

Università degli Studi di Padova  
Scuola di Ingegneria

Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione  
Dipartimento di Ingegneria Industriale  
Corso di Laurea in Ingegneria Biomedica

LA RIGENERAZIONE DI ORGANI  
IN ALTERNATIVA AL TRAPIANTO

**Relatore:**

Ch.mo prof. Andrea BAGNO

**Laureanda:**

Nina Veronique NYONGHA TSABLONG

22 Novembre 2013

**Anno accademico 2013/2014**

## **ABSTRACT**

In ambito medico si sta facendo fronte ad un problema molto importante: quello della sostituzione degli organi che hanno, per diverse ragioni, perso la loro funzionalità. Si tratta di un problema causato dall'invecchiamento della popolazione e dall'insufficiente numero di donatori idonei; altre cause, che conoscono poche vie terapeutiche, sono i traumi, le lesioni e l'assenza congenita di tessuti complessi come la trachea, l'esofago, e il muscolo scheletrico.

Un nuovo approccio consiste nell'uso di scaffold biologici tridimensionali fatti di matrice extracellulare allogenica o xenogenica derivata da fonti non autologhe. Questi scaffold, dopo un'accurata ricellularizzazione con cellule staminali o cellule differenziate autologhe, fungono da modelli induttivi per la ricostruzione di tessuti o organi. Il metodo è stato utilizzato con successo per la riparazione e la ricostruzione di diversi tessuti complessi come la trachea, l'esofago, e il muscolo scheletrico in modelli animali e anche in esseri umani, sotto adeguati controlli etico-scientifici. L'approccio proposto potrebbe servire da piattaforma per ingegnerizzare altri tessuti e addirittura interi organi.

# INDICE

- 1. Introduzione**
- 2. La matrice extracellulare**
  - 2.1 Ruolo
    - 2.1.1** Nello sviluppo fisiologico, la riparazione, e la rigenerazione di organi
    - 2.1.2** Come materiale di supporto
    - 2.1.3** Qualche esempio
  - 2.2 Sfide nell'isolamento e la sterilizzazione degli scaffold di matrice extracellulare
  - 2.3 Origine delle cellule
- 3. I processi di decellularizzazione e ricellularizzazione**
  - 3.1** La decellularizzazione dell'organo
  - 3.2** La ricellularizzazione dello scaffold
  - 3.3** Nota sui bioreattori
  - 3.4** Risultati e commenti
- 4. Milestones, situazione attuale e sfide per il futuro**
  - 4.1** Il fegato
  - 4.2** Il rene
  - 4.3** La pelle
  - 4.4** Il muscolo scheletrico
  - 4.5** Il cuore
- 5. Conclusioni**
- 6. Bibliografia**

# 1. Introduzione

Ogni anno negli Stati Uniti, 120.000 persone muoiono a causa di malattie polmonari croniche [1], 112.000 per insufficienza renale [2], 27.000 per malattie del fegato [3], e 425.000 per malattie del cuore [4]. Attualmente, il trattamento consiste nel trapianto allogenico. Purtroppo però la domanda risulta incessante e l'immunosoppressione è costosa e potenzialmente pericolosa per il paziente, senza considerare che gli organi da trapiantare devono essere fisiologicamente vitali. Tutti questi aspetti fanno sì che l'offerta non riesca a soddisfare la richiesta e molti pazienti in attesa di trapianto muoiono prima che venga trovato un organo compatibile disponibile. I pazienti che hanno la fortuna di ricevere un organo devono poi ricevere per tutta la vita una terapia immunosoppressiva che purtroppo presenta alti rischi e non elimina talvolta del tutto il rischio di rigetto [5].

I progressi recenti nei campi dell'ingegneria tissutale e della medicina rigenerativa hanno fornito una solida base per la sostituzione funzionale di tessuti complessi e di organi interi. L'approccio prevede l'utilizzo di matrice extracellulare ottenuta dalla decellularizzazione di organi interi. La comodità sta nella disponibilità di scaffold di natura allogenica o anche xenogenica che andrebbero ricellularizzati con cellule autologhe; questa sarebbe una possibile soluzione al problema dei pochi donatori idonei per il trapianto allogenico. La Figura 1 riassume brevemente il ciclo di tessuti e organi bioingegnerizzati dal donatore al ricevente.

In questa tesina si parlerà del processo di rigenerazione di organi interi, ponendo particolare attenzione al ruolo della matrice extracellulare. Inoltre se ne descriverà il processo, descrivendone le diverse fasi. In ultima analisi verrà fatto un punto sui passi raggiunti finora, presentando la situazione attuale e le prospettive future.

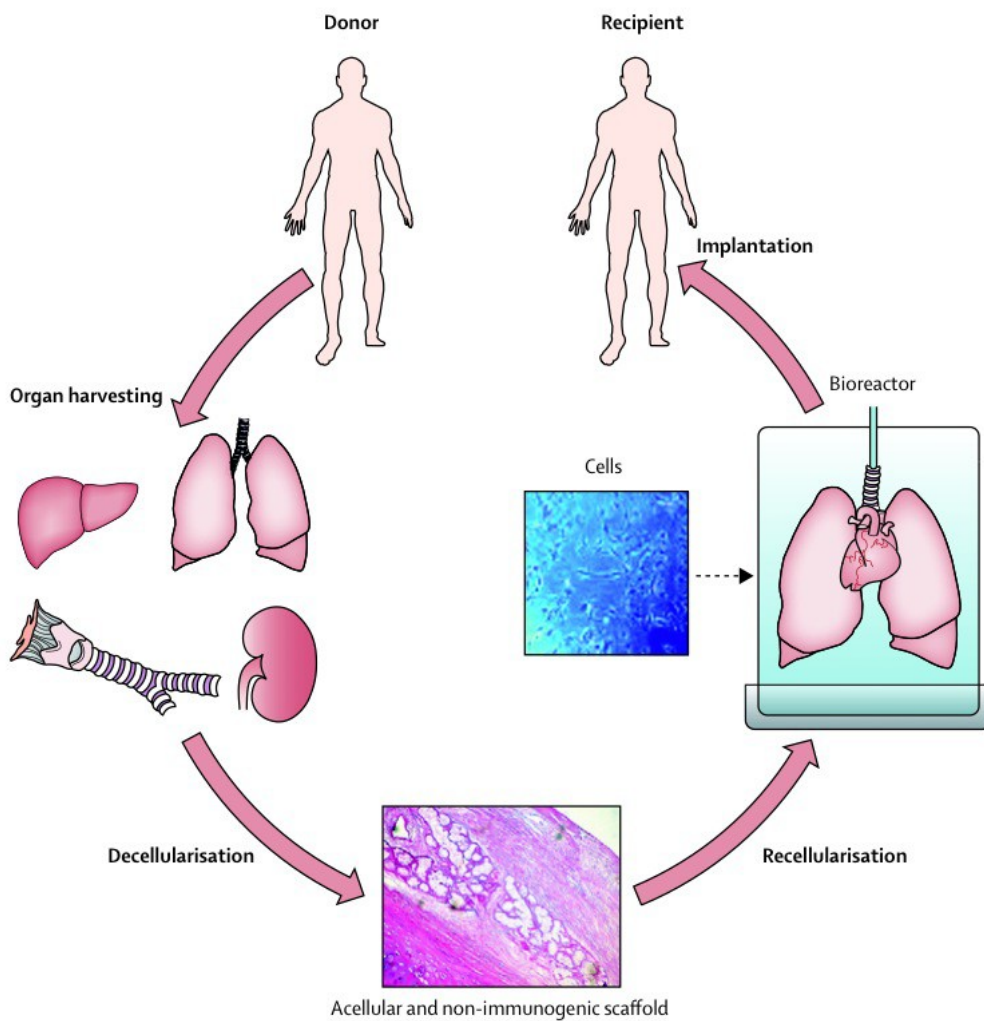


Figura 1: Bioingegnerizzazione di tessuti ed organi. Il primo passo è la raccolta di organi che vanno poi decellularizzati per ottenere dei bioscaffold. Questi ultimi sono a loro volta ripopolati in ambienti adeguati (bioreattori) per essere infine impiantati nel ricevente.

## **2. La matrice extracellulare**

### **2.1. Ruolo**

#### **2.1.1. Nello sviluppo fisiologico, la riparazione, e la rigenerazione di organi**

La matrice extracellulare (extra-cellular matrix, ECM) è l'insieme delle macromolecole (collagene, elastina, proteoglicani, e glicoproteine strutturali) alle quali si legano le cellule per organizzarsi in tessuti [6].

Tutte le cellule animali hanno a che fare con la matrice extracellulare, le cui caratteristiche di composizione e microarchitettura variano in dipendenza dai diversi tessuti e organi. Essa ha una funzione importante in tutti i tessuti, in quanto rappresenta una guida allo sviluppo ed alla rigenerazione fisiologica degli organi. Inoltre, si è scoperto che la struttura e le proteine della matrice extracellulare svolgono un ruolo fondamentale nel determinare la differenziazione, la proliferazione, la sopravvivenza, la polarità e la migrazione delle cellule. Il processo di costante interscambio tra le cellule e la matrice extracellulare descritto come reciprocità dinamica, determina il destino di ogni cellula.

Ogni componente della matrice ha un ruolo specifico. La laminina per esempio (la prima proteina della matrice extracellulare prodotta allo stadio embrionale di otto cellule) partecipa all'adesione cellulare e alla migrazione durante la gastrulazione. La fibronectina, il collagene IV ed i glicosamminoglicani contribuiscono più avanti nello sviluppo. In fasi successive, altre strutture come ad esempio le membrane basali sono necessarie per la formazione di tessuti specializzati come l'epitelio. Siti specifici di legame all'interno della matrice guidano ulteriormente lo sviluppo e la maturazione degli organi. La fibronectina è essenziale per la formazione del cuore, del polmone e del rene. Al di là degli aspetti molecolari, lo stress e la tensione indotti dalla matrice extracellulare regolano la proliferazione cellulare ed il fenotipo non solo nello sviluppo, ma anche in seguito, durante i processi di riparazione e rigenerazione tissutale. Nella guarigione delle ferite, un'assenza di matrice porta alla perdita di supporto meccanico a livello cellulare. Nell'insufficienza renale acuta, per esempio, le cellule tubulari necrotiche si staccano dalla membrana basale, mentre le cellule epiteliali tubulari sopravvissute si differenziano e proliferano, ripristinando l'integrità tubolare. Questo fenomeno non si verifica in aree prive di membrane basali intatte. Al contrario, i processi riparativi iperattivi sono caratterizzati da una sovrapproduzione di proteine di

matrice extracellulare, che in molti casi conduce ad una distorsione nell'architettura del tessuto, un ostacolo alla riparazione e quindi un grosso problema nella funzionalità dell'organo.

