



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN

BIOINGEGNERIA

**INGEGNERIA TISSUTALE APPLICATA AL
PADIGLIONE AURICOLARE IN MODELLO
ANIMALE DI *RATTUS NORVEGICUS*:
OTTIMIZZAZIONE DI UN PROTOCOLLO DI
DECELLULARIZZAZIONE E PROSPETTIVE
FUTURE**

Relatore:

Prof.ssa Astolfi Laura

Laureanda:

Ditaranto Michela

Correlatore:

Prof.ssa Albertin Giovanna

ANNO ACCADEMICO 2023–2024

Indice

| | |
|--|-----------|
| Abstract | 1 |
| Introduzione | 3 |
| 1. Cenni di anatomia e fisiologia dell'orecchio esterno | 3 |
| 1.1 Il padiglione auricolare | 4 |
| 1.1.1 Rivestimento cutaneo | 4 |
| 1.1.2 Legamenti e Muscoli | 5 |
| 1.1.3 Innervazione | 6 |
| 1.1.4 Vascolarizzazione | 6 |
| 1.1.5 Fisiologia | 7 |
| 2. Cenni di Patologia..... | 8 |
| 2.1 Microtia | 8 |
| 2.2 Atresia..... | 9 |
| 2.3 Tumori maligni dell'orecchio..... | 10 |
| 2.4 Lesioni | 10 |
| 3. Tecniche di ricostruzione del padiglione auricolare..... | 11 |
| 3.1 Otopoesi mediante cartilagine costale autologa | 11 |
| 3.2 Otopoesi mediante materiale alloplastico..... | 13 |
| 3.3 Dispositivi protesici ottenuti con materiali sintetici | 14 |
| 3.4 Scaffold 3D..... | 15 |
| 4. Tecniche di Decellularizzazione | 16 |
| 4.1 La matrice extracellulare come scaffold biologico..... | 17 |
| 4.2 Metodi di decellularizzazione di organi interi | 18 |
| 4.3 Valutazione della matrice extracellulare decellularizzata | 21 |
| 4.3.1 Verifica della rimozione cellulare | 21 |
| 4.4 Biocompatibilità | 22 |
| 4.4.1 Citotossicità | 23 |
| 4.4.2 Immunogenicità | 25 |
| 4.5 Ricellularizzazione | 26 |
| Obiettivo dello studio..... | 27 |
| Materiali e Metodi | 29 |
| 1. Tecnica chirurgica di espianto dei padiglioni auricolari | 29 |
| 2. Bioreattore | 31 |
| 3. Protocolli di decellularizzazione | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 4. Sezione dei campioni | 35 |
| 5. Test di citotossicità..... | 36 |
| 5.1 Linea cellulare HaCaT | 36 |
| 5.2 Test di contatto diretto | 36 |
| 5.3 Test di contatto indiretto | 37 |
| 5.4 Saggio di vitalità | 38 |
| 6. Contenuto di DNA | 40 |
| 6.1 Estrazione del DNA | 40 |
| 6.2 Quantificazione del DNA..... | 42 |
| 7. Analisi istologica..... | 43 |
| 7.1 Preparazione dei campioni biologici..... | 43 |
| 7.2 Colorazioni..... | 46 |
| 8. Acquisizione delle immagini e quantificazione | 48 |
| 9. Analisi dei dati | 52 |
| Risultati e Discussione | 53 |
| 1. Efficacia della decellularizzazione..... | 53 |
| 1.1 Ispezione visiva..... | 53 |
| 1.2 Analisi istologica qualitativa e quantitativa | 54 |
| 1.2.1 Ematossilina ed Eosina | 54 |
| 1.2.2 DAPI | 57 |
| 1.2.3 Tricromica di Masson | 58 |
| 1.2.4 Alcian Blu | 62 |
| 1.2.5 Weigert..... | 65 |
| 1.3 Contenuto di DNA | 68 |
| 2. Citocompatibilità in vitro | 69 |
| Conclusioni | 71 |
| Riferimenti Bibliografici..... | 73 |
| Sitografia..... | 76 |

Abstract

Presupposti dello studio

I difetti e le malformazioni dell'orecchio esterno si traducono in anomalie estetiche e funzionali che possono avere un impatto psicologico e sociale significativo. Le malformazioni congenite del padiglione auricolare si manifestano con una incidenza complessiva non elevata che tende a rimanere costante negli anni, a cui si aggiungono altre anomalie acquisite, quali traumi, tumori cutanei e ustioni, sempre più frequenti e in aumento. In tutti i casi è possibile intervenire o con la chirurgia ricostruttiva o con l'applicazione di protesi alloplastiche. Purtroppo, le attuali tecniche presentano risultati estetici e funzionali non soddisfacenti. Inoltre, la chirurgia ricostruttiva prevede interventi invasivi con complicanze post-operatorie non trascurabili. Occorre quindi studiare nuove tecnologie in grado di migliorare le prospettive nei pazienti. La decellularizzazione dei tessuti è un approccio innovativo della medicina rigenerativa, combinato con la bioingegneria, finalizzato alla ricostruzione di organi o loro parti. Gli scaffold biocompatibili ottenuti tramite questo processo possono essere colonizzati da cellule autologhe, permettendo così la rigenerazione del tessuto auricolare superando gli attuali limiti ricostruttivi.

Obiettivo

Lo scopo del presente studio è quello di convalidare un protocollo di decellularizzazione ottimizzato per il padiglione auricolare nel modello animale di ratto (*Rattus norvegicus*). La ricerca è stata condotta presso il Laboratorio di Bioacustica dell'Università degli Studi di Padova, appartenente al progetto LIFELAB (Living, Innovative, Fully Engineered, Long-Lasting and Advanced Bioreplacement), finanziato dalla Regione Veneto e gestito dal Consorzio per la Ricerca Sanitaria (CORIS).

Materiali e Metodi

Sono stati espianati sette padiglioni auricolari, preservando le principali vie vascolari (giugulare e carotidea): quattro padiglioni sono stati sottoposti al processo di decellularizzazione, mentre i restanti sono stati lasciati allo stato nativo come controllo di riferimento per valutare l'efficacia del protocollo applicato. Mediante l'utilizzo di un bioreattore, il tessuto nativo è stato sottoposto ad una combinazione di trattamenti chimici e biologici in grado di rimuovere ogni componente cellulare e nucleare, preservando la composizione e la struttura della matrice extracellulare.

Variando i tempi e le modalità di perfusione di alcune soluzioni è stato definito un protocollo di decellularizzazione ottimale. Al termine della procedura sono stati effettuati test di biocompatibilità *in vitro*, test di quantificazione del DNA residuo ed indagini istologiche, come definito dalle linee guida ISO 10993-5 (Tests for *in vitro* cytotoxicity).

Risultati

Dopo una prima fase di individuazione del protocollo ottimale, variando i tempi e le modalità di perfusione di alcune soluzioni, si inserisce il presente studio, con la validazione del protocollo di decellularizzazione che ha fornito i migliori risultati, ripetendo il procedimento su diversi campioni e analizzando statisticamente i risultati ottenuti. L'analisi istologica ha dimostrato una riduzione delle componenti cellulari presenti rispetto al controllo nativo. Anche i nuclei, ben visibili con colorazione E&E e DAPI, sono risultati assenti nei campioni decellularizzati. Inoltre, è stata rilevata una notevole riduzione della componente muscolare, con un'adeguata preservazione del contenuto di GAGs e fibre elastiche. La quantità media di DNA residuo nei campioni decellularizzati risulta inferiore a 50 ng/mg di tessuto, soglia stabilita per definire un tessuto opportunamente decellularizzato in modo da ridurre la possibilità di una risposta immunitaria in caso di impianto in vivo. Meno promettenti appaiono i risultati dei test di vitalità cellulare diretta e indiretta, nei quali il valore di vitalità cellulare media è al di sotto del valore di soglia del 70%. Il biomateriale è considerato "non citotossico" se la vitalità delle cellule trattate è almeno del 70%. Questo risultato potrà essere ottimizzato prolungando i tempi di lavaggio previsti al termine dell'azione di ciascun detergente.

Conclusioni e prospettive future

Dal confronto dei dati raccolti si può affermare il successo della validazione del protocollo di decellularizzazione ritenuto ottimale: il protocollo garantisce un buon equilibrio tra l'efficacia della rimozione del materiale cellulare e nucleare, il mantenimento dell'integrità strutturale e funzionale della matrice e la riduzione della quantità di DNA residuo. Sono invece necessarie ulteriori ottimizzazioni del protocollo di decellularizzazione per migliorare la biocompatibilità cellulare dello scaffold. Il progetto proseguirà con l'analisi delle caratteristiche meccaniche del campione decellularizzato, una valutazione del mantenimento della distribuzione della rete di fibre di collagene presenti, a cui si aggiungono controlli sulla quantità residua di detergenti presenti nel campione decellularizzato e prove microbiologiche di sterilizzazione. Sulla base dei futuri risultati condotti sul modello animale, il progetto potrebbe un immediato impatto traslazionale diventando applicabile anche ai tessuti autoptici di origine umana.

Introduzione

1. Cenni di anatomia e fisiologia dell'orecchio esterno

L'orecchio è l'organo sensoriale responsabile dell'udito e dell'equilibrio. Anatomicamente è suddiviso in tre parti: orecchio esterno, medio ed interno (Fig. 1), componenti che lavorano in sinergia per rilevare, amplificare, trasmettere e interpretare le onde sonore, permettendo all'individuo la percezione uditiva (Niekrash, 2021).

L'orecchio esterno è composto dal padiglione auricolare, o pinna, che raccoglie le onde sonore e le trasmette lungo il meato acustico esterno, seconda componente dell'orecchio esterno, fino alla membrana timpanica (Drake et al., 2023).

Le onde sonore generano vibrazioni meccaniche sulla membrana timpanica, che a sua volta le trasmette attraverso la catena dei tre ossicini nell'orecchio medio alla finestra ovale, che confina con l'orecchio interno. Le vibrazioni della membrana della finestra ovale provocano il movimento della colonna di liquido presente nell'orecchio interno che stimola ed attiva specifici recettori. La trasformazione di onde sonore (meccaniche) in impulsi elettrici si verifica dunque solo nell'orecchio interno. Per questo motivo orecchio esterno e orecchio medio, a differenza dell'orecchio interno, sono considerati parti dell'apparato di conduzione sonora (Schunke et al., 2015).

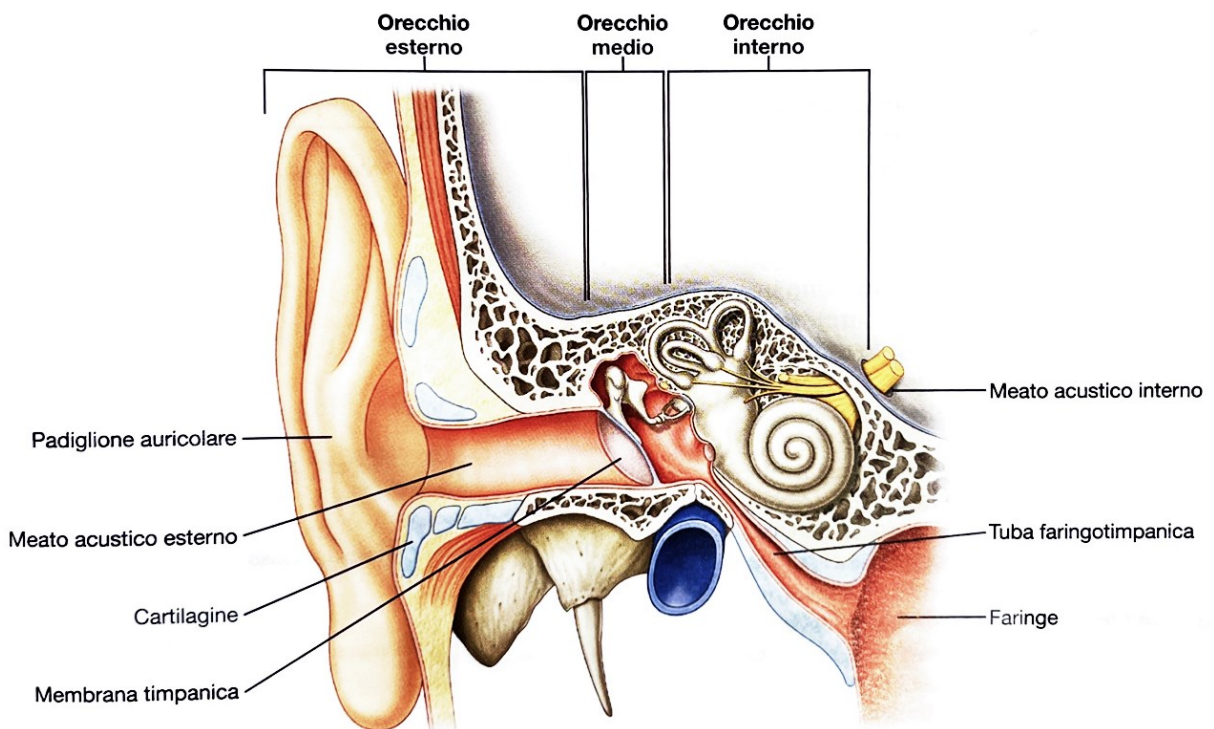


Figura 1: Schema dell'orecchio umano destro

Tratto da Anatomia del Gray. I fondamenti, Drake R.L., 2023.

1.1 Il padiglione auricolare

Il padiglione auricolare è collocato lateralmente alla testa nella regione temporale. Presenta una struttura elicoidale irregolarmente concava composta da uno scheletro sottile di cartilagine elastica, ricoperto da cute, muscoli e legamenti. La sua struttura è modellata da vari rilievi e solchi che modulano l'onda sonora facilitando la percezione della direzione del suono (Fig. 2). Il grande margine curvo e sporgente del padiglione è noto come elice, che termina inferiormente con il lobulo, plica cutanea priva di cartilagine e formata da tessuto adiposo e fibroso. Al centro del padiglione si trova la conca del padiglione auricolare. Dal fondo di quest'area origina il meato acustico esterno. Appena anteriormente all'apertura del meato acustico esterno e davanti alla conca è presente un'eminanza detta trago. Di fronte al trago e al di sopra del lobulo è situato l'antitrigo. Un altro margine curvo, più piccolo, parallelo e anteriore all'elice, è l'antelice. La depressione tra elice e antelice è denominata fossa scafoide (Drake et al., 2023).

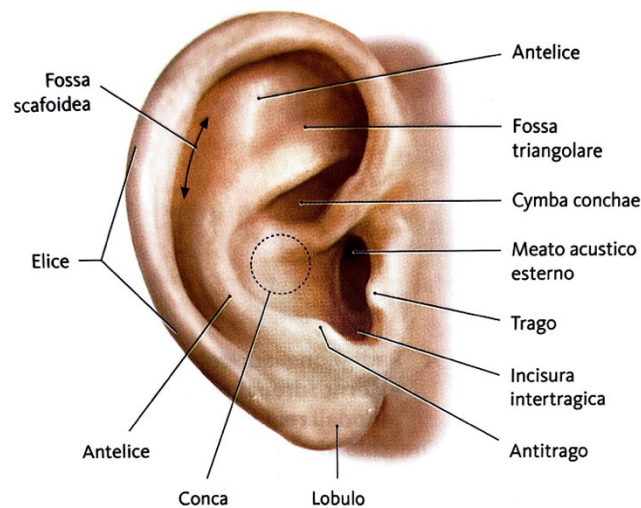


Figura 2: Padiglione auricolare destro

Tratto da Prometheus. Testo atlante di Anatomia. Testa, collo e neuroanatomia, Schunke M., 2015.

1.1.1 Rivestimento cutaneo

La cute del padiglione auricolare è sottile, ricca di fibre elastiche e strettamente aderente alla fibrocartilagine elastica, diversamente dalla cute che riveste la faccia mediale per la presenza di uno strato adiposo intermedio (Ambrosetti et al., 2018).

1.1.2 Legamenti e Muscoli

La lastra fibrocartilaginea del padiglione auricolare è connessa al cranio tramite legamenti anteriori, superiori e posteriori. Coinvolti in questo attaccamento ci sono anche dei piccoli muscoli estrinseci (anteriore, posteriore e superiore) che consentono il movimento dell'auricolare nel suo complesso (Ambrosetti et al., 2018; Niekrash, 2021).

In particolare, i legamenti sono distinti in estrinseci, coinvolti nell'unione del padiglione all'osso temporale, ed intrinseci, che contribuiscono al mantenimento della forma e stabilizzazione del padiglione. I legamenti estrinseci includono il legamento anteriore, che origina dal trago e dalla radice dell'elice e si unisce al processo zigomatico dell'osso temporale, e il legamento posteriore che, invece, collega il padiglione al processo mastoideo (Ambrosetti et al., 2018).

I muscoli intrinseci attraversano le porzioni cartilaginee del padiglione e possono modificare la sua forma. Sono, più precisamente, il grande e piccolo muscolo dell'elice, il muscolo del trago, il muscolo dell'antitrigo e muscoli trasverso ed obliquo. I muscoli estrinseci, ossia i muscoli auricolari anteriore, superiore e posteriore, si estendono dal cuoio capelluto o dal cranio fino al padiglione auricolare e possono anche svolgere un ruolo nella posizione del padiglione (Fig. 3). Entrambi questi gruppi di muscoli sono innervati dal nervo facciale [VII] (Drake et al., 2023).

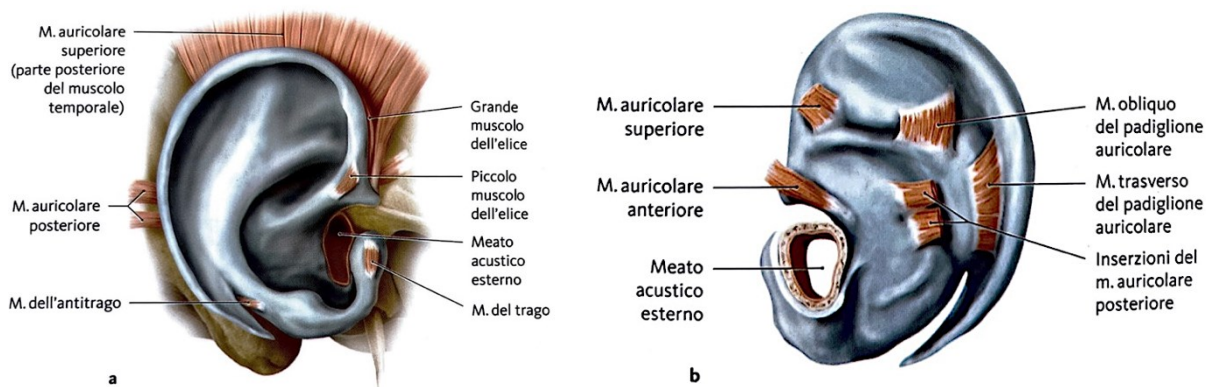


Figura 3: Cartilaginee e muscoli del padiglione auricolare.

a. Visione laterale della superficie esterna; b. Visione mediale della superficie posteriore dell'orecchio destro

Tratto da Prometheus. Testo atlante di Anatomia. Testa, collo e neuroanatomia, Schunke M., 2015.

1.1.3 Innervazione

L'innervazione sensitiva del padiglione auricolare ha diverse origini. Le superfici più esterne del padiglione sono innervate dal nervo grande auricolare, dal nervo piccolo occipitale proveniente appartenente al plesso cervicale, e dal ramo auricolotemporale del nervo mandibolare [V3].

Le parti più interne e profonde del padiglione auricolare sono innervate dal nervo vago [X], in particolare dal ramo auricolare, e dal nervo facciale [VII] (Drake et al., 2023).

L'innervazione motoria risulta semplice e poco funzionale; è assicurata da due rami del nervo facciale: il nervo auricolare posteriore e la branca temporo-facciale (Ambrosetti et al., 2018).

1.1.4 Vascolarizzazione

L'irrorazione arteriosa al padiglione auricolare è garantita dall'arteria carotide esterna (Fig. 4): l'arteria temporale superficiale irrora anteriormente la faccia laterale; l'arteria auricolare posteriore irroro il restante padiglione.

Il drenaggio venoso avviene tramite vene corrispondenti che seguono le arterie (Drake et al., 2023).

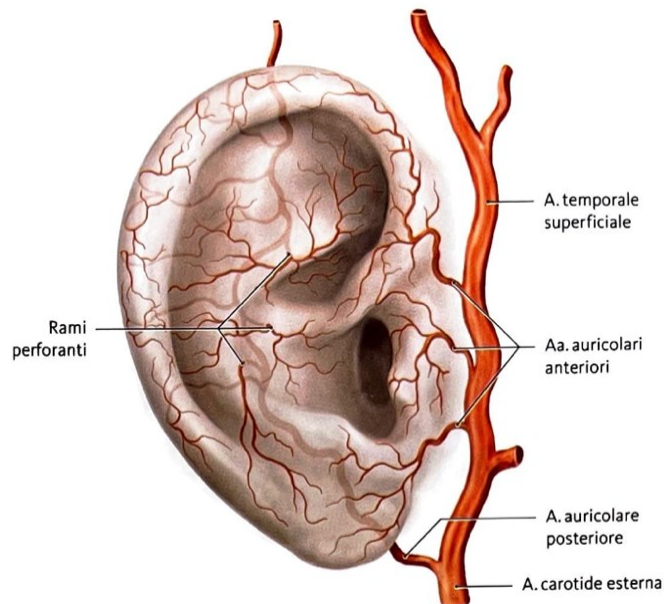


Figura 4: Irrorazione arteriosa del padiglione auricolare destro, visione laterale.

Tratto da Prometheus. Testo atlante di Anatomia. Testa, collo e neuroanatomia, Schunke M., 2015.

1.1.5 Fisiologia

L'orecchio esterno possiede come principale funzione quella di amplificare i suoni ma, un ulteriore ruolo fisiologico, a lungo considerato come secondario nell'organo dell'udito, è quello di proteggere l'orecchio medio, in particolare la membrana timpanica, da fenomeni provenienti dall'ambiente esterno.

Il padiglione auricolare mediante i solchi e rilievi aiuta a localizzare i suoni e a trasmetterli al canale uditivo, potenziandoli.

Le onde sonore possono viaggiare attraverso due percorsi acustici: uno diretto tramite la conca e uno indiretto attraverso l'elice e l'antelice. La differenza di posizione tra questi percorsi causa un ritardo di 0,2 millisecondi, che consente di percepire la posizione verticale di una sorgente sonora.

L'amplificazione e la trasmissione sonora avvengono nel padiglione auricolare e nel condotto uditivo esterno. In particolare, sono amplificate le frequenze comprese tra 2 kHz e 4 kHz; per le frequenze tra 1,5 kHz e 7 kHz, l'amplificazione dell'intensità varia tra 10 e 15 dB. Il padiglione auricolare amplifica le frequenze intorno ai 5-6 kHz, mentre la membrana timpanica e il condotto uditivo esterno migliorano le frequenze più basse tra 2 kHz e 5 kHz. Inoltre, la cartilagine auricolare partecipa alla conduzione del suono, poiché la sua vibrazione aiuta a trasmettere le frequenze basse (Thomassin & Barry, 2016).

2. Cenni di Patologia

Le anomalie auricolari si verificano a causa di errori durante lo sviluppo embriologico della cartilagine auricolare fetale, che avviene tipicamente nella quinta-nona settimana di gestazione, o a causa di forze fisiche anormali durante lo sviluppo che influenzano la normale crescita dell'orecchio. Queste anomalie possono compromettere diversi livelli di funzionalità, talvolta limitando l'uso di ausili uditivi (Liaw et al., 2017).

Le anomalie del padiglione auricolare possono avere un impatto estetico significativo con notevoli conseguenze psico-sociali che incidono sulla qualità della vita, ad esempio condizionando significativamente la capacità di un bambino di comunicare e socializzare (Siegert & Magritz, 2007; Liaw et al., 2017).

I difetti e le deformità auricolari includono non solo difetti acquisiti dovuti a traumi, ustioni, tumori, difetti perforanti, cicatrici e infiammazione/allergie, ma anche malformazioni auricolari congenite che vanno da malformazioni di grado I (ad esempio, orecchie prominenti) a malformazioni di grado III, che comprendono gravi casi di microtia. Spesso queste condizioni sono accompagnate da atresia uditiva, malformazioni dell'orecchio medio e talvolta anche anomalie facciali con coinvolgimento del nervo facciale. A seconda della natura del difetto e delle circostanze individuali, il ripristino di un auricolare completamente soddisfacente e completo rappresenta sempre l'obiettivo principale del paziente e del chirurgo plastico (Storck et al., 2014).

2.1 Microtia

La microtia è un difetto congenito dell'orecchio che può presentarsi con lievi anomalie strutturali fino ad una completa assenza dell'orecchio detta anotia (Fig. 5). La microtia è spesso associata alla perdita dell'udito e in genere richiede un trattamento per ristabilire la funzionalità compromessa e la ricostruzione chirurgica dell'orecchio.

Si verifica più frequentemente nei maschi, con un rischio aumentato stimato del 20-40% rispetto alle femmine.

Tra i pazienti con diagnosi di microtia, il 77%-93% degli individui ha un coinvolgimento unilaterale con il 60% dei casi che colpisce l'orecchio destro. Anche se le deformità con un grado minore si presentano spesso con un normale canale esterno, questo non dovrebbe diminuire il sospetto di una possibile sottostante anomalia dell'orecchio medio, dell'orecchio interno o del nervo facciale (Luqueti ed al., 2012; Liaw et al., 2017).

Vengono eseguiti test audiologica per determinare il grado di compromissione dell'udito ed eventualmente per indicare la necessità dell'utilizzo di apparecchi acustici (Luquetti ed al., 2012; Liaw et al., 2017).

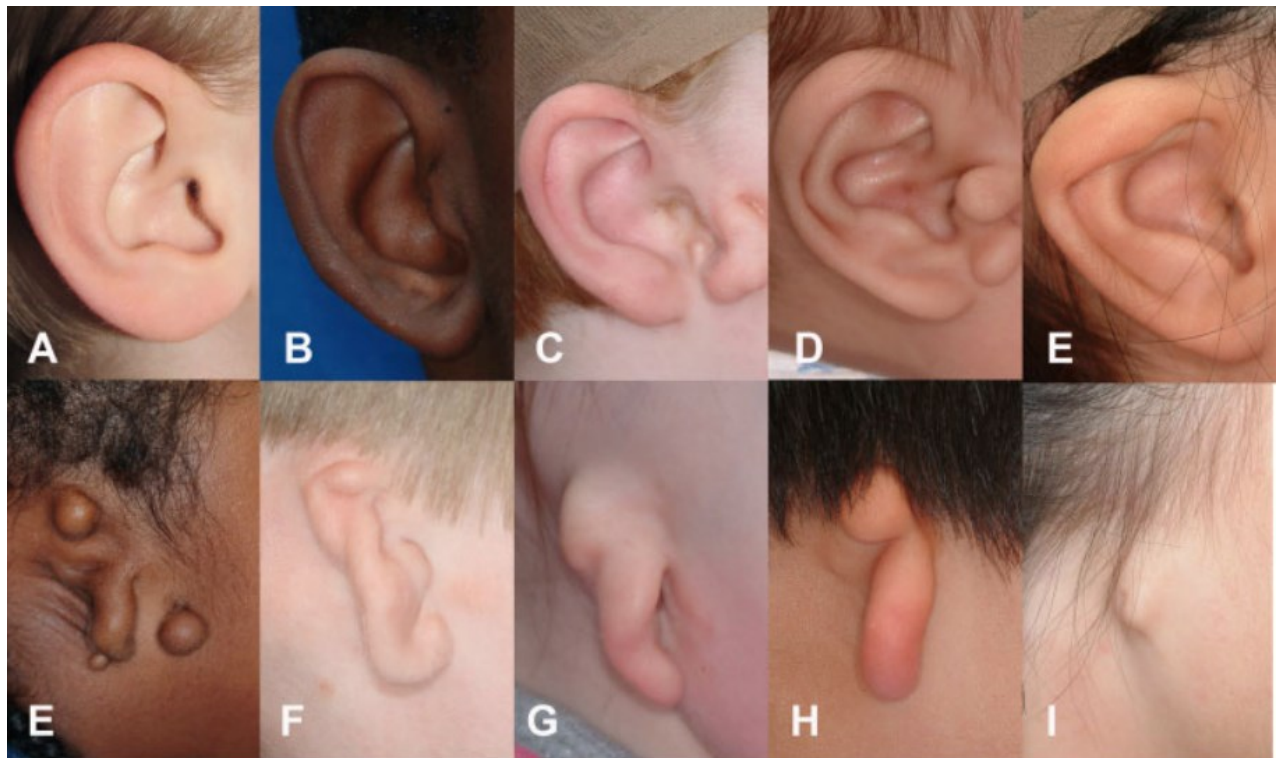


Figura 5: Fotografie di individui con diversi gradi di microtia. A: orecchio tipico; B-D: displasia di primo grado; E: displasia di secondo grado; F-J: displasia di terzo grado (Classificazione proposta da Hunter et al., 2009).

Tratto da Microtia: Epidemiology and genetics, Luquetti D.V., et al., 2012.

2.2 Atresia

L'atresia uditiva congenita, spesso associata alla microtia, è un difetto congenito che si manifesta con l'assenza o il restringimento del canale uditivo esterno (Zhang et al., 2019). Ha un'incidenza di 1 su 10.000-20.000 nati vivi ed è più comune nei maschi, con un rapporto di 2:1. L'atresia unilaterale è 3-5 volte più frequente rispetto a quella bilaterale, con l'orecchio destro maggiormente colpito (Liaw et al., 2017).

La classificazione dell'atresia uditiva congenita si basa su osservazioni cliniche e chirurgiche:

Tipo A. Stenosi

La stenosi è un restringimento delle parti fibrocartilaginee o ossee del condotto uditivo esterno. La membrana timpanica è presente, ma più piccola del normale e leggermente deformata. La maggior parte dei casi presenta un'ipoacusia da lieve a moderata.

Tipo B. Atresia parziale

In questo caso, è presente una placca ossea che ostruisce in parte il canale uditivo esterno e la membrana timpanica è assente o rudimentale. La membrana timpanica spesso non è attaccata alla catena di ossicini, che può essere poco sviluppata. I pazienti generalmente presentano un'ipoacusia conduttiva moderata o moderata-grave.

Tipo C. Atresia totale

Si osserva una completa aplasia del condotto uditivo esterno con una placca ossea. Le parti fibrocartilaginea e ossea del condotto uditivo esterno sono assenti, così come la membrana timpanica. Risulta un certo grado di sottosviluppo dell'orecchio medio e delle strutture associate. I pazienti presentano una perdita uditiva moderata-grave (Zhang et al., 2019).

2.3 Tumori maligni dell'orecchio

I carcinomi del padiglione auricolare e del meato uditivo esterno sono i più comuni. La maggior parte di questi tumori è rappresentata da tumori dermatologici, neoplasie, prevalentemente carcinomi basocellulari e carcinomi squamocellulari. Risultano molto frequenti e facilmente riconoscibili nella maggior parte dei casi, anche se spesso trascurati dagli anziani. I carcinomi basocellulari (CBC) sono i più comuni, mentre i carcinomi squamocellulari (CE) sono meno frequenti. Minore incidenza è associata al melanoma e carcinoma neuroendocrino di Merkel. Al padiglione auricolare, questi tumori pongono le stesse sfide diagnostiche e terapeutiche degli altri tumori cutanei. La diagnosi di tali tumori maligni può essere complicata quando imitano un'otite esterna. In generale, si localizzano più frequentemente sull'elice, sull'antelice e sulla superficie posteriore del padiglione. La loro presenza nella conca è rara, ma in tali casi sono più difficili da individuare e trattare (Beauvillain de Montreuil & Jourdain, 2012).

2.4 Lesioni

I traumatismi del padiglione auricolare sono comuni a causa della sua posizione sporgente ed esposta. I padiglioni sono anche suscettibili al trauma a causa della involontaria propensione naturale degli esseri umani nel ruotare la testa durante un impatto o un incidente, cercando di evitare traumi facciali diretti. Sono comunemente legati ad incidenti automobilistici, aggressioni e lesioni sportive. Tra le più comuni lesioni del padiglione auricolare rientrano contusioni, ematomi, abrasioni, lacerazioni, avulsioni parziali o complete spesso dovute a morsi di animale o colpi di proiettile ed infine lesioni termiche. I rischi legati a questi traumi sono infettivi o estetici (Punjabi et al., 1997).

3. Tecniche di ricostruzione del padiglione auricolare

La chirurgia costruttiva e ricostruttiva della morfologia e dell'anatomia del padiglione auricolare comprende diverse tecniche e richiede un'ampia esperienza. Con i progressi in ambito chirurgico e biotecnologico, l'utilizzo di innesti di cartilagine costale autologa, materiali alloplastici o protesi consente una ricostruzione del padiglione accettabile, anche se con risultati estetici e funzionali talvolta non soddisfacenti. Inoltre, queste tecniche prevedono procedure chirurgiche invasive e complicazioni post-operatorie non trascurabili, svantaggi che l'ingegneria tissutale della cartilagine mira a superare in futuro. È importante affrontare le anomalie del padiglione auricolare poiché possono alterare l'aspetto estetico e avere un grave impatto psicosociale sulla qualità della vita. I principali fattori che guidano i diversi trattamenti includono la patologia del paziente, le condizioni della pelle e le preferenze del paziente stesso (Siegert & Magritz, 2007; Storck et al., 2014).

3.1 Otopoesi mediante cartilagine costale autologa

Il trattamento standard per la ricostruzione chirurgica del padiglione auricolare è l'uso di diversi segmenti di cartilagine costale autologa per creare un neo-padiglione, successivamente impiantato sottocute. Questa tecnica richiede che l'orecchio sia sufficientemente maturo, una grande quantità di cartilagine costale e il rispetto delle procedure postoperatorie. Di solito, viene realizzata a partire dai 6-9 anni di età (Storck et al., 2014; Kelley & Scholes, 2007; Siegert & Magritz, 2007).

Nella prima fase, si progetta un modello del padiglione da usare come guida per definire la corretta posizione dell'innesto. Successivamente, attraverso un'incisione limitata, viene prelevata la cartilagine dalla sesta all'ottava costola controlaterale, per ottenere una migliore curvatura dell'innesto (Fig. 6) (Kelley & Scholes, 2007).

Dopo la rimozione della cartilagine, le costole vengono ricostruite suturando reti riassorbibili che favoriscono una rigenerazione stabile (Siegert & Magritz, 2007).



Figura 6: Pianificazione del modello sulla settima e ottava costola (a, b). Struttura auricolare autologa ottenuta.

Tratto da Reconstruction of the auricle, Siegert R. & Magritz R., 2007.

L'impalcatura cartilaginea viene quindi collocata in una tasca sottocutanea nell'area auricolare, preservando la vascolarizzazione subdermica e sollevando abbastanza tessuto per evitare eccessiva pressione sull'innesto (Kelley & Scholes, 2007). Viene, inoltre, posto uno scarico a vuoto per aspirare la secrezione della ferita, rimosso dopo cinque giorni.

Dopo un periodo di guarigione di 6-8 settimane, segue una seconda fase chirurgica. Viene creato un solco retroauricolare per elevare l'orecchio, così da lateralizzare il padiglione. La ferita aperta residua viene chiusa utilizzando un innesto cutaneo (Storck et al., 2014).

Si ottiene un buon risultato estetico (Fig. 7), sebbene si imiti la normalità poiché la cartilagine costale ialina utilizzata ha proprietà diverse rispetto alla cartilagine elastica del padiglione (Siegert & Magritz, 2007).

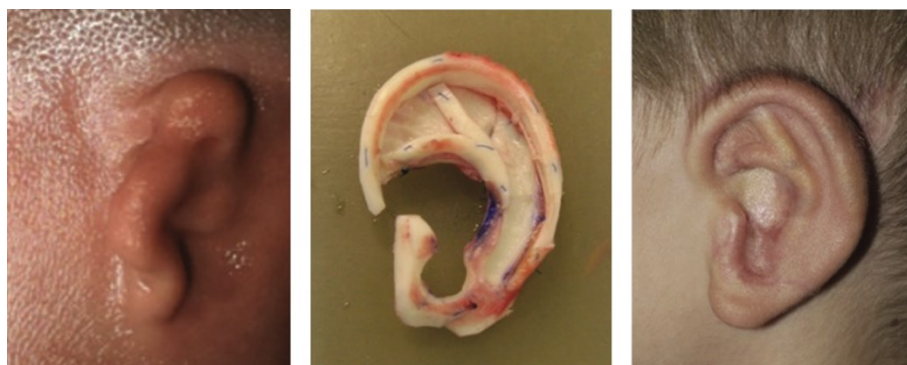


Figura 7: Malformazione auricolare sul lato destro in un bambino di 7 anni, struttura ottenuta con cartilagine costale, aspetto estetico del padiglione ricostruito dopo 6 mesi.

Tratto da Total reconstruction of the auricle: our experiences on indications and recent techniques, Storck K., et al., 2014.

Ulteriori limitazioni includono il lungo tempo necessario per raccogliere la cartilagine costale e la morbilità nel sito del donatore. Tuttavia, il principale vantaggio di questa tecnica è l'uso di materiale autologo, che riduce al minimo il rischio di infezione o rigetto dell'impianto (Storck et al., 2014).

3.2 Otopoiesi mediante materiale alloplastico

Più recentemente, sono state utilizzate strutture in polietilene poroso per la realizzazione di impalcature auricolari, evitando la morbilità associata all'uso di cartilagine autologa, cicatrici, deformità e dolore postoperatorio. Questo materiale termoplastico ha una bassa reattività tissutale e la sua struttura porosa consente la crescita dei tessuti al suo interno (Kelley & Scholes, 2007; Storck et al., 2014).

In alcuni casi si preferisce combinare polietilene poroso con un lembo fasciale temporo-parietale per favorire la guarigione e l'integrazione con i tessuti circostanti. Inizialmente, erano stati utilizzati altri materiali come il silicone, ma a causa degli alti tassi di infezione, perforazioni cutanee, dislocazioni, reazioni da corpi estranei e fibrosi della capsula, il suo utilizzo è stato limitato (Storck et al., 2014).

Lo scheletro in polietilene è ottenuto tramite due parti (cerchio elicoidale e base dell'orecchio) che vengono unite riscaldando la plastica o suturandole. Le correzioni sottili possono essere fatte usando un bisturi, permettendo adattamenti all'orecchio rudimentale se necessario. Prima dell'impianto, la struttura viene immersa in una soluzione antibiotica per prevenire infezioni precoci. Come per i costrutti autologhi, vengono posizionati scarichi a vuoto sotto il lembo per aspirare le secrezioni della ferita.

Questa tecnica richiede solo un'operazione. Le complicazioni riportate in letteratura per il materiale alloplastico includono il rischio di infezione ed estrusione, oltre a costi più elevati. Inoltre, l'uso del lembo fasciale temporo-parietale comporta rischi specifici, tra cui la necessità di preservare l'arteria temporale superficiale e la vena per garantire un apporto di sangue assiale e ottenere un lembo affidabile (Storck et al., 2014).

3.3 Dispositivi protesici ottenuti con materiali sintetici

Recenti avanzamenti tecnologici hanno reso i dispositivi protesici un'opzione di ricostruzione alternativa, riducendo il numero di fasi operative richieste rispetto alla ricostruzione autogena e garantendo risultati estetici più soddisfacenti. Questi dispositivi richiedono pulizia e manutenzione quotidiana e devono essere sostituiti ogni 4-5 anni. Spesso vengono preferiti in seguito a tentativi falliti di ricostruzione autogena, nei casi di perdita traumatica dell'intero padiglione auricolare con grandi difetti e lesioni dei tessuti molli profondi, ma anche dopo resezione tumorale in pazienti anziani (Kelley & Scholes, 2007; Storck et al., 2014).

La protesi auricolare è realizzata in silicone (o lattice) e può essere creata a specchio partendo dall'orecchio intatto controlaterale. I colori del silicone vengono selezionati per corrispondere al tono unico della pelle del paziente (Fig. 8). La protesi sintetica può essere fissata al cranio tramite viti in titanio impiantate o mediante adesivi. Tuttavia, l'uso di tali protesi, che richiedono sostituzioni nel tempo, comporta il rischio di infezioni e infiammazioni intorno alle viti (Storck et al., 2014).



Figura 8: Protesi auricolare in silicone con magneti integrati; ricostruzione dopo completa resezione auricolare.

Tratto da Total reconstruction of the auricle: our experiences on indications and recent techniques, Storck K., et al., 2014.

3.4 Scaffold 3D

Nell'ultimo decennio, l'ingegneria tissutale e la stampa di scaffold 3D sono emerse come nuove frontiere nella ricostruzione auricolare (Al-Qurayshi et al., 2021). Questi approcci prevedono la coltivazione e l'espansione *in vitro* di cellule staminali pluripotenti o condrociti autologhi prelevati da biopsie auricolari, che vengono poi seminate su scaffold con forme auricolari. Tali impalcature possono essere sintetiche, ottenute con polimeri come PLA (acido-poli-lattico) (Fig. 9), oppure biologiche, come collagene, gel di alginato, fibrina o chitosano, o una loro combinazione. Il padiglione coltivato *in vitro* può quindi essere impiantato, evitando la necessità di prelevare tessuto dal donatore. Questa tecnica rappresenta una promettente alternativa nella pratica clinica, ma richiede ulteriori studi (Storck et al., 2014). Rimane infatti una sfida significativa ottenere i 250 milioni di condrociti autologhi necessari per seminare un costruito auricolare e promuovere la formazione di una matrice di cartilagine elastica, a causa delle limitate risorse di condrociti disponibili e della perdita del fenotipo che spesso si verifica durante l'espansione *in vitro* dei condrociti auricolari (Vernice et al., 2024).

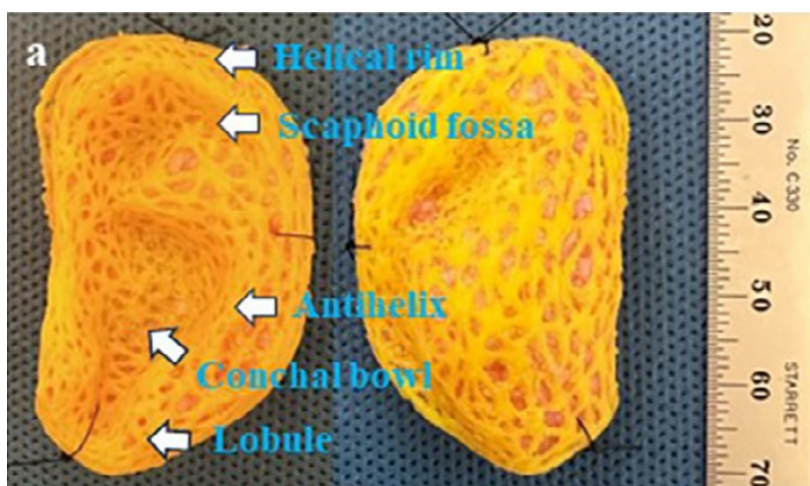


Figura 9: Scaffold preimpianto in PLA ottenuto tramite stampa 3D.

Tratto da Bioengineering Full-scale auricles using 3D-printed external scaffolds and decellularized cartilage xenograft, Vernice et al., 2024.

Un'alternativa alle impalcature sintetiche è rappresentata dalle impalcature biologiche, ottenute tramite decellularizzazione del padiglione auricolare, che conservano la microstruttura della loro matrice extracellulare nativa e le proprietà meccaniche del tessuto (Al-Qurayshi et al., 2021).

4. Tecniche di Decellularizzazione

Un approccio comune nell'ingegneria dei tessuti e nella medicina rigenerativa (TE/RM) è la creazione di un ambiente strutturale e molecolare che imiti le proprietà meccaniche, geometriche e biologiche dell'organo/tessuto nativo, che possa poi essere ripopolato con cellule selezionate per creare un tessuto/organo autologo in grado di sostituire quello danneggiato limitando reazioni immunitarie avverse (Peloso et al., 2015).

Il trattamento attuale per l'insufficienza d'organo irreversibile è rappresentato dal trapianto di organi. Tuttavia, esiste un significativo divario tra il numero di donatori d'organi e il numero dei pazienti che ne necessitano, divario che evidenzia il fondamentale problema della carenza di organi. Obiettivo comune per la TE/RM è quello di oltrepassarlo, creando dei tessuti funzionali o interi organi da utilizzare come "parti di ricambio" compatibili con l'organismo del paziente ricevente mediante la tecnica di decellularizzazione, riducendo i rischi associati al trapianto e la carenza di organi (Peloso et al., 2015).

La decellularizzazione dei tessuti si ottiene lavando l'organo con soluzioni detergenti per rimuovere tutte le componenti cellulari e nucleari dagli organi dei donatori, mantenendo però intatta la composizione e struttura della matrice extracellulare (Peloso et al., 2015; Gilbert et al., 2006). Dopo la decellularizzazione, l'organo si riduce ad una matrice che funge da scaffold, supporto tridimensionale che successivamente può essere ripopolato con cellule del paziente ricevente (Fig. 10). Utilizzando le cellule del paziente, si evitano problemi di rigetto immunitario, poiché il corpo riconosce le cellule come proprie. Inoltre, la biocompatibilità del biomateriale garantisce che lo scaffold non provochi ulteriori reazioni avverse nell'organismo ospite. In questo modo, è possibile creare un nuovo tessuto o organo funzionale che può essere trapiantato nel paziente senza la necessità di terapie immunosoppressive (Badylak et al., 2011).

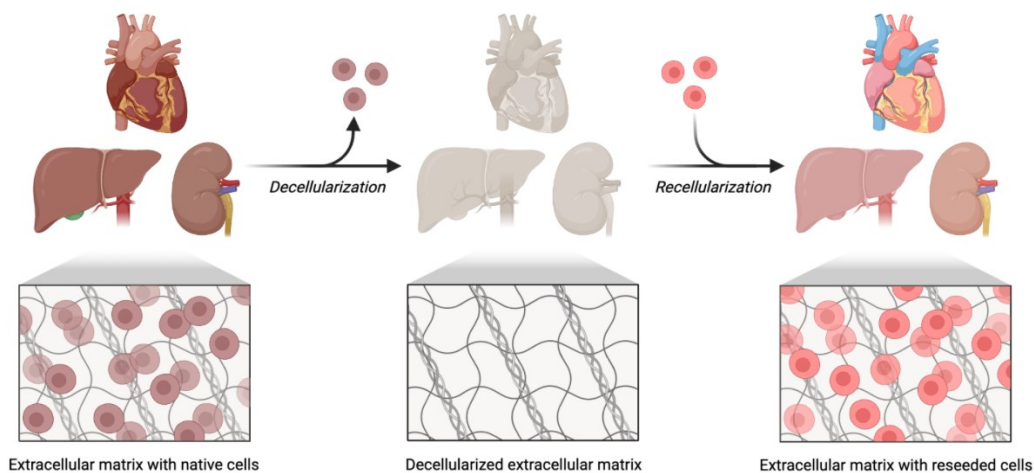


Figura 10: Processo schematico della decellularizzazione e ri-popolamento cellulare di interi organi (Biorender).

L'efficacia del processo di decellularizzazione dipende da molti fattori, come la densità dei tessuti o il loro spessore. Bisogna anche considerare che tutti gli agenti utilizzati per la decellularizzazione alterano la struttura della matrice extracellulare originale, causando alcune modifiche nella microarchitettura dell'organo (Peloso et al., 2015).

Studi preliminari su modelli animali hanno fornito risultati promettenti, ma restano alcune questioni da risolvere, come la scelta delle specie da cui prelevare l'organo, il protocollo ottimale di decellularizzazione da applicare dell'organo donatore, il miglioramento delle tecniche di ripopolamento cellulare e scelta delle colture cellulari più appropriate (Badylak et al., 2011).

4.1 La matrice extracellulare come scaffold biologico

La matrice extracellulare (Extra Cellular Matrix, ECM) rappresenta l'impalcatura naturale di un tessuto o organo ed è prodotta dalle stesse cellule che lo popolano e caratterizzano. La composizione e l'ultrastruttura dell'ECM sono influenzate da fattori che determinano il fenotipo delle cellule, ma, a sua volta, l'ECM ha un impatto significativo sul comportamento e sul fenotipo delle cellule stesse. Alcuni studi dimostrano che l'adesione cellulare, la migrazione, la proliferazione e la disposizione spaziale delle cellule sono eventi fortemente influenzati della matrice. L'ECM è quindi in uno stato di "equilibrio dinamico" con il tessuto circostante, non è solo una struttura passiva che supporta le cellule, ma interagisce con esse, influenzando in modo significativo il loro comportamento e le loro funzioni (Badylak, 2004; Peloso et al., 2015).

L'ECM definisce le proprietà fisiche, biochimiche e biomeccaniche specifiche dell'organo. Le proprietà fisiche stimolano la funzione biologica (divisione cellulare, polarità tissutale e migrazione cellulare) e la meccano-trasduzione cellulare, che converte stimoli meccanici in attività chimiche; mentre, le caratteristiche biochimiche contribuiscono a inviare fattori di crescita (segnali specifici) locali e solubili, facilitando la comunicazione e il coordinamento delle funzioni cellulari essenziali per la crescita e la riparazione del tessuto (Peloso et al., 2015).

La composizione dell'ECM è unica e specifica per ogni tessuto. In generale, è costituita principalmente da fibre di collagene (reticolari ed elastiche), una sostanza amorfa costituita da glicosamminoglicani (GAGs) e glicoproteine (fibronectina, elastina, laminina), e da una varietà di fattori di crescita (Badylak et al., 2011).

Utilizzare l'ECM come scaffold offre diversi vantaggi rispetto a soluzioni sintetiche tradizionali: fornisce un ambiente naturale per le cellule seminate, confrontabile con quello dell'organo nativo, e include stimoli biochimici specifici dell'organo come fattori di crescita. Inoltre, mantiene l'architettura tridimensionale originale dopo la decellularizzazione,

supportando così la semina cellulare, l'attaccamento, la crescita, l'espansione e la maturazione del tessuto o organo.

Infine, può essere trapiantata in vivo, garantendo un apporto fisiologico di ossigeno e nutrienti e riducendo risposte immunitarie (Peloso et al., 2015).

Grazie al processo di decellularizzazione, lo scaffold può essere ottenuto da donatori xenogenici, ovvero appartenenti a una specie diversa da quella del ricevente, o da donatori allogenici, della stessa specie superando gli attuali ostacoli legati al trapianto di organi (Crapo et al., 2011).

4.2 Metodi di decellularizzazione di organi interi

La decellularizzazione dei tessuti avviene mediante la combinazione di più metodi: fisici, chimici e biologici (Fig. 11). Questi, generalmente, sono combinati nei protocolli di decellularizzazione in modo da massimizzare l'efficacia del trattamento, preservando il più possibile le componenti dell'ECM (Crapo et al., 2011).

Trattamenti fisici

I trattamenti fisici includono agitazione, elettroporazione o sonicazione (tecnica che utilizza onde sonore ad alta frequenza per causare lisi cellulare), pressione diretta (metodo efficace per tessuti o organi che non sono caratterizzati da ECM densamente organizzata come fegato, polmone) o cicli di congelamento-scongelo (formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari che interrompono le membrane cellulari e causano la lisi cellulare). Questi metodi distruggono la membrana cellulare e, grazie a successivi risciacqui, si rimuove il contenuto cellulare dall'ECM. Tuttavia, possono causare danni alla struttura della matrice (Gilbert et al., 2006).

Trattamenti chimici

I metodi chimici includono l'utilizzo di soluzioni acide/basiche, detergenti ionici (come sodio dodecil solfato, o SDS) e non ionici (Triton X-100), alcoli ed enzimi (come tripsina) (Crapo et al., 2011).

Gli agenti acidi sono utilizzati per solubilizzare le componenti del citoplasma cellulare e rimuovere gli acidi nucleici come l'RNA e il DNA ma, allo stesso tempo, danneggiano il collagene presente nella matrice e influenzano la quantità di glicosamminoglicani (GAG) e fattori di crescita.

Ad esempio, l'acido peracetico distrugge efficacemente le membrane cellulari e gli organuli intracellulari con un effetto minimo sulla composizione e struttura dell'ECM. Diversamente,

L'acido acetico danneggia e rimuove il collagene causando una corrispondente riduzione della forza ECM, ma non influisce sui glicosamminoglicani (Gilbert et al., 2006; Crapo et al., 2011). Le soluzioni basiche (ad esempio idrossido di calcio, solfuro di sodio e idrossido di sodio) sono comunemente usate per rimuovere i peli dai campioni di derma ma, possono eliminare completamente i fattori di crescita dalla matrice e, rompendo le fibrille di collagene, influiscono negativamente sulle proprietà meccaniche della matrice.

Vengono utilizzate anche soluzioni ipertoniche e ipotoniche che causano lisi cellulare attraverso semplici effetti osmotici senza compromettere l'architettura della matrice. Servono anche per eliminare i residui cellulari all'interno del tessuto dopo la lisi cellulare (Crapo et al., 2011).

I detergenti (ionici, non-ionici e zwitterionici) solubilizzano, disgregano le membrane cellulari e dissociano il DNA dalle proteine, rimuovendo materiale cellulare e genetico dai tessuti. Tuttavia, questi agenti possono anche rompere e dissociare le proteine della matrice extracellulare, compromettendo la sua integrità e funzionalità. La loro efficacia aumenta con il tempo di esposizione ma varia a seconda del tipo di tessuto (Crapo et al., 2011).

Il Triton X-100 (detergente non ionico) è efficace nel rimuovere residui cellulari e lipidi da tessuti più spessi. Detergenti ionici come l'SDS sono efficaci nel rimuovere i nuclei cellulari dai tessuti più densi, come i reni, preservando la meccanica del tessuto. Tuttavia, possono danneggiare l'ultrastruttura e eliminare i fattori di crescita. Infine, detergenti zwitterionici (come il CHAPS) sono più efficaci per la rimozione cellulare dai tessuti sottili come i polmoni.

È importante nel processo di decellularizzazione effettuare dei lavaggi dopo l'uso dei detergenti, così da eliminare eventuali residui dall'ECM. Infatti, detergenti come l'SDS, tendono a persistere nei tessuti, penetrando anche in quelli più densi. Anche a basse concentrazioni, tali residui possono essere citotossici e annullare i benefici di una matrice extracellulare priva di cellule. Anche i tessuti sottili come le valvole richiedono numerosi lavaggi per rimuovere completamente i detergenti residui.

Alcoli come isopropanolo o etanolo agiscono disidratando e lisando le cellule e sono più efficaci delle lipasi nel rimuovere i lipidi pur danneggiando l'ultrastruttura dell'ECM (Crapo et al., 2011).

Trattamenti biologici

Gli agenti biologici possono essere suddivisi in agenti enzimatici e agenti non enzimatici (come l'acido etilico-enediaminetetraacetico, o EDTA).

Gli agenti enzimatici come nucleasi, tripsina, collagenasi o lipasi interrompono l'interazione proteina-proteina determinando il distacco cellulare dalla membrana basale, ma danneggiando

la struttura del collagene dell'ECM. Sono specifici per rimuovere residui cellulari e componenti della matrice indesiderati, ma possono lasciare residui che compromettono la ricellularizzazione o causano risposte immunitarie (Crapo et al., 2011; Peloso et al., 2015). Le nucleasi (come DNasi o RNasi) scindono le sequenze di acidi nucleici e facilitano la rimozione dei nucleotidi dopo la lisi cellulare nei tessuti; la tripsina, pur rimuovendo le cellule, può danneggiare l'elastina e il collagene. La collagenasi ha il maggior rischio di compromettere l'ultrastruttura dell'ECM e le sue proprietà meccaniche (Hussein et al., 2016; Crapo et al., 2011).

Gli agenti non enzimatici agiscono interrompendo l'adesione cellulare all'ECM sequestrando ioni metallici ma, non intervengono nella rimozione cellulare; per questo motivo molti protocolli di decellularizzazione combinano agenti biologici non enzimatici con detergenti in grado di rimuovere delicatamente le cellule dalla matrice (Peloso et al., 2015).

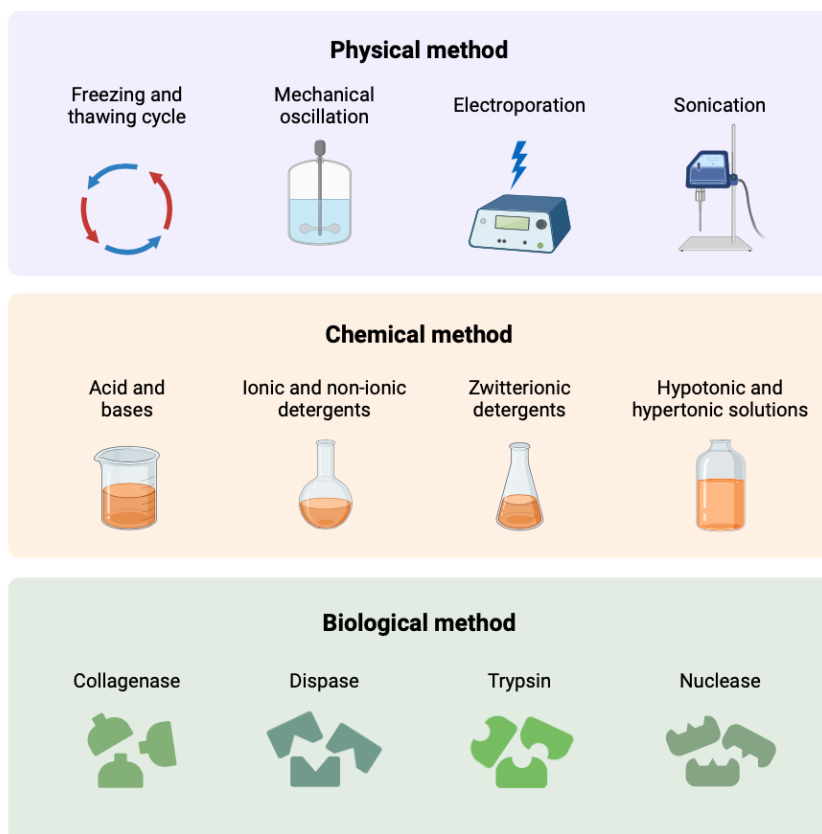


Figura 11: Metodi usati per decellularizzare tessuti e organi (Biorender).

La tecnica di decellularizzazione da utilizzare viene scelta in base alla struttura dell'organo o tessuto. Il metodo di decellularizzazione per perfusione sfrutta la rete vascolare nativa dell'organo per distribuire efficacemente le soluzioni di decellularizzazione e rimuovere il materiale cellulare anche negli strati più profondi, rendendolo ideale per tessuti molto densi. Tuttavia, non tutti i tessuti possiedono una vascolarizzazione che permetta l'applicazione di

questo metodo. Per tali tessuti, si ricorre ad altre strategie come l'immersione in agenti di decellularizzazione posti in agitazione. Questo approccio è stato applicato a vari tessuti, inclusi valvole cardiache, vasi sanguigni, muscoli/tendini, nervi periferici, midollo spinale, cartilagine/menisco, trachea, esofago, derma e vescica urinaria (Crapo et al., 2011).

Entrambe le metodiche possono danneggiare l'ECM a causa della pressione esercitata nella rete vascolare nativa o di un'agitazione meccanica troppo aggressiva (Crapo et al., 2011).

La scelta è legata al tipo di tessuto e alle sue caratteristiche. Diversi studi dimostrano che l'efficacia della decellularizzazione e le alterazioni dell'ECM variano in base alla fonte del tessuto, alla sua composizione, densità e altri fattori (Gilbert et al., 2006).

4.3 Valutazione della matrice extracellulare decellularizzata

Ottenere una completa decellularizzazione di tessuti o organi è particolarmente difficile, poiché spesso sono presenti tracce di DNA residuo e altre componenti cellulari nella matrice extracellulare decellularizzata. Pertanto, è necessario ottimizzare il protocollo valutando l'efficacia degli agenti utilizzati, le tecniche di somministrazione e la durata del trattamento. Il protocollo di decellularizzazione viene definito considerando la struttura, le caratteristiche e la quantità del tessuto da trattare (Crapo et al., 2011).

Il materiale cellulare residuo all'interno dell'ECM può causare problemi di citocompatibilità *in vitro* e risposte avverse dell'ospite *in vivo* dopo la ripopolazione della matrice. Sebbene le tecniche di decellularizzazione non possano rimuovere completamente il materiale cellulare, è possibile valutare qualitativamente e quantitativamente l'efficacia del processo di decellularizzazione (Crapo et al., 2011).

4.3.1 Verifica della rimozione cellulare

Una prima ispezione per determinare l'efficienza della rimozione del materiale cellulare dai tessuti è visiva: gli organi, infatti, dopo la decellularizzazione mostrano un caratteristico aspetto biancastro/traslucido.

Mediante colorazioni istologiche è possibile visualizzare la morfologia dei tessuti e le cellule che li compongono, determinando così l'efficacia del processo di decellularizzazione.

Per esempio, la colorazione Ematossilina-Eosina (E&E) permette di osservare qualitativamente la presenza di strutture nucleari. Con colorazioni alternative come la colorazione Tricromica di Masson, si può valutare la presenza nei tessuti di varie molecole citoplasmatiche ed extracellulari. Anche i metodi immunostochimici possono essere utilizzati per rilevare specifiche proteine intracellulari, come l'actina e la vimentina (Gilbert et al., 2006).

Per definire in modo più preciso il grado di rimozione cellulare si può procedere con l'analisi istologica volta a verificare la presenza di DNA, che avviene o mediante la colorazione DAPI o mediante saggi che utilizzano ioduro di propidio e PicoGreen. Queste tecniche consentono di fornire dati quantitativi riguardanti la presenza di DNA all'interno del campione (Gilbert et al., 2006). Inoltre, è essenziale verificare che, al termine del processo di decellularizzazione, siano state preservate fondamentali componenti dell'ECM, come le proteine di adesione (fibronectina e laminina), i glicosamminoglicani (GAG), i fattori di crescita, le fibre elastiche e i collagene. Questi elementi consentiranno alle cellule l'infiltrazione (le cellule devono poter penetrare e diffondersi all'interno della matrice) e l'integrazione (adesione delle cellule alla matrice), sia *in vitro* che *in vivo*. L'esecuzione di test meccanici dell'ECM dopo il trattamento forniscono informazioni sulla presenza ed integrità delle proteine strutturali all'interno dell'impalcatura (Gilbert et al., 2006).

Infine, si procede con la valutazione della biocompatibilità mediante test *in vitro* e *in vivo* per esaminare la biodegradabilità, la citocompatibilità, la patogenicità e l'immunogenicità (Hussein et al., 2016).

4.4 Biocompatibilità

I biomateriali sono materiali sintetici progettati per un uso prolungato a contatto con ambienti biologici, con l'obiettivo di ridurre al minimo le reazioni avverse dell'organismo. Un requisito fondamentale per la loro applicazione in procedure di impianto e innesto è la biocompatibilità, ovvero la capacità di funzionare in una specifica applicazione senza provocare reazioni avverse nell'organismo ospite (Di Bello & Bagno, 2016).

La tecnica di decellularizzazione consente di realizzare un'impalcatura non tossica, non patogena, non immunogenica, che sia biodegradabile, e in grado di consentire l'adesione cellulare e di fornire adeguate proprietà per guidare la crescita, la proliferazione e la migrazione cellulare, favorendo la formazione di nuovi tessuti. Se eseguita con successo, questa tecnica riduce al minimo o elimina la possibilità di rigetto immunitario, evitando la necessità di farmaci immunosoppressivi e riducendo il rischio di trasmissione di malattie (Hussein et al., 2016).

Il contatto prolungato tra lo scaffold decellularizzato e impiantato e i tessuti riceventi, richiede diversi test prima dell'applicazione clinica. Il termine "biocompatibilità" viene utilizzato nel campo dei biomateriali per descrivere le prestazioni di un materiale dopo l'impianto e per distinguere i biomateriali utilizzabili clinicamente da altri materiali. Con il termine di biocompatibilità si indica "l'abilità di un materiale di funzionare con una risposta appropriata dell'ospite in un'applicazione specifica". Le valutazioni della biocompatibilità includono test

sulla compatibilità cellulare, compatibilità immunitaria e sulle caratteristiche relative al sito di trapianto.

Queste valutazioni devono essere eseguite secondo le regole e le linee guida fornite dall'International Standards Organization (ISO) per la sperimentazione della biocompatibilità dei biomateriali per applicazioni mediche (Hussein et al., 2016).

4.4.1 Citotossicità

Nei protocolli di decellularizzazione sono impiegate diverse sostanze chimiche che vengono selezionate per le loro capacità intrinseche di danneggiare le cellule. Se le sostanze chimiche rimangono all'interno del tessuto in alte concentrazioni dopo il trattamento, allora è probabile che lo scaffold prodotto risulti tossico per le cellule che saranno seminate.

È necessario quantificare la presenza di sostanze chimiche residue nell'impalcatura decellularizzata per valutare l'efficacia del protocollo e per eventuali aggiustamenti (Gilbert et al., 2006).

I test di citotossicità consentono di scartare i biomateriali contenenti sostanze tossiche con possibili effetti dannosi, prima del loro impiego clinico. Questi test prevedono l'esposizione di sostanze estratte da impalcature a diverse linee di coltura cellulare. Le colture cellulari utilizzate sono estremamente sensibili anche a piccole quantità di sostanze chimiche e manifestano istantaneamente segni di tossicità in presenza di sostanze potenzialmente nocive (Hussein et al., 2016). Si misura quindi la vitalità delle cellule in coltura, utilizzando sia approcci di contatto diretto che indiretto. L'uso dello stesso tipo di cellule che poi affronteranno l'impianto *in vivo* consente un'analisi più specifica, ad esempio, le strutture di derivazione cardiovascolare dovrebbero essere testate utilizzando cellule endoteliali o cardiomiociti (Hussein et al., 2016).

Saggio di contatto indiretto (Metodo di estrazione)

Il metodo di estrazione valuta la citotossicità a breve termine testando effetti come il cambiamento nella morfologia delle cellule, l'inibizione della loro crescita, e l'impatto sul loro metabolismo. Si osserva l'effetto di sostanze rilasciate dai materiali su cellule in coltura incubando i supporti a 37°C per 12-72 ore, con un rapporto di 1.0 g/5 ml, come indicato dalle linee guida ISO. Le colture di cellule che non sono a contatto con i materiali fungono da controllo negativo.

Per misurare la citotossicità si utilizzano saggi di vitalità, come il test con trypan blue e il saggio MTT. Il test del trypan blue valuta la vitalità cellulare tramite la colorazione delle cellule morte, mentre il saggio MTT misura la capacità delle cellule di ridurre il MTT a formazano blu-violetto, un indicatore della funzionalità cellulare. Un materiale è considerato non citotossico se il numero di cellule vive è almeno il 70% rispetto al controllo non trattato (Hussein et al., 2016).

Saggio di contatto diretto

Il saggio di contatto diretto rileva sostanze tossiche non estraibili analizzando direttamente l'interazione delle cellule con i supporti decellularizzati. Durante questo test, un campione del materiale è posto in contatto fisico con le cellule, che vengono poi osservate per verificare l'adesione, la migrazione, e la distribuzione cellulare sulla superficie del materiale. La valutazione della tossicità si effettua esaminando le modifiche morfologiche delle cellule e conducendo test di vitalità, come il saggio MTT, che misura l'effetto tossico a livello cellulare (Hussein et al., 2016).

4.4.2 Immunogenicità

Per garantire la biocompatibilità dello scaffold dopo l'impianto nell'uomo, è obbligatorio evitare il rigetto iperacuto e acuto verificando la rimozione completa di componenti cellulari, antigeni e materiali nucleici (Hussein et al., 2016). Infatti, i processi di decellularizzazione includono enzimi comunemente derivati da fonti bovine (ad esempio, DNasi, RNasi, tripsina) che possono potenzialmente evocare una risposta immunitaria avversa da parte dell'ospite e potenzialmente aumentare il rischio di trasmissione di xeno antigeni, suggerendo l'importanza di rimuovere i resti di DNA dai tessuti decellularizzati (Gilbert et al., 2006; Hussein et al., 2016). In particolare, è possibile testare quantitativamente il DNA a doppio filamento (dsDNA). La concentrazione soglia di materiale cellulare residuo all'interno dell'ECM sufficiente a causare una risposta di rimodellamento negativa può variare ma sulla base dei risultati di studi in cui è stata osservata una risposta di rimodellamento costruttiva in vivo, sono stati definiti i seguenti criteri minimi sufficienti per soddisfare l'intento della decellularizzazione:

- <50 ng dsDNA per mg di peso secco di ECM
- <200 bp lunghezza del frammento di DNA
- mancanza di materiale nucleare visibile in sezioni tissutale macchiate con 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI) o E&E.

L'attenzione sul materiale nucleico residuo è giustificata poiché il DNA è direttamente correlato alle reazioni avverse dell'ospite, è onnipresente tra i tipi di tessuto e cellule, e fornisce un indice generale per altri residui cellulari all'interno dell'ECM.

Il primo criterio è quantificabile utilizzando intercalanti del dsDNA disponibili in commercio come PicoGreen, ioduro di propidio o bisbenzimidide; il secondo mediante elettroforesi di gel (Crapo et al., 2011).

4.5 Ricellularizzazione

L'ultima fase consiste nella semina dello scaffold, ottenuto attraverso decellularizzazione, con cellule specifiche del tessuto o organo di interesse. Questo processo, noto come ricellularizzazione, mira a ricreare *in vitro* le condizioni ideali per l'adesione, crescita, differenziazione e proliferazione delle cellule, al fine di sviluppare un organo funzionante e pronto per un potenziale trapianto.

Si utilizzano cellule staminali capaci di proliferare e generare popolazioni di cellule differenziate essenziali per la formazione di un tessuto o organo funzionale. Queste cellule possono essere autologhe, cellule "self", provenienti dallo stesso paziente destinatario dell'organo bioingegnerizzato, che evitano risposte immunitarie avverse e la necessità di terapia immunosoppressiva. Tuttavia, un grande ostacolo da superare è il gran numero di cellule necessarie per occupare l'intero volume dell'impalcatura acellulare (Peloso et al., 2015; Badylak et al., 2011). Diversamente, le cellule allogeniche ("not self") sono ottenibili in grandi quantità ma con un rischio elevato di reazioni immunitarie avverse e contaminazioni (Badylak SF et al., 2011).

Tra le cellule utilizzate figurano le cellule staminali mesenchimali del midollo osseo (MSC), cellule multipotenti capaci di auto-rinnovarsi o di differenziarsi in cellule più specializzate (osteoblasti, condrociti, miociti e adipociti). Restano invece una fonte teoricamente preziosa per la medicina rigenerativa le cellule staminali embrionali (ESC), cellule con capacità combinata di espansione illimitata e pluripotenza (possono differenziarsi in cellule derivate da uno qualsiasi dei tre strati germinali primari: ectoderma, endoderma e mesoderma). A causa di dibattiti etici sull'uso di tali cellule, l'attenzione sembra spostarsi sull'uso di cellule staminali pluripotenti indotte di origine adulta (iPSC).

Si impiegano anche cellule non staminali, come cellule parenchimali (i fibroblasti) e cellule vascolari come le cellule endoteliali (Badylak et al., 2011). Per un ripopolamento efficace dello scaffold è essenziale stabilire una precisa combinazione dei vari tipi cellulari per ciascun organo, garantendo la corretta crescita di tutte le cellule una volta seminate (Peloso et al., 2015).

Obiettivo dello studio

I difetti e le malformazioni dell'orecchio esterno comportano anomalie estetiche e funzionali che possono avere un impatto psicologico e sociale significativo. È possibile intervenire con diverse tecniche di chirurgia ricostruttiva o con l'applicazione di protesi alloplastiche, soluzioni che tuttavia presentano alcune limitazioni estetiche e funzionali, procedure chirurgiche invasive e complicazioni post-operatorie.

L'ingegneria tissutale rappresenta un approccio innovativo per la rigenerazione di organi e tessuti. Utilizzando tecniche di decellularizzazione, è possibile creare scaffold biocompatibili che, una volta privati delle componenti cellulari originarie, vengono ripopolati con cellule prelevate dal paziente stesso (cellule autologhe). Successivamente gli scaffold ottenuti possono essere impiantati nel paziente ricevente per rigenerare l'organo/tessuto compromesso, riducendo al minimo complicazioni come rigetto immunitario e infiammazioni.

Lo scopo di questo studio è convalidare un protocollo di decellularizzazione ottimizzato per la creazione di un padiglione auricolare, applicando tecniche di ingegneria tissutale al modello animale di ratto (*Rattus norvegicus*). Questo modello animale è stato scelto perché di facile reperibilità, già utilizzato in molti studi in questo campo e per una certa affinità istologica con il padiglione auricolare umano.

La ricerca è stata condotta presso il Laboratorio di Bioacustica dell'Università degli Studi di Padova, appartenente al progetto LIFELAB (Living, Innovative, Fully Engineered, Long-Lasting and Advanced Bioreplacement), finanziato dalla Regione Veneto e gestito dal Consorzio per la Ricerca Sanitaria (CORIS).

Nel corso degli anni sono stati sviluppati diversi protocolli con l'obiettivo di massimizzare l'effetto della decellularizzazione preservando il più possibile l'integrità e la funzionalità dell'ECM.

Sulla base di questi precedenti protocolli, in una prima fase di ricerca, è stato individuato quello che ha mostrato i migliori risultati in termini di conservazione delle componenti connettivali di sostegno dell'ECM e loro proprietà, eliminazione delle componenti cellulari e nucleari e citocompatibilità. Tuttavia, negli scaffold ottenuti è stata osservata una scarsa rimozione della componente muscolare, un ridotto contenuto di GAGs e fibre elastiche, una vitalità cellulare inferiore al 70%.

È stato pertanto necessario perfezionare il protocollo di decellularizzazione, per ottimizzare il processo. Modificando la modalità di funzionamento del circuito per alcune soluzioni decellularizzanti, i tempi e le velocità di perfusione, nel presente lavoro è stato definito un protocollo ottimale validato in quattro padiglioni auricolari di ratto, con il principale obiettivo di eliminare al meglio la componente muscolare ma preservando le altre componenti dell'ECM, cercando di equilibrare l'aggressività del protocollo per rimuovere le componenti indesiderate (elementi cellulari e nucleari) con la necessità di preservare la microstruttura dell'ECM, mantenendo inalterate le proprietà dello scaffold.

Materiali e Metodi

1. Tecnica chirurgica di espianto dei padiglioni auricolari

È stato eseguito l'espianto del padiglione auricolare sul modello animale di *Rattus norvegicus*, ceppo Sprague-Dawley, seguendo le linee guida sulla sperimentazione animale nazionali (DL 116/92) ed Europee (direttiva 86-609), con il permesso etico ottenuto dall'Organismo per il benessere animale (OPBA) dell'Università degli Studi di Padova in data 02 aprile 2020 (Notifica n° 13/2020) ai sensi della nota della direzione generale della sanità animale e dei farmaci veterinari del 24 luglio 2017.

L'intera procedura è stata eseguita utilizzando uno stereoscopio (Nikon SMZ 1000, Nikon Metrology, Inc, Brighton, MI, USA).

Una volta eseguita la rasatura retroauricolare e peri-auricolare, necessaria per evitare contaminazione microbica (Fig. 12), è stato posizionato il ratto in posizione supina usando strumenti di fissaggio su un tavolo operatorio sterile.

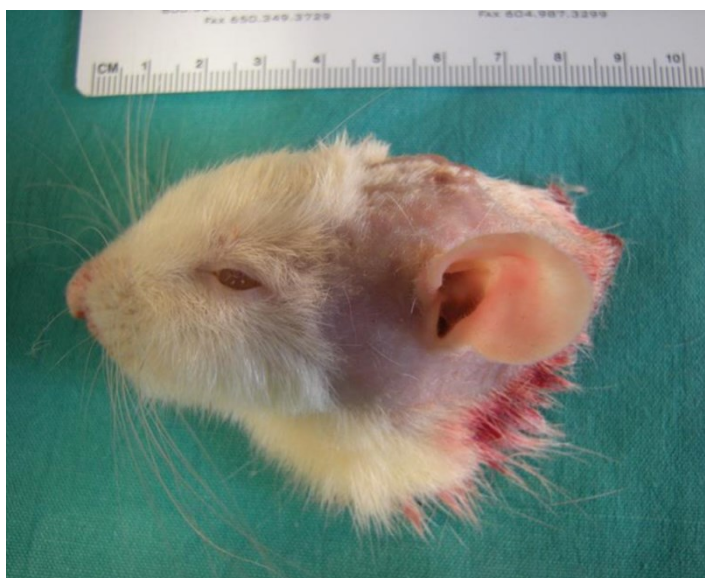


Figura 12: Testa di *Rattus norvegicus*, Sprague Dawley.

È stato sollevato un lembo di pelle e sottocute; senza l'uso di strumenti affilati per preservare le strutture, sono stati individuate la vena giugulare esterna e successivamente la carotide.

Una volta isolati i due vasi, venoso e arterioso maggiori è stato seguito il loro decorso fino alla base del cranio e alla parte inferiore del padiglione auricolare, isolando e espiantando il peduncolo vascolare (Fig. 13), previa sezione del condotto uditivo esterno a circa 2 mm dalla

membrana timpanica. Successivamente, è stata effettuata un'incisione intorno al padiglione auricolare, mantenendo un margine cutaneo di almeno 0,5 cm dal condotto uditivo esterno.

I vasi arteriosi e venosi così ottenuti sono stati incannulati con un ago-cannula che funge da microcatetere vincolato al padiglione con filo di sutura (Fig. 13). È stata iniettata una soluzione salina eparinizzata (soluzione salina contenente una piccola quantità di eparina per prevenire la formazione di coaguli) attraverso il peduncolo arterioso per verificare un adeguato ritorno venoso.

L'innesto così ottenuto è stato conservato in freezer ad una temperatura di -20°C in una piastra Petri sterile e sigillata con parafilm fino al primo giorno di decellularizzazione (per un tempo massimo di 21 giorni).



Figura 13: Padiglione auricolare espantato con peduncolo vascolare vincolato all'ago-cannula.

I padiglioni espantati destinati ai diversi protocolli di decellularizzazione testati sono stati quattro, mentre sono stati espantati tre padiglioni come “controllo” per i successivi test di quantificazione del DNA e per le colorazioni istologiche, permettendo in questo modo di mettere a confronto il padiglione decellularizzato e quello nativo per ogni protocollo utilizzato (Fig. 14).

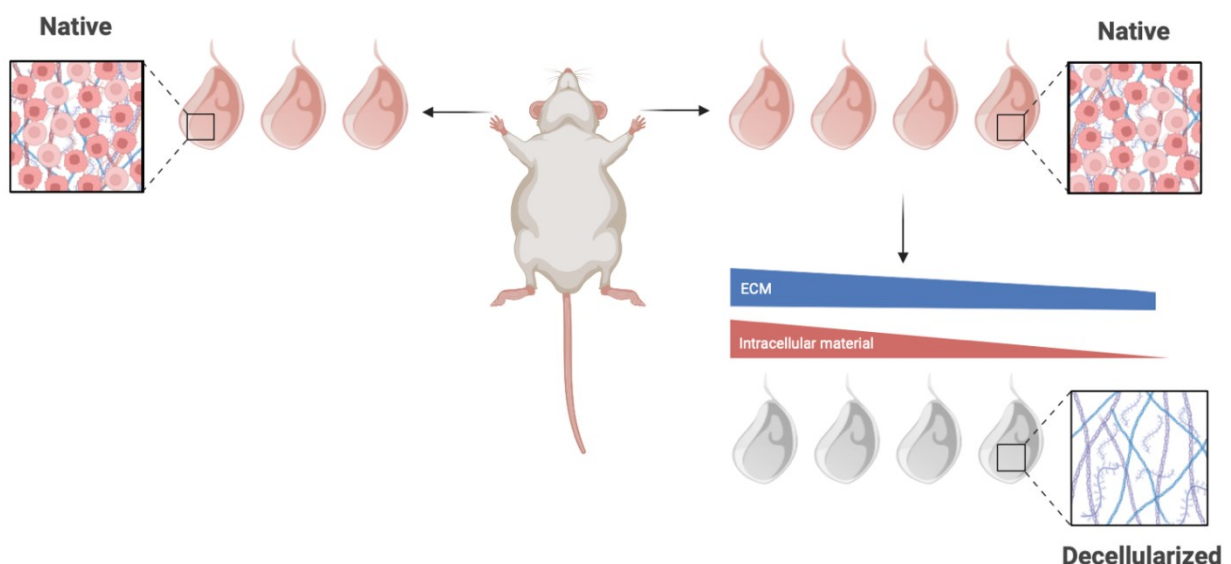


Figura 14: Schematizzazione dell'espanto effettuato e successiva decellularizzazione (Biorender).

2. Bioreattore

È stato applicato un protocollo di decellularizzazione per perfusione, per consentire una distribuzione uniforme e profonda delle soluzioni decellularizzanti attraverso il sistema vascolare dell'organo, mantenendo il sistema chiuso e sterile. L'uso di un bioreattore è necessario per controllare con precisione il flusso dei reagenti, assicurare condizioni sterili e ottimizzare i parametri del processo (come pressione e velocità di perfusione), rendendo il metodo più efficiente e riproducibile. Pertanto, è stato messo a punto un bioreattore per infondere le soluzioni attraverso la rete vascolare nativa del padiglione. È composto da:

- Bottiglie sterili autoclavabili in vetro contenenti le soluzioni da infondere.
- Una camera di decellularizzazione contenente una soluzione nella quale è immerso il campione.
- Una pompa peristaltica (Minipuls 3 – Gilson, Fig. 15).

Inoltre, è presente un circuito idraulico con tubi sterili (del diametro interno di 0,3 mm) collegati alla pompa. L'ago cannula vincola il padiglione ai tubi del sistema di perfusione e ne consente il funzionamento.



Figura 15: Pompa peristaltica Minipuls 3 – Gilson.

Il padiglione auricolare è stato perfuso garantendo una portata di circa 7 ml/minuto (portata cardiaca del modello animale in esame) in base al diametro dei tubi utilizzati: la velocità di rotazione della pompa viene impostata sullo strumento selezionando i giri al minuto (rpm). A seconda della soluzione decellularizzante prevista nel protocollo, è stata definita una duplice modalità di funzionamento del circuito: in “aperto” o in “chiuso”. Nel circuito “chiuso” è presente una sola bottiglia sterile, contenente la soluzione decellularizzante e il padiglione auricolare espianato e incannulato (Fig. 16). La pompa, mediante una cannula inserita nella bottiglia, estrae la soluzione e la fa fluire attraverso il padiglione, permettendo alla soluzione di attraversare il tessuto. La soluzione, dopo essere penetrata nel padiglione, viene espulsa dallo stesso, accumulandosi nella medesima bottiglia. Si completa così il circuito chiuso e la soluzione continua a ricircolare.

Il ricircolo continuo della soluzione garantisce un'esposizione uniforme e prolungata del padiglione alla soluzione decellularizzante.

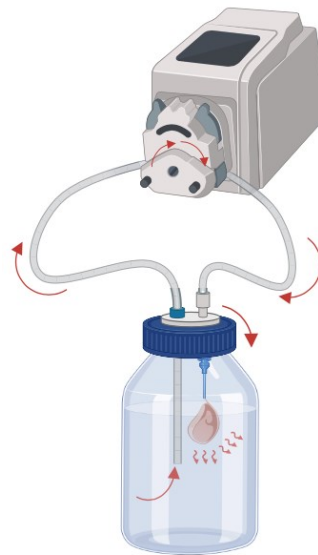


Figura 16: Struttura schematizzata del bioreattore con modalità di funzionamento in “chiuso” (Biorender).

Nel circuito “aperto”, anche detto a perdere, sono previste tre bottiglie autoclavabili in vetro (Fig. 17). La soluzione decellularizzante (soluzione madre in figura) è contenuta in una bottiglia separata da quella contenente il padiglione auricolare. La pompa peristaltica estrae la soluzione e la spinge nel padiglione, mediante il sistema di tubi inferiore (1). La soluzione, dopo aver attraversato il padiglione (2), viene aspirata attraverso un secondo sistema di tubi superiore (3) che confluisce in una bottiglia di scarto (4). In questo sistema la soluzione usata viene continuamente sostituita, garantendo al padiglione la perfusione della soluzione decellularizzante sempre priva di scarti, pulita.

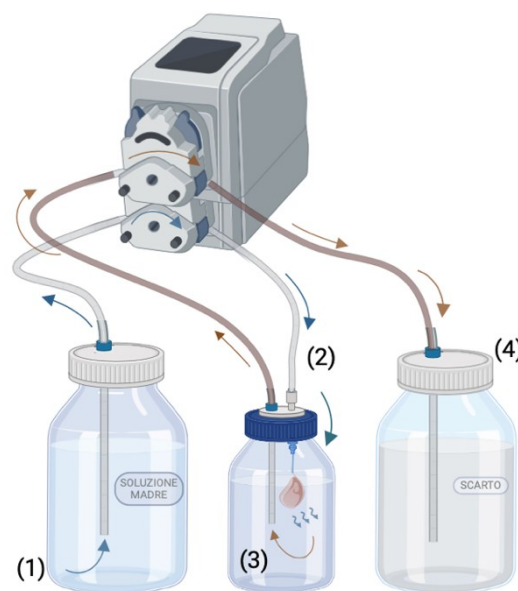


Figura 17: Struttura schematizzata del bioreattore con modalità di funzionamento in “aperto” (Biorender).

3. Protocolli di decellularizzazione

I protocolli di perfusione/decellularizzazione utilizzati sono stati sviluppati presso il Laboratorio di Bioacustica dell'Università di Padova, Dipartimento di Neuroscienze.

I protocolli prevedono una combinazione di trattamenti chimici (detergenti ionici e non ionici, alcoli, soluzioni saline) e biologici (agenti enzimatici: nucleasi) seguiti da diversi lavaggi con acqua distillata (dH₂O) che consentono di rimuovere contaminanti ed eventuali residui dei reagenti chimici utilizzati, riducendo la conseguente citotossicità dello scaffold ma preservando la composizione e la struttura della matrice extracellulare.

I protocolli applicati ai quattro campioni (chiamati R1, R2, R3, R4) differiscono per le tempistiche e le velocità di perfusione delle soluzioni adottate ma anche per la modalità di funzionamento del circuito. Per tutti i protocolli la durata è stata pari a otto giorni di perfusione. Innanzitutto, per prevenire la contaminazione batterica, sono stati eseguiti dei lavaggi con antibiotici e antimicotici efficaci contro una vasta gamma di batteri e funghi.

A seguire, sono stati aggiunti al detergente ionico utilizzato con differenti concentrazioni, efficace per rimuovere i lipidi dai tessuti, ma anche GAGs e fattori di crescita. È stato aggiunto anche un solvente organico per facilitare la penetrazione del detergente nei tessuti. Dopo il suo utilizzo, sono stati effettuati dei lavaggi a base di acqua distillata (dH₂O) con aggiunta di antibiotici e antimicotici per neutralizzare il detergente, rimuovendo eventuali residui che tendono a persistere nel tessuto.

Il detergente non ionico è stato usato per isolare le proteine di membrana. Rompendo le membrane cellulari, il suo utilizzo facilita la rimozione delle cellule dai tessuti. Sono seguiti lavaggi con soluzione salina tamponata per preservare la vitalità della matrice extracellulare.

Successivamente, è stato perfuso colato di sodio, detergente utilizzato per la rimozione del tessuto muscolare, a cui sono seguiti lavaggi necessari per neutralizzarlo.

Infine, l'utilizzo della DNasi I ha consentito di scindere enzimaticamente il DNA e l'uso di acido peracetico ha permesso di sterilizzare i campioni.

Di seguito sono descritti in tabelle, senza entrare nello specifico in quanto potrebbero essere oggetto di brevetto, i protocolli di decellularizzazione applicati ai corrispettivi campioni con le soluzioni perfuse e le tempistiche associate.

| PROTOCOLLO R1 | | PROTOCOLLO R2 | |
|--|-------|--|-------|
| Soluzione | Tempo | Soluzione | Tempo |
| Antibiotico Antimicotico 3X | 67h | Antibiotico Antimicotico 3X | 69h |
| Detergente ionico 1% Detergente ionico 0,1% | 6h | Detergente ionico 1% Detergente ionico 0,1% | 5h |
| Alcoli | 2h | Alcoli | 1h |
| Detergente non ionico 1% | 17h | Detergente non ionico 1% | 17h |
| Colato di sodio | 8h | Colato di sodio | 7h |
| Alcoli | 2h | Alcoli | 20min |
| Dnasi I 1500 u/m2 | 16h | Dnasi I 1500 u/m2 | 16h |
| Acido Peracetico 0,1% | 2h | Acido Peracetico 0,1% | 1h |

Tabella 1: Protocollo applicato al padiglione sinistro del ratto 1 Tabella 2: Protocollo applicato al padiglione destro del ratto 2

| PROTOCOLLO R3 | | PROTOCOLLO R4 | |
|--|-------|--|-------|
| Soluzione | Tempo | Soluzione | Tempo |
| Antibiotico Antimicotico 3X | 69h | Antibiotico Antimicotico 3X | 69h |
| Detergente ionico 1% Detergente ionico 0,1% | 5h | Detergente ionico 1% Detergente ionico 0,1% | 5h |
| Alcoli | 20min | Alcoli | 20min |
| Detergente non ionico 1% | 17h | Detergente non ionico 1% | 17h |
| Colato di sodio | 7h | Colato di sodio | 7h |
| Alcoli | 20min | Alcoli | 20min |
| Dnasi I 1500 u/m2 | 16h | Dnasi I 1500 u/m2 | 16h |
| Acido Peracetico 0,1% | 2h | Acido Peracetico 0,1% | 2h |

Tabella 3: Protocollo applicato al padiglione destro del ratto 3 Tabella 4: Protocollo applicato al padiglione sinistro del ratto 4

Partendo dal protocollo R1, il protocollo successivo R2 ha introdotto una modifica principale: il cambiamento della modalità di funzionamento del circuito per la perfusione degli alcol. In particolare, si è passati da un circuito "chiuso" ad un circuito "aperto". Questa modifica è stata mantenuta anche nei protocolli R3 e R4, determinando una riduzione delle tempistiche di perfusione.

4. Sezione dei campioni

Al termine della procedura di decellularizzazione i padiglioni decellularizzati sono stati tagliati a metà longitudinalmente, ottenendo due porzioni di campione simmetriche.

Una delle due metà verrà processata per le analisi istologiche, senza effettuare ulteriori sezioni. L'altra metà, invece, è stata ulteriormente divisa orizzontalmente in tre regioni, separando base (posizione più prossimale all'ago cannula), centro (regione centrale) e pinna (posizione più distale). Ciascuna regione così ottenuta è stata ulteriormente suddivisa in tre parti di dimensioni comparabili, destinate ai successivi test di biocompatibilità (diretta e indiretta) e quantificazione del DNA.

I padiglioni nativi, anch'essi privati della regione carotidea, sono stati tagliati a metà longitudinalmente.

Una delle due metà verrà processata simultaneamente alla metà del padiglione decellularizzato per le analisi istologiche, mentre l'altra metà è utilizzata unicamente per la quantificazione del DNA, come controllo nativo (Fig. 18).

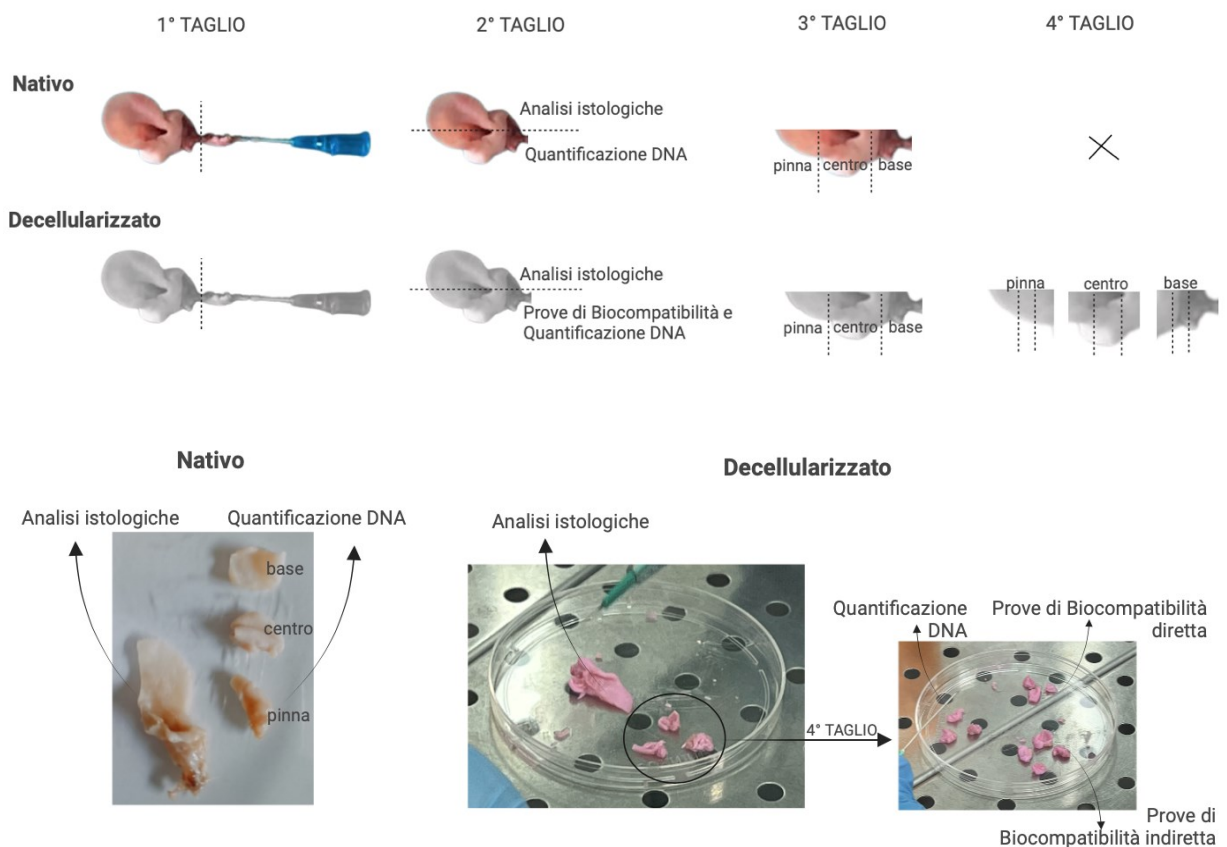


Figura 18: Schematizzazione del taglio nei campioni nativo e decellularizzato (Biorender).

5. Test di citotossicità

I test di citotossicità sono stati eseguiti secondo i requisiti descritti nella normativa internazionale ISO 10993-5, relativa alla valutazione biologica dei dispositivi medici. Per valutare la citotossicità *in vitro* dei campioni dopo la decellularizzazione, sono stati eseguiti test di contatto diretto e indiretto utilizzando colture cellulari di cheratinociti umani (HaCaT).

5.1 Linea cellulare HaCaT

La linea cellulare epiteliale HaCaT è ottenuta tramite una trasformazione spontanea a partire da una coltura primaria di cheratinociti della pelle adulta umana. Queste cellule crescono in coltura come cellule aderenti, mostrando una forma fusiforme. Grazie alla loro capacità di mantenere una normale e notevole capacità di differenziazione epidermica anche dopo più passaggi, le cellule HaCaT sono considerate una linea cellulare immortale, in grado di proliferare indefinitamente senza perdere le caratteristiche fenotipiche tipiche dei cheratinociti umani. La linea cellulare HaCaT offre un sistema sperimentale riproducibile e facile da coltivare, comunemente utilizzata per studiare la differenziazione epidermica, la proliferazione cellulare, l'apoptosi e la risposta agli stimoli esterni (Boukamp et al., 1988).

Il terreno di coltura utilizzato per le cellule HaCaT è costituito da DMEM High Glucose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Biowest), un mezzo arricchito con alta concentrazione di glucosio. A questo mezzo vengono aggiunti:

- 10% FBS (Siero fetale bovino): il siero fetale bovino fornisce fattori di crescita essenziali per il mantenimento e la crescita delle cellule in coltura.
- 1% PS (Penicillina e Streptomicina): una combinazione di antibiotici usata per prevenire la contaminazione batterica delle colture cellulari.

Questa combinazione di nutrienti e antibiotici garantisce un ambiente ottimale per la crescita e la sopravvivenza delle cellule HaCaT in coltura.

Prima dell'esperimento, le cellule HaCaT sono state mantenute e passate in fiasche T25 con 5% di CO₂ a 37 °C con il 95% di umidità.

5.2 Test di contatto diretto

Per il test di contatto diretto è stata utilizzata una piastra da 24 pozzetti, in cui (Fig. 19):

- i primi tre pozzetti ospitano rispettivamente una porzione di base (B), centro (C) e pinna (P), porzioni ricavate dal campione decellularizzato e poste a contatto diretto con le cellule.
- gli altri due pozzetti rappresentano il non trattato (NT), riferimento per la vitalità basale delle cellule e per normalizzare i risultati degli altri pozzetti.

Le cellule sono state raccolte dalle fiasche e seminate nei cinque pozzetti in una piastra 24 Wells, considerando che devono essere seminate 15.000 cellule/pozzetto con 500 μ l di DMEM per ogni pozzetto. Dopo 24 ore di incubazione a 37 °C con 5% di CO₂, è stato sostituito il mezzo di coltura ed esclusivamente nei pozzetti previsti, utilizzando un ago sterile, sono stati inseriti i frammenti di campione (n=3) precedentemente tagliati. Dopo 72 ore di incubazione a 37 °C, è stato eseguito il saggio di vitalità MTS. Una miscela di MTS e PMS, con rapporto 20:1, è stata aggiunta in proporzione 1:5 con il terreno di coltura fresco ad ogni pozzetto. La piastra è stata incubata per 3 ore a 37 °C con 5% di CO₂. Infine, è stata eseguita la lettura di assorbimento per la valutazione della vitalità cellulare.

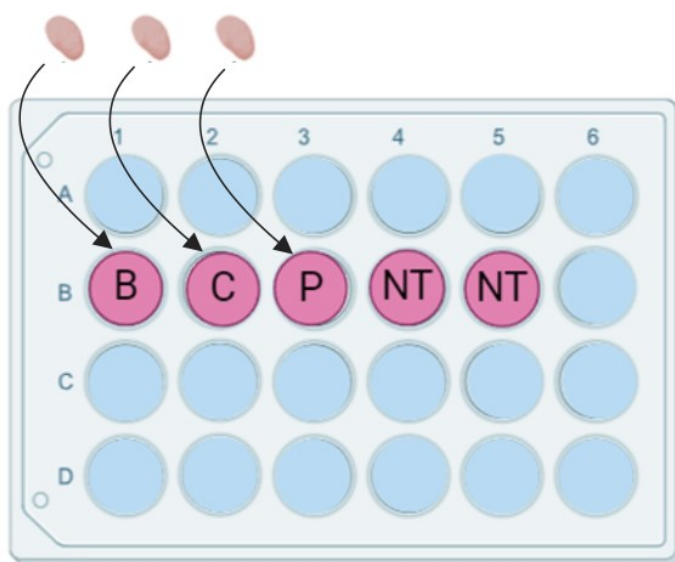


Figura 19: Schematizzazione della piastra per test di contatto diretto (Biorender).

5.3 Test di contatto indiretto

È stata utilizzata una piastra da 96 pozzetti, in cui (Fig. 20):

- tre corsie sono utilizzate per valutare la vitalità delle cellule, dopo il contatto indiretto con le porzioni rispettivamente di base, centro e pinna ottenute dal campione decellularizzato.
- una corsia rappresenta il controllo (non trattato).

La scelta del numero di pozzetti da utilizzare per ogni corsia è legata al peso dei frammenti del campione decellularizzato destinati a tale prova. Almeno quattro pozzetti devono essere considerati nella corsia del non trattato.

In particolare, ogni porzione del campione decellularizzato (base, centro, pinna) è stata inserita in una provetta da 2 ml. Il DMEM è stato aggiunto mantenendo un rapporto tra materiale di prova ed estrattore di 100mg/ml, come indicato dalla norma internazionale ISO 10993-12. Le provette sono state incubate per 72 ore a 37 °C con 5% di CO₂. In questo modo il terreno viene condizionato e può essere utilizzato per il test (Fig. 20).

Le cellule sono state raccolte e seminate considerando 5.000 cellule/pozzetto con 100 µl di DMEM in una piastra da 96 pozzetti, successivamente incubata per 24 ore a 37 °C.

Al termine delle 24 ore previste, nei pozzetti delle prime tre corsie stabilite, viene sostituito il mezzo di coltura con il terreno condizionato di ogni campione, prelevando 100 µl per ogni pozzetto dai rispettivi tubi incubati. Dopo 72 ore di incubazione a 37 °C con 5% di CO₂, è stato eseguito il saggio MTS. Una miscela (20 µl) di MTS e PMS 20:1 è stata aggiunta ad ogni pozzetto (80 µl di terreno completo). La piastra è stata incubata per 3 ore a 37 °C con 5% di CO₂, dopo le quali è stata eseguita la lettura di assorbimento.

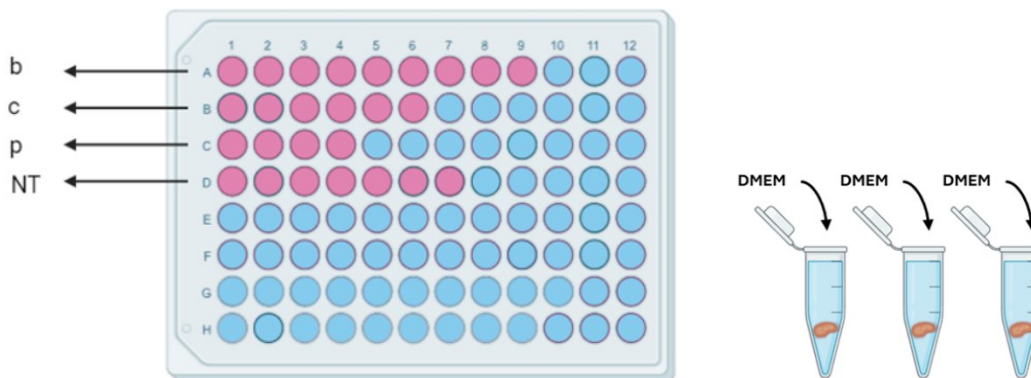


Figura 20: Schematizzazione della piastra per test di contatto indiretto; preparazione del terreno condizionato (Biorender).

5.4 Saggio di vitalità

Il saggio di vitalità cellulare colorimetrico MTS+PMS (CellTiter 96® AQueous One Solution, Promega, Milano, Italia) è stato utilizzato per determinare la vitalità cellulare, ossia il numero di cellule vive e metabolicamente attive in una popolazione cellulare, valutando l'effetto tossico del campione decellularizzato sulle cellule.

Il saggio MTS si basa sulla capacità delle cellule vitali di ridurre il sale di tetrazolio giallo (MTS) a formazano, un prodotto marrone solubile nel mezzo di coltura. Questo processo di riduzione avviene grazie all'azione dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, che è attivo solo nelle cellule vive. La reazione chimica è facilitata dalla presenza del fenazina metosulfonato (PMS), che funge da accettore di elettroni. L'assorbanza del formazano prodotto viene misurata a 490 nm utilizzando uno spettrofotometro ed è proporzionale al numero di cellule vive presenti nel pozzetto. Quindi, maggiore è il numero di cellule vitali presenti, maggiore è il quantitativo di questo prodotto e maggiore l'intensità del colore marrone (Cory et al., 1991).

Per garantire l'accuratezza e l'affidabilità dei risultati, è fondamentale includere pozzetti di controllo, non trattati che contengono solo le cellule e il mezzo di coltura senza il campione in esame, come riferimento per la vitalità basale delle cellule.

Dopo l'incubazione, l'assorbanza del prodotto formazano viene misurata utilizzando il lettore di micropiastre INNO (LTEK Co., Ltd, Repubblica di Corea) (Fig. 21). La lunghezza d'onda utilizzata per la misurazione è 490 nm, che corrisponde all'assorbanza massima del formazano solubile.

Per ogni set di campioni (controlli non trattati e trattati), si calcola l'assorbanza media per ottenere dati rappresentativi. L'assorbanza media dei pozzetti di controllo è stata considerata come il massimo livello di vitalità possibile per le cellule non esposte a trattamenti. L'assorbanza dei pozzetti trattati viene confrontata con quella dei controlli non trattati per determinare la percentuale di vitalità relativa. Questo aiuta a valutare l'effetto del tessuto decellularizzato o dei residui di decellularizzazione sul numero di cellule vitali. In particolare, la vitalità delle cellule coltivate nei pozzetti trattati è stata espressa come percentuale della vitalità massima. Valori di alta assorbanza (vicina ai controlli non trattati), indicano che il trattamento non ha un effetto citotossico significativo e le cellule sono vitali. Diversamente, una bassa assorbanza indica un effetto citotossico, con una riduzione del numero di cellule vive.

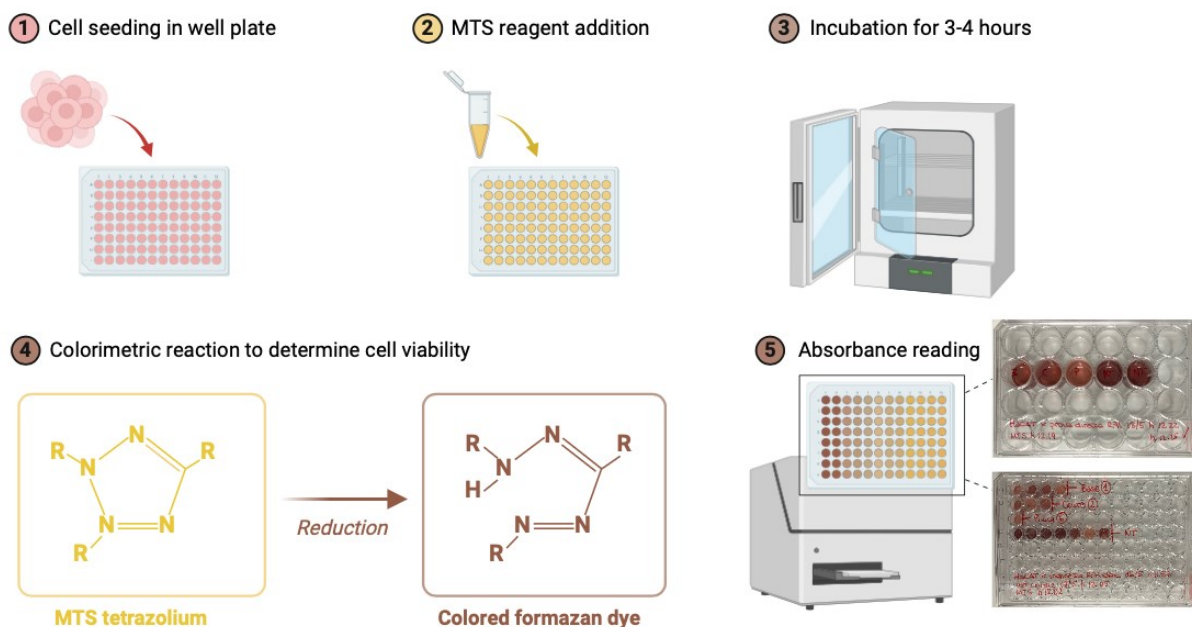


Figura 21: Schematizzazione della procedura del saggio di vitalità MTS (Biorender).

6. Contenuto di DNA

Per valutare l'efficacia della decellularizzazione, garantire la purezza del campione e assicurare la sua idoneità per applicazioni cliniche e di ricerca è stata eseguita l'estrazione del DNA nei campioni decellularizzati. È stata eseguita anche nei campioni nativi, utilizzati come riferimento per confrontare i livelli di DNA. Questo confronto aiuta a determinare la quantità di DNA che è stata effettivamente rimossa durante il processo di decellularizzazione. È stato utilizzato un protocollo standard di estrazione che include lisi cellulare, purificazione e precipitazione del DNA. Dopo l'estrazione del DNA dai tessuti, è stata quantificata la quantità presente nel campione mediante spettrofotometro che misura l'assorbanza del campione a specifiche lunghezze d'onda (260 nm per il DNA).

6.1 Estrazione del DNA

Il DNA è stato estratto dai campioni tagliati e conservati in provette da 1,5ml contenenti porzioni di base, centro e pinna appartenenti sia al gruppo dei padiglioni decellularizzati sia dei nativi (di controllo). È stato utilizzato il kit commerciale di estrazione DNeasy Blood & Tissue Kits Qiagen, progettato per la rapida e efficace purificazione del DNA totale (incluso DNA genomico, mitocondriale e patogeno) da una varietà di fonti di campioni, come tessuti, cellule, sangue o batteri. Il kit sfrutta le proprietà di una membrana di silice per purificare il DNA. In presenza di alte concentrazioni di sali caotropici (presenti nei buffer forniti nel kit), il DNA si lega alla membrana di silice. I sali caotropici sono sostanze chimiche che denaturano le proteine e facilitano la lisi cellulare, facilitando il legame del DNA alla membrana (Qiagen, 2023).

Ogni campione è stato prima trattato con 180 µl di una soluzione tampone di lisi (Buffer ATL) contenente detergenti e successivamente con 20 µl di proteinasi K, proteinasi che digerisce le proteine cellulari, inclusi gli enzimi che potrebbero degradare il DNA. Questi primi passaggi rompono le membrane cellulari e nucleari, liberando il DNA.

Dopo aver utilizzato un agitatore da laboratorio a vortice (vortex), i campioni sono stati incubati a 56°C per un tempo variabile, fino ad una completa lisi delle cellule e digestione delle proteine. Dopo una rapida centrifuga, sono stati aggiunti 4 µl di RNase A (100mg/ml) per rimuovere l'RNA e dopo aver usato il vortex, le provette sono state incubate per due minuti a temperatura ambiente (15-25°C). In seguito ad una rapida centrifuga, sono stati aggiunti 200 µl di una soluzione tampone contenente sali caotropici (Buffer AL), miscelati energicamente con un vortex per 15 secondi ed incubati a 56°C per 10 minuti. Dopo l'aggiunta di 200 µl di etanolo (96-100%), le provette sono state miscelate e centrifugate velocemente per facilitare il legame del DNA alla membrana di silice nella colonna di spin. È stata quindi trasferita l'intera miscela

(prelevando anche eventuali precipitati) nella colonna di spin DNeasy collocata in un tubo di raccolta da 2 ml (Fig. 22). Dopo aver centrifugato a 8000 rpm per 1 minuto, è stato scartato il liquido di eluizione, riutilizzando il tubo di raccolta per il passaggio successivo.

Sono seguiti dei lavaggi con 500 μ l di buffer AW1, e in seguito AW2 con i quali la colonna viene lavata per rimuovere proteine, sali, e altri contaminanti. Questi lavaggi assicurano che solo il DNA rimanga legato alla membrana. È stata sempre eseguita dopo la somministrazione dei buffer una centrifuga per rimuovere completamente i residui di lavaggio.

Per ottenere una “prima eluizione” sono stati aggiunti 50 μ l di tampone AE direttamente al centro della membrana della colonna spin. Le provette sono state incubate per 30 minuti a temperatura ambiente prima di essere centrifugate per 1 minuto a 8000 rpm. Dopo la centrifuga, le colonne spin sono state spostate in nuove provette di raccolta da 1,5 ml mentre, le provette per microcentrifuga da 1,5 ml contenenti il DNA purificato appena ottenuto, sono state conservate per procedere con la quantificazione mediante spettrofotometro.

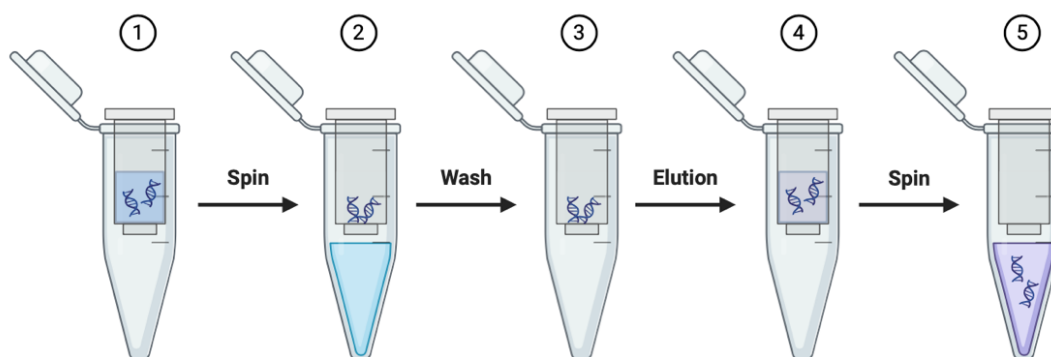


Figura 22: Principio di funzionamento dell'estrazione del DNA mediante kit (Biorender).

Per la “seconda eluizione”, nelle colonne spin sono stati aggiunti 50 μ l di tampone AE e le provette così preparate sono state chiuse con parafilm e incubate overnight a temperatura ambiente.

Il giorno successivo sono state centrifugate a 8000 rpm per 1 minuto e poi conservate con il DNA eluito per procedere alla quantificazione con spettrofotometro.

6.2 Quantificazione del DNA

La concentrazione di DNA nei campioni è stata determinata utilizzando uno spettrofotometro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Questo strumento misura il contenuto di DNA in una goccia di eluizione analizzandone l'assorbanza a 260 nm (A₂₆₀). Infatti, il DNA assorbe luce a questa lunghezza d'onda quindi, misurando l'assorbanza, si può determinare la concentrazione di DNA. Tale principio si basa sulla seguente relazione lineare, nota come legge di Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

dove:

A è l'assorbanza.

ϵ è il coefficiente di estinzione molare del DNA.

c è la concentrazione del DNA.

l è la lunghezza del percorso (spessore del campione attraversato dalla luce).

Dettagli della Misurazione:

- Assorbanza a 260 nm (A₂₆₀): Un valore A₂₆₀ pari ad 1 corrisponde a 50 µg/ml di dsDNA, considerando una lunghezza del percorso di rilevamento di 1 cm. Lo strumento offre una funzione di correzione della lunghezza del percorso. Grazie a questa funzione, il NanoDrop può determinare con precisione la concentrazione di DNA utilizzando un volume ridotto di solo 1 µL di eluato, ottenendo una misurazione accurata in µg/µl.

Misurazioni Supplementari:

- Assorbanza a 230 nm (A₂₃₀): Lunghezza d'onda che misura l'assorbanza dei sali caotropici.

- Assorbanza a 280 nm (A₂₈₀): Lunghezza d'onda che misura l'assorbanza delle proteine.

Rapporto di Assorbimento:

- Rapporto A₂₆₀/A₂₃₀: Questo rapporto dovrebbe essere intorno a 2. Valori inferiori possono indicare la presenza di contaminanti come sali caotropici.

- Rapporto A₂₆₀/A₂₈₀: Per campioni di DNA con elevata purezza, questo rapporto dovrebbe essere intorno a 1,8. Valori inferiori indicano la presenza di proteine come contaminanti.

Espressione dei risultati:

La concentrazione di DNA è stata misurata sulle due eluizioni preparate per ogni campione. È stata espressa come ng di dsDNA per mg di tessuto secco, utilizzando un fattore di conversione valido per gli acidi nucleici di DNA doppio filamento. Sommando il risultato delle due eluizioni (a loro volta somma dei risultati ottenuti per porzioni di base, centro e pinna), si è ottenuto il valore in ng di DNA presente sui mg di tessuto dell'intero campione decellularizzato.

7. Analisi istologica

7.1 Preparazione dei campioni biologici

Prima di poter tagliare sottili sezioni dei campioni di tessuto, è necessario impregnare e ricoprire il tessuto con un mezzo, insolubile in acqua, che lo renda più consistente. I passaggi di fissazione, disidratazione e chiarificazione stabilizzano il campione, ne preservano la struttura e prevengono la degradazione enzimatica, preparando il tessuto all'infiltrazione da parte del mezzo di inclusione, ma mantenendo intatte le caratteristiche strutturali del campione (Bologna et al., 2020).

Fissazione dei campioni

I campioni decellularizzati e nativi destinati ad indagini istologiche, inseriti in cassette per istologia, sono stati immersi nel fissativo Shandon Glio-fixx™ (Thermo Fisher Scientific, Milano, IT) per un massimo di 22 ore a 4°C. Successivamente i campioni devono essere lavati al fine di eliminare l'eccesso di fissativo che potrebbe alterare la colorazione (Bologna et al., 2020). I campioni sono stati quindi lavati sotto acqua corrente e successivamente immersi in etanolo al 70% per una durata massima di due settimane, iniziando il processo di disidratazione.

Disidratazione

La disidratazione (rimozione dell'acqua dai campioni) avviene attraverso il passaggio del tessuto in una serie di alcoli a concentrazione progressivamente crescente, dal 70% al 100%, per tempi di permanenza in ciascuna concentrazione variabili da 15 minuti a un'ora, a seconda delle dimensioni del pezzo (Bologna et al., 2020). I campioni sono stati quindi inseriti in un processatore automatico di campioni istologici (Fig. 23) (MTP SLEE Mainz, Nieder-Olm, Germania). Selezionando il programma opportuno (durata totale di 12 ore), i campioni sono stati disidratati passando in etanoli a concentrazioni crescenti fino a raggiungere l'alcol assoluto (Leica). Seguono i processi di chiarificazione e immersione in paraffina.



Figura 23: Processore automatico di campioni istologici MTP (SLEE).

Chiarificazione o Diafanizzazione

I liquidi solubili nei mezzi di inclusione e denominati diafanizzanti sono numerosi e comprendono lo xilolo o il benzene. Attualmente, vengono utilizzati alcuni agenti che sostituiscono a tutti gli effetti gli altri diafanizzanti. I tempi di permanenza nei diafanizzanti dipendono dalle dimensioni del pezzo ma non risultano essere troppo lunghi (Bologna et al., 2020).

Questo processo coinvolge l'uso di un solvente per rendere i tessuti trasparenti e pronti per l'inclusione in paraffina. Un sostituto comunemente usato al posto dello xilolo tradizionale è il Sub-X, meno tossico e meno infiammabile rispetto allo xilolo. I campioni sono stati quindi immersi in due cambi successivi di Sub-X (Leica) per garantire la completa diafanizzazione.

Infiltrazione

Il campione chiarificato viene immerso nel mezzo di inclusione fuso per un periodo di tempo sufficiente a garantire che penetri nei più profondi interstizi del tessuto (Bologna et al., 2020). I campioni sono stati immersi in paraffina (Diawax, con punto di fusione di 56-58°C, Diapath, Bergamo, Italia) per poi essere inclusi. Tali passaggi sono stati eseguiti sempre utilizzando il processore automatico di campioni istologici.

Inclusione in paraffina

I campioni ben impregnati di paraffina sono stati posti in un apposito contenitore di materiale metallico, orientati opportunamente e utilizzando la centralina di inclusione MPS/P1 (SLEE) (Fig. 24) sono stati ricoperti con il mezzo d'inclusione fuso, fino ad una completa solidificazione del mezzo su piastra refrigerata MPS/C MTP (SLEE).

Solo dopo che il campione incluso risulta ben solidificato è pronto per essere tagliato (Bologna et al., 2020).

I campioni sono stati quindi tagliati con un microtomo rotativo automatico (Shandon Finesse ME). Per migliorare la consistenza del mezzo di inclusione, prima del taglio il blocchetto di paraffina e campione incluso, può essere raffreddato a -20°C . Per ogni campione sono state tagliate sezioni sequenziali con spessore di $5\ \mu\text{m}$, poste in seguito in un bagnetto termostato alla temperatura di 37°C per facilitarne la stesura e raccolte, infine, su vetrini porta oggetto polarizzati Superfrost Plus (Diapath). Questi vetrini sono stati posti ad asciugare su piastra riscaldata (Slee Mainz) a 37°C per essere poi colorati (Fig. 25).



Figura 24: Centralina di inclusione MPS/P1 (SLEE); piastra refrigerata MPS/C MTP (SLEE).

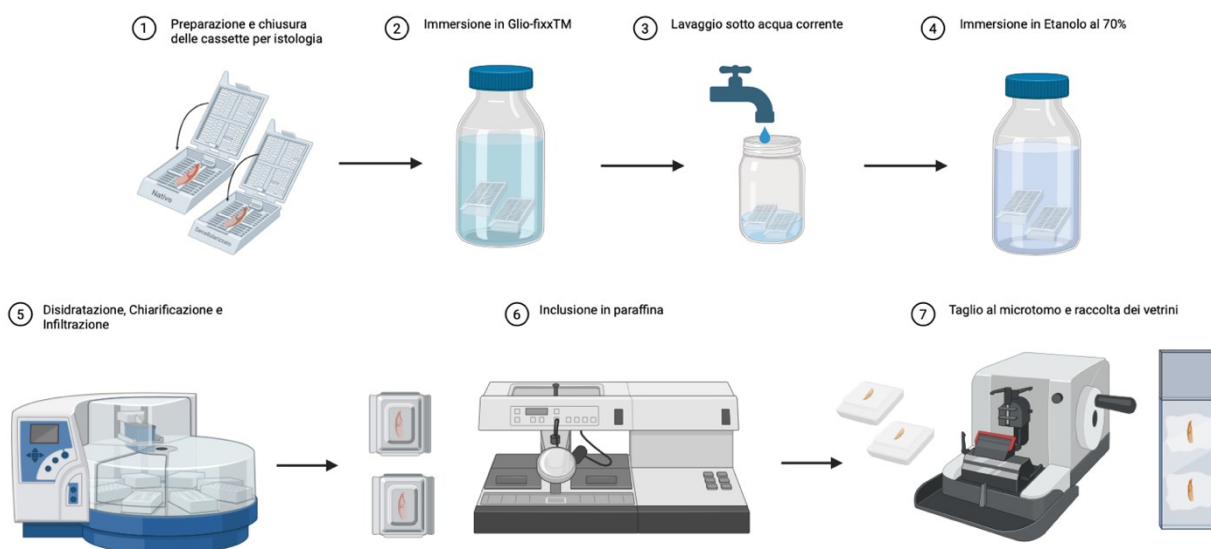


Figura 25: Schematizzazione delle procedure istologiche eseguite (Biorender).

7.2 Colorazioni

Per valutare qualitativamente l'efficacia della decellularizzazione, sono state effettuate diverse colorazioni istologiche, che hanno permesso di ottenere una comprensione più approfondita della composizione e delle caratteristiche dei tessuti a livello microscopico, migliorando il contrasto tra diverse strutture tissutali. Le colorazioni sono state effettuate anche nei campioni nativi, per confrontare le caratteristiche tissutali originali con i campioni decellularizzati, valutando se la struttura del tessuto è stata alterata o preservata.

Per tutte le colorazioni i vetrini sono stati inizialmente “sparaffinati” in xilolo e reidratati con una serie di alcool a concentrazione decrescente (100%, 95%, 80%) per poi essere lavati in acqua distillata (precorso anche detto di “andata”). I tempi sono fissi a prescindere dal campione in esame. Se la colorazione è a gocce, dopo l'acqua distillata, si toglie l'eccesso e i vetrini sono riposti in una camera umida per evitare che il campione non si secchi durante la colorazione.

Segue l'effettiva colorazione dei vetrini (a gocce o ad immersione) secondo i protocolli messi a punto presso il Laboratorio di Bioacustica dell'Università degli Studi di Padova. Al termine della procedura di colorazione, ad eccezione della colorazione DAPI, i vetrini sono stati disidratati in una serie crescente di alcool (80%, 95%, 100%) e infine passati in xilolo (percorso di “ritorno”). Mediante vetrini copri-oggetto e resina di montaggio permanente (Micromount, Diapath, Bergamo, Italia) i vetrini sono stati montati. Diversamente, per la colorazione DAPI, sono stati effettuati dei lavaggi con PBS (soluzione tamponata isotona e non tossica per le cellule, ideale per lavaggi cellulari) in camera umida e la chiusura dei vetrini è avvenuta utilizzando glicerolo al 20% (Sigma- Aldrich).

Ematossilina ed Eosina (E&E)

La colorazione E&E fornisce una visione dettagliata della microanatomia dei tessuti. L'ematossilina di Mayer (Leica Biosystems, Milano, Italia) marca specificamente le componenti nucleari, come eterocromatina e nucleoli, acidi nucleici, proteine di membrana e membrane cellulari, conferendo loro un colore blu/violetto. L'eosina, soluzione acquosa al 1% (Leica Biosystems, Milano, Italia), colora invece le componenti citoplasmatiche, incluse le proteine cellulari e mitocondriali, il collagene, le fibre elastiche, le fibre muscolari e i globuli rossi, con tonalità che vanno dal rosa al rosso (Sampias & Rolls). In una colorazione E&E ben eseguita, si possono notare leggere variazioni nelle sfumature di colore, in particolare con l'eosina. Queste differenze cromatiche aiutano a distinguere e interpretare meglio le varie componenti tissutali, facilitando l'identificazione di cambiamenti morfologici (Sampias & Rolls).

Alcian Blu (AB)

La colorazione Alcian Blu pH 2,5 (Kit Bio-Optica 04-160802, Milano, Italia) è utilizzata per evidenziare i GAGs, mucopolisaccaridi acidi presenti nei tessuti. Infatti, il colorante Alcian blu si lega solo ai mucopolisaccaridi acidi, che hanno gruppi solforici e carbossilici. Non reagisce invece con i gruppi fosfati degli acidi nucleici. Sono quindi colorate solo le mucine acide, presenti nelle mucose dei tessuti.

Colorazione Weigert (cW)

La colorazione Weigert (Kit Bio-Optica 04-050802, Milano, Italia) utilizza un colorante per le fibre elastiche che vengono evidenziate in viola scuro/nero. Tuttavia, tale affinità non è completamente esclusiva, poiché anche altre strutture come il collagene e le membrane basali possono risultare colorate. Per questo motivo, è essenziale eseguire una differenziazione accurata per ottenere una colorazione intensa e selettiva delle fibre elastiche, distinguendole chiaramente dalle altre componenti tissutali.

Tricromica di Masson (TM)

La colorazione Tricromica di Masson (kit Biopica 04-010802, Milano, Italia) consente di distinguere il tessuto connettivo mediante l'utilizzo di vari coloranti. Associa infatti l'ematossilina Ferrica di Weigert per evidenziare in nero/blu scuro i nuclei delle cellule, l'acido picrico per colorare gli eritrociti, rendendoli visibili come macchie gialle ben distinguibili e, mediante una miscela di coloranti acidi (tra cui la fucsina), consente di colorare il citoplasma delle cellule, fibre muscolari e granuli acidofili.

Infine, l'utilizzo del blu di anilina evidenzia il tessuto connettivo, inclusi il collagene e le fibre connettive, in blu/azzurro.

DAPI

La colorazione utilizza un colorante fluorescente blu DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindolo) (D9542, Sigma-Aldrich, MO, USA) che si lega al DNA a doppio filamento (dsDNA). In particolare, lega fortemente regioni del DNA ricche di sequenze di adenina e timina (AT) presenti nella scanalatura minore del DNA. Quando il DAPI si lega al dsDNA mostra una fluorescenza 20 volte maggiore rispetto alla sua fluorescenza libera. Questo comporta un'emissione di luce blu molto più intensa, rendendo visibile il DNA con un microscopio a fluorescenza. La fluorescenza emessa è direttamente proporzionale alla quantità di DNA presente, con un massimo di emissione intorno a 460 nm.

8. Acquisizione delle immagini e quantificazione

L'analisi istologica dei campioni colorati con le riportate colorazioni è stata effettuata tramite microscopio ottico Nikon ECLIPSE 50i (Nikon Instruments, Melville, New York, USA) e microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse TE2000-U (Nikon Instruments) per la colorazione con DAPI. Per ogni campione tutte le immagini sono state acquisite con il software NIS-Elements 3.0 Image Analysis System (Nikon Instruments), sviluppato per il controllo e l'acquisizione delle immagini di microscopia. Tale programma consente di creare un'unica immagine ad altissima risoluzione, spostando manualmente o automaticamente il vetrino sul microscopio. Il software unisce i diversi fotogrammi, fornendo immagini di grandi dimensioni ad alto ingrandimento (Large-image). Sono state quindi acquisite con questa modalità tre Large-image per ogni campione e per ciascuna colorazione, distinguendo le porzioni di base, centro e pinna presenti per ogni vetrino, rappresentative della totalità del campione (Fig. 26).

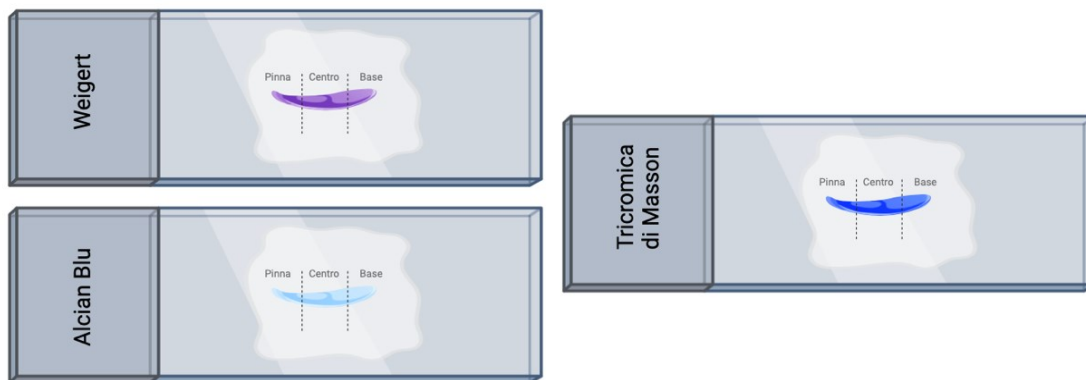


Figura 26: Vetrini rappresentanti il campione colorato con distinzione delle tre porzioni (Biorender).

In base alla colorazione effettuata sul vetrino in esame, sono state acquisite immagini con diversi ingrandimenti e settando opportunamente i parametri di acquisizione (Tab. 5), quali tempo di esposizione (Exposure) per ottenere un livello di luminosità ottimale, guadagno (Gain) per aumentare la luminosità dell'immagine senza aumentare il tempo di esposizione e contrasto (Contrast).

| | Tricromica di Masson | Weigert | Alcian Blu |
|---------------|----------------------|-------------|------------|
| Ingrandimento | 10x | 20x | 10x |
| Exposure | 6 ms | 4 ms | 8 ms |
| Gain | 1.40x | 1.00x | 1.40x |
| Contrast | Anti-reflex | Anti-reflex | Enhanced |

Tabella 5: Parametri utilizzati per l'acquisizione delle immagini destinate alla quantificazione (Biorender).

La quantificazione dei vetrini colorati è stata effettuata per analizzare e misurare quantitativamente le caratteristiche dei tessuti. Con questa procedura è possibile ottenere dati quantitativi sulla densità, area o intensità delle strutture tissutali colorate, facilitando il confronto tra campioni decellularizzati e nativi. Questo consente di ottenere informazioni più precise sulle variazioni morfologiche e strutturali del tessuto, valutando in maniera più oggettiva l'efficacia o meno della decellularizzazione. La quantificazione è stata effettuata esclusivamente sulle seguenti colorazioni: Tricromica di Masson, Weigert ed Alcian Blu, seguendo i protocolli di quantificazione sviluppati presso il Laboratorio di Bioacustica dell'Università di Padova, Dipartimento di Neuroscienze. Usando il software ImageJ Fiji (<https://imagej.net/ij/>), per ogni colorazione è stata definita una Region of Interest (ROI) rettangolare per selezionare aree specifiche dell'immagine che si vogliono isolare dal resto, permettendo un'analisi precisa e ripetibile.

Quantificazione Tricromica di Masson

Dopo aver definito ed isolato la regione di interesse, per distinguere e quantificare la componente muscolare nei campioni di padiglione auricolare nativo e decellularizzato, sono state isolate le componenti colorate in rosso/arancione mediante una sfogliatura a colori, escludendo manualmente se necessario altre strutture non indicanti tessuto muscolare come citoplasma e granuli acidofili (Fig. 27). Si misura quindi l'area dei pixels, cioè il tessuto muscolare dell'immagine. Tale valore è rapportato all'area del tessuto totale in pixels della ROI (cioè tessuto muscolare e tessuto di fondo dell'immagine isolato dallo sfondo, escludendo le componenti bianche, spazi vuoti).

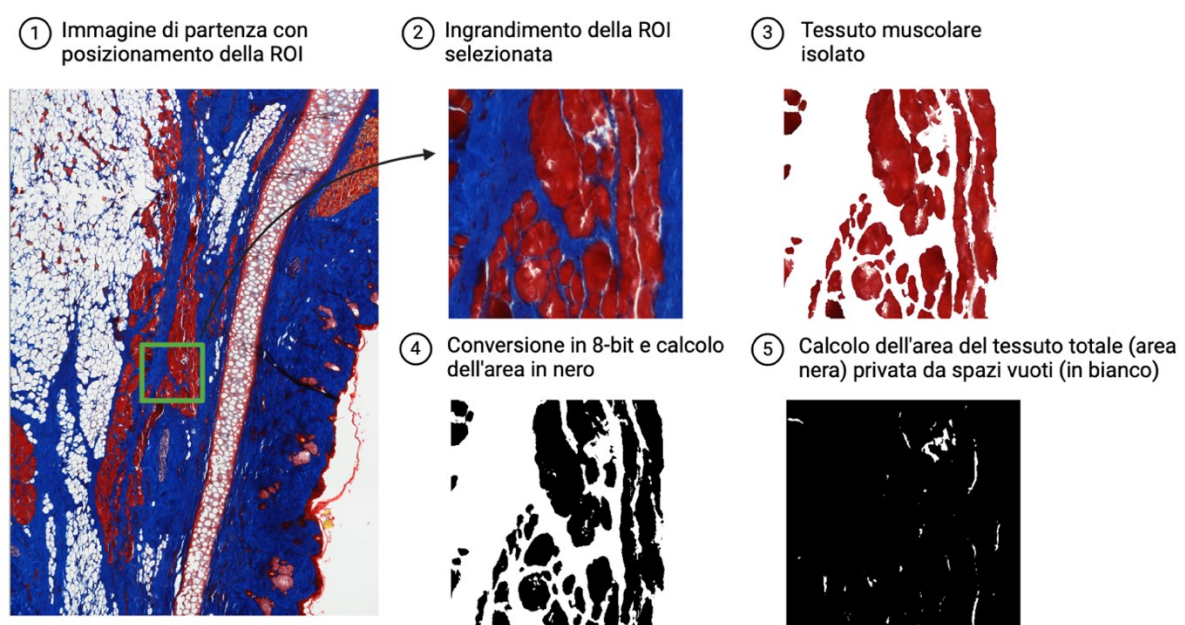


Figura 27: Schematizzazione della procedura utilizzata per isolare e quantificare il tessuto muscolare presente in campione nativo (Biorender).

Tale procedura è stata realizzata sulle tre porzioni (base, centro, pinna) di ogni campione, selezionando due ROI per ogni porzione.

Quantificazione Weigert

Dopo aver identificato visivamente le fibre elastiche da isolare, evidenziate in colore viola scuro/nero e aver definito e posizionato la ROI per concentrarsi sulla zona da analizzare, per quantificare il contenuto di fibre elastiche è stato valutato il rapporto tra l'area delle sole fibre e il tessuto totale. Sono state applicate tecniche di miglioramento dell'immagine come la modifica di luminosità, contrasto e deconvoluzione a colori per aumentare la visibilità delle fibre e separarle dallo sfondo. Queste operazioni hanno trasformato le fibre elastiche in una tonalità differente (viola/azzurro). In seguito, l'immagine è sottoposta ad una sogliatura a colori per isolare le fibre elastiche e conversione in formato 8 bit per calcolarne l'area in pixel. L'area calcolata delle fibre elastiche viene rapportata all'area totale del tessuto in pixel all'interno della ROI (Fig. 28).

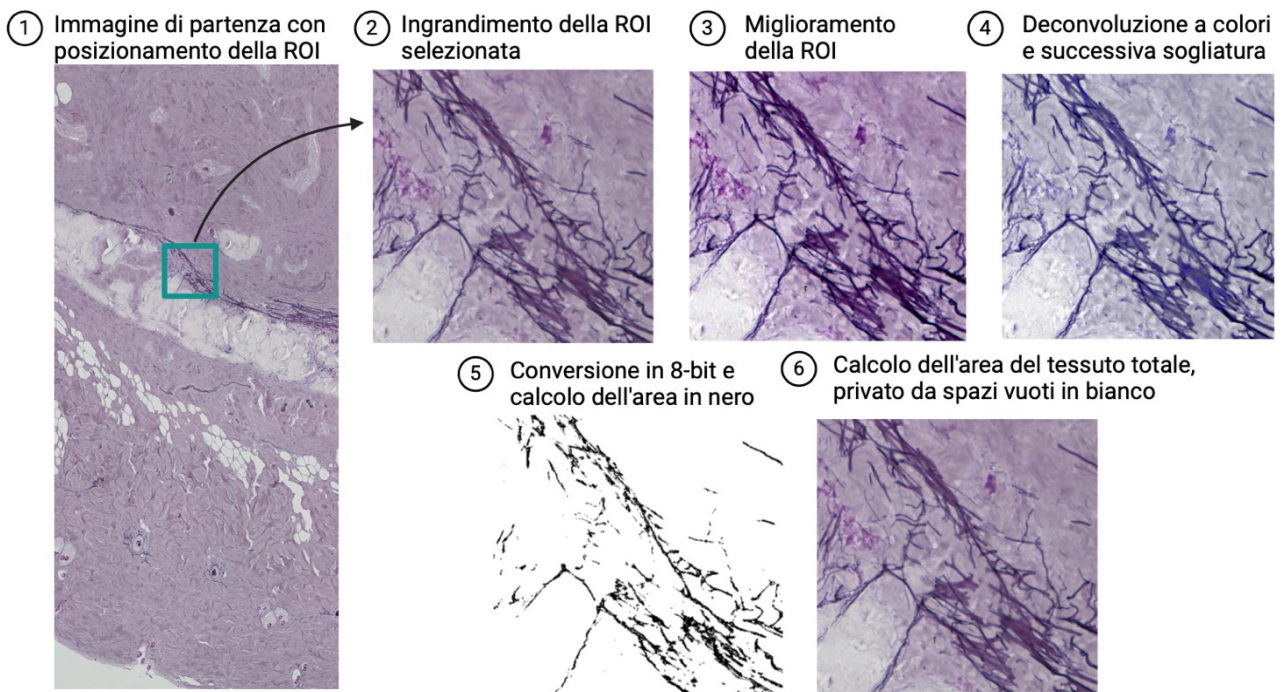


Figura 28: Schematizzazione della procedura utilizzata per isolare e quantificare le fibre elastiche presenti in campione nativo (Biorender).

Tale procedura è stata realizzata sulle tre porzioni (base, centro, pinna) di ogni campione, selezionando due ROI per ogni porzione.

Quantificazione Alcian Blu

Mediante questa colorazione è stata quantificata la presenza di glicosamminoglicani (GAGs), individuati visivamente sul vetrino con una tonalità di azzurro/blu. Dopo aver definito e posizionato una Regione di Interesse (ROI) per concentrarsi sulla regione da analizzare, mediante un'operazione di sogliatura, è stato isolato il tessuto in blu/azzurro rispetto allo sfondo biancastro.

L'immagine è stata convertita in scala di grigi a 8-bit per facilitare l'analisi quantitativa dell'intensità del colore. Infatti, diversamente dalle altre quantificazioni, non si calcola un rapporto tra aree ma si misura l'intensità media del colore Alcian Blu su tutta l'immagine. In particolare, avendo convertito l'immagine in scala di grigi, si misura il "Mean Grey Value", cioè il valore medio dell'intensità dei pixel in grigio considerando solo il tessuto all'interno della ROI (Fig. 29). Questo valore rappresenta l'intensità di colorazione e, di conseguenza, la quantità di GAG presenti, con una relazione di proporzionalità inversa. Il valore Mean Grey Value varia, infatti, tra 0 (corrispondente al nero) e 255 (corrispondente al bianco). Pertanto, valori di Mean Grey Value alti indicano che il tessuto è più chiaro, con una minore intensità di colorazione blu/azzurro e di conseguenza, minore presenza di GAGs. Viceversa, un Mean Grey Value basso indica che il tessuto è più scuro, con una maggiore intensità di colorazione blu/azzurro e quindi maggiore presenza di GAGs.

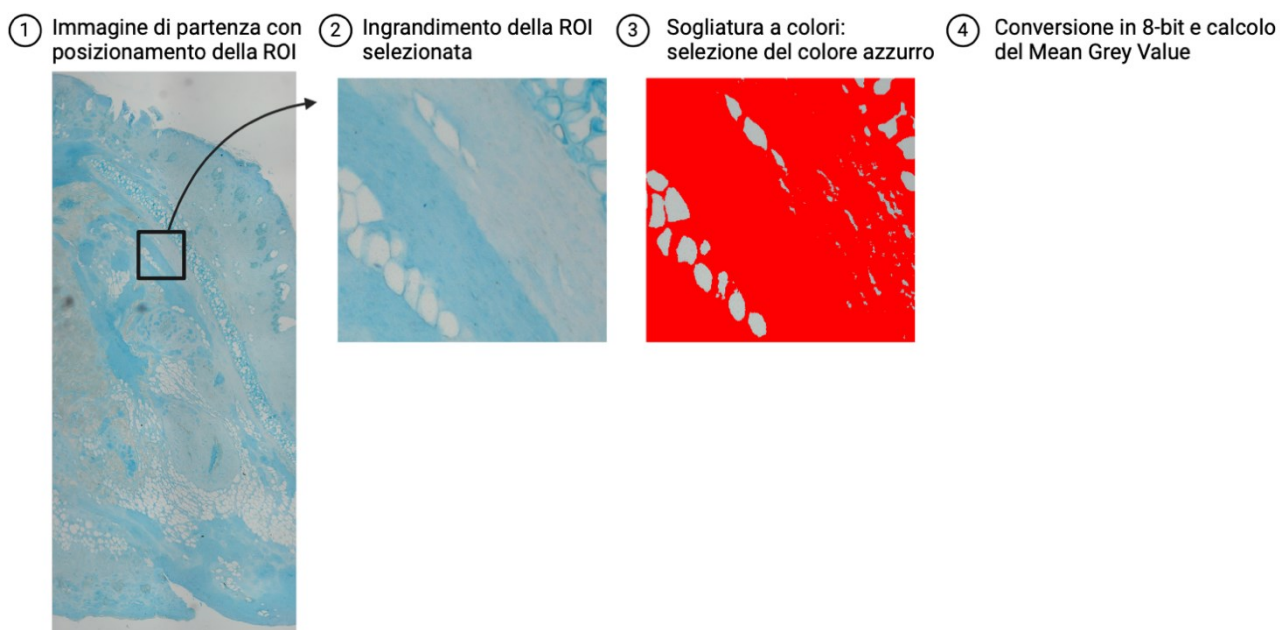


Figura 29: Schematizzazione della procedura utilizzata per isolare e quantificare i GAGs presenti in campione nativo (Biorender).

Tale procedura è stata realizzata sulle tre porzioni (base, centro, pinna) di ogni campione, selezionando due ROI per ogni porzione.

9. Analisi dei dati

Il foglio di calcolo Excel (Microsoft 365) e il programma GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) sono stati utilizzati per organizzare ed analizzare i dati ottenuti dalle indagini di citotossicità, quantificazione del DNA e dalle quantificazioni istologiche eseguite.

I risultati dei test di citotossicità e della quantificazione del DNA sono stati espressi come valore medio, confrontando il valor medio ottenuto per i campioni decellularizzati con quello dei campioni nativi.

I dati ottenuti dalla quantificazione di immagini istologiche sono stati analizzati statisticamente per determinare se esiste una differenza significativa nella quantità misurata tra i due gruppi di campioni: campioni decellularizzati e campioni nativi. Per questo scopo, è stato utilizzato il test parametrico test-t di Student, utilizzato per confrontare campioni indipendenti, assumendo che le varianze campionarie dei due gruppi siano uguali. Tuttavia, se questa ipotesi non è verificata, è stato utilizzato un test alternativo, ovvero il test-t di Welch. Il test-t di Welch, variante del test-t di Student, tiene conto di varianze campionarie potenzialmente diverse tra i due gruppi.

È stato considerato un p-value inferiore a 0,05 come statisticamente significativo.

Risultati e Discussione

Il presente lavoro descrive un protocollo di decellularizzazione ottimizzato per il padiglione auricolare in modello animale di ratto, risultato di un processo di ricerca svolto nel corso degli anni passati presso il Laboratorio di Bioacustica dell'Università di Padova, Dipartimento di Neuroscienze. Considerando i precedenti risultati ottenuti in termini di efficacia di decellularizzazione e citocompatibilità, requisiti essenziali per i biomateriali da impianto, è stato selezionato il protocollo migliore, che nel presente studio è stato applicato a quattro padiglioni auricolari, ottimizzandolo. Quindi, sono stati valutati gli effetti del protocollo di decellularizzazione ottimale sulle componenti dell'ECM e in termini di biocompatibilità.

In questo capitolo, vengono riportati i risultati ottenuti per i campioni decellularizzati con il protocollo ritenuto ottimale. I risultati sono discussi per dimostrare che il protocollo di decellularizzazione descritto consente di ottenere un'impalcatura correttamente decellularizzata, a discapito della citocompatibilità dello scaffold ottenuto.

1. Efficacia della decellularizzazione

Ottenere una completa ed ottimale decellularizzazione del tessuto richiede la realizzazione di un'impalcatura priva di residui cellulari e nucleari, non immunogenica e non citotossica, che preservi la struttura e la composizione della matrice extracellulare. Pertanto, è essenziale valutare l'assenza di componenti cellulari e nucleari e il mantenimento delle strutture desiderate. Nei paragrafi successivi sono presentati i risultati ottenuti applicando le tecniche di decellularizzazione e di analisi descritte nel precedente capitolo.

1.1 Ispezione visiva

A seguito del processo di decellularizzazione, il campione macroscopicamente presenta la medesima complessa morfologia nativa; struttura, forma e dimensioni native sono state mantenute. Si osserva un caratteristico aspetto biancastro/traslucido, quasi trasparente (Fig. 30), che indica un processo di decellularizzazione ben riuscito in cui la maggior parte degli elementi cellulari, che normalmente conferiscono colore e opacità ai tessuti, sono stati rimossi conservando però l'ECM, naturalmente biancastra e traslucida. L'aspetto biancastro e trasparente del campione indica anche che non vi è una quantità significativa di materiale citoplasmatico o nucleare residuo.

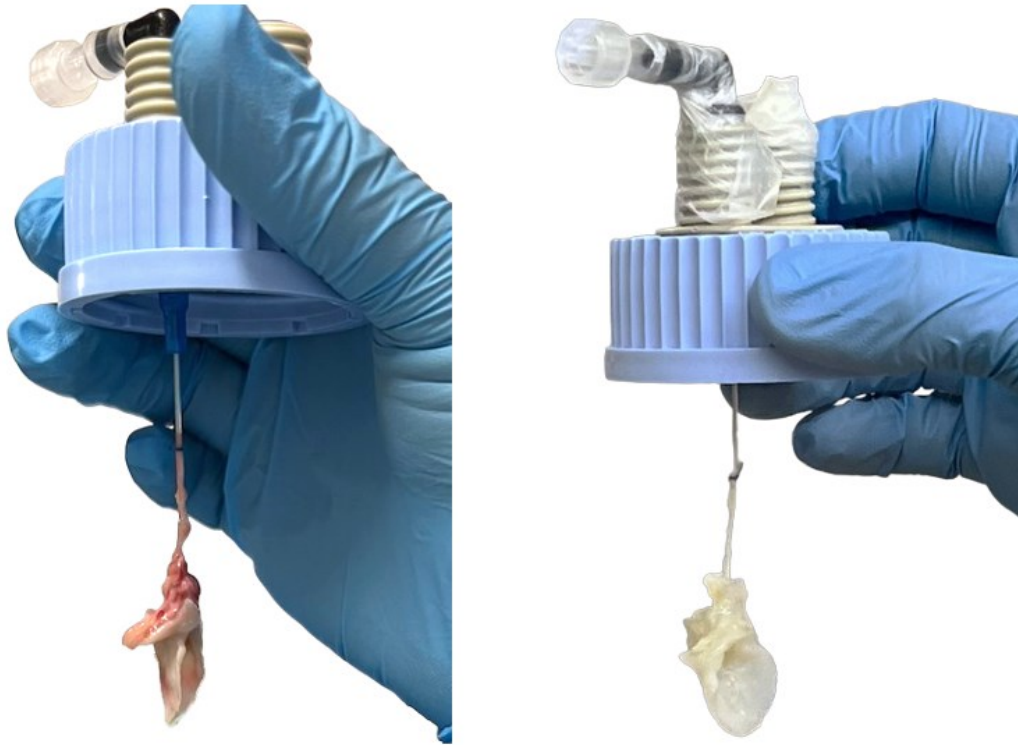


Figura 30: Padiglione auricolare nativo (a sinistra) e decellularizzato (a destra).

1.2 Analisi istologica qualitativa e quantitativa

Le immagini dei vetrini istologici sono state acquisite per le diverse porzioni (base, centro e pinna) del padiglione auricolare sia nativo che decellularizzato, fornendo un'analisi più completa su come abbiano agito i detergenti nelle diverse porzioni dell'organo.

Le analisi istologiche mostrano che nei campioni decellularizzati l'integrità della matrice extracellulare (ECM) è stata preservata e che il protocollo di decellularizzazione ha rimosso efficacemente il materiale cellulare, nucleare e in particolare il tessuto muscolare. I risultati qualitativi sono stati confermati dalle successive quantificazioni.

1.2.1 Ematossilina ed Eosina

Mediante la colorazione con Ematossilina ed Eosina si possono distinguere le componenti cellulari e tissutali nel padiglione auricolare nativo e decellularizzato. I nuclei sono colorati dall'ematossilina di viola scuro, mentre la matrice extracellulare (ECM) e le proteine citoplasmatiche assumono varie tonalità di rosa grazie all'eosina.

A seguito del processo di decellularizzazione, ci si aspetta di osservare nei campioni decellularizzati l'assenza di nuclei e di componenti cellulari, la conservazione dell'ECM e della struttura generale del tessuto. Potrebbero essere presenti aree vuote (spazi non colorati o meno colorati) precedentemente occupati da cellule, ghiandole o vasi sanguigni. Tali caratteristiche sono tutte riscontrabili nel confronto riportato in figura (Fig. 31) tra campione nativo e campioni decellularizzati (R1, R2, R3, R4).

In particolare, nel padiglione auricolare nativo, i nuclei appaiono come numerosi puntini ben visibili in viola scuro, totalmente assenti in tutte le sezioni dei campioni decellularizzati.

Nel campione nativo è ben evidente anche l'epitelio pavimentoso composto cheratinizzato, con i nuclei delle cellule in viola. Questo epitelio è assente nei campioni decellularizzati, che mostrano invece una colorazione rosa meno intensa rispetto ai campioni nativi.

Sotto lo strato epiteliale si distingue il derma, uno strato più spesso di tessuto connettivo, composto da collagene, elastina e altre fibre, con nuclei cellulari visibili in viola scuro. Nel derma si distinguono diverse strutture, come follicoli piliferi, ghiandole e vasi sanguigni, strutture assenti nei campioni decellularizzati nei quali sono visibili solo aree vuote (spazi bianchi). Tuttavia, il derma è ancora individuabile ma con una colorazione rosa più attenuata. Da queste prime osservazioni si può dedurre che il processo di decellularizzazione è stato efficace nel rimuovere componenti cellulari e strutture cellulari più profonde e complesse, preservando l'integrità della struttura del tessuto connettivo e del derma.

È possibile distinguere anche il tessuto adiposo, non colorato, e i fasci di tessuto muscolare in rosso intenso, ben rappresentati nella base del campione nativo. Diversamente, nei campioni decellularizzati i fasci muscolari appaiono molto frammentati, in alcune porzioni totalmente assenti.

Al centro di ogni sezione, si osserva il canale centrale di cartilagine elastica caratterizzato da lacune contenenti condrociti (visibili con ingrandimenti maggiori), circondato da pericondrio. Tale struttura è preservata nei campioni decellularizzati, nei quali sono presenti lacune vuote.

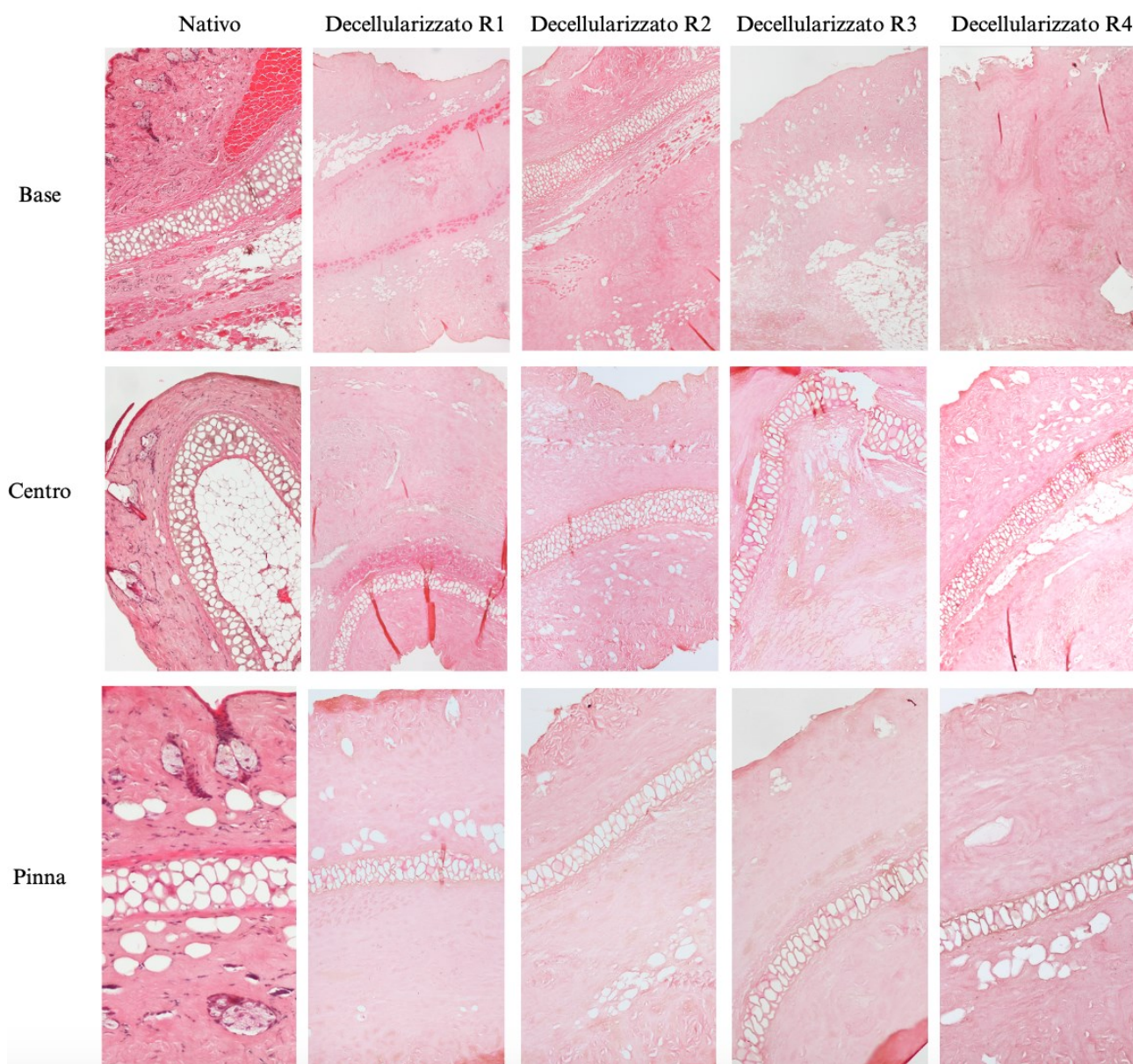


Figura 31: Colorazione Ematossilina ed Eosina. Sulle righe, dall'alto verso il basso, sezioni di base, centro, pinna. Sulle colonne, a sinistra il padiglione nativo, a destra i padiglioni decellularizzati.

Da questo confronto qualitativo si può sostenere che il processo di decellularizzazione ha ridotto o eliminato i tessuti presenti nel campione nativo, inclusa la componente muscolare, preservando l'integrità complessiva della matrice extracellulare. La rimozione del materiale cellulare osservata nell'epitelio, nel derma e nella cartilagine, indica l'efficacia del protocollo di decellularizzazione adottato. Inoltre, l'assenza di nuclei è stata confermata anche con la colorazione DAPI, soddisfacendo uno dei criteri fondamentali stabiliti per definire una decellularizzazione efficace: l'assenza di materiale nucleare nelle sezioni di tessuto, verificabile con colorazioni DAPI o Ematossilina ed Eosina. Tale verifica è fondamentale poiché la presenza di materiale genetico residuo può causare reazioni avverse nell'ospite (Crapo et al., 2011).

1.2.2 DAPI

Con la colorazione DAPI (Fig. 32), i nuclei delle cellule sono resi visibili attraverso una fluorescenza blu, grazie all'affinità del colorante per specifiche regioni del DNA. Nei padiglioni nativi, i nuclei sono chiaramente visibili e numerosi lungo tutto lo spessore della sezione e in tutte le porzioni (base, centro, pinna). Nei campioni decellularizzati, i nuclei sono totalmente assenti. In alcune porzioni, principalmente di base e centro (campione R4), si possono osservare componenti colorate di blu fluorescente. Queste rappresentano residui di materiale cellulare e non nuclei, aventi forma diversa. Questi dati confermano i risultati ottenuti con la colorazione Ematossilina ed Eosina, dimostrando l'efficacia dei protocolli di decellularizzazione utilizzati.

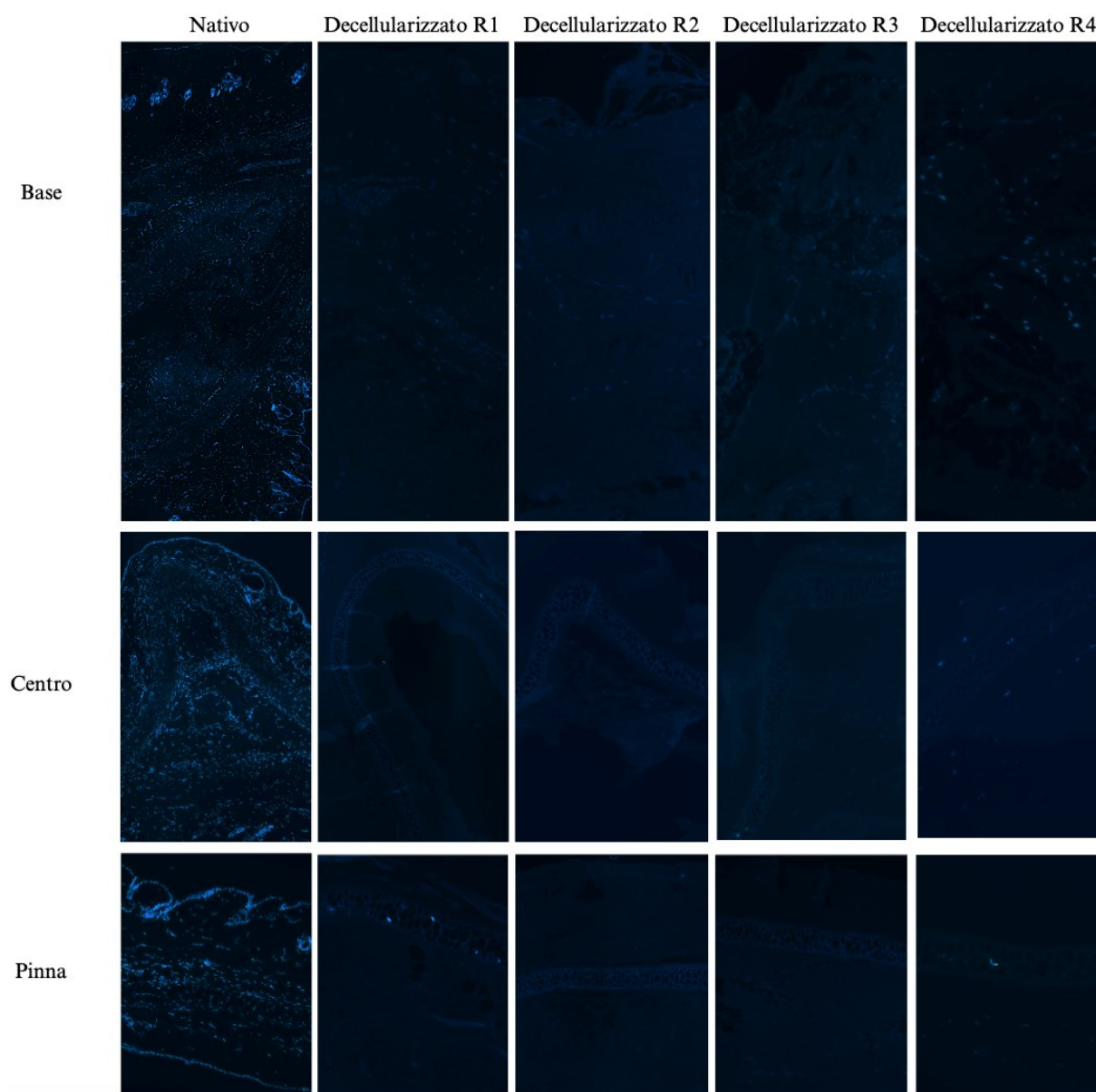


Figura 32: Colorazione DAPI. Sulle righe, dall'alto verso il basso, sezioni di base, centro, pinna. Sulle colonne, a sinistra il padiglione nativo, a destra i quattro padiglioni decellularizzati.

1.2.3 Tricromica di Masson

Con la colorazione tricromica di Masson si evidenziano in blu intenso le fibre collagene e in rosso acceso il tessuto connettivo e muscolare. Nella base del padiglione, il tessuto muscolare assume principalmente una forma concentrica dovuta al taglio trasversale del campione. Tuttavia, presenta anche una forma allungata, in linea con la direzione preferenziale del muscolo (disposizione maggiormente evidente nelle porzioni di centro e pinna). Tali componenti muscolari nei campioni decellularizzati dovrebbero essere totalmente rimosse nelle varie regioni per garantire l'efficacia del protocollo utilizzato, eliminando qualsiasi rischio di reazione immune in caso di impianto *in vivo*.

In figura (Fig. 33) si osserva qualitativamente una sostanziale diminuzione del tessuto muscolare nei campioni decellularizzati rispetto al campione nativo.

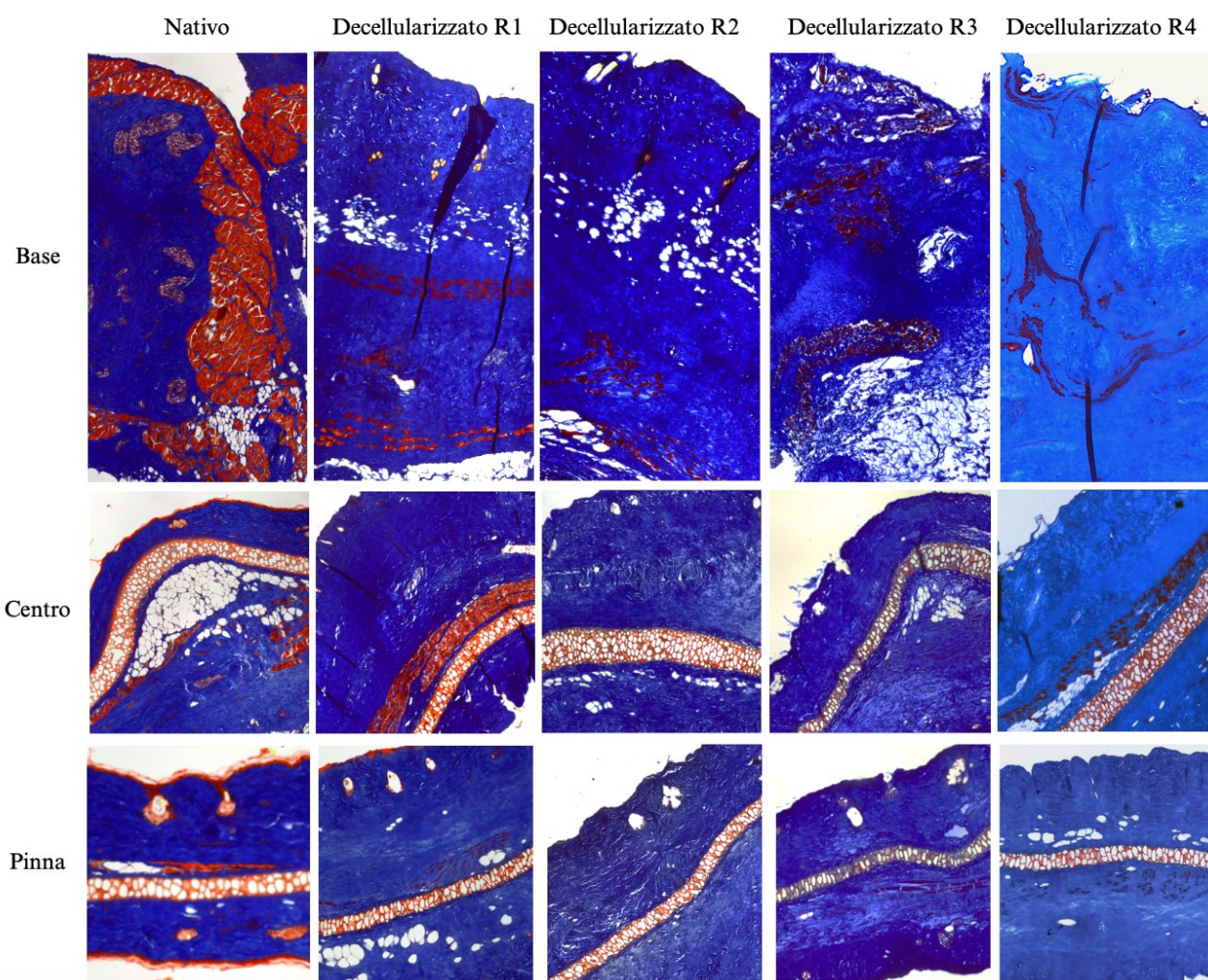


Figura 33: Colorazione Tricromica di Masson. Sulle righe, dall'alto verso il basso, sezioni di base, centro, pinna. Sulle colonne, a sinistra il padiglione nativo, a destra i quattro padiglioni decellularizzati.

In particolare, nella base dei padiglioni decellularizzati, i fasci muscolari sono discontinui e frammentati; sono del tutto assenti grandi porzioni concentriche di tessuto muscolare, mentre risultano maggiormente presenti spazi vuoti (spazi in bianco). Questo indica una corretta rimozione del tessuto muscolare, confermata dalla successiva quantificazione.

Nelle porzioni del centro, i fasci muscolari sono del tutto assenti nei campioni decellularizzati R2 e R3, frammentati e discontinui nel campione R4. L'unica eccezione è rappresentata dal campione R1 in cui appare evidente la presenza di tessuto muscolare in prossimità del canale centrale, indicando una non corretta penetrazione degli agenti chimici utilizzati in questa specifica zona.

Risultati migliori si osservano nella pinna: per tutti i campioni il tessuto muscolare è quasi del tutto assente o ridotto a piccole porzioni frammentate.

Infine, risultano evidenti in blu le fibre collagene in tutte le sezioni sia nel campione nativo, sia nei campioni decellularizzati, nei quali sembrano essere non alterate.

Da una prima analisi qualitativa si osserva in generale un corretto mantenimento delle fibre di collagene e una buona rimozione del tessuto muscolare, risultati confermati dell'analisi quantitativa seguente.

Quantificazione tricromica di Masson

Per valutare quanto tessuto muscolare è stato rimosso durante il processo di decellularizzazione, è stato utilizzato il protocollo di quantificazione descritto nel capitolo precedente. Dopo aver isolato le componenti muscolari presenti nel campione, l'area ricavata è stata rapportata al tessuto totale presente nell'immagine. Tale rapporto consente di quantificare precisamente la proporzione di tessuto muscolare rispetto al tessuto totale, fondamentale per capire quanto muscolo è presente in relazione alle altre componenti tissutali.

Dal confronto statistico tra campioni nativi e decellularizzati è stato possibile valutare se la differenza tra la quantità media di tessuto muscolare presente nel nativo e nel decellularizzato è statisticamente significativa o meno. Questo significa che, attraverso le analisi statistiche, si è determinato se la riduzione del tessuto muscolare osservata nei campioni decellularizzati è un reale effetto del protocollo di decellularizzazione applicato e quindi se la decellularizzazione ha effettivamente ridotto la quantità di tessuto muscolare in modo significativo rispetto ai campioni nativi.

Sono stati ottenuti i seguenti risultati:

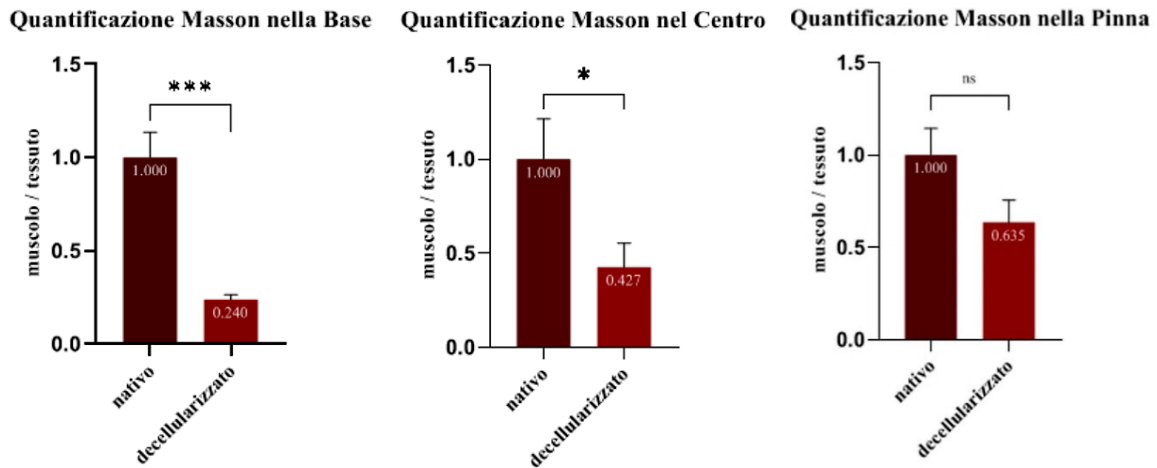


Figura 34: Quantificazione del tessuto muscolare presente nelle porzioni di base, centro e pinna nei campioni nativi e decellularizzati mediante la colorazione Tricromica di Masson.

I dati sono espressi come media \pm errore standard della media (SEM). Si è considerato un p-value minore di 0,05 come significativo. *** differenze molto significative ($p < 0,001$); * differenze significative ($p < 0,05$); ns non ci sono differenze significative ($p > 0,05$).

In tutte le porzioni esaminate, confrontando i risultati con il 100% (quantità di muscolo massima presente nei campioni nativi), si osserva sempre una riduzione del tessuto muscolare nei campioni decellularizzati.

La differenza altamente significativa nella base tra i due gruppi indica la quasi completa eliminazione del tessuto muscolare, risultato confermato anche dalle analisi qualitative.

Nel centro, si riscontrano differenze moderatamente significative, mentre nella pinna le differenze non sono significative (Fig. 34). Quest'ultimo risultato, discostante dai precedenti, potrebbe essere legato all'accuratezza della procedura di segmentazione del tessuto muscolare; una segmentazione imprecisa può portare a sovrastime o sottostime della quantità di tessuto muscolare. Inoltre, la quantità di tessuto muscolare può variare tra i campioni di padiglione auricolare, a causa di fattori individuali del campione stesso.

Dal confronto tra le quantità di tessuto muscolare presente nei campioni nativi e decellularizzati, si osserva che in tutte le porzioni esaminate si verifica sempre una riduzione del tessuto muscolare nei campioni decellularizzati rispetto al 100% presente nei campioni nativi. Questa riduzione in tutte le porzioni suggerisce che il processo di decellularizzazione agisce su tutto il tessuto, sebbene l'entità della riduzione possa variare tra le diverse porzioni.

I risultati evidenziano che l'efficacia del protocollo di decellularizzazione è maggiore nelle aree periferiche (base) rispetto a quelle centrali e terminali (pinna).

Osservando il grafico complessivo in figura (Fig. 35), si può affermare che il campione decellularizzato presenta nella sua totalità una buona riduzione delle componenti muscolari rispetto al campione nativo. La percentuale di tessuto muscolare residuo è pari al 43%, un risultato soddisfacente rispetto ai precedenti protocolli, nei quali la differenza tra la media del tessuto muscolare nativo e decellularizzato non risultava significativa, dimostrando la necessità di ottimizzare il protocollo per ottenere una maggiore rimozione della componente muscolare, obiettivo raggiunto con il presente studio. Tuttavia, la non totale assenza di tessuto muscolare potrebbe scatenare una risposta immunitaria nell'organismo ospite e influenzare negativamente la rigenerazione tissutale, motivi per cui si richiedono ulteriori miglioramenti nel protocollo di decellularizzazione.

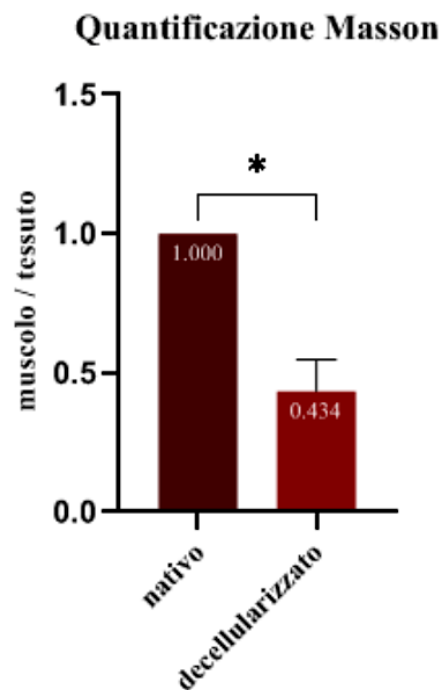


Figura 35: Quantificazione del tessuto muscolare totale nei campioni nativi e decellularizzati mediante la colorazione Tricromica di Masson. I dati sono espressi come media \pm errore standard della media (SEM). Si è considerato un p-value minore di 0,05 come significativo; * differenze significative ($p < 0.05$).

1.2.4 Alcian Blu

L'Alcian blu è una colorazione istochimica che si lega ai mucopolisaccaridi presenti nella matrice extracellulare. In particolare, evidenzia i glicosamminoglicani (GAGs) in blu, conferendo alla sezione un aspetto azzurro più o meno intenso a seconda della quantità di GAGs presenti, permettendo di visualizzare la loro distribuzione nel tessuto (Fig. 36). I GAGs sono componenti essenziali della matrice extracellulare che devono essere preservati dopo il processo di decellularizzazione per mantenere l'integrità del tessuto e le sue proprietà biomeccaniche, come l'elasticità e la rigidità.

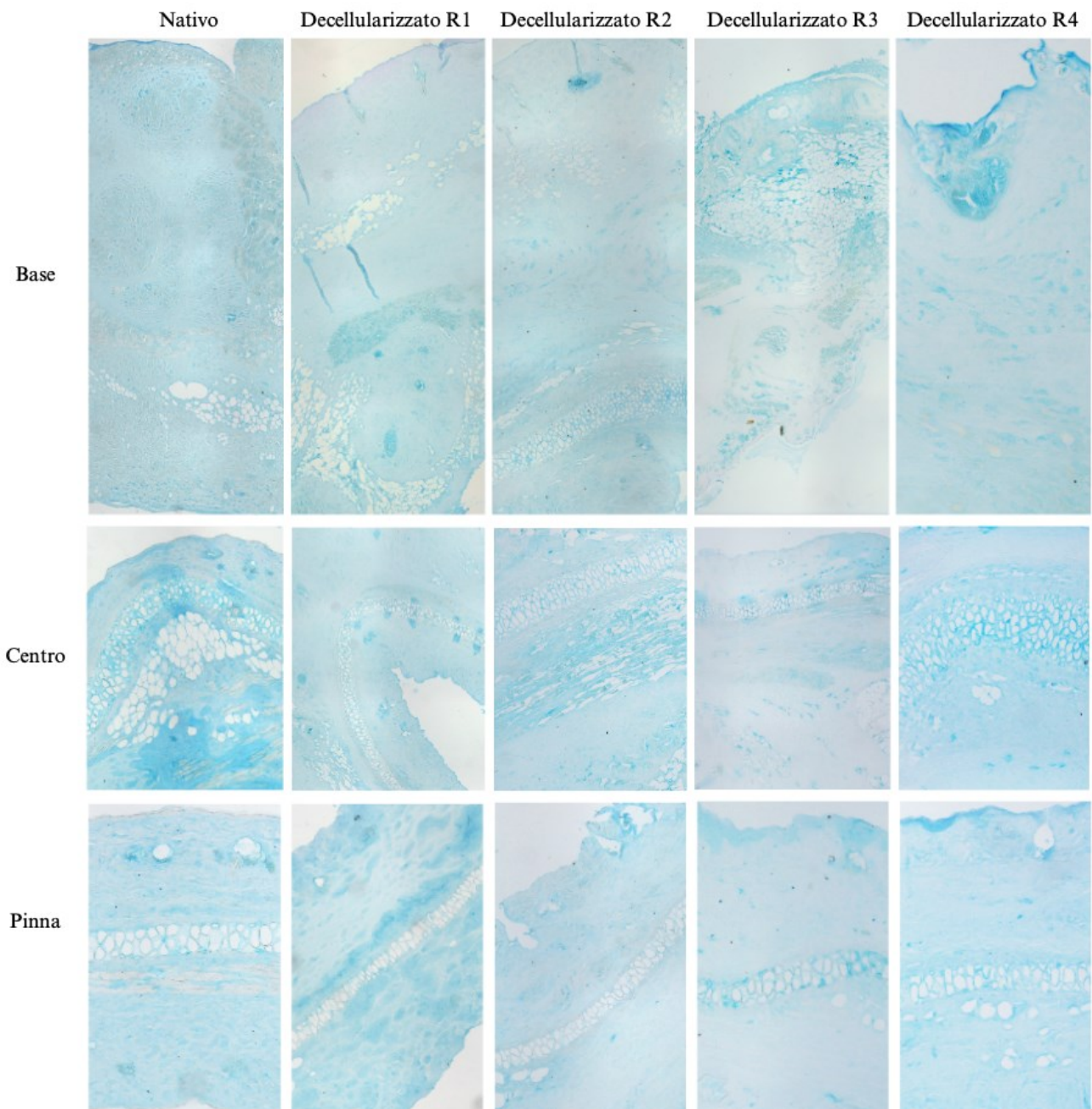


Figura 36: Colorazione Alcian Blu. Sulle righe, dall'alto verso il basso, sezioni di base, centro, pinna. Sulle colonne, a sinistra il padiglione nativo, a destra i quattro padiglioni decellularizzati.

I risultati di questa colorazione (Fig. 36) mostrano un elevato contenuto di GAGs nei padiglioni auricolari nativi, come evidenziato dall'intensità della colorazione in ogni porzione del campione. Nei campioni decellularizzati, l'intensità della colorazione resta invariata, suggerendo un contenuto di GAGs nella matrice analogo a quello riscontrato nel campione nativo. Le proprietà viscoelastiche dello scaffold decellularizzato sono state quindi preservate grazie alla conservazione dei GAGs nei padiglioni decellularizzati. Tali affermazioni sono confermate dalla successiva quantificazione.

Quantificazione Alcian Blu

Sulla base delle procedure descritte nel capitolo precedente, è stata quantificata l'intensità luminosa media della colorazione per quantificare il contenuto di GAGs nei campioni nativi e decellularizzati, confrontati tra loro mediante test statistici.

Sulla base della relazione di proporzionalità inversa tra l'intensità di colorazione e quantità di GAGs presenti nel campione, è stato valutato se l'aumento dell'intensità luminosa media, e quindi un minore contenuto di GAGs nei campioni decellularizzati possa essere staticamente significativo, ottenendo i seguenti risultati:

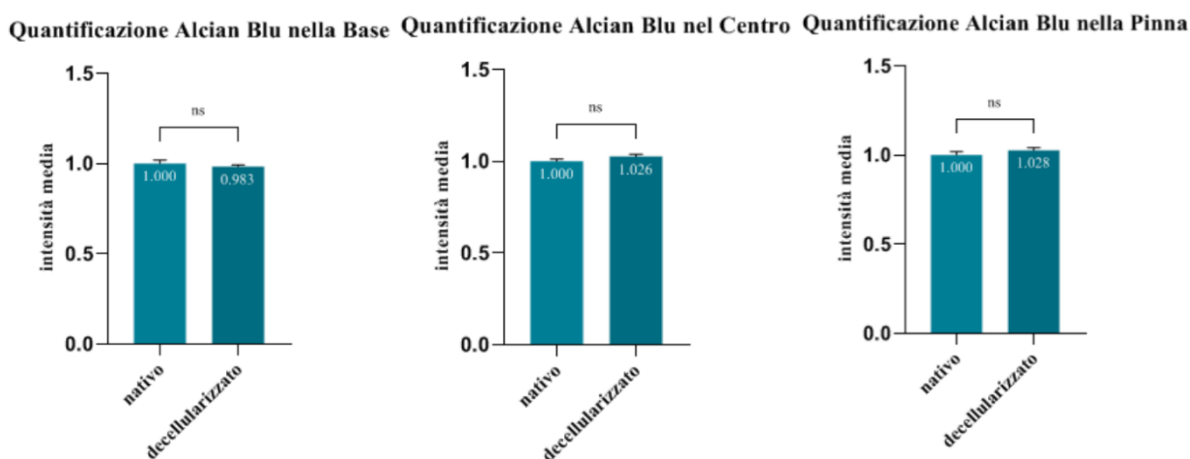


Figura 37: Quantificazione dell'intensità media luminosa della colorazione Alcian Blu presente nelle porzioni di base, centro e pinna nei campioni nativi e decellularizzati.

I dati sono espressi come media \pm errore standard della media (SEM). Si è considerato un p-value minore di 0,05 come significativo; ns non ci sono differenze significative ($p > 0.05$).

L'analisi in tutte le porzioni del campione decellularizzato (base, centro e pinna) ha mostrato che la differenza di intensità luminosa media rispetto a quella media nei campioni nativi non è significativa. Questo suggerisce che non esiste una differenza rilevante tra campioni nativi e decellularizzati in termini di intensità luminosa media.

Di conseguenza, il contenuto di GAGs (glicosamminoglicani) nei campioni decellularizzati può essere considerato simile a quello dei campioni nativi. Nella pinna e nel centro, il valore di intensità luminosa media è maggiore nei campioni decellularizzati rispetto ai campioni nativi (Fig. 37). Il contenuto di GAGs in queste porzioni è quindi minore nei padiglioni auricolari decellularizzati (con una differenza statisticamente non significativa), risultato atteso poiché, in seguito ai processi di decellularizzazione, può verificarsi una leggera perdita di GAGs a causa degli agenti chimici utilizzati per rimuovere componenti indesiderate dallo scaffold. Diversamente, nella base dei campioni decellularizzati, il valore di intensità luminosa media risulta inferiore rispetto ai campioni nativi (Fig. 37). Questo indica una maggiore presenza di GAGs nel campione decellularizzato, apparente contraddizione giustificata dalla possibilità che si realizzi un addensamento del tessuto, un restringimento, in seguito alle procedure di decellularizzazione applicate. Anche in questa porzione la differenza misurata tra campioni nativi e decellularizzati risulta non significativa.

Si può quindi concludere che la quantità di GAGs è stata preservata complessivamente nei campioni decellularizzati (Fig. 38). I GAGs sono presenti nei campioni decellularizzati in qualità leggermente inferiori rispetto ai nativi, ma con una differenza non statisticamente significativa tra le intensità medie dei due gruppi confrontati. Il processo di decellularizzazione applicato non ha compromesso la presenza di GAGs nel tessuto. Sono stati mantenuti correttamente, preservando le proprietà desiderate della matrice extracellulare e la sua integrità.

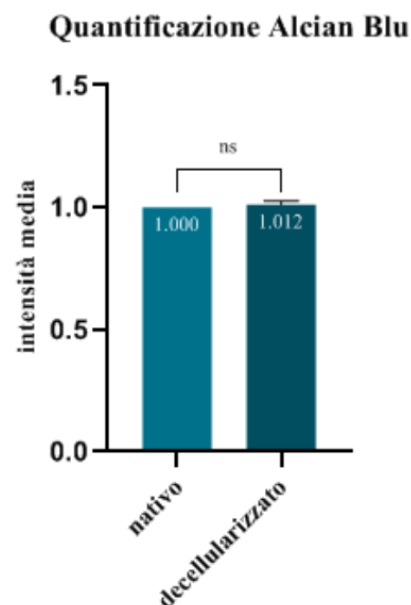


Figura 38: Quantificazione dell'intensità media luminosa totale nei campioni nativi e decellularizzati della colorazione Alcian Blu. I dati sono espressi come media \pm errore standard della media (SEM).

Si è considerato un p-value minore di 0,05 come significativo; ns non ci sono differenze significative ($p > 0.05$).

1.2.5 Weigert

In questa colorazione sono evidenziate in nero/viola scuro le fibre elastiche. Preservare tali fibre durante la decellularizzazione è importante per garantire la funzionalità del scaffold decellularizzato e l'integrità strutturale. Forniscono supporto strutturale, elasticità e resistenza. Come si può osservare in figura (Fig. 39), il padiglione auricolare nativo mostra nelle diverse sezioni strutture ramificate di colore viola scuro (le fibre elastiche), disperse lungo tutta la lunghezza l'immagine, meglio visibili in particolare nelle porzioni di centro e pinna. Altre componenti della matrice extracellulare assumono diverse tonalità di rosa/viola.

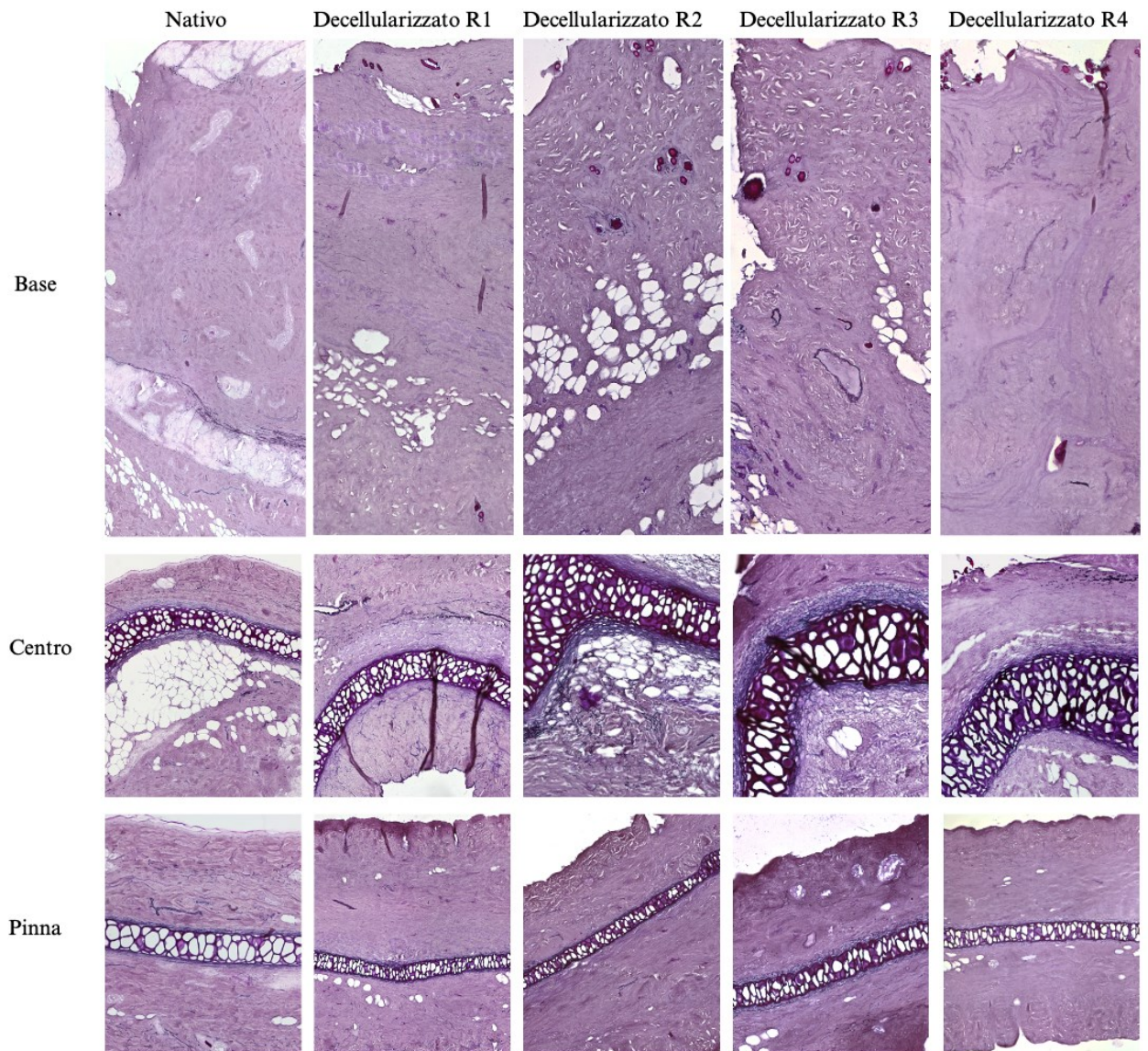


Figura 39: Colorazione Weigert. Sulle righe, dall'alto verso il basso, sezioni di base, centro, pinna.

Sulle colonne, a sinistra il padiglione nativo, a destra i quattro padiglioni decellularizzati.

Il pattern della colorazione è il medesimo nei padiglioni auricolari decellularizzati (Fig. 39), nei quali si può notare che non c'è scomparsa di fibre: risultano leggermente meno concentrate e più frammentate nella porzione della base; nel centro appaiono numerose e ben evidenti, così come nella pinna. Qui appaiono meno presenti in alcuni campioni a causa della colorazione intensa delle altre componenti dell'ECM presenti.

È possibile affermare che la quantità di fibre elastiche è conservata rispetto al campione nativo, risultato confermato nel paragrafo successivo.

Quantificazione Weigert

Dopo aver isolato e quantificato le fibre elastiche presenti nei campioni nativi e decellularizzati secondo il protocollo descritto nel capitolo precedente, mediante l'analisi statistica è stato stabilito se la diversa quantità misurata nei campioni decellularizzati rispetto ai nativi è statisticamente significativa. Sono stati ottenuti i seguenti risultati:

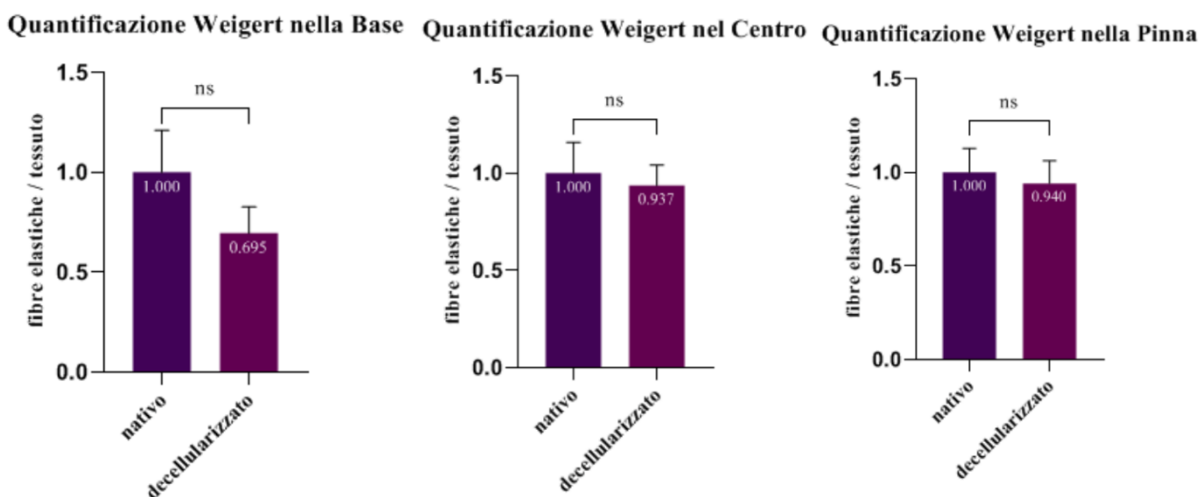


Figura 40: Quantificazione delle fibre elastiche presenti nella base, centro e pinna nei campioni nativi e decellularizzati mediante colorazione Weigert. I dati sono espressi come media \pm errore standard della media (SEM). Si è considerato un p-value minore di 0,05 come significativo; ns non ci sono differenze significative ($p > 0.05$).

Si conferma che anche dal punto di vista statistico la variazione di fibre elastiche non è significativa nelle diverse porzioni (base, centro e pinna). Il contenuto è stato quindi preservato, con un gradiente di efficacia: maggiore conservazione delle fibre elastiche nella pinna rispetto al centro e alla base (Fig. 40).

Questo conferma il gradiente di efficacia evidenziato con la colorazione tricromica di Masson: gli agenti chimici utilizzati hanno agito in maniera più aggressiva nella base, riducendo sia il tessuto muscolare presente ma anche le fibre elastiche; diversamente, si osserva nelle porzioni centrali e terminali (pinna) un'azione meno intensa, che porta ad una riduzione minore sia del tessuto muscolare che delle fibre elastiche, maggiormente preservate. Diversi fattori contribuiscono a un'azione più aggressiva nella base e meno intensa nelle porzioni centrali e terminali. La base del padiglione auricolare essendo più vicina al punto di ingresso degli agenti chimici utilizzati, consente una maggiore concentrazione e penetrazione degli stessi. Questo rende l'azione più intensa nella base rispetto alle porzioni più distali. Inoltre, essendo la base la porzione iniziale del percorso, riceve una quantità maggiore di agenti e ha un tempo di esposizione più lungo rispetto alle porzioni centrali e terminali. Questi fattori comportano una distribuzione degli agenti chimici più diluita e meno efficace nel centro e nella pinna del padiglione auricolare.

Complessivamente le fibre sono state preservate all'85% nei campioni decellularizzati rispetto ai nativi (100%), con una differenza statisticamente non significativa (Fig. 41). Questo conferma l'efficacia del protocollo utilizzato nel preservare questi componenti fondamentali per la funzionalità e struttura dello scaffold.

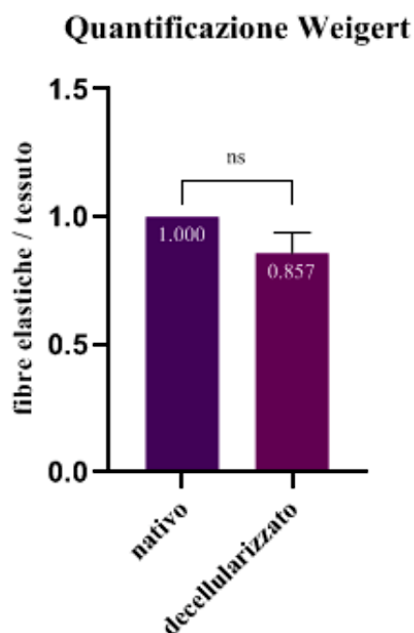


Figura 41: Quantificazione delle fibre elastiche presenti complessