53 \mu\text{g/ml}$ , mentre le particelle micrometriche manifestano una tossicità ridotta, con un valore di  $IC_{50}$  pari a  $72,13 \pm 16,2 \mu\text{g/ml}$ .



*Figura 3.3. Dati di vitalità cellulare. Curve concentrazione-risposta delle hMSCs incubate per 48 ore con CuO. I quadrati rappresentano i dati relativi alle micro particelle di CuO, i triangoli quelli relativi alle NPs. I dati sono espressi come media  $\pm$  SD della vitalità percentuale di 2 esperimenti indipendenti condotti in esaplicato per ciascuna delle 8 concentrazioni. La linea continua rappresenta il fitting della curva ottenuto tramite la funzione di Hill riadattata, riportata nell'equazione (1). Il valore di  $IC_{50}$  ottenuto è pari a  $2,5 \pm 0,53 \mu\text{g/ml}$  per le nanoparticelle, e a  $72,13 \pm 16,2 \mu\text{g/ml}$  per le particelle micrometriche.*

### 3.4 Discussione

Lo scopo del presente studio è stato quello di testare una nuova linea cellulare (hMSCs) per saggi di citotossicità di base. L'approccio utilizzato è stato impostato partendo dal modello di regressione sviluppato da Spielmann (1999), seguendo le regole

stabilite dall'ICCVAM (2006b) in seguito allo studio di validazione delle 3T3 e delle NHK. Le raccomandazioni dell'ICCVAM sono state accuratamente seguite e i criteri di accettazione suggeriti, completamente soddisfatti. In particolare, le raccomandazioni dell'ICCVAM richiedono che ogni nuova linea cellulare da testare dimostri di possedere uguale o maggiore accuratezza e realizzabilità delle due linee cellulari (3T3 e NHK) già validate. I risultati ottenuti in questo studio mostrano che la regressione ottenuta con le hMSCs non differisce statisticamente da quelle relative alle linee cellulari 3T3 e NHK validate dall'ICCVAM, basate sul confronto tra pendenza e intercetta, le quali rappresentano parametri essenziali quando si considera l'idoneità dei saggi di base sulla citotossicità.

L'accuratezza del metodo presentato è da ricercarsi nell'identificazione dei reagenti chimici e delle proporzioni per le quali le categorie di rischio GHS sono state correttamente predette, nella comparazione fra la linea cellulare proposta e le due linee cellulari già validate. I risultati mostrano chiaramente che per le sostanze testate, le hMSCs possiedono identiche o in alcuni casi maggiori capacità di predire correttamente le categorie di rischio GHS di quelle mostrate dalle 3T3 e dalle NHK.

Quanto trovato sembra essere estremamente promettente dal momento che la possibilità di testare reagenti chimici utilizzando un sistema umano potrebbe incrementare la pertinenza e l'accuratezza della predizione tossicologica. Inoltre, e questo è il motivo principale per cui è stato scelto di testare cellule umane, la capacità delle cellule staminali di differenziarsi in varie tipologie cellulari e svilupparsi in sistemi di organi, permette loro di sostituire linee cellulari trasformate e cellule primarie per studi *in vitro*, eliminando quindi potenziali limitazioni e migliorando l'attinenza dei saggi di previsione. Un altro fattore importante da considerare è che la possibilità di ottenere cellule staminali da soggetti

umani potrebbe offrire l'opportunità mai avuta in precedenza di analizzare come influisca il corredo genetico sulla suscettibilità individuale alla tossicità.

Esistono inoltre ulteriori aspetti del perché le hMSCs possano rappresentare un'opzione migliore delle due linee cellulari validate e attualmente in uso. A tal riguardo, va specificato il fatto che gli esiti dei saggi del NRU basati sulle 3T3 e sulle NHK sono confrontabili, ma l'ICCVAM suggerisce l'uso della linea cellulare 3T3 per condurre questa tipologia di test in quanto meno costosa se confrontata con la linea cellulare NHK. D'altra parte però, le 3T3 non rappresentano un sistema umano che di norma sarebbe da preferirsi. Sulla base di ciò, le hMSCs possono rappresentare un'alternativa ideale alle NHK, dal momento che i costi corrispondenti ai relativi esperimenti sono comparabili a quelli che si hanno utilizzando le 3T3.

Il metodo proposto renderà possibile la valutazione della tossicità di nuovi reagenti chimici mediante studi *in vitro* e potrà inoltre essere utilizzato per prevedere le dosi iniziali da somministrare per studi di tossicità *in vivo*, così che si abbia una sostanziale riduzione dei test sugli animali, nonché dei costi ad essi associati. Tali dosi iniziali saranno di fatto impiegate nell'ambito di numerose procedure approvate per test di tossicità orale acuta *in vivo*, come ad esempio l'ATC (Acute Toxic Class), l'UDP (Up-and-Down Procedure) e la FDP (Fixed Dose Procedure), in accordo con quanto stabilito dall'OECD (2001a, 2001b, 2008). Oltre a ciò, le simulazioni effettuate mediante computer potrebbero essere utilizzate in maniera più appropriata, per ciascuna sostanza, per stimare il numero di animali necessari allo studio, e anche il relativo tasso di sopravvivenza. Tuttavia, va osservato che la linea cellulare proposta nel presente studio (hMSCs), così come d'altra parte le 3T3 e le NHK, non sono in grado di prevedere correttamente la categoria di rischio nel caso delle sostanze più tossiche (GHS 1 e GHS 2). Diversi fattori potrebbero essere responsabili per tale assenza di accuratezza. Risulta chiaro, a tal riguardo, che le colture cellulari *in vitro*

non sono in grado di mimare la cinetica e la dinamica delle sostanze legate ai sistemi *in vivo*. Infatti, quando si considerano i sistemi *in vitro*, l'assorbimento, il metabolismo, la distribuzione e i processi di escrezione, che controllano l'esposizione dei tessuti bersaglio dell'organismo *in vivo*, sono assenti (Blaauboer *et al.*, 1990; Flint, 1990). Come conseguenza, le concentrazioni tossiche alle quali i sistemi *in vitro* e *in vivo* sono esposti potrebbero non corrispondere le une alle altre (o corrispondere solo per un breve lasso di tempo) (Blaauboer *et al.*, 2002a, 2002b; ICCVAM 2006a, 2006b). Pertanto, dal momento che i reagenti chimici richiedono che vi sia attivazione metabolica per manifestare la loro tossicità, è possibile che il loro comportamento non sia correttamente interpretato dalla curva di regressione, che a sua volta non è in grado di stimare correttamente la tossicità *in vivo* (Clemedson *et al.*, 2002).

Inoltre, è ben noto che la maggior parte dei saggi di citotossicità basale sottostimano la tossicità dei reagenti chimici noti per agire su specifici recettori o cellule (Clemedson *et al.*, 2002). Tale è il caso del cloruro di mercurio II (classe GHS 1) e dell'arsenito di sodio (classe GHS 2), per i quali gli organi bersaglio primari negli esseri umani sono rispettivamente i reni ed il sistema nervoso centrale e periferico (Aschner e Aschner, 1990; Cheng *et al.*, 2011; HSDB, 2005; Huang *et al.*, 2010; Lewis, 2000; Magos e Clarkson, 2006), nonché il tratto gastrointestinale, il cuore, il cervello ed i reni (Das *et al.*, 2010; Garcia-Chavez *et al.*, 2003; HSDB, 2003; Lin *et al.*, 2007; Manna *et al.*, 2008), e sia le hMSCs così come le 3T3 e le NHK, usate per i test di tossicità e confrontate nell'ambito di questo lavoro, provengono da differenti tessuti. Pertanto la tossicità stimata utilizzando queste cellule può essere attribuita a differenti meccanismi.

Altro fattore importante da considerare è la presenza delle proteine del siero, le quali possono o no essere incluse nei sistemi cellulari di coltura. Ad esempio, i terreni di coltura delle hMSCs e delle 3T3 contengono siero, ma non quello delle NHK. Infatti, un

agente tossico può o no legarsi alle proteine del siero, e ciò può ridurre la sua disponibilità nei siti bersaglio. Le proteine del siero creano un ambiente di crescita ottimale per le cellule e preservano diversi componenti vitali, ad esempio membrana e citoscheletro, o enzimi chiave. In particolare, la sottostimata tossicità del cicloesimide, noto inibitore della sintesi proteica, può essere spiegata come suggerito da Geier (Geier *et al.*, 1992), il quale ha dimostrato che, sebbene venga bloccata la sintesi proteica, il siero inibisce la morte cellulare indotta da tale reagente tossico, probabilmente attraverso la stabilizzazione di alcune proteine cellulari vitali per le cellule.

Consideriamo ora il caso in cui le hMSCs proposte danno luogo a sovrastima della tossicità. Oltre ad alcuni dei fattori discussi precedentemente, il comportamento osservato può essere attribuito al saggio del NRU stesso, dal momento che esso si basa sull'abilità delle cellule vitali di incorporare e legare il neutral red, un colorante sopravvitali che penetra attraverso le membrane cellulari delle cellule vitali e si accumula nei lisosomi. Pertanto, se l'agente tossico comporta alterazioni della superficie cellulare o della sensibilità della membrana lisosomiale, vi sarà un minore assorbimento o un minor legame del neutral red, di conseguenza il saggio potrà rilevare una minore vitalità cellulare, che a sua volta darà luogo ad una sovrastima della citotossicità (Barile *et al.*, 1994). Questa spiegazione si applica al caso dell'acido tricloroacetico, dal momento che uno studio recente ha dimostrato che esso causa destabilizzazione della membrana lisosomiale (Abdel-Hamid *et al.*, 2011). Il comportamento del sodio ipoclorito può essere giustificato seguendo le medesime considerazioni, dal momento che anch'esso mostra un meccanismo di degradazione della membrana, principalmente in seguito all'azione del cloro (Estrela *et al.*, 2002; Simon *et al.*, 2009).

Come accennato nell'introduzione, dati i promettenti risultati ottenuti con tale test per la valutazione della tossicità orale acuta di sostanze chimiche, si è voluta valutare la

sua possibile applicazione per la stima della tossicità acuta anche di nanoparticelle, in particolare quelle di ossido cuprico. I dati ottenuti in questo caso sono perfettamente concordanti con quelli già presenti in letteratura ottenuti da Karlsson su cellule epiteliali alveolari A549 (Karlsson *et al.*, 2009), dove le nanoparticelle di CuO risultano molto più tossiche della rispettiva controparte micrometrica. In questo lavoro la maggiore tossicità delle NPs rispetto alle particelle micrometriche, viene spiegata dal fatto che le prime, a causa delle loro ridotte dimensioni, sono in grado di interagire fisicamente con le membrane mitocondriali inducendo apoptosi. In un recente studio condotto da Semisch (Semisch *et al.*, 2014), vengono confrontate la citotossicità e la genotossicità di nano e microparticelle di CuO, riscontrando, anche in questo caso una maggior tossicità delle NPs. Una delle analisi che viene effettuata è la misura dell'area superficiale delle particelle utilizzate tramite analisi di Brunauer-Emmett-Teller (BET), riscontrando un valore pari a 17,23 m<sup>2</sup>/g nel caso delle nanoparticelle, e pari a 0,74 m<sup>2</sup>/g nel caso delle particelle micrometriche. Pertanto in tale lavoro, la maggior tossicità delle particelle nanometriche viene attribuita proprio alla loro maggior area superficiale (circa 23 volte maggiore di quella delle microparticelle), che ne incrementerebbe l'attività redox, tipica del rame, sia a livello extra che intracellulare, determinando una maggiore mortalità delle cellule.

Inoltre, anche i dati relativi al valore di IC<sub>50</sub> ottenuto per le NPs di CuO risultano in accordo con dati presenti in letteratura condotti sulla linea di monociti umani leucemici THP-1, dove viene riscontrato un valore compreso fra 3 e 3,89 µg/ml (Lanone *et al.*, 2009), e sulla linea tumorale YUMAC (Wang Y. *et al.*, 2012), dove si riscontra un valore pari a 1,533 µg/ml.

In conclusione, questo lavoro di ricerca (Scanu *et al.*, 2011; Mancuso e Cao, 2014) ha mostrato per la prima volta come le hMSCs possono essere utilizzate per eseguire test di tossicità acuta *in vitro*. Infatti, in confronto ai sistemi tradizionalmente utilizzati, basati su

linee cellulari trasformate o immortalizzate, le hMSCs consentono di ottenere modelli più accurati delle condizioni *in vivo*.

La maggiore aspettativa riposta in tale studio è che, sebbene i test siano stati condotti su un numero ridotto di sostanze tossiche e su una sola tipologia di NPs, i risultati ottenuti possano essere considerati come un passo avanti verso uno sforzo costante rivolto allo sviluppo di metodi alternativi che sostituiscano quelli che fanno uso di test su animali.

# Capitolo 4

## Conclusioni

---

Gli importanti progressi della conoscenza nelle scienze della vita, iniziati alla fine del secolo scorso, che ancora stanno acquisendo impulso, producono un sempre più rapido avanzamento dell'ingegneria e della medicina a livello biomolecolare, cellulare e tissutale. Tale sviluppo ha luogo altresì in un momento in cui la popolazione mondiale sta subendo importanti variazioni nello stile di vita, si verifica un continuo aumento dell'età media e crescono le aspettative di una migliore qualità della vita. In questo contesto nasce una nuova disciplina, l'Ingegneria Biomedica, la quale utilizza le metodologie e le tecnologie dell'Ingegneria per descrivere, comprendere e risolvere le problematiche di interesse medico-biologico, attivando una stretta collaborazione interdisciplinare tra ingegneri, biofisici, medici e biologi.

L'obiettivo dell'Ingegneria Biomedica è quindi essenzialmente quello di produrre nuove tecnologie che apportino beneficio alla salute umana, avvalendosi di molteplici settori di interesse, quali la modellistica computazionale o la più recente Ingegneria Tissutale.

Le attività svolte durante la presente tesi di dottorato, si inseriscono all'interno di questo contesto, toccando diverse aree di interesse dell'Ingegneria Biomedica, fra cui in particolare l'Ingegneria dei Tessuti, in quanto la mia principale attività ha riguardato la messa a punto di un protocollo di decellularizzazione di arterie carotidi ovine, vasi dal

diametro interno inferiore ai 6 mm, con lo scopo di ottenere uno scaffold funzionale da utilizzare nella realizzazione di sostituti vascolari ingegnerizzati di piccolo calibro.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che la combinazione di un detergente non-ionico, qual è il Triton X-100, con un trattamento enzimatico, la Tripsina, risulta più efficiente del trattamento ionico (SDS) per l'ottenimento di una matrice extracellulare da carotide ovina da utilizzare per la realizzazione di una protesi vascolare di piccolo calibro con caratteristiche molecolari e meccaniche confrontabili a quelle di un'arteria nativa. Tali risultati hanno dimostrato anche che i detergenti, gli enzimi e gli antibiotici impiegati nei protocolli descritti, possono essere efficacemente rimossi senza influenzare la proliferazione cellulare. Questo è un aspetto molto importante in quanto studi precedenti hanno dimostrato come eventuali tracce residue di detergenti possano causare tossicità (Cebotari *et al.*, 2010), e rendere impossibile il ripopolamento e il successivo impianto della protesi.

I risultati ottenuti in questa fase rappresentano quindi il punto di partenza per possibili sviluppi futuri: la realizzazione di una protesi vascolare funzionale tramite ripopolamento della matrice con cellule staminali autologhe. Si tratta, come precedentemente esposto, di cellule non specializzate, in grado di replicarsi per lunghi periodi senza andare incontro a differenziamento. Possiedono quindi la capacità di auto-rinnovamento ma possono anche dare origine a cellule progenitrici, con capacità proliferativa limitata, dalle quali discendono popolazioni di cellule altamente differenziate (p.e. nervose, muscolari, ematiche). Possono facilmente essere isolate da diverse fonti, e se prelevate dal paziente ricevente eliminano la problematica del fenomeno del rigetto.

Le cellule staminali non sono però strumento esclusivo della medicina rigenerativa, ma possono fornire un ottimo apporto anche alla tossicologia *in vitro*.

Dal 1998 ad oggi sono stati infatti validati numerosi test *in vitro* che permettono di ridurre il numero di animali utilizzati nei test di tossicità acuta. Tuttavia, i test basati su colture cellulari ad oggi validati non possono completamente sostituire i test sull'animale, in quanto non sono sufficientemente accurati nel predire la tossicità orale acuta. I test tossicologici *in vitro* ad oggi proposti vengono spesso condotti con linee cellulari trasformate o immortalizzate, che presentano un comportamento e un fenotipo anomali, o con cellule primarie disponibili in quantità limitata, e non sempre facilmente mantenibili in coltura.

Lo sviluppo di test alternativi alla sperimentazione animale, semplici, veloci, poco costosi e altamente predittivi per l'uomo, diviene particolarmente importante se si considera il vertiginoso incremento dei materiali innovativi disponibili per applicazioni avanzate in tutti i settori dell'Ingegneria Biomedica.

