

**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE**

**CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

**BIOCOMPATIBILITÀ CHIMICA E MECCANICA DI MATRICE**

**EXTRACELLULARE PER L'INGEGNERIZZAZIONE DEL**

**MIOCARDIO**

**Relatrice:** Prof.ssa Silvia Todros

**Laureanda:** Benedetta Baldan

**ANNO ACCADEMICO:** 2023-2024

**Data di Laurea:** 19/11/2024



# Indice

<b>Abstract</b>	<b>5</b>
<b>Introduzione</b>	<b>7</b>
<b>1 La matrice extracellulare cardiaca</b>	<b>9</b>
1.1 Composizione e morfologia . . . . .	9
1.2 Proprietà meccaniche . . . . .	11
1.3 Il miocardio: tessuto, funzionalità e patologie . . . . .	13
1.3.1 Descrizione anatomica del miocardio . . . . .	13
1.3.2 Infarto miocardico . . . . .	15
<b>2 Ingegneria tessutale cardiaca</b>	<b>17</b>
2.1 Ingegneria tessutale . . . . .	17
2.2 Applicazioni dell'ingegneria tessutale al tessuto cardiaco . . . . .	18
<b>3 Matrice extracellulare ingegnerizzata</b>	<b>21</b>
3.1 Composizione della matrice e materiali utilizzati . . . . .	21
3.2 Valutazione della biocompatibilità del modello porcino . . . . .	23
3.3 Analisi sulle proprietà della matrice ingegnerizzata . . . . .	25
3.4 Caratterizzazione meccanica dello scaffold . . . . .	27
3.4.1 Comportamento meccanico del tessuto cardiaco sano . . . . .	27
3.4.2 Comportamento meccanico del tessuto cardiaco in seguito a infarto miocardico . . . . .	30
3.4.3 Osservazioni sulla meccanica della matrice ingegnerizzata . . . . .	32
<b>4 Bioreattori in ingegneria tessutale</b>	<b>35</b>
4.1 Introduzione generale sui bioreattori . . . . .	35
4.2 Bioreattore utilizzato . . . . .	37
4.2.1 Morfologia e costruzione del bioreattore . . . . .	37

4.2.2	Valutazione finale del bioreattore utilizzato . . . . .	38
<b>Conclusioni</b>		<b>40</b>
<b>Bibliografia</b>		<b>41</b>

# Abstract

Le malattie cardiovascolari sono responsabili di un terzo delle morti globali e tra queste ben l'85% sono causate da ictus, patologie e disfunzioni del miocardio. Poiché il miocardio non si rigenera, risulta di fondamentale importanza studiare metodi di ricostruzione e/o sostituzione del muscolo cardiaco. A tal fine, l'ingegneria tissutale consente di ricostruire il tessuto e ricrearne le caratteristiche fisiologiche, morfologiche e funzionali, permettendone poi l'impianto *in vivo* e consentendo il ripristino delle funzionalità dell'organo danneggiato.

L'ingegneria tissutale è una metodica che si basa sulla coltura del tessuto *in vitro* attraverso la proliferazione di cellule specifiche su uno scaffold, ovvero una struttura che ricrei l'ambiente biologico della matrice extracellulare, sulla quale le cellule tissutali si poggiano; lo scaffold, infatti, deve essere compatibile chimicamente, morfologicamente e meccanicamente per garantire non solo la buona proliferazione delle cellule, ma anche la sopravvivenza del tessuto completo *in vivo*. Lo scaffold è pertanto una struttura fondamentale nel processo di ingegnerizzazione dei tessuti biologici.

Questa tesi tratterà dell'ingegnerizzazione del tessuto muscolare cardiaco, soffermandosi sulla composizione e caratterizzazione meccanica della matrice extracellulare e del miocardio, facendo riferimento allo studio condotto da Rosellini et al.[1], e porrendo, infine, lo sguardo su alcune tipologie di bioreattori funzionali alla sopravvivenza e alla crescita delle cellule sullo scaffold scelto.



# Introduzione

Le malattie cardiovascolari sono la prima causa di morte nel mondo, responsabili di un terzo delle morti totali, di cui, in particolare, l'85% è dovuto a ictus e infarto miocardico [2]. L'infarto miocardico si verifica quando il sangue smette di circolare in maniera adeguata in una parte del cuore e il muscolo cardiaco viene, quindi, danneggiato dalla mancanza di apporto di ossigeno. Il progresso nella cura dell'infarto miocardico ha fatto sì che solamente il 25-30% [3] dei pazienti colpiti da infarto acuto del miocardio vada incontro a morte. Nei rimanenti pazienti, la presenza di un'area miocardica infartuata, dovuta all'impossibilità del miocardio di rigenerarsi, comporta un rischio di morte aumentato di circa 3 volte nei primi anni dopo l'infarto [4] e una ridotta qualità di vita per il paziente.

Nel caso di danneggiamento del tessuto muscolare cardiaco, a causa della limitata disponibilità di donatori di organi trapiantabili e dell'impossibilità delle cellule del miocardio di rigenerarsi, è stato proposto il ricorso ai metodi dell'ingegneria tissutale. In questo modo è possibile creare un tessuto biologico, partendo dalla coltivazione di cellule specifiche o staminali su uno scaffold artificiale, che ricrei le condizioni fisiologiche e biologiche del tessuto reale e che migliori le funzionalità del tessuto danneggiato [5].

Componente fondamentale del processo di ingegnerizzazione del tessuto è, quindi, la costruzione di uno scaffold adeguato alla proliferazione cellulare, ovvero una struttura che svolga la funzione della matrice extracellulare (ECM) nei tessuti biologici naturali. Questa struttura deve presentare proprietà chimiche, morfologiche e meccaniche funzionali alla crescita e al funzionamento del nuovo tessuto *in vitro* e soprattutto dopo l'impianto *in vivo*.

Questa tesi tratterà dell'ingegneria tissutale cardiaca e, in particolare, della realizzazione di scaffold attraverso l'utilizzo di molecole proteiche e polisaccaridiche, soffermandosi sulle proprietà meccaniche del tessuto miocardico sano e infartuato e della matrice ingegnerizzata. Quindi vengono analizzate le caratteristiche morfologiche e passive degli scaffold e vengono, infine, analizzati il ruolo e alcune di tipologie di bioreattori utilizzati in ingegneria tissutale.



# Capitolo 1

## La matrice extracellulare cardiaca

La matrice extracellulare (ECM) è una struttura costituita da componenti non cellulari, che formano un'impalcatura per favorire la proliferazione cellulare e lo sviluppo dei tessuti biologici. La ECM è una complessa rete tridimensionale altamente organizzata con ruoli strutturali e funzionali essenziali per la crescita e la sopravvivenza del tessuto che sostiene; essa costituisce la superficie sulla quale le cellule del tessuto sono incorporate, operando da mezzo di comunicazione tra le cellule stesse e svolgendo funzioni cardine nei processi di crescita, migrazione, differenziazione, sopravvivenza, omeostasi, morfogenesi, organizzazione, rimodellamento e regolazione cellulare. In particolare, esistono due tipi di ECM: le ECM interstiziali, che avvolgono le cellule, e le ECM pericellulari, che si trovano in stretto contatto con le cellule stesse (la membrana basale ne è un esempio) [6].

Le variazioni nella composizione e/o nella struttura della ECM comportano modificazioni non solo delle proprietà strutturali e biochimiche, ma anche nella comunicazione dei segnali che regolano lo sviluppo e l'omeostasi cellulare, portando nei casi peggiori a patologie, sindromi e condizioni letali per la sopravvivenza del tessuto [7].

Per questi motivi la ECM è il tassello imprescindibile per la riuscita del processo di ingegnerizzazione dei tessuti biologici.

### 1.1 Composizione e morfologia

I componenti principali delle ECM sono proteine fibrose: proteoglicani (PG) e glicosamminoglicani (GAG), collageni, glicoproteine strutturali e fibre elastiche, proteasi e altre proteine e glicoproteine, come le proteine matricellulari. Il tipico matricore cardiaco è composto per il 90% da collageni, per il 6% da glicoproteine e per il 4% da PG [8].

I PG sono macromolecole che consistono in un filamento proteico principale al quale sono ancorate catene di GAG caricate negativamente. I PG regolano l'organizzazione strutturale e meccanica della matrice, svolgono funzioni di resistenza meccanica alla compressione, regolano l'idratazione e sono fondamentali per la capacità di interagire con i fattori di crescita (GF), citochine, chemochine e recettori cellulari di superficie. I PG sono suddivisi in quattro categorie principali in base alla loro localizzazione e omologia: PG secreti in ambiente extracellulare, PG secreti in ambiente pericellulare, PG della superficie cellulare e PG secreti in ambiente intracellulare. Tra i PG secreti esternamente è importante ricordare i SLRP (*small leucine-rich PGs*), che controllano le funzioni spaziali del tessuto nello sviluppo e nell'omeostasi, e gli ialettani (PG che legano le lectine), che regolano numerose pathway di segnale e, di conseguenza, numerose funzioni cellulari. I PG secreti in ambiente pericellulare, tra cui perlecano e agrina interagiscono con vari recettori cellulari e influiscono sul funzionamento dei sistemi muscolo-scheletrico e cardiovascolare. Si hanno poi i PG della superficie cellulare, tra cui sindecani e glipicani (GPCs), i quali svolgono funzioni coordinative dei segnali e agiscono da corecettori. Infine, si hanno i PG secreti in ambiente intracellulare, di cui è rilevante nominare solo il SRGN [8] [7] [6].

I GAG sono eteropolisaccaridi lineari e tra essi sono da ricordare: eparan solfato (HS), eparina (Hep), condroitina solfato (CS), cheratan solfato (KS), dermatan solfato (DS), acido ialuronico (HA). Quest'ultimo è fondamentale per la ritenzione idrica, l'integrità strutturale, la riparazione tissutale e la rigenerazione. Inoltre, lo HA, legato alla proteina di superficie CD44, guida lo sviluppo muscolare attraverso la regolazione della migrazione e dei fattori di crescita [8] [7] [6].

I collagene sono proteine strutturali fibrose e costituiscono la maggior parte delle ECM, ricoprono una funzione di supporto meccanico, fornendo anche elasticità e stabilità; inoltre, i collagene interagiscono con i recettori di superficie, regolando numerosi processi cellulari. Nel tessuto cardiaco sono presenti principalmente collagene di tipo I, III, IV e VI [8]. La rilevanza dei collagene è data dalla particolare struttura a tripla elica, che conferisce a queste proteine le caratteristiche proprietà meccaniche e strutturali che li rendono così indispensabili (si veda sezione 1.2) [7] [6].

Le fibre elastiche sono particolarmente importanti nella ECM del sistema cardiovascolare, nel quale le proprietà elastiche dei tessuti sono cruciali nel mantenimento della pressione sanguigna. Si ricordano l'elastina e la fibronectina [8]. Queste glicoproteine strutturali conferiscono elasticità a lungo raggio e sono fondamentali per l'interazione e la regolazione dell'adesione tra

cellule [6] [7].

Tra le proteasi significative nella ECM cardiaca è importante nominare le metalloproteinasi di matrice (MMP), le disintegrine e metalloproteinasi con ripetizioni simili alla trombospondina (ADAMTS) [8]. Le metalloproteinasi sono, infatti, la classe più ampia di proteinasi e sono responsabili del catabolismo di quasi tutte le molecole delle ECM, oltre ad avere rilevanza nell'interazione tra cellule [7].

Infine, si ricordano altri recettori di superficie come integrine e il recettore ialuronico CD44, importanti per la comunicazione bidirezionale tra cellule e matrice.

## 1.2 Proprietà meccaniche

La ECM cardiaca presenta caratteristiche meccaniche di anisotropia, ovvero il tessuto cardiaco presenta comportamenti meccanici diversi in direzioni diverse nello spazio, dove i movimenti longitudinali e circolari che caratterizzano la torsione muscolare cardiaca sono dovuti alle variazioni negli angoli tra le fibre muscolari. Tale struttura è fortemente connessa alla morfologia della ECM, la quale presenta proprietà meccaniche passive nel tessuto cardiaco; essa ricopre un ruolo dominante grazie alla sua alta organizzazione e gerarchia strutturale, che pone i collagene di tipo I e di tipo III alla base delle caratteristiche meccaniche di tutto il tessuto [9]. In alcuni studi come quello di Shen et al.[10] è stato dimostrato che, conducendo esperimenti di creep e rilassamento delle tensioni su una fibrilla di collagene di tipo I, questa presenta una risposta viscoelastica. Nello studio, per scrivere il modello matematico che descrive la risposta meccanica, viene utilizzato il modello fenomenologico di Maxwell-Weichert, costituito da due rami di Maxwell, ognuno costituito da un elemento elastico (molla) e da un elemento viscoso (pistone) in serie tra loro, posti in parallelo ad un elemento elastico. Il modello costitutivo descrive il materiale come caratterizzato da un modulo elastico in dipendenza dal tempo dato dall'espressione:

$$E_{relax}(t) = E_0 + E_1 \exp(-t/\tau_1) + E_2 \exp(-t/\tau_2) \quad (1.1)$$

Dove  $E_0$  è il modulo elastico tempo-indipendente,  $\tau_1$  e  $\tau_2$  sono i tempi di rilassamento (ovvero il coefficiente di viscosità del pistone diviso il modulo elastico della molla); nell'equazione 1.1 si assume che la velocità di deformazione moltiplicata al modulo elastico degli elementi di Maxwell sia molto minore rispetto alla velocità di variazione dello stress. La risposta non lineare delle fibrille alle prove di stress-relaxation e di creep è rappresentata in figura 1.1. In figura 1.1(a) si nota che lo stress nominale ha inizialmente una velocità di rilassamento elevata, che diminuisce col passare del tempo secondo una legge esponenziale, tendendo a raggiungere un asintoto; allo stesso modo in figura 1.1(b) si nota come lo sforzo aumenti rapidamente all'inizio,

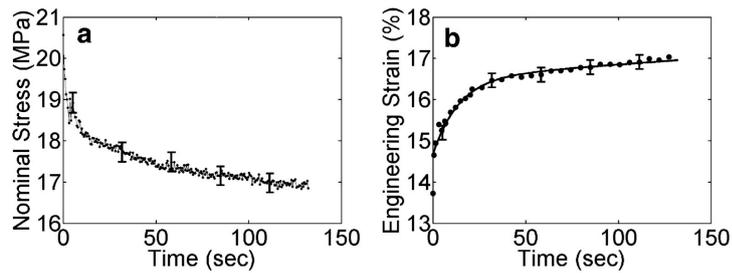


Figura 1.1: Risposta meccanica di un campione rappresentativo di fibrilla di collagene. (a) Curva sforzo nominale-tempo. (b) Curva deformazione ingegneristica-tempo. Per maggiore chiarezza, le barre di errore sono mostrate ogni 50 punti dati per entrambe le curve, e i simboli sono mostrati ogni 3, 5 o 10 punti dati per la curva deformazione ingegneristica-tempo [10].

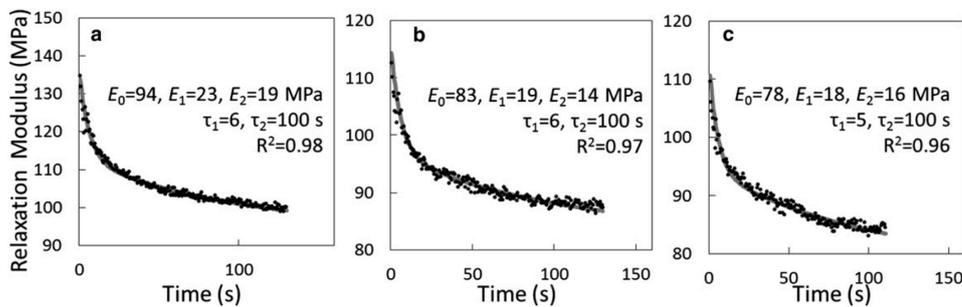


Figura 1.2: Comportamento viscoelastico del campione di fibrilla di collagene mostrato in figura 1.1, testato tre volte con 100 minuti di riposo tra un test e l'altro, che mostra le curve modulo di rilassamento-tempo per (a) test 1, (b) test 2 e (c) test 3. I punti rappresentano i dati sperimentali, mentre le curve continue rappresentano le curve adattate utilizzando un modello di Maxwell-Weichert. I moduli elastici ( $E$ ), i tempi di rilassamento ( $\tau$ ) e il coefficiente di determinazione ( $R^2$ ) sono riportati in ciascun grafico [10]

tendendo poi ad un plateau tipico del comportamento viscoelastico nella prova di creep. Tali curve confermano il comportamento viscoelastico delle fibrille di collagene I.

In figura 1.2 è rappresentata la relazione del modulo di stress relaxation col tempo nelle tre prove svolte nell'esperimento di Shen et al.[10].

Questo tipo di comportamento del collagene di tipo I conferisce alla ECM importanti proprietà meccaniche, come potenziale di flessione, frizione tra molecole e capacità, quindi, di interazione molecolare. Inoltre, per evitare che l'eccessivo attrito tra catene molecolari impedisca lo scorrimento relativo delle fibrille di collagene, queste ultime sono ricoperte da uno strato di PG e GAG, i quali, grazie al forte carattere idrofilo, permettono la lubrificazione tra le molecole legandosi a molecole d'acqua.

In conclusione, il contributo del collagene di tipo I risulta necessario nello scaffold del tessuto muscolare cardiaco in quanto fornisce proprietà cruciali per il buon funzionamento del muscolo cardiaco.

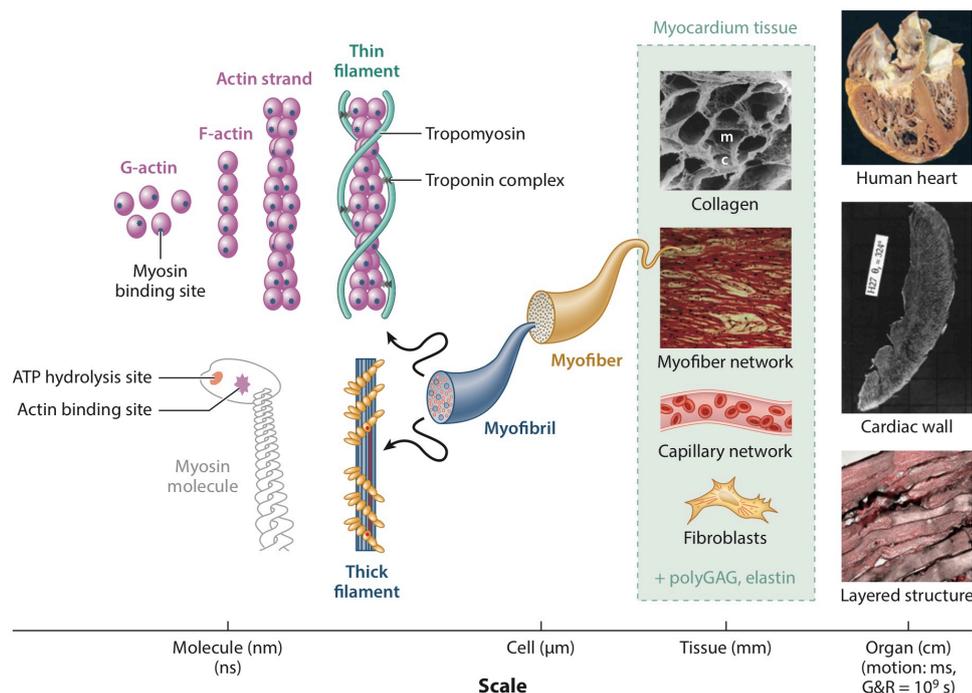


Figura 1.3: Gerarchia strutturale del tessuto miocardico. Abbreviazioni: ATP, adenosina trifosfato; c, lacune capillari; G&R, crescita e rimodellamento; m, lacune di miofibrille; polyGAG, poliglicosaminoglicano [12]

### 1.3 Il miocardio: tessuto, funzionalità e patologie

Il miocardio è il tessuto muscolare cardiaco; esso costituisce, di gran lunga, la componente principale delle pareti del cuore e ne provoca il movimento pulsatile. È un tessuto paragonabile al tessuto muscolare striato (scheletrico).

#### 1.3.1 Descrizione anatomica del miocardio

Il miocardio è un tessuto composito e presenta una gerarchia strutturale e funzionale altamente raffinata, costituita da cardiomiociti (miociti) e fibroblasti, sostenuti dalla ECM e perfusi da una rete vascolare.

I cardiomiociti sono le cellule che compongono per la maggior parte il tessuto muscolare cardiaco; essi occupano, infatti, circa tre quarti del volume del tessuto. Si presentano come dei cilindri, dove la dimensione radiale è circa sette volte minore rispetto alla dimensione longitudinale. Più miociti sono raggruppati a formare unità sarcomeriche attraverso strutture chiamate dischi intercalari (*intercalated disc*) e proteine chiamate connessioni (*gap junction*). I primi permettono la trasmissione di impulsi elettrici e forze meccaniche, facilitando la contrazione sincronizzata tra miociti differenti, le seconde sono specializzate nella trasmissione del potenziale cellulare attraverso dei canali ionici diretti tra le cellule [11].

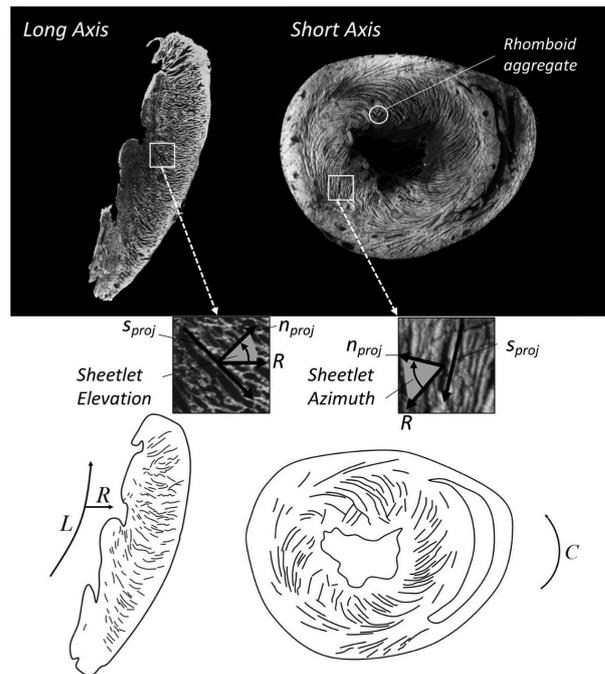


Figura 1.4: Strutture a lamelle immagini nelle viste lungo l'asse cardiaco (sinistra) e trasversale (destra). Nelle macrografie (in alto) è evidente la disposizione delle fibre cardiache [13]

Considerando la struttura ad un livello subcellulare è possibile osservare che i cardiomiociti contengono varie miofibrille (figura 1.3), costituite da bande ripetute grazie alle quali formano la struttura del sarcomero. Il sarcomero consiste nella ripetizione di filamenti di actina (filamenti sottili) e miosina (filamenti spessi) (figura 1.3). I primi si muovono parallelamente ai filamenti spessi verso il centro del sarcomero; i secondi sono ancorati attraverso la proteina titina, essenziale per la sua capacità estensiva che consente un allungamento massimo del 170% della lunghezza iniziale. Il movimento avviene in seguito all'innescio, prodotto dal rilascio di energia (sotto forma di adenosina trifosfato, ATP), che provoca l'accorciamento del sarcomero [11].

I fibroblasti cardiaci presentano dimensioni ridotte rispetto ai cardiomiociti e sono più numerosi. Essi svolgono un ruolo fondamentale nel mantenimento della ECM.

Nella ECM sono presenti tre tipologie di collagene, che consentono il funzionamento dell'intera struttura: collagene endomisio, perimisio ed epimisio. Il collagene endomisio avvolge individualmente le miofibrille nelle lamine; il collagene perimisio presenta elevata resistenza alla trazione e connette lamine adiacenti tenendo insieme gruppi di miofibrille; infine, il collagene epimisio costituisce uno strato di tessuto connettivo che circonda l'intero muscolo [11].

Le fibre sono disposte secondo il loro asse principale e sono accoppiate da un'estremità all'altra; l'angolo di orientazione di tali fibre viene chiamato angolo elicoidale poiché ruota in base alla posizione sulla parete ventricolare. Inoltre, i cardiomiociti ventricolari sono organizzati in fogli posizionati su piani radiali e tangenziali, costituiti da un numero tendenzialmente

compreso tra quattro e sei strati di cellule. In generale, l'organizzazione delle fibre e degli strati di cardiomiociti è estremamente complessa e variabile in base alla posizione in cui si trovano. Una delle rappresentazioni più accurate della disposizione e composizione della muscolatura cardiaca è mostrata in figura 1.4. Poiché inizialmente le fibrille di collagene sono arrotolate e crimpate, nella configurazione iniziale il tessuto non sostiene alcun carico; ne consegue che a tensioni basse la risposta meccanica è governata dalle sole miofibrille, mentre a carichi maggiori subentra l'azione combinata delle miofibrille e delle fibre di collagene [11] [13].

### **1.3.2 Infarto miocardico**

Tra le malattie cardiovascolari (CVD), l'infarto miocardico (MI) è quella che provoca il maggior numero di morti nel mondo. Il MI è definito come la morte delle cellule che compongono il miocardio, ovvero i cardiomiociti, dovuta ad ischemia prolungata [14], portando al progressivo deterioramento delle funzioni del cuore [15]. Questo evento traumatico è causato dallo squilibrio tra la richiesta e la disponibilità di ossigeno nel miocardio e, nei casi più acuti, può provocare insufficienza cardiaca. Una delle cause più comuni che portano a MI è l'arteriosclerosi coronarica, che provoca un accumulo di placche arteriosclerotiche, ovvero cumuli di tessuto fibroso sulla parete dei vasi arteriosi. Il continuo sviluppo di tali placche porta al restringimento del vaso e, con l'aumento della richiesta di ossigeno, il flusso sanguigno ostruito non è in grado di fornire un'adeguata ossigenazione ai tessuti. Inoltre, quando il cappuccio fibroso della placca perde stabilità, può verificarsi l'erosione o la rottura delle placche e la conseguente formazione di trombi nella circolazione, i quali ostruiscono il flusso sanguigno; si ha in seguito l'impedimento della respirazione aerobica, l'esaurimento di ATP e l'accumulo di metaboliti. Le prime disfunzioni ventricolari critiche sono osservabili dopo alcuni secondi dall'ischemia. Conseguentemente si ha la morte dei cardiomiociti e il rimpiazzo delle cellule morte con cicatrici formate da tessuto fibroso non contrattile ed ECM. Il rischio di ripetizione di eventi simili o anche più severi porterebbe poi alla formazione eccessiva di tessuto fibrotico, che andrebbe a compromettere seriamente le funzioni cardiache, per esempio sviluppando un'insufficienza cardiaca [16].



## Capitolo 2

# Ingegneria tessutale cardiaca

Le malattie cardiovascolari sono responsabili di un terzo delle morti globali, fatto che le porta ad essere la principale causa di morte globalmente. In particolare, circa l'80% di queste morti sono causate da infarti e ictus [2]. Per quanto riguarda l'infarto miocardico il problema principale è la perdita di cardiomiociti, queste cellule sono infatti incapaci di rigenerarsi, determinando il danneggiamento permanente del muscolo cardiaco. Per risolvere questo problema le tecniche più in uso sono il trapianto di cuore e l'installazione di un dispositivo di assistenza ventricolare (VAD). Tuttavia, entrambe le tecniche presentano limitazioni significative: il trapianto implica la disponibilità di organi donati, non sempre garantita, inoltre, nel caso si trovasse un organo trapiantabile, il paziente dovrebbe assumere a vita farmaci immunosoppressivi; nel caso di utilizzo di VAD, sarebbe necessaria un'operazione chirurgica estremamente invasiva e il paziente dovrebbe essere sottoposto a terapie anticoagulanti [17]. Per questi motivi la frontiera dell'ingegneria tessutale ha iniziato ad essere esplorata con forte interesse: questa pratica permette di ripristinare quasi o completamente le funzionalità cardiache tramite il trapianto di un surrogato del tessuto muscolare cardiaco elaborato *in vitro*.

### 2.1 Ingegneria tessutale

L'ingegneria tessutale (TE) è una pratica che interseca varie discipline scientifiche, quali la bioingegneria dei materiali, il design e modellamento in 3D, biologia e medicina. E' pertanto un'area di ricerca complessa che propone di creare impianti rigenerativi, migliorare le piattaforme di screening farmacologico e modellare varie patologie *in vitro* per la ricerca. Questa pratica include vari approcci che permettono di facilitare il rimpiazzo o la riparazione dei tessuti danneggiati; le declinazioni della TE includono strategie basate sulla coltura di cellule e metodologie di scaffolding, nelle quali la creazione di una ECM adeguata è cardinale in quanto essa costituisce l'ambiente di proliferazione e adesione cellulare.

Gli ambiti di applicazione della TE sono molteplici grazie alla sua versatilità e ad oggi è possibile ingegnerizzare molti tessuti biologici diversi. Si studiano, infatti, approcci promettenti nell'ingegnerizzazione del tessuto osseo per la rigenerazione o riparazione del tessuto tramite fattori di crescita, in particolare nel trapianto osteocondrale. Questa pratica è utilizzata anche nel ripristino delle funzioni di tessuti epatico, renale e polmonare patologici, come anche per la riparazione del tessuto oculare, tuttavia i risultati promettenti in questo campo sono ancora limitati. Per quanto riguarda le applicazioni della TE epiteliale, esistono in commercio vari sostituti sintetici all'epitelio, creati tramite metodologia di biostampa in 3D, che vengono utilizzati con funzione di protezione, guarigione e riparazione di difetti superficiali. La TE viene utilizzata anche nella ricostruzione di tessuto gastrointestinale, tramite l'utilizzo di cellule staminali mesenchimali per la rigenerazione del tessuto muscolare liscio. In urologia le applicazioni della TE permetteranno di far fronte al problema dell'incontinenza. Invece, gli approcci della TE al tratto orale comprendono impianti per la ricostruzione della mucosa e la sostituzione della gengiva danneggiata, lesionata o ammalata. Infine, la TE ha largo impiego nell'ambito cardiovascolare, con l'ingegnerizzazione di tessuto miocardico funzionale e valvole ingegnerizzate; in questo settore è particolarmente importante la creazione di una matrice extracellulare funzionale per il sostegno dei cardiomiociti e che consenta tutto il range di contrazioni cardiache [18].

## **2.2 Applicazioni dell'ingegneria tessutale al tessuto cardiaco**

Le applicazioni dell'ingegneria tessutale all'ambito cardiovascolare sono molteplici, in particolare esistono tre macroapprocci: approccio cellulare senza scaffold, approccio basato su biomateriali senza cellule, approcci ibridi (scaffold cellulari).

Per quanto riguarda gli approcci che non utilizzano scaffold, la proposta è quella di risolvere il problema della perdita irreversibile di cardiomiociti nel tessuto cardiaco; questa tecnica utilizza impianti di cellule direttamente nel tessuto patologico. Ciononostante, questo approccio riscontra ancora varie complicazioni dovute ad ostacoli nel ricreare la struttura e le proprietà meccaniche del tessuto originale senza ricorrere ad uno scaffold per l'ancoraggio e la proliferazione cellulare. Inoltre, anche la mancanza di gruppi cellulari staminali adatti, l'insuccesso nella sopravvivenza delle cellule impiantate e il rischio di tumorigenesi sono importanti difficoltà. Per far fronte ad alcune delle complicità nominate esiste la tecnica della biostampa in 3D, applicata con successo nella creazione di tessuto muscolare liscio; questa metodologia permette, infatti, di ricreare in maniera più fedele le caratteristiche meccaniche e biochimiche del tessuto [19].

L'approccio acellulare con utilizzo di biomateriali, invece, mira a creare un ambiente che migliori e sostenga la rete di segnali intracellulari per permettere terapie rigenerative più effi-

caci. Naturalmente, la creazione di uno scaffold che sia adeguato all'ambiente biologico e che imiti al meglio la matrice extracellulare del tessuto interessato non è semplice; questo approccio richiede che i materiali utilizzati e il prodotto finale rispecchino alcune caratteristiche cardinali, funzionali al successo della terapia *in vivo*. Alcune di queste proprietà riguardano la scelta delle fonti cellulari più adatte e, in particolare, l'impiego di biomateriali che siano in grado di supportare lo sviluppo, la maturazione e le funzioni cellulari, il mantenimento dell'integrità meccanica per la miglior imitazione dell'ambiente biologico (per il miocardio si mira ad uno scaffold che presenti rigidità relativamente bassa,  $\approx 1 - 10$  kPa), ma anche il controllo della biodegradabilità per permettere il rimodellamento della matrice. Pertanto, ad oggi i biomateriali sintetici e naturali vengono lavorati utilizzando alcune tecniche specifiche, come tecniche di decellularizzazione, approcci di produzione attiva, electrospinning, 3D casting e micropatterning [19].

Infine, l'approccio ibrido prevede l'utilizzo di scaffold ingegnerizzati accoppiati a cellule specifiche derivanti dal paziente. Per la creazione dello scaffold valgono tutte le condizioni richieste nell'approccio acellulare precedentemente trattato. In particolare, per raggiungere le richieste di biomimetismo, gli scaffold devono essere assemblati tramite vari approcci come il casting, la biostampa e l'electrospinning. Questi approcci permettono di raggiungere la giusta morfologia della matrice per scaffold composti da biomateriali naturali e consentono la funzionalizzazione degli scaffold costituiti da biomateriali sintetici per facilitare l'integrazione e la maturazione cellulare nel tessuto ingegnerizzato. Oltre a ciò, gli scaffold devono supportare e promuovere la vascolarizzazione del tessuto per via diretta o attraverso la loro natura porosa [19]. Di seguito si nominano alcune tecniche utilizzate per l'ingegnerizzazione dei tessuti che utilizzano scaffold e colture cellulari. Una delle nuove frontiere della bioingegneria è la stampa o biostampa in 3D in cui le cellule cardiache derivate dal paziente vengono incorporate su un supporto chiamato bioink, in grado di mantenere la struttura e la geometria tessutale. Ad oggi questa tecnica è limitata dalla quantità e dalla complessità delle caratteristiche tessutali cardiache. Si ha poi un approccio basato sulla capacità delle cellule di autoassemblarsi specificamente rispetto al tessuto che compongono. Mediante questa tecnica vengono realizzate placche cardiache o supporti vascolari perfusi. La ricerca si sta concentrando sul miglioramento di questa tecnologia, trovando soluzioni che permettano l'aumento della popolazione cellulare e l'ottimizzazione della vascolarizzazione del tessuto. Anche la terapia di iniezione di cellule e idrogel sta prendendo piede poiché offre un processo meno invasivo rispetto ad altre tecniche. Questa terapia promette la rigenerazione del tessuto direttamente *in vivo* attraverso l'iniezione di fattori di crescita, citochine e metalloproteinasi e idrogeli. Il 3D casting è una metodologia che interseca la biostampa in 3D e il casting, permettendo al tessuto creato di ottenere benefici da entrambe le tecniche, in particolare, è possibile risolvere il problema della vascolarizzazione nei

tessuti ottenuti tramite biostampa 3D. Una tecnica ampiamente studiata è quella della decellularizzazione di tessuti, utile soprattutto nei casi in cui il paziente necessita di un trapianto totale di organo e non vi sia disponibilità di organi da donatori: viene ricavata la matrice decellularizzata dell'organo d'interesse e vi si riseminano le cellule staminali del paziente, sfruttandone così la capacità di autoassemblaggio. Un grosso vantaggio di questa tecnica è il poter evitare eventuali terapie immunosoppressive dopo l'impianto. Le tecnologie di micropatterning e microstamping offrono importanti vantaggi nella creazione di trame tessutali fino all'ordine del sub-micron: ciò permette di realizzare tessuti altamente biomimetici e in grado di dirigere l'allineamento cellulare. L'electrospinning è una tecnica largamente impiegata nella creazione di tessuti per applicazioni cliniche e industriali grazie alla sua efficacia e versatilità in termini di materiali utilizzabili e di prodotti ottenibili. Un ultimo approccio è quello del metodo *organ-on-a-chip*, che ripropone la realizzazione dell'ambiente biologico su scala microscopica [19].

## Capitolo 3

# Matrice extracellulare ingegnerizzata

La ECM cardiaca ingegnerizzata, come osservato in precedenza, deve possedere caratteristiche specifiche per assicurare la proliferazione, la crescita e la sopravvivenza *in vitro* e *in vivo* dei cardiomiociti e per permettere al tessuto finale di compiere correttamente i movimenti funzionali al pompaggio del sangue nel sistema cardiovascolare. La buona riuscita della ECM dipenderà, pertanto, non solo dai materiali utilizzati, ma soprattutto dalle proprietà di biocompatibilità meccanica e biologica dello scaffold nel suo complesso.

### 3.1 Composizione della matrice e materiali utilizzati

La composizione della ECM è fondamentale per garantire tutte le proprietà funzionali del tessuto; infatti, non solo è necessario scegliere molecole che siano singolarmente utili, ma esse devono anche instaurare interazioni favorevoli tra di loro. Pertanto, nello studio di Rosellini et al.[1] vengono realizzate due tipologie di scaffold porosi derivati dalla miscela di componenti proteici, collagene o gelatine, con un componente polisaccaridico, l'alginato, usando un rapporto in peso 20:80 di alginato e collagene (scaffold AC) o alginato e gelatina (scaffold AG). Durante le analisi sulle proprietà dei due tipi di scaffold, i risultati ottenuti sono stati poi confrontati con dei campioni di tessuto miocardico nativo porcino (si veda sezione 3.3). I reagenti utilizzati nella composizione e nel trattamento degli scaffold sono i seguenti: alginato (viscosità al 2%, soluzione a 25°C=250 cps), collagene di tipo I, gelatina (tipo B da pelle bovina), glutaraldeide (GTA; in soluzione acquosa al 25%), soluzione salina tamponata con fosfato (PBS, phosphate buffered saline), collagenasi, entrambi acquistati a Sigma-Aldrich<sup>TM</sup> (Milano, Italia), cloruro di calcio e acido acetico, acquistati da Carlo Elba Reagenti<sup>TM</sup> (Milano, Italia). Di seguito si analizzano i reagenti di maggior importanza nel dettaglio.

L'alginato è un composto reperibile in natura dalle alghe brune e dai batteri, che presenta buona biocompatibilità, degradabilità e non trombogenicità. E' un polisaccaride contenente

gruppi carbossilici che conferiscono carica negativa, consentendo alla molecola di legarsi con altri composti di carica positiva; il suo legame con alcune molecole caricate positivamente permette un miglioramento delle proprietà meccaniche e la creazione di un ambiente idoneo alla proliferazione cellulare [20].

