



# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

Scuola di Ingegneria  
Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione  
Dipartimento di Ingegneria Industriale

Corso di Laurea in Bioingegneria

## **La sottomucosa intestinale porcina decellularizzata come biomateriale per nuovi approcci terapeutici di medicina rigenerativa: metodi di sterilizzazione a confronto**

Relatore: Prof. Andrea Bagno  
Correlatore: Prof.ssa Laura Iop  
Correlatore: Dott.ssa Tiziana Palmosi

Laureanda: Stefania Ballarin

Data: 8 Luglio 2019

A.A. 2018/2019

# INDICE

---

<b>INDICE</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>4</b>
<b>1. INGEGNERIA TISSUTALE APPLICATA ALLA MEDICINA RIGENERATIVA</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1. L'INGEGNERIA TISSUTALE</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2. LO SCAFFOLD</b> .....	<b>8</b>
<b>1.3. LA MATRICE EXTRACELLULARE</b> .....	<b>11</b>
<b>1.4. DECELLULARIZZAZIONE DI TESSUTI E ORGANI</b> .....	<b>16</b>
1.4.1. <i>METODI FISICI</i> .....	17
1.4.2. <i>METODI CHIMICI</i> .....	18
1.4.3. <i>METODI ENZIMATICI</i> .....	20
<b>1.5. STERILIZZAZIONE DI TESSUTI E ORGANI</b> .....	<b>21</b>
1.5.1. <i>METODI FISICI</i> .....	22
1.5.2. <i>METODI CHIMICI</i> .....	24
1.5.3. <i>ALTRI METODI</i> .....	26
1.5.4. <i>CRITERI DI SELEZIONE E VALIDAZIONE DEI METODI DI STERILIZZAZIONE PER I BIOMATERIALI</i> .....	27
1.5.4.1. <i>METODI DIRETTI</i> .....	29
1.5.4.2. <i>METODI INDIRETTI</i> .....	30
1.5.4.3. <i>MOST PROBABLE NUMBER (MPN)</i> .....	32
1.5.4.4. <i>CONTA PER FILTRAZIONE SU MEMBRANA</i> .....	35
<b>2. LA SOTTOMUCOSA INTESTINALE (SIS) PORCINA DECELLULARIZZATA E STERILIZZATA COME SCAFFOLD PER APPLICAZIONI CLINICHE</b> .....	<b>36</b>
<b>2.1. COMPONENTI E STRUTTURA</b> .....	<b>36</b>
<b>2.2. PROCESSO DI BIOINDUZIONE, RIMODELLAMENTO E DEGRADAZIONE DELLA SIS-ECM</b> .....	<b>42</b>
<b>2.3. AMBITI DI APPLICAZIONE</b> .....	<b>44</b>
2.3.1. <i>STUDI PRECLINICI</i> .....	45
2.3.2. <i>STUDI CLINICI</i> .....	48
<b>SCOPO DELLO STUDIO</b> .....	<b>54</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>56</b>
<b>3.1. PRELIEVO E PROCESSAMENTO DELLA SIS</b> .....	<b>56</b>
<b>3.2. DECELLULARIZZAZIONE E STERILIZZAZIONE DELLA SIS</b> .....	<b>57</b>
3.2.1. <i>DECONTAMINAZIONE: TRATTAMENTO CON ANTIBIOTICI, ANTIMICOTICI (AA) E PAA</i> .....	58
3.2.2. <i>DECELLULARIZZAZIONE TRICOL</i> .....	59
3.2.3. <i>CONTAMINAZIONE CONTROLLATA (CC)</i> .....	62

3.2.4. STERILIZZAZIONE CON PAA .....	63
<b>3.3. CARATTERIZZAZIONE DELLA SIS TRATTATA .....</b>	<b>64</b>
3.3.1. ESTRAZIONE DI DNA.....	64
3.3.2. ANALISI ISTOLOGICHE.....	64
3.3.2.1. EMATOSSILINA ED EOSINA (H&E).....	65
3.3.1. VALUTAZIONE DELLA STERILITA' .....	65
3.3.1.1. TEST DI STERILITA' .....	66
3.3.1.2. COLORAZIONE DI GRAM.....	66
3.3.1.3. IDENTIFICAZIONE QUALITATIVA DI CONTAMINANTI BATTERICI .....	67
3.3.1.4. IDENTIFICAZIONE QUANTITATIVA DI CONTAMINANTI BATTERICI – METODO MPN .....	67
3.3.4. ANALISI STATISTICA DEI RISULTATI .....	69
<b>4. RISULTATI.....</b>	<b>70</b>
4.1. VERIFICA DI DECELLULARIZZAZIONE .....	70
4.2. VALUTAZIONE STRUTTURALE E DI DECELLULARIZZAZIONE DELLA SIS.....	71
4.3. VERIFICA DI STERILITA' .....	72
4.4. COLORAZIONE DI GRAM.....	76
4.5. IDENTIFICAZIONE QUALITATIVA DI CONTAMINANTI BATTERICHE .....	77
4.6. IDENTIFICAZIONE QUANTITATIVA DI CONTAMINANTI BATTERICHE – METODO MPN .....	78
<b>DISCUSSIONE .....</b>	<b>82</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>88</b>

## ABSTRACT

---

Negli ultimi anni l'ingegneria tissutale e la medicina rigenerativa si impegnano a realizzare equivalenti biologici in grado di ripristinare le funzionalità dell'organo/tessuto che andranno a sostituire e di autoripararsi nel caso di danno o stress. Questi sostituiti si compongono principalmente di una struttura tridimensionale, denominata *scaffold*, da cellule e agenti bioattivi. Molti biomateriali di origine sintetica e biologica vengono impiegati per la loro costruzione. Recentemente, si sta facendo molto uso di matrici extracellulari, ottenute da diverse fonti animali, come *scaffold* per la rigenerazione tissutale. Esse sono ottenute da tessuti nativi sottoposti a tecniche di decellularizzazione e sterilizzazione, che consentono di prevenire la risposta immunitaria dell'organismo ricevente e infezioni una volta effettuato l'impianto.

Una delle matrici extracellulari di grande interesse biomedico deriva dalla sottomucosa intestinale porcina. Essa risulta biocompatibile, facile da maneggiare, resistente, e presenta potenziali di rimodellamento e rigenerazione. Da molti anni trova impiego in clinica essendo uno *scaffold* naturale particolarmente promettente e versatile con applicazione in svariati ambiti, come nei campi cardiovascolare, gastrointestinale, urogenitale e nella guarigione di ferite. Essendo però un materiale xenogenico necessita di essere decellularizzato, per la rimozione del materiale cellulare animale, e sterilizzato, per ridurre l'elevato carico batterico e fungino che lo caratterizza.

Questo lavoro di tesi si pone l'obiettivo di ottenere un ottimale protocollo di sterilizzazione per la sottomucosa intestinale porcina decellularizzata in modo da poterla applicare in futuro in clinica in maniera sicura e non dannosa per il paziente. La decellularizzazione TRICOL, basata su detergenti, è stata effettuata sulla sottomucosa intestinale suina con completa rimozione delle componenti cellulari e il mantenimento della matrice extracellulare. Il protocollo sterilizzante testato sulla sottomucosa intestinale porcina decellularizzata consta in un trattamento di decontaminazione a più fasi basato su un cocktail di antibiotici e antimicotici combinato con acido peracetico a due diverse concentrazioni. Inoltre, per testare la sua efficacia nel peggior scenario di rischio biologico, si è anche proceduto a ricreare *in vitro* una contaminazione controllata con tre ceppi batterici. Le verifiche di sterilità, effettuate mediante test di torbidità e identificazione qualitative/quantitative di contaminanti, hanno dato risultati positivi, ma non del tutto univoci. In futuro, saranno quindi necessari ulteriori approfondimenti per valutare la reale efficacia del protocollo sviluppato.



# 1. INGEGNERIA TISSUTALE APPLICATA ALLA MEDICINA RIGENERATIVA

---

L'ingegneria tissutale è un settore fortemente interdisciplinare che si pone l'obiettivo di ricreare e riparare organi e tessuti, ristabilendo o migliorando le loro funzioni. Essa sfrutta l'attività delle cellule in modo da farle interagire con molecole segnale attraverso opportune impalcature (*scaffold*) per promuovere la crescita cellulare e generare bioequivalenti tissutali. In questo l'ingegneria tissutale aiuta la medicina rigenerativa che ha come obiettivo la rigenerazione di tessuti e organi *in vitro*, impiegando le stesse cellule del paziente le quali dovranno interagire o sostituire le funzioni di tessuti e organi malati, riducendo i rischi di incompatibilità e rigetto a vantaggio della salute del paziente e della funzionalità dell'impianto [1].

In questo capitolo si tratterà di ingegneria tissutale, degli scaffold e della matrice extracellulare (ECM) naturale pensata come impalcatura ideale per la rigenerazione di tessuti. Verranno descritte le componenti biologiche di quest'ultima e le tecniche di processamento comunemente impiegate per poterla utilizzare clinicamente, ovvero decellularizzazione e sterilizzazione.

## 1.1. L'INGEGNERIA TISSUTALE

L'ingegneria tissutale (*Tissue engineering*, TE) è stata definita nel 1998 come “*una tecnica interdisciplinare che applica i principi e i metodi dell'ingegneria e delle scienze biologiche con l'obiettivo di comprendere le relazioni fondamentali tra struttura e funzione nei tessuti sani e malati dei mammiferi e di sviluppare sostituti biologici in grado di ripristinare, mantenere o migliorarne le funzioni*” [2].

Rappresenta un campo di ricerca che combina biologia, chimica, medicina ed ingegneria per lo sviluppo di sostituti funzionali biologici. L'obiettivo è ripristinare e migliorare la funzione del tessuto o organo danneggiato, sostituendolo attraverso un equivalente bioingegnerizzato generato *in vitro* a partire dalla combinazione di *scaffold* e cellule [3], [4]. La rigenerazione tissutale guidata, invece, sfrutta la capacità di uno *scaffold* di fare da guida per il ripopolamento da parte delle cellule dell'ospite una volta che è stato impiantato. Si può quindi definire quest'ultimo approccio come un'eccezione semplificata della classica TE [5].

Come precedentemente accennato, la TE fa uso di:

- cellule (differenziate o indifferenziate);
- supporti o *scaffold* tridimensionali porosi;
- agenti bioattivi, come i fattori di crescita (*growth factors*, GF) per promuovere la crescita cellulare [3], [4].

Le cellule impiegate nella TE possono essere classificate in autologhe (proprie del paziente), allogene (dalla stessa specie) e xenogene (di specie diverse) [6]. Le prime sono usate per diminuire i rischi di risposte immunologiche come i rigetti (acuti e iperacuti), così come di infezioni [7]. Invece, le allogene e le xenogene sono immunogene e necessitano di terapie immunosoppressive quando vengono impiegate [6].

Le cellule possono essere seminate e coltivate su uno *scaffold*, sintetico, biologico o ibrido, in grado di supportare la formazione del tessuto tridimensionale (Figura 1.1), fornendogli un'impalcatura meccanica iniziale fino a quando le cellule producono una adeguata ECM. Durante la formazione, la deposizione e l'organizzazione della matrice appena generata, lo *scaffold* viene degradato o metabolizzato. In questa fase uno stimolo importante è dato dai GF, che promuovono la maturazione dei nuovi tessuti generati *in vitro* [1], [4], [7].

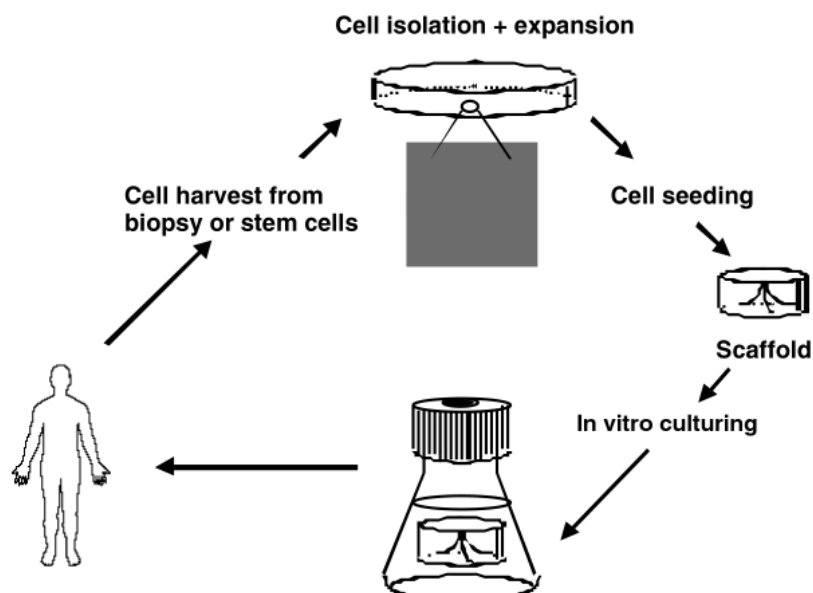


Figura 1.1: Ciclo esplicativo del TE [7].

I GF sono polipeptidi che segnalano diversi tipi di processi cellulari che inducono migrazione, differenziamento e proliferazione cellulare. Diversi GF vengono impiegati nella TE, quali il

fattore di crescita dei fibroblasti basico (b-FGF), il fattore di crescita insulino simile di tipo 1 (IGF-1) e la proteina morfogenetica ossea 2 (BMP-2) (Tabella 1.1) [8].

Growth Factor	Abbreviation	Function
Angiopoietin-1	Ang-1	Blood vessel maturation and stability
Angiopoietin-2	Ang-2	Endothelial cells disassociation from surrounding tissues
Basic fibroblast growth factor-2	bFGF-2	Endothelial cells survival, migration and proliferation
Bone morphogenetic protein-2	BMP-2	Osteoblasts differentiation and migration
Bone morphogenetic protein-7	BMP-7	Osteoblasts differentiation and migration, renal development
Fibroblast growth factor	FGF	Angiogenesis and embryonic development
Epidermal growth factor	EGF	Epithelial cell growth, proliferation and differentiation
Insulin-like growth factor-1	IGF-1	Cell proliferation and inhibiting cell apoptosis
Nerve growth factor	NGF	Neural cells survival and proliferation
Platelet-derived growth factor	PDGF	Embryonic development, proliferation, migration, growth of endothelial cells
Transforming growth factor- $\alpha$	TGF- $\alpha$	Basal cells or neural cells proliferation
Transforming growth factor- $\beta$	TGF- $\beta$	Bone-forming cells Proliferation and differentiation, anti-proliferative factor for epithelial cells
Vascular endothelial growth factor	VEGF	Endothelial cells survival, migration and proliferation

Tabella 1.1: GF impiegati nel TE con le relative funzioni [8].

La TE impiega inoltre bioreattori, sistemi dinamici, che permettono di controllare e mantenere condizioni favorevoli in termini di concentrazione di nutrienti, temperatura, pressioni parziali di ossigeno e biossido di carbonio e pH con l'obiettivo di migliorare le proprietà biologiche e meccaniche dei costrutti *in vitro* [1], [4], [8].

La sfida attuale della TE e della medicina rigenerativa è quella di generare tessuti e organi ricostruiti con le cellule del paziente, minimizzando il rischio di rigetto e ripristinando al meglio l'equilibrio fisiologico nella zona interessata [1].

## 1.2. LO SCAFFOLD

Numerose strategie attualmente utilizzate per progettare i tessuti dipendono dall'impiego di uno *scaffold*. Questi fungono da "impalcatura", che può essere di origine sintetica o biologica, in modo da organizzare le cellule in un'architettura tridimensionale, stimolandone la crescita e la formazione di nuovo tessuto [9].

Idealmente, gli *scaffold* per la TE dovrebbero soddisfare i seguenti requisiti:

1. la superficie deve consentire l'adesione per favorire la crescita cellulare;
2. devono essere biocompatibili, in quanto la loro degradazione non deve provocare infiammazione o tossicità *in vivo*;
3. devono essere biodegradabili;
4. devono possedere una bassa o nulla immunogenicità;



5. la porosità deve consentire la distribuzione spaziale delle cellule e la diffusione di sostanze nutritive in tutto lo *scaffold* durante la coltura *in vitro* per facilitare la formazione omogenea dei tessuti di interesse;
6. devono essere in grado di includere segnali biochimici e/o fisici che influenzino il fenotipo cellulare e promuovano la ricrescita cellulare;
7. il materiale deve essere riproducibile in una struttura tridimensionale biomeccanicamente resistente e con proprietà intrinseche simili a quelle del tessuto/organo che deve sostituire [10], [11].

In sintesi, devono essere: biodegradabili, biocompatibili, non tossici, non mutageni e non immunogeni. Inoltre, lo *scaffold* deve essere in grado di imitare la struttura e la funzione biologica della matrice extracellulare (*extracellular matrix*, ECM) nativa, sia in termini di composizione chimica che di struttura fisica. L'ECM è originariamente nota per il suo ruolo nel fornire supporto strutturale alle cellule e come sede per la migrazione cellulare per cui, lo *scaffold* dovrebbe essere in grado di fornire un supporto meccanico appropriato e mostrare proprietà superficiali favorevoli, a consentire l'adesione, la proliferazione e il differenziamento delle cellule.

La formazione di tessuti con caratteristiche desiderate dipende anche dalle proprietà meccaniche del materiale con cui è prodotto. Le prestazioni meccaniche dello *scaffold* dipendono da caratteristiche, come elasticità, comprimibilità, comportamento viscoelastico, resistenza alla trazione e deformazione a rottura. Il tasso di degradazione deve essere pari a quello di formazione di nuovi tessuti o comunque essere adeguato al rilascio controllato di molecole bioattive [3], [9]. Infatti, oltre a fornire un supporto per la formazione di nuovi tessuti gli *scaffold* sono utilizzati per stabilizzare e fornire molecole bioattive (per esempio, i GF) nel sito di interesse in modo da rilasciarle localmente per promuovere vari processi, fra cui l'angiogenesi [9].

Nel corso dell'ultimo secolo, materiali biocompatibili come metalli, ceramiche e polimeri sono stati ampiamente utilizzati per la realizzazione di *scaffold*. I metalli e le ceramiche hanno contribuito a importanti progressi nel campo medico, in particolare nella sostituzione del tessuto osseo. Tuttavia, questi materiali non sono biodegradabili. I materiali polimerici sono ampiamente utilizzati nella TE per realizzare *scaffold* che svolgono un ruolo fondamentale nella semina cellulare, la proliferazione e la formazione di nuovi tessuti. Molti di questi materiali

hanno ottenuto l'approvazione della *Food and Drug Administration (FDA)* degli Stati Uniti per uso clinico umano, come nel caso di suture chirurgiche e dispositivi impiantabili [10].

Esistono due tipi di materiali polimerici, ovvero quelli di sintesi e quelli di origine biologica.

- Polimeri sintetici (come acido poliglicolico PGA, acido polilattico PLA, policaprolattone PCL, acido poli[lattico-glicolico] PLGA e loro copolimeri) sono interessanti per la TE per la loro biodegradabilità controllata e bassa tossicità. I polimeri sintetici possono essere prodotti in modo riproducibile con pesi molecolari specifici, strutture a blocchi, legami degradabili e modalità di reticolazione.
- Polimeri di origine biologica (chitina, chitosano, alginato, collagene e acido ialuronico) vengono utilizzati per molti usi, per esempio, come *patches* (rattoppi tissutali) adesivi e per la somministrazione di farmaci. L'utilizzo di polimeri naturali risulta vantaggioso in quanto sono biocompatibili e biodegradabili, non sono tossici, non inducono reazioni infiammatorie avverse, presentano stabilità meccanica e possono essere degradati per via enzimatica. D'altra parte, può esservi il rischio di trasmissione di malattie e di rigetto nell'uomo a causa dell'utilizzo di una varietà di polimeri ottenuta da risorse animali [3], [8], [9], [11].

Diversi biomateriali naturali, tra cui collagene, fibronectina e laminina, ovvero i componenti principali della ECM, sono impiegati per preparare *scaffold*. La ECM stessa può essere impiegata come *scaffold* induttivo per la sostituzione o la ricostruzione di molti tessuti diversi [11], [12].

Infatti, presenta un certo grado di resistenza meccanica e flessibilità, garantendo un supporto meccanico alle cellule ed è biodegradabile. Influenza, inoltre, la migrazione cellulare e tramite i suoi costituenti (per esempio, proteine adesive) fornisce proprietà biomeccaniche e segnali biochimici per la ricrescita cellulare e la riparazione di tessuti [11].

Se lo *scaffold* ECM è di origine xenogenica, prima del suo uso clinico, viene trattato con glutaraldeide, carbodiimmide o agenti fotossidanti, per prevenire reazioni avverse da parte del sistema immunitario che può scatenare una tipica reazione da corpo estraneo: incapsulamento fibroso, rallentamento o completa inibizione della degradazione dello scaffold e infiammazione cronica [12].

In altre parole, sebbene la ECM possa essere utilizzata come *scaffold* per la riparazione dei tessuti, il suo metodo di preparazione può modificare drasticamente la risposta di

rimodellamento [12]. Di seguito verrà introdotta la ECM, descrivendo la sua struttura e le sue componenti.

### 1.3. LA MATRICE EXTRACELLULARE

I tessuti biologici sono costituiti da un numero variabile di cellule legate ad una entità strutturale complessa denominata ECM. Essa circonda e supporta le cellule dei tessuti e presenta un grado variabile di porosità attraverso cui diffondono le sostanze nutritive e l'ossigeno e contro-diffondono CO<sub>2</sub> e prodotti del catabolismo. Inoltre, è progettata e secreta dalle cellule residenti di ciascun tessuto e organo, essendo quindi molto specifica a seconda del distretto corporeo. Si trova in uno stato di "equilibrio dinamico" con le cellule, i tessuti e gli organi di cui fa parte. Le sue molecole strutturali e funzionali, che sono proteine fibrose, glicoproteine adesive e glicosamminoglicani, forniscono i mezzi attraverso i quali le cellule adiacenti comunicano tra loro e con l'ambiente esterno [1], [11], [12].

Svolge un ruolo attivo nella trasmissione di segnali, regolando lo sviluppo, la migrazione, la proliferazione, la formazione e la funzione delle cellule che sono in stretto contatto con essa. In aggiunta fornisce anche un supporto per vasi sanguigni, nervi e vasi linfatici [1], [12].

La ECM nativa possiede quindi molte caratteristiche dello *scaffold* o del biomateriale ideale per la TE: influenza il fenotipo, l'adesione, la proliferazione, la migrazione, e la disposizione spaziale tridimensionale delle cellule residenti. Svolgendo così un ruolo chiave nella morfogenesi tissutale e nello sviluppo di organi [1], [11], [12].

Per quanto riguarda la sua struttura, è composta da un complesso reticolo di proteine e polisaccaridi disposti in un'architettura tridimensionale (Figura 1.2) [11].

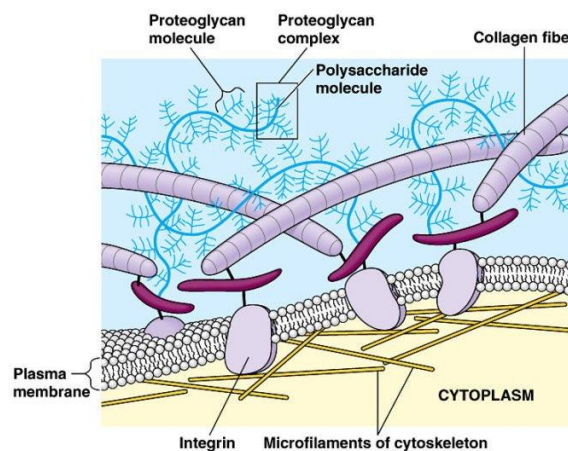


Figura 1.2: Schematizzazione della struttura della ECM [13]

Come anticipato, le tre classi di biomolecole principali che la compongono sono:

- proteine strutturali (collagene ed elastina);
- glicosamminoglicani (GAGs) e proteoglicani;
- proteine adesive (fibronectina e laminina) [1].

Il **collagene** rappresenta la proteina strutturale presente in maggior quantità nella ECM, è costituito da catene polipeptidiche denominate catene  $\alpha$ , strettamente intrecciate tra loro in modo da formare una super-elica compatta. Ogni singolo filamento assume una struttura terziaria elicoidale sinistrorsa; tre singoli filamenti si organizzano in una super-elica destrorsa, costituendo la struttura quaternaria del tropocollagene, precursore del collagene (Figura 1.3). La singola fibra di collagene è composta da macrofibrille, che a sua volta si organizzano in microfibrille, ciascuna delle quali è costituita da eliche di tropocollagene (Figura 1.4) [1].

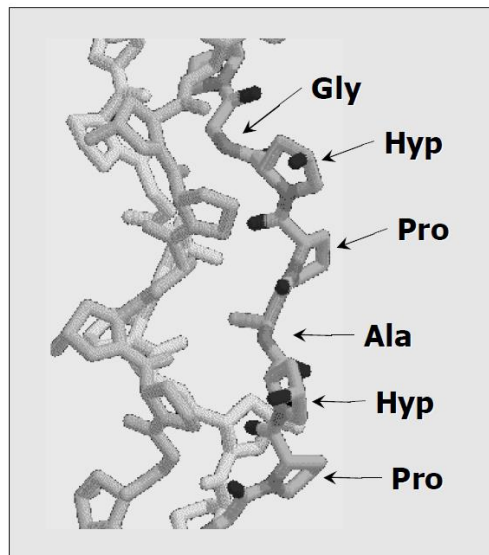


Figura 1.3: Parte della struttura del tropocollagene [1].

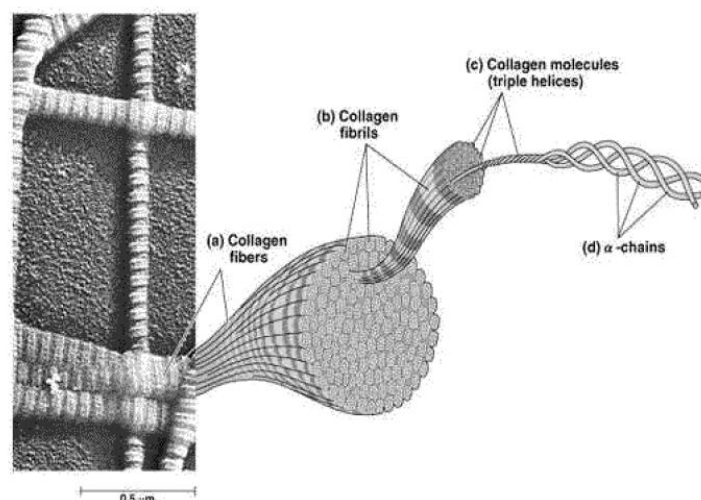


Figura 1.4: Le catene  $\alpha$  di collagene si organizzano in fibrille e fibre [1].

Esistono diversi tipi di questa proteina strutturale: collagene di tipo I, II e III formano fibrille strutturalmente molto simili fra loro, mentre il collagene di tipo IV forma un reticolo bidimensionale ed è il più importante componente della lamina basale (un sottile tessuto che separa i tessuti epiteliali, mesoteliali o endoteliali dal tessuto connettivo sottostante) [1], [11].

Il collagene di tipo I è formato da catene di tropocollagene che si associano fianco a fianco formando fibre che reticolano gli spazi intercellulari [2]. È la principale proteina strutturale presente nei tessuti ed è abbondante nelle strutture tendinee e legamentose, fornendo la forza necessaria per accogliere il carico meccanico uniassiale e pluriassiale, a cui questi tessuti sono comunemente sottoposti. Questi stessi tessuti, inoltre, forniscono una fonte di collagene per molte applicazioni nell'ambito dei dispositivi medici.

Il collagene di tipo III si trova principalmente all'interno del tessuto sottomucoso di organi selezionati, come la vescica urinaria, ovvero in tessuti in cui è richiesta una certa flessibilità.

Il collagene di tipo VI è una molecola relativamente piccola che funge da unità di collegamento tra i glicosamminoglicani e le proteine strutturali più grandi come il collagene di tipo I, fornendo così una consistenza simile al gel presente nella ECM [12]. E' costituito da una testa globulare e una coda nell'estremità opposta: quattro molecole di tropocollagene si associano strettamente tra loro formando un complesso a forma di X [2]. Questo tipo di collagene è presente all'interno della membrana basale della maggior parte delle strutture vascolari e all'interno di tessuti che contengono una componente di cellule epiteliali. L'affinità del ligando del collagene di tipo IV per le cellule endoteliali è la ragione per cui viene utilizzato come copertura biocompatibile per dispositivi medici destinati al contatto con il sangue [12].

Ultima proteina con funzione strutturale presente nella matrice è l'**elastina**: una proteina fibrosa che si trova in grande quantità nei tessuti elastici con conformazione spiraliforme ad avvolgimento disordinato (*random coil*, Figura 1.5).

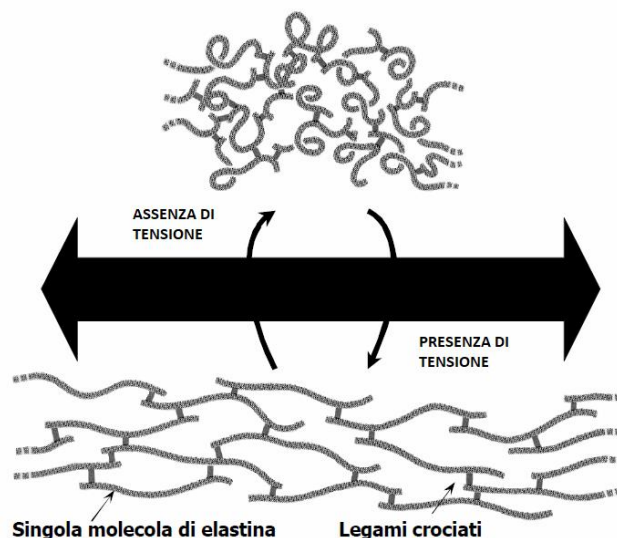


Figura 1.5: L'avvolgimento *random coil* è responsabile del comportamento elastico dell'elastina la cui struttura varia in assenza o in presenza di tensione [2].

Contribuisce all'elasticità, alla compliance e alla resilienza della ECM, fornisce l'integrità meccanica ai tessuti e regola il comportamento cellulare [11].

Le singole catene in *random coil* sono legate tra loro tramite numerosi legami reticolari: questa particolare struttura consente alle fibre di estendersi e di tornare successivamente alla posizione di partenza, cioè di avere un comportamento elastico. In natura, le fibre di elastina sono intrecciate con le fibrille di collagene che, essendo dotate di scarsa elasticità, limitano l'entità della deformazione dei tessuti, evitandone così la lacerazione [2].

La ECM contiene una grande varietà e quantità di **glicosamminoglicani** (GAGs o mucopolissacaridi) ossia catene polisaccaridiche non ramificate, costituite dalla ripetizione di unità saccaridiche (N-acetilglucosammina o N-acetilgalattosammina) solfatate. Nei tessuti sono legati a proteine extracellulari per formare i proteoglicani. I GAGs presenti nella ECM comprendono acido ialuronico, condroitina e condroitina solfato, eparina ed eparan solfato. L'acido ialuronico è uno dei componenti fondamentali dei tessuti connettivi. Esso trova impiego come *scaffold* per la ricostruzione tissutale, ma anche come "veicolo" per il ripopolamento cellulare in applicazioni della TE terapeutica [12].

Nei tessuti, i GAGs sono legati a proteine extracellulari per formare i **proteoglicani**, enormi aggregati di natura covalente nei quali i polisaccaridi spesso rappresentano il 95% del complesso. Sono costituiti da lunghe catene di ialuronato, cui sono legate in maniera non covalente numerose unità proteiche. Ogni proteina lega covalentemente le molecole di GAGs [1]. Con la loro architettura complessa conferiscono ai tessuti le caratteristiche di

viscoelasticità, legano i GF e le citochine e trattengono l'acqua grazie alla loro natura idrofilica [12].

Nella ECM si possono trovare importanti proteine di adesione come la fibronectina e la laminina. La **fibronectina** presenta un ruolo fondamentale nell'adesione cellulare, interagendo e legando specifiche proteine (integrine) ancorate sulla superficie della membrana cellulare; è coinvolta, inoltre, nell'interazione con altre biomolecole dell'ECM, quali collagene, fibrina ed eparina. E' una molecola con una certa flessibilità: si presenta come una glicoproteina dimerica con le due subunità legate da un ponte disolfuro nella zona C-terminale (estremità di una catena di amminoacidi che termina con un gruppo carbossilico) [1]. La fibronectina è presente in grandi quantità nelle sottomucose, nelle membrane basali e nei tessuti interstiziali. Le caratteristiche di questa proteina la rendono un substrato ideale per la coltura cellulare *in vitro* e come copertura per *scaffold* sintetici utili a promuovere la loro biocompatibilità [12].

La **laminina** è una complessa proteina di adesione per diversi tipi di cellule, è costituita da tre catene  $\alpha$ ,  $\beta$ , e  $\gamma$  che tipicamente assumono una conformazione quaternaria a croce oppure a Y; tre delle quattro braccia della croce sono costituite dalle parti N-terminali delle tre catene, mentre il braccio più lungo è caratterizzato dalle regioni C-terminali raggruppate e legate insieme da tre ponti disolfuro intercatena [1]. La laminina è presente in tutto il corpo all'interno delle membrane basali dove agisce come un molecola di adesione per diversi tipi di cellule ed è importante per l'organizzazione e il mantenimento delle strutture vascolari [14].

La ECM funge da deposito per diversi **GF**, proteine capaci di stimolare specifiche funzioni delle cellule tra le quali differenziamento, proliferazione, e migrazione. Sebbene i GF siano presenti all'interno della ECM in piccolissime quantità, agiscono come potenti modulatori del comportamento cellulare. La tipologia di GF trovati nell'ECM è ampia e comprende: il fattore di crescita delle cellule endoteliali vascolari (VEGF), la famiglia dei fattori di crescita dei fibroblasti (FGF), il fattore di crescita delle cellule epiteliali (EGF), il fattore di crescita beta (TGF-beta), fattore di crescita dei cheratinociti (KGF), fattore di crescita degli epatociti (HGF), fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) e proteina morfogenetica ossea (BMP). Un vantaggio nell'impiegare la ECM nativa come substrato o *scaffold* per la crescita e il differenziamento cellulare è proprio la presenza dei GF, nella stessa quantità con cui si trovano in natura e soprattutto nella stessa struttura tridimensionale. Considerando la ECM un substrato per la crescita cellulare *in vitro* e *in vivo*, è ragionevole presumere che essa possa comportarsi da veicolo temporaneo (cioè biodegradabile) a rilascio controllato per fattori di crescita [12].

Come descritto precedentemente, la ECM può essere impiegata come *scaffold*, se però risulta di origine allogenica o xenogenica può indurre risposta immunitaria e infiammazione cronica. Per ovviare a tale problematica, la decellularizzazione può consentire di rimuovere le cellule e ridurre l'antigenicità evitando di fare utilizzo di agenti citotossici, come la glutaraldeide [11]. Nel paragrafo 1.4 verranno descritti i vari metodi comunemente impiegati per decellularizzare tessuti e organi.

#### **1.4. DECELLULARIZZAZIONE DI TESSUTI E ORGANI**

L'obiettivo del processo di decellularizzazione è quello di rimuovere in modo efficiente tutto il materiale cellulare (compreso quello nucleare), preservando la composizione, l'attività biologica e l'integrità meccanica della ECM [15].

Diversi studi, come quelli condotti da Hodde et al. [16] e McDevitt et al. [17], hanno dimostrato che dopo la decellularizzazione, gli *scaffold ECM* conservano il contenuto di collagene, di glicosaminoglicani e di GF, tra cui TGF- $\beta$ , b-FGF e VEGF [18].

Inoltre, il metodo di decellularizzazione ideale deve eliminare anche gli antigeni cellulari allogenici. Come già accennato, questi sono riconosciuti dall'ospite come agenti estranei (“*non-self*”) e quindi provocano una risposta infiammatoria o un rigetto immuno-mediato.

I materiali per i *bioscaffold ECM* decellularizzati sono ampiamente utilizzati per applicazioni cliniche che prevedono la riparazione e la ricostruzione dei tessuti muscoloscheletrici, delle strutture cardiovascolari, del tratto urinario inferiore, del tratto gastrointestinale e del sistema nervoso centrale. Tali *scaffold* promuovono e facilitano i processi di rimodellamento e rigenerazione di tessuto innervato e funzionale [19].

Un protocollo di decellularizzazione prevede:

1. la lisi della membrana cellulare usando trattamenti fisici o soluzioni ioniche;
2. la separazione dei componenti cellulari dall'ECM, ad esempio impiegando trattamenti enzimatici;
3. la solubilizzazione di componenti cellulari citoplasmatici e nucleari usando detergenti;
4. la rimozione dei detriti cellulari dal tessuto.

Al termine del processo di decellularizzazione, si deve cercare di rimuovere il più possibile eventuali residui degli agenti impiegati a tale scopo, per evitare qualsiasi reazione avversa del tessuto trattato nel ricevente ed eliminare fonti di citotossicità [15].



Il protocollo di decellularizzazione deve essere disegnato attentamente considerando la struttura ed il contenuto cellulare del tessuto o organo da trattare.

La maggior parte dei protocolli di decellularizzazione prevedono più fasi e l'utilizzo, anche combinato, di metodi fisici, chimici ed enzimatici [18]. Trattamenti fisici, come l'agitazione meccanica ed il congelamento-scongelamento, distruggono la membrana cellulare, liberandone il contenuto cellulare e facilitandone la rimozione. I trattamenti enzimatici, come quelli basati sulla tripsina, e quelli chimici come le soluzioni ad azione ipotonica o ipertonica e i detergenti, distruggono le membrane cellulari e i legami responsabili delle connessioni intercellulari ed extracellulari [15].

Verranno ora descritti in dettaglio i metodi fisici, chimici ed enzimatici applicati nella decellularizzazione.

#### **1.4.1. METODI FISICI**

I metodi fisici utilizzati per indurre la decellularizzazione dei tessuti includono:

- congelamento-scongelamento;
- pressione idrostatica;
- agitazione meccanica;
- elettroporazione [15].

Il processo di **congelamento-scongelamento** distrugge le cellule all'interno dei tessuti e degli organi, ma i residui di membrana e intracellulari non vengono rimossi. Durante il rapido congelamento di un tessuto, si formano dei cristalli di ghiaccio intracellulare che rompono le membrane cellulari. La variazione di temperatura deve essere attentamente controllata per evitare che la formazione di cristalli più grandi possa avere effetti deleteri sulla struttura dell'ECM [11], [15].

Le cellule possono essere rimosse applicando una **pressione idrostatica** diretta al tessuto, ma questo metodo è efficace solo per i tessuti o gli organi che non sono caratterizzati da ECM densamente organizzata. L'uso della pressione idrostatica richiede un tempo relativamente breve, risultando più efficace dei detergenti o degli enzimi per la rimozione delle cellule [15], [20]. D'altro canto, questo metodo può indurre danni alla struttura dell'ECM e riduce il contenuto di GAGs in misura maggiore rispetto ad altri metodi [11], [19].

L'**agitazione meccanica** associata con enzimi, soluzioni ipo/ipertonica e/o agenti chelanti, è molto efficace per la rimozione delle cellule di un tessuto o organo ma può danneggiare l'ultrastruttura e l'integrità della membrana basale [20]. L'agitazione meccanica può essere applicata utilizzando una piastra di agitazione magnetica o uno scuotitore orbitale, in entrambi i casi la velocità, la quantità di reagenti e la durata dell'agitazione meccanica vengono opportunamente scelti in base alla composizione, al volume e alla densità del tessuto da decellularizzare [15]

L'**elettroporazione** consiste in una serie di impulsi elettrici della durata di microsecondi attraverso il tessuto e quindi attraverso le cellule, provocando la destabilizzazione del potenziale elettrico di membrana e quindi la formazione di micropori. La presenza dei micropori nella membrana cellulare provoca la perdita dell'omeostasi e la morte cellulare. Applicando questa tecnica l'integrità, la morfologia e l'architettura tridimensionale della ECM sono in gran parte mantenute. Tuttavia le sonde per l'elettroporazione sono relativamente piccole, limitandone l'uso solo a tessuti e organi di piccole dimensioni e spessore [11], [20].

#### **1.4.2. METODI CHIMICI**

I metodi fisici da soli spesso non sono sufficienti per la completa decellularizzazione e l'efficienza del protocollo è notevolmente migliorata dall'uso di agenti chimici [18], fra cui:

- acidi e basi;
- detergenti non ionici;
- detergenti ionici;
- detergenti zwitterionici;
- alcoli;
- Tri (n-butil) fosfato (TBP);
- soluzioni ipertoniche e soluzioni ipotoniche;
- agenti chelanti [15], [20].

Gli **acidi** e le **basi** sono usati nei protocolli di decellularizzazione per catalizzare o causare la degradazione idrolitica delle biomolecole e per solubilizzare la componente citoplasmatica e nucleare delle cellule. Ad esempio, l'acido acetico, l'acido peracetico (*peracetic acid*, PAA), l'acido solforico e l'idrossido di ammonio (NH<sub>4</sub>OH) possono effettivamente distruggere le membrane cellulari e gli organelli intracellulari. Tuttavia, queste sostanze chimiche dissociano anche molecole importanti come i GAGs dai tessuti ricchi di collagene e possono ridurre la

resistenza e le proprietà meccaniche della ECM a causa della rimozione di alcuni componenti principali, come il collagene dopo trattamento con acido acetico [11], [15].

Le basi (idrossido di calcio, solfuro di sodio, idrossido di sodio) sono più utilizzate per le prime fasi di decellularizzazione (ad es., rimozioni dei peli dal derma), però eliminano i GF e riducono le proprietà meccaniche della ECM [20].

I **detergenti non ionici** sono ampiamente adoperati nei protocolli di decellularizzazione perché distruggono le interazioni lipidi-lipidi e lipidi-proteine. Diversamente, lasciano intatte quelle proteina-proteina, non alterando anche la conformazione funzionale [15]. Il Triton X-100 è molto utilizzato nei protocolli di decellularizzazione, rimuove efficacemente i residui cellulari dai tessuti più spessi (per esempio dai condotti valvolari) dove i metodi enzimatici ed osmotici non sono sufficienti [20]. Tuttavia, i detergenti non ionici possono ridurre il contenuto di laminina e fibronectina ed influire sull'ultrastruttura della ECM [11].

I **detergenti ionici** sono efficaci nella solubilizzazione delle membrane cellulari citoplasmatiche e nucleari, ma tendono a denaturare le proteine interrompendo le interazioni proteina-proteina [15]. I detergenti ionici più comunemente usati sono il sodio dodecil solfato (SDS), sodio colato/desossicolato e Triton X-200. L'SDS è più efficace del Triton per la rimozione dei residui nucleari dai tessuti e organi più spessi, però tende a distruggere la struttura nativa del tessuto provocando una diminuzione della concentrazione dei GAGs. Il desossicolato di sodio è anche molto efficace per rimuovere i residui cellulari ma causa una maggiore distruzione dell'architettura nativa del tessuto rispetto al SDS [15],[20]. Il sodio colato invece ha un effetto meno aggressivo sulla ECM [21].

I **detergenti zwitterionici** mostrano le proprietà sia dei detergenti non ionici che degli ionici. CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate), SB-10 (sulfobetain-10) e SB-16 (sulfobetain-16) sono solo alcuni degli agenti zwitterionici che vengono utilizzati nei processi di decellularizzazione [15]. I detergenti zwitterionici hanno una maggiore tendenza a denaturare le proteine e sono più efficaci nella rimozione di cellule dai tessuti più sottili. Spesso trovano utilizzo in combinazione con altri detergenti [15], [20].

Gli **alcoli** come l'isopropanolo, l'etanolo e il metanolo rimuovono i lipidi dai tessuti trattati e provocano lisi cellulare per disidratazione [20].

**Tri (n-butil) fosfato (TBP)** è un solvente organico che viene utilizzato per inattivare i virus nel sangue senza compromettere l'attività del fattore di coagulazione. Solo recentemente è stato

usato come agente decellularizzante in quanto presenta una buona capacità di rimozione della componente nucleare, senza danneggiare le fibre di collagene né provocare effetti negativi sul comportamento meccanico della ECM [15].

Un alternato trattamento con **soluzioni ipertoniche** e **soluzioni ipotoniche** è in grado di provocare lisi cellulare attraverso la variazione di osmolarità (ossia se una cellula è posta in una soluzione ipertonica l'acqua tende a passare all'esterno della membrana procurando il restringimento della cellula; al contrario, se è posta in una soluzione ipotonica si rigonfia per effetto dell'acqua che passa per la membrana fino a comportare la rottura e lisi cellulare [1]) con cambiamenti minimi nelle molecole e nell'architettura della ECM. Tali possono anche essere utilizzate per un risciacquo del tessuto dai residui cellulari [20].

Gli **agenti chelanti**, come EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) e EGTA (acido glicole etilenico tetraacetico), dissociano le proteine di membrana mediante il sequestro di ioni metallici. È stato dimostrato che cationi bivalenti, come  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , sono necessari per l'adesione delle cellule al collagene e alla fibronectina in corrispondenza dei recettori RGD (sequenza di aminoacidi Arginina-Glicina-Aspartato). Legando i cationi bivalenti, gli agenti chelanti facilitano la rimozione del materiale cellulare dal tessuto e spesso sono impiegati in combinazione con enzimi (Tripsina) oppure con detergenti [15], [20].

Terminato il processo di decellularizzazione è di fondamentale importanza eliminare qualsiasi residuo chimico dal prodotto finale in quanto la citotossicità degli agenti utilizzati, anche a ridotte concentrazioni, inibisce e/o nega completamente le proprietà vantaggiose dello *scaffold* decellularizzato [20].

### **1.4.3. METODI ENZIMATICI**

Le tecniche di decellularizzazione basate su metodi enzimatici prevedono l'uso di enzimi di digestione (proteasi), come tripsina, lipasi, dispasi, termolisina,  $\alpha$ -galattosidasi, e nucleasi [15].

Le **proteasi** (o enzimi proteolitici) rompono i legami peptidici tra il gruppo amminico ed il gruppo carbossilico delle proteine, mentre le **nucleasi** (ad esempio la DNasi e la RNasi) separano le sequenze di acido nucleico e facilitano la rimozione dei nucleotidi dopo la lisi cellulare [20].

La **tripsina** è un esempio di enzima proteolitico: scinde i legami peptidici all'estremità carbossilica dell'amminoacido (lisina o arginina). La sua massima attività enzimatica si verifica a 37°C e a pH=8 [15]. Può essere impiegata per rompere i legami intercellulari e per rimuovere

i nuclei cellulari da tessuti densi. Essa provoca degli effetti molto deleteri sulla ECM del tessuto trattato, compromettendone sia le proprietà biologiche che biomeccaniche [20].

Le **lipasi** idrolizzano e scompongono i lipidi, mentre le **dispasi** hanno un effetto digestivo simile a quello della tripsina mediante la scissione della fibronectina, del collagene IV e del collagene I. La **termolisina** idrolizza i legami peptidici contenenti amminoacidi idrofobi e l' **$\alpha$ -galattosidasi** è impiegata per eliminare l'antigene immunogenico galattosio- $\alpha$ -1,3-galattosio ( $\alpha$ -Gal) [11], [20].

Le **nucleasi** rompono i legami fosfodiesterici tra le subunità nucleotidiche degli acidi nucleici. Esse possono avere attività endonucleasica ed esonucleasica: le prime catalizzano l'idrolisi dei legami interni delle catene ribonucleotidiche e deossiribonucleotidiche, invece, le seconde quella dei legami terminali di deossiribonucleotidi e ribonucleotidi; entrambe provocano la degradazione di RNA e di DNA [15].

Non sempre gli enzimi hanno effetto positivo. Durante il processo di decellularizzazione può essere rilasciato un certo numero di proteasi cellulari dal tessuto, le quali possono danneggiare l'ultrastruttura dell'ECM nativa. Perciò, è utile includere degli **inibitori di proteasi** (per esempio, fenilmetilsolfonilfluoruro, aprotonina e leupeptina) che hanno l'azione di bloccare il sito catalitico enzimatico e quindi preservano l'integrità della ECM [15].

Terminata la decellularizzazione è fondamentale eseguire un trattamento di sterilizzazione in modo da eliminare qualsiasi fonte di contaminazione (batteri, virus, funghi) che potrebbe essere causa di infezione nell'ospite.

## **1.5. STERILIZZAZIONE DI TESSUTI E ORGANI**

La FDA fornisce le linee guida per la validazione e preparazione dei dispositivi medici, tra cui anche gli *scaffold* xenogenici decellularizzati. In particolare, il metodo di sterilizzazione applicato deve aderire alle linee guida relative all'annullamento del carico batterico ossia ISO/DIS 1135-1 e ISO/DIS 1137-1 [19].

Per sterilizzazione si intende il processo grazie al quale si raggiunge una riduzione dei microrganismi comprese le endospore batteriche altamente resistenti, su un determinato substrato o in un ambiente.

Per disinfezione, invece, si intende un processo che comporti una riduzione dei microrganismi patogeni escluse le spore presenti su un substrato o in un ambiente [22].

L'efficacia di un processo di sterilizzazione è misurata dalla probabilità relativa alla presenza di microrganismi ancora vitali dopo il trattamento stesso. Questa probabilità viene indicata come livello di sicurezza di sterilità o SAL. Convenzionalmente un materiale viene definito sterile se il SAL è inferiore a  $10^{-6}$  ossia quando la probabilità di trovarvi un microrganismo è inferiore ad una su un milione [23].

Di fondamentale importanza è valutare l'efficacia della procedura di sterilizzazione e l'integrità finale del prodotto sterilizzato. I metodi di sterilizzazione possono essere suddivisi in fisici e chimici, come verrà spiegato più in dettaglio qui sotto.

### **1.5.1. METODI FISICI**

I metodi fisici includono l'uso del calore (a secco e umido) e delle radiazioni ionizzanti.

La sterilizzazione con **calore secco** (160-190°C per almeno 2 ore) prevede l'utilizzo di aria calda e agisce per ossidazione delle componenti cellulari del microrganismo, denaturandolo [23], [24]. La sterilizzazione a calore a secco non è adatta per i materiali termosensibili mentre è utile per i materiali termostabili, come per esempio gli impianti metallici, oppure per quelli che non possono essere penetrati dal calore umido, come le plastiche, dispositivi elettrici e metalli sensibili alla corrosione [2], [23].

La sterilizzazione con **calore umido** (120-130° C per 15-30 minuti) è più efficace e prevede l'utilizzo di vapore saturo (ossia acqua in fase di vapore) e sottopressione, provocando idrolisi e denaturazione del substrato proteico del microrganismo più rapidamente rispetto al calore secco. Il motivo di ciò risiede nell'utilizzo del vapore saturo il quale, per osmosi, penetra nelle cellule più facilmente, rigonfiandole e denaturandole. Il calore umido è comunemente usato per la sterilizzazione dei materiali resistenti al calore e all'umidità come impianti in acciaio inossidabile e strumenti chirurgici. Non è adatto invece, per i biomateriali che sono sensibili al calore e all'umidità come i polimeri biodegradabili; questo perché le temperature utilizzate sono di molto superiori alle temperature di rammollimento [2], [23].

Le tecniche di radiazioni si dividono in:

- Radiazioni non ionizzanti, ossia le radiazioni ultraviolette (UV);
- Radiazioni ionizzanti che comprendono i raggi gamma  $\gamma$ , i raggi X e l'irradiazione con elettroni accelerati (*E-Beam*).

L'**irradiazione UV** viene utilizzata per trattare i microrganismi aero-dispersi e la decontaminazione dell'ambiente di produzione e lavorazione dei biomateriali. La luce UV a lunghezza d'onda pari a circa 254 nm interrompe la struttura degli acidi nucleici attraverso la formazione di dimeri di timina e distrugge le capacità riproduttive dei microrganismi. Tuttavia, la sola radiazione UV non è considerata un metodo efficace di sterilizzazione a causa del suo scarso potere penetrante, del lungo tempo di trattamento e della suscettibilità al movimento dell'aria [23].

La sterilizzazione con i **raggi gamma** ( $\gamma$ ) prevede l'uso di fotoni ad elevata energia emessi da una sorgente di cobalto ( $^{60}\text{Co}$ , isotopo radioattivo sintetico del metallo cobalto). Tale energia sottrae elettroni alla molecola provocando la liberazione di specie radicaliche libere di idrogeno, idrossido e perossido causando gravi danni al DNA batterico. Questa tecnica viene utilizzata per sterilizzare i tessuti per trapianto, prodotti farmaceutici, dispositivi medici e attrezzature mediche monouso [23]. Tuttavia, può deteriorare i polimeri, dato che un elevato dosaggio provoca la rottura delle catene polimeriche e la loro successiva ricombinazione casuale o la creazione di legami non desiderati [2], [23].

Il Gray (Gy) è l'unità di misura della dose assorbita di radiazione  $\gamma$  nel Sistema Internazionale (S.I.). A dosaggi bassi (<15 kGy) si evidenzia un aumento della resistenza e del modulo elastico negli *scaffold* ECM, mentre a dosaggi veramente bassi (5 kGy) viene riportata la frammentazione della ECM e la destabilizzazione delle molecole di collagene [19], [25]. A dosi superiori (>15 kGy) ne risentono sia le proprietà strutturali che quelle meccaniche della ECM. Conseguentemente, all'aumentare della dose di irradiazione, la scissione delle catene di collagene causa alterazioni nelle proprietà meccaniche dello *scaffold* e di conseguenza anche della biocompatibilità dell'innesto. [19].

I **raggi X** sono fotoni ad alta frequenza, presentano brevi lunghezze d'onda e spettri di energia molto ampi, hanno capacità di penetrazione migliore rispetto al fascio di elettroni accelerati (*E-Beam*) e simili all'irradiazione  $\gamma$  con meno impatto però sui materiali impiegati nel prodotto da sterilizzare. La rapidità del processo, l'eccellente uniformità della dose e una migliore penetrazione rispetto ai raggi  $\gamma$  o *E-beam* (descritto poi) rendono la tecnologia a raggi X una valida alternativa di sterilizzazione per i dispositivi medici [23].

L'**irradiazione E-Beam** caratterizzata da elettroni ad elevata energia, viene impiegata per una vasta gamma di applicazioni, in particolare, per la sterilizzazione di dispositivi medici e per il controllo di contaminazione. L'irradiazione con elettroni accelerati inattiva i microrganismi con

lo stesso metodo basato sui raggi  $\gamma$ . La rapida irradiazione garantisce un minor tempo di esposizione, comportando una degradazione del materiale significativamente inferiore rispetto alla irradiazione  $\gamma$ , perciò questa è vantaggiosa per tutti i materiali termosensibili (tra cui i materiali polimerici). Avendo però una scarsa capacità di penetrazione (Figura 1.6) può essere applicata solo per dispositivi metallici di piccole dimensioni [23].

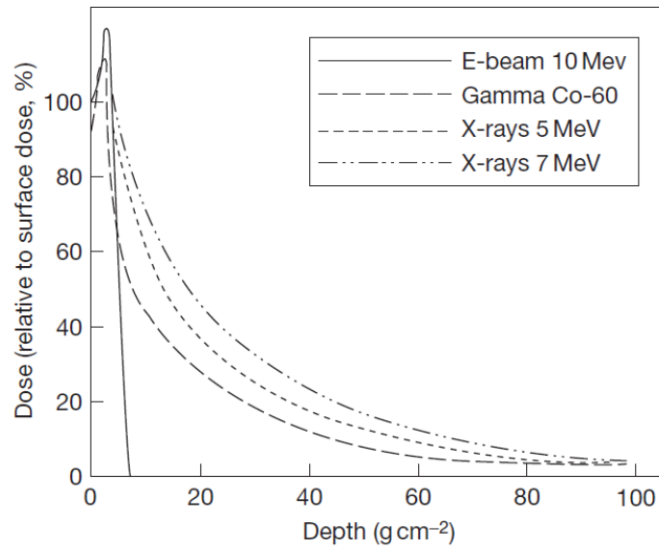


Figura 1.6- Profili di profondità e di penetrazione dei raggi *E-beam*, gamma e X. Si noti che la profondità di penetrazione è una funzione sia della distanza che della densità del materiale [23].

In conclusione, i metodi più utilizzati per la sterilizzazione di innesti tissutali sono le irradiazioni  $\gamma$  ed *E-Beam*, perché hanno una sufficiente profondità di penetrazione nei tessuti con una bassa densità [23].

### 1.5.2. METODI CHIMICI

I metodi chimici per la sterilizzazione comprendono l'uso dell'ossido di etilene, del PAA e del perossido di idrogeno.

L'**ossido di etilene (EtO)**, a temperatura ambiente, è un gas altamente infiammabile, se miscelato con l'aria diventa esplosivo. L'EtO ha un'azione battericida, sporicida e virucida ed è utilizzato come sterilizzante a basse temperature da circa 50 anni. Le sue proprietà risiedono nell'alchilazione di alcuni gruppi funzionali, amminici e carbossilici ma esercita soprattutto il suo effetto a livello degli acidi nucleici con conseguenze letali. L'EtO è compatibile con una vasta gamma di materiali e le sue proprietà di penetrazione lo rendono il metodo più adatto per la sterilizzazione per la maggior parte dei dispositivi medicali [23]. I residui derivati dalla sterilizzazione con EtO comportano, tuttavia, problemi di tossicità; infatti, possono permanere



nei tessuti trattati dei residui nocivi, provocando delle risposte avverse nell'ospite e compromettendo il corretto rimodellamento e l'adeguata funzione dello *scaffold* biologico [19].

Il PAA è un forte ossidante, che agisce sulle membrane cellulari esterne e denatura le proteine. Viene utilizzato sia per disinfettare innesti di tessuti (quali ad esempio innesti di pelle, tendini e sottomucosa intestinale (SIS)), che come metodo efficace di sterilizzazione, generalmente senza comportare reazioni dannose all'ECM.

Tramite il suo meccanismo di ossidazione che consiste in un trasferimento di elettroni, esso inattiva batteri gram-positivi e negativi, endospore, lieviti e spore della muffa (anche a basse temperature). La sua azione risiede nel rilascio di ossigeno e radicali liberi, che comportano l'ossidazione e distruzione degli enzimi microbici [23]. Non lascia residui e i suoi prodotti di decomposizione (ossigeno, acido acetico, acqua e perossido di idrogeno) non sono nocivi [26].