### **2.1.2. La matrice extracellulare come materiale di supporto**

Il ruolo poliedrico della matrice extracellulare nativa nella riparazione e rigenerazione la rende un materiale di innesto interessante. Diversi prodotti sono stati testati fino ad oggi con promettenti risultati in diverse applicazioni cliniche.

Il successo clinico è fortemente correlato alla scelta del materiale: dev'essere capace di trasmettere segnali biochimici e biofisici. Si possono usare scaffold sintetici: la loro composizione, le proprietà fisiche, e il processo di degradazione risultano altamente controllabili. Questi materiali però hanno uno svantaggio: sono poco specifici rispetto alla struttura degli organi ed al tipo di cellule interessate.

In alternativa si può usare la matrice extracellulare pura, o almeno sue proteine, oppure una combinazione di proteine della matrice extracellulare con polimeri sintetici.

Gli scaffold di matrice extracellulare sono ottenuti dopo decellularizzazione. Questa tecnica consiste nel togliere cellule dai tessuti cadaverici tramite processi fisici, enzimatici e chimici, senza causare alterazioni biologiche, meccaniche o di composizione della matrice extracellulare. Il grosso vantaggio sta nell'ottenimento di scaffold con proteine specifiche che hanno già le "impronte" lasciate dalle "storia" del tessuto. Infatti le proteine della matrice extracellulare sono tra le più conservative, e quindi la rimozione del contenuto cellulare tramite decellularizzazione dovrebbe, almeno teoricamente, fornire scaffold non immunogenici con una struttura di base intatta, permettendo così la rigenerazione di nuovo tessuto.

### **2.1.4 Qualche esempio**

Esiste un'ampia varietà di prodotti derivati dalla matrice extracellulare che sono stati approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) ed attualmente utilizzati in ambito clinico.

Alloderm1 è un esempio di matrice dermica acellulare derivata dalla pelle umana che si è dimostrata utile in molte applicazioni come ad esempio la cura di bruciate, la riparazione di ernie addominali e la chirurgia estetica. E' risultata completamente

biocompatibile e può essere impiantata in modo sicuro; induce la formazione di tessuto connettivo derivato dall'ospite e fornisce supporto meccanico e aumento di tessuto.

CryoValve1 SG Pulmonary Valve, è una valvola umana decellularizzata che viene impiantata nel ventricolo destro durante interventi di chirurgia cardiaca. Come nel caso delle matrici dermiche, le valvole acellulari sono anch'esse ripopolate dalle cellule dell'ospite e sono teoricamente simili alle valvole naturali: caratteristica fondamentale per garantirne crescita e longevità.

Un altro esempio è l'utilizzo, approvato dalla FDA e ormai frequentissimo, di innesti allogenici ossei decellularizzati in chirurgia ortopedica.

Tutto ciò dimostra che i protocolli di decellularizzazione possono essere applicati all'uso clinico e diventare disponibili per un gran numero di pazienti.

## **2.2. Sfide nell'isolamento e sterilizzazione degli scaffold di matrice extracellulare**

La scelta del protocollo di decellularizzazione dipende dall'uso che si intende fare della matrice extracellulare. Il collagene, per esempio, è resistente ai detergenti ionici, ma non alla digestione enzimatica [7], quindi la decellularizzazione con detergente ionico è la scelta ideale se si intende generare scaffold con collagene intatto.

E' fondamentale anche generare uno scaffold privo di agenti patogeni. Il processo di decellularizzazione ideale rimuoverebbe i componenti cellulari, ma potrebbe non fornire un prodotto sufficientemente sterile. La maggior parte delle tecniche di sterilizzazione usate oggi comportano il rischio di danneggiare la matrice e di lasciare residui tossici. Il vapore pressurizzato, il calore secco ed i prodotti chimici, che sono stati testati clinicamente non possono essere usati perché denaturano le proteine della matrice extracellulare. Da questo punto di vista l'esposizione a ossido di etilene combinata con la liofilizzazione potrebbe andare bene perché non denatura la matrice extracellulare, né distrugge le proteine, ma diminuisce la stabilità delle fibre di collagene [8]. Altre tecniche quali l'irradiazione gamma o con fascio di elettroni sono ampiamente utilizzate nella produzione di dispositivi medici, ma è stato dimostrato che compromettono la stabilità meccanica degli scaffold [9]. La perfusione con acido peracetico (PAA) sembrerebbe un'alternativa interessante: è un agente battericida al 0,001%, fungicida al 0,003% e sporicida al 0,3% [10]; inoltre conserva le proteine della matrice

extracellulare, i glicosaminoglicani, la laminina e la fibronectina [11]. Il PAA non altera le caratteristiche meccaniche del tessuto sterilizzato [12] e vengono conservati i fattori di crescita [13, 14].

Ad oggi, non è stato riportato nessun confronto diretto tra i diversi metodi di sterilizzazione di scaffold decellularizzati. Tuttavia, si può affermare che ogni metodo modifica in tutto o in parte le proprietà della matrice extracellulare e pertanto deve essere scelto in base all'applicazione prevista. La produzione di scaffold clinicamente sicuri e ben standardizzati è la base per l'ingegnerizzazione degli organi, ma è solo il primo passo verso la creazione di tessuti e organi vitali .

### **2.3. Origine delle cellule**

Le cellule e la matrice extracellulare hanno un rapporto stretto e interdipendente. Pertanto, il tipo e la fonte delle cellule utilizzate per ripopolare uno scaffold tridimensionale sono importantissimi per l'eventuale funzionalità ed il successo clinico dell'organo ingegnerizzato.

L'ingegnerizzazione di tessuti e organi complessi richiede la ricostruzione del parenchima, della struttura vascolare e delle strutture di supporto. Questi requisiti sono molto diversi tra di loro perché i fattori elencati differiscono in base al numero e al tipo di cellule e in funzione dell'organo di interesse. Una cellula "ideale" dovrebbe avere la capacità di proliferare o di auto-rinnovarsi. Salvo casi particolari in cui tipi cellulari differenziati specifici agli organi possono essere isolati, cresciuti in vitro e usati, il candidato ideale è una cellula staminale. La scelta è va dunque fatta tra cellule autologhe e cellule allogeniche, e tra cellule staminali embrionali (ES) o adulte.

Le cellule autologhe sono auto-derivate e limitano quindi il rischio di esposizione ad agenti trasmissibili. Esse hanno poche probabilità di essere rigettate o di provocare una risposta immunitaria avversa e quindi abbassano o eliminano la necessità di trattamenti immunosoppressivi. Questi vantaggi eliminano i rischi di infezione, di cancro e gli effetti tossici dell'immunosoppressione.

Un esempio di terapia con cellule autologhe è l'apporto di cellule ricavate dal midollo osseo per il trattamento di malattie come l'infarto del miocardio e come l'artrosi.

Purtroppo però, nella maggior parte degli organi (ad esempio pancreas, polmone, cuore), le cellule autologhe non possono essere facilmente raccolte, oppure il loro numero è insufficiente per essere utilizzate in un tessuto nascente.

La semina delle cellule dipende dal tipo di cellule scelto e dall'obiettivo finale. Chiaramente, si raggiunge più facilmente la vascolarizzazione tramite perfusione, mentre invece per rigenerare il parenchima è preferibile l'iniezione.

Le cellule allogeniche non sono auto-derivate. Possono essere raccolte in grandi quantità e da individui giovani e sani. Nella maggior parte delle applicazioni di medicina rigenerativa, la scelta tra fonti autologhe e allogeniche si basa su criteri quali: il numero di cellule necessarie ed i tempi in cui servono, la facilità di raccogliere le cellule, e la capacità di differenziare nei tipi cellulari necessari in vitro. Ad esempio, nel caso di una lesione acuta dove il tempo è fondamentale, un prodotto autologo che richiede settimane di preparazione risulta poco utile. Invece in situazioni non urgenti come la sostituzione di un'articolazione dove il materiale tessutale ingegnerizzato può essere coltivato in vitro durante settimane o mesi, le cellule autologhe diventano un'opzione valida. Le figure 2 e 3 mostrano esempi di come si possa procedere alla scelta del tipo di cellule da utilizzare.

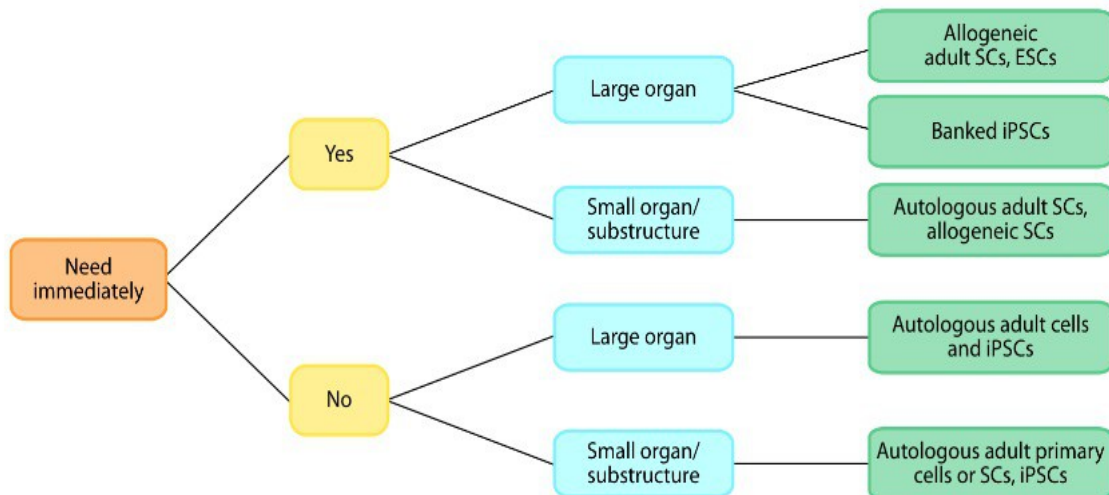


Figura 2: Esempio di algoritmo di decisione per la selezione del tipo di parenchimali o di cellule staminali da utilizzare per la ricellularization di una matrice tridimensionale. Abbreviazioni: ESC, cellule staminali embrionali; iPSC: cellule staminali pluripotenti inducibili, SC: cellule staminali.