Pertanto durante il presente lavoro di tesi, mi sono occupata dello sviluppo di un nuovo test *in vitro* per la valutazione della tossicità orale acuta, seguendo le linee guida fornite dal Test Methods Evaluation Report dell'ICCVAM (ICCVAM, 2006b), basato sulle cellule staminali mesenchimali umane, che abbia la stessa capacità dei test già validati e basati sulle 3T3 e sulle NHK nel predire la dose di partenza per i test di tossicità orale acuta *in vivo*, e nel predire la categoria di rischio secondo la classificazione del Globally Harmonized System of Classification – GHS (ONU, 2009).

I risultati mostrano chiaramente che per le sostanze testate, le hMSCs possiedono identiche o in alcuni casi maggiori capacità di predire correttamente le categorie di rischio GHS di quelle mostrate dalle 3T3 e dalle NHK.

Quanto trovato sembra essere estremamente promettente dal momento che la possibilità di testare reagenti chimici utilizzando un sistema umano potrebbe incrementare la pertinenza e l'accuratezza della predizione tossicologica. Inoltre, va specificato il fatto

che gli esiti dei saggi del NRU basati sulle 3T3 e sulle NHK sono confrontabili, ma l'ICCVAM suggerisce l'uso della linea cellulare 3T3 per condurre questo genere di test in quanto meno costosa se confrontata con la linea cellulare NHK. D'altra parte però, le 3T3 non rappresentano un sistema umano che di norma sarebbe da preferirsi. Sulla base di ciò, le hMSCs possono rappresentare un'alternativa ideale alle NHK, dal momento che i costi corrispondenti ai relativi esperimenti sono comparabili a quelli che si hanno utilizzando le 3T3.

Inoltre, tale test si è rivelato estremamente utile nella valutazione della tossicità delle nanoparticelle, in particolare delle nanoparticelle di ossido di rame (CuO). Si tratta di particelle caratterizzate da ampio utilizzo, p.e. come semiconduttori o all'interno di dispositivi contraccettivi intrauterini (Aruoja *et al.*, 2009). Tuttavia, nonostante le loro numerose applicazioni, l'utilizzo di queste e altre innovative sostanze su scala nanometrica non è stato accompagnato nel tempo da una normativa specifica rendendo necessario lo sviluppo di test utili a garantirne la sicurezza per l'uomo.

Questa parte del mio lavoro di tesi si inserisce quindi in uno dei più recenti settori dell'Ingegneria Biomedica quello delle nanotecnologie, che trova applicazione in numerosi settori produttivi, dalla medicina alla cosmesi. Si tratta di un campo ampio e complesso che ha in comune il solo elemento della "scala dimensionale", perciò è difficile adottare un'unica regolamentazione valida per un'ampia varietà di materiali, sostanze e applicazioni che interessano quasi tutti gli ambiti della scienza.

Il test *in vitro* basato sulle cellule staminali mesenchimali qui presentato e finalizzato alla valutazione della tossicità delle micro e nanoparticelle di CuO, ha fornito dati perfettamente concordanti con quelli già presenti in letteratura ottenuti da Karlsson su cellule epiteliali alveolari A549 (Karlsson *et al.*, 2009), dove le nanoparticelle di CuO risultano molto più tossiche della rispettiva controparte micrometrica. Inoltre, poiché anche

i dati relativi al valore di  $IC_{50}$  ottenuto per le NPs di CuO risultano in accordo con dati presenti in letteratura (Lanone *et al.*, 2009; Wang Y. *et al.*, 2012), è ragionevole ipotizzare una possibile applicabilità del test anche alla valutazione della tossicità di NPs.

La maggiore aspettativa riposta in tale studio è che, sebbene i test siano stati condotti su un numero ridotto di sostanze tossiche e su una sola tipologia di NPs, i risultati ottenuti possano essere considerati come un passo avanti verso uno sforzo costante rivolto allo sviluppo di metodi alternativi che sostituiscano quelli che fanno uso di test su animali.

## Referenze bibliografiche

---

Abdel-Hamid NM, El-Moselhy MA, and El-Baz A. (2011). "Hepatocyte lysosomal membrane stabilization by olive leaves against chemically induced hepatocellular neoplasia in rats." *International Journal of Hepatology*. Vol. 2011, Article ID 736581, 6 pages.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.(1994). *Molecular Biology of the Cell*. 3rd. Anderson, M.; Granum, S., editors. Garland Publishing; NY, USA.

Allaire E., Bruneval P., Mandet C., Becquemin J.P., Michel J.B.(1997). The immunogenicity of the extracellular matrix in arterial xenografts. *Surgery* 122, 73–81.

Amiel G.E, Komura M., Shapira O., Yoo J.J., Yazdani S., Berry J., Kaushal S., Bischoff J., Atala A., Soker S. (2006). Engineering of blood vessels from acellular collagen matrices coated with human endothelial cells. *Tissue Eng*.

Anderson J. M., Hiltner A., Wiggins M. J., Schubert M. A., Collier T. O., Kao W. J., Mathur A. B. (1998). Recent advances in biomedical polyurethane biostability and biodegradation. *Polymer International*, 1998; 46: 163 – 171.

Aruoja V., Dubourguier H.C., Kasemets K., Kahru A. (2009). Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Sci Total Environ* 407: 1461–1468.

Asada M., Ebihara S., Yamanda S., Niu K., Okazaki T., Sora I., Arai H. (2009) Depletion of serotonin and selective inhibition of 2B receptor suppressed tumor

angiogenesis by inhibiting endothelial nitric oxide synthase and extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. *Neoplasia* 11, 408–417.

Aschner M., and Aschner J.L. (1990). "Mercury neurotoxicity: mechanisms of blood-brain barrier transport." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 14(2):169-176.

Bader A., Steinhoff G., Strobl K., Schilling T., Brandes G., Mertsching H., Tsikas D., Froelich J., Haverich A. (2000). Engineering of human vascular aortic tissue based on a xenogeneic starter matrix, *Transplantation*, vol. 70, no. 1, pp. 7–14.

Badylak F. S., Freytes D. O., Gilbert T. W. (2009). Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomaterialia* vol.5: p.1-13.

Badylak F. S., Taylor D., Uygun K. (2011). Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds. *Annual Review of Biomedical Engineering*: p.27-53.

Badylak S.F. (2002) The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Semin Cell Dev. Biol.* 13, 377–383.

Badylak, S.F. and Gilbert, T.W. (2008) Immune response to biologic scaffold materials. *Semin Immunol.* 20, 109–116.

Baguneid M. S, Seifalian A. M., Salacinski H. J., Murray D., Hamilton G. and Walker M. G, (2006) Tissue engineering of blood vessels, *British Journal of Surgery* 93, 282-290

Baiguera S., Del Gaudio C., Jaus M.O., Polizzi L., Gonfiotti A., Comin C.E., Bianco A., Ribatti D., Taylor D.A., Macchiarini P. (2012). Long-term changes to in vitro preserved bioengineered human trachea and their implications for decellularized tissues. *Biomaterials* 33(14):3662-72.

Balls M. (1991). Why modification of the LD50 test will not be enough. *Lab Anim* 25: 198–206.

Ballyk P.D., Walsh C., Butany J., Ojha M. (1998). Compliance mismatch may promote graft-artery intimal hyperplasia by altering suture-line stresses. *J Biomech.*31(3):229-237.

Baptista P.M, Orlando G., Mirmalek-Sani S. H., Siddiqui M., Atala A. and Soker S. (2009). Whole organ decellularization: a tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc:*6526–9.

Baptista P.M., Siddiqui M.M., Lozier G., Rodriguez S.R., Atala A., Soker S.I. (2011). The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology;*53:604–17

Barile F.J., Dierickx P.J., and Kristen U. (1994). "In Vitro Cytotoxicity Testing for Prediction of Acute Human Toxicity." *Cell Biology and Toxicology* 10(3):155-162.

Barry L., Murphy J.M. (2004) Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 568–584

Basketter D.A., Reynolds F.S., York M. (1997). Predictive testing in contact dermatitis.Irritant dermatitis. *Clin Dermatol* 15: 637–644.

Bergmeister H., Strobl M., Grasl C., Liska R., Schima H. (2013). Tissue engineering of vascular grafts. *Eur Surg;*45(4):187-193.

Bhatia S.N., Balis U.J., Yarmush M.L., Toner M. (1998). Microfabrication of hepatocyte/fibroblast cocultures: role of homotypic cell interactions. *Biotechnol. Prog.* 14:378–87.

Birchall M. and Hamilton G. (2012) Tissue engineered vascular replacement for children. *Lancet.* 380:197-198.

Blaauboer B.J., Wortelboer H.M., and Mennes W.C. (1990). "The use of liver cell cultures derived from different mammalian species in *in vitro* toxicological studies: implementation in extrapolation models?" *ATLA.* 18:251-258.