Lomas *et al.* hanno dimostrato che l'impiego di PAA, combinato con il glicerolo, non risulta citotossico per la disinfezione e la conservazione di innesti di pelle da donatori, garantendo la biocompatibilità degli allotrapianti cutanei; infatti, come già accennato, il residuo di PAA si decompone rapidamente in acqua, ossigeno ed anidride carbonica [27].

Inoltre, gli stessi ricercatori hanno testato un protocollo di disinfezione basato su PAA anche per allotrapianti tendinei, dimostrando che può causare delle modifiche strutturali sulle fibre tendinee, aumentando gli spazi tra di esse. Non vengono introdotte, tuttavia, modificazioni delle proprietà biomeccaniche dopo sforzo a trazione, e di citocompatibilità [28].

Tuttavia, questa capacità di ossidazione può anche ridurre l'integrità biologica, chimica e strutturale dei materiali biologici [23],[29]. Per esempio, è stato dimostrato che il PAA riduce il contenuto nella SIS di VEGF, ma non di FGF-2 e TGF- $\beta$ 1. Questo indica che il VEGF è altamente suscettibile alle proprietà ossidative del PAA [30].

Il PAA può essere combinato con antibiotici e antimicotici (AA) per aumentare il suo potenziale di sterilizzazione. Fidalgo *et al.* hanno testato un metodo di sterilizzazione a due fasi, basato su un cocktail di AA e PAA, per sterilizzare *scaffold* pericardici decellularizzati di origine bovina e porcina. Sono state testate due concentrazioni di PAA, rispettivamente allo 0,05% e allo 0,1%, dopo aver realizzato una contaminazione controllata degli scaffold con tre ceppi batterici noti a simulare lo scenario peggiore di rischio infettivo. Entrambe le concentrazioni di PAA, combinate con AA, hanno permesso la rimozione dei microrganismi batterici. Negli *scaffold* bovini, l'architettura e i componenti della ECM sono stati mantenuti dopo il trattamento

AA+PAA (ad entrambe le concentrazioni). Invece, il trattamento con AA+PAA 0,1% testato ha causato delle frammentazioni al collagene degli *scaffold* porcini. A livello biomeccanico, il PAA (ad entrambe le concentrazioni) non ha causato variazioni sul comportamento del pericardio decellularizzato. Inoltre, esperimenti di citocompatibilità basati su cellule staminali mesenchimali umane hanno dimostrato che il trattamento con PAA non induce citotossicità negli *scaffold* pericardici di entrambe le specie [31].

Il **perossido di idrogeno (HP)**, come l'acido peracetico, inattiva i microrganismi (batteri, lieviti, funghi, virus e spore) attraverso il processo di ossidazione. Può essere trasformato in radicali ossidrilici altamente reattivi ( $\text{OH}\cdot$ ), che attaccano i lipidi di membrana, il DNA e altri componenti cellulari essenziali per inattivare per la vitalità delle cellule batteriche [23].

### 1.5.3. ALTRI METODI

Oltre ai metodi sopraelencati possono essere utilizzati altri metodi di sterilizzazione, tra cui anidride carbonica supercritica e gas plasma.

L'**anidride carbonica supercritica (SC-CO<sub>2</sub>)** presenta un effetto battericida. Lo stato supercritico è uno stato fisico che si raggiunge ad una data temperatura (31.1°C) e pressione (74 atm), detto "punto critico" (Figura 1.7) [23].

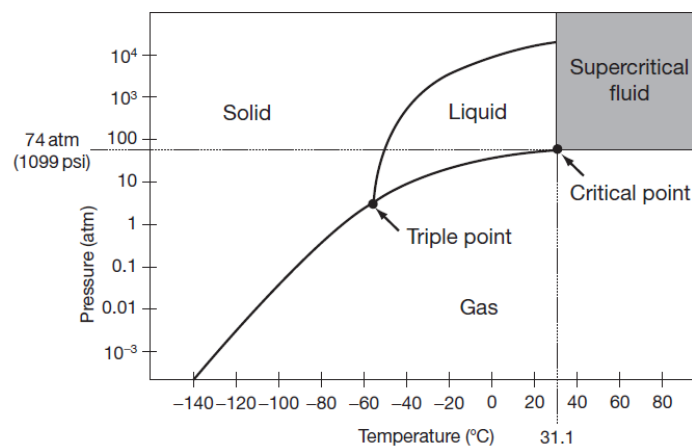


Figura 1.7- Diagramma di stato dell'anidride carbonica (CO<sub>2</sub>) [23].

L'SC-CO<sub>2</sub> presenta sia proprietà dello stato fisico liquido e sia di quello gassoso. Non è tossico, ma non consente per alcuni microbi, comprese le endospore batteriche e i virus, di raggiungere autonomamente un livello di sterilizzazione adeguato (SAL 10<sup>-6</sup>). Per questo motivo viene utilizzato con additivi come PAA [23]. Questo trattamento è stato, inoltre, utilizzato per la sterilizzazione di *scaffold* biologici [19].

Il **gas plasma** a basse temperature consiste in particelle cariche (radicali liberi) prodotte attraverso l'azione di un forte campo elettrico o magnetico generato tramite radiofrequenze o microonde. Il processo del gas plasma combina l'azione dell'irradiazione UV e quella dei radicali liberi dell'ossigeno, come schematizzato in Figura 1.8 [23].

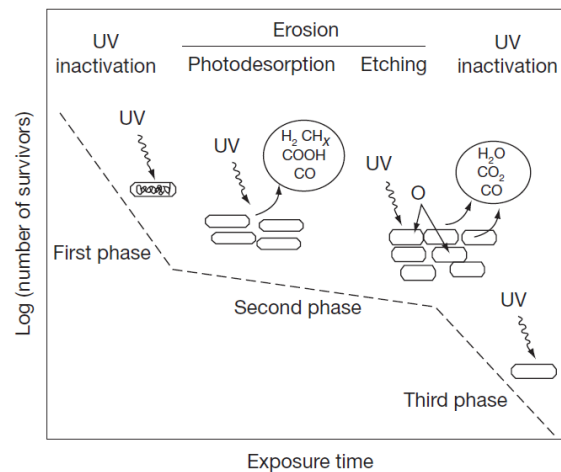


Figura 1.8- Meccanismo di eliminazione dei microrganismi durante le tre fasi di sterilizzazione con gas plasma [23].

Questo processo lavora a basse temperature per distruggere rapidamente i microrganismi, ed è per questo che è considerato un metodo promettente per tutti quei materiali e dispositivi sensibili al calore e all'umidità come le plastiche, i dispositivi elettrici e i metalli sensibili alla corrosione. Gli effetti del gas plasma a basse temperature su alcuni biomateriali di origine biologica, in particolare sul collagene, sono ancora poco noti, anche se si ritiene che esso induca un cross-linking superficiale e migliori la resistenza dei polimeri trattati all'abrasione e ai danni meccanici, senza alterare la struttura e la resistenza a fatica [23].

#### **1.5.4. CRITERI DI SELEZIONE E VALIDAZIONE DEI METODI DI STERILIZZAZIONE PER I BIOMATERIALI**

L'esposizione a un processo di sterilizzazione correttamente validato e accuratamente controllato non fornisce la garanzia che il prodotto sia sterile e quindi applicabile nella clinica. Per la convalida e il controllo del processo di sterilizzazione è importante constatare il contenuto microbiologico presente durante il processo, in termini di numero, di caratteristiche e di proprietà dei microrganismi [23]. A tal proposito, il termine *bioburden*, o carico biologico, viene usato per descrivere la popolazione di microrganismi vitali ancora presenti in un prodotto sterile. La quantificazione del carico biologico può essere utilizzata per la validazione e riqualificazione dei processi di sterilizzazione [32].

Come già precedentemente descritto ogni metodo di sterilizzazione presenta vantaggi e limitazioni, da considerare con attenzione per scegliere il trattamento più idoneo per il materiale di interesse.

Il processo di scelta del metodo dovrebbe tenere conto di queste indicazioni generali:

- effettuare una valutazione della carica microbica (o *bioburden*) sul biomateriale o dispositivo medico: più alto sarà il livello di *bioburden* e più incisivo sarà l'approccio di sterilizzazione;
- valutare lo *sterilizzante* (gas o liquido) da utilizzare, il quale deve entrare in contatto diretto con i microrganismi durante il processo di sterilizzazione.
- considerare il tipo di biomateriale da sterilizzare: la sua biocompatibilità deve essere garantita alla fine del trattamento;
- il processo di sterilizzazione non deve alterare le proprietà del materiale sterilizzato in modo da non compromettere le sue funzionalità [23].

Al fine di dimostrare la reale efficacia di un metodo di sterilizzazione usato, la valutazione della sterilità deve essere effettuata anche simulando la peggiore situazione di carica microbica, per esempi in condizioni di elevato *bioburden* presente negli *scaffold* biologici o di contaminazione da parte dei batteri più resistenti allo specifico protocollo di disinfezione/sterilizzazione adottato. Infatti, la verifica del controllo di qualità e la quantificazione/qualificazione di eventuali contaminanti resistenti devono essere effettuati per la validazione del metodo di sterilizzazione poiché in questo modo si possono introdurre delle migliorie per garantire la sterilità dei sostituti biologici prima del loro impianto *in vivo* [31]. Si rende, quindi, necessaria la determinazione quantitativa dei microrganismi, in termini di numero di cellule e/o quantità di biomassa.

È possibile classificare i metodi di conta microbica in:

- metodi diretti, basati su conta microscopica e conta vitale in piastra;
- metodi indiretti, ovvero turbidimetria, determinazione del consumo o della produzione di molecole o di componenti chimici cellulari, determinazione del peso secco cellulare e del volume di biomassa;
- determinazione del numero più probabile di cellule batteriche (*Most Probable Number*, MPN);
- conta per filtrazione su membrana [22].

#### **1.5.4.1. METODI DIRETTI**

Questi metodi si basano sulla determinazione del numero di cellule batteriche e si distinguono in conta microscopica e conta vitale in piastra.

Il primo metodo consiste nella conta delle cellule mediante microscopio (conta diretta totale) e permette di stabilire il numero totale di cellule presenti in un volume noto di sospensione microbica. Con questa tecnica vengono utilizzati particolari vetrini (Thomas-Zeiss, Petroff-Hausser o Burker) o camere di conteggio, ossia strumenti microbiologici convalidati per contare direttamente le cellule. A seconda del microrganismo possono essere applicate diverse camere di conteggio e diverse impostazioni del microscopio [33]. Con la **conta microscopica** è possibile determinare direttamente le cellule microbiche presenti nel campione (conta totale), senza distinguere tra vive e morte. Il conteggio viene effettuato con un microscopio ottico e il numero di cellule microbiche si calcola tramite un fattore moltiplicativo riferito al volume di liquido contenuto nella camera di conta. Questo metodo possiede il grande vantaggio di avere tempi di esecuzione inferiori rispetto agli altri metodi diretti, però non permette la distinzione tra cellule vive e morte perché è difficile distinguere cellule molto piccole (con il rischio che non vengano contate) e non è adatto per sospensioni a basse densità cellulare (meno di  $10^6$  UFC/mL) [22].

Per il conteggio esclusivo di cellule vitali, viene effettuata una **conta vitale in piastra** (conta in piastra o conta delle colonie), che consiste nel determinare il numero di cellule presenti in un campione contando le colonie che si originano da tali cellule in grado di svilupparsi su un opportuno terreno di coltura contenente agar (un polisaccaride prodotto da alghe marine che viene aggiunto al terreno di coltura per consentirne la solidificazione). Il conteggio delle colonie sviluppatesi nel terreno di coltura permette di risalire al numero di microrganismi presenti nell'unità di volume (o di peso) del campione [22] e dovrebbe essere tale che ogni microrganismo vitale sia in grado di esprimersi come una colonia visibile senza essere influenzato negativamente dalle colonie vicine ad esso [32].

Questa tecnica ha il vantaggio di essere molto sensibile poiché possono essere contati campioni contenenti pochissime cellule, inoltre, utilizzando terreni colturali selettivi è possibile contare solo particolari gruppi di microrganismi all'interno di una popolazione mista [22]. La conta vitale in piastra presenta alcune limitazioni, che includono: la potenziale sottostima della quantità di batteri quando una singola colonia proviene da grandi aggregati, e la difficoltà di interpretazione, quando più piastre mostrano colonie nell'intervallo numerabile [34].

Ci sono due metodi per effettuare una conta in piastra:

- metodo per inclusione, in cui si ha lo sviluppo delle colonie all'interno del terreno contenente agar;
- metodo per spandimento in superficie, in cui si ha lo sviluppo delle colonie sulla superficie di un terreno agarizzato.

Il conteggio delle colonie può essere effettuato manualmente o tramite apparecchi conta-colonie. I risultati vengono espressi come numero di Unità Formanti Colonie (UFC) per unità di volume (o di peso) di campione [22].

#### ***1.5.4.2. METODI INDIRETTI***

I metodi indiretti, a differenza di quelli diretti, consistono nella determinazione di parametri di tipo chimico-fisico che vengono correlati alla quantità di biomassa microbica presente nel campione di partenza. Il parametro rilevato è correlato alla biomassa totale e non a quella vitale [22].

La **misurazione della torbidità** di una sospensione è un approccio comunemente utilizzato che consente una valutazione rapida ed economica della crescita rispetto alla conta vitale in piastra [34]. La turbidimetria è una metodica di analisi che permette di determinare il livello di torbidità di un liquido sfruttando l'assorbimento e la riflessione (assorbanza) dei raggi luminosi di determinate lunghezza d'onda utilizzando uno spettrofotometro. Quest'ultimo misura la quantità di luce che viene assorbita (o deviata) da parte di sostanze in soluzione o da parte di particelle (cellule) in sospensione. Come accennato, la grandezza che misura lo strumento è l'assorbanza, espressa come:

$$A = \log_{10}(I_0/I)$$

$I_0$ =intensità della radiazione monocromatica incidente;

$I$ =intensità della radiazione monocromatica trasmessa [35].

Variando la lunghezza d'onda della luce emessa dalla sorgente luminosa è possibile inoltre effettuare misurazioni specifiche della concentrazione dei diversi componenti presenti in soluzione. Per l'analisi spettrofotometrica, la soluzione è posta all'interno di particolari contenitori, perlopiù di vetro, dette cuvette [22]. La sospensione cellulare appare torbida perché ogni cellula intercetta e riflette la luce. Pertanto, quanto maggiore sarà il numero di cellule presenti, tanto più la sospensione assorbirà e/o rifletterà la luce e tanto maggiore sarà la sua

torbidità. Questa tecnica rapida e non distruttiva consente una determinazione indiretta ma semplice, dello sviluppo microbico. Nella determinazione spettrofotometrica dell'assorbanza di una coltura microbica si impiegano radiazioni monocromatiche la cui lunghezza d'onda cade all'interno del campo della luce visibile, ovvero tra 480 e 640 nm [22], [36]. Il valore ottenuto tramite la valutazione della torbidità è relativo al numero totale di cellule quindi non vi è una distinzione tra cellule vitali o morte anche se, nel caso di popolazioni microbiche in fase di crescita esponenziale il numero di cellule vive non si discosta di molto da quello totale [22]. Una limitazione di questa tecnica di conta riguarda il fatto che può essere applicata solo a colture liquide e con alti limiti di rilevazione ( $10^7$  UFC ml<sup>-1</sup>) e di conseguenza ottenendo poche informazioni dirette sulla fase di latenza [37].

Inoltre, nello studio condotto da Clais *et al.* è stato dimostrato che nel conteggio di batteri anaerobi (*Porphyromonas gingivalis*), questa tecnica presenta una bassa accuratezza, in quanto le densità ottiche sono scarsamente correlate con i valori attesi. Diversi fattori contribuiscono a errori di conteggio e quindi alla bassa precisione. In primo luogo, i batteri vivi e morti contribuiscono alla torbidità, comportando una fase di crescita esponenziale al momento dell'analisi che rende difficile la standardizzazione del campionamento [34]. Nonostante queste limitazioni, però, questa tecnica risulta rapida, facile e non distruttiva (se i prelievi vengono effettuati in completa sterilità) e viene ampiamente utilizzata per un'approssimazione rapida delle concentrazioni batteriche [22], [34].

Altri metodi indiretti consistono in:

- **determinazione del consumo o della produzione di molecole** (ad esempio, consumo di O<sub>2</sub> e produzione di CO<sub>2</sub>) **o di componenti chimici cellulari** (azoto, proteine totali, fosforo e ATP). Con questo metodo, la quantità di questi componenti fornisce una determinazione abbastanza accurata della biomassa microbica presente;
- **determinazione del peso secco cellulare**: il peso secco della biomassa microbica presente in un volume noto di terreno di coltura può essere determinato attraverso la misurazione della massa cellulare, raccolta tramite centrifugazione o filtrazione dopo suo essiccamento;
- **determinazione del volume di biomassa**: viene centrifugato un volume noto di sospensione microbica in provette tarate e poi si procede valutando il volume del sedimento ottenuto. Il dato viene espresso come percentuale rispetto al volume della sospensione microbica di partenza [22].

#### **1.5.4.3. MOST PROBABLE NUMBER (MPN)**

Il metodo MPN è un metodo utilizzato per la stima del numero di microrganismi vitali in un campione in cui i microrganismi sono distribuiti casualmente ed è particolarmente adatto quando si ha un basso livello di carica biologica [32].

Nella determinazione del MPN si impiegano una serie di tubi contenenti terreno di coltura liquido (il brodo nutriente sosterrà la crescita degli organismi e diventerà torbido) che vengono inoculate con una quantità fissa di diluizioni in serie decimale del campione [22], [38]. Maggiore è il numero di tubi (ogni serie è costituita da 2 a 5 tubi) utilizzato per il numero di diluizione, maggiore risulterà il grado di affidabilità della conta. Dopo incubazione, solo in alcuni tubi sarà possibile visualizzare lo sviluppo di microbi, identificato tramite intorbidamento del terreno e/o in base a qualche caratteristica metabolica dei microrganismi ricercati[22].

I risultati vengono poi espressi sotto forma probabilistica come numero più probabile di microrganismi per unità di volume (o di peso) del campione. Il calcolo del MPN viene effettuato dopo incubazione e sulla base dei tubi risultati torbidi (positivi), alle varie diluizioni [22]. Dalla frequenza con cui si verificano i risultati positivi all'interno di una serie di repliche, viene effettuata una stima del numero di microrganismi vitali presenti nel campione [32]. I risultati, registrati in termini di presenza/assenza di sviluppo nelle successive serie di tubi, vengono confrontati con apposite tabelle (Tabella 1.2). In queste, sono riportati i valori per unità di volume (o di peso) del campione e il valore minimo e massimo, che delimitano l'intervallo nel quale si considera compreso il 95% dei valori totali possibili per quella determinata combinazione [22]. Gli intervalli di confidenza al 95% nelle tabelle hanno il seguente significato: prima che le provette siano inoculate, la probabilità è almeno del 95% che l'intervallo di confidenza associato al risultato includa la concentrazione effettiva [39]. La tabella MPN normalmente presenta solo i risultati per tre diluizioni in sequenza (ad esempio,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ), ma le serie di diluizioni testate potrebbero provenire da provette diluite da  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$  [38].



Il calcolo del MPN può essere ottenuto tramite la formula generale:

$$\sum_{j=1}^k \frac{g_j m_j}{1 - \exp(-\lambda m_j)} = \sum_{j=1}^k t_j m_j$$

Dove:

- $K$  indica il numero di diluizioni;
- $g_j$  indica il numero di provette positive (o crescita) nella  $j$ -esima diluizione;
- $m_j$  indica la quantità del campione originale messo in ciascun tubo nella  $j$ -esima diluizione;
- $t_j$  indica il numero di tubi nella diluizione  $j$  [39].

Il requisito chiave per l'applicazione del metodo MPN è una distribuzione casuale di microrganismi su tutto il campione in esame e un'accurata diluizione del campione attraverso la serie di diluizioni [22], [38]. Assume anche che i microrganismi siano separati e non si influenzino a vicenda (ovvero si attraggono o respingono) e, inoltre, si deve presumere che ogni provetta il cui inoculo abbia un singolo organismo vitale produca una crescita visibile [38].

Di conseguenza, questo metodo può essere utilizzato per la determinazione della carica biologica su campioni liquidi, fluidi viscosi, polveri o in situazioni in cui il *bioburden* viene stimato in un liquido impiegato come eluente per un singolo prodotto. Inoltre, il metodo MPN è semplice da eseguire e la base statistica del metodo lo rende più appropriato per una valutazione generale piuttosto che per determinazioni accurate [32].

Tabella 1 Per 3 provette ciascuna con 0,1, 0,01 e 0,001 g di inoculo, gli MPN per grammo e gli intervalli di confidenza al 95%.											
Pos. tubi			MPN / g	Conf. lim.		Pos. tubi			MPN / g	Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001		Basso	alto	0.10	0.01	0.001		Basso	alto
0	0	0	<3.0	-	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0,17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1.000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1.000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2.000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4.100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	> 1100	420	-

Tabella 1.2: Tabella MPN per un design a tre repliche dal *Bacterial Analytical Manual* della FDA [39].

#### ***1.5.4.4. CONTA PER FILTRAZIONE SU MEMBRANA***

Questo metodo è impiegato per la conta di microrganismi in campioni liquidi, a basse concentrazioni di microrganismi [32]. Consiste nel filtrare un volume noto di campione attraverso una membrana filtrante a base di acetato di cellulosa che, data la sua microporosità (pori aventi diametro pari a 0,20  $\mu\text{m}$ ), è in grado di trattenere le cellule microbiche [22]. Se si usano filtri di diametro differente, i volumi delle diluizioni e dei lavaggi devono essere aggiustati di conseguenza [35].

Terminata la filtrazione la membrana è posta sulla superficie di un terreno agarizzato, su piastre Petri. Il terreno ricco di sostanze nutritive consente lo sviluppo delle cellule rimaste sulla membrana filtrante. Dopo un periodo di incubazione, si potrà evidenziare lo sviluppo di colonie a partire dalla singola cellula intrappolata sulla membrana. Il numero delle colonie formate verrà riferito all'unità di volume del liquido filtrato, consentendo la determinazione del numero di microrganismi presenti. Questo metodo è molto rapido per cui si possono esaminare grandi quantità di volume di liquidi [22].

La filtrazione a membrana è anche utile quando si sospetta che il substrato liquido contenga sostanze microbicide o microbiostatiche, poiché i microrganismi vengono rimossi dall'eluente e possono essere lavati sul filtro a membrana prima dell'incubazione. Alcuni tipi di membrana possono assorbire o rilasciare sostanze che possono inibire la crescita di microrganismi, quindi è importante utilizzare filtri a membrana adatti per il conteggio di microrganismi. Inoltre, il filtro a membrana e l'eluente dovrebbero essere compatibili [32].

## 2. LA SOTTOMUCOSA INTESTINALE (SIS) PORCINA DECELLULARIZZATA E STERILIZZATA COME SCAFFOLD PER APPLICAZIONI CLINICHE

---

Una delle ECM maggiormente utilizzate clinicamente deriva dalla SIS. Questo tessuto è particolarmente promettente in quanto è biocompatibile, facile da maneggiare, resiste nel tempo, possiede un potenziale di rimodellamento e rigenerazione con scarsa predisposizione alla cicatrizzazione e alla calcificazione [40].

### 2.1. COMPONENTI E STRUTTURA

La SIS è uno strato connettivale molto sottile (~100  $\mu$ m), situato tra la mucosa e lo strato muscolare, che deriva dalla porzione digiunale dell'intestino tenue suino (Figura 2.1) [40], [41]. Lo strato sottomucoso fornisce resistenza all'intestino tenue attraverso una complessa organizzazione di collagene che forma una ECM fibrosa [42].

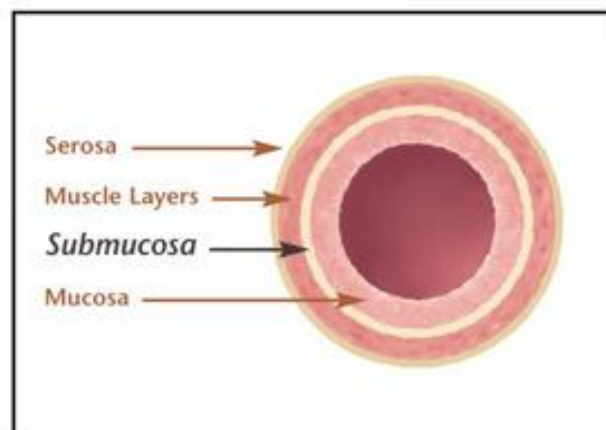


Figura 2.1: Schematizzazione degli strati dell'intestino tenue del maiale, in sezione trasversale [43].

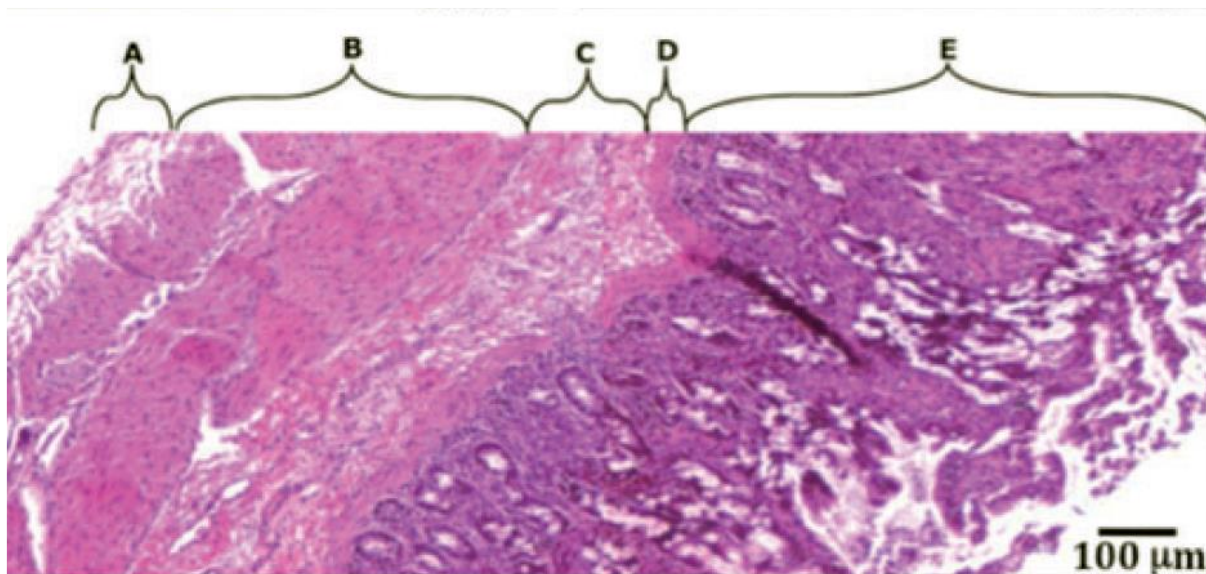


Figura 2.2: Ematossilina ed eosina (H&E) dell'intestino tenue porcino nativo. A, *serosa*; B, *muscularis*; C, *submucosa*; D, *muscularis mucosa*; E, *mucosa* [44].

In particolare, il lato della sierosa rappresenta gli strati del tessuto connettivo sottostante la superficie membranosa, è meno denso ed è composto da una rete di collagene, fibre reticolari ed elastiche con diametro variabile; invece, il lato della mucosa (submucoso luminale) è composto da fibre strettamente impaccate e ha una superficie relativamente liscia e densa (Figura 2.2) [44], [45].

La ECM della SIS, o SIS-ECM, è costituita da specifiche proteine quali collagene (90% prevalentemente di tipo I, ed in minor quantità di tipi III, IV, V e VI), fibronectina e laminina, GAGs (ad esempio, eparan solfato, condroitin e acido ialuronico), che aiutano a regolare la densità della matrice ed a inibire la formazione di cicatrici durante il processo di guarigione [46], infine proteoglicani, GF e molecole di adesione in grado di promuovere il rimodellamento del tessuto [40], [47].

Le fibre di collagene sono orientate parallelamente lungo l'asse longitudinale dell'intestino tenue [40], [41]. È probabile che questa particolare disposizione a spirale delle fibre collagene, assieme allo strato di cellule muscolari lisce adiacenti, faciliti la dilatazione e la retroazione dell'intestino tenue, ovvero i movimenti specifici nel trasporto del bolo lungo il lume digestivo [40], [48].

La fibronectina promuove l'adesione e la migrazione dei fibroblasti, delle cellule endoteliali e dei monociti. Inoltre, favorisce l'assemblaggio della membrana basale. La sua presenza può

avere un ruolo significativo per l'ancoraggio iniziale delle cellule alla SIS e per la loro successiva proliferazione [49].

La SIS, inoltre, è molto ricca di vari GF, come TGF- $\beta$ , anche di tipo 1, b-FGF, e VEGF [16], [40], [46], [50].

Questi GF, rilasciati durante la degradazione dello *scaffold*, possono promuovere l'angiogenesi e altre attività mitogeniche *site-specific*, oltre a stimolare il differenziamento cellulare durante il processo di rimodellamento [40], [50]. Infatti, il b-FGF agisce sulla proliferazione dei fibroblasti, l'angiogenesi e l'aumento della sintesi di collagene. Il VEGF promuove l'angiogenesi, la permeabilità vascolare delle cellule endoteliali e stimola la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali [50]. Il TGF- $\beta$  favorisce la proliferazione e il differenziamento cellulare, la guarigione delle ferite e inibisce la proliferazione dei macrofagi e linfociti, mentre il TGF- $\beta$ 1 regola l'angiogenesi e la formazione della matrice rigenerativa nelle ferite di guarigione, anche se questo GF provoca anche effetti avversi in molte condizioni patologiche [1], [17].