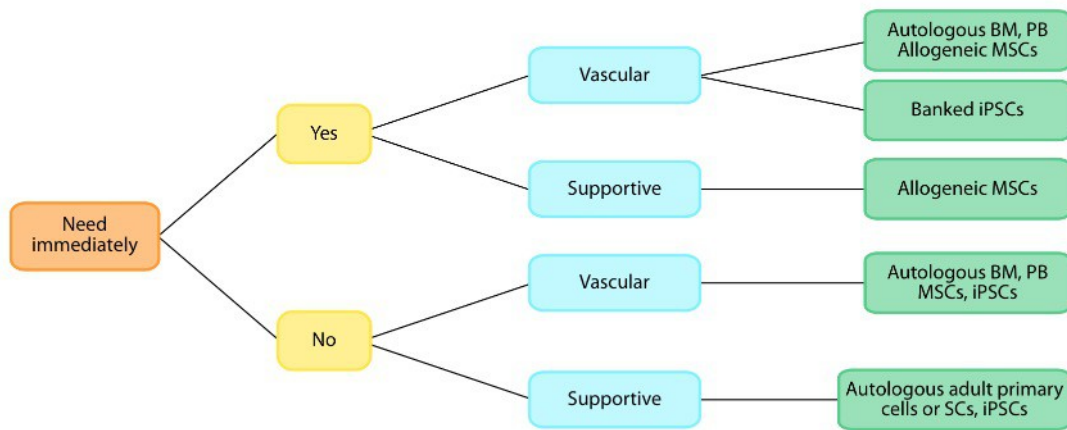


Figura 3: Esempio di algoritmo di decisione per la selezione del tipo cellulare non parenchimale da utilizzare nella ripopolazione di uno scaffold tridimensionale. Abbreviazioni: BM: midollo osseo, iPSC: cellule staminali pluripotenti inducibili, MSC: cellule stromali di midollo, PB: sangue periferico.

### **3. I processi di decellularizzazione e ricellularizzazione**

Una nota equipe di esperti formata da Pedro M. Baptista, Giuseppe Orlando, Sayed-Hadi, Mirmalek-Sani, Mohummad Siddiqui, Anthony Atala e Shay Soker ha condotto una serie di esperimenti con risultati interessanti [15]. L'approccio prevede l'utilizzo di matrice extracellulare, ottenuta tramite decellularizzazione di organi o tessuti allogeneici o xenogeneici. La chiave sta nell'immediata disponibilità di uno scaffold xenogenico che potrebbe successivamente essere ricellularizzato con le cellule autologhe. Inoltre, questo approccio potrebbe ovviare alla necessità di un trattamento immunosoppressivo. La matrice funge da modello tridimensionale induttivo attorno al quale il paziente ricostruisce tessuto funzionale. La corretta distribuzione spaziale delle cellule su uno scaffold e la loro maturazione funzionale e fenotipica possono avvenire in un bioreattore ex-vivo, in situ, o in una combinazione di questi due ambienti.

#### **3.1 La decellularizzazione dell'organo**

Per decellularizzare tessuti di abbastanza grande volume senza distruggerli tagliandoli a fette sottili, si sfruttano le loro reti vascolari originali. Attraverso queste si introduce una soluzione decellularizzante (fatta di 1% di detergente Triton X -100 e 0,1% di idrossido di ammonio in acqua deionizzata) negli organi sfruttandone il sistema vascolare naturale. L'introduzione di soluzione decellularizzante è preceduta e seguita da perfusione di acqua deionizzata, processo che richiede circa 2 giorni. Usando questo metodo, si è potuto decellularizzare con successo fegati, reni, pancreas e intestini di varie dimensioni e specie animali. Di preciso sono stati decellularizzati un fegato di furetto da otto centimetri (Figura 4 A e B), un rene di maiale da dodici centimetri (Figura 4 RE e F), un pancreas di maiale da 23 centimetri di (Figura 4I e J) ed un intestino tenue di maiale da 25 centimetri (Figura 4 M e N). Questo metodo produce tessuti completamente decellularizzati con una rete vascolare conservata: il bioscaffold acellulare vascolarizzato (acellular vascularized bioscaffold, AVB).

Nel caso particolare del fegato, l'albero vascolare potrebbe essere osservato direttamente grazie allo spazio parenchimale trasparente (Figura 4B). L'uso di detergente Triton X-100 e idrossido di ammonio consente la rimozione rapida ed efficace di tutte le componenti cellulari del tessuto. Rimangono gli elementi della matrice extracellulare quasi intatti, anche se in confronto con l'uso di altri detergenti come l'SDS (sodio

dodecil (lauril) solfato) c'è un aumento di complessi proteici. La decellularizzazione completa dell'AVB e la conservazione della rete vascolare sono state confermate da diversi metodi. In effetti una tecnica di colorazione delle sezioni dei vari organi decellularizzati (Figura 4C, G, K, O) ha mostrato l'attesa colorazione caratteristica del collagene senza la colorazione basofila caratteristica del materiale cellulare. Ulteriori analisi di questi bioscaffolds decellularizzati utilizzando anticorpi per diversi tipi di collagene, laminina e fibronectina, hanno dimostrato una conservazione non solo della chimica matriciale di ciascun organo, ma anche delle posizioni spaziali delle matrici. Per confermare l'integrità della rete vascolare si è effettuato una verifica: se il fluido iniettato nel sistema vascolare poteva fluire attraverso lo stesso senza però stravasare in tutto l'organo. Uno studio in fluoroscopia con colorante radiopaco ha dimostrato che il colorante iniettato scorreva come di norma in una rete vascolare intatta (Figura 4 D, H, L e P). Purtroppo però circa 5 minuti dopo l'inizio della perfusione, gli organi interi divennero radio-opachi: segno di fuoriuscita del colorante dai canali vascolari nella matrice. Tuttavia, questa serie di esperimenti ha dimostrato che gli AVB preparati da organi diversi possono mantenere pervietà della loro rete vascolare originale. Tale rete intatta può essere utilizzata per fornire cellule al bioscaffold e quindi nutrienti all'organo bioingegnerizzato.

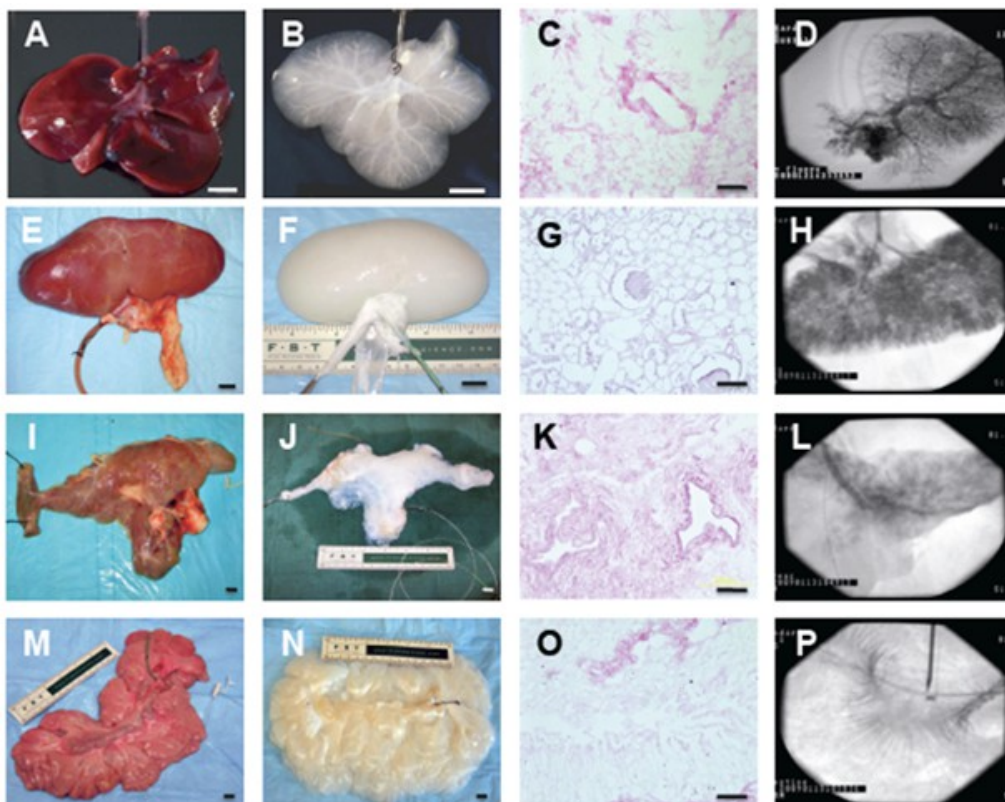


Figura 4. Esempi di decellularizzazione di organi. Gli organi sono stati ottenuti mantenendo le strutture arteriali e venose. I vasi sono stati cannulati ed attaccati ad una pompa peristaltica e poi perfusi tutta una notte con ddH<sub>2</sub>O. Gli organi sono poi stati decellularizzati con una soluzione di 1% di Triton-X / 0.1% di idrossido di ammonio in ddH<sub>2</sub>O a 10–60 ml per ora durante 24 ore oppure fino alla traslucidità, e perfusi con ddH<sub>2</sub>O prima della sterilizzazione (raggi gamma) e di essere analizzati istologicamente. A, B; E, F; I, J; M, N: viste macroscopiche di fegato di furetto, rene, pancreas e intestino di maiale rispettivamente prima e dopo la decellularizzazione. La rimozione delle componenti cellulari si può osservare mediante la trasparenza o il color bianco dei bioscaffold decellularizzati. C, G, K, O: la colorazione delle sezioni istologiche rispettivamente di fegato, rene, pancreas, ed intestino decellularizzati. Non viene osservato nessun materiale nucleare cellulare, ma solo il color rosa caratteristico delle proteine della matrice extracellulare. D, H, L, P: analisi fluoroscopica delle reti vascolari rispettivamente del fegato, del rene, del pancreas, e dell'intestino. Il fattore di contrasto circola attraverso gli scaffold decellularizzati, si muove progressivamente dai vasi grandi, continua nelle arteriole di medio volume, per poi riempire la fine vascolarizzazione di ogni organo. Le barre di scala rappresentano 1cm in A-B, E-F, I-J, M-N e 100 micron in C, G, K e O.