Blaauboer B.J. (2002a). "The Applicability of *in Vitro*-Derived Data in Hazard Identification and Characterisation of Chemicals." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 11:213-225.

Blaauboer, B.J. (2002b). "The necessity of biokinetic information in the interpretation of *in vitro* toxicity data." *ATLA*. 30, Supplement 2:85-91.

Borenfreund E., and Puerner J.A. (1985). Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* 24, 119-124.

Boyce T., Edwards J., Scarborough N. (1999) Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop. Clin. North Am.* 30, 571–581

Brutsaert D.L. (2003). Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. *Physiol. Rev.* 83:59-11.

Cappello J., Crissman J., Dorman M., Mikolajczak M., Textor G., Marquet M. and Ferrari F. (1990). Genetic engineering of structural protein polymers. *Biotechnol Prog*;6(3):198–202.

Cebotari S., Tudorache I., Jaekel T., Hilfiker A., Dorfman S., Ternes W., Haverich A., Lichtenberg A. (2010). Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. *Artif Organs* 34(3):206-10.

Chamberlain G., Fox, J., Ashton B., Middleton J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. Nov;25(11):2739-49.

Chapel A., Bertho J.M., Bensidhoum M., Fouillard L., Young RG., Frick J., Demarquay C., Cuvelier F., Mathieu E., Trompier F., Dudoignon N., Germain C., Mazurier C., Aigueperse J., Borneman J., Gorin N.C., Gourmelon P., Thierry D. (2003).

Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J. Gene. Med.* 5, 1028–1038.

Chen R.R., Mooney D.J. (2003). Polymeric growth factor delivery strategies for tissue engineering, *Pharm. Res.*;20:1103–1112.

Cheng S.J., Lee J.J., Chang H.H., Chen H.M, Chiang M.L, Kuo M.Y, Tseng, C.Y., and Kok S.H. (2011). "Differential toxicities of intraneurally injected mercuric chloride for sympathetic and somatic motor fibers: an ultrastructural study." *Journal of the Formosan Medical Association.* 110(2):93-99.

Chow M.J., Zhang Y. (2011). Changes in the mechanical and biochemical properties of aortic tissue due to cold storage. *Journal of Surgical Research* 171, 434–442

Clarke D.L., Johansson C.B., Wilbertz J., Veress B., Nilsson E., Karlström H., Lendahl U., Frisén J. (2000). Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 288, 1660–1663.

Clemedson C., Nordin-Andersson M., Bjerregaard H.F., Clausen J., Forsby A., Gustafsson H., Hansson U., Isomaa B., Jorgensen C., Kolman A., Kotova N., Krause G., Kristen U., Kurppa K., Romert L. and Scheers E. (2002). "Development of an *in vitro* test battery for the estimation of acute human systemic toxicity: an outline of the EDIT project." *ATLA* 30(3):313-321.

Conklin B.S., Richter E.R., Kreutziger K.L., Zhong D.-S., Chen C. (2002). Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft. *Medical Engineering & Physics* 24, 173–183.

Contreras M.A , Quist W.C., Logerfo F.W. (2000). Effect of porosity on small-diameter vascular graft healing. *Microsurgery* 20(1):15-21.

Cortiella J., Niles J., Cantu A., Brettler A., Pham A., Vargas G., Winston S., Wang J., Walls S., Nichols J.E. (2010). Influence of Acellular Natural Lung Matrix on Murine

Embryonic Stem Cell Differentiation and Tissue Formation. *Tissue Eng Part A*. 16(8):2565-2580.

Crapo P. M., Gilbert T. W., Badylak S. F. (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* vol. 32: p.3233-3243.

Curcio E., Macchiarini P., De Bartolo L. (2010). Oxygen mass transfer in a human tissue-engineered trachea. *Biomaterials* 31: 5131–36

Das A.K, Sahu R., Dua TK, Bag S., Gangopadhyay M., Sinha M.K., and Dewanjee S. (2010). "Arsenic-induced myocardial injury: protective role of *Corchorus olitorius* leaves." *Food and Chemical Toxicology* 48(5):1210-1207.

Davignon J., Mabile L. (2001). Mechanisms of action of statins and their pleiotropic effects. *Ann. Endocrinol.* 62, 101–112.

Depasquale I., Wheatley D.N. (2006). Action of Lovastatin (Mevinolin) on an in vitro model of angiogenesis and its co-culture with malignant melanoma cell lines. *Cancer Cell Int.* 6, 9.

Devine S.M, Cobbs C., Jennings M., Bartholomew A., Hoffman R. (2003) Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* 101, 2999–3001.

Duncan A.W., Soto-Gutierrez A. (2013). Liver repopulation and regeneration: new approaches to old questions. *Curr Opin Organ Transplant* 18:197–202

Dutta R. C. and Dutta A. K. (2009) Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications, *Biotechnology Advances*, 27, 334–339.

Earle W.R. (1943). Production of malignancy *in vitro*. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J. Nat. Cancer Inst.* 4: 165-212.

Erices A., Conget P., Minguell J.J. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol.* 109, 235–242.

Estrela C., Estrela C.R.A., Barbin E.L., Spanó J.C.E., Marchesan M.A., and Pécora J.D. (2002). "Mechanism of action of sodium hypochlorite." *Brazilian Dental Journal* 13(2):113-117.

Feng Q., Lu S.J., Klimanskaya I., Gomes I., Kim D., Chung Y., Honig G.R., Kim K.S., Lanza R. (2010) Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence. *Stem Cells* 28:704–712

Fischer-Piette E. (1929). Le tissu lymphocyto-gène des Crustacés étudié en survie in vitro. *C.R. hebd. Soc. Biol., Paris, III*: 764-766.

Flint O.P. (1990). "In vitro toxicity testing: purpose, validation and strategy." *ATLA* 18:11-18.

Freed L. E., Vunjak-Novakovic G., Biron R. J., Eagles D. B., Lesnoy D. C, Barlow S. K., Langer R. (1994). Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering. *Nature Biotechnology* 12, 689–693.

Fuchs J.R., Nasser B.A., Vacanti J.P. (2001). Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction, *Ann Thorac Surg*; 72:577–591.

Fukumitsu K., Yagi H., Soto-Gutierrez A. (2011) Bioengineering in organ transplantation: targeting the liver. *Transplant Proc.* 43: 2137–8.

Garcia-Chavez E., Santamaria A., Diaz-Barriga F., Mandeville P., Juarez B.I. and Jimenez-Capdeville M.E. (2003). "Arsenite-induced formation of hydroxyl radical in the striatum of awake rats." *Brain Research* 976(1):82-89.

Geier A., Beery R., Haimshon M., Hemi R. and Lunenfeld B. (1992). "Serum and insulin inhibit cell death induced by cycloheximide in the human breast cancer cell line MCF-7." *In vitro Cellular and Developmental Biology* 28A(6):415-418.

Genschow E., Spielmann H., Scholz G., Seiler A., Brown N., Piersma A., Brady M., Clemann N., Huuskonen H., Paillard F., Bremer S., and Becker K. (2002). "The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests, results of the definitive phase and evaluation of prediction models." *ATLA* 30(2):151-176.

Gilbert A., Evtushenko M., Nair H. (2001). Purification of fibrinogen and virus removal using preparative electrophoresis. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;936:625-9

Gilbert T.W., Sellar, T.L., Badylak S.F. (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* vol.27: p.3675-3683.

Girton T.S., Oegema T.R., Tranquillo R.T. (1999). Exploiting glycation to stiffen and strengthen tissue equivalents for tissue engineering. *J Biomed Mater Res.* 46(1):87-92.

Gobbi A. (2007) L'impiego delle cellule mesenchimali autologhe e del gel piastrinico per il trattamento delle lesioni cartilaginee *Comunicazioni dell'Oasi Bioresearch Foundation Gobbi Onlus, Milano, 29-31.*

Goh S-K., Bertera S., Olsen P., Candiello J.E., Halfter W., Uechi G., Balasubramani M., Johnson S.A., Sicari B.M., Kollar E., Badylak S.F., Banerjee I. (2013). Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering. *Biomaterials* 34:6760–72.

Goissis G., Suzigan S., Parreira D.R., Maniglia J.V., Braile D.M., Raymund, S. (2000). Preparation and characterization of collagen-elastin matrices from blood vessels intended as small diameter vascular grafts. *Artificial Organs* 24, 217–223.

Goldman, S., Zadina K., Moritz T., Ovitt T., Sethi G., Copeland J.G., Thottapurathu L., Krasnicka B., Ellis N., Anderson R.J., Henderson W. (2004) Long-term patency of saphenous vein and left internal mammary artery grafts after coronary artery bypass surgery: results from a Department of Veterans Affairs Cooperative Study. *J Am Coll Cardiol* 44(11): p. 2149-56.