Il collagene, come precedentemente analizzato nel paragrafo 1.2, è un costituente fondamentale della matrice cardiaca poiché fornisce delle proprietà essenziali alla maturazione delle cellule miocardiche e al movimento del tessuto cardiaco; nello specifico, il collagene derivato dal tessuto cardiaco presenta un ciclo di rilassamento e contrazione molto sviluppato e funzionale specificatamente al battito cardiaco [21].

La gelatina è una proteina naturale derivata dal collagene. Essa offre vari vantaggi rispetto al suo precursore: migliore viscosità, elasticità e conduttività, come anche minore tossicità e proprietà meccaniche più favorevoli nella TE, proprietà ioniche, maggiore idrofilia e capacità di legarsi ad altri polimeri. Inoltre, la gelatina risulta più biocompatibile poiché, grazie alla sua natura meno aromatica, riduce le reazioni di rigetto *in vivo*. Per migliorare ulteriormente la biocompatibilità di questo composto la ricerca ha sintetizzato il metacrilato gelatinoso, il quale presenta caratteristiche ancora più vantaggiose rispetto alla sola gelatina [22].

La GTA e l'acido acetico sono due composti utilizzati per promuovere il crosslinking e le interazioni elettrostatiche. Il primo viene utilizzato nello studio di Rosellini et al.[1] per promuovere il crosslinking dei componenti proteici; tuttavia, il trattamento prolungato di un tessuto tramite GTA rischia di compromettere il potenziale di rimodellamento del tessuto stesso, ovvero la capacità di modificarsi in seguito a danneggiamenti o stimoli. Per questo motivo, nonostante tramite risciacquo estensivo sia possibile rimuovere i residui di GTA efficacemente [1], ad oggi si stanno studiando nuovi metodi, meno rischiosi, di stimolare il crosslinking proteico [23]. L'acido acetico viene impiegato nello studio di Rosellini et al.[1] per favorire le interazioni elettrostatiche tra i gruppi amminici delle proteine e i gruppi carbossilici dei polisaccaridi ed è una sostanza che, come la GTA, potrebbe avere effetti tossici sulla cultura cellulare; ad ogni modo, questo acido è conveniente in quanto può essere estratto da gas naturali senza emissioni e, di conseguenza, aiuta a ridurre gli impatti ecologici [24]. Inoltre, anch'esso può essere eliminato efficacemente attraverso risciacquo [1].

La PBS viene utilizzata da Rosellini et al.[1] nello studio della degradazione *in vitro* assieme alle collagenasi, utilizzate a 16 U/mL in un bagno dinamico; la PBS viene poi impiegata per la caratterizzazione meccanica e nelle analisi di proliferazione e differenziazione cellulare.

## 3.2 Valutazione della biocompatibilità del modello porcino

Nel tempo sono stati considerati vari modelli animali per lo studio delle malattie cardiovascolari, come cani, conigli, roditori, suini e altri ancora. Inizialmente furono identificate importanti somiglianze in termini di composizione molecolare e cellulare con il regno dei roditori; questi animali vennero però considerati inadeguati nell'imitare la fisiologia umana. Iniziò, pertanto, la ricerca di una specie animale che riuscisse a riprodurre adeguatamente il sistema cardiovascolare umano e venne identificata per prima la specie canina, in seguito abbandonata a causa di questioni etiche e differenze anatomiche di base. Infine, la scelta ricadde sulla specie suina, che presenta, nei limiti e negli interessi della ricerca, un sistema cardiovascolare sufficientemente affine a quello umano. In particolare, tra le due maggiori classi di suini appartenenti alla specie *sus scrofa domestica* si distinguono i suini da allevamento e i suini nani, dei quali, i secondi presentano caratteristiche più vantaggiose alla ricerca. Innanzitutto, il rapporto tra il peso del cuore e il peso corporeo è lo stesso dell'essere umano (5g/kg [25]); altre similitudini si ritrovano nelle valvole semilunari umane e porcine (vantaggio che permette l'impianto di vere e proprie valvole suine decellularizzate e ingegnerizzate negli esseri umani), nell'approssimazione della risposta infiammatoria, coagulativa, intra- e post- operativa, e anche nelle aritmie dovute a infarto. I suini, per giunta, sono predisposti all'arteriosclerosi degenerativa con l'età, proprio come il genere umano, il che permette di studiare accuratamente la malattia *in vivo*. D'altra parte, esistono svariate differenze tra le due specie. Le discrepanze anatomiche di maggior rilevanza sono causate dalle differenze posturali tra specie bipede e quadrupede, fattore che comporta disposizioni del torace contrastanti, che influenzano ampiamente la dinamica del flusso sanguigno. Oltre a ciò, sono state osservate differenze a livello microstrutturale nelle valvole cardiache per quanto riguarda l'espressione di metalloproteinasi I e la distribuzione di proteoglicani. La specie umana e la specie suina si distinguono anche nella distribuzione dell'innervazione del nodo atriale, che nei suini si presenta uniforme, mentre negli esseri umani la distribuzione è eterogenea; ciò implica la sostanziale differenza nella generazione dell'impulso: unifocale nei suini e multifocale negli esseri umani. Un'ulteriore fondamentale differenza si ha nelle fibre di Purkinje, componente essenziale per il sistema di conduzione; nei suini tali fibre sono connesse al miocardio ventricolare, transmuralmente, mentre negli esseri umani le giunzioni delle fibre si trovano subendocardicamente. Infine, il sistema di conduzione suino presenta una maggior concentrazione di tessuto connettivo rispetto al tessuto elastico e questo fattore aumenta ulteriormente il distacco elettrofisiologico tra la specie suina e quella umana [25].

Nonostante le differenze elencate, il modello porcino è ormai ampiamente utilizzato nello studio delle dinamiche cardiovascolari e viene impiegato anche nell'ingegnerizzazione dei tessuti cardiaci, designati in futuro all'impianto umano *in vivo*. La decellularizzazione del tessuto cardiaco porcino permette il mantenimento della composizione di collagene I e III (la cui im-

portanza è già stata discussa nella sezione 1.2 di questa tesi) e la preservazione della struttura e dell'orientamento delle fibre nella ECM; anche le lamine vascolari basali vengono mantenute intatte. Di conseguenza, vengono conservate anche le proprietà biomeccaniche e la stabilità strutturale dello scaffold. Operando un metodo di decellularizzazione adeguato, infatti, è possibile preservare la stabilità e il comportamento biomeccanico del cuore nativo (figura 3.1), l'architettura e le caratteristiche della ECM porcina, che dimostra straordinaria corrispondenza con quella umana [26]. Questa somiglianza è stata osservata da Ballobre-Barreiro et al.[27]; nello studio si osserva l'affinità del processo di rimodellamento della ECM dopo l'infarto miocardico attraverso un'analisi proteomica. Grazie a questo studio è possibile osservare la dinamica di rimodellamento post infarto su campioni porcini che esemplificano accuratamente la dinamica del tessuto umano e, in particolare, della formazione di miofibroblasti regolata dal fattore di crescita trasformante  $-\beta$  (TGF- $\beta$ , *transforming growth factor- $\beta$* ) e dalle interazioni con i GAG. Il rimodellamento della ECM causa una variazione nella disposizione e quantità di tessuto fibroso nella ECM stessa, modificando quindi la dinamica di conduzione dell'intero organo. I fibroblasti contribuiscono, infatti, alla propagazione del segnale elettrico: ciò implica che nella preparazione dello scaffold per l'ingegnerizzazione del miocardio sia fondamentale scegliere un componente decellularizzato che presenti disposizioni delle fibre affini a quelle umane. Anche per questa motivazione il modello porcino è favorito rispetto ad altri modelli animali disponibili.

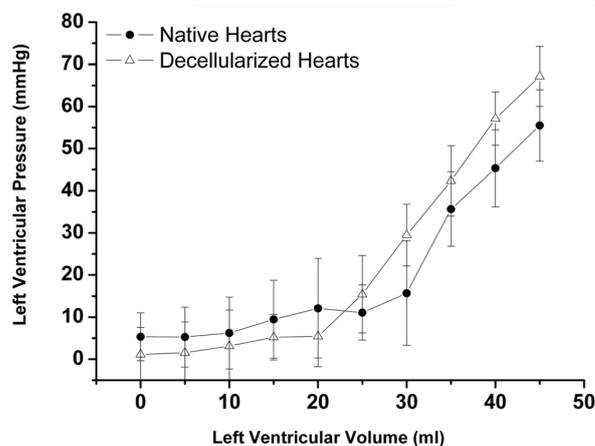


Figura 3.1: Dallo studio di Weymann et al.[26], questo grafico rappresenta i risultati delle misurazioni biomeccaniche, in termini di relazione pressione-volume ventricolare. I cuori decellularizzati presentano un comportamento biomeccanico affine a quello dei cuori nativi. Tutte i valori sono espressi come media  $\pm$ SEM

In conclusione il modello porcino, nonostante le numerose limitazioni associate all'anatomia e al sistema di conduzione, si conferma uno strumento estremamente valido nello studio dell'apparato cardiovascolare e delle sue patologie.

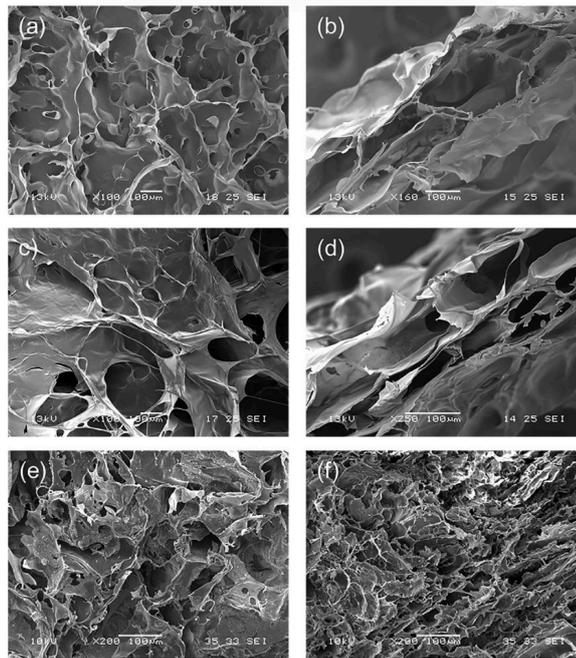


Figura 3.2: Microscopie SEM di: (a) superficie e (b) sezione trasversale della spugna AC; (c) superficie e (d) sezione trasversale di una spugna AG; (e) superficie e (f) sezione trasversale del miocardio porcino decellularizzato [1].

### 3.3 Analisi sulle proprietà della matrice ingegnerizzata

Nello studio di Rosellini et al.[1] vengono condotte alcune analisi sulle caratteristiche dello scaffold ottenuto, in particolare vengono effettuati: analisi sulla morfologia, analisi di spettroscopia infrarossa, test di rigonfiamento e analisi sulla proliferazione e sulla degradazione.

L'analisi sulla porosità e la morfologia dello scaffold è stata condotta tramite Microscopia Elettronica a Scansione (SEM, *Scanning Electron Microscope*), utilizzando un coating in oro, e le immagini sono state analizzate con il software ImageJ (*National Institute of Health*); infine, la percentuale di porosità è stata ottenuta calcolando il rapporto tra l'area ricoperta dai pori e l'area dello scaffold totale. Le superfici di entrambe le spugne (AC e AG) risultano strutturalmente omogenee, con pori adeguatamente interconnessi (figura 3.2(a)), simili a quelli del miocardio porcino decellularizzato (figura 3.2(e)); la sezione trasversale, invece, presenta pori di dimensioni minori nel tessuto nativo (figura 3.2(f)) rispetto al tessuto sintetico AC (figura 3.2(b)).

Le percentuali di porosità sono del 49% per le spugne AC, del 60% per le spugne AG e 13% per il tessuto nativo. La percentuale di porosità maggiore nel tessuto sintetico può essere considerata un vantaggio poiché favorisce la proliferazione, differenziazione e aggregazione cellulare grazie al trasporto facilitato di nutrienti nel tessuto; inoltre, un grado di porosità maggiore facilita la migrazione cellulare, permettendo di evitare il sovraccumulo di cellule [28].

Le analisi di imaging chimico a infrarossi sono state eseguite con un sistema di imaging a spettro spotlight 350 FT-NIR (*Fourier Transform - Near Infrared*) misurando l'attenuazione del riflesso totale con l'obiettivo di valutare l'omogeneità chimica e le interazioni a livello molecolare dei campioni di scaffold. I picchi di assorbimento degli scaffold AC e AG sono stati confrontati con i picchi di assorbimento del tessuto nativo; l'assorbimento rilevato da entrambe le tipologie scaffold suggerisce la formazione di legami idrogel tra proteine e polisaccaridi. Considerando 1 il valore che esprime un alto livello di omogeneità nel campione, sia il tessuto naturale che gli scaffold sintetici presentano valori prossimi all'unità. È stato in seguito calcolato il rapporto tra le quantità di polisaccaridi e quelle di proteine presenti nei vari campioni, ottenendo così un valore molto basso per i tessuti nativi, normalmente costituiti maggiormente da componenti proteici, e un valore maggiore, ma non ancora vicino all'unità, per gli scaffold sintetici. Negli scaffold AC il valore è maggiore rispetto agli scaffold AG, effetto probabilmente dovuto alla minor flessibilità del collagene e, di conseguenza, alla ridotta capacità di stabilire legami con l'alginato, portando ad un accumulo di polisaccaridi sulla superficie maggiore rispetto allo scaffold AG. Infine, la mappatura dei campioni è stata utilizzata per studiare la struttura secondaria delle proteine, tramite l'osservazione della deconvoluzione dell'ammide I. Gli scaffold AC presentano forme disordinate,  $\beta$ -piegamenti e  $\alpha$ -eliche, mentre gli scaffold AG presentano invece svariate  $\alpha$ -eliche, dovute probabilmente all'interazione tra le componenti polimeriche di questo tipo di scaffold, che hanno causato un riarrangiamento della struttura secondaria della gelatina.