### 3.2 La ricellularizzazione dello scaffold

Oltre a fornire canali vascolari, i bioscaffold possono anche fornire un adeguato ambiente per la crescita cellulare. Il fegato per esempio è composto da due principali tipi di cellule: gli epatociti e le cellule endoteliali. Delle cellule endoteliali di topo marcate col GFP sono state introdotte attraverso la vena porta ed il “fegato-AVB” è stato perfuso con cellule endoteliali per 3 giorni. L'AVB impiantato è stato osservato con il microscopio a fluorescenza, mostrando una linea di cellule endoteliali fluorescenti che rivestono i canali vascolari (Figura 5A). Non sono state osservate cellule endoteliali

marcate al di fuori dei canali. Per verificare se si poteva anche ricellularizzare il tratto vascolare della vena porta, sono state introdotte le stesse cellule endoteliali marcate fluorescenti (color verde) attraverso la vena porta nell'AVB che poi è stato ispezionato con microscopio a fluorescenza. Lo spazio periportale è stato riempito con cellule endoteliali (Figura 5B), e si è osservata la disposizione esagonale caratteristica delle strutture vascolari degli spazi periportali dei lobuli. Una foto di uno dei lobi ha mostrato una distribuzione omogenea delle cellule endoteliali in tutto il “fegato-AVB” (Figura 5C).

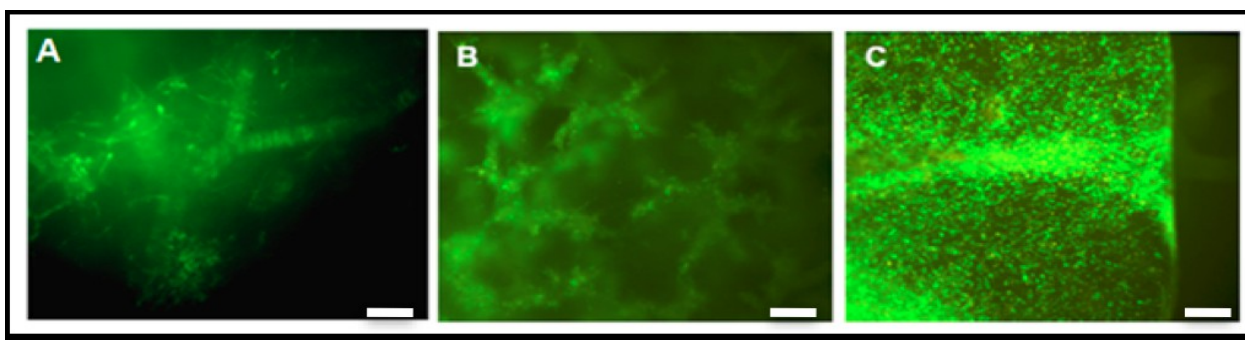


Figura 5: Ri-endotelizzazione degli scaffold di fegato di furetto. (A) Cellule epiteliali marcate con GFP sono state impiantate tramite la vena cava nel bioscaffold di fegato, mostrando cellule endoteliali che ricoprono i canali vascolari dello scaffold. (B) Cellule endoteliali marcate con GFP perfuse via la vena porta si distribuiscono maggiormente nelle aree periportali a forma esagonale. (C) Distribuzione omogenea delle cellule in un lobo. Barre di scala 100um.

Presi insieme, questi risultati suggeriscono che il metodo di perfusione utilizzato per introdurre la soluzione decellularizzante può essere utilizzato anche per fornire cellule per impiantare il lume dei canali vascolari ed il parenchima dei lobuli epatici attraverso la vena porta e la vena cava rispettivamente. Essi forniscono anche una prova che i canali vascolari siano intatti e che quasi nessuna cellula endoteliale può essere osservata fuori dai canali.

Si è inoltre effettuata una serie di esperimenti di co-semina di cellule endoteliali e di carcinoma epatocellulare umano (cellule + HepG2): 30 milioni di HepG2 e 30 milioni di cellule endoteliali MS1 sono state seminate nella vena porta del bioscaffold mediante perfusione con mezzo di coltura. Il mezzo di coltura (DMEM w/ 10 % FBS) è stato poi continuamente perfuso per una settimana a 6 ml/min. Una settimana dopo la semina, si è osservata un'alta densità di cellule in tutto l' AVB con una visibile formazione di tessuto (Figura 6A). L'analisi immunohistochimica ha poi mostrato un'ampia e intensa

espressione albuminica (Figura 6B) ed un gran numero di cellule proliferanti nel nucleo del bioscaffold, come dimostra l'immunocolorazione da Ki67 (Figura 6D). La colorazione del fattore di Von Willebrand ha dimostrato un modello tipico di una sezione trasversale di capillare (Figura 6C). Tutti questi risultati messi insieme dimostrano che la ricellularizzazione dei bioscaffold con perfusione di cellule può essere considerato un approccio efficace per la bioingegnerizzazione di organi interi.

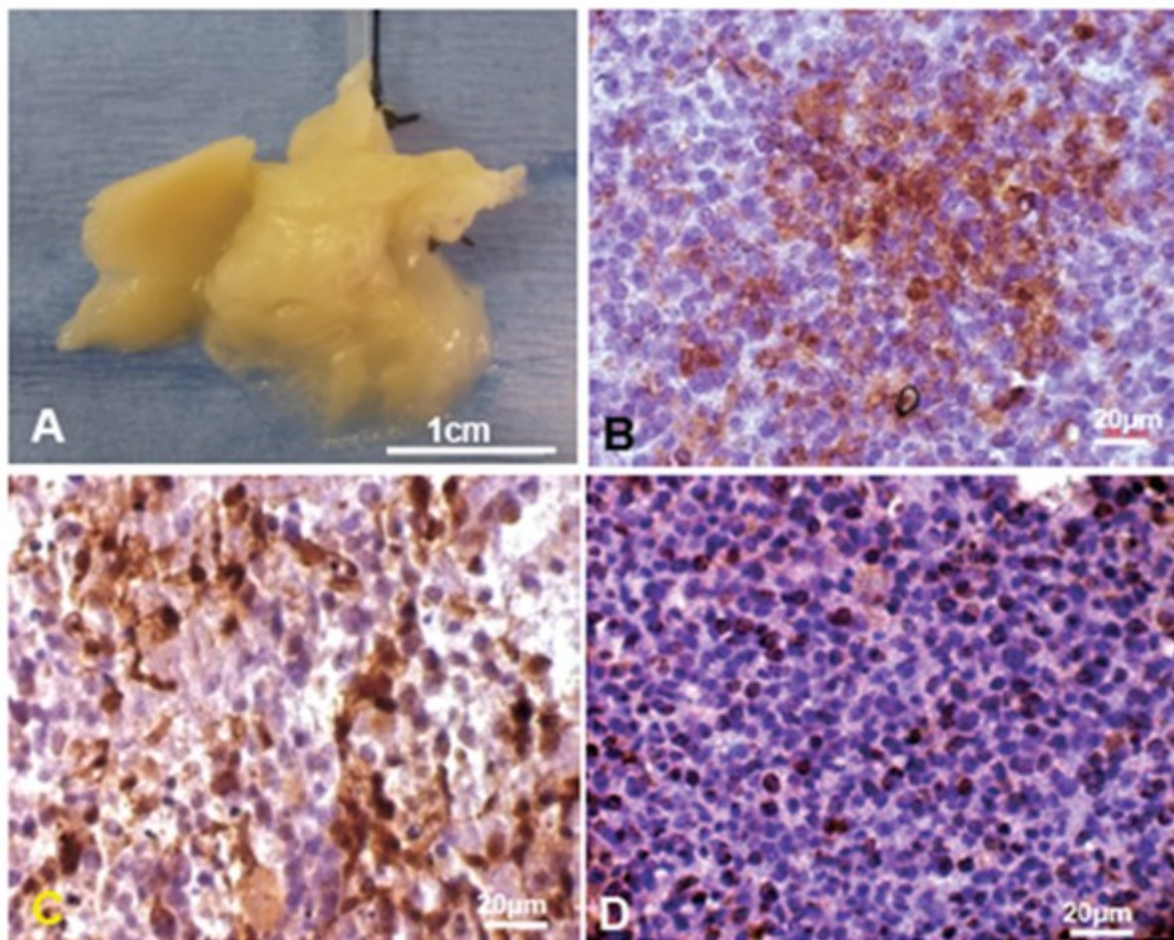


Figura 6. Ricellularizzazione del bioscaffold di fegato di furetto. (A) Vista macroscopica del lobo destro del bioscaffold di fegato di furetto in cui sono state impiantate cellule epatiche umane (HepG2) con cellule endoteliali. (B) Immunocolorazione per l'espressione albuminica delle cellule di HepG2 ancorate nel bioscaffold. (C) Espressione del fattore di Von Willebrand nelle cellule impiantate con un modello simile alle reti capillari. (D) L'immunocolorazione anti-Ki67 mostra un gran numero di cellule che proliferano nel bioscaffold.

### 3.3 Nota sui bioreattori

I bioreattori sono camere meccaniche chiuse e sterili capaci di fornire le condizioni ambientali idonee per l'attività cellulare. Sono quindi necessari per un ripopolamento

fisiologico cellulare ottimale delle matrici di organi decellularizzati. Le macchine forniscono elementi nutritivi tramite la rete vascolare e sono anche in grado di stimolare le cellule della matrice che riproduce così le condizioni necessarie all'organo in crescita. Alcuni esempi di stimoli fisici possono essere un'interfaccia aria-liquido per la rigenerazione della trachea, oppure movimenti respiratori per la rigenerazione del polmone, o ancora stimoli elettrici per la rigenerazione cardiaca.

I bioreattori devono sostenere la cultura sterile di cellule parenchimali o stromali per diverse ore, giorni o addirittura mesi; qualche sistema è già disponibile nel commercio. Se gli organi ricellularizzati sono destinati ad essere ampiamente utilizzati, allora saranno necessari sistemi di bioreattori adeguatamente monitorati, mantenuti, e realizzati con materiali sterilizzabili e/o monouso.

La Figura 7 mostra un cuore di ratto in un bioreattore. Il cuore è stato decellularizzato chimicamente e poi ripopolato con cardiomiociti neonatali [16]. Esso riceve sostanze nutritive e stimoli meccanici ed elettrici che lo "allena" a battere da solo. Osservando attentamente si può vedere che è collegato a due cateteri responsabili dell'afflusso e del deflusso di una soluzione nutritiva. Il cuore è anche collegato a due elettrodi che lo inducono a contrarsi ed espandersi.

La Figura 8 invece rappresenta un modello semplice di bioreattore con i suoi elementi fondamentali.