Gorna K. Gogolewski S. (2006). Biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue repair and regeneration. *Journal of Biomedical Material Research* 79A: 128 – 138.

Gorna K., Gogolewski S. (2002). Biodegradable polyurethanes for implants. II. In vitro degradation and calcification of materials from poly( $\epsilon$ -caprolactone)-poly(ethylene oxide) diols and various chain extenders. *Journal of Biomedical Material Research* 60: 592 – 606.

Grassl E.D, Oegema T.R, Tranquillo R.T. (2003) A fibrin-based arterial media equivalent. *J Biomed Mater Res A*. Sep 1;66(3):550-61.

Grassl E.D., Oegema T.R., Tranquillo R.T. (2002) Fibrin as an alternative biopolymer to type-I collagen for the fabrication of a mediaequivalent. *J Biomed Mater Res*. 60(4):607-12.

Greenwald S.E, Berry C.L. (2000). Improving vascular grafts: the importance of mechanical and haemodynamic properties. *J Pathol* 190: 292-9.

Griffitt, R.J., Weil R., Hyndman K.A., Denslow N.D., Powers K. (2007). Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol* 41, 8178–8186.

Grikscheit T.C., Aleem Siddique B.A., Ochoa E. R., Srinivasan A., Alsberg E., Hodin R.A. and Vacanti J. P. (2004). Tissue-engineered small intestine improves recovery after massive small bowel resection. *Ann Surg* 240:748–54.

Grillo H.C. (2002). Tracheal replacement: a critical review. *Ann Thorac Surg*. 73: 1995–2004.

Halloran P.F. (2004). Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N. Engl. J. Med*. 351:2715–29.

Harrison R. (1907) Observations on the living developing nerve fiber. *Anat. Rec*. 1:116-128; *Proc. Soc. Exp. Med, N.Y.* 140-143.

Heinlaan M., Ivask A., Blinova I., Dubourguier H.C., Kahru A. (2008). Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* 71:1308–1316.

Hergenrother R.W., Wabers H.D., Cooper S.L. (1993). Effect of hard segment chemistry and strain on the stability of polyurethanes: in vivo biostability. *Biomaterials* 14: 449-458.

Hermanns M.I., Unger R E., Kehe K., Peters K., Kirkpatrick C. J. (2004). Lung epithelial cell lines in coculture with human pulmonary microvascular endothelial cells: development of an alveolo-capillary barrier in vitro. *Lab. Invest.* 84:736–52.

Hibino N., McGillicuddy E., Matsumura G. (2010). Late-term results of tissue-engineered vascular grafts in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg* 139:431– 436, 436

Higgins S.P., Solan A.K., Niklason L.E. (2003) Effects of polyglycolic acid on porcine smooth muscle cell growth and differentiation. *J Biomed Mater Res A.* 2003; 67: 295–302

Horwitz E. M. (2002). Stem cell plasticity: the growing potential of cellular therapy *Archives of medical research* 34, 600-606.

Howard AB, Alexander RW, Nerem RM, Griendling KK, Taylor WR. (1997). Cyclic strain induces an oxidative stress in endothelial cells. *Am J Physiol* 272: 421-7

HSDB. (2003). Hazardous Substances Data Bank [Internet]. Bethesda (MD): U.S. National Library of Medicine. Toxicology Data Network (ToxNet), National Institutes of Health (NIH), Department of Health and Human Services. [Last Revision Date 20030305]. Sodium Arsenite; Hazardous Substances Databank Number: 693. Available from: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>

HSDB. (2005). Hazardous Substances Data Bank [Internet]. Bethesda (MD): U.S. National Library of Medicine. Toxicology Data Network (ToxNet), National Institutes of

Health (NIH), Department of Health and Human Services. Last Revision Date 20050823].  
Mercury Chloride; Hazardous Substances Databank Number: 33. Available from:  
<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>

Hsu S., Tseng H., Wu M. (2000). Comparative In vitro evaluation of two different preparations of small diameter polyurethane vascular grafts. *Artif Organs*. 24(2):119-28

Huang C.F., Liu S.H., Hsu C.J., and Lin-Shiau SY. (2010). "Neurotoxicological effects of low-dose methylmercury and mercuric chloride in developing offspring mice." *Toxicological Letters* 201(3):196-204.

Hutter H., Vogel B.E., Plenefisch J.D., Norris C.R., Proenca R.B., Spieth J., Guo C., Mastwal S., Zhu X., Scheel J., Hedgecock E.M. (2000) Conservation and novelty in the evolution of cell adhesion and extracellular matrix genes. *Science* 287, 989–994.

Huynh T., Abraham G., Murray J., Brockbank K., Hagen P. and Sullivan S. (1999) "Remodeling of an acellular collagen graft into a physiologically responsive neovessel," *Nature Biotechnology*, vol. 17, no. 11, pp. 1083–1086

Hyongbum K., Sung-Whan K., Douglas N., Sinae K., and Young-Sup Y. (2009). Cell Therapy with Bone Marrow Cells for Myocardial Regeneration. *Antioxid Redox Signal.*; 11(8): 1897–1911

**ICCVAM.** (2006a). "Background Review Document: in vitro basal cytotoxicity test methods for estimating acute oral systemic toxicity." NIH Publication No: 07-4518, National Institute for Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

**ICCVAM.** (2006b). "Test Method Evaluation Report (TMER): in vitro cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity testing." NIH Publication No: 07-4519, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

Ikada Y. (2006). Challenges in tissue engineering, *J R Soc Interface*3: 589–601.

Isenberg B.C., Williams C., Tranquillo R. T. (2006) Endothelialization and flow conditioning of fibrin-based media-equivalents, *Annals of Biomedical Engineering* 34, 971-985

Jackson K.A, Mi T., Goodell M.A. (1999) Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14482–14486.

Jason A.P., Tony H., Bernhard O. P., Shankar S. (2005). Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*; 6:99 – 111.

Jindal R., Nahmias Y., Tilles A.W., Berthiaume F., Yarmush M.L. (2009). Amino acid-mediated heterotypic interaction governs performance of a hepatic tissue model. *FASEB J.* 23:2288–98.

Kamkin A., Kiseleva I., Isenberg G. (2003). Activation and inactivation of a nonselective cation conductance by local mechanical deformation of acutely isolated cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* 57:793–803.

Kamkin A., Kiseleva I., Lozinsky I., Scholz H. (2005). Electrical interaction of mechanosensitive fibroblasts and myocytes in the heart. *Basic Res. Cardiol.* 100:337–45.

Karlsson H.L., Cronholm P., Gustafsson J., Moller L. (2008). Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem, Res. Toxicol.*, 21, 1726-1732.

Karlsson H.L., Gustafsson J., Cronholm P., Moller L. (2009). Size-dependent toxicity of metal oxide particles- A comparison between nano- and micrometer size. *Toxicology Letters.*, 188: 112-118.

Kasemets K., Ivask, A., Dubourguier H.C., Kahru A. (2009). Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicol In Vitro* 23: 1116–1122.

Kasimir M.T., Weigel G., Sharma J., Rieder E., Seebacher G. (2005). The decellularized porcine heart valve matrix in tissue issue engineering: platelet adhesion and activation. *Thromb. Haemost.* 94:562–67.

Kaushal S., Amiel G.E., Guleserian K.J., Shapira O.M., Perry T., Sutherland F.W, Rabkin E., Moran A.M., Schoen F.J., Atala A., Soker S., Bischoff J., Mayer J.E. Jr. (2001) Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo,” *Nature Medicine*, vol. 7, no. 9, pp. 1035–1040.

Kim H., Kim S-W., Nam D., Kim S. and Yoon Y-S. (2009) Cell Therapy with Bone Marrow Cells for Myocardial Regeneration. *Antioxid Redox Signal.* 11(8): 1897–1911.

Kleinman H., McGarvey M., Hassel J., Martin G., Baron van Evercooren A., Dubois-Dalcq M. (1984) The role of laminin in basement membranes and in the growth, adhesion and differentiation of cells. In: Kleinman H, McGarvey M editor. *The role of extracellular matrix in development.* New York: Liss; p. 123-143.

Langer R., Vacanti J.P. (1993). *Tissue Engineering.* *Science* 260:920–926.

Langley G. (2005). *European Coalition to End Animal Experiments: Acute Toxicity Testing Without Animals.* London: ECEAE

Lanone S., Rogerieux F., Geys J., Dupont A., Maillot-Marecha E., Boczkowski J., Lacroix G., Hoet P. ( 2009). Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines, *Particle and Fibre Toxicology* , 6:14

Lanza R. (2004). *Handbook of Stem Cells: Volume 2 Adult and Fetal Stem Cells.*

Laurence J. (2010) British boy receives tracheal transplant with his own cells. *BMJ* 340: c1633.