I test di rigonfiamento sono stati svolti sottoponendo gli scaffold a vapore acqueo a 37°C. Il grado di rigonfiamento di ogni spugna è stato calcolato tramite la seguente formula:  $(W_s - W_d)/W_d \times 100$ , dove  $W_s$  e  $W_d$  sono i pesi rispettivamente al rigonfiamento e all'asciugatura dei campioni. Questo tipo di test è indice dell'idrofilia dello scaffold, fondamentale nei processi di adesione cellulare e di allargamento dei pori. Il tessuto che ha dimostrato maggiore idrofilia è stato il tessuto miocardico nativo, con un massimo di rigonfiamento dell'80%, seguito dagli scaffold AG (con un picco di rigonfiamento al 70%) e infine dagli scaffold AC (con un picco di rigonfiamento al 50%). La gelatina è, infatti, molto più idrofila del collagene.

I test della degradazione *in vitro* sono stati svolti valutando la perdita di peso degli scaffold in due contesti: in PBS, dove gli scaffold sono stati lasciati in ammollo per 75 giorni per valutare la degradazione idrofila, e in PBS con supplemento di collagenasi a 16 U/mL, per 10 giorni per la valutazione della degradazione enzimatica. La percentuale di peso perso è stata calcolata tramite la formula:  $(W_0 - W_t)/W_0 \times 100$ , dove  $W_0$  è il peso di partenza e  $W_t$  è il peso dello scaffold asciutto al tempo  $t$ . I test di degradazione idrofila sono risultati coerenti col test di rigonfiamento: la percentuale di peso rimasto è stata 88% per gli scaffold AC, meno idrofili rispetto agli scaffold AG, in cui la percentuale di peso rimanente è stata del 45%. I test di degradazione enzimatica

hanno permesso di confermare i risultati ottenuti in precedenza: la percentuale di peso rimanente negli scaffold AC è stata del 59%, mentre per gli scaffold AG è stata del 19%. La differenza così considerevole tra le degradazioni dei due scaffold è probabilmente dovuta al peso molecolare della gelatina degli scaffold AG, molto minore rispetto al collagene degli scaffold AC. Questi test hanno permesso di osservare che la degradazione in ambiente acquoso è sempre presente nonostante la presenza di crosslinking chimico.

Infine, per valutare la proliferazione e differenziazione cellulare sono stati analizzati l'elongazione dei filamenti di actina e il numero di nuclei per cellula. In merito alla proliferazione, i campioni sono stati osservati a 7 giorni dall'inseminazione, mostrando un livello di proliferazione maggiore sugli scaffold AG rispetto agli scaffold AC. Relativamente alla differenziazione, osservando gli scaffold dopo 5 giorni dall'inseminazione, la lunghezza dei filamenti di actina più lunghi e il maggior numero di nuclei per cellula sono stati osservati nella cultura sugli scaffold AG, la cui superiorità rispetto agli scaffold AC è stata confermata anche grazie ad altre analisi morfologiche, fisicochimiche e funzionali. Una possibile spiegazione a questo fenomeno risiede nelle interazioni molecolari tra la gelatina e i componenti polisaccaridici: la gelatina, avendo un peso molecolare medio minore rispetto al collagene, è più flessibile nell'interazione con l'alginato e permette, pertanto, la formazione di legami più stabili. Inoltre, la conformazione acquisita dalla gelatina dopo l'interazione con l'alginato è molto più simile al collagene non fibrillare, il cui contributo è fondamentale nella crescita dei tessuti ingegnerizzati.

### **3.4 Caratterizzazione meccanica dello scaffold**

Alcune delle funzioni più importanti svolte dalla ECM in TE sono quelle di supporto geometrico e meccanico del tessuto biologico, in particolare, la ECM deve costituire una base adeguata alla crescita di un tessuto che simuli il più accuratamente possibile il comportamento meccanico del tessuto originale. La ECM ricopre, infatti, un ruolo fondamentale nella creazione di un tessuto meccanicamente funzionale. Una delle maggiori sfide riscontrate dalla ricerca nell'ambito della TE è proprio la difficoltà nel creare un tessuto che esibisca un comportamento corrispondente a quello del tessuto nativo. Questo tipo di complicazioni sono riscontrate particolarmente nel caso in cui il tessuto da sostituire fosse non lineare e altamente anisotropo e, di conseguenza, richiedesse una caratterizzazione biomeccanica più specifica e varia, come il tessuto miocardico [29].

#### **3.4.1 Comportamento meccanico del tessuto cardiaco sano**

Il miocardio è un tessuto a carattere altamente anisotropo, con una struttura estremamente complessa e organizzata, il cui comportamento meccanico è conseguenza dell'orientamento delle

fibre e dei contributi di tutti i costituenti principali della ECM. Fenomeni come l'aumento di fluido extracellulare (dovuto alla porosità dello scaffold) e l'attrito tra le molecole possono influenzare le proprietà del tessuto. Nello specifico, il comportamento meccanico del tessuto è dovuto alla somma dei contributi dei singoli componenti: vari studi sperimentali hanno dimostrato che le proteine più abbondanti nei sarcomeri presentano carattere viscoelastico [30][10]. Grazie a questi studi, nonostante il miocardio fosse inizialmente stato caratterizzato come un tessuto iperelastico, ad oggi è possibile descriverlo tramite un modello costitutivo viscoelastico poiché il comportamento è rappresentato più accuratamente.

Uno dei modelli più semplici ed efficaci per la descrizione delle prove di stress relaxation e di creep è descritto da Nordsletten et al.[9], che presenta un nuovo modello viscoelastico per la caratterizzazione meccanica del miocardio. Inizialmente, viene usato un modello Zener, costituito da un ramo di Maxwell posto in parallelo ad una molla, come descritto nel paragrafo 1.2. In questo caso lo stress totale percepito può essere scritto come:

$$\sigma(t) = \sigma_0^e + \int_0^t B \exp((s-t)/\tau) \dot{\sigma}_0^e(s) ds \quad (3.1)$$

Dove  $\sigma_0^e(t) = E_0 \varepsilon(t)$  indica lo stress percepito dal ramo elastico,  $\tau = (E/\eta)^{-1}$  è il tempo di rilassamento,  $B = E/E_0$  è il peso di rilassamento e  $E$  e  $\eta$  sono il modulo elastico e il modulo di viscosità del ramo di Maxwell, rispettivamente. Nel modello indicato, la risposta elastica è rappresentata dalla prima parte dell'equazione, mentre la seconda parte dell'equazione rappresenta la risposta viscoelastica: l'integrale indica che il comportamento viscoelastico è dovuto alla somma dei singoli componenti del tessuto. Per estendere la validità di questo modello a materiali non lineari (come il miocardio), si sostituisce la risposta elastica con la sua variante iperelastica non lineare  $\mathbf{S}_e$ . Inoltre, si adatta il modello prendendo in considerazione i molteplici tempi di rilassamento dovuti alla molteplicità di fibrille di collagene che competono al movimento. Infine, per aggiustare il modello, si considera la variante non lineare del modello di Maxwell generalizzato, nel quale è presente un numero  $n$  di rami viscoelastici in parallelo, che rappresentano gli  $n$  contributi delle fibrille; la somma di questi contributi viene espressa tramite un integrale. A causa dell'elevato numero di fibrille, per scrivere il modello costitutivo è più conveniente adottare un metodo frazionato (viscoelasticità frazionata, VE). Partendo dal modello viscoelastico precedente si ottiene:

$$\mathbf{S}(t) = \mathbf{S}_e(t) + B_0 D_t^\alpha \mathbf{S}_e + \mathbf{S}_p(t) \quad (3.2)$$

dove

$$D_t^\alpha g = \frac{1}{\Gamma(1-\alpha)} \int_0^t (t-s)^{-\alpha} \dot{g}(s) ds, \quad \alpha \in [0,1] \quad (3.3)$$

Concettualmente, il modello VE è rappresentato con uno spettro di rilassamento continuo, modulato da  $\alpha$ , che riduce la complessità e il numero di parametri richiesti dalla risposta del materiale. Su una scala microscopica, in questo modo, la frizione tra molecole comporta tempi di rilassamento relativamente bassi; mentre, su una scala maggiore, i tempi di rilassamento aumentano poiché gli agglomerati che creano attrito sono di maggiore ingombro. Il modello VE esemplifica adeguatamente la media di questi due fenomeni. Generalizzando la struttura dell'equazione 3.2 si ottiene:

$$\mathbf{S}(t) = \mathbf{S}_e(t) + \mathbf{S}^*(t) + \mathbf{S}_p(t), \quad \mathbf{S}^*(t) + \delta D_t^\alpha \mathbf{S}^* = D_t^\alpha \mathbf{S}_v \quad (3.4)$$

dove  $\mathbf{S}_v$  denota la risposta viscoelastica non lineare,  $\mathbf{S}_e$  denota la risposta elastica e  $\mathbf{S}^*$  è la soluzione all'equazione differenziale, in cui  $\delta > 0$  indica la dipendenza dalla storia di deformazione.

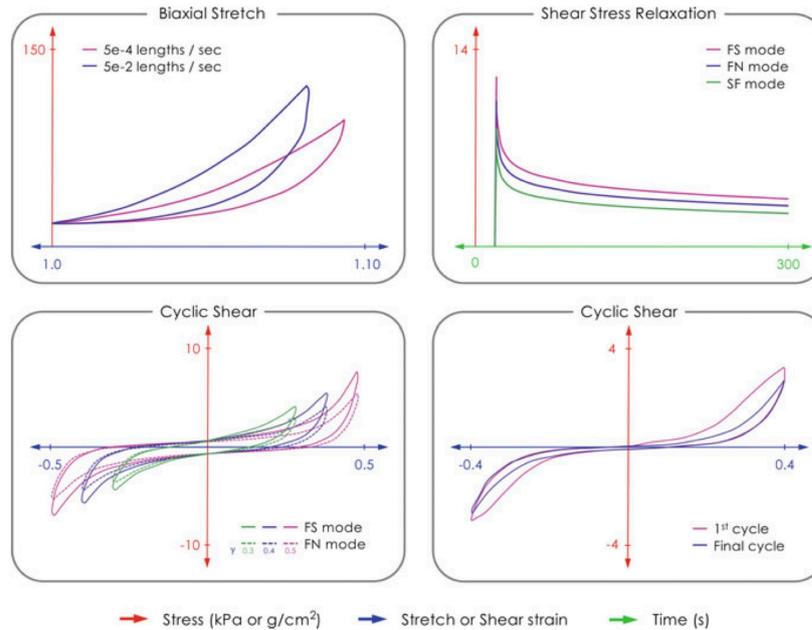


Figura 3.3: Illustrazione dei test reologici nei tessuti miocardici. (In alto a sinistra) Rappresentazione dei dati del test biassiale eseguito sul miocardio canino a diverse frequenze. (In alto a destra) Rappresentazione della prova di stress relaxation trasversale nel miocardio umano per diverse orientazioni microstrutturali. (In basso a sinistra) Rappresentazione dei test di tensione di taglio ciclico nel miocardio umano per diverse orientazioni microstrutturali. (In basso a destra) Rappresentazione dei test di tensione di taglio ciclico nel miocardio suino[31].

Il modello VE riflette la gerarchia strutturale del miocardio, tenendo in considerazione i tempi di rilassamento delle fibrille e i diversi comportamenti che portano alla dissipazione viscosa. Questo modello interpreta opportunamente il comportamento del tessuto: nella prova di rilassamento rappresenta l'iniziale picco e il successivo decadimento, e anche nelle prove

cicliche di tensione di taglio e allungamento biassiale riproduce la non linearità in modo affidabile. Nello studio di Nordsletten et al.[9] il modello VE viene poi confrontato con altri modelli precedentemente in auge, in particolare quello di Holzapfel-Ogden [32] e quello di Costa (entrambi descritti nella review condotta da Avazmohammadi et al. [12]), dimostrando evidente superiorità nella descrizione del comportamento meccanico del miocardio. Da ultimo, il modello VE viene valutato in relazione a dati sperimentali, permettendo di confermare l'affidabilità nella riproduzione delle misure sperimentali e anche nella predizione di ulteriori misurazioni 3.3.