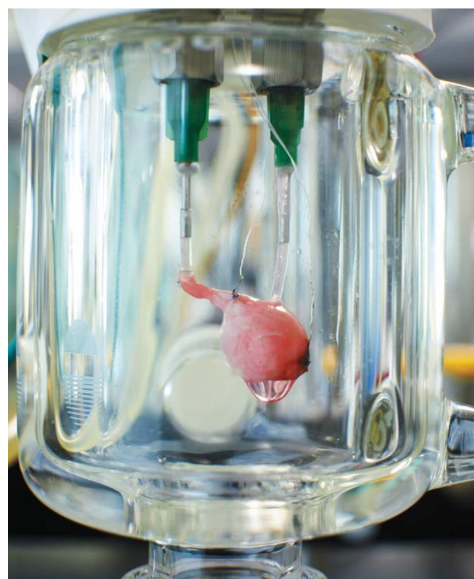


Figura 7. Un cuore di ratto decellularizzato in un bioreattore.

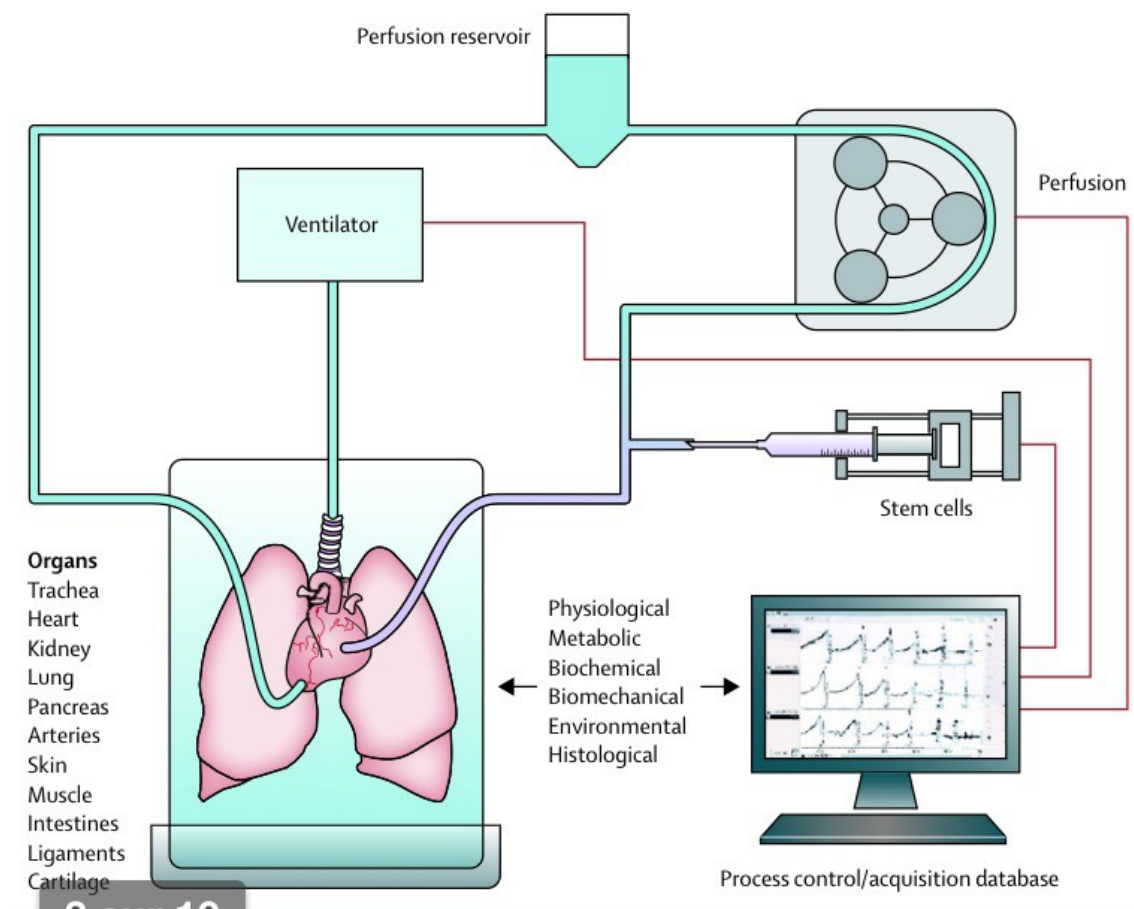


Figura 8. Gli elementi fondamentali di un bioreattore.

### 3.4 Risultati e commenti

Lo studio appena descritto fornisce un metodo efficace per fabbricare bioscaffold di organi con un sistema vascolare completo. I dati forniti dimostrano che la microarchitettura e la rete vascolare dei diversi organi trattati con questo metodo sono state mantenute intatte e che c'è crescita cellulare in vitro. Questo approccio, che produce bioscaffold di organi interi con la loro microarchitettura originale, fornisce materiali con proprietà uniche per la bioingegnerizzazione di organi interi. La struttura vascolarizzata tridimensionale permette la crescita e la vitalità di diversi tipi di cellule, favorendo così un nuovo livello di complessità per l'interazione, l'organizzazione e la perfusione cellulari; si tratta di un importantissimo traguardo nel campo della medicina rigenerativa.

La decellularizzazione tradizionale si faceva agitando il tessuto di interesse in un contenitore: tale approccio è capace di decellularizzare tessuti solo fino ai cinque millimetri di spessore. Tessuti più spessi tendono a decellularizzarsi bene in superficie,

ma rimane materiale cellulare nel loro interno. Il motivo è che la matrice decellularizzata in superficie forma uno strato resistente impedendo l'accesso del detergente al parenchima profondo. Il metodo proposto è meno traumatico per il tessuto rispetto all'approccio tradizionale e si riesce così ad ottenere una matrice acellulare con un albero vascolare capace di fornire cellule e sostanze nutritive nel bioscaffold.

La scelta del detergente per la generazione dell'AVB mediante perfusione può determinare la conservazione di importanti attività biologiche. L'equipe Harald C Ott et al ha recentemente riportato l'uso di questa tecnica per la decellularizzazione di un cuore con risultati simili, confermando il potenziale di questo nuovo metodo per generare scaffold per organi bioartificiali. Sebbene l'uso di forti detergenti ionici come l'SDS faciliti la rimozione totale delle cellule e possa produrre un bioscaffold funzionale, è possibile che possa danneggiare alcuni componenti della matrice extracellulare. Per questo motivo, si è scelto di utilizzare un detergente non ionico meno aggressivo, il Triton X - 100. Si è scoperto che questo detergente poteva decellularizzare con successo il fegato, il rene, i polmoni e l'intestino tenue rimuovendone circa il 98% del DNA cellulare. Infatti, il fatto che le cellule endoteliali e gli epatociti perfusi possano localizzarsi specificamente nei siti appropriati all'interno dei bioscaffold di fegato, lascia pensare che i segnali fisiologici siano stati conservati correttamente.

La matrice extracellulare derivata da organi quali l'intestino tenue, la vescica urinaria, o la pelle viene ampiamente utilizzata per la ricostruzione di molti tessuti. La ricostruzione del tratto urinario basso, gli impianti arteriali, o la ricostituzione della pelle sono alcune delle numerose applicazioni cliniche. Nel caso specifico del fegato, delle sezioni matrice di fegato decellularizzate sono state utilizzate per l'ingegneria tissutale del fegato. Tuttavia, queste matrici extracellulari di tessuto acellulare non possiedono un albero vascolare naturale, che è essenziale nella ingegnerizzazione di organi bioartificiali tridimensionali.

Questi risultati suggeriscono che gli AVB hanno un importante vantaggio rispetto ad altri metodi di preparazione di matrice extracellulare che non conservano una rete vascolare intatta. E' dunque possibile superare le limitazioni relative alla diffusione di ossigeno imposte dallo spessore del tessuto. L'obiettivo principale di questo lavoro mira all'ottenimento di un bioscaffold biocompatibile e vascolarizzato con la stessa complessità dell'organo naturale. Questi bioscaffold possono essere utilizzati per la

ingegnerizzazione di altri organi solidi che richiedono un albero vascolare in grado di supportare un gran numero di cellule, generando buona parte degli organi necessari ai trapianti.

#### **4. Milestones, situazione attuale e sfide per il futuro**

Diversi esempi di organi ingegnerizzati sono emersi negli ultimi anni. Più recentemente, organi complessi come il cuore, il fegato, i polmoni, e il rene sono stati ingegnerizzati a partire da matrici di organi decellularizzate e cellule animali.

Quello che ci si aspetta da un dato organo dipende dalla funzione che questo deve espletare. La Tabella 1 [18] descrive i passi raggiunti fino agli anni 2000 nella rigenerazione di diversi tessuti. Dal 1959, in cui sono stati ottenuti i primi aggregati di cardiomiociti in vitro, le cose sono andate avanti molto significativamente. La Tabella 2 invece riassume brevemente le aspettative per il cuore, il fegato, il rene, i polmoni ed il pancreas. Per i diversi organi si evidenzia la funzione minima da compiere e gli obiettivi che si dovrebbero raggiungere per un organo completamente sufficiente. Inoltre sarà necessario che gli organi creati in laboratorio possano sopravvivere per un tempo sufficientemente lungo (anche anni nel caso di malattie croniche). Dovrebbero anche essere in grado di rispondere alle esigenze funzionali dell'individuo.

ANNI	CUORE	POLMONE	RENE	PANCREAS
<b>1900 - 1970</b>	1959: aggregati di cardiomiociti in vitro			
<b>1970 - 1979</b>		1976: cultura in vitro di cellule tipo alveolari produttori pneumociti		
<b>1980 - 1990</b>	1988: lo stiramento meccanico migliora l'orientazione dei cardiomiociti	1983: cultura ex-vivo di un polmone intero 1986: differenziazione in vitro di pneumatociti di tipo II in pneumatociti di tipo I	1987: viene lanciato il concetto di rene bioartificiale (BAK)	1980: isole microencapsulate e correggono stati diabetici nei ratti
<b>1990 - 2000</b>	1997: generazione di cardiomiociti in vitro		1996: tubulogenesi in vitro di cellule del tubulo renale prossimale 1999: il BAK sostituisce funzionalmente il tubulo renale fisiologico nei doti uremici	
<b>2000 - 2010</b>	2002: miocardio adulto con proprietà elettrofisiche e farmacologiche 2004: miocardio conduttivo con fisiologia elettrica migliorata 2005: miocardio ri-ingegnerizzato con funzione migliorata in vivo 2006: matrici di canali e portatori di ossigeno aumentano la densità tessutale del miocardio re-ingegnerizzato 2008: generazione di un cuore bioartificiale pompa-funzionante basato su matrici decellularizzate con perfusione	2001: mucosa bronchiale generata in vitro 2004: barriera polmone-sangue generata in vitro 2006: angiogenesi in vivo di tessuto polmonare 2008: formazione di tessuto polmonare in vitro 2008: successo di un trapianto di trachea decellularizzata e poi ripopolata in un umano 2009: un polmone bioartificiale aiuta gli scambi gassosi in vivo quando viene trapiantato ortotopicamente	2004: prove cliniche sul BAK in diversi centri 2005: prove cliniche sul BAK in diversi centri 2007: differenziazione in vitro del dotto di Wolf e del mesenchima metanefrico	2005: scaffold biodegradabili migliorano la sopravvivenza di isole trapiantate in vivo 2007: l'incapsulamento di collagene IV e laminina con idrogel migliora la funzione delle isole 2008: riprogrammazione di cellule pancreatiche esocrine adulti in cellule beta 2010: il pancreas endocrino bioartificiale annulla lo stato diabetico

Tabella 1: Milestones nella rigenerazione di cuore, polmoni, rene, e tessuto pancreatico.

<b>Organo</b>	<b>Cellule basi</b>	<b>Funzione minima</b>	<b>Obiettivi</b>
<b>Cuore</b>	Cardiociti	Contrattilità	Pompaggio contro il post-carico, responsività con farmaci, sistemi di conduzione, attività di pacemaker, valvole funzionanti
<b>Fegato</b>	Epatociti	Produzione di albumina e urea	Metabolismo con farmaci, regolazione metabolica, sintesi di fattore coagulante
<b>Rene</b>	Cellule renali midollari	Produzione di urina	Filtrazione di sangue, sistema renina angiotensina, mantenimento della pressione sanguinea
<b>Polmone</b>	Cellule alveolari tipo II	Scambi di ossigeno	Respirazione
<b>Pancreas</b>	Isole alfa, cellule beta	Secrezione di insulina e glucagone	Enzimi pancreatici digestivi, produzione di ormoni endocrine

Tabella 2: Obiettivi per gli organi interamente ingegnerizzati.

#### **4.1. Il fegato**

Il trapianto di cellule epatiche è l'alternativa la più valida al trapianto di fegato intero. Purtroppo però fin dal primo trapianto di epatociti in un paziente con ipercolesterolemia familiare [19], diversi altri tentativi sono stati realizzati con risultati non convincenti [20-29]. Questi insuccessi potrebbero essere attribuiti al numero relativamente basso di epatociti che si sono ancorati al ricevente, a causa della quantità e della qualità delle cellule infuse e anche alla tossicità dei trattamenti immunosoppressivi. Tuttavia, il trapianto di una quantità di epatociti corrispondente all'1-5% della massa totale del fegato è stato in grado di mostrare risultati positivi nei pazienti trapiantati [30].

La carenza di epatociti umani per il trapianto ha permesso di identificare altre fonti cellulari. Per esempio le cellule staminali ematopoietiche [31, 32] e le cellule fetali progenitrici del fegato [33, 34] hanno potuto migliorare le condizioni di pazienti cirrotici.

Progressi significativi sono stati realizzati con le staminali embrionali e le staminali indotte pluripotenti per creare cellule epatiche usando determinati fattori di crescita solubili che "simulano" lo sviluppo embrionale del rene [35, 36]. Le cellule epatiche derivate dalle staminali embrionarie, una volta trapiantate in reni di roditori, sono state capaci di attaccarsi e di esprimere numerosi funzioni epatiche normali [37]. Tuttavia

un'ulteriore valutazione di sicurezza deve essere effettuata per determinare se queste cellule potranno funzionare proprio come epatociti adulti primari.

La Figura 9 quantifica la proliferazione cellulare, l'apoptosi, e le funzioni renali dopo un trapianto.

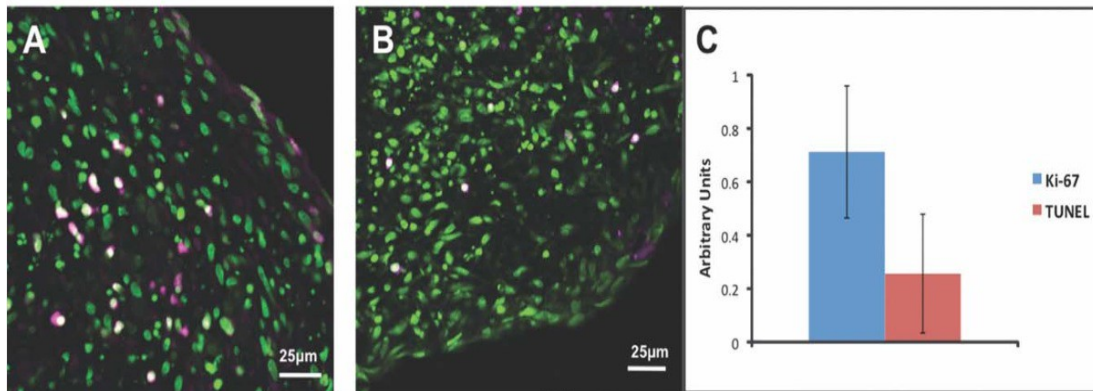


Figura 9. Valutazione di cellule renali dopo un trapianto. Sezioni di bioscaffold, sette giorni dopo il trapianto sono state immunocolorate con anti-Ki67(viola) (A) e TUNEL (viola) (B). I nuclei sono stati marcati con YO-PRO1 (verde). La colorazione Ki67 mostra un gran numero di cellule che proliferano attraverso lo scaffold. (B) La colorazione TUNEL mostra solo poche cellule apoptotiche. (C) Analisi di immagini di diverse sezioni mostrano una maggiore proliferazione rispetto all'apoptosi.

## 4.2 Il rene

Si possono coltivare cellule adulte del tubulo renale prossimale isolate con una elevata capacità di auto-riproduzione. Queste cellule si possono differenziare in strutture tubulari se coltivate in gel di collagene 3D. Quando vengono seminate sulle fibre matriciali, queste cellule non solo formano uno strato confluyente, ma dimostrano anche di avere delle capacità funzionali di trasporto. Il concetto del rene bioartificiale (Bioartificial Kidney, BAK) sfrutta queste proprietà combinando le funzioni metaboliche ed endocrine delle cellule tubulari renali coltivate in una matrice sintetica con un tradizionale sistema di emofiltrazione. Cellule del tubulo prossimale umano nei BAK hanno raggiunto l'applicazione clinica e migliorato temporaneamente la vita di pazienti con insufficienza renale acuta. Questi risultati dimostrano che le cellule isolate possono crescere e funzionare se vengono seminate su uno scaffold idoneo.

Il passo successivo è quello di fornire uno scaffold che possa consentire il trapianto ed una totale integrazione in un sistema ospite come innesto vero e proprio. Il miglioramento delle funzioni renali potrebbe essere raggiunto con scaffold simili alla matrice extracellulare naturale del rene. Infatti, esperimenti hanno dimostrato che la

matrice extracellulare nativa del rene isolata grazie al trattamento chimico di sezioni cadaveriche di rene era in grado di sostenere l'innesto di cellule renali fetali.

La Figura 10 mostra come si possano ottenere dei reni decellularizzati tramite perfusione.

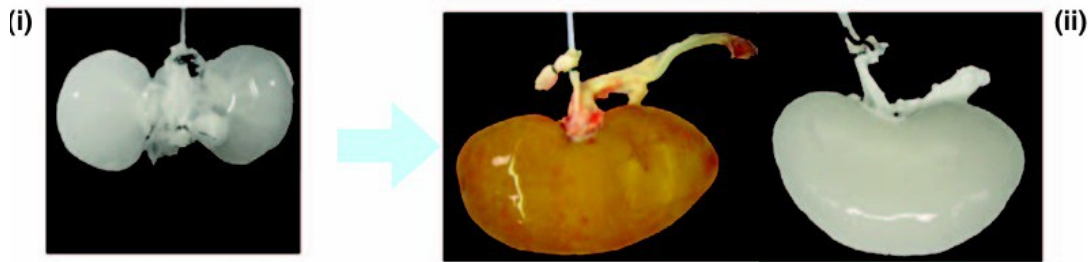


Figura 10. (i) Scaffold di rene di ratto ottenuto da un rene cadaverico dopo decellularizzazione per perfusione. (ii) Rene di maiale prima e dopo la decellularizzazione: l'aorta addominale è stata canalizzata per la perfusione.

### 4.3 La pelle

Come per ogni organo o tessuto, la pelle ha caratteristiche anatomiche, tipi cellulari e caratteristiche fisiologiche uniche che vanno prese in considerazione durante il processo di sostituzione tessutale. L'obiettivo principale nella sostituzione della pelle per le ferite grandi e non curabili è il ristabilimento della barriera epidermica per evitare infezioni e perdite di fluidi. Anche se l'autotrapianto *a spessore parziale* rimane la cura standard, esso non può essere applicato ai pazienti i cui difetti della pelle coinvolgono una grande superficie del corpo per la carenza di donatori di derma e il fatto che spesso le proprietà funzionali native non sono ristabilite.

Idealmente, una pelle ingegnerizzata dovrebbe consentire la ricrescita di uno strato dermico della pelle funzionale e fisiologico avendo caratteristiche annessiali come i peli o la pigmentazione. Finora, la riparazione della pelle è stata realizzata con sostituti artificiali o terapie cellulari (o una combinazione dei due approcci). I nuovi trattamenti si basano su nuove formulazioni di strutture porose tridimensionali che si comportano come la matrice extracellulare per la consegna in-situ di cellule staminali epidermiche. La matrice extracellulare della pelle supporta l'innesto delle cellule, la loro proliferazione, e la loro differenziazione in vitro e in vivo, e fornisce anche collagene ed altre sostanze biologiche (come per esempio fibrina o acido ialuronico) che

contribuiscono alla guarigione delle ferite ed incoraggiano lo sviluppo di tessuto cicatriziale o la ricostituzione dell'architettura fisiologica.