La SIS-ECM viene spesso impiegata in clinica nella sua forma acellulare, diversi studi hanno riportato vari metodi per decellularizzarla, in modo da evitare reazioni infiammatorie avverse e rigetto immunologico dopo il suo impianto. Ji *et al.* hanno confrontato tre metodi di decellularizzazione, pubblicati in letteratura, ovvero il metodo ideato da Badylak *et al.*, quello di Abraham *et al.*, ed infine, di Luo *et al* [51].

Nel metodo di Badylak *et al.*, l'intestino tenue è stato congelato a  $-80^{\circ}\text{C}$  e scongelato; tramite abrasione meccanica sono stati rimossi gli strati di sierosa e di *tunica* mucosa per ottenere il foglio di SIS. In seguito, per disinfettare, decellularizzare e sterilizzare la SIS; essa è stata trattata con una soluzione di 0,1% PAA e 4% etanolo per 2 ore in agitazione continua [51], [52].

Abraham *et al.*, invece, una volta ottenuta la SIS, come descritto nel metodo precedente, l'hanno decellularizzata impiegando un trattamento multi-step. Inizialmente, è stata incubata in una soluzione contenente EDTA e idrossido di sodio (NaOH) per 16 ore. Successivamente, è stata lasciata in acido cloridrico (HCl) e sodio cloruro (NaCl) per 8 ore. Infine, è stata trattata con NaCl e *Phosphate Buffer Saline* (PBS) [51], [53].

L'ultimo metodo, di Luo *et al.*, consisteva in un protocollo a più fasi che includeva la rimozione meccanica degli strati di sierosa, della *tunica* muscolare e della mucosa, la sgrassatura, la digestione enzimatica, la decellularizzazione con SDS e la sterilizzazione con irradiazione  $\gamma$ .

La sgrassatura è stata eseguita immergendo la SIS in una soluzione contenente metanolo e cloroformio per 12 ore. In seguito, il materiale è stato decellularizzato con 0,5 % di SDS in 0,9% di NaCl, in continua agitazione per 4 ore. Infine, la SIS è stata trattata con 0,1% PAA e 20% di etanolo per 30 minuti [50], [51].

Con tutti e tre i metodi i nuclei sono stati rimossi, ma le fibre di collagene della ECM hanno riportato danni che includevano disallineamento e vari gradi di rottura, specialmente nei campioni SIS trattati con il secondo e il terzo metodo. Ad ogni modo, il contenuto di DNA degli *scaffold* SIS, preparati con tutti e tre i metodi, era al di sotto del valore di soglia di 50 ng/mg, proposto da Crapo *et al.* [20]. Inoltre, le SIS trattate con il metodo di Luo *et al.* presentavano una ridotta concentrazione di proteine della ECM, probabilmente dovuta alla più aggressiva decellularizzazione, in particolare all'utilizzo di tripsina, che causa più danni alla struttura e alle proteine. Ad ogni modo, tutti e tre i metodi hanno mostrato una decellularizzazione soddisfacente, mantenendo la maggior parte dei componenti bioattivi, come le proteine identificate tramite analisi proteomica [50]–[53].

Oltre alle proteine strutturali, anche i GF presenti nella SIS-ECM e il mantenimento della loro bioattività dipendono molto dalle tecniche di decellularizzazione e sterilizzazione adottate.

Per molti di questi GF, si è mantenuta la bioattività anche dopo sterilizzazione terminale, come è stato dimostrato nello studio condotto da McDevitt *et al.* in cui solo l'8% del contenuto di TGF- $\beta$ 1 nella SIS nativa è stato rimosso o distrutto durante la realizzazione del materiale nella sua formulazione finale Oasis®. La disinfezione con PAA, la sterilizzazione con EtO e il processo di liofilizzazione da loro utilizzato non hanno quindi ridotto il quantitativo di TGF- $\beta$ 1 nel prodotto SIS finale [17].

Nello studio condotto da Luo *et al.*, descritto sopra, è stato osservato invece che il metodo multi-step applicato ha ridotto i livelli dei GF, inclusi VEGF, b-FGF e TGF- $\beta$ , di circa il 50% rispetto al contenuto originale della SIS nativa [50].

Le tecniche di decellularizzazione e sterilizzazione applicate possono modificare le proprietà biomeccaniche della SIS. Nella forma nativa, essa è un materiale molto sottile con proprietà viscoelastiche e tensionali che garantiscono una maggiore resistenza e rigidità lungo la direzione della fibra preferenziale rispetto alla direzione della fibra incrociata [48], [54]. Dopo processamento, la resistenza di uno *scaffold* SIS può essere aumentata mediante la realizzazione di costrutti con più strati di materiale, che vengono uniti insieme tramite un processo di pressatura sottovuoto a produrre e un dispositivo più spesso, secco e rigido [47], [48].

Ad esempio, Restore® *orthobiologic soft tissue implant* (DePuy Synthes Joint Reconstruction, Warsaw, IN, USA) è costituito da 10 strati di SIS-ECM [47].

In seguito alla reidratazione del costrutto, si ripristinano le sue caratteristiche di flessibilità ed elasticità (Figura 2.3) [48].



Figura 2.3: SIS porcina decellularizzata, il materiale è tornato elastico dopo essere stato reidratato [55].

Fra tutte le SIS-ECM, la Cormatrix® (*CorMatrix Cardiovascular, Inc.*, Roswell, Atlanta e Alpharetta, GA, USA) è uno dei prodotti commerciali che ha trovato maggiore applicazione nella chirurgia cardiovascolare (Figura 2.4). Viene commercializzata come materiale SIS porcina decellularizzata, non reticolata e liofilizzata, costituita da 4 o 6 strati pressati insieme per formare un'unica membrana dallo spessore di circa 100  $\mu\text{m}$ . La Cormatrix® liofilizzata è



disponibile in due dimensioni e deve essere reidratata (10 minuti a temperatura ambiente in una soluzione salina sterile), per ritornare flessibile ed elastica prima del suo utilizzo [40].



Figura 2.4: Cormatrix ECM® (CorMatrix Cardiovascular, Inc., Roswell, Atlanta e Alpharetta, GA, USA) [56].

I processi di disidratazione e reidratazione possono influenzare l'adesione cellulare, come è stato dimostrato nello studio condotto da Badylak *et al.* in cui è stata valutata l'aderenza delle cellule endoteliali umane dal microcircolo dermale (HMECs) a forme idratate e disidratate di SIS acellulare e riassorbibile, anche dopo funzionalizzazione con uno dei quattro componenti principali della ECM (collagene di tipo I, collagene di tipo IV, fibronectina e laminina). I risultati ottenuti dimostrano che le HMEC aderiscono maggiormente alla SIS-ECM idratata rispetto alle superfici funzionalizzate, questo perché la SIS risulta già ricca di GF, collagene, laminina e fibronectina che hanno un ruolo fondamentale nell'adesione, proliferazione, migrazione e differenziamento cellulare. Inoltre, anche l'ultrastruttura della ECM può avere un ruolo fondamentale nell'adesione delle cellule endoteliali. L'aderenza delle HMEC avveniva in maniera migliore nella SIS idratata rispetto alla disidratata e poi reidratata; questo perché la disidratazione determina una denaturazione delle proteine fondamentali per il legame cellule-ECM [57].

## 2.2. PROCESSO DI BIOINDUZIONE, RIMODELLAMENTO E DEGRADAZIONE DELLA SIS-ECM

Come già descritto, la SIS-ECM presenta proprietà bioinduttive e alta biodegradabilità che la rendono uno *scaffold* promettente per il rimodellamento tissutale grazie alla sua alta concentrazione di GF in grado di favorire angiogenesi, mitogenesi e differenziamento cellulare [40].

Il processo di degradazione dello *scaffold* SIS e il rilascio dei GF continua fino a quando l'intera "impalcatura" non è completamente degradata [48].

Questo processo di rimodellamento non è ancora del tutto noto e finora si è proposto il cosiddetto modello di bioinduzione [58], che prevede diversi meccanismi:

1. la degradazione dello *scaffold* mediante l'azione di enzimi e monociti sottoposti a percorsi distintivi di differenziamento nei macrofagi con fenotipo M2 o M1. Il fenotipo M2 stimola il rimodellamento e l'integrazione della matrice all'interno del tessuto attraverso il rilascio di citochine antinfiammatorie, mentre il macrofago M1 promuove la secrezione di citochine pro-infiammatorie ed è associato ad una infiammazione cronica [59], [60];
2. il rilascio di GF, come VEGF, TGF- $\beta$  e altri peptidi (ad es. endostatina e angiostatina) dalla ECM degradabile [48];
3. l'infiltrazione delle cellule del ricevente che sostengono il rimodellamento tissutale [60].

In particolare, i peptidi criptici (prodotti di degradazione delle molecole costituenti la ECM) rilasciati dal processo di degradazione avviano e sostengono il reclutamento delle cellule circolanti derivate dal midollo osseo, che partecipano attivamente al rimodellamento tissutale a lungo termine [48]. In questo modo, la degradazione della ECM può avviare un processo di rimodellamento fisiologico innestando una risposta antinfiammatoria di tipo M2, con rapida sostituzione della SIS-ECM e formazione di nuovo tessuto [58].

La SIS-ECM una volta impiantata nel sito anatomico di interesse scatena da parte del destinatario il rilascio di anticorpi associati al profilo  $T_{\text{helper}}$  di tipo -2 in associazione ai macrofagi M2. Vengono quindi secrete varie interleuchine, come IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, ovvero citochine che sono correlate all'accettazione dell'impianto [48], [59].

In uno studio condotto da Allman *et al.* la SIS-ECM è stata impiantata per via sottocutanea su un modello di topo, e la risposta da parte del ricevente è stata confrontata con quelle indotte da impianto di un altro tessuto xenogenico (muscolo di ratto) e di un tessuto singenico (ossia proveniente da muscolo da individui murini geneticamente identici). Il tessuto muscolare xenogenico dopo 28 giorni dall'impianto ha indotto una risposta caratteristica del rigetto dell'impianto, ossia mostrava necrosi, formazione di granuloma e incapsulamento. Il tessuto muscolare singenico presentava una lieve risposta infiammatoria e l'innesto presentava un tessuto morfologicamente organizzato, coerente con l'accettazione dell'impianto. La risposta dell'ospite alla SIS-ECM era simile a quella del tessuto muscolare singenico: dopo 10 giorni l'infiltrato di cellule mononucleate con pochi neutrofili sparsi era diminuito e l'impianto era circondato da una maggiore organizzazione tissutale e proliferazione fibroblastica, che indicava che stava avvenendo un rimodellamento del tessuto. Dopo 28 giorni, il processo infiammatorio si è completamente risolto seguito da riassorbimento e rimodellamento da parte del tessuto nativo, con accettazione dell'impianto. I topi non hanno sviluppato una risposta immunitaria avversa verso la SIS-ECM e l'analisi delle citochine tissutali hanno mostrato un aumento dell'espressione del IL-4 prodotto dai linfociti Th2, che avviano il processo di accettazione dell'impianto [61].

La SIS-ECM, inoltre, presenta la capacità di essere rapidamente biodegradata dall'organismo, come è stato dimostrato negli studi condotti da Record *et al.* e da Gilbert *et al.*

Nel primo studio, è stato dimostrato che un *bioscaffold* derivato dalla SIS (marcata con  $^{14}\text{C}$ , una biomolecola di tracciamento) viene completamente e rapidamente degradato dopo il suo impianto *in vivo* per la riparazione della vescica urinaria in un modello canino. Inoltre, è stato dimostrato che i sottoprodotti di degradazione della SIS entrano solo brevemente in circolo e vengono rapidamente escreti tramite l'escrezione urinaria, in quanto non vi è stato alcun accumulo significativo di  $^{14}\text{C}$  negli altri organi e tessuti [62].

Nel secondo studio, il 60 % della massa totale di SIS (marcata come descritto sopra), impiegata per la ricostruzione del tendine sempre in modello canino, è stata degradata e riassorbita entro 4 settimane dall'impianto e la sua rimozione completa si è verificata entro 3 mesi. Anche in questo caso, i prodotti di degradazione riassorbiti sono stati eliminati completamente attraverso l'escrezione urinaria [63].

## 2.3. AMBITI DI APPLICAZIONE

Come già descritto nel capitolo precedente, vari *scaffold* sono di interesse biomedico (Tabella 2.1) e fra questi la SIS-ECM ha assunto sempre più rilevanza nelle applicazioni cliniche, grazie ai suoi numerosi vantaggi. Innanzitutto, è biocompatibile, facile da maneggiare e resiste nel tempo, possiede un potenziale di rimodellamento e rigenerazione del tessuto, con scarsa predisposizione alla cicatrizzazione e alla calcificazione [40].

Product	Company	Material	Chemical modification	Form	Use
<i>Acellular</i> Oasis <sup>®</sup>	Healthpoint	Porcine small intestinal submucosa (SIS)	Natural	Dry sheet	Partial & full thickness wounds; superficial and second degree burns
Xelma <sup>™</sup>	Molnlycke	ECM protein, PGA, water		Gel	Venous leg ulcers
AlloDerm	Lifecell	Human skin	Cross-linked	Dry sheet	Abdominal wall, breast, ENT/head & neck reconstruction, grafting
CuffPatch <sup>™</sup>	Arthrotek	Porcine small intestinal submucosa (SIS)	Cross-linked	Hydrated sheet	Reinforcement of soft tissues
TissueMend <sup>®</sup>	TEI Biosciences	Fetal bovine skin	Natural	Dry sheet	Surgical repair and reinforcement of soft tissue in rotator cuff
Durepair <sup>®</sup>	TEI Biosciences	Fetal bovine skin	Natural	Dry sheet	Repair of cranial or spinal dura
Xenform <sup>™</sup>	TEI Biosciences	Fetal bovine skin	Natural	Dry sheet	Repair of colon, rectal, urethral, and vaginal prolapse, pelvic reconstruction, urethral sling
SurgiMend <sup>™</sup>	TEI Biosciences	Fetal bovine skin	Natural	Dry sheet	Surgical repair of damaged or ruptured soft tissue membranes
PriMatrix <sup>™</sup>	TEI Biosciences	Fetal bovine skin	Natural	Dry sheet	Wound management
Permacol <sup>™</sup>	Tissue Science Laboratories	Porcine skin	Cross-linked	Hydrated sheet	Soft connective tissue repair
Graft Jacket <sup>®</sup>	Wright Medical Tech	Human skin	Cross-linked	Dry sheet	Foot ulcers
Surgisis <sup>®</sup>	Cook SIS	Porcine small intestinal submucosa (SIS)	Natural	Dry sheet	Soft tissue repair and reinforcement
Durasis <sup>®</sup>	Cook SIS	Porcine small intestinal submucosa (SIS)	Natural	Dry sheet	Repair dura matter
Stratasis <sup>®</sup>	Cook SIS	Porcine small intestinal submucosa (SIS)	Natural	Dry sheet	Treatment of urinary incontinence
OrthADAPT <sup>™</sup>	Pegasus Biologicals	Horse pericardium	Cross-linked		Reinforcement, repair and reconstruction of soft tissue in orthopedics
DurADAPT <sup>™</sup>	Pegasus Biologicals	Horse pericardium	Cross-linked		Repair dura matter after craniotomy
Axis <sup>™</sup> dermis	Mentor	Human dermis	Natural	Dry sheet	Pelvic organ prolapse
Suspend <sup>™</sup>	Mentor	Human fascia lata	Natural	Dry sheet	Urethral sling
Restore <sup>™</sup>	DePuy	Porcine small intestinal submucosa (SIS)	Natural	Sheet	Reinforcement of soft tissues
Veritas <sup>®</sup>	Synovis Surgical	Bovine pericardium		Hydrated sheet	Soft tissue repair
Dura-Guard <sup>®</sup>	Synovis Surgical	Bovine pericardium		Hydrated sheet	Spinal and cranial repair
Vascu-Guard <sup>®</sup>	Synovis Surgical	Bovine pericardium			Reconstruction of blood vessels in neck, legs, and arms
Peri-Guard <sup>®</sup>	Synovis Surgical	Bovine pericardium			Pericardial and soft tissue repair

Tabella 2.1: Elenco di alcuni dispositivi disponibili in commercio composti da ECM [48]

Infatti, è stata introdotta con successo in ambito chirurgico come nuovo biomateriale e ha trovato diversi ambiti di applicazione, ovvero come *patch* nella chirurgia cardiovascolare [56], [64]–[67], nella riparazione del miocardio e chiusura del pericardio [68]–[70], per la costruzione dei lembi per le valvole cardiache [71]–[75], nella rigenerazione della vescica [76]–[79] e dell’urotelio [80], nella riparazione di muscoli [81], [82], delle pareti addominali [83] e del tendine di Achille [63], nella rigenerazione del tessuto tracheale [84], nella guarigione di ferite ed ulcere [55] e nell’ambito gastrointestinale [85]–[88].

Product	Company	Material	Processing	Form	Clinical Use
CorMatrix ECM <sup>®</sup>	CorMatrix Cardiovascular, Inc., Roswell, GA, USA	Porcine SIS	Natural	Dry sheet	Pericardial repair and reconstruction; cardiac tissue repair; carotid repair
Durasis <sup>®</sup>	Cook Biotech, Inc., West Lafayette, IN, USA	Porcine SIS	Natural	Dry sheet	Repair dura matter
Oasis <sup>®</sup>	Cook Biotech, Inc., West Lafayette, IN, USA	Porcine SIS	Natural	Dry sheet	Partial and full thickness wounds; superficial and second degree burns
Restore <sup>®</sup> orthobiologic soft tissue implant	DePuy Synthes Joint Reconstruction, Warsaw, IN, USA	Porcine SIS	Natural	Dry sheet	Reinforcement of soft tissues
Stratasis <sup>®</sup>	Cook Biotech, Inc., West Lafayette, IN, USA	Porcine SIS	Natural	Dry sheet	Treatment of urinary incontinence
Surgisis <sup>®</sup>	Cook Biotech, Inc., West Lafayette, IN, USA	Porcine SIS	Natural	Dry sheet	Soft tissue repair and reinforcement

Tabella 2.2: Elenco dei prodotti derivati da SIS-ECM attualmente disponibili [56].

Di seguito vengono riportati diversi casi preclinici e clinici in cui trovano impiego questi *scaffold* basati su SIS. Gli studi preclinici hanno portato risultati promettenti e positivi, non si può dire altrettanto però per i casi clinici.

### 2.3.1. STUDI PRECLINICI

Numerosi studi preclinici su modello animale hanno dimostrato la capacità della SIS-ECM porcina nella riparazione e rigenerazione di vari tessuti, come per esempio, della trachea [84], dell'esofago [87], dei legamenti [81], delle pareti addominali [82], [83] ed in ambito cardiovascolare [64]–[68], [74], [75], gastrointestinale [86], [88] e urogenitale [77]–[80].

In campo cardiovascolare il primo studio condotto sulla SIS è stato realizzato nel 1989 da Badylak *et al.*, in cui è stato testato l'utilizzo di una SIS autologa come innesto vascolare di grande diametro (10 mm) in un modello canino. I risultati di questo studio hanno dimostrato l'endotelizzazione della superficie dell'innesto e nessun segno di infezione. L'accumulo di cellule infiammatorie, principalmente macrofagi tissutali, era coerente con la risposta dell'organismo alla guarigione della ferita. Non sono state nemmeno osservate iperplasia intinale o dilatazione aneurismatica dell'innesto [40], [64].

In seguito, è stato realizzato uno studio da Hiles *et al.* per valutare le proprietà meccaniche e fisiche di un innesto aortico realizzato con una SIS porcina su un modello canino. Dopo un mese dall'impianto, l'innesto presentava una struttura visibilmente simile all'arteria nativa. Dopo due mesi, l'innesto rimodellato risultava più spesso e molto più resistente della SIS nativa. Tutto ciò a dimostrazione che il processo di rimodellamento ha trasformato l'innesto in un materiale con proprietà meccaniche intermedie tra quelle della SIS nativa e dell'aorta nativa, acquisendo via via le caratteristiche di un valido sostituto [65].

Un'ulteriore esperienza preclinica in campo cardiovascolare è stata condotta da Padalino *et al.* In questo studio, la Cormatrix® è stata impiegata come *patch* per la chirurgia ricostruttiva cardiovascolare, innestandola nell'aorta addominale in un modello di roditore geneticamente modificato (ratto transgenico GFP (*green fluorescent protein*)), al fine di valutare l'origine della proliferazione cellulare (se da donatore o da ricevente). Le analisi istopatologiche hanno dimostrato che gli innesti SIS espianati non presentavano alcuna infiammazione o effetti degenerativi di calcificazione, dimostrando, invece, un significativo rimodellamento neoangiogenico ed endotelizzazione del lume [40], [66].

Uno studio preclinico, che però ha presentato risultati negativi, è quello condotto da Ropcke *et al.* Lo scopo dello studio era di valutare la morfologia, la funzionalità ed il rigurgito di valvole tricuspидali realizzate con Cormatrix® in un modello porcino. Dopo 6 mesi dall'intervento l'area e l'altezza delle cuspidi erano diminuite. La deiscenza del setto, in tutti gli innesti, ha causato grave dilatazione del ventricolo destro e dell'*annulus* con conseguente rigurgito valvolare. Il fallimento dell'intervento era principalmente dovuto alle tecniche chirurgiche adottate, suture troppo superficiali, che hanno portato alla deiscenza del setto, in quanto l'innesto realizzato con Cormatrix® ha mostrato una funzionalità immediata, segni di rimodellamento del tessuto e potenziale crescita dopo 6 mesi dall'impianto [74].

Al contrario, Rasmussen *et al.* hanno dimostrato che è possibile produrre con successo una valvola polmonare a tre cuspidi con supporto prossimale, per evitare il restringimento della valvola, realizzata interamente con materiali biodegradabili. La valvola è stata costruita impiegando Cormatrix® ed il supporto anulare con LactoSorb® (*Biomet Microfixation*, Jacksonville, USA), un sistema di fissazione riassorbibile, utilizzato principalmente nella chirurgia ossea e non ancora in chirurgia cardiaca [89]. La valvola è stata valutata *in vitro*, con un modello a flusso pulsatile impiegando l'acqua come fluido di prova, e *in vivo* su un modello porcino. La valutazione *in vitro* e *in vivo* ha dimostrato che la valvola era completamente funzionale e competente. Nel modello *in vitro*, la valvola ha funzionato bene con una corretta chiusura e apertura e sulla curva della pressione polmonare è stato osservato il tipico *dicrotic notch* osservato per le valvole semilunari native, ovvero il punto sulla curva discendente della pressione arteriosa che segnala la chiusura della valvola aortica e l'inizio della diastole, al momento della sistole terminale [90]. La valvola è stata impiantata e valutata nel modello sperimentale *in vivo*. L'ecocardiografia ha dimostrato che tutte e tre le cuspidi si muovevano liberamente e in modo uniforme. Come nel modello *in vitro* è stato osservato il comportamento

dicrotico sulla curva della pressione polmonare al momento della sistole terminale, ad indicare una corretta chiusura della valvola [75].

Invece, nello studio condotto da Pavcnik et al., la SIS-ECM impiegata come innesto carotideo in un modello ovino ha presentato un tasso di insuccesso (dilatazione, stenosi e formazione di aneurismi) pari al 70% dopo 3-4 mesi dall'innesto. Questo è stato probabilmente dovuto al modello animale adottato, alla lunghezza dell'innesto (10 cm) e dalla risposta dell'organismo al materiale SIS-ECM [40].

La SIS porcina è impiegata, inoltre, nella riparazione delle pareti addominali. Nello studio condotto da Valentin *et al.* sono stati studiati quattro biomateriali, ossia Restore®, CuffPatch™ (*Arthrotek*, Warsaw, IN, USA), mesh in polipropilene ed innesto di tessuto autologo, clinicamente rilevanti per la loro capacità di promuovere il rimodellamento tissutale di un difetto della parete addominale in un modello di ratto. Questo studio ha dimostrato che lo *scaffold* SIS non reticolato (Restore®) e l'innesto di tessuto autologo possono supportare la ricostruzione del tessuto muscolare scheletrico, a differenza dello *scaffold* SIS reticolato (CuffPatch™) e il mesh in polipropilene. Il tessuto muscolare neoformato era morfologicamente simile al muscolo scheletrico nativo, innervato, vascolarizzato e presentava fibre muscolari, collagene di tipo I e II [82].

In ambito gastrointestinale, la SIS ha trovato validazione nella riparazione sperimentale dell'esofago [87] e come ipotesi terapeutica di malattie o traumi dovuti alla sindrome da intestino corto [85], [86], [88].

Nello studio condotto da Demirblich *et al.*, essa ha dimostrato di essere un efficace biomateriale nella rigenerazione intestinale. In cui è stata utilizzata come *patch* per riparare un difetto digiunale in un modello di coniglio. Dopo 6 settimane dall'intervento, l'innesto risultava sostituito da tessuto mucoso e sottomucoso e da uno strato completo di cellule epiteliali, con la presenza di vasi sanguigni e fibre di collagene ben organizzate, con fibroblasti sparsi tra di esse [88].

Infine, la SIS è anche impiegata nella ricostruzione della vescica urinaria. Wang *et al.* hanno impiegato la SIS-ECM porcina come *patch* per la ricostruzione della parete della vescica in un modello di coniglio e successivamente ne hanno determinato le ottime proprietà funzionali e istologiche acquisite post-impianto. A 4 settimane, il materiale risultava ancora integro, ma a 12 e 24 settimane non vi era più traccia residua della SIS, che era stata quindi completamente degradata e sostituita da tessuto rigenerato a coprire la superficie esterna della regione

dell'innesto. Inoltre, dopo 24 settimane dall'intervento, la vescica rigenerata assomigliava a una vescica nativa e sana. Erano, infatti, presenti tutti e tre gli strati caratteristici del tessuto vescicale, ovvero mucosa con sottomucosa, muscolatura liscia e sierosa; inoltre, il suo volume era significativamente aumentato con una compliance conforme a quella della vescica nativa [79].

Da questi studi preclinici su modelli animali la SIS porcina risulta essere un biomateriale promettente in quanto ha dimostrato la sua capacità di rigenerare e riparare tessuti e la sua versatilità nei vari ambiti di applicazione. Nonostante questi studi presentino delle limitazioni, come il numero insufficiente di animali impiegati e brevi follow-up di indagine, i risultati promettenti ottenuti sono stati sufficienti per introdurre la SIS in ambito clinico.

### **2.3.2. STUDI CLINICI**

La SIS-ECM è impiegata in molti campi clinici, ed è attualmente disponibile in commercio come Cormatrix ECM® (*CorMatrix Cardiovascular, Inc.*, Roswell, GA, USA), Durasis® (*Cook Biotech, Inc.*, West Lafayette, IN, USA), Oasis® (*Cook Biotech, Inc.*, West Lafayette, IN, USA), Restore® *orthobiologic soft tissue implant* (*DePuy Synthes Joint Reconstruction*, Warsaw, IN, USA) e Surgisis®, oggi sostituita da Biodesign® (*Cook Biotech, Inc.*, West Lafayette, IN, USA) [56].

Tra i prodotti SIS-ECM disponibili in commercio quello che ha trovato maggiore utilizzo è CorMatrix ECM® (*CorMatrix Cardiovascular, Inc.*, Roswell, GA, USA). Questa SIS porcina decellularizzata ha avuto grande applicazione nella chirurgia cardiovascolare per le sue capacità di favorire la rigenerazione ed il rimodellamento “costruttivo” dei tessuti [40].

Dispone di autorizzazione da parte della FDA ed il marchio CE della Comunità Europea [58] per l'uso cardiaco nell'uomo, ovvero per la riparazione e la ricostruzione del pericardio [56], [70], in chirurgia cardiaca e vascolare congenita sia in pazienti cardiopatici adulti [71], [91] che pediatrici [92]–[95], per la ricostruzione valvolare anche nel caso di endocardite infettiva [71], [96], [97] e riparazione del miocardio danneggiato in seguito ad un infarto [69], [98].

Cormatrix® ha dimostrato risultati promettenti in alcuni casi preclinici su modello animale, ma non si può dire altrettanto nell'uomo; infatti, ci sono diversi studi che hanno riportato risultati incoraggianti e altri, invece, contrastanti. Questo è probabilmente spiegabile in quanto, Cormatrix® è un materiale xenogenico per l'uomo, e scatena una risposta infiammatoria a causa della presenza, seppure ridotta rispetto al tessuto nativo, dell'epitopo  $\alpha$ -gal. Quest'ultimo è



espresso su tutte le membrane delle cellule dei mammiferi, ad eccezione di quelle degli umani e dei primati ed è causa di rigetto iperacuto [99]. Inoltre, come è stato dimostrato dal laboratorio di Medicina Rigenerativa dell'Università di Padova, Cormatrix presenta ancora residui di DNA, per cui non è completamente decellularizzata, ma risulta devitalizzata [100].

Di seguito vengono descritti alcuni casi clinici in cui Cormatrix® è applicata in ambito cardiovascolare con alcuni risultati vantaggiosi e altri meno.