Levin D.E., Grikscheit T.C. (2012) Tissue-engineering of the gastrointestinal tract. *Curr Opin Pediatr*;24:365–70

Lewis R.J. (2000). "Sax's dangerous properties of industrial materials." 10<sup>th</sup> ed. Wiley and Sons Inc, New York.

Lichtenberg A., Tudorache I., Cebotari S., Suprunov M., Tudorache G. (2006). Preclinical testing of tissue-engineered heart valves re-endothelialized under simulated physiological conditions. *Circulation* 114:1559–65.

Lillie M.A, Gosline J.M. The viscoelastic basis for the tensile strength of elastin. *Int J Biol Macromol* 2002;30(2):119–127.

Lin A.M.Y, Cha P.L, Fang S.F., Chi C.W., and Yang C.H. (2007). "Endoplasmic reticulum stress is involved in arsenite-induced oxidative injury in rat brain." *Toxicology and Applied Pharmacology* 224(2):138-146.

Liu S.Q., Tische C., Alkema P.K. (2004). Neointima formation on vascular elastic laminae and collagen matrices scaffolds implanted in the rat aortae. *Biomaterials* 25, 1869–1882

Long J.L, Tranquillo R.T. (2003) Elastic fiber production in cardiovascular tissue-equivalents. *Matrix Biol.* 22(4):339-50

MacArthur B.D. and Oreffo, R.O.C. (2005). Bridging the gap. *Nature* 433:19-58.

Macchiarini P., Jungebluth P., Go T. (2008) Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 372: 2023–30.

Magos L., and Clarkson T.W. (2006). "Overview of the clinical toxicity of mercury." *Annals of Clinical Biochemistry* 43(Pt4):257-268.

Mailloux A., Deslandes B., Vaubourdolle M., Baudin B. (2003) Captopril and enalaprilat decrease antioxidant defences in human endothelial cells and are unable to protect against apoptosis. *Cell Biol. Int.* 27, 825–830.

Mancuso L. and Cao G. (2014) Acute toxicity test of CuO nanoparticles using human Mesenchymal Stem Cells. *Toxicological Mechanism and Methods* *in press*.

Mancuso L., Gualerzi A., Boschetti F., Loy F. and. Cao G. (2014) Decellularized Ovine Arteries as Small-Diameter Vascular Grafts. *Biomedical Materials* *in press*.

Manna P., Sinha M., and Sil P.C. (2008). "Arsenic-induced oxidative myocardial injury: protective role of arjunolic acid." *Archives of Toxicology* 82(3):137-149.

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

Maor P. M. and Rubinsky B. (2010). Non thermal irreversible electroporation for tissue decellularization. *J. Biomech Eng* vol.132.

McFetridge P.S., Daniel J.W., Bodamyali T., Horrocks M., Chaudhuri J.B. (2004) Preparation of porcine carotid arteries for vascular tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A*. 70: 224–34.

McGlohorn J.B., Holder W.D., Jr., Grimes L.W., Thomas C.B., Burg K.J. (2004) Evaluation of smooth muscle cell response using two types of porous polylactide scaffolds with differing pore topography. *Tissue Eng*. 10: 505–14

McGrath K.P, Tirrell D.A, Kawai M., Mason T.L., Fournier M.J. (1990) Chemical and biosynthetic approaches to the production of novel polypeptide materials. *Biotechnol Prog* 6(3):188–192

Menon N.G., Rodriguez E.D., Byrnes C.K., Giroto J.A., Goldberg N.H., Silverman R.P. (2003). Revascularization of human acellular dermis in full-thickness abdominal wall reconstruction in the rabbit model. *Ann. Plastic Surg*. 50:523–27.

Meyer D.E, Chilkoti A. ( 2002) Genetically encoded synthesis of protein-based polymers with precisely specified molecular weight and sequence by recursive directional ligation: examples from the elastinlike polypeptide system. *Biomacromolecules* 3(2):357–367

Miller D.C, Thapa A., Haberstroh K.M., Webster T.J. (2004) Endothelial and vascular smooth muscle cell function on poly(lactic-co-glycolic acid) with nano-structured surface features. *Biomaterials*. 25: 53–61

Mirmalek-Sani S-H, Orlando G., McQuilling J.P., Pareta R., Mack D.L., Salvatori M., Farney A.C., Stratta R.J., Atala A., Opara E.C., Soker S. (2013) Porcine pancreas extracellular matrix as a platform for endocrine pancreas bioengineering. *Biomaterials* 34:5488–95

Mooney D.J, Mazzoni C.L., Breuer C., McNamara K., Hern D., Vacanti J.P., Langer R. (1996) Stabilized polyglycolic acid fibre-based tubes for tissue engineering. *Biomaterials*. 17: 115–24

Moran E.C., Dhal A., Vyas D., Lanis A., Soker S., Baptista P.M. (2014) Whole-organ bioengineering: current tales of modern alchemy. *Transl Res*. 163(4):259-267.

Morin O. and Normand C. (1986). Long-term maintenance of hepatocyte functional activity in co-culture. Requirements for sinusoidal endothelial cells and dexamethasone. *J. Cell. Physiol*. 129: 103-110.

Mortensen P.B. (1989). The incidence of cancer in schizophrenic patients. *J. Epidemiol. Community Health* 43, 43–47.

Mrugala D., Bony C., Neves N., Caillot L., Fabre S., Moukoko D., Jorgensen C., Noël D. (2008) Phenotypic and functional characterisation of ovine mesenchymal stem cells: application to a cartilage defect model. *Ann. Rheum. Dis*. 67(3), 288–295

Nagapudi K., Brinkmana W.T., Thomas B.S. (2005). Viscoelastic and mechanical behavior of recombinant protein elastomers. *Biomaterials* 26(23):4695–4706.

Nahmias Y., Berthiaume F., Yarmush M.L. (2007). Integration of technologies for hepatic tissue engineering. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*. 103:309–29.

Naito Y., Shinoka T., Duncan D. (2011). Vascular tissue engineering: Towards the next generation vascular grafts. *Adv Drug Deliv Rev* 63:312–323

Nakayama K.H., Batchelder C.A., Lee C.I., Tarantal A.F. (2010) Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 16:2207–16

Nakayama K.H., Lee C.C.I., Batchelder C.A., Tarantal A.F. (2013) Tissue specificity of decellularized rhesus monkey kidney and lung scaffolds. *PLoS One* 8:10

Nelson D.L., Cox M. M. (2002). *I principi di Biochimica di Lehninger*. Terza edizione. Edizione Zanichelli.

Niklason L.E, Gao J., Abbott W.M., Hirschi K.K., Houser S., Marini R., Langer R. (1999) Functional arteries grown in vitro. *Science*. 16;284(5413):489-93

Niklason L.E., Langer R. (2001). Prospects for organ and tissue replacement, *J. Am. Med. Assoc*; 285:573–576.

Nowocin A.K., Southgate A., Gabe S.M. Ansari T. (2013) Biocompatibility and potential of decellularized porcine small intestine to support cellular attachment and growth. *J Tissue Eng Regen Med*.

**OECD.** (2001a). "Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. OECD Guideline For Testing of Chemicals No. 423." Paris, France.

**OECD.** (2001b). "Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 420." Paris, France.

**OECD.** (2008). "Acute Oral Toxicity – Up-and-Down Procedure. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 425." Paris, France.

Okuhn S.P., Connelly D.P., Calakos N., Ferrell L., Pan M.X., Goldstone J. (1989) Does compliance mismatch alone cause neointimal hyperplasia? *J Vasc Surg*. 9(1):35-45

ONU. (2009). "Globally harmonized system of classification and labeling of chemicals – GHS." Third revised edition. New York and Geneva.

Opitz F., Schenke-Layland K., Cohnert T.U., Starcher B., Halbhuber K.J., Martin D.P., Stock U.A. (2004) Tissue engineering of aortic tissue: dire consequence of suboptimal elastic fiber synthesis in vivo. *Cardiovasc Res.* 2004; 63: 719–30

Orlando G, Farney AC, Iskandar SS, Mirmalek-Sani SH, Sullivan DC, Moran E, AbouShwareb T, De Coppi P, Wood KJ, Stratta RJ, Atala A, Yoo JJ, Soker S. (2012) Production and implantation of renal extracellular matrix scaffolds from porcine kidneys as a platform for renal bioengineering investigations. *Ann Surg.* 256

Orlando G., Booth C., Wang Z., Totonelli G., Ross C.L., Moran E., Salvatori M., Maghsoudlou P., Turmaine M., Delario G., Al-Shraideh Y., Farooq U., Farney A.C., Rogers J., Iskandar S.S., Burns A., Marini F.C., De Coppi P., Stratta R.J., Soker S. (2013) Discarded human kidneys as a source of ECM scaffold for kidney regeneration technologies. *Biomaterials* 34:5915–25

Orlando G., Domínguez-Bendala J., Shupe T., Bergman C., Bitar K.N., Booth C., Carbone M., Koch K.L., Lerut J.P., Neuberger J.M., Petersen B., Ricordi C., Atala A., Stratta R.J., Soker S. (2013) Cell and organ bioengineering technology as applied to gastrointestinal diseases. *Gut.* 62:774–86

Ott H. C., Clippinger B., Conrad C., Schuetz C., Pomerantseva I., Ikonomidou L., Kotton D., Vacanti JP. (2010) Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat Med.* 16(8):927-33.