Diversi tipi di cellule mature differenziate della pelle sono stati studiati per i trapianti. La matrice extracellulare è in grado di indirizzare le cellule verso le loro regioni di destinazione e di sostenere la crescita e la differenziazione delle cellule staminali locali e delle cellule progenitrici che probabilmente hanno un ruolo chiave nella guarigione delle ferite e potenzialmente forniscono una guarigione senza cicatrici. Le cellule sono necessarie per la guarigione completa delle ferite ma se vengono impiantate da sole senza matrice extracellulare, hanno scarse speranze di sopravvivenza. Gli approcci di terapia cellulare devono essere migliorati per quanto riguarda il tipo di cellule utilizzate, la scelta delle cellule (autologhe oppure allogeniche) e la loro sopravvivenza e funzionalità dopo il rilascio in situ. L'uso delle cellule staminali o delle cellule progenitrici e degli scaffold ingegnerizzati dalla matrice extracellulare conservata potrebbe essere la soluzione migliore, ma ulteriori sviluppi sono necessari al fine di fornire un innesto di pelle completamente funzionale.

#### **4.4 Il muscolo scheletrico**

Il muscolo scheletrico ha una popolazione di cellule di riserva chiamate cellule satelliti che sono responsabili della rigenerazione del muscolo danneggiato. Tuttavia, in situazioni in cui la perdita di tessuto muscolare supera il 20% della massa di tessuto, non è possibile la sostituzione di muscolo sano funzionante senza tessuto cicatriziale. Questo è un problema, ma studi pre-clinici hanno mostrato che scaffold composti da matrice extracellulare della vescica urinaria [38] o della sottomucosa del piccolo intestino [39] di maiale potrebbero aiutare la formazione di nuovo tessuto scheletrico funzionale senza tessuto cicatriziale. Questo approccio ha permesso la ricostituzione del muscolo scheletrico in un paziente con una considerevole perdita del muscolo quadricipite [40]. Contrariamente alle strategie ricostruttive che utilizzano organi interi decellularizzati come polmone, fegato o cuore, l'uso di questi scaffold di matrice extracellulare acellulare non include una fase di ripopolamento ex-vivo; piuttosto si basa sul reclutamento di cellule staminali o progenitrici endogene attraverso peptidi derivati dalla matrice extracellulare nativa [41, 42, 43]. Queste cellule poi proliferano e si differenziano in situ in risposta a stimoli microambientali locali.

#### 4.5 Il cuore

Uno dei principali obiettivi nella terapia cardiaca è il recupero di muscolo cardiaco danneggiato a seguito di un infarto tramite l'ingegnerizzazione del miocardio. I primi tentativi di terapia di rigenerazione negli esseri umani erano basati sull'iniezione diretta di cellule progenitrici circolanti, o di cellule progenitrici derivate dal midollo osseo, nel miocardio infartuato [44]. Anche se alcuni studi hanno mostrato un miglioramento della funzione cardiaca dopo iniezione intravascolare di tali cellule [45, 46], la percentuale di cellule sopravvissute nel miocardio infartuato era generalmente molto bassa [47, 48]. Questi risultati poco convincenti hanno motivato l'utilizzo di biomateriali. L'approccio classico nell'uso dei biomateriali consiste nell'impiantare un patch cardiaco fatto da uno scaffold seminato con cellule cardiache. Zimmermann ha utilizzato cardiomiociti neonatali di ratto incorporati in un gel di collagene e sottoposto poi a stimolazione meccanica per migliorare le proprietà contrattili del patch [49]. L'integrazione del patch all'interno del muscolo nativo, così come il miglioramento della funzione cardiaca sono stati dimostrati. Successivamente, l'equipe di Leor et al. ha impiantato spugne di alginato seminate con cardiomiociti fetali in un miocardio di topo infartuato [50]. Dopo nove settimane in vivo, solo una piccola parte del patch innestato era occupato da cardiomiociti, mentre la maggior parte degli scaffold di alginato è stata riempita con fibre di collagene e fibroblasti sparsi. Si è anche riusciti a creare un patch di tessuto cardiaco usando l'approccio di auto-assemblaggio cellulare introdotto dall'equipe di Okano [51]. In questo approccio, fogli di cellule sono state coltivate e distaccate dal loro substrato di coltura utilizzando un substrato di polimero sensibile alla temperatura. Con questa procedura in più fasi, una fetta spessa 1 mm di tessuto cardiaco è stata impiantata in un miocardio infartuato di ratto adulto.

Un settore emergente e promettente in bioingegneria cardiaca è costituito da biomateriali iniettabili per la cardiomioplastica cellulare. L'iniezione di biomateriale liquido che potrebbe poi solidificarsi in situ non imporrebbe una geometria fissa come con un patch cardiaco. Inoltre, iniettare il biomateriale nel tessuto cicatriziale consentirebbe un intimo contatto tra le cellule iniettate e il tessuto ospite; e soprattutto, una terapia iniettabile può essere somministrata usando una procedura meno invasiva.

L'equipe di Christman ha diretto indagini su una colla di fibrina come scaffold iniettabile per rilasciare mioblasti per il miocardio ischemico [52]. Essi hanno riferito che la fibrina ha aumentato in modo significativo la sopravvivenza cellulare oltre le 5 settimane.

L'equipe di Seliktar ha proposto un nuovo tipo di materiale biosintetico iniettabile basato su fibrinogeno, da essere usato come vettore nella terapia cellulare cardiaca. Il biomateriale è realizzato coniugando glicole polietilenico (PEG) con fibrinogeno per formare un precursore liquido che viene poi assemblato in situ in una matrice di idrogel utilizzando la fotopolimerizzazione atossica [53]. Questa formulazione permette il controllo della velocità di degradazione dell'idrogel, e quindi una riduzione della risposta infiammatoria complessiva. Inoltre, è possibile controllare le proprietà meccaniche dell'idrogel tramite modifiche alla composizione della matrice [54]. L'idrogel così ottenuto è stato iniettato in cuori infartuati adulti di ratto insieme a cardiomiociti di ratto neonatale o cardiomiociti derivati da cellule staminali embrionali (ESC) umane. Utilizzando questo metodo, la sopravvivenza delle cellule è stata aumentata e la funzionalità cardiaca complessiva è stata significativamente migliorata dopo 30 giorni. Infatti l'indagine ecocardiografica dimostra un'aumentata resistenza all'allungamento del 26% [55].

Più recentemente, e con un enorme potenziale per il settore della bioingegneria degli organi, l'equipe di Ott et al. ha pubblicato un nuovo metodo di decellularizzazione per perfusione capace di generare scaffold di organi interi [56]. L'introduzione di un ugello nell'aorta ascendente ha permesso la perfusione coronarica retrograda con detergenti. Con tale metodo si è ottenuta la rimozione completa delle componenti cellulari di un cuore intero che è stato poi ripopolato con cardiomiociti neonatali di ratto. Questi ultimi sono stati veicolati all'interno dello scaffold cardiaco mediante iniezione transmurale, mentre le cellule endoteliali sono state iniettate attraverso l'aorta. Lo scaffold così ottenuto è stato in grado di eseguire la contrazione fino al 2% della normale funzione contrattile. La Figura 11 mostra immagini di scaffold cardiaci prima e dopo la decellularizzazione per perfusione. Si può osservare la canalizzazione effettuata per permettere la perfusione di detergente.

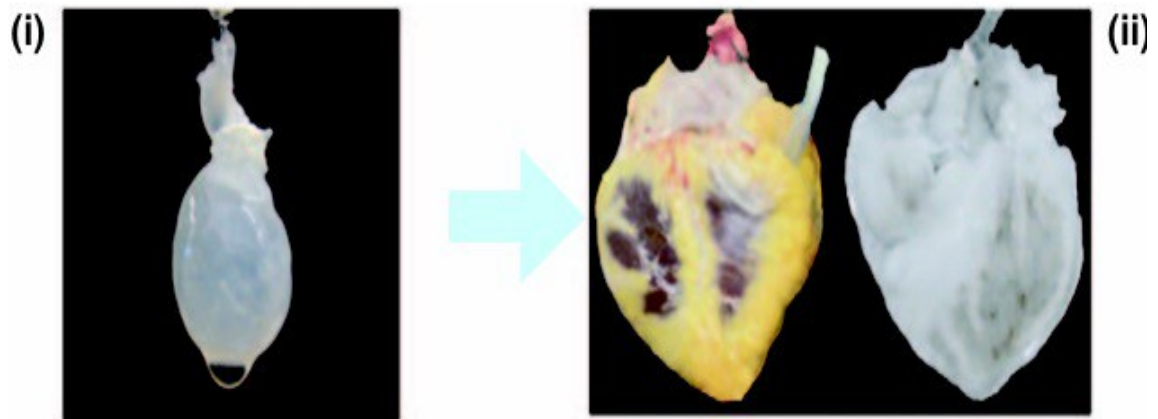


Figura 11: scaffold di cuore di ratto generato da un cuore cadaverico con decellularizzazione per perfusione. (i) l'aorta ascendente è stata cannulata per la perfusione. (ii): cuore umano prima e dopo la decellularizzazione.

## 5. Conclusioni

La decellularizzazione potrà permettere la rigenerazione tessutale su scala clinica: le necessità metaboliche verranno garantite dalla vascolarizzazione che rimane intatta; inoltre verranno mantenute le proprietà della matrice extracellulare nativa.

Sebbene studi correnti 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 generazione 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 essere il più possibile vicini alla realtà clinica. Le proteine della matrice extracellulare sono tra le più conservate [57]. Alcuni componenti degli scaffold di matrice extracellulare decellularizzata come il collagene di tipo I bovino hanno riscontrato un ampio successo in applicazioni terapeutiche [58]. Però la decellularizzazione può creare o lasciare epitopi antigenici residui [59].

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 [59,60]. 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 [61]. L'FDA 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. Allo stadio attuale della tecnologia, ripetere l'intero processo di embriogenesi dallo stadio di cellula singola all'organogenesi in laboratorio sembra poco realistico. Una tale impresa richiederebbe periodi di coltura lunghi per generare tessuti di dimensione utile, e porterebbe sicuramente a dilemmi etici ovvi. Gli scaffold di matrice extracellulare nativa potrebbero offrire una scorciatoia pratica dalla fase di espansione cellulare alla maturazione degli organi, bypassando la formazione iniziale della struttura embrionale. Anche se le relazioni spaziali e gli stimoli molecolari si collocano nelle prime fasi dello sviluppo embrionale, le fasi successive di maturazione fetale risultano meglio comprese e più facili da replicare. Ci si potrebbe concentrare su quelle fasi, fornendo tipi cellulari clinicamente rilevanti, del corrispondente stadio di sviluppo e un ambiente di sviluppo con carico meccanico e stimoli di crescita, per poter realizzare gli scaffold. Infatti, poiché il destino della cellula si decide in questa fase, il rischio di differenziazione secondo un percorso non corretto (es. tiroide vs respiratoria) sarebbe più ridotto.