Scholl *et al.* hanno raccolto diversi casi clinici dal 2007 al 2009 in cui questa SIS-ECM è stata utilizzata in 43 interventi, anche complessi, in pazienti pediatrici per la chiusura pericardica (16 casi), riparazione di vasi cardiaci o di grandi vasi (37 casi), riparazione del setto atriale (11 casi), arterioplastica polmonare (10 casi) e aortoplastica (2 casi). Inoltre, è stata utilizzata anche come *patch* per la ricostruzione del tratto di efflusso nel ventricolo destro (6 casi), della vena cava superiore (2 casi), per la riparazione del seno coronario (1 caso), per la realizzazione di valvole monocuspidi polmonari (5 casi) e per l'aumento delle cuspidi valvolari (2 casi). La media del follow-up è stata di 7,85 mesi (0,5-24 mesi) con risultati buoni. Non si sono riscontrate effusioni pericardiche o trombosi intracardiache o intravascolari correlate alla SIS-ECM, i *patches* non si sono ridotti o calcificati e quattro valvole monocuspidi su 5 erano competenti e non presentavano stenosi [95].

Nello studio clinico di Quarti *et al.*, Cormatrix® è stata impiegata in chirurgia su 9 pazienti per riparazioni valvolari, di cui 5 valvole aortiche, due valvole tricuspidi, una valvola mitrale ed una valvola polmonare. Nessuno dei pazienti ha riscontrato complicazioni legate a Cormatrix® e, dopo un follow-up medio di 13,2 mesi (range 4-25 mesi), non sono stati riscontrati casi di fallimento o calcificazione dei *patches* [94].

Tutti gli studi condotti e pubblicati in letteratura comunque riportano risultati dell'immediato post-operatorio e/o di brevi periodi successivi, ma non a lungo termine.

Nello studio clinico multicentrico, prospettico e non randomizzato, condotto da Padalino *et al.*, Cormatrix® è stata impiegata per la riparazione valvolare, ovvero per la ricostruzione delle cuspidi o della valvola polmonare, del setto interatriale o interventricolare, o del pericardio oppure come *patch* per vasi arteriosi, sia sistemici che polmonari. Sono stati inclusi nello studio 103 pazienti, sia pediatrici che adulti, di cui 38 hanno subito riparazione valvolare, 16 ricostruzione settale, 71 arterioplastica e 7 impianto in altri siti. Nel post-operatorio, solo in 26 pazienti (25,2%) sono insorte delle complicazioni, ma non sono state collegate alla SIS-ECM impiegata. Dopo una media di follow-up di 23,33 mesi ci sono stati 4 decessi, non correlati alla

Cormatrix®. In 6 pazienti, invece, dopo un follow-up mediano di 25,2 mesi, è stato richiesto un re-intervento a causa del fallimento dell'impianto. In particolare, in 5 casi di questi l'insuccesso del trattamento con Cormatrix® riguardava la plastica della valvola aortica e nell'altro rimanente quella della valvola mitralica (estensione del lembo mitrale anteriore). Appare quindi che Cormatrix® non ha dato esiti favorevoli in quei pazienti che hanno subito una chirurgia valvolare. È utile sottolineare che al re-intervento valvolare non vi era evidenza di calcificazione, ma il *patch*, seppur intatto, presentava rimodellamento fibrotico e lieve rigidità. Inoltre, sono state osservate all'analisi istopatologica alcune cellule infiammatorie, linfociti e cellule giganti e non sono stati trovati segni di rigenerazione [91].

Anche, Gerdisch *et al.*, hanno utilizzato Cormatrix® per la chirurgia valvolare, in particolare quella della valvola mitrale. In generale, il materiale non ha provocato reazioni infiammatorie acute o croniche e calcificazioni, risultava flessibile e facilmente adattabile per l'applicazione valvolare. Solo in due pazienti, con una storia di chemioterapia e radioterapie per cancro, l'impianto ha fallito; è plausibile che la terapia antitumorale abbia influito negativamente sulla capacità intrinseca delle cellule dei pazienti di ripopolare il *bioscaffold*. Gli autori hanno comunque riconosciuto varie limitazioni allo studio: innanzitutto, il numero limitato di pazienti (in totale 19), il follow-up troppo breve (media 10,9 mesi (range 4-48 mesi)) e, infine, la coorte di pazienti poco rappresentativa di tutte le età (basso numero di pazienti pediatriche). Oltre a tener conto di questi aspetti, ulteriori studi dovranno essere eseguiti per comprendere la relazione tra l'integrazione del *bioscaffold* ed i trattamenti chemioterapici e radioterapici [71].

Inoltre, il meccanismo di rigenerazione del tessuto cardiaco tramite Cormatrix® non è del tutto chiaro. Alcuni studi sostengono che questo materiale promuova un rimodellamento tissutale, altri invece sostengono il contrario. Stelly *et al.* hanno monitorato per 5 anni un paziente di 60 anni, il quale aveva subito una chiusura del pericardio con l'impiego della Cormatrix®, e tramite analisi di tomografia computerizzata hanno potuto osservare la formazione di neo-pericardio, 3 anni dopo l'impianto. Inoltre, dopo 5 anni, a causa di un re-intervento non collegato all'impianto, si è potuto eseguire delle analisi istologiche sulla Cormatrix® espiantata, dimostrando la formazione di tessuto connettivo fibroso denso e laminato, ed una completa ricellularizzazione con una rete vascolare molto sviluppata [70].

Non si può descrivere un analogo risultato per i *patches* espantati ed analizzati istologicamente da Nelson *et al.*, dopo una procedura di Fontan effettuata in due fasi in pazienti pediatriche. Nei campioni espantati si è potuto osservare una infiammazione cronica ed una reazione da corpo

estraneo, anche mediata da eosinofili, oltre che calcificazioni distrofiche. Nessun *patches* ha mostrato evidenza di rigenerazione tissutale dopo una media di 21 mesi (18-26 mesi) dall'impianto [101].

Ulteriori studi hanno sollevato delle perplessità sulla reale efficacia terapeutica di Cormatrix®, come quelli di Rosario-Quinones *et al.* e Nezdad *et al.* Nel primo studio si è potuto verificare che la reazione dell'organismo alla SIS-ECM commercializzata possa indurre disfunzioni nella performance emodinamica con conseguente necessità di rimozione dell'impianto. I *patches* espianati hanno mostrato una intensa reazione infiammatoria caratterizzata da eosinofilia prominente, accompagnata da tessuto granulare e fibrosi, indotto dall'epitopo  $\alpha$ -gal [99]. Nello studio condotto da Nezdad *et al.* sono stati riportati i risultati a lungo termine dell'utilizzo della Cormatrix® per la bicuspidazione di una valvola aortica stenotica in un paziente di 12 anni. La valvola è rimasta stabile per due anni, ma dopo 52,2 mesi ha mostrato grave calcificazione, fibrosi, ispessimento, retrazione ed infiammazione, rendendo quindi necessario un re-intervento [73].

Oltre a Cormatrix®, altre SIS-ECM sono utilizzate in ambito clinico per la riparazione tissutale, come Oasis® per le ulcere [102], [103], Surgisis® per le ernie [104], [105] e Restore® per la cuffia dei rotatori [106], [107].

Recentemente, è stato intrapreso uno studio clinico multicentrico, prospettico e randomizzato, da Brown-Etris *et al.* sull'utilizzo di Oasis® nel trattamento delle ulcere da pressione. Si è visto che entro 12 settimane, il 40% delle ferite croniche guariva dopo il trattamento con Oasis® rispetto allo standard di cura, pari a 29%. Inoltre, i dati ottenuti hanno mostrato che il trattamento con questa SIS-ECM ha portato ad una riduzione dell'area dell'ulcera del 90% su 55% dei pazienti entro 12 settimane, rispetto al 38% dei pazienti sottoposti al trattamento standard. La guarigione al 90% generalmente riflette la formazione del tessuto di granulazione e la contrazione della ferita, ed è un processo relativamente rapido, che è seguito poi da una progressiva endotelizzazione. Questi dati molto positivi indicano che questa SIS-ECM può essere usata in modo vantaggioso nel trattamento di ulcere di dimensioni maggiori, che finora hanno bassa probabilità di guarigione con le cure standard [102].

La SIS-ECM Surgisis® è stata applicata per la riparazione dell'ernia ventrale, ma con risultati soddisfacenti solo a breve termine. Nello studio condotto da Helton *et al.*, 53 pazienti sono stati sottoposti ad un intervento per riparare i difetti della parete addominale con un follow-up mediano di 14 mesi (range 2-29 mesi). Durante il follow-up, 6 pazienti hanno presentato

infezione nel sito dell'innesto e reazione all'impianto, 13 deiscenza parziale, 9 ernie ricorrenti, 17 necessità precoce di re-intervento e 22 complicanze. Questi risultati dimostrano che a lungo termine Surgisis® è scarsamente efficace nella riparazione dell'ernia ventrale [105].

Lo stesso esito è stato osservato per Restore®. Nel trial clinico eseguito da Malcarney *et al.*, è stato dimostrato che questa SIS-ECM può avere effetti collaterali nella riparazione della cuffia dei rotatori. Quattro pazienti su 25 hanno avuto una reazione infiammatoria già dopo 13 giorni dall'intervento. I risultati istopatologici hanno confermato una reazione infiammatoria acuta all'innesto SIS [107]. Infatti, Restore® non è un materiale acellulare e contiene DNA porcino, e causa una risposta infiammatoria nel paziente, accompagnata da dolore [108].

Da questo quadro emerge quindi che sebbene alcuni studi abbiano riportato dati confortanti sull'utilizzo della SIS in ambito clinico, altrettanti evidenziano ancora delle incertezze nella sua performance clinica. La SIS-ECM è sicuramente un materiale versatile e può essere impiegato in molti ambiti, ma necessita ancora di studi approfonditi su larga scala e con follow-up a lungo termine. Inoltre, essendo un materiale xenogenico per l'uomo necessita di essere lavorata con tecniche di decellularizzazione ottimali per rimuovere nuclei e cellule animali per renderla il più possibile biocompatibile in modo da non scatenare reazioni avverse una volta impiantata nel ricevente.



## SCOPO DELLO STUDIO

---

La SIS è una delle ECM maggiormente impiegate in clinica, ancora con risultati discordanti a causa di inefficaci trattamenti di decellularizzazione e sterilizzazione.

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è di sviluppare un adeguato protocollo di sterilizzazione per un *patch* di SIS porcina decellularizzata, al fine di poterla applicare in futuro nella clinica in modo sicuro.

Il materiale ottenuto deve preservare le caratteristiche strutturali del tessuto nativo, ma deve essere deprivato delle componenti cellulari originali, come pure delle contaminanti batteriche associate alla derivazione intestinale della sottomucosa.

In particolare, lo studio si prefigge di ottimizzare un protocollo di sterilizzazione, già testato con successo su *scaffold* xenogenici pericardici acellulari, al fine di ottenere una SIS-ECM ben decellularizzata e priva di rischio biologico.



### **3. MATERIALI E METODI**

---

Tutti i reagenti, se non diversamente specificato sono stati acquistati dalla ditta Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

#### **3.1. PRELIEVO E PROCESSAMENTO DELLA SIS**

Gli intestini porcini sono stati prelevati da maiali di razza Duroc, con peso tra i 140 e 170 Kg, ed età compresa tra i 9 e i 14 mesi. La raccolta del tessuto è stata effettuata presso il macello porcino “F.lli Guerriero” a Villafranca Padovana (Padova).

Da ciascun animale è stata prelevata una porzione di circa 20 cm di digiuno, distante circa 20 cm dall’inizio del duodeno. I tratti di intestini prelevati sono stati stoccati all’interno di contenitori di plastica da 200 ml contenenti una soluzione 0,9% NaCl durante la fase di trasporto pre-processamento.

Una volta arrivati in laboratorio, gli intestini prelevati sono stati lavati con tampone fosfato PBS per rimuovere eventuali residui intestinali. Si è poi proceduto all’isolamento della sottomucosa intestinale porcina attraverso separazione meccanica della sierosa con l’aiuto di pinzette e forbici. Infine, per escludere la tonaca muscolare dal campione, si è introflessa la porzione interessata e si è proceduto all’eliminazione della mucosa muscolare. Ripulito l’intestino dagli strati di sierosa e mucosa muscolare, è stata ottenuta la sottomucosa intestinale porcina.

I campioni di SIS in esame sono stati prelevati da animali differenti e ciascun campione è stato tagliato longitudinalmente al fine di prelevare i campioni di interesse (Figura 3.1) per i trattamenti successivi.





Figura 3.1: Sottomucosa intestinale porcina nativa tagliata longitudinalmente.

### 3.2. DECELLULARIZZAZIONE E STERILIZZAZIONE DELLA SIS

I campioni di SIS prelevati sono stati sottoposti ai diversi step riportati nel diagramma in Figura 3.2.

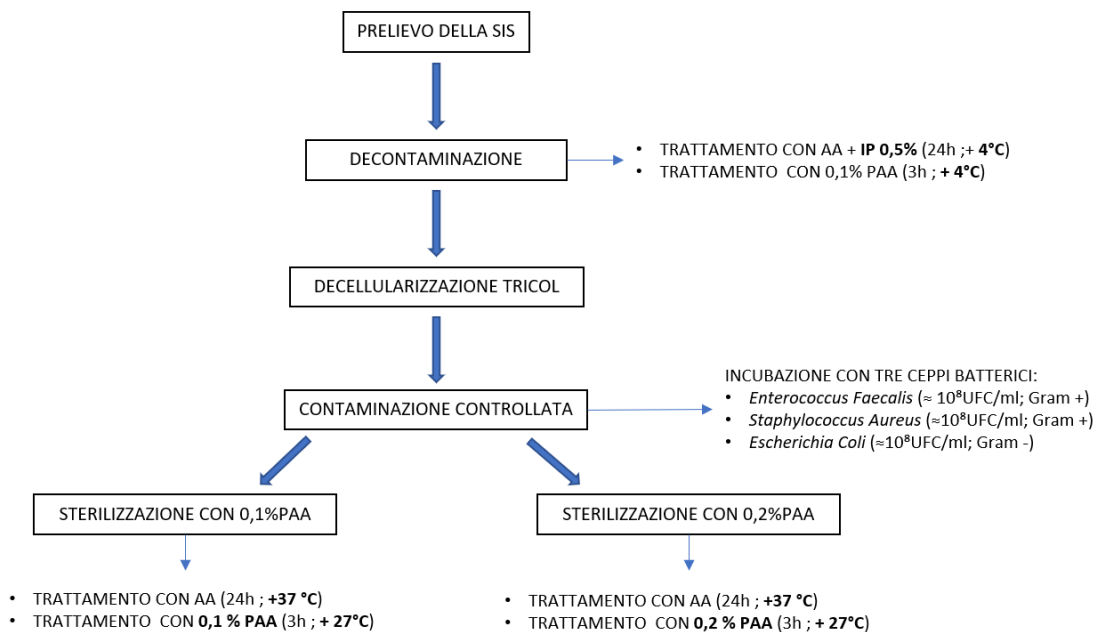


Figura 3.2. Diagramma dell'esperimento

Tutte le fasi e la preparazione delle soluzioni sono state eseguite in completa sterilità, utilizzando filtri a membrana con un diametro dei pori di 0,22  $\mu\text{m}$  (Euroclone®, Milan, Italy).

### 3.2.1. DECONTAMINAZIONE: TRATTAMENTO CON ANTIBIOTICI, ANTIMICOTICI (AA) E PAA

I campioni di SIS nativi presentano un elevato *bioburden*, per cui prima di procedere con il trattamento è necessaria una iniziale decontaminazione.

Questo metodo è stato sviluppato dal gruppo di Medicina Rigenerativa Cardiovascolare dell'Università di Padova (Fidalgo *et al* [31]), dove questo studio è stato realizzato. Esso prevede un trattamento a due step:

1. Preparazione di un cocktail di AA in PBS, come in Tabella 3.1,

TIPOLOGIA	CONCENTRAZIONE	AZIONE	PRODUTTORE
Vancomicina	50 mg/L	Inibisce attività dei Gram <sup>+</sup>	---
Gentamicina	80 mg/L	Inibisce attività dei Gram <sup>+</sup> e dei Gram <sup>-</sup>	---
Cefoxitina	240 mg/L	Inibisce attività dei Gram <sup>+</sup> e dei Gram <sup>-</sup>	Fluka, Strasbourg, France
Amfotericina B	250 mg/L	Fungicida	EuroClone®, Milan, Italy

Tabella 3.1: Tabella di AA e relative concentrazioni d'uso, modalità d'azione e produttore.

I campioni sono stati lasciati per 24 ore in agitazione a + 4°C. Al termine del trattamento sono stati effettuati due lavaggi in PBS sterile.

2. Preparazione di una soluzione di PAA allo 0,1% v/v in PBS sterile a pH 7.3. I campioni sono stati trattati per 3 ore in agitazione a 4°C. Terminato il trattamento, sono stati effettuati due lavaggi in PBS sterile per rimuovere i residui di PAA dai campioni.

Sono stati aggiunti anche gli inibitori di proteasi (IP) in concentrazione 0,5%, come riportato in tabella 3.2.

IP	CONCENTRAZIONE
Fenilmetilsulfonil fluoruro (P.M.S.F)	400mM
N-Etilmaleimide (N.E.M)	1M
Benzamidina	1M
Iodoacetammide	200mM

Tabella 3.2: Componenti e concentrazioni d'uso degli IP.

Le soluzioni con IP sono state realizzate con dimetilsolfossido (DMSO) e conservate a -20°C fino al loro utilizzo.

Rispetto al protocollo proposto da *Fidalgo et al.* [31], sono state apportate delle modifiche, ossia nella decontaminazione iniziale sono stati aggiunti gli IP e si è modificata la temperatura di lavoro. Queste variazioni sono state fatte per inibire l'attività delle metalloproteinasi (MMP) liberate dalle cellule del tessuto trattato, che possono alterare l'integrità della ECM[15].

### **3.2.2. DECELLULARIZZAZIONE TRICOL**

Una volta conclusa la prima decontaminazione, i campioni sono stati decellularizzati seguendo il protocollo TRICOL [87]. Questo protocollo prevede un trattamento alternato di soluzioni ipo- e ipertoniche, l'utilizzo di detergenti Triton X-100 e colato di sodio, seguito da incubazione con Benzonase™, una endonuclease aspecifica ricombinante utile alla completa rimozione dei residui degli acidi nucleici [87].

Questo protocollo è già stato dimostrato valido per la decellularizzazione di condotti valvolari porcini e umani, oltre che per tessuti pericardici xenogenici. In particolare, le valvole decellularizzate sono state testate in un modello porcino allogeneico con un follow up di 15 mesi, dimostrando una buona rigenerazione e buona prestazione emodinamica, escludendo qualsiasi segno di degenerazione (come calcificazioni, fibrosi e/o trombosi) o rigetto immunitario [88], [89].

Prima di avviare le fasi della decellularizzazione, si prepara il tampone madre A (TMA) (impiegato come soluzione tampone e per mantenere l'integrità del tessuto in quanto contiene l'EDTA che sequestra gli ioni bivalenti, inoltre presenta un'azione antiossidante) e gli IP:

- Preparazione TMA (100mM di ascorbato di sodio e 50mM di EDTA in PBS). La soluzione deve avere un pH di 7.4 e, per prevenire la sua ossidazione, deve essere conservata all'interno di un contenitore coperto e flussata con azoto ogni qualvolta si apra il contenitore.
- La preparazione degli IP è già stata descritta nel paragrafo 3.2.1.

Il protocollo TRICOL presenta una serie di passaggi elencati di seguito.

Tutte le soluzioni, eccetto quelle contenenti gli IP, sono state preventivamente degassate e filtrate. Tra parentesi sono riportate rispettivamente, la durata dello step e la temperatura.

I campioni per ciascun animale sono stati stoccati in contenitori di plastica sterili con un volume di 150 ml della soluzione preparata e posti in agitazione.

1. Primo Step (8h, 4°C)
  - TMA, 10%
  - DMSO, 10%
  - IP A , 0,5%
  - IP B, 0,5%
  - Acqua deionizzata e microfiltrata (mQ)
  
2. Secondo Step (8h, 4°C)
  - TMA, 10%
  - mQ
  
3. Terzo Step (8h, 4°C)
  - TMA, 10%
  - Triton X-100, 1% v/v
  - IP A, 0,5%
  - IP B, 0,5%
  - mQ
  
4. Quarto Step (8h, 4°C)
  - TMA; 10%
  - Triton X-100, 0,1% v/v
  - mQ

5. Quinto Step (8h (2 volte), 4°C)
- TMA, 10%
  - NaCl, 0,5M
  - Triton X-100, 0,1% v/v
  - PBS
6. Sesto Step (1° lavaggio: 1,5h, 4°C; 2° lavaggio: 1,5h, RT)
- TMA, 10%
  - Triton X-100, 0,1% v/v
  - 1°\_mQ; 2°\_PBS
7. Settimo Step (8h (2 volte), RT, al buio)
- TMA, 10%
  - Colato di Sodio, 10mM
  - PBS
  - pH 7.4
8. Ottavo Step (1° lavaggio: 1,5h, RT; 2° lavaggio: 1,5h, 4°C)
- PBS
9. Nono Step (30', 4°C)
- NaCl, 0,9%
  - mQ

10. Decimo Step (1h (2 volte), 4°C)
- Isopropanolo, 10%
  - NaCl, 0,9%
  - mQ

Prima di procedere alla digestione con Benzonase™, i campioni vengono equilibrati in un buffer con eccesso di magnesio per 8 ore in agitazione. Con il buffer di equilibratura si saturano tutti i siti del tessuto che legano ioni  $\text{Ca}^{2+}$  rendendoli disponibili all'enzima che presenta come cofattore il  $\text{Mg}^{2+}$ .

Questo buffer lavora ad un pH ottimale di 8 ed è composto da:

- Tris-HCl 50mM
- $\text{MgCl}_2$  1mM

Acqua deionizzata e microfiltrata (mQ)

In seguito, è stata eseguita la digestione degli acidi nucleici a 37°C per 24 ore (per due volte) utilizzando Benzonase™ solubilizzata nello stesso buffer di equilibratura.

### 3.2.3. CONTAMINAZIONE CONTROLLATA (CC)

Al fine di valutare l'efficacia dei nuovi metodi di sterilizzazione è stata eseguita una CC (come descritta nel protocollo realizzato da Fidalgo *et al.* [31]) sui campioni trattati. I ceppi batterici impiegati per la CC dei campioni sono stati forniti dal Dipartimento di Microbiologia e Virologia dell'Università di Padova.

I ceppi batterici utilizzati sono:

- *Enterococcus faecalis* (Gram<sup>+</sup>, ATCC® 29212™),
- *Escherichia coli* (Gram<sup>-</sup>, ATCC® 35218™),
- *Staphylococcus aureus* (Gram<sup>+</sup>, ATCC® 29213™).

Per ciascun ceppo batterico, è stata prelevata dalla piastra *agar chocolate* (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Stati Uniti) seminata una colonia isolata. Questa è stata inoculata in una provetta contenente il mezzo di coltura batterico, ovvero Tioglicolato (*Thioglycolate*

*medium*, THIO; Biolife, Milano, Italy). Le provette contenenti la soluzione batterica sono state incubate *over night* (ON) a 37°C, in modo da promuovere la crescita dei batteri inoculati.

La quantificazione dei batteri è stata fatta seguendo gli standard di McFarland [109] (Tabella 3.3), considerando un valore McFarland pari a 0,5 che corrisponde approssimativamente ad una densità cellulare di  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL.

STANDARD MCFARLAND	DENSITA' CELLULARE APPROSSIMATIVA ( $\approx 10^8$ UFC/mL)
0.5	1.5
1	3.0
2	6.0
3	9.0
4	12.0

Tabella 3.3: McFarland Standard [109].

La verifica della avvenuta crescita batterica è stata calcolata tramite la misurazione della assorbanza ( $\lambda=600$  nm) con l'uso dello spettrofotometro (Nanodrop, 2000c Spectrophotometer, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Stati Uniti), utilizzando il medium THIO come controllo. Una volta ottenuti i valori finali di assorbanza, si è potuto calcolare tramite gli standard di McFarland il valore approssimativo di UFC/mL di densità batterica presente in ciascuna provetta.

Successivamente si è proceduto alla CC vera e propria, preparando una soluzione madre contenente  $\approx 10^8$  UFC/ml per ciascun ceppo batterico e distribuendola nei diversi campioni di SIS decellularizzata, precedentemente inseriti in contenitori di plastica sterili. La contaminazione è stata effettuata per 2 ore a +37°C.

Terminata la CC, sono stati eseguiti tre lavaggi in PBS sterile in agitazione per 30 minuti per la rimozione di eventuali contaminanti non adesi.

#### **3.2.4. STERILIZZAZIONE CON PAA**

Dopo la CC, i campioni di SIS decellularizzata sono stati decontaminati con AA ed infine divisi in due gruppi: il primo trattato con PAA 0,1% mentre il secondo con PAA 0,2%.

In particolare, il trattamento con AA è stato realizzato come precedentemente descritto nel paragrafo 3.2.1, ossia con un cocktail AA, costituito da Vancomicina, Gentamicina e Cefoxitina e Amfotericina B.

I campioni sono stati poi trattati con AA e lasciati per 24 ore in agitazione a 37°C. Al termine del trattamento, sono stati effettuati due lavaggi in PBS sterile (il primo da 30 minuti ed il secondo ON) per rimuovere gli eventuali residui di AA.

Due soluzioni di PAA, allo 0,1% (v/v) e allo 0,2% (v/v), sono state preparate con PBS sterile avente un pH di 7.4 (aggiustato con NaOH). Entrambe le soluzioni sono state filtrate ed usate entro un'ora dalla loro preparazione, incubando i campioni per 3 ore a 27°C, in costante agitazione.

Al termine del trattamento, sono stati effettuati tre lavaggi in PBS sterile (due lavaggi di 30 minuti ed un terzo ON) per rimuovere eventuali residui di PAA.

### **3.3. CARATTERIZZAZIONE DELLA SIS TRATTATA**

I campioni di SIS decellularizzata e decontaminata sono stati sottoposti a verifiche di decellularizzazione, sterilità e/o altri saggi. In particolare, si è proceduto a effettuare:

- Estrazione di DNA, per quantificare la resa di decellularizzazione;
- Analisi istologiche, per verificare l'avvenuta decellularizzazione e valutare la struttura globale della ECM prima e dopo i vari trattamenti;
- Verifiche di sterilità.

Tutti i sopra citati saggi e quantificazioni sono stati confrontati con campioni di SIS nativa, considerati come controllo.

#### **3.2.1. ESTRAZIONE DI DNA**

La quantificazione del contenuto totale di DNA è stata effettuata sui campioni di SIS per ogni animale, dopo la decellularizzazione, con un range di peso umido tra i 18 e i 25 mg.

Per l'estrazione del DNA, è stato impiegato il kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germania). La concentrazione è stata poi misurata allo spettrofotometro NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Stati Uniti) alla lunghezza d'onda di 260 nm. La misura finale di DNA è stata espressa in ng/mg di tessuto.

#### **3.2.2. ANALISI ISTOLOGICHE**

Per effettuare le analisi istologiche, i campioni sono stati precedentemente congelati con 20% saccarosio, per preservare la ECM durante il congelamento, nel quale i campioni sono stati lasciati ON a +4°C. Successivamente, sono stati lasciati in equilibratura per due ore in una



soluzione di OCT + 20% saccarosio (1:1), sempre a +4°C. Per il congelamento, il campione è stato posizionato su un Embedding device (Bio-Optica, Milan, Italy) (dispositivo di inclusione), coprendolo con soluzione OCT + 20% sucrose (1:1) e congelandolo con isopentano e fumi di azoto. I campioni sono stati poi conservati a -80°C fino al loro utilizzo.

I campioni congelati e conservati a -80°C sono stati sezionati con il criostato Leica CM1850 UV (Leica, Wetzlar, Germany) ad una temperatura di -27°C, con uno spessore che variava tra i 6-8 µm, e le sezioni raccolte su vetrini (Superfrost™, Thermo-scientific, Germany) sono state conservate a -20°C fino alle successive analisi.

### **3.2.2.1. EMATOSSILINA ED EOSINA (H&E)**

Tramite la colorazione istologica H&E è possibile avere una visione generale della struttura della ECM ed effettuare una verifica qualitativa della decellularizzazione. In questa colorazione, la ECM viene colorata in rosa dall'eosina, mentre i nuclei sono colorati in blu/viola dall'ematossilina. Le sezioni di campione sono state colorate seguendo il protocollo standard fornito dal kit Rapid Frozen Sections (Bio-Optica, Milan, Italy), con alcune modifiche:

- immersione per 5 minuti in acqua distillata per rimuovere eventuali residui di OCT;
- immersione per 15 secondi nella soluzione di ematossilina e lavaggio in acqua di fonte;
- immersione per 1 minuto in una soluzione di viraggio e lavaggi in acqua di fonte.
- immersione per 2 minuti nella soluzione di eosina;
- 5 immersioni in etanolo al 95%, per due volte;
- 5 immersioni in etanolo assoluto, per due volte;
- Immersione per 1 minuto in Xilene, per due volte;
- Montaggio con montante non acquoso.

Le immagini istologiche sono state fotografate tramite microscopio ottico Nikon Eclipse 50i equipaggiato con il software NISElement D 3.2 (Nikon Corporation Shinagawa, Tokyo, Japan).