Un altro studio condotto da Ramadan et al.[33], riporta le analisi sperimentali condotte su campioni di miocardio porcino e ovino. Ramadan rileva un modulo elastico (rappresentazione dell'elasticità statica di un materiale) del cuore porcino entro un range di 0.012-0.198 MPa, denotando la deformabilità del tessuto; il tan delta (rappresentazione del livello al quale un materiale dissipa l'energia oscillatoria), invece, resta pressoché costante durante l'analisi dinamica, indicando che il modulo elastico e il modulo di perdita aumentano proporzionalmente. Anche tramite le analisi sperimentali condotte in questo studio è possibile concludere la natura viscoelastica del tessuto muscolare cardiaco e la sua anisotropia dovuta all'orientazione delle fibre muscolari.

### **3.4.2 Comportamento meccanico del tessuto cardiaco in seguito a infarto miocardico**

In seguito all'infarto miocardico sono riconoscibili quattro fasi principali di evoluzione del tessuto muscolare cardiaco: la fase acuta, durante la quale la mancanza di apporto di ossigeno impedisce al sarcomero di compiere movimenti meccanici attivi, la necrosi, in cui si ha la morte delle cellule cardiache, la fase fibrotica, in cui vengono prodotte nuove fibre ordinate di collagene, e la fase di rimodellamento, ovvero la stabilizzazione del tessuto cicatrizzato [31]. In particolare, durante la fase fibrotica si ha un aumento nella deposizione di fibre allineate di collagene: questo meccanismo è dovuto alla necessità di sostituire i cardiomiociti necrotici. Il collagene prodotto in questa fase è principalmente di tipo I e la disposizione delle fibre, assieme all'addensamento della ECM, causa l'incremento della rigidità del tessuto infartuato e l'assottigliamento della parete ventricolare. Quest'ultimo fenomeno provoca la diminuzione del lavoro della parete e delle tensioni sviluppate nelle zone adiacenti al sito infartuato; si ha, pertanto, il rallentamento del processo di rimodellamento. Ciò implica il verificarsi di disfunzioni diastoliche e compromissione delle funzioni sistoliche, dovute all'accoppiamento meccanico ed elettrico delle regioni infartuate e le regioni sane.

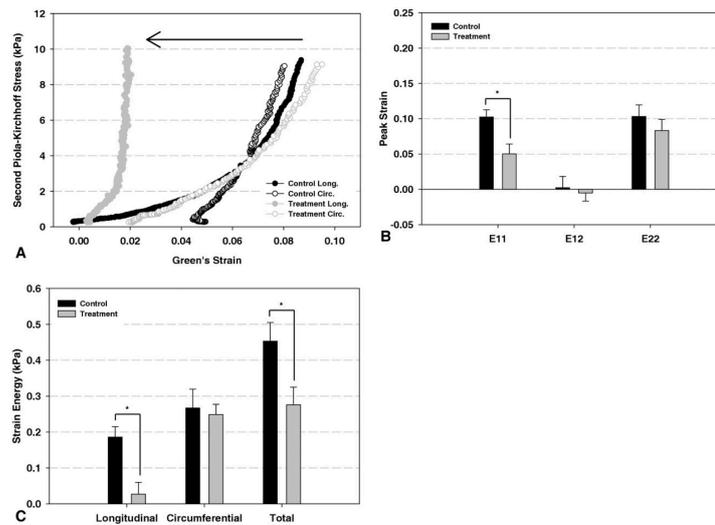


Figura 3.4: Rappresentazione dei test meccanici del tessuto infartuato. (A) Grafici rappresentativi sforzo-deformazione dei campioni provenienti da entrambi i gruppi (di controllo e di trattamento). (B) La deformazione massima e (C) l'energia di deformazione massima sono riportate per tutti i gruppi. La deformazione longitudinale massima ( $E_{11}$ ) e l'energia di deformazione totale sono risultate significativamente inferiori nel gruppo di trattamento rispetto ai controlli. Come per i dati della deformazione media massima, le energie di deformazione direzionali erano isotrope nel gruppo di trattamento e anisotrope nel gruppo di controllo. ( $E_{22}$  deformazione circonferenziale;  $E_{12}$  deformazione di taglio longitudinale-circonferenziale) [34].

Nello studio di Brazile et al.[35] è possibile ritrovare delle informazioni sperimentali sul comportamento meccanico della ECM miocardica infartuata, in seguito a prove di trazione biasiale sotto carichi fisiologicamente rilevanti, svolte nella direzione longitudinale e circonferenziale. Innanzitutto, Brazile nota che l'anisotropia complessiva della ECM non cambia sostanzialmente dopo l'infarto. Sulla direzione longitudinale si ha una tendenza all'irrigidimento della ECM, che causa una maggiore difficoltà nel movimento di estensione. Sulla direzione circonferenziale, invece, non è stato notato alcun andamento specifico. Complessivamente, si nota un indurimento generale della ECM durante la fase acuta, in particolare sulla direzione longitudinale, dove si perde progressivamente estensibilità, come è visibile dai grafici in figura 3.4. Questo fenomeno è dovuto ad alterazioni strutturali durante la progressione dell'infarto: nella fase fibrotica, infatti, l'accumulo ordinato di fibre di collagene di tipo I aumenta la densità e l'ordine nella ECM, portando alla compromissione del comportamento anisotropo generale. Complessivamente, il tessuto miocardico infartuato presenta un comportamento meccanico viscoelastico nel quale le caratteristiche elastiche sono meno pronunciate a causa dell'addensamento delle fibre di collagene nel tessuto cicatrizzato.

Esistono vari modelli matematici che descrivono il rimodellamento del tessuto dopo l'infarto miocardico e sono raccolti nella review di Li et al.[36] e nello studio di Sàez [37], ma ancora non è presente un modello specifico che simuli il comportamento viscoelastico del miocardio

infartuato e, in particolare, delle zone cicatrizzate. La risposta meccanica all'applicazione di tensione al tessuto cicatrizzato è, infatti, non lineare e analiticamente complicata da descrivere (figura 3.5). Inoltre, i dati sperimentali di cui la ricerca dispone sono tutti animali e raccolti in seguito ad infarto miocardio indotto tramite tecniche specifiche: a questo proposito, non è possibile affermare che la struttura fibrosa del collagene depositato dopo un infarto indotto artificialmente sia la stessa che si presenta in seguito ad un infarto dovuto a cause naturali.

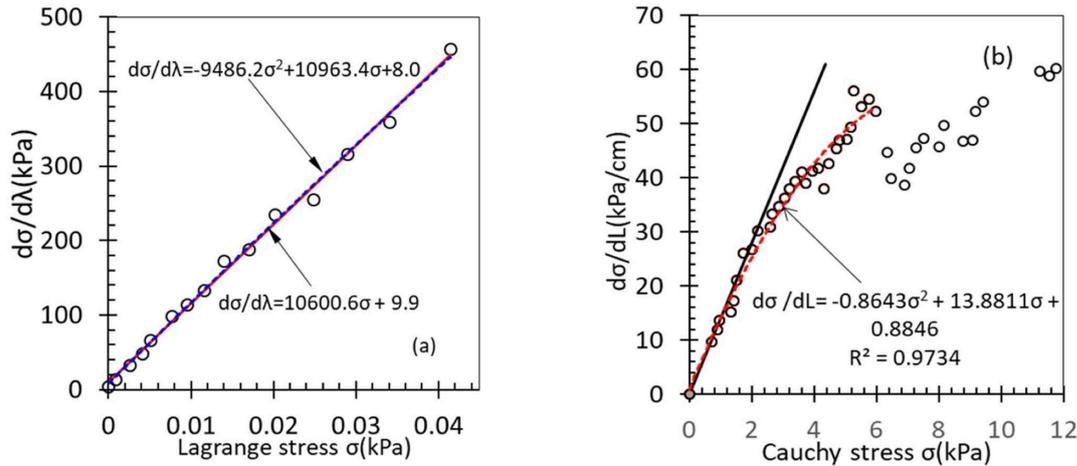


Figura 3.5: Dati sperimentali e curve adattate tensione-allungamento o lunghezza  $d\sigma/d\varepsilon$ ,  $d\sigma/dL$  in termini di stress  $\sigma$ ; (a) mesentere di rana, (b) parete del ventricolo sinistro di rana; a due giorni dall'infarto miocardico [36].

In conclusione, nonostante non esistano modelli affermati per la descrizione del comportamento meccanico del miocardio infartuato, esistono molteplici studi sperimentali che ne descrivono quantitativamente la risposta meccanica e che indagano il rimodellamento strutturale delle fibre di collagene. Ogni informazione aggiuntiva è indispensabile alla comprensione delle dinamiche in atto nel tessuto miocardico danneggiato ed è essenziale alla comunità scientifica nella ricerca di terapie efficaci.

### 3.4.3 Osservazioni sulla meccanica della matrice ingegnerizzata

Una delle sfide più impegnative della TE è riprodurre il tessuto artificiale in modo che le proprietà meccaniche di quest'ultimo siano compatibili con quelle del tessuto nativo. La risposta meccanica complessiva è conseguenza della composizione e della struttura del tessuto e delle caratteristiche dell'ambiente nel quale è immerso.

Nello studio di Rosellini et al.[1], la caratterizzazione meccanica degli scaffold sintetici è stata condotta mediante l'analisi dinamico-meccanica (DMA8000, Perkin-Elmer<sup>TM</sup>, Waltham, MA). Gli scaffold sono stati tagliati in strisce rettangolari e lo spessore considerato è stato ot-

tenuto dalla media degli spessori misurati in cinque tratti del campione. I campioni sono stati equilibrati per 3h in PBS a 37°C e, poiché devono sopravvivere e operare all'interno dell'ambiente biologico, le analisi sono state svolte in condizioni di campioni bagnati. La caratterizzazione degli scaffold è stata svolta anche in configurazione piegata con la modalità cantilever. Lo studio è stato condotto tramite un test di trazione uniassiale, a diverse frequenze: 1 Hz (60 bpm) per simulare la frequenza cardiaca sana, 3.5 Hz (210 bpm) per simulare la frequenza cardiaca patologica e a 10 Hz come condizione di fatica. I test sono stati svolti sugli scaffold AG, AC e sul tessuto miocardico nativo porcino, e le valutazioni finali sono state condotte tramite il confronto dei risultati di ciascuna tipologia di campione.

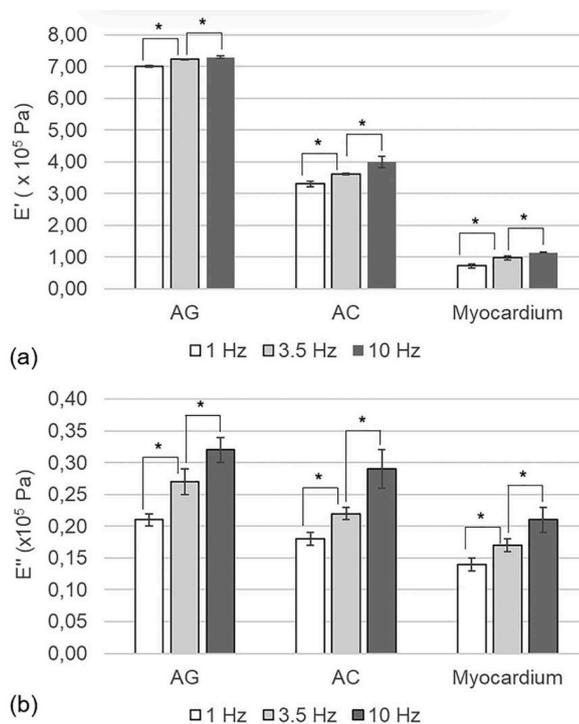


Figura 3.6: (a) Modulo di stoccaggio ( $E'$ ) e (b) modulo di perdita ( $E''$ ) delle sugna AG, AC e tessuto miocardico decellularizzato, misurati con DMA (*Dynamic Mechanical Analysis*) a frequenze diverse (1, 3.5 e 10 Hz)[1].

Per tutti i campioni analizzati l'innalzamento della frequenza ha causato un aumento sia del modulo elastico (*storage modulus*,  $E'$ ), che del modulo viscoso (*loss modulus*,  $E''$ ); per tutti i campioni  $E''$  è risultato minore rispetto a  $E'$ , indicando un comportamento prevalentemente elastico, in accordo con le proprietà discusse nella sezione 3.4.1. In aggiunta, i valori di  $E'$  e  $E''$  degli scaffold sintetici sono risultati maggiori rispetto allo scaffold nativo; entrambi i moduli hanno assunto valori più alti per gli scaffold AG rispetto a quelli AC, risultato dovuto probabilmente alla natura delle interazioni tra i componenti proteici e polisaccaridici nelle spugne AG, in accordo con le analisi a infrarossi. È stato confermato [34] che l'irrigidimento del tessuto

miocardico in seguito al rimodellamento può portare a vantaggi significativi: l'irrigidimento e inspessimento della parete ventricolare comporta stress meccanico ridotto nella regione infartuata e dovrebbe ridimensionare l'espansione del rimodellamento ad altre zone del tessuto. Per questo motivo, ottenere degli scaffold sintetici che siano più rigidi rispetto al tessuto nativo potrebbe comportare proprietà sensibilmente vantaggiose.