La fonte clinicamente ideale per ricavare cellule progenitrici è ancora da identificare. Le cellule staminali embrionali comportano problemi etici e sono immunogeniche, compromettendo in tal modo il loro valore clinico. Le cellule staminali pluripotenti indotte sono un'alternativa, anche se le mutazioni correlate alla malattia dovranno essere corrette, come ad esempio le mutazioni del BMP2 (Bone morphogenetic protein receptor type II) nell'ipertensione polmonare. Inoltre, le preoccupazioni riguardanti modifiche genetiche dovranno essere affrontate. Creare il numero adeguato di cellule differenziate richieste per la rigenerazione di organi di dimensioni umane supera le tecnologie attuali e pone problemi significativi nel controllo fenotipico su grande scala [62]. Molti degli attuali sforzi volti a sviluppare strategie di espansione e di staminalità (la riprogrammazione dei fibroblasti che salta le fasi progenitrici pluripotenti [63]), potrebbero fornire nuove soluzioni applicabili all'ingegnerizzazione di organi in un futuro prossimo.

La rigenerazione di organi solidi basata su scaffold di matrice extracellulare nativa rappresenta una grande promessa, ma rimane chiaramente un obiettivo ambizioso. Lavorare verso questo obiettivo fornirà prodotti terapeutici che consentiranno di migliorare sempre di più la qualità di vita.

## 6. Bibliografia

- [1] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Deaths from chronic obstructive pulmonary disease—United States, 2000-2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008; 57: 1229–32.
- [2] United States Renal Data System (USRDS). Renal disease data 2009. <http://www.usrds.org/> (accessed Oct 22, 2010).
- [3] Heron M, Hoyert DL, Murphy SL, Xu J, Kochanek KD, Tejada-Vera B. Deaths: final data for 2006. *Natl Vital Stat Rep* 2009; 57: 1–134.
- [4] Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y. Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N Engl J Med* 2001; 344: 532–33.
- [5] Orens JB, Garrity ER Jr. General overview of lung transplantation and review of organ allocation. *Proc Am Thorac Soc* 2009; 6: 13–19.
- [6] Link a:  
<http://www.chups.jussieu.fr/polys/capacites/capagerontodocs/annefondamentale/VieillissementMEC1.pdf>
- [7] Gilbert, T.W. et al. (2006) Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* 27, 3675–3683
- [8] Olde Damink, L.H. et al. (1995) Influence of ethylene oxide gas treatment on the in vitro degradation behavior of dermal sheep collagen. *J. Biomed. Mater. Res.* 29, 149–155
- [9] Freytes, D.O. et al. (2008) Uniaxial and biaxial properties of terminally sterilized porcine urinary bladder matrix scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.* 84, 408–414
- [10] Greenspan, F.P. and MacKellar, D.G. (1951) The application of peracetic acid germicidal washes to mold control of tomatoes. *Food Technol.* 5, 95–97
- [11] Brown, B. et al. (2006) The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix. *Tissue Eng.* 12, 519–526
- [12] Freytes, D.O. et al. (2004) Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials* 25, 2353–2361
- [13] Voytik-Harbin, S.L. et al. (1997) Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa. *J. Cell Biochem.* 67, 478–491

- [14] Hodde, J.P. et al. (2001) Vascular endothelial growth factor in porcine-derived extracellular matrix. *Endothelium* 8, 11–24
- [15] Pedro M. Baptista, Giuseppe Orlando, Sayed-Hadi Mirmalek-Sani, Mohummad Siddiqui, Anthony Atala and Shay Soker (2009) Whole Organ Decellularization - A Tool for Bioscaffold Fabrication and Organ Bioengineering
- [16] Link a: <http://www.technologyreview.com/demo/410007/making-bioartificial-hearts/>
- [17] Link a: <http://www.faqs.org/patents/app/20090202977>
- [18] Jeremy J. Song, Harald C. Ott (2011) Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds
- [19] Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, et al. Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet* 1994; 6: 335.
- [20] Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 1998; 338: 1422.
- [21] Horslen SP, McCowan TC, Goertzen TC, et al. Isolated hepatocyte transplantation in an infant with a severe urea cycle disorder. *Pediatrics* 2003; 111: 1262.
- [22] Ambrosino G, Varotto S, Strom SC, et al. Isolated hepatocyte transplantation for Crigler-Najjar syndrome type 1. *Cell Transpl* 2005; 14: 151.
- [23] Muraca M, Gerunda G, Neri D, et al. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. *Lancet* 2002; 359: 317.
- [24] Sokal EM, Smets F, Bourgois A, et al. Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety, and metabolic follow-up. *Transplantation* 2003; 76: 735.
- [25] Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, et al. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation* 1997; 63: 559.
- [26] Strom SC, Chowdhury JR, Fox IJ. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 39.
- [27] Strom SC, Fisher RA, Rubinstein WS, et al. Transplantation of human hepatocytes. *Transplant Proc* 1997; 29: 2103.

- [28] Combs C, Brunt EM, Solomon H, Bacon BR, Brantly M, Di Bisceglie AM. Rapid development of hepatic alpha1 antitrypsin globules after liver transplantation for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1997; 112: 1372.
- [29] Mito M, Kusano M, Kawaura Y. Hepatocyte transplantation in man. *Transplant Proc* 1992; 24: 3052.
- [30] Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation* 2006; 82: 441.
- [31] Salama H, Zekri AR, Zern M, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in 48 patients with end-stage chronic liver diseases. *Cell Transplant* 2010. June 29 [ahead of print].
- [32] Pai M, Zacharoulis D, Milicevic MN, et al. Autologous infusion of expanded mobilized adult bone marrow-derived CD34+ cells into patients with alcoholic liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1952.
- [33] Khan AA, Shaik MV, Parveen N, et al. Human fetal liver derived stem cell transplantation as supportive modality in the management of end stage decompensated liver cirrhosis. *Cell Transplant* 2010; 19: 409.
- [34] Schmelzer E, Zhang L, Bruce A, et al. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med* 2007; 204: 1973.
- [35] Gouon-Evans V, Boussemart L, Gadue P, et al. BMP-4 is required for hepatic specification of mouse embryonic stem cell-derived definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 1402.
- [36] Gadue P, Huber TL, Paddison PJ, Keller GM. Wnt and TGF-beta signaling are required for the induction of an in vitro model of primitive streak formation using embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 16806.
- [37] Basma H, Soto-Gutierrez A, Yannam GR, et al. Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes. *Gastroenterology* 2009; 136: 990.
- [38] Brown BN, Valentin JE, Stewart-Akers AM, McCabe GP, Badylak SF. Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. *Biomaterials* 2009; 30: 1482–91.

- [39] Valentin JE, Turner NJ, Gilbert TW, Badylak SF. Functional skeletal muscle formation with a biologic scaffold. *Biomaterials* 2010; 31: 7475–84 .
- [40] Mase VJ Jr, Hsu JR, Wolf SE, et al. Clinical application of an acellular biologic scaffold for surgical repair of a large, traumatic quadriceps femoris muscle defect. *Orthopedics* 2010; 33: 511.
- [41] Agrawal V, Tottey S, Johnson SA, Fruend JM, Siu BF, Badylak SF. Recruitment of progenitor cells by an ECM cryptic peptide in a mouse model of digit amputation. *Tissue Eng Part A* 2011; 17: 2435–43.
- [42] Agrawal V, Johnson SA, Reing J, et al. Epimorphic regeneration approach to tissue replacement in adult mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 3351–55.
- [43] Beattie AJ, Gilbert TW, Guyot JP, Yates AJ, Badylak SF. Chemoattraction of progenitor cells by remodeling extracellular matrix scaffolds. *Tissue Eng Part A* 2009; 15: 1119–25.
- [44] Murry CE, Field LJ, Menasche P. Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point. *Circulation* 2005; 112: 3174.
- [45] Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, et al. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 2003; 108: 2212.
- [46] Schachinger V, Assmus B, Britten MB, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 1690.
- [47] Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, et al. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation* 2005; 111: 2198.
- [48] Qian H, Yang Y, Huang J, et al. Intracoronary delivery of autologous bone marrow mononuclear cells radiolabeled by <sup>18</sup>F-fluoro-deoxy-glucose: tissue distribution and impact on post-infarct swine hearts. *J Cell Biochem* 2007; 102: 64.
- [49] Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, et al. Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res* 2002; 90: 223.
- [50] Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A, et al. Bioengineered cardiac grafts: a new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation* 2000; 102(19 Suppl. 3): III56

- [51] Shimizu T, Sekine H, Yamato M, Okano T. Cell sheet- based myocardial tissue engineering: new hope for damaged heart rescue. *Curr Pharm Des* 2009; 15: 2807.
- [52] Christman KL, Vardanian AJ, Fang Q, Sievers RE, Fok HH, Lee RJ. Injectable fibrin scaffold improves cell transplant survival, reduces infarct expansion, and induces neovasculature formation in ischemic myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 654.
- [53] Williams CG, Malik AN, Kim TK, Manson PN, Elisseeff JH. Variable cytocompatibility of six cell lines with photo-initiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation. *Biomaterials* 2005; 26: 1211.
- [54] Dikovsky D, Bianco-Peled H, Seliktar D. The effect of structural alterations of PEG-fibrinogen hydrogel scaffolds on 3-D cellular morphology and cellular migration. *Biomaterials* 2006; 27: 1496.
- [55] M. Habib, K. Shapira - Schweitzer, O. Caspi, A. Gepstein, G. Arbel, D. Aronson, D. Seliktar, L. Gepstein, dati non pubblicati.
- [56] Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, et al. Perfusion- decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med* 2008; 14: 213.
- [57] Hutter, H. et al. (2000) Conservation and novelty in the evolution of cell adhesion and extracellular matrix genes. *Science* 287, 989–994 .
- [58] Badylak, S.F. (2002) The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Semin Cell Dev. Biol.* 13, 377–383 .
- [59] Badylak, S.F. and Gilbert, T.W. (2008) Immune response to biologic scaffold materials. *Semin Immunol.* 20, 109–116
- [60] Raeder, R.H. et al. (2002) Natural anti-galactose alpha1,3 galactose antibodies delay, but do not prevent the acceptance of extracellular matrix xenografts. *Transpl. Immunol.* 10, 15–24
- [61] Boyce, T. et al. (1999) Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop. Clin. North Am.* 30, 571–581
- [62] Murry, C.E. and Pu, W.T. (2011) Reprogramming fibroblasts into cardiomyocytes. *N. Engl. J. Med.* 364, 177–178 .
- [63] Ieda, M. et al. (2010) Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 142, 375–386 .