### **3.3.1. VALUTAZIONE DELLA STERILITA'**

Al fine di valutare la sterilità si sono effettuati test per la verifica di torbidità e per l'identificazione e quantificazione di eventuali contaminanti.

### **3.3.1.1. TEST DI STERILITA'**

I test di sterilità sono stati eseguiti in accordo con la Farmacopea Europea [35], immergendo i campioni in due medium di coltura: Tioglicolato (Thioglycollate medium, THIO; Biolife, Milano, Italy) e brodo di soia triptico (Tryptone soya broth, TSB; Biolife, Milano, Italy).

Il medium THIO è principalmente impiegato per la coltura di batteri anaerobi, tuttavia rileva anche i batteri aerobici mentre il TSB è adatto alla coltura di funghi e batteri aerobi [35].

I mezzi di coltura sono stati preparati e sterilizzati in autoclave a 121°C per 2 ore e conservati ad una temperatura di +4°C fino al loro utilizzo.

Al termine di ogni step dell'esperimento come mostrato nel *flow chart* in Figura 3.2, i campioni di ciascun animale sono stati immersi in entrambi i mezzi di coltura. In particolare, sono stati incubati per 7 giorni a 37°C per il mezzo THIO e a 22°C per il mezzo TSB, in entrambi i casi in continua agitazione e utilizzando come controlli i due soli medium. Unica eccezione riguardava il check di sterilità al termine della sterilizzazione con le due differenti concentrazioni di PAA, in cui è stato impiegato solo il mezzo di coltura THIO, in quanto in questa fase della ricerca era di interesse constatare solo la presenza di contaminanti batterici.

Al termine dei 7 giorni di incubazione, se il mezzo fosse risultato torbido sarebbe stato indicativo di campioni contaminati; mentre se fosse risultato limpido, non vi sarebbe stata presenza di batteri o funghi, per cui la SIS precedentemente contaminata e poi trattata con AA/PAA risultava sterile.

### **3.3.1.2. COLORAZIONE DI GRAM**

Dopo la CC, è stata effettuata una colorazione di Gram per osservare la distribuzione di eventuali microrganismi batterici sulla superficie della SIS. La colorazione Gram è stata effettuata presso il laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'Università di Padova.

Questa tecnica permette di differenziare i batteri Gram<sup>+</sup> e Gram<sup>-</sup> in base ai loro costituenti della parete cellulare.

La colorazione fa uso di un complesso di cristalli di iodio-violetto e di una colorazione di contrasto di safranina. Le pareti cellulari dei batteri Gram<sup>+</sup> mantengono questo complesso dopo il trattamento tramite l'alcool e appaiono viola, mentre i Gram<sup>-</sup> decolorizzano in seguito al trattamento diventano rosa.

Questo perché i batteri Gram<sup>+</sup> presentano uno spesso strato di peptidoglicani nelle loro pareti cellulari, che mantiene il cristal-violetto. Invece, i batteri Gram<sup>-</sup> presentano uno strato di peptidoglicani più sottile, che non mantiene il cristal-violetto durante il processo di decolorazione [110], [111].

### **3.3.1.3. IDENTIFICAZIONE QUALITATIVA DI CONTAMINANTI BATTERICI**

L'identificazione di eventuali contaminanti è stata effettuata seminando una piastra *chocolate agar* (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Stati Uniti), con un *inoculation loop* (Inoculation loop 10µl, blue, Sarstedt, Numbrecht, Germany) precedentemente immerso nell'ultima soluzione di lavaggio, in cui erano immersi i campioni.

Le piastre seminate sono state poi incubate a 37°C per 48 ore. In seguito, solo in caso di avvenuta crescita batterica, sono state portate al Dipartimento di Microbiologia e Virologia dell'Università di Padova dove è stata eseguita una spettrometria di massa MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight).

Questa tecnica sofisticata identifica rapidamente le specie batteriche determinando le masse molecolari delle proteine ribosomiali. L'analisi viene eseguita su cellule intere o su estratti batterici. Questa procedura consiste nell'assorbire il campione su di una matrice, che viene portata in soluzione e sottoposta ad irradiazione con un fascio laser, comportando la ionizzazione della soluzione. Le molecole ionizzate vengono poi accelerate in un campo elettrico e separate in funzione del loro peso molecolare in un tubo a vuoto. Gli ioni raggiungono il rilevatore, più o meno rapidamente, secondo il loro rapporto massa-carica (m/z). Il segnale elettrico viene elaborato dal computer e convertito in uno spettro di massa, altamente caratteristico a seconda di ogni contaminante batterico [112].

Questa verifica è stata effettuata per ogni campione di SIS al termine della decellularizzazione, della CC e della sterilizzazione con PAA alle concentrazioni 0,1% e 0,2%.

Tutte le qualificazioni di contaminanti sono state eseguite in duplice copia.

### **3.3.1.4. IDENTIFICAZIONE QUANTITATIVA DI CONTAMINANTI BATTERICI – METODO MPN**

Il metodo MPN, descritto nel paragrafo 1.5.4.3, è stato utilizzato per la quantificazione di eventuali contaminanti sull'ultima soluzione di lavaggio, in cui erano immersi i campioni.

Anche in questo caso, la verifica è stata effettuata per ogni campione SIS al termine della decellularizzazione, della CC e della sterilizzazione con PAA alle concentrazioni 0,1% e 0,2%.

Questo metodo si basa su diluizioni in serie decimale del campione contaminato da testare.

Una volta effettuate le serie di diluizioni, i campioni vengono incubati a 37°C per sette giorni.

La stima dei contaminanti viene effettuata verificando la positività (torbidità) su campioni triplicati per ciascuna diluizione.

I calcoli per l'MPN sono stati effettuati utilizzando il foglio di calcolo Excel contenuto nell'ISO 7218 (sito della FDA; Jarvis, Wilrich *et al.* 2010) (Figura 3.4).

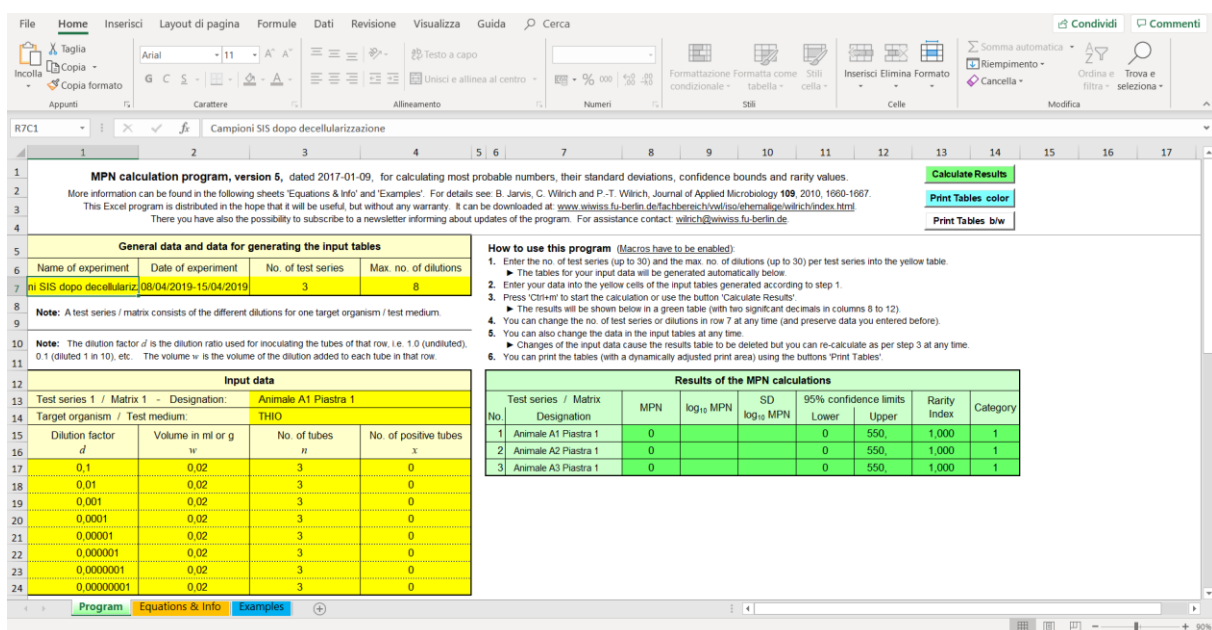


Figura 3.4: File Excel per il calcolo del MPN.

Sono stati inseriti prima il numero di campioni considerati ed il numero di diluizioni, poi sono stati riportati:

- i fattori di diluizione nella prima colonna;
- il volume dell'inoculo aggiunto nella seconda colonna;
- il numero di pozzetti inoculati per ciascuna diluizione nella terza colonna;
- il numero di pozzetti positivi (torbidi) nell'ultima colonna.

Il valore finale calcolato è stato espresso in MPN per grammo (MPN/g).

Per i campioni che hanno fornito una combinazione di pozzetti 0,0,0 o 5,5,5, il calcolatore MPN ha indicato rispettivamente un valore di 0 o infinito (Figura 3.5). Si stima che un valore di MPN

restituito per queste combinazioni di pozzetti 0,0,0 e 5,5,5 sia riconducibile, rispettivamente, a valori <18 e >18.000 per 100g (ISO 7218).

data		Results of the MPN calculations								
Example 1		No.	Test series / Matrix Designation	MPN	log <sub>10</sub> MPN	SD log <sub>10</sub> MPN	95% confidence limits		Rarity Index	Category
No. of tubes <i>n</i>	No. of positive tubes <i>x</i>						Lower	Upper		
E.coli		1	Example 1	0			0	0.66	1.000	1
5	0	2	Example 2	∞			65.	∞	1.000	1
5	0									
5	0									

Example 2	
E.coli	
No. of tubes <i>n</i>	No. of positive tubes <i>x</i>
5	5
5	5
5	5

Figura 3.5: Esempio di un valore di MPN restituito pari a 0 o infinito (ISO 7218).

Tutti i test MPN sono stati eseguiti in duplice copia.

### 3.3.4. ANALISI STATISTICA DEI RISULTATI

I dati quantitativi acquisiti sono stati precedentemente elaborati tramite Microsoft Excel 2013 ed espressi come media ± deviazione standard (SD). Successivamente, si è impiegato il software GraphPad Prism 5 per l'analisi statistica, condotta tramite ANOVA ad una via, e il test di Tukey per i confronti multipli. Si è utilizzato come valore di soglia per la significatività statistica il valore  $p < 0,05$ .

## 4. RISULTATI

In questo studio si è valutata l'efficacia su SIS decellularizzata di due varianti di un metodo di sterilizzazione, che consistono in un cocktail di AA ed un trattamento PAA a due diverse concentrazioni, ossia allo 0,1% e allo 0,2%.

Inoltre, i risultati ottenuti sono stati confrontati con il controllo (SIS nativa).

### 4.1. VERIFICA DI DECELLULARIZZAZIONE

Per valutare l'avvenuta decellularizzazione, è stata effettuata la quantificazione del contenuto totale di DNA per ciascun animale, dopo il trattamento TRICOL.

Si può notare che, per tutte e tre le SIS dopo TRICOL, la quantità di acidi nucleici sia al di sotto del valore di soglia di 50 ng/mg, proposto da Crapo *et al.* [20] affinché il tessuto si possa considerare decellularizzato (Figura 4.1). Come si può notare, vi è una differenza statisticamente significativa fra il valore di DNA nella SIS nativa ( $150,5 \pm 17,36$  ng/mg) e i valori delle tre SIS trattate con TRICOL (in media  $24,14 \pm 4,52$  ng/mg). Invece, non vi è nessuna differenza statisticamente significativa fra i valori di DNA tra le singole SIS dopo TRICOL.

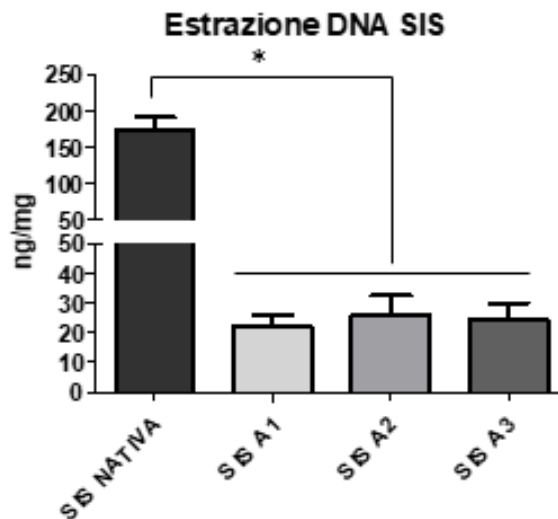


Figura 4.1: Contenuto di DNA nella SIS nativa e nelle SIS (A1, A2 e A3) dopo TRICOL.

## 4.2. VALUTAZIONE STRUTTURALE E DI DECELLULARIZZAZIONE DELLA SIS

Per avere un'idea globale sul mantenimento della struttura della ECM dopo le fasi di decellularizzazione e sterilizzazione, in Figura 4.2 si riportano le immagini della colorazione H&E. Il confronto tra i campioni mostra come l'architettura della ECM si sia conservata durante nella SIS dopo TRICOL (Figura 4.2, B) e dopo il trattamento AA+PAA 0,1% (Figura 4.2, C), mantenendo intatte le strutture vascolari.

Si può notare, inoltre, che l'avvenuta decellularizzazione in quanto non vi è presenza di nuclei (colorati in viola) sulla SIS dopo TRICOL (Figura 4.2, B), a differenza della SIS nativa (Figura 4.2, A) in cui, invece, sono evidenti.

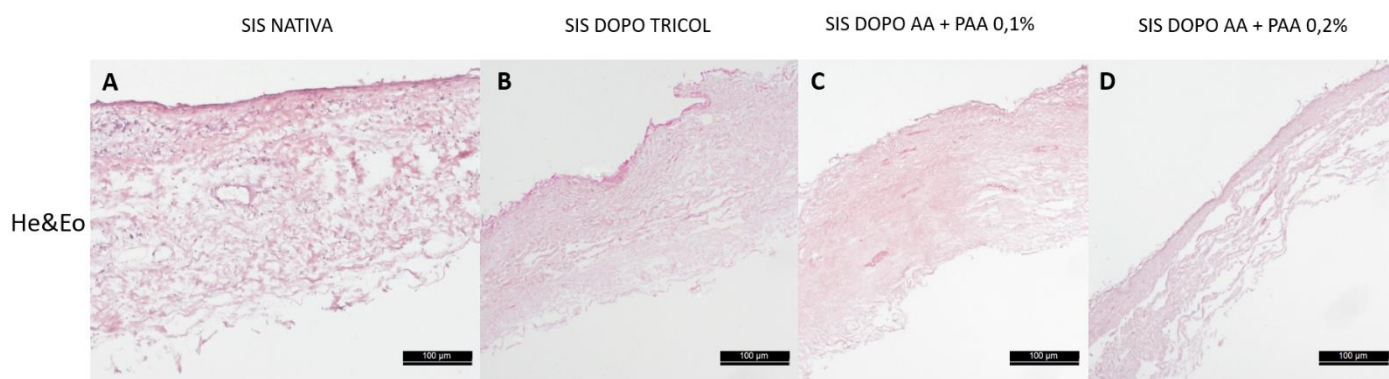


Figura 4.2: Immagini istologiche H&E; A. SIS nativa, B. SIS dopo TRICOL, C. SIS dopo AA+PAA 0,1% e D. SIS dopo AA+PAA 0,2%. Ingrandimento 10X, scale bar = 100 µm.

Inoltre, si può notare che la sterilizzazione con AA + PAA 0,2% risulti alquanto aggressiva, comportando la formazione di spazi tra le fibre della ECM, distruggendo le strutture vascolari, e l'assottigliamento dello *scaffold*, come evidenziato a maggiore ingrandimento in Figura 4.3.

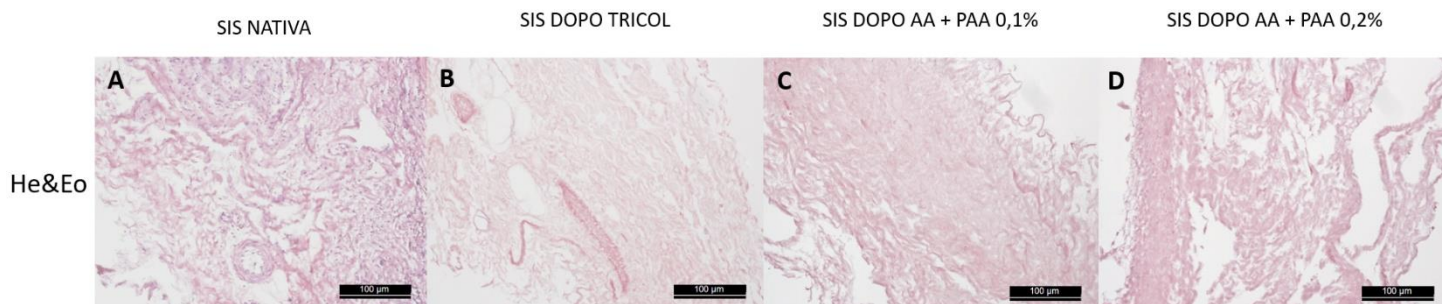


Figura 4.3: Immagini istologiche H&E; A. SIS nativa, B. SIS dopo TRICOL, C. SIS dopo AA+PAA 0,1% e D. SIS dopo AA+PAA 0,2%. Ingrandimento 20X, scale bar = 100 µm.

### 4.3. VERIFICA DI STERILITA'

I risultati del test di sterilità, per la verifica della torbidità, sono riportati in Tabella 4.1.

	THIO	TSB
SIS NATIVA	3/3	3/3
DOPO DECONTAMINAZIONE	2/3	2/3
DOPO TRICOL	1/3	2/3
DOPO AA+PAA 0,1%	2/3	---
DOPO AA+PAA 0,2%	2/3	---

Tabella 4.1: Risultati dei test di sterilità, dopo 7 giorni.

Tutti i campioni di SIS nativa risultavano contaminati in entrambi i mezzi di coltura (Figura 4.4a e b).

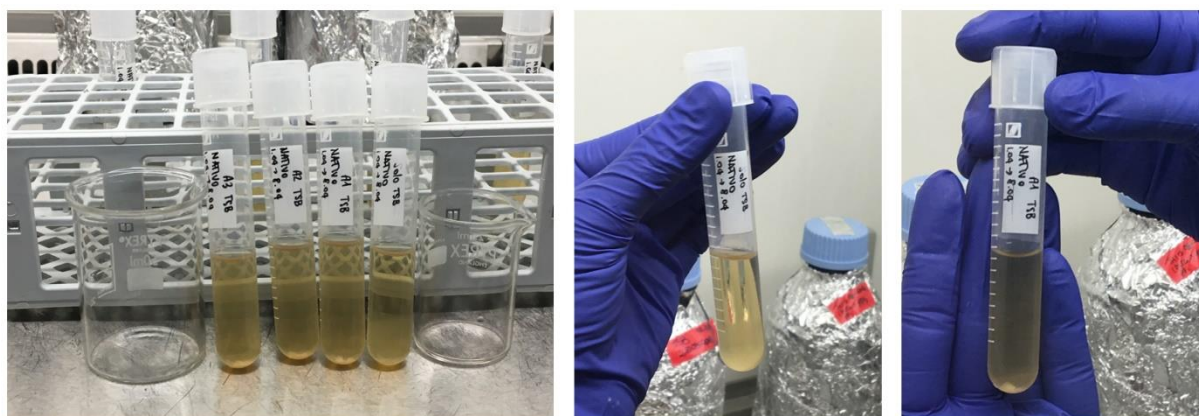


Figura 4.4a: Test di sterilità campioni SIS nativi in TSB, dopo 7 giorni.



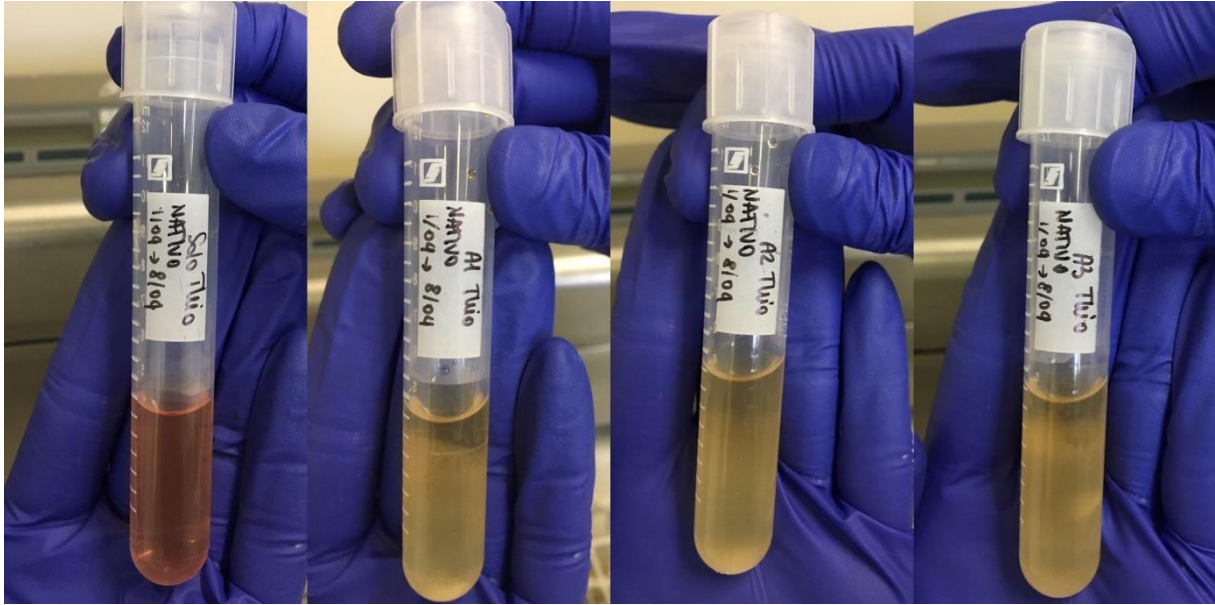


Figura 4.4b: Test di sterilità campioni SIS nativi in THIO, dopo 7 giorni.

Dopo la decontaminazione, per entrambi i mezzi di coltura, due campioni su tre sono risultati contaminati (Figura 4.5a e b).

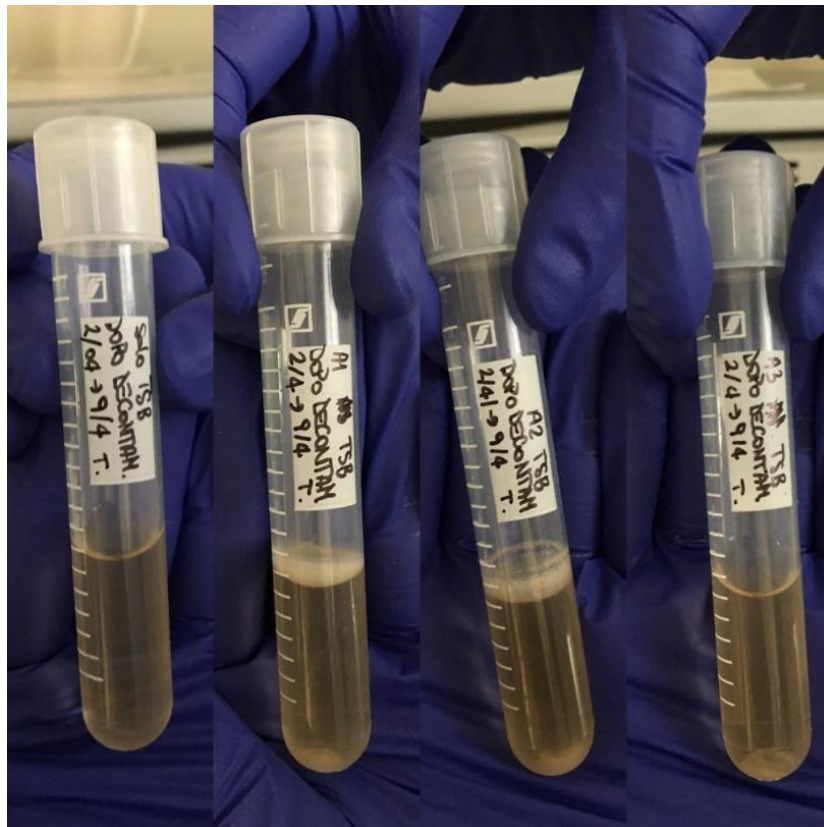


Figura 4.5a: Test di sterilità campioni SIS dopo decontaminazione in TSB, dopo 7 giorni.

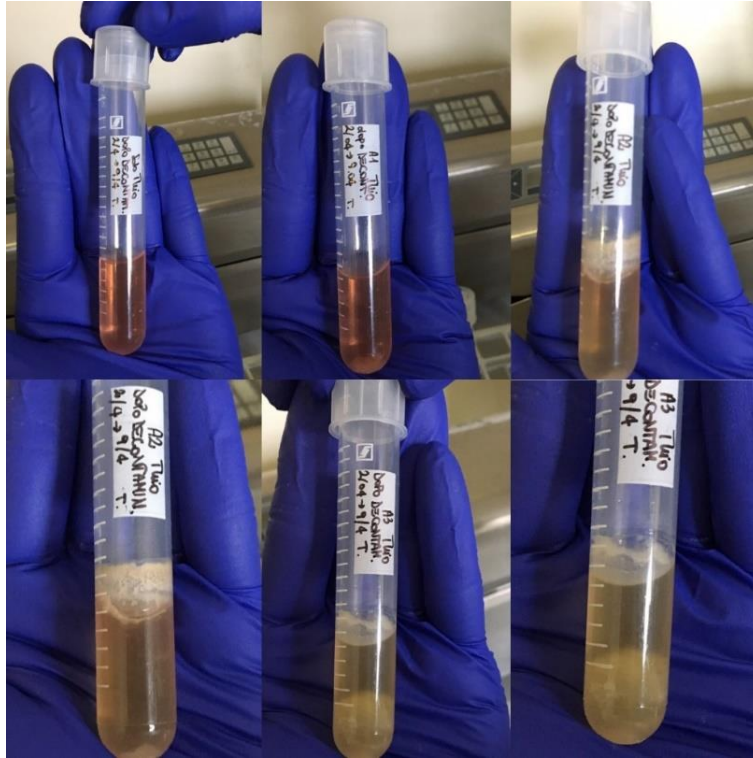


Figura 4.5b: Test di sterilità campioni SIS dopo decontaminazione in THIO, dopo 7 giorni.

Dopo TRICOL, solo un campione nel mezzo THIO risultava contaminato; invece, due campioni nel mezzo TSB presentavano contaminazione da funghi (Figura 4.6a e b).

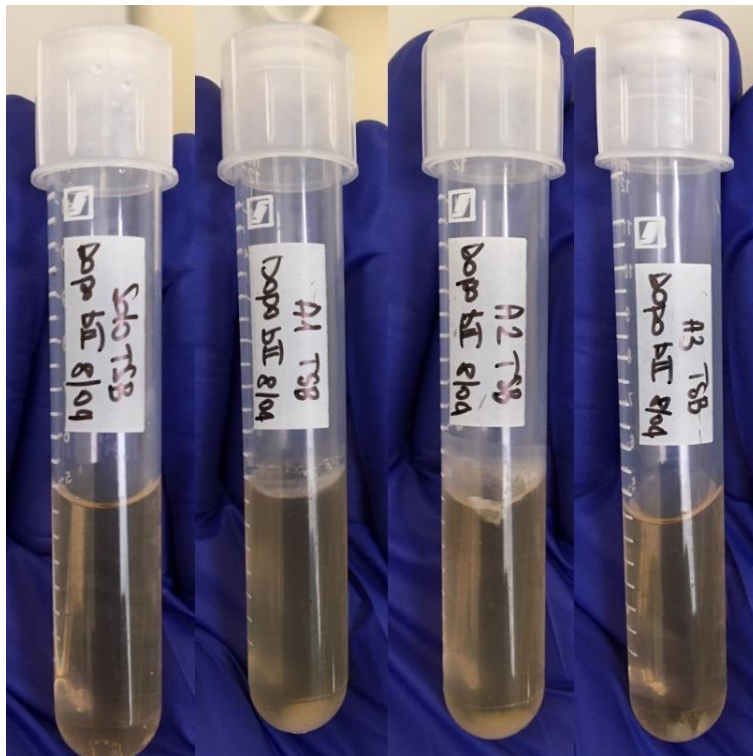


Figura 4.6a: Test di sterilità campioni SIS dopo TRICOL in TSB, dopo 7 giorni.

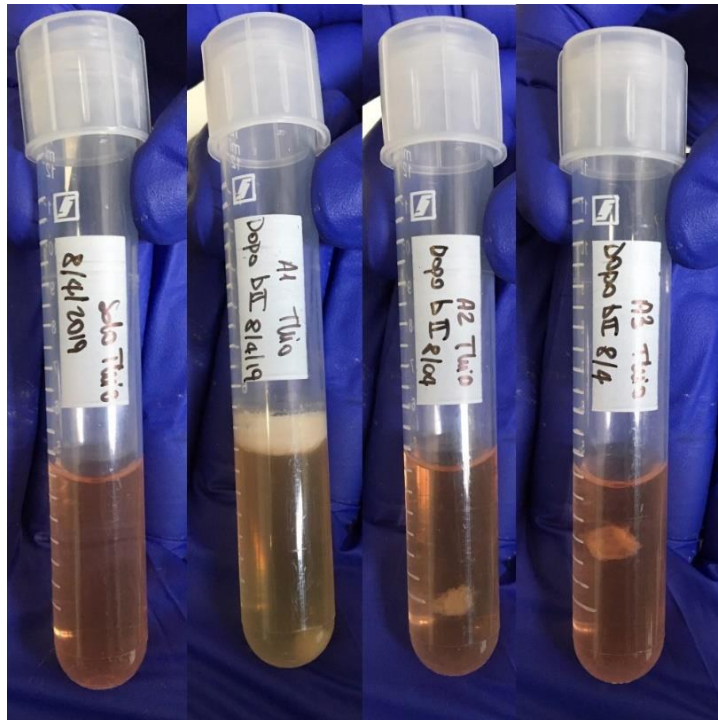


Figura 4.6b: Test di sterilità campioni SIS dopo TRICOL in THIO, dopo 7 giorni.

I test di sterilità per i campioni dopo trattamento con AA allo 0,1% PAA e allo 0,2% PAA sono stati eseguiti solo impiegando il mezzo di coltura THIO, in quanto era di interesse investigare l'eventuale presenza di sole contaminanti batteriche.

Nei campioni dopo trattamento con AA e 0,1% PAA, due campioni risultavano contaminati; lo stesso valeva per i campioni dopo trattamento con AA e 0,2% PAA (Figura 4.7a e b).

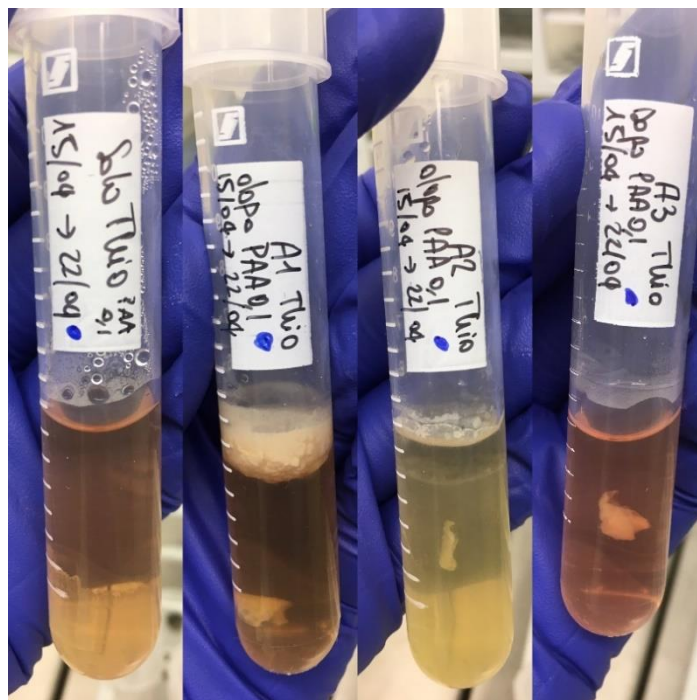


Figura 4.7a: Test di sterilità campioni su SIS trattati con AA e 0,1% PAA in THIO, dopo 7 giorni.

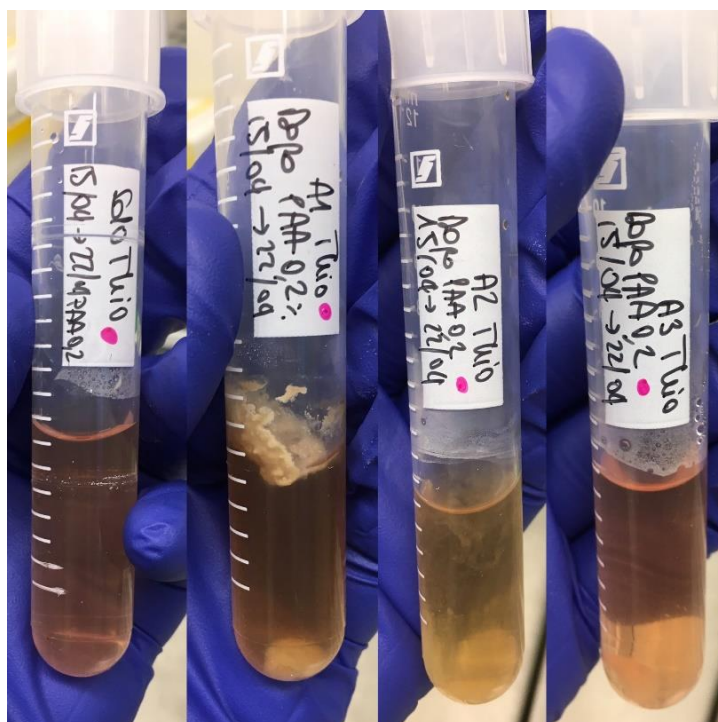


Figura 4.7b: Test di sterilità campioni SIS trattati con AA e 0,2% PAA in THIO, dopo 7 giorni.

#### 4.4. COLORAZIONE DI GRAM

La Colorazione di Gram è stata eseguita dopo la CC per constatare l'avvenuta contaminazione e l'adesione dei ceppi batterici impiegati. In Figura 4.8 si possono notare in viola i batteri Gram<sup>+</sup> (*Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*) ed in rosa i Gram<sup>-</sup> (*Escherichia coli*).

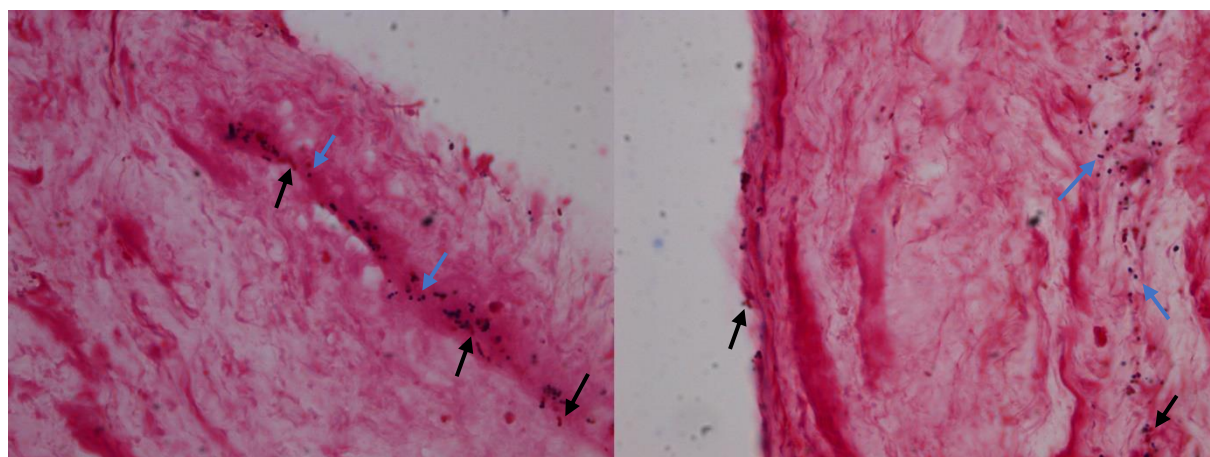


Figura 4.8: Batteri Gram<sup>+</sup> (freccia blu) e Gram<sup>-</sup> (freccia nera) adesi al tessuto dopo CC. In viola (freccia blu) si possono notare gli *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, con la loro forma cocchi a grappolo. Invece, in rosa (freccia nera) si possono distinguere gli *Escherichia coli*, con la loro tipica forma a bastoncino, 100X.

#### **4.5. IDENTIFICAZIONE QUALITATIVA DI CONTAMINANTI BATTERICHE**

Dopo la CC, le piastre *chocolate agar*, seminate con l'ultima soluzione di lavaggio e ricche di colonie batteriche (Figura 4.9), sono state portate al laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'Università di Padova per l'identificazione dei ceppi batterici di provenienza.

Le contaminanti rilevate tramite la spettrometria di massa MALDI-TOF erano esattamente i tre ceppi batterici impiegati per la CC, ovvero *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Quindi, da questi risultati si è potuto confermare l'avvenuta contaminazione con i ceppi batterici considerati.

Dopo la decellularizzazione e la sterilizzazione con AA ed entrambe le percentuali di PAA, le piastre *agar chocolate*, seminate con l'ultima soluzione di lavaggio, risultavano prive di colonie isolate di contaminanti (Figura 4.9).

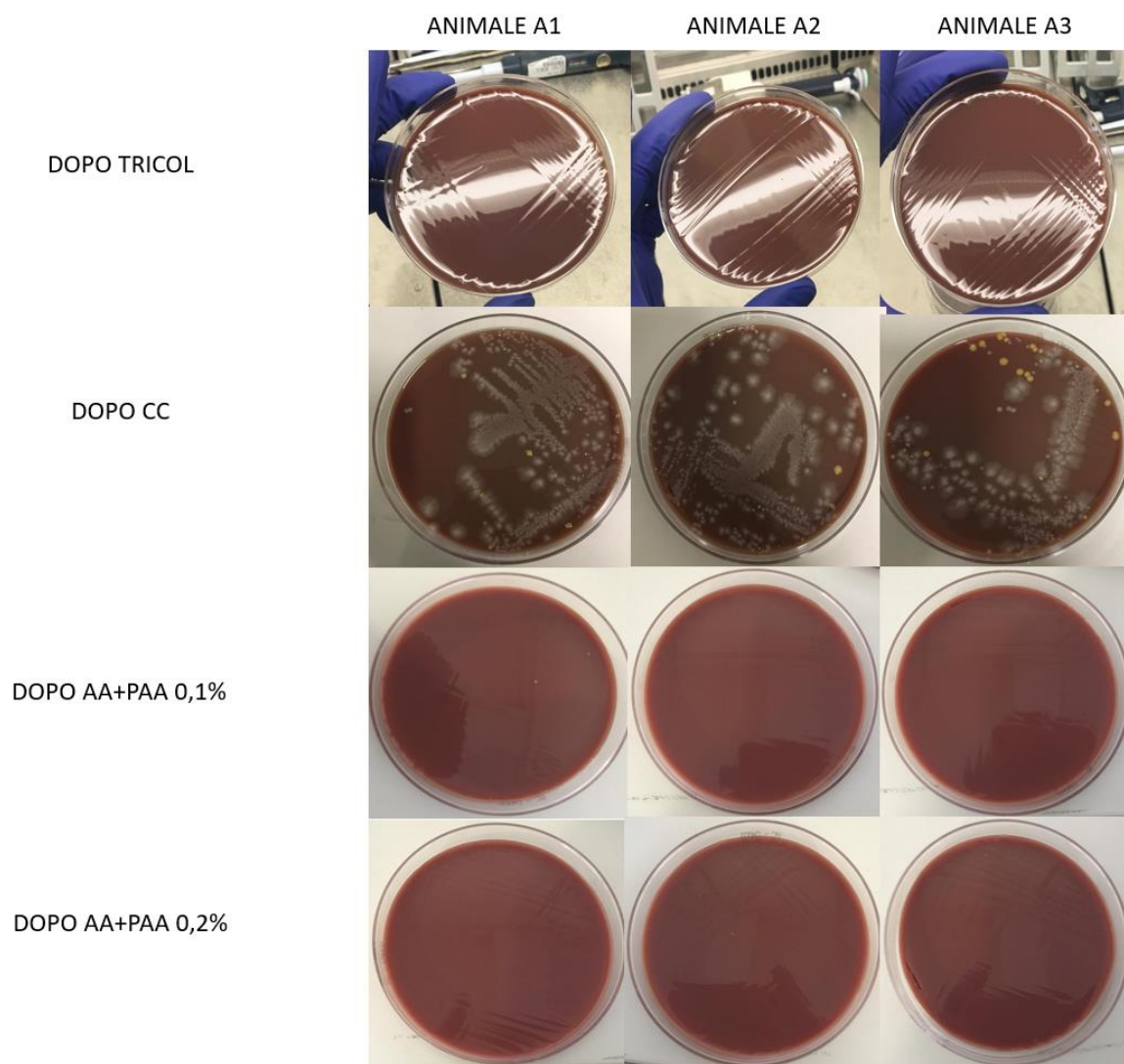


Figura 4.9: Piastre *chocolate agar* dopo TRICOL, CC, dopo AA+PAA 0,1% e dopo AA+PAA 0,2%, dopo 48 ore.

#### 4.6. IDENTIFICAZIONE QUANTITATIVA DI CONTAMINANTI BATTERICHE – METODO MPN

I risultati per il metodo MPN sono stati ottenuti verificando l'avvenuta positività (torbidità) e utilizzando il file di calcolo Excel fornito dall' ISO 7218 (Jarvis, Wilrich *et al.* 2010).

Dopo la decellularizzazione, il metodo MPN risultava negativo: non vi erano segni di torbidità e il file di calcolo restituiva un MPN pari a 0, che corrisponde quindi ad un quantitativo di contaminanti inferiori a 18g per 100g (Figura 4.10). I campioni di SIS dopo decellularizzazione sono quindi risultati sterili.

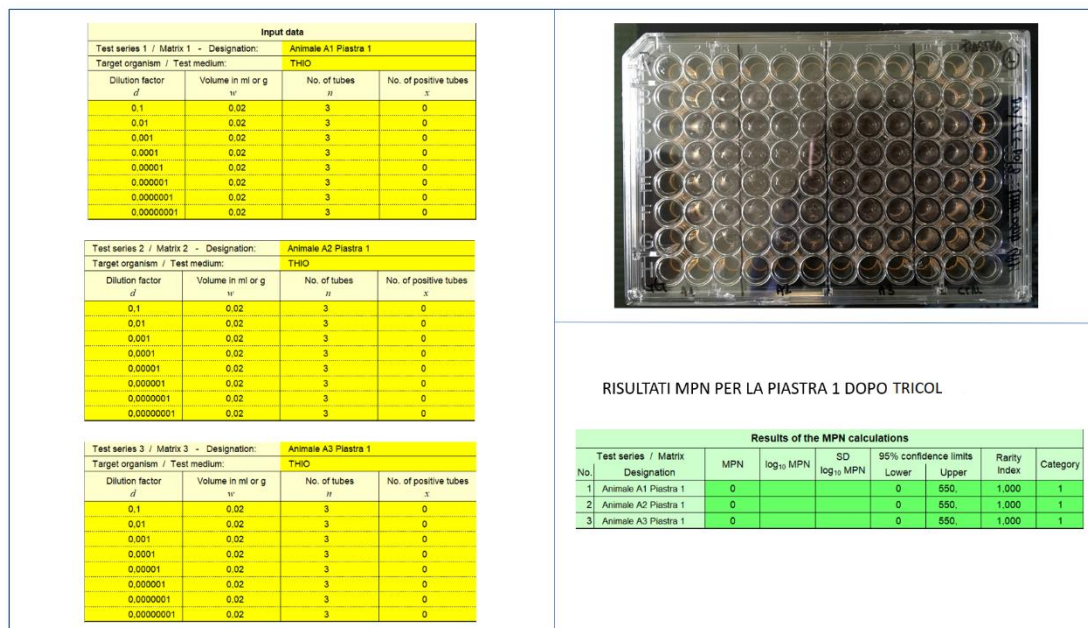


Figura 4.10: Risultati MPN dopo TRICOL, a 7 giorni di incubazione.

Invece, dopo la CC si è osservata la torbidità (positività) e il calcolatore MPN ha restituito un valore infinito, indicativo di un quantitativo di batteri superiore al 18.000 g per 100g (Figura 4.11). Anche con questo metodo è stata confermata l'avvenuta contaminazione.

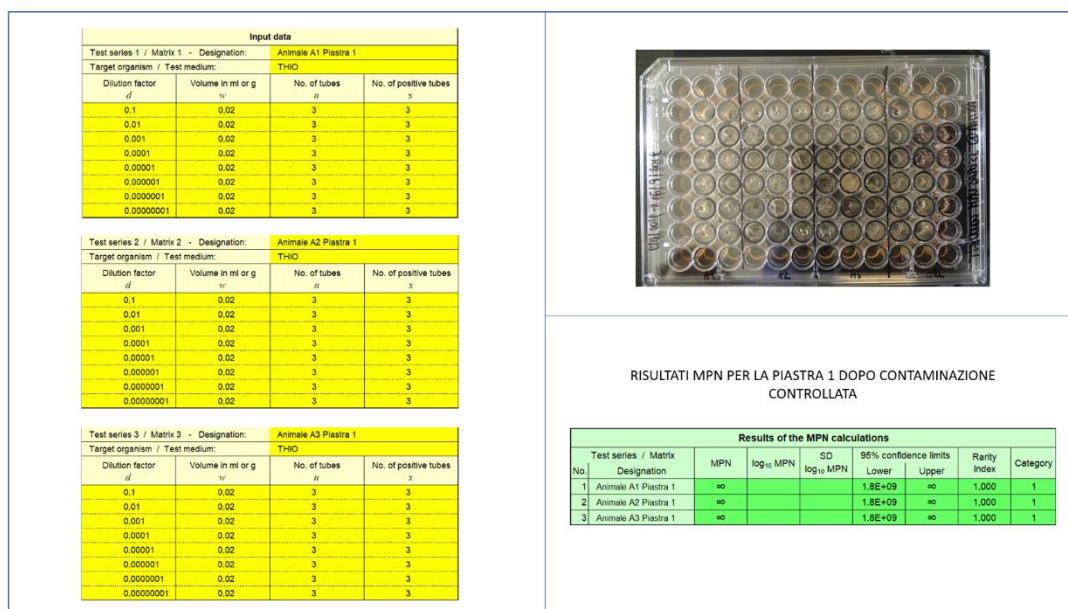


Figura 4.11: Risultati MPN dopo CC, a 7 giorni di incubazione.

Per entrambi i trattamenti con AA+PAA (0,1% e 0,2%), il metodo MPN risultava negativo: non vi era segni di torbidità e il file di calcolo restituiva un MPN pari a 0, che corrisponde quindi

ad un quantitativo di contaminanti inferiore a 18g per 100g (Figura 12a e b). Secondo queste osservazioni, i campioni di SIS sono risultati sterilizzati con entrambe le concentrazioni di PAA.

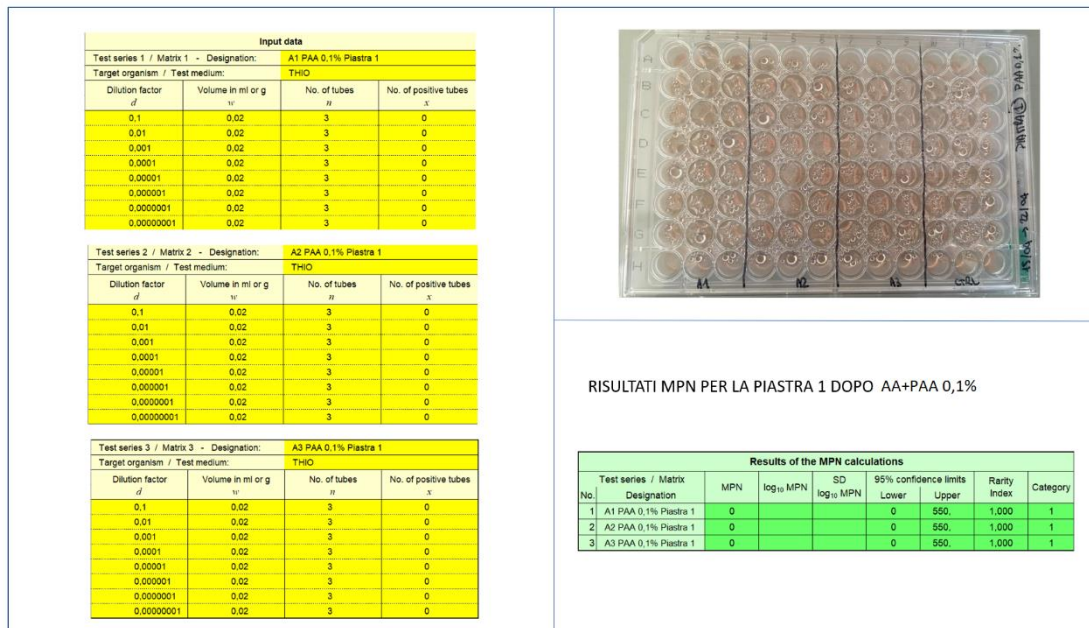


Figura 4.12a: Risultati MPN dopo 0,1% PAA, a 7 giorni di incubazione.

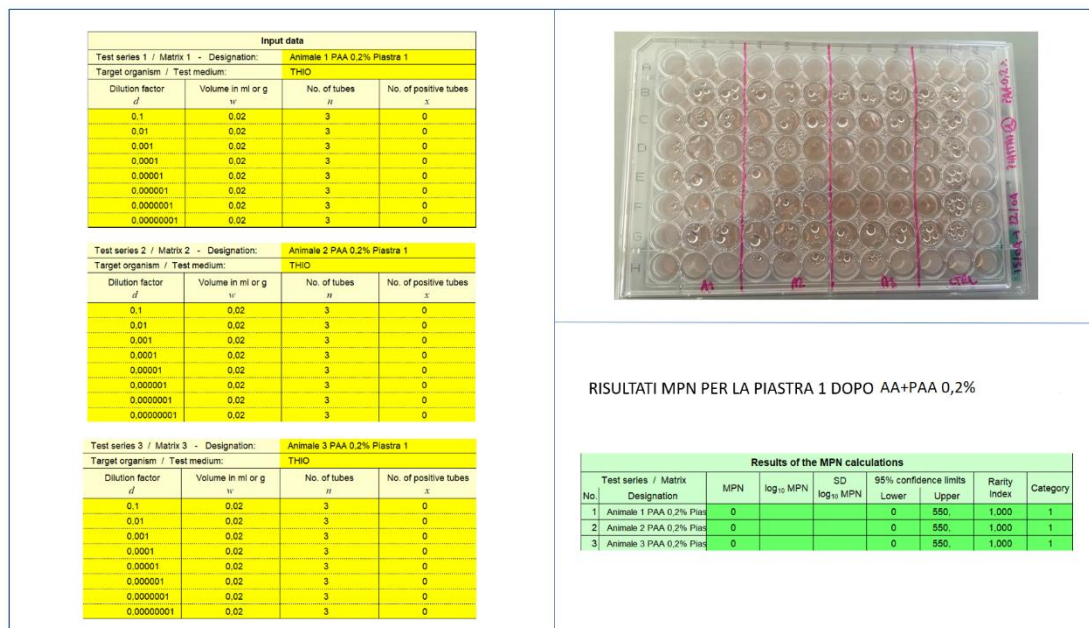


Figura 4.12b: Risultati MPN dopo 0,2% PAA, a 7 giorni di incubazione.





## DISCUSSIONE

---

La SIS è sicuramente un biomateriale promettente e versatile. Il suo elevato potenziale rigenerativo, dovuto anche a una ECM particolarmente ricca in GF, l'ha resa di notevole interesse biomedico per interventi di riparazione e ricostruzione di vari apparati dell'organismo. Essendo xenogenica in quanto di origine porcina, prima del suo utilizzo clinico è necessario trattarla opportunamente con tecniche di decellularizzazione, per rimuovere le cellule del donatore, e sterilizzazione, per eliminare contaminanti batteriche associate alla sua derivazione intestinale. È quindi essenziale renderla il più possibile biocompatibile per prevenire reazioni avverse, come infezioni e/o rigetto immunitario, una volta impiantata nel ricevente.

Questo lavoro di tesi si prefigge proprio questo obiettivo, ovvero ottimizzare un protocollo di sterilizzazione con lo scopo di ottenere una SIS-ECM decellularizzata e sterile. Il protocollo utilizzato è stato ottimizzato a partire da un metodo ideato dal laboratorio di Medicina Rigenerativa Cardiovascolare dell'Università di Padova, dove anche questo studio si è svolto, ed è già stato testato con successo su *scaffold* xenogenici pericardi acellulari [31].

Rispetto a quello precedentemente sviluppato per il pericardio bovino e porcino [31], il protocollo applicato alla SIS porcina decellularizzata si compone di una preliminare decontaminazione (AA+PAA 0,1% a +4°C), in quanto il tessuto nativo presenta un elevato *bioburden*, e di due successive varianti, ossia un trattamento con AA e due diverse concentrazioni di PAA (0,1% e 0,2% a 27°C). Per testare l'efficacia del trattamento sterilizzante a base di AA e PAA, si è anche proceduto a ricreare *in vitro* il peggior scenario di *bioburden* attraverso una CC con tre ceppi batterici noti.

Il protocollo TRICOL si conferma efficace anche nella decellularizzazione della SIS: infatti, la quantità di acidi nucleici residua nello scaffold è in media pari a  $24,14 \pm 4,52$  ng/mg, di molto al di sotto del valore di soglia di 50 ng/mg proposto da Crapo *et al* [20]. Inoltre, le immagini istologiche mostrano l'assenza di nuclei visibili e la conservazione dell'architettura dell'ECM, compresa quella delle strutture vascolari. Rispetto ad altri protocolli di decellularizzazione già pubblicati per la SIS, TRICOL rimuove efficacemente le componenti cellulari del donatore e non altera l'integrità strutturale delle ECM; inoltre, come è stato dimostrato dal gruppo di Medicina Rigenerativa Cardiovascolare dell'Università di Padova, i residui dei detergenti impiegati si riscontrano in concentrazioni infinitesime, che non hanno nessun effetto avverso sulla vitalità cellulare e quindi sul potenziale rigenerativo [113]. Analisi preliminari effettuate

nello stesso laboratorio hanno evidenziato, inoltre, che il metodo di Badylak *et al.* (0,1% PAA e 4% etanolo in agitazione per 2 ore a +4°C; [52]) risulta inefficiente nella rimozione completa del materiale cellulare.

Il trattamento della SIS acellulare con AA e PAA a diverse concentrazioni induce differenti effetti sulla ECM. Le analisi istologiche mostrano, infatti, il mantenimento della struttura e della rete vascolare negli *scaffold* SIS trattati con AA+PAA 0,1%, senza evidenziare danni alle fibre di collagene. Diversamente, la concentrazione allo 0,2% di PAA risulta essere molto aggressiva, comportando la formazione di spazi tra le fibre della ECM, l'assottigliamento dello *scaffold* e distruggendo l'impalcatura delle strutture vascolari.

Per quanto riguarda l'efficacia di sterilizzazione degli *scaffold* SIS dopo i diversi trattamenti, i test di sterilità, eseguiti dopo ogni fase del protocollo, hanno dato risultati non sempre univoci.

In particolare, secondo i test di torbidità, i campioni risultano positivi per contaminazioni sia batterica che fungina dopo la prima decontaminazione pre-decellularizzazione, confermando, come atteso, che il singolo trattamento di AA+PAA 0,1% a + 4°C non è sufficiente a ridurre il *bioburden* della SIS nativa. Anche in seguito al trattamento TRICOL, tre campioni di SIS sono risultati positivi, rispettivamente uno da contaminazione batterica e due fungina. Infine, gli *scaffold* SIS contaminati in modo controllato e poi trattati con AA+PAA 0,1% e AA+PAA 0,2%, presentano in entrambi i casi due campioni su tre positivi alla contaminazione di batteri.

Risultati dissimilari, invece, sono forniti dai metodi quantitativo MPN e qualitativo MALDI-TOF. Entrambi dimostrano che gli *scaffold* SIS risultano sterili sia dopo trattamento TRICOL, che dopo AA+PAA, ad entrambe le concentrazioni.

Una spiegazione plausibile a ciò può essere dovuta al fatto che nei test di torbidità sono stati impiegati *punches* di SIS, invece nei metodi di identificazione e quantificazione di contaminanti l'ultima soluzione in cui gli stessi *scaffold* sono stati lavati. Seguendo le linee guida della Farmacopea Europea per i campioni biologici [35], i test di sterilità possono essere eseguiti con frammenti di tessuto o con la soluzione di risciacquo finale. Impiegando quest'ultima, si ha il vantaggio di non sprecare tessuto, ottenendo una verifica di sterilità ritenuta sufficiente dalla Farmacopea Europea. Dall'interpretazione dei risultati ottenuti, emerge come questo test non sia in grado di fornire informazioni sufficienti a questo scopo. Né la Farmacopea né le ISO 11737 [32], [35] raccomandano di utilizzare ulteriori analisi specifiche per verificare l'efficacia di un metodo di sterilizzazione, come per esempio metodi per l'identificazione qualitativa dei contaminanti e test di vitalità per verificare che i batteri rimasti adesi siano stati effettivamente

inattivati dal trattamento sterilizzante applicato. Nel presente studio, è stata aggiunta l'identificazione dei contaminanti tramite MALDI-TOF, dopo aver seminato piastre *chocolate agar* con l'ultima soluzione di lavaggio. Sarebbe opportuno, ad esempio, realizzare lo stesso test seminando un omogenato dello *scaffold* SIS, invece del semplice mezzo di lavaggio, e procedere quindi nuovamente alla verifica qualitativa degli eventuali contaminanti presenti.

Come accennato inizialmente, questo protocollo di sterilizzazione è stato testato su biomateriali xenogenici pericardici acellulari (bovini e porcini). Diversamente da questa ricerca, Fidalgo *et al.* [31] hanno impiegato concentrazioni inferiori di PAA, ovvero 0,05% e 0,01%. Nel trattamento dei pericardi decellularizzati, entrambe le concentrazioni di PAA, combinate con AA, hanno permesso la rimozione dei microorganismi batterici, così come verificato tramite MPN e MALDI-TOF. Negli *scaffold* di pericardio bovino, l'architettura e i componenti della ECM sono stati mantenuti dopo il trattamento AA+PAA (ad entrambe le concentrazioni). All'opposto, il trattamento con AA+PAA 0,1% ha causato frammentazioni al collagene degli *scaffold* porcini. Nel caso della SIS porcina, gli *scaffold* trattati con AA+PAA allo 0,1% preservano la struttura della ECM senza danni evidenti. Questo risultato di mantenimento della ECM sembra in linea con quanto osservato da Badylak *et al.*, che propongono un trattamento per decontaminare, decellularizzare e sterilizzare la SIS a base di 0,1% PAA e 4% etanolo per 2 ore in agitazione continua [52]. Probabilmente, la natura e lo spessore del tessuto risultano decisivi per la scelta della concentrazione di PAA da utilizzare. Come è stato dimostrato dai risultati di questa ricerca dopo il trattamento AA+PAA 0,2%, una concentrazione troppo elevata può, di certo, comportare seri danni alla ECM potenzialmente in grado di compromettere le funzionalità dello *scaffold* sterilizzato una volta impiantato.

Dai risultati ottenuti finora, l'impiego di una concentrazione allo 0,1% di PAA consente quindi di ottenere una SIS acellulare senza comportare danni alla struttura della ECM, fondamentale per il suo utilizzo come *scaffold* per la rigenerazione e il rimodellamento di tessuti. Ad ogni modo, sono necessari ulteriori analisi e saggi per poter confermare la preservazione della SIS-ECM, attraverso ad esempio analisi di immunofluorescenza per verificare il mantenimento di alcune delle componenti principali della ECM, come collagene di tipo I e IV, laminina ed elastina. Altrettanto fondamentali allo scopo sono le analisi biochimiche, che permetteranno di quantificare la concentrazione di GAGs, di idrossiprolina (collagene), e dei GF, così rilevanti per le proprietà pro-rigeneranti di questo promettente biomateriale.



## **RINGRAZIAMENTI**

---

Giunti al termine di questo lungo percorso universitario mi sento di ringraziare tutte le persone che mi sono state accanto e hanno contribuito a rendere possibile questo traguardo. Per primi voglio ringraziare i miei genitori che mi hanno permesso di intraprendere questa esperienza universitaria, supportandomi anche nei momenti più difficili e ricordandomi di credere sempre nelle proprie capacità. Voglio ringraziare anche il mio ragazzo che mi ha sempre ascoltata, spronata e sostenuta nelle mie scelte. Un ringraziamento va al mio relatore, Prof. Andrea Bagno per avermi dato l'opportunità di svolgere l'attività di tesi presso il laboratorio di ricerca di Medicina Rigenerativa Cardiovascolare. Un altro grande ringraziamento va alle mie due correlatrici, la Prof.ssa Laura Iop e la Dott.ssa Tiziana Palmosi, che in questi mesi mi hanno seguita e aiutata, incoraggiandomi e spronandomi soprattutto nei momenti dove le difficoltà rischiavano di prendere il sopravvento. Voglio, inoltre, ringraziare le mie nonne per il loro sostegno e i loro consigli. Ed infine, ringrazio i miei amici che trovano sempre il modo di farmi sorridere e di darmi la carica per ripartire a testa alta.



## BIBLIOGRAFIA

---

- [1] C. Di Bello and A. Bagno, *Interazioni tra biomateriali e tessuti*, Prima Ediz. Bologna, 2009.
- [2] C. Di Bello, *Biomateriali-Introduzione allo studio dei materiali per uso biomedico*, Prima ediz. Bologna, 2004.
- [3] F. Asghari, M. Samiei, K. Adibkia, A. Akbarzadeh, and S. Davaran, “Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review,” *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.*, vol. 45, no. 2, pp. 185–192, Feb. 2017.
- [4] S. I. Correia *et al.*, “Current concepts: tissue engineering and regenerative medicine applications in the ankle joint,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 11, no. 92, pp. 20130784–20130784, Dec. 2013.
- [5] “Tissue Engineering,” in *Craig’s Restorative Dental Materials*, Elsevier, 2012, pp. 369–384.
- [6] Y. Ikada, “Challenges in tissue engineering,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 3, no. 10, pp. 589–601, Oct. 2006.
- [7] U. A. Stock and J. P. Vacanti, “Tissue Engineering: Current State and Prospects,” *Annu. Rev. Med.*, vol. 52, no. 1, pp. 443–451, Feb. 2001.
- [8] B. Bakhshandeh *et al.*, “Tissue engineering; strategies, tissues, and biomaterials,” *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, vol. 33, no. 2, pp. 144–172, Jul. 2017.
- [9] J. L. Drury and D. J. Mooney, “Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 24, pp. 4337–4351, Nov. 2003.
- [10] G. Chen, T. Ushida, and T. Tateishi, “Scaffold Design for Tissue Engineering,” *Macromol. Biosci.*, vol. 2, no. 2, pp. 67–77, Feb. 2002.
- [11] S. Yi, F. Ding, L. Gong, and X. Gu, “Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine,” *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, vol. 12, no. 3, pp. 233–246, Feb. 2017.



- [12] S. F. Badylak, "Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction," *Transpl. Immunol.*, vol. 12, no. 3–4, pp. 367–377, Apr. 2004.
- [13] N. Campbell, R. J.B, and G. Mitchell L, *Biology*, Inc. 1999.
- [14] R. Londono and S. F. Badylak, "Biologic Scaffolds for Regenerative Medicine: Mechanisms of In vivo Remodeling," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 43, no. 3, pp. 577–592, Mar. 2015.
- [15] T. W. Gilbert, T. L. Sellaro, and S. F. Badylak, "Decellularization of tissues and organs," *Biomaterials*, vol. 27, no. 19, pp. 3675–3683, Jul. 2006.
- [16] J. P. Hodde, R. D. Record, H. A. Liang, and S. F. Badylak, "Vascular endothelial growth factor in porcine-derived extracellular matrix.," *Endothelium*, vol. 8, no. 1, pp. 11–24, 2001.
- [17] C. A. McDevitt, G. M. Wildey, and R. M. Cutrone, "Transforming growth factor- $\beta$ 1 in a sterilized tissue derived from the pig small intestine submucosa," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 67A, no. 2, pp. 637–640, Nov. 2003.
- [18] M. Parmaksiz, A. E. Elçin, and Y. M. Elçin, "Decellularization of Bovine Small Intestinal Submucosa," in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 1577, 2017, pp. 129–138.
- [19] T. J. Keane, I. T. Swinehart, and S. F. Badylak, "Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance," *Methods*, vol. 84. pp. 25–34, Aug-2015.
- [20] P. M. Crapo, T. W. Gilbert, and S. F. Badylak, "An overview of tissue and whole organ decellularization processes," *Biomaterials*, vol. 32, no. 12, pp. 3233–3243, Apr. 2011.
- [21] L. Iop *et al.*, "The influence of heart valve leaflet matrix characteristics on the interaction between human mesenchymal stem cells and decellularized scaffolds," *Biomaterials*, vol. 30, no. 25, pp. 4104–4116, Sep. 2009.
- [22] A. Vaughan, P. Buzzini, and F. Clementi, *Laboratorio didattico di microbiologia*, Prima ediz. Milano, 2008.
- [23] Q.-Q. Qiu, W.-Q. Sun, and J. Connor, "Sterilization of Biomaterials of Synthetic and Biological Origin," in *Comprehensive Biomaterials*, Elsevier, 2011, pp. 127–144.

- [24] E.P. Commission, “5.1-General arguments on the sterility,” in *European Pharmacopeia 5.0*, 2005.
- [25] W. Q. Sun and P. Leung, “Calorimetric study of extracellular tissue matrix degradation and instability after gamma irradiation,” *Acta Biomater.*, vol. 4, no. 4, pp. 817–826, Jul. 2008.
- [26] “Sterilizzazione con acido peracetico | Linee guida sulla disinfezione e la sterilizzazione | Biblioteca delle linee guida | Biblioteca delle linee guida | Controllo delle infezioni | CDC.” [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/sterilization/peracetic-acid.html>. [Accessed: 18-Jun-2019].
- [27] R. . Lomas, J. . Cruse-Sawyer, C. Simpson, E. Ingham, R. Bojar, and J. . Kearney, “Assessment of the biological properties of human split skin allografts disinfected with peracetic acid and preserved in glycerol,” *Burns*, vol. 29, no. 6, pp. 515–525, Sep. 2003.
- [28] R. J. Lomas, L. M. Jennings, J. Fisher, and J. N. Kearney, “Effects of a peracetic acid disinfection protocol on the biocompatibility and biomechanical properties of human patellar tendon allografts,” *Cell Tissue Bank.*, vol. 5, no. 3, pp. 149–60, 2004.
- [29] L. M. Delgado, A. Pandit, and D. I. Zeugolis, “Influence of sterilisation methods on collagen-based devices stability and properties,” *Expert Rev. Med. Devices*, vol. 11, no. 3, pp. 305–314, May 2014.
- [30] J. Hodde, A. Janis, D. Ernst, D. Zopf, D. Sherman, and C. Johnson, “Effects of sterilization on an extracellular matrix scaffold: Part I. Composition and matrix architecture,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 18, no. 4, pp. 537–543, Apr. 2007.
- [31] C. Fidalgo *et al.*, “A sterilization method for decellularized xenogeneic cardiovascular scaffolds,” *Acta Biomater.*, vol. 67, pp. 282–294, Feb. 2018.
- [32] EN ISO 11737-1, “Sterilization of health care products - Microbiological methods - Part 1: Determination of a population of microorganisms on products,” 2018.
- [33] L.-M. Mauerhofer, P. Pappenreiter, C. Paulik, A. H. Seifert, S. Bernacchi, and S. K.-M. R. Rittmann, “Methods for quantification of growth and productivity in anaerobic microbiology and biotechnology,” *Folia Microbiol. (Praha)*, Nov. 2018.

- [34] S. Clais *et al.*, “Comparison of viable plate count, turbidity measurement and real-time PCR for quantification of *Porphyromonas gingivalis*,” *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 60, no. 1, pp. 79–84, Jan. 2015.
- [35] E.P. Commission, “2.6-Biological Tests,” in *European Pharmacopeia 5.0*, 2005.
- [36] E.P. Commission, “5.1.6-Alternative methods for control of microbiological quality,” in *European Pharmacopeia 6.0*, 2008.
- [37] R. Lindqvist, “Estimation of *Staphylococcus aureus* growth parameters from turbidity data: characterization of strain variation and comparison of methods.,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 72, no. 7, pp. 4862–70, Jul. 2006.
- [38] S. Sutton, “The Most Probable Number Method and Its Uses in Enumeration, Qualification, and Validation,” *J. Valid. Technol.*, 2010.
- [39] FDA, “Bacterial Analytical Manual, Appendix 2,” 2010. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm109656.htm>.
- [40] L. Iop, T. Palmosi, E. Dal Sasso, and G. Gerosa, “Bioengineered tissue solutions for repair, correction and reconstruction in cardiovascular surgery.,” *J. Thorac. Dis.*, vol. 10, no. Suppl 20, pp. S2390–S2411, Jul. 2018.
- [41] M. S. Sacks and D. C. Gloeckner, “Quantification of the fiber architecture and biaxial mechanical behavior of porcine intestinal submucosa,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 46, no. 1, pp. 1–10, Jul. 1999.
- [42] “A World Leader in Regenerative Medicine - Technology | Cook Medical.” [Online]. Available: <https://www.cookbiotech.com/technology/>. [Accessed: 19-Jun-2019].
- [43] “Cormatrix - MAC’s MEDICAL.” [Online]. Available: <http://www.macsmaterial.com/en/products/cormatrix>. [Accessed: 01-Mar-2019].
- [44] B. Andrée, A. Bär, A. Haverich, and A. Hilfiker, “Small intestinal submucosa segments as matrix for tissue engineering: review.,” *Tissue Eng. Part B. Rev.*, vol. 19, no. 4, pp. 279–91, Aug. 2013.
- [45] J. P. Hodde, R. D. Record, R. S. Tullius, and S. F. Badylak, “Retention of Endothelial Cell Adherence to Porcine-Derived Extracellular Matrix after Disinfection and Sterilization,” *Tissue Eng.*, vol. 8, no. 2, pp. 225–234, Apr. 2002.

- [46] J. P. Hodde, S. F. Badylak, A. O. Brightman, and S. L. Voytik-Harbin, "Glycosaminoglycan Content of Small Intestinal Submucosa: A Bioscaffold for Tissue Replacement," *Tissue Eng.*, vol. 2, no. 3, pp. 209–217, Sep. 1996.
- [47] S. F. Badylak, D. O. Freytes, and T. W. Gilbert, "Reprint of: Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function," *Acta Biomater.*, vol. 23, pp. S17–S26, Sep. 2015.
- [48] S. F. Badylak, "The extracellular matrix as a biologic scaffold material ☆," *Biomaterials*, vol. 28, no. 25, pp. 3587–3593, Sep. 2007.
- [49] K. Lindberg and S. F. Badylak, "Porcine small intestinal submucosa (SIS): a bioscaffold supporting in vitro primary human epidermal cell differentiation and synthesis of basement membrane proteins.," *Burns*, vol. 27, no. 3, pp. 254–66, May 2001.
- [50] J.-C. Luo *et al.*, "A multi-step method for preparation of porcine small intestinal submucosa (SIS).," *Biomaterials*, vol. 32, no. 3, pp. 706–13, Jan. 2011.
- [51] Y. Ji *et al.*, "Diverse preparation methods for small intestinal submucosa (SIS): Decellularization, components, and structure.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 107, no. 3, pp. 689–697, Mar. 2019.
- [52] B. Brown, K. Lindberg, J. Reing, D. B. Stolz, and S. F. Badylak, "The Basement Membrane Component of Biologic Scaffolds Derived from Extracellular Matrix," *Tissue Eng.*, vol. 12, no. 3, pp. 519–526, Mar. 2006.
- [53] G. A. Abraham, J. Murray, K. Billiar, and S. J. Sullivan, "Evaluation of the porcine intestinal collagen layer as a biomaterial," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 51, no. 3, pp. 442–452, Sep. 2000.
- [54] S. F. Badylak, "Small Intestinal Submucosa (SIS): A Biomaterial Conducive to Smart Tissue Remodeling," in *Tissue Engineering*, Boston, MA: Birkhäuser Boston, 1993, pp. 179–189.
- [55] L. Shi and V. Ronfard, "Biochemical and biomechanical characterization of porcine small intestinal submucosa (SIS): a mini review.," *Int. J. Burns Trauma*, vol. 3, no. 4, pp. 173–9, 2013.
- [56] T. Holubec *et al.*, "The Use of Extracellular Matrix Patches in Cardiac Surgery," *J.*

- Card. Surg.*, vol. 30, no. 2, pp. 145–148, Feb. 2015.
- [57] S. Badylak, A. Liang, R. Record, R. Tullius, and J. Hodde, “Endothelial cell adherence to small intestinal submucosa: an acellular bioscaffold.,” *Biomaterials*, vol. 20, no. 23–24, pp. 2257–63, Dec. 1999.
- [58] Z. Mosala Nezhad, A. Poncelet, L. de Kerchove, P. Gianello, C. Fervaille, and G. El Khoury, “Small intestinal submucosa extracellular matrix (CorMatrix®) in cardiovascular surgery: a systematic review,” *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.*, vol. 22, no. 6, pp. 839–850, Jun. 2016.
- [59] S. F. Badylak and T. W. Gilbert, “Immune response to biologic scaffold materials,” *Semin. Immunol.*, vol. 20, no. 2, pp. 109–116, Apr. 2008.
- [60] A. V Piterina *et al.*, “ECM-based materials in cardiovascular applications: Inherent healing potential and augmentation of native regenerative processes.,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 10, no. 10, pp. 4375–417, Nov. 2009.
- [61] A. J. Allman *et al.*, “XENOGENEIC EXTRACELLULAR MATRIX GRAFTS ELICIT A TH2-RESTRICTED IMMUNE RESPONSE1,” *Transplantation*, vol. 71, no. 11, pp. 1631–1640, Jun. 2001.
- [62] R. D. Record *et al.*, “In vivo degradation of 14C-labeled small intestinal submucosa (SIS) when used for urinary bladder repair.,” *Biomaterials*, vol. 22, no. 19, pp. 2653–9, Oct. 2001.
- [63] T. W. Gilbert, A. M. Stewart-Akers, A. Simmons-Byrd, and S. F. Badylak, “Degradation and Remodeling of Small Intestinal Submucosa in Canine Achilles Tendon Repair,” *J. Bone Jt. Surg.*, vol. 89, no. 3, pp. 621–630, Mar. 2007.
- [64] S. F. Badylak, G. C. Lantz, A. Coffey, and L. A. Geddes, “Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog.,” *J. Surg. Res.*, vol. 47, no. 1, pp. 74–80, Jul. 1989.
- [65] M. C. Hiles, S. F. Badylak, G. C. Lantz, K. Kokini, L. A. Geddes, and R. J. Morff, “Mechanical properties of xenogeneic small-intestinal submucosa when used as an aortic graft in the dog.,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 29, no. 7, pp. 883–91, Jul. 1995.
- [66] M. A. Padalino *et al.*, “Extracellular matrix graft for vascular reconstructive surgery: evidence of autologous regeneration of the neoaorta in a murine model,” *Eur. J.*

- Cardio-Thoracic Surg.*, vol. 42, no. 5, pp. e128–e135, Nov. 2012.
- [67] L. Boni *et al.*, “Reconstruction of pulmonary artery with porcine small intestinal submucosa in a lamb surgical model: Viability and growth potential,” *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 144, no. 4, pp. 963-969.e1, Oct. 2012.
- [68] C. M. G. Ramos *et al.*, “Myocardial regeneration after implantation of porcine small intestinal submucosa in the left ventricle.,” *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.*, vol. 29, no. 2, pp. 202–13.
- [69] B. Yanagawa, V. Rao, T. M. Yau, and R. J. Cusimano, “Potential myocardial regeneration with CorMatrix ECM: A case report,” *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 147, no. 4, pp. e41–e43, Apr. 2014.
- [70] M. Stelly and T. C. Stelly, “Histology of CorMatrix Bioscaffold 5 Years After Pericardial Closure,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 96, no. 5, pp. e127–e129, Nov. 2013.
- [71] M. W. Gerdisch, R. J. Shea, and M. D. Barron, “Clinical experience with CorMatrix extracellular matrix in the surgical treatment of mitral valve disease.,” *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 148, no. 4, pp. 1370–8, Oct. 2014.
- [72] C. L. Gilbert, J. Gnanapragasam, R. Benhaggen, and W. M. Novick, “Novel Use of Extracellular Matrix Graft for Creation of Pulmonary Valved Conduit,” *World J. Pediatr. Congenit. Hear. Surg.*, vol. 2, no. 3, pp. 495–501, Jul. 2011.
- [73] Z. Mosala Nezhad, P. Baldin, A. Poncelet, and G. El Khoury, “Calcific Degeneration of CorMatrix 4 Years After Bicuspidization of Unicuspid Aortic Valve.,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 104, no. 6, pp. e431–e433, Dec. 2017.
- [74] D. M. Ropcke *et al.*, “Small intestinal submucosa tricuspid valve tube graft shows growth potential, remodelling and physiological valve function in a porcine model†,” *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.*, vol. 24, no. 6, pp. 918–924, Jun. 2017.
- [75] J. Rasmussen *et al.*, “In-vitro and in-vivo evaluation of a novel bioprosthetic pulmonary valve for use in congenital heart surgery,” *J. Cardiothorac. Surg.*, vol. 14, no. 1, p. 6, Jan. 2019.
- [76] G. S. Hussey, M. C. Cramer, and S. F. Badylak, “Extracellular Matrix Bioscaffolds for Building Gastrointestinal Tissue.,” *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–13, 2018.

- [77] P. Caione, N. Capozza, D. Zavaglia, G. Palombaro, and R. Boldrini, "In vivo bladder regeneration using small intestinal submucosa: experimental study," *Pediatr. Surg. Int.*, vol. 22, no. 7, pp. 593–599, Jul. 2006.
- [78] J. E. Nuininga *et al.*, "A rabbit model to tissue engineer the bladder," *Biomaterials*, vol. 25, no. 9, pp. 1657–61, Apr. 2004.
- [79] Y. Wang and L. Liao, "Histologic and functional outcomes of small intestine submucosa-regenerated bladder tissue," *BMC Urol.*, vol. 14, p. 69, Aug. 2014.
- [80] C. C. Roth *et al.*, "Temporal differentiation and maturation of regenerated rat urothelium," *BJU Int.*, vol. 103, no. 6, pp. 836–41, Mar. 2009.
- [81] V. Musahl *et al.*, "The use of porcine small intestinal submucosa to enhance the healing of the medial collateral ligament—a functional tissue engineering study in rabbits," *J. Orthop. Res.*, vol. 22, no. 1, pp. 214–220, Jan. 2004.
- [82] J. E. Valentin, N. J. Turner, T. W. Gilbert, and S. F. Badylak, "Functional skeletal muscle formation with a biologic scaffold," *Biomaterials*, vol. 31, no. 29, pp. 7475–7484, Oct. 2010.
- [83] Z.-L. Wang *et al.*, "Comparison of small intestinal submucosa and polypropylene mesh for abdominal wall defect repair," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 29, no. 6, pp. 663–682, Apr. 2018.
- [84] N. Bergonse Neto *et al.*, "Regeneration of Tracheal Tissue in Partial Defects Using Porcine Small Intestinal Submucosa," *Stem Cells Int.*, vol. 2018, pp. 1–8, 2018.
- [85] M. K. Chen and S. F. Badylak, "Small Bowel Tissue Engineering Using Small Intestinal Submucosa as a Scaffold," *J. Surg. Res.*, vol. 99, no. 2, pp. 352–358, Aug. 2001.
- [86] Z. Q. Wang, Y. Watanabe, and A. Toki, "Experimental assessment of small intestinal submucosa as a small bowel graft in a rat model," *J. Pediatr. Surg.*, vol. 38, no. 11, pp. 1596–601, Nov. 2003.
- [87] M. F. Lopes, A. Cabrita, J. Ilharco, P. Pessa, and J. Patrício, "Grafts of Porcine Intestinal Submucosa for Repair of Cervical and Abdominal Esophageal Defects in the Rat," *J. Investig. Surg.*, vol. 19, no. 2, pp. 105–111, Jan. 2006.

- [88] S. Demirbilek, T. Kanmaz, I. Zardali, M. N. Edali, and S. Yücesan, "Using porcine small intestinal submucosa in intestinal regeneration," *Pediatr. Surg. Int.*, vol. 19, no. 8, pp. 588–592, Oct. 2003.
- [89] "LactoSorb® Resorbable Fixation System." [Online]. Available: <https://www.zimmerbiomet.com/medical-professionals/cmflactosorb-resorbable-fixation-system.html>. [Accessed: 22-Jun-2019].
- [90] F. Susin, *Dispensa fluidodinamica per Bioingegneria*. .
- [91] M. A. Padalino *et al.*, "Early and mid-term clinical experience with extracellular matrix scaffold for congenital cardiac and vascular reconstructive surgery: a multicentric Italian study," *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.*, vol. 21, no. 1, pp. 40–9; discussion 49, Jul. 2015.
- [92] A. H. Zaidi *et al.*, "Preliminary experience with porcine intestinal submucosa (CorMatrix) for valve reconstruction in congenital heart disease: Histologic evaluation of explanted valves," *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 148, no. 5, pp. 2216–2225.e1, Nov. 2014.
- [93] R. G. Witt, G. Raff, J. Van Gundy, M. Rodgers-Ohlau, and M.-S. Si, "Short-term experience of porcine small intestinal submucosa patches in paediatric cardiovascular surgery," *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.*, vol. 44, no. 1, pp. 72–76, Jul. 2013.
- [94] A. Quarti, S. Nardone, M. Colaneri, G. Santoro, and M. Pozzi, "Preliminary experience in the use of an extracellular matrix to repair congenital heart diseases," *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.*, vol. 13, no. 6, pp. 569–572, Dec. 2011.
- [95] F. G. Scholl, M. M. Boucek, K.-C. Chan, L. Valdes-Cruz, and R. Perryman, "Preliminary Experience With Cardiac Reconstruction Using Decellularized Porcine Extracellular Matrix Scaffold: Human Applications in Congenital Heart Disease," *World J. Pediatr. Congenit. Hear. Surg.*, vol. 1, no. 1, pp. 132–136, Apr. 2010.
- [96] J. Wallen and V. Rao, "Extensive Tricuspid Valve Repair After Endocarditis Using CorMatrix Extracellular Matrix," *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 97, no. 3, pp. 1048–1050, Mar. 2014.
- [97] S. Sündermann, H. Rodriguez Cetina Biefer, M. Emmert, and V. Falk, "Use of Extracellular Matrix Materials in Patients with Endocarditis," *Thorac. Cardiovasc.*



- Surg.*, vol. 62, no. 01, pp. 076–079, Nov. 2012.
- [98] H. E. M. Mewhort, J. D. Turnbull, H. C. Meijndert, J. M. C. Ngu, and P. W. M. Fedak, “Epicardial infarct repair with basic fibroblast growth factor–enhanced CorMatrix-ECM biomaterial attenuates postischemic cardiac remodeling,” *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 147, no. 5, pp. 1650–1659, May 2014.
- [99] F. Rosario-Quinones, M. S. Magid, J. Yau, A. Pawale, and K. Nguyen, “Tissue reaction to porcine intestinal Submucosa (CorMatrix) implants in pediatric cardiac patients: a single-center experience,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 99, no. 4, pp. 1373–7, Apr. 2015.
- [100] N. Filippo, A. Paola, I. Laura, S. Michele, and G. Gino, “Biocompatibility Evaluation Criteria for Novel Xenograft Materials: Distribution and Quantification of Remnant Nucleic Acid and Alpha-Gal Epitope,” *J. Stem Cell Res. Ther.*, vol. 01, no. S6, p. , Dec. 2013.
- [101] J. S. Nelson, A. Heider, M.-S. Si, and R. G. Ohye, “Evaluation of Explanted CorMatrix Intracardiac Patches in Children With Congenital Heart Disease,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 102, no. 4, pp. 1329–35, Oct. 2016.
- [102] M. Brown-Etris, C. T. Milne, and J. P. Hodde, “An extracellular matrix graft (Oasis® wound matrix) for treating full-thickness pressure ulcers: A randomized clinical trial,” *J. Tissue Viability*, vol. 28, no. 1, pp. 21–26, Feb. 2019.
- [103] E. N. Mostow, G. D. Haraway, M. Dalsing, J. P. Hodde, D. King, and OASIS Venus Ulcer Study Group, “Effectiveness of an extracellular matrix graft (OASIS Wound Matrix) in the treatment of chronic leg ulcers: a randomized clinical trial,” *J. Vasc. Surg.*, vol. 41, no. 5, pp. 837–43, May 2005.
- [104] B. K. Oelschlager *et al.*, “Biologic prosthesis reduces recurrence after laparoscopic paraesophageal hernia repair: a multicenter, prospective, randomized trial,” *Ann. Surg.*, vol. 244, no. 4, pp. 481–90, Oct. 2006.
- [105] W. S. Helton, P. M. Fisichella, R. Berger, S. Horgan, N. J. Espat, and H. Abcarian, “Short-term outcomes with small intestinal submucosa for ventral abdominal hernia,” *Arch. Surg.*, vol. 140, no. 6, pp. 549–60; discussion 560-2, Jun. 2005.
- [106] D. Bryant *et al.*, “A randomized clinical trial to compare the effectiveness of rotator

- cuff repair with or without augmentation using porcine small intestine submucosa for patients with moderate to large rotator cuff tears: a pilot study,” *J. Shoulder Elb. Surg.*, vol. 25, no. 10, pp. 1623–1633, Oct. 2016.
- [107] H. L. Malcarney, F. Bonar, and G. A. C. Murrell, “Early inflammatory reaction after rotator cuff repair with a porcine small intestine submucosal implant: a report of 4 cases,” *Am. J. Sports Med.*, vol. 33, no. 6, pp. 907–11, Jun. 2005.
- [108] M. H. Zheng, J. Chen, Y. Kirilak, C. Willers, J. Xu, and D. Wood, “Porcine small intestine submucosa (SIS) is not an acellular collagenous matrix and contains porcine DNA: possible implications in human implantation,” *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, vol. 73, no. 1, pp. 61–7, Apr. 2005.
- [109] DALYNN BIOLOGICALS, “McFarland Standard-For in vitro use only-,” 2014.
- [110] “Gram Staining.” [Online]. Available: [https://serc.carleton.edu/microbelife/research\\_methods/microscopy/gramstain.html](https://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/microscopy/gramstain.html). [Accessed: 23-Jun-2019].
- [111] R. Coico, “Gram Staining,” in *Current Protocols in Microbiology*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2005.
- [112] M. Sauget, B. Valot, X. Bertrand, and D. Hocquet, “Can MALDI-TOF Mass Spectrometry Reasonably Type Bacteria?,” *Trends Microbiol.*, vol. 25, no. 6, pp. 447–455, Jun. 2017.
- [113] L. Iop, A. Paolin, P. Aguiari, D. Trojan, E. Cogliati, and G. Gerosa, “Decellularized Cryopreserved Allografts as Off-the-Shelf Allogeneic Alternative for Heart Valve Replacement: In Vitro Assessment Before Clinical Translation,” *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, vol. 10, no. 2, pp. 93–103, Apr. 2017.