In conclusione, entrambi gli scaffold sviluppati da Rosellini et al.[1], in particolare gli scaffold AG, presentano caratteristiche favorevoli al miglioramento del tessuto finale, attraverso la riduzione dello stress di parete.

# Capitolo 4

## Bioreattori in ingegneria tessutale

La creazione di un tessuto biologico richiede la crescita efficiente di varie tipologie cellulari su scaffold tridimensionali. Per ottenere ciò è necessario utilizzare un bioreattore adeguato. I bioreattori permettono di mantenere uniforme la concentrazione cellulare sullo scaffold attraverso il controllo dei parametri microambientali e asettici, permettono l'agevolazione del trasferimento di massa e consentono di ottenere una produzione più efficiente e ripetibile dei tessuti ingegnerizzati.

### 4.1 Introduzione generale sui bioreattori

I bioreattori in TE devono contribuire a creare un ambiente biochimico e biomeccanico che regoli il trasporto di sostanze nutritive e ossigeno alle cellule e che controlli la produzione e l'accumulo di metaboliti dalle cellule stesse. Per la costruzione di un bioreattore funzionale alla tipologia di tessuto che si vuole ingegnerizzare, è necessario tenere conto di alcuni importanti parametri: il trasferimento di massa attraverso il bioreattore, la stimolazione meccanica e la stimolazione elettrica. Salehi-Nik et al.[38] elencano e spiegano i parametri fondamentali per la costruzione dei bioreattori e dei modelli matematici per il monitoraggio del tessuto in crescita.

Uno degli ostacoli maggiori nella realizzazione dei bioreattori è la regolazione del trasporto delle sostanze nutritive e dell'ossigeno; la maggior parte dei tessuti ingegnerizzati è, infatti, di dimensioni ridotte a causa della singola azione della diffusione come meccanismo di trasporto di nutrienti. La distribuzione di sostanze è fondamentale per garantire la sopravvivenza del tessuto *in vitro*, specialmente quando la coltura cellulare vi permane per lungo tempo. Il trasferimento di massa interno (ovvero alle cellule più centrali) dipende dalla struttura e dalla porosità dello scaffold, ma anche dalle dimensioni di cellule e matrice e dal coefficiente di diffusione del biomateriale. Per questo motivo è cruciale sviluppare un design dello scaffold adeguato al trasporto diffusivo e convettivo; per esempio, ricreare un flusso laminare nel bioreattore permetterebbe

di nutrire tessuti di dimensioni anche elevate. Anche il trasporto dell'ossigeno è primario per la sopravvivenza del tessuto *in vitro*: in questo caso gli aspetti da tenere in considerazione sono la scarsa solubilità dell'ossigeno nel mezzo di coltura cellulare, la necessità di mantenere l'equilibrio tra l'apporto e il consumo di ossigeno delle cellule e la diversa richiesta del gas in diverse fasi della crescita del tessuto.

La stimolazione meccanica è un parametro estremamente importante in quanto ha un impatto diretto sulla sopravvivenza e le funzionalità delle cellule. Molte tipologie cellulari nei mammiferi sono, infatti, reattive alle tensioni di taglio che permettono di indurre la secrezione di fattori biologici.

Infine, la stimolazione elettrica è particolarmente rilevante nell'ingegnerizzazione di tessuti cardiaci: è stato dimostrato che onde elettriche con profili ad impulsi rettangolari alla frequenza di 1 Hz e potenza di 5 V/cm possono indurre proprietà contrattili nei costrutti ingegnerizzati cardiaci.

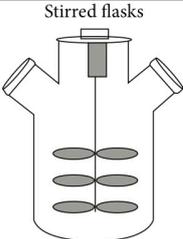
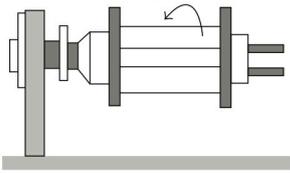
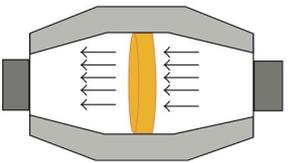
Bioreactor type	General descriptions	Mass transfer mechanism	Shear stress	Special usage	Tissue	Considerations
Static culture	Batch culture with no flow of nutrient	Diffusion (high)	Very low	Cell proliferation	—	Homogeneous structure of cell constructs and nutrient diffusion limitations
 <p>Stirred flasks</p>	Magnetically stirring of medium	Convection (high)	High	Dynamic seeding of scaffolds	Cartilage	Appropriate scaffold and balance between increasing mass transfer and modulating shear stresses
 <p>Rotating wall</p>	Rotating at a speed so the constructs in the reactor are maintained "stationary" in a state of continuous free fall	Convection (high)	Low	Tissue constructs which need dynamic laminar flow	Cartilage, bone and skin	Operating conditions (e.g., speed of rotating) especially for growing large tissue mass
 <p>Perfusion</p>	Flow of medium over or through a cell population or bed of cells	Convection (moderate) and diffusion (high)	Moderate	Tissues physico-chemically and environmentally relevant to human tissues	Epithelial cells, intestinal, bone, cartilage, and arteries	Seeding and attachment of human cells especially within the scaffold body

Figura 4.1: Confronto di parametri ingegneristici in diverse tipologie di bioreattore [38]

In figura 4.1 è possibile osservare il confronto dei parametri nominati per diverse tecniche di costruzione di bioreattori.

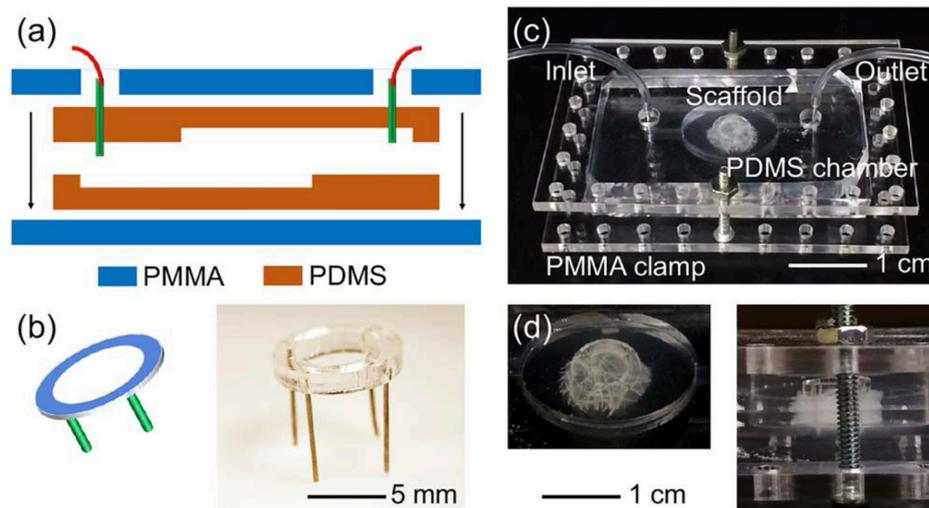


Figura 4.2: (a) diagramma schematico della struttura di un bioreattore cardiaco microfluidico. (b) rappresentazione schematica e fotografica che mostra dell'unità di supporto dello scaffold. (c,d) fotografie che mostrano un bioreattore assemblato e visuale ingrandita della camera che racchiude lo scaffold [1]

## 4.2 Bioreattore utilizzato

Nello studio di Rosellini et al.[1] vengono utilizzati due tipi di bioreattori e le colture cellulari sviluppatasi all'interno di uno e dell'altro vengono poi messe a confronto. Sono stati utilizzati un bioreattore statico e uno dinamico.

### 4.2.1 Morfologia e costruzione del bioreattore

Gli scaffold sono stati tagliati in dischi del diametro di 10 mm e dello spessore di 2 mm; le cellule sono state trattate nel mezzo di coltura DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's Medium*) e in un siero fetale di bovino al 10% (FBS, *Fetal Bovine Serum*). Le cellule sono poi state impiantate negli scaffold AG versando 30  $\mu\text{L}$  di mezzo di coltura, che ha immediatamente perfuso lo scaffold attraverso le porosità.

Il bioreattore, visibile in figura 4.2(c,d), è stato realizzato accoppiando due piastre in PDMS (polidimetilsilossano), che sono state successivamente perforate all'ingresso e all'uscita per permettere il passaggio di connettori metallici e tubi in Teflon. Per evitare ulteriori perdite il dispositivo in PDMS è stato fissato all'interno di due lastre in PMMA (polimetilmetacrilato), tenute insieme da quattro viti e bulloni. Sul fondo della camera del bioreattore è stato fissato un supporto su misura costituito da un anello in PMMA e quattro gambe metalliche, figura 4.2(b), per immobilizzare lo scaffold e impedire che il flusso di liquido lo comprometta. Il bioreattore è stato, infine, riempito con il mezzo di coltura e i tubi all'ingresso e all'uscita sono stati connessi

ad un circuito chiuso. Il liquido nutritivo è stato fatto circolare grazie a una pompa peristaltica, con una velocità di 200  $\mu\text{L}/\text{h}$ .

Il bioreattore appena descritto rientra nella categoria dei bioreattori microfluidici (MFB), che combinano caratteristiche vantaggiose dei bioreattori statici e delle piattaforme di maggiori dimensioni per la coltura commerciale, come il monitoraggio del microambiente. I MFB sono soluzioni a costo minore e personalizzate per ogni studio, che forniscono un'ampia gamma di possibilità in termini di geometria, dinamicità della piattaforma e applicazioni specializzate. Alcuni vantaggi di questo tipo di bioreattore sono: la possibilità di regolare i parametri del microambiente cellulare, il miglioramento della qualità delle colture che garantisce uno sviluppo uniforme, l'agevolazione della differenziazione cellulare specifica e la minimizzazione di eventuali disomogeneità; infine, i MFB permettono di simulare le condizioni fisiologiche e indagare le risposte cellulari a stimoli diversi [39].

In genere un bioreattore MFB garantisce il trasporto di volumi di fluidi attraverso le camere di coltura tramite tubi e pompe, che generano un flusso laminare per regolare e monitorare costantemente il trasporto di nutrienti [39].

Alcune limitazioni nell'utilizzo dei MFB sono il tempo di costruzione, in quanto i MFB di maggiori dimensioni presentano strutture complesse, e il fatto che alcuni dei materiali utilizzati possono non essere perfettamente biocompatibili, degradandosi nel tempo e/o inducendo l'assorbimento di molecole indesiderate. Questi fattori possono compromettere la coltura cellulare e richiedere tempi lunghi per la pulizia e la sterilizzazione dei campioni, oltre che procedure costose [39].

#### **4.2.2 Valutazione finale del bioreattore utilizzato**

Le cellule sono state coltivate per 3 giorni in condizioni statiche e successivamente suddivise tra il bioreattore MFB e quello statico. La coltura è stata poi valutata dopo 14 giorni e, sebbene in entrambi i casi ci fosse una percentuale di sopravvivenza delle cellule, nel bioreattore statico la percentuale di cellule vive è calata drasticamente. Diversamente, nel bioreattore dinamico la maggior parte delle cellule sono rimaste vive grazie al trasporto di sostanze nutritive.

Questi risultati confermano ulteriormente l'importanza di un ambiente dinamico che garantisca apporto di sostanze nutritive ed eliminazione di metaboliti e sostanze di scarto per la sopravvivenza delle cellule in coltura.

In conclusione, è possibile affermare che gli scaffold AG affiancati da un ambiente dinamico costituiscono dei validi supporti per la crescita cellulare nel contesto della TE.

# Conclusioni

L'infarto miocardico è una patologia che, attraverso il danneggiamento del tessuto muscolare cardiaco e della ECM, provoca un elevato rischio di mortalità e il peggioramento della qualità di vita nei pazienti che vi sopravvivono. Le soluzioni maggiormente in uso, quali trapianto di cuore e l'impianto di VAD, non sono sempre attuabili e, per questo motivo, la ricerca si sta orientando nella direzione dell'ingegneria tessutale. Questa pratica si propone di ricreare artificialmente i tessuti biologici, tramite l'utilizzo di cellule staminali o specifiche e creando scaffold temporanei sostitutivi alla ECM.

Una delle sfide che mettono più in difficoltà la ricerca è quella di riuscire a ricreare tessuti che presentino un comportamento fisiologico e meccanico compatibile con il tessuto nativo. Le caratteristiche meccaniche e morfologiche sono conseguenza diretta della composizione e della struttura del tessuto artificiale, parametri che ricadono principalmente sulla ECM che ospita le cellule in coltura. Di conseguenza è fondamentale produrre scaffold che favoriscano adeguatamente la proliferazione, la differenziazione e la crescita delle cellule per il tessuto che si vuole realizzare.

In questa tesi è stato preso in esame lo studio di Rosellini et al.[1], in cui vengono realizzate due tipologie di scaffold composti da alginato e collagene (AC) e alginato e gelatina (AG). Nello studio vengono svolti vari test sui due scaffold per constatarne le caratteristiche e valutarne i vantaggi; gli scaffold sono poi stati confrontati anche con dei campioni di tessuto nativo proveniente dal miocardio porcino decellularizzato, cosicché si potesse confrontare le proprietà dei due scaffold con un tessuto nativo generalmente biocompatibile con il tessuto umano.

In conclusione, è emersa la superiorità degli scaffold AG in quanto favoriscono maggiormente l'adesione cellulare, la crescita e la differenziazione in ambiente statico e soprattutto in ambiente dinamico (in un bioreattore MFB). Gli scaffold AG hanno, inoltre, mostrato maggiore congruenza con il tessuto nativo, oltre al miglioramento di alcune caratteristiche di quest'ultimo. Questo risultato può essere dovuto alle interazioni molecolari generate tra alginato e gelatina, emerse molto più forti rispetto ai legami creati tra alginato e collagene. Per questi motivi gli scaffold AG sono stati considerati delle valide opzioni in ingegneria tessutale cardiaca. In seguito allo studio di Rosellini sono state condotte ulteriori ricerche per attestare la validità e

l'applicabilità dell'ingegneria tessutale anche *in vivo*; la ricerca si muove velocemente in questo ambito e negli ultimi anni sono stati eseguiti i primi impianti *in vivo*, che hanno permesso il consolidarsi di questa pratica nel contesto clinico.

# Bibliografia

- [1] E. Rosellini, Y. S. Zhang, B. Migliori et al., «Protein/polysaccharide-based scaffolds mimicking native extracellular matrix for cardiac tissue engineering applications,» *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 106, n. 3, pp. 769–781, 2018. doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36272>. indirizzo: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.a.36272>.
- [2] «Cardiovascular Diseases (CVDs).» (), indirizzo: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
- [3] S. Boateng e T. Sanborn, «Acute myocardial infarction.» *Disease-a-month: DM*, vol. 59, n. 3, pp. 83–96, 2013. doi: [10.1016/j.disamonth.2012.12.004](https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2012.12.004). indirizzo: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23410669/>.
- [4] S. Johansson, A. Rosengren, K. Young e E. Jennings, «Mortality and morbidity trends after the first year in survivors of acute myocardial infarction: a systematic review,» *BMC cardiovascular disorders*, vol. 17, pp. 1–8, 2017. doi: [10.1186/s12872-017-0482-9](https://doi.org/10.1186/s12872-017-0482-9). indirizzo: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28173750/>.
- [5] R. K. Iyer, L. L. Chiu, L. A. Reis e M. Radisic, «Engineered cardiac tissues,» *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 22, n. 5, pp. 706–714, 2011, Tissue, cell and pathway engineering, issn: 0958-1669. doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.04.004>. indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166911000668>.
- [6] N. K. Karamanos, A. D. Theocharis, Z. Piperigkou et al., «A guide to the composition and functions of the extracellular matrix,» *The FEBS Journal*, vol. 288, n. 24, pp. 6850–6912, 2021. doi: <https://doi.org/10.1111/febs.15776>. indirizzo: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/febs.15776>.
- [7] A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli e N. K. Karamanos, «Extracellular matrix structure,» *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 97, pp. 4–27, 2016, Extracellular Matrix (ECM) and ECM-like materials: Therapeutic Tools and Targets in Cancer Treatment,

issn: 0169-409X. doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>. indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X15002574>.

- [8] I. G. Lunde, K. B. Rypdal, S. Van Linthout, J. Diez e A. González, «Myocardial fibrosis from the perspective of the extracellular matrix: Mechanisms to clinical impact,» *Matrix Biology*, vol. 134, pp. 1–22, 2024, issn: 0945-053X. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2024.08.008>. indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0945053X24001100>.
- [9] D. Nordsletten, A. Capilnasiu, W. Zhang et al., «A viscoelastic model for human myocardium,» *Acta Biomaterialia*, vol. 135, pp. 441–457, 2021, issn: 1742-7061. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.08.036>. indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706121005699>.
- [10] Z. L. Shen, H. Kahn, R. Ballarini e S. J. Eppell, «Viscoelastic Properties of Isolated Collagen Fibrils,» *Biophysical Journal*, vol. 100, n. 12, pp. 3008–3015, 2011, issn: 0006-3495. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.04.052>. indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349511005625>.
- [11] R. Avazmohammadi, J. S. Soares, D. S. Li, S. S. Raut, R. C. Gorman e M. S. Sacks, «A contemporary look at biomechanical models of myocardium,» *Annual review of biomedical engineering*, vol. 21, n. 1, pp. 417–442, 2019. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-062117-121129>. indirizzo: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31167105/>.
- [12] R. Avazmohammadi, J. S. Soares, D. S. Li, S. S. Raut, R. C. Gorman e M. S. Sacks, «A contemporary look at biomechanical models of myocardium,» *Annual review of biomedical engineering*, vol. 21, n. 1, pp. 417–442, 2019. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-062117-121129>. indirizzo: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6626320/>.
- [13] A. J. Wilson, G. B. Sands, I. J. LeGrice, A. A. Young e D. B. Ennis, «Myocardial mesostructure and mesofunction,» *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 323, n. 2, H257–H275, 2022, PMID: 35657613. doi: [10.1152/ajpheart.00059.2022](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00059.2022). eprint: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00059.2022>. indirizzo: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00059.2022>.
- [14] K. Thygesen, J. S. Alpert, A. S. Jaffe et al., «Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018),» *Circulation*, vol. 138, n. 20, e618–e651, 2018. doi: [10.1161/CIR.0000000000000617](https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000617). eprint: <https://www.ahajournals.org/doi/pdf/10.1161/CIR.0000000000000617>. indirizzo: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/CIR.0000000000000617>.

- [15] M. Algoet, S. Janssens, U. Himmelreich et al., «Myocardial ischemia-reperfusion injury and the influence of inflammation,» *Trends in Cardiovascular Medicine*, vol. 33, n. 6, pp. 357–366, 2023, issn: 1050-1738. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2022.02.005>. indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050173822000299>.
- [16] J. Yap, H. A. Cabrera-Fuentes, J. Irei, D. J. Hausenloy e W. A. Boisvert, «Role of Macrophages in Cardioprotection,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, n. 10, 2019, issn: 1422-0067. doi: 10.3390/ijms20102474. indirizzo: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/10/2474>.
- [17] Y. Zhao, N. T. Feric, N. Thavandiran, S. S. Nunes e M. Radisic, «The Role of Tissue Engineering and Biomaterials in Cardiac Regenerative Medicine,» *Canadian Journal of Cardiology*, vol. 30, n. 11, pp. 1307–1322, 2014, issn: 0828-282X. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2014.08.027>. indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0828282X14013439>.
- [18] P. Hassanzadeh, F. Atyabi e R. Dinarvand, «Tissue engineering: Still facing a long way ahead,» *Journal of Controlled Release*, vol. 279, pp. 181–197, 2018, issn: 0168-3659. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.04.024>. indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365918302086>.
- [19] M. L. Tomov, C. J. Gil, A. Cetnar et al., «Engineering functional cardiac tissues for regenerative medicine applications,» *Current cardiology reports*, vol. 21, pp. 1–13, 2019. doi: 10.1007/s11886-019-1178-9. indirizzo: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7153535/>.
- [20] M. Tamimi, S. Rajabi e M. Pezeshki-Modaress, «Cardiac ECM/chitosan/alginate ternary scaffolds for cardiac tissue engineering application,» *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 164, pp. 389–402, 2020, issn: 0141-8130. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.134>. indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813020338873>.
- [21] H. Tani, E. Kobayashi, S. Yagi et al., «Heart-derived collagen promotes maturation of engineered heart tissue,» *Biomaterials*, vol. 299, p. 122 174, 2023, issn: 0142-9612. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2023.122174>. indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961223001825>.
- [22] S. K. Asl, M. Rahimzadegan e A. K. Asl, «Progress in cardiac tissue engineering and regeneration: Implications of gelatin-based hybrid scaffolds,» *International Journal of Biological Macromolecules*, p. 129 924, 2024. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.129924. indirizzo: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38311143/>.

- [23] M. Steitz, S. Zouhair, M. B. Khan et al., «A Glutaraldehyde-Free Crosslinking Method for the Treatment of Collagen-Based Biomaterials for Clinical Application,» *Bioengineering*, vol. 10, n. 11, 2023, issn: 2306-5354. doi: 10.3390/bioengineering10111247. indirizzo: <https://www.mdpi.com/2306-5354/10/11/1247>.
- [24] C. Z. Mosher, P. A. Brudnicki, Z. Gong et al., «Green electrospinning for biomaterials and biofabrication,» *Biofabrication*, vol. 13, n. 3, p. 035 049, 2021. doi: <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ac0964>. indirizzo: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34102612/>.
- [25] P. P. Lelovas, N. G. Kostomitsopoulos e T. T. Xanthos, «A comparative anatomic and physiologic overview of the porcine heart,» *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, vol. 53, n. 5, pp. 432–438, 2014. indirizzo: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25255064/>.
- [26] A. Weymann, N. P. Patil, A. Sabashnikov et al., «Bioartificial heart: a human-sized porcine model—the way ahead,» *PloS one*, vol. 9, n. 11, e111591, 2014. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111591>. indirizzo: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4218780/>.
- [27] J. Barallobre-Barreiro, A. Didangelos, F. A. Schoendube et al., «Proteomics Analysis of Cardiac Extracellular Matrix Remodeling in a Porcine Model of Ischemia/Reperfusion Injury,» *Circulation*, vol. 125, n. 6, pp. 789–802, 2012. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.056952. indirizzo: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.056952>.
- [28] C. C. Loh QL, «Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size,» *Tissue Eng Part B Rev.*, vol. 19, n. 6, pp. 485–502, 2013. doi: 10.1089/ten.TEB.2012.0437. indirizzo: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23672709/>.
- [29] J. A. Stella, A. D'Amore, W. R. Wagner e M. S. Sacks, «On the biomechanical function of scaffolds for engineering load-bearing soft tissues,» *Acta Biomaterialia*, vol. 6, n. 7, pp. 2365–2381, 2010, issn: 1742-7061. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.01.001>. indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S174270611000005X>.
- [30] D. Nordsletten, A. Capilnasiu, W. Zhang et al., «A viscoelastic model for human myocardium,» *Acta Biomaterialia*, vol. 135, pp. 441–457, 2021, issn: 1742-7061. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.08.036>. indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706121005699>.

- [31] R. Miller, D. Marlevi, W. Zhang et al., «Modeling biomechanics in the healthy and diseased heart,» in *Modeling Biomaterials*, Springer, 2021, pp. 141–239. doi: 10.1007/978-3-030-88084-2\_5. indirizzo: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-88084-2\\_5](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-88084-2_5).
- [32] M. Kojic, M. Milosevic, B. Milicevic e V. Simic, «Heart mechanical model based on Holzapfel experiments,» in *Computational Bioengineering and Bioinformatics: Computer Modelling in Bioengineering 8*, Springer, 2020, pp. 12–21. doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-43658-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-43658-2_2). indirizzo: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-43658-2\\_2#citeas](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-43658-2_2#citeas).
- [33] S. Ramadan, N. Paul e H. E. Naguib, «Standardized static and dynamic evaluation of myocardial tissue properties,» *Biomedical Materials*, vol. 12, n. 2, p. 025 013, 2017. doi: 10.1088/1748-605X/aa57a5. indirizzo: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28065929/>.
- [34] M. Morita, C. E. Eckert, K. Matsuzaki et al., «Modification of infarct material properties limits adverse ventricular remodeling,» *The Annals of thoracic surgery*, vol. 92, n. 2, pp. 617–624, 2011. doi: 10.1016/j.athoracsur.2011.04.051. indirizzo: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3254256/>.
- [35] B. L. Brazile, J. R. Butler, S. S. Patnaik et al., «Biomechanical properties of acellular scar ECM during the acute to chronic stages of myocardial infarction,» *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, vol. 116, p. 104 342, 2021.
- [36] W. Li, «Biomechanics of infarcted left ventricle: a review of modelling,» *Biomedical Engineering Letters*, vol. 10, n. 3, pp. 387–417, 2020. doi: 10.1007/s13534-020-00159-4. indirizzo: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1751616119314675>.
- [37] P Sáez e E Kuhl, «Computational modeling of acute myocardial infarction,» *Computer methods in biomechanics and biomedical engineering*, vol. 19, n. 10, pp. 1107–1115, 2016. doi: 10.1080/10255842.2015.1105965. indirizzo: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26583449/>.
- [38] N. Salehi-Nik, G. Amoabediny, B. Pouran et al., «Engineering parameters in bioreactor’s design: a critical aspect in tissue engineering,» *BioMed research international*, vol. 2013, n. 1, p. 762 132, 2013. doi: 10.1155/2013/762132. indirizzo: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24000327/>.

- [39] J. P. Licata, K. H. Schwab, Y.-E. Har-El, J. A. Gerstenhaber e P. I. Lelkes, «Bioreactor technologies for enhanced organoid culture,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24, n. 14, p. 11 427, 2023. doi: 10.3390/ijms241411427. indirizzo: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37511186/>.