Ott H.C., Matthiesen T.S., Goh S.K, Black L.D., Kren S.M., et al. (2008). Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat. Med.* 14:213–21

Park K.M., Woo H.M. (2012) Systemic decellularization for multi-organ scaffolds in rats. *Transplant Proc* 44:1151–4.

Patel A., Fine B., Sandig M., Mequanint K. (2006) Elastin biosynthesis: The missing link in tissue-engineered blood vessels. *Cardiovasc Res* 71(1):40–49

Patil P.B., Chougule P.B., Kumar V.K., Almström S., Bäckdahl H., Banerjee D., Herlenius G., Olausson M., Sumitran-Holgersson S. (2013) Recellularization of acellular human small intestine using bone marrow stem cells. *Stem Cells Transl Med* 2:307–15.

Petersen T.H., Calle E.A., Zhao L., Lee E.J., Gui L., Raredon M.B., Gavrilov K., Yi T., Zhuang Z.W., Breuer C., Herzog E., Niklason L.E. (2010) Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science* 2010; 329: 538–41

Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K, Dougl, R, Mosca J. D., Moorman M. A, Simonetti D. W., Craig S., Marshak D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147.

Porges E., Schade B., Ropte W. (1985). Automated flow-through method to determine the dissolution rate of slightly soluble substances, *Pharm Ind*; 1:7-86.

Prakash Y.S., Stenmark K.R. (2012) Bioengineering the lung: molecules, materials, matrix, morphology, and mechanics. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 302:L361–2

Raeder, R.H. Badylak S.F., Sheehan C., Kallakury B., Metzger D.W. (2002) Natural anti-galactose alpha1,3 galactose antibodies delay, but do not prevent the acceptance of extracellular matrix xenografts. *Transpl. Immunol.* 10, 15–24

Redaelli A. and Montecvecchi F. (2007) *Biomeccanica - Analisi multiscala di tessuti biologici.*

Riva A., Faa G., Loffredo F., Piludu M., Testa Riva F. (1999) An improved OsO<sub>4</sub> maceration method for the visualization of Internal structures and surfaces in human

bioptic specimens by high resolution scanning electron microscopy. *Scanning Microscopy*. 13:111-122

Riva A., Loy F., Isola R., Isola M., Conti G., Perra A. (2007). New findings on 3-D microanatomy of cellular structures in human tissues and organs. An HRSEM study. *Eur J Histochem*.51:53-58.

Robinson S., Delongas J.L., Donald E., Dreher D., Festag M., Kervyn S., Lampo A., Nahas K., Nogues V., Ockert D., Quinn K., Old S., Pickersgill N., Somers K., Stark C., Stei P., Waterson L., Chapman K. (2008). A European pharmaceutical company initiative challenging the regulatory requirement for acute toxicity studies in pharmaceutical drug development. *Regul Toxicol Pharmacol* 50: 345–352

Ross E.A., Abrahamson D.R., St John P., Clapp W.L., Williams M.J., Terada N., Hamazaki T., Ellison G.W., Batich C.D. (2012) Mouse stem cells seeded into decellularized rat kidney scaffolds endothelialize and remodel basement membranes. *Organogenesis* 8:49–55.

Ross E.A., Williams M.J., Hamazaki T., Terada N., Clapp W.L., Adin C., Ellison G.W., Jorgensen M., Batich C.D. (2009) Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds. *J Am Soc Nephrol* 20: 2338–47.

Ross J.J., Lyman D.J. (1977) Development of Small Diameter Vascular Prostheses. *ASAIO Journal*, 1977. 23(1): p. 253-260

Roy S., Silacci P., Stergiopoulos N. (2005) Biomechanical properties of decellularized porcine common carotid arteries. *Am J Physiol Heart Circulatory Physiol*. 289(4):H1567-H76

Ruth R.C., Mooney D.J. (2003). Polymeric growth factor delivery strategies for Tissue Engineering. *Pharm Res*. 20:1103-1112.

Salacinski H.J., Goldener S., Giudiceandrea A., Hamilton G., Seifalian A.M., Edwards A. (2001) The mechanical behavior of vascular grafts: a review. *J Biomater App.* 15: 241-78.

Sarraf C.E., Eastwood M. (2005). Stem cells, tissue engineering and the mechanical environment. In: Ashammakhi NA, Reis RL, eds. *Topics in Tissue Engineering* vol. 2. Expertissues E-books. Chapter 10, pp. 401–452.

Scanu, M., Mancuso L., Cao G. (2011). Evaluation of the use of human Mesenchymal Stem Cells for acute toxicity tests. *Toxicology in Vitro* 25, 1989–1995.

Schaner P.J., Martin N.D., Tulenko T.N., Shapiro I.M., Tarola N.A., Leichter R.F., Carabasi R.A., Dimuzio P.J. (2004). Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. *Journal of Vascular Surgery* 40, 146–153

Schechner J.S., Crane S.K., Wang F., Szeglin A.M., Tellides G. (2003). Engraftment of a vascularized human skin equivalent. *FASEB J.* 17:2250–56.

Scherer W. F., Syverton J. T., Gey G. O. (1953). Studies On The Propagation In Vitro Of Poliomyelitis Viruses: Iv. Viral Multiplication In A Stable Strain Of Human Malignant Epithelial Cells (Strain Hela) Derived From An Epidermoid Carcinoma Of The Cervix. *J Exp Med.* May 1; 97(5): 695–710.

Schoen F.J. and Cotran R.S. (2000). Vasi sanguigni. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T (eds) *Robbins: le basi patologiche delle malattie*. Iccin, Padova, pp 577-633

Schugens Ch., Maquet V., Grandfils Ch., Jerome R., Teyssie Ph. (1995). Polylactide macroporous biodegradable implants for cell transplantation. II. Preparation of polylactide foams by liquid-liquid phase separation, *Journal of Biomedical Materials Research*; 30: 449 – 461.

Seliktar D, Black RA, Vito RP, Nerem RM. (2000) Dynamic mechanical conditioning of collagen-gel blood vessel constructs induces remodeling in vitro. *Ann Biomed Eng.* 28(4):351-62

Semisich A., Ohle J., Witt B .and Hartwig A. (2014). Cytotoxicity and genotoxicity of nano - and microparticulate copper oxide: role of solubility and intracellular bioavailability. *Particle and Fibre Toxicology*: 11:10

Shaw J.E., Sicree R.A., Zimmet P.Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 87:4–14

Shen Q., Goderie S.K, Jin L., Karanth N., Sun Y., et al. (2004). Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304:1338–40.

Sheridan W.S., Duffy G.P., Murphy B.P. (2012). Mechanical characterization of a customized decellularized scaffold for vascular tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 8, 58–70

Shin'oka T., Imai Y., Ikada Y. (2001) Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N Engl J Med.* 344:532–533

Shinoka T., Breuer C. (2008) Tissue-engineered blood vessels in pediatric cardiac surgery. *Yale J Biol Med.* 81:161–166

Shum-Tim D., Stock U., Hrkach J., Shinoka T., Lien J., Moses M.A., Stamp A., Taylor G., Moran A.M., Landis W., Langer R., Vacanti J.P., Mayer J.E., Jr. (1999) Tissue engineering of autologous aorta using a new biodegradable polymer. *Ann Thorac Surg.* 68: 2298–304

Silver F.H., Horvath I., Foran D.J. (2001) Viscoelasticity of the vessel wall: the role of collagen and elastic fibers. *Crit Rev Biomed Eng* 29(3):279–301

Silver F.H., Snowhill P.B., Foran D.J. (2003) Mechanical behavior of vessel wall: a comparative study of aorta, vena cava, and carotid artery. *Ann Biomed Eng* 31(7):793–803

Simon A., Duc Nghiem L., Le-Clech P., Khan S.J., and Drewes J.E. (2009). "Effects of membrane degradation on the removal of pharmaceutically active compounds (PhACs) by NF/RO filtration processes." *Journal of Membrane Science* 340(1-2):16-25.

Song J.J., Guyette J.P., Gilpin S.E., Gonzalez G., Vacanti J.P., Ott H.C. (2013) Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. *Nat Med* 19:646–51

Song J.J., Kim S.S., Liu Z., Madsen J.C., Mathisen D.J., Vacanti J.P., Ott HC. (2011) Enhanced in vivo function of bioartificial lungs in rats. *Ann Thorac Surg.* 92:998–1006

Soto-Gutierrez A., Zhang L., Medberry C., Fukumitsu K., Faulk D., Jiang H., Reing J., Gramignoli R., Komori J., Ross M., Nagaya M., Lagasse E., Stolz D., Strom S.C., Fox I.J., Badylak S.F. (2011) A whole-organ regenerative medicine approach for liver replacement. *Tissue Eng Part C Methods* 17:677–86

Sottiurai V.S., Yao J.S., Flinn W.R., Batson R.C. (1983) Intimal hyperplasia and neointima: An ultrastructural analysis of thrombosed grafts in humans. *Surgery* 93: 809-17.

Spielmann H., Genschow E., Liebsch M. and Halle W. (1999). "Determination of the Starting Dose for Acute Oral Toxicity (LD50) Testing in the up and Down Procedure (UDP) from Cytotoxicity Data." *ATLA* 27:957-966.

Stock U.A., Vacanti J.P. (2001). Tissue engineering: current state and prospects. *Ann. Rev. Med;* 52:443–51.

Sullivan D.C., Mirmalek-Sani S.H., Deegan D.B., Baptista P.M., Aboushwareb T., Atala A., Yoo J.J. (2012) Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system. *Biomaterials* 33:7756–64

Sussman N.L, Kelly J.H. (1993). Artificial liver: a forthcoming attraction. *Hepatology* 17:1163–64.

Swartz D.D., Russell J.A., Andreadis S.T. (2005) Engineering of fibrin-based functional and implantable small-diameter blood vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(3):H1451–H1460

Takahashi K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861–872

Takahashi K., Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 25;126(4):663-76

Tanzi M. C., Farè S., Petrini P., Tanini A., Piscitelli E., Zecchi-Orlandini S., Brand, M.L. (2003) Cytocompatibility of polyurethane foams as biointegrable matrices for the preparation of scaffolds for bone reconstruction. *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics* 1: 58 – 66

Tanzi M. C., *Fondamenti di Bioingegneria Chimica: non solo Biomateriali*. Pitagora Editrice Bologna, 2006; 94 – 98

Timpl R., Brown J.C. (1994) The laminins. *Matrix Biol.* 14(4):275-81.

Tiwari A., Salacinski H., Seifalian A.M., Hamilton G. (2002) New prostheses for use in bypass grafts with special emphasis on polyurethanes. *Cardiovasc Surg.* 10(3):191-7

Toma J.G, Akhavan M., Fernandes K.J.L., Barnabé-Heider F., Sadikot A., Kaplan D.R., Miller F.D. (2001) Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat. Cell Biol.* 3, 778–784

Totonelli G., Maghsoudlou P., Garriboli M., Riegler J., Orlando G., Burns A.J., Sebire N.J., Smith V.V., Fishman J.M., Ghionzoli M., Turmaine M., Birchall M.A., Atala A., Soker S., Lythgoe M.F., Seifalian A., Pierro A., Eaton S., De Coppi P. (2012) A rat

decellularized small bowel scaffold that preserves villus-crypt architecture for intestinal regeneration. *Biomaterials* 33:3401–10

Tranquillo R.T., Girton T.S., Bromberek B.A., Tribes T.G. and Mooradian D.L. (1996). Magnetically orientated tissue-equivalent tubes: application to a circumferentially orientated media-equivalent. *Biomaterials* 17(3): 349-357

Tranquillo RT. (2003) ECM gene expression correlates with in vitro tissue growth and development in fibrin gel remodeled by neonatal smooth muscle cells. *Matrix Biol.* 22(6):477-90

Uygun B.E., Soto-Gutierrez A., Yagi H., Izamis M.L., Guzzardi M.A., et al. (2010). Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat. Med.* 16:814–20.

Uygun B.E., Yarmush M.L., Uygun K. (2012) Application of whole-organ tissue engineering in hepatology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9:738–44

Vaithilingam V. and Tuch BE. (2011) Islet transplantation and encapsulation: an update on recent developments. *Rev Diabet Stud.* 8(1):51-67.

van der Lei B. Nieuwenhuis P., Molenaar I., Wildevuur CR. (1987) Long term biologic fate of neoarteries regenerated in microporous, compliant, biodegradable, small-caliber vascular grafts in rats. *Surgery* 1987; 101: 459-67

Vunjak-Novakovic G., Tandon N., Godier A., Maidhof R., Marsano A. (2010). Challenges in cardiac tissue engineering. *Tissue Eng. Part B Rev.* 16:169–87

Wainwright J.M., Czajka C.A., Patel U.B., Freytes D.O., Tobita K., Gilbert T.W., Badylak S. (2010). Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart. *Tissue Eng Part C Methods.* 16(3):525-32.

Wang Y., Cui C.B., Yamauchi M., Miguez P., Roach M., Malavarca R., Costello M.J., Cardinale V., Wauthier E., Barbier C., Gerber D.A., Alvaro D., Reid L.M. (2011).

Lineage restriction of human hepatic stem cells to mature fates is made efficient by tissue-specific biomatrix scaffolds. *Hepatology* 53:293–305.

Wang Y., Zi X-Y., Su J., Zhang H-X., Zhang X-R., Li J-X., Yin M., Yang F., Hu Y-P.(2012). Cuprous oxide nanoparticles selectively induce apoptosis of tumor cells. *International Journal of Nanomedicine*. 7, 2641-2652.

Wang Z., Li N., Zhao J., White J.C., Q, P., Xing B. (2012). CuO nanoparticle interaction with human epithelial cells: cellular uptake, location, export, and genotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 1512-1521.

Weinberg C.B, Bell E. (1986) A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science* 231(4736):397–400

Wertheim J.A., Baptista P.M., Soto-Gutierrez A. (2012). Cellular therapy and bioartificial approaches to liver replacement. *Curr Opin Organ Transplant* 17:235–40.

Williams C., Liao J., Joyce E.M., Wang B., Leach J.B., Sacks M.S., Wong J.Y. (2009). Altered structural and mechanical properties in decellularized rabbit carotid arteries. *Acta Biomaterialia* 5, 993–1005.

Wilshaw S.P., Rooney P., Berry H., Kearney J.N., Homer-Vanniasinkam S., Fisher J. (2012) Development and Characterization of Acellular Allogeneic Arterial Matrices. *Tissue Eng Part A*. 18(5-6):471-483.

Wu Y., Zhao Q., Anderson J.M., Hiltner A., Lodoen G.A., Payet C.R. (1991). Effect of some additives on the biostability of poly(etherurethane) elastomer. *J Biomed Mater Res* 25: 725-39.

Xue L., Greisler H.P. (2003). *Biomaterials in the development and future of vascular grafts*. *J Vasc Surg*, Vol. 37, p. 472-480.

Yang L., Li S., Hatch H., Ahrens K., Cornelius J.G., Petersen B.E., Peck A.B. (2002) *In vitro* trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 8078–8083.

Yang S., Leong K., Du Z., Chua C. (2001) The design of scaffolds for use in tissue engineering. *Tissue Eng.* Dec;7(6):679-89.

Ye Q., Zund G., Jockenhoevel S., Schoeberlein A., Hoerstrup S.P., Grunenfelder J., Benedikt P., Turina M. (2000). Scaffold precoating with human autologous extracellular matrix for improved cell attachment in cardiovascular tissue engineering. *ASAIO J.* 46: 730–3.

York M., Griffiths H.A., Whittle E., Basketter D.A. (1996). Evaluation of a human patch test for the identification and classification of skin irritation potential. *Contact Dermatitis* 34: 204–212.

York M., Steiling W. (1998). A critical review of the assessment of eye irritation potential using the Draize rabbit eye test. *J Appl Toxicol* 18: 233–240

Young B., Heath J.W. (2000). *Istologia e anatomia microscopica*. Testo atlante. Terza edizione. Casa editrice Ambrosiana.

Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318:1917–1920

Zhao Y., Glesne D., Huberman E. (2003) A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 2426–2431.

Zhao Y., Zhang S., Zhou J., Wang J., Zhen M., Liu Y., Chen J., Qi Z. (2010). The development of a tissue-engineered artery using decellularized scaffold and autologous ovine mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 31, 296–307.

Zucco F., Bianchi V. (1994). “Nozioni di colture cellulari” Lombardo Editore.

Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraser J.K., Benhaim P., Hedrick M.H. (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* **13**, 4279–4295

Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* **7**, 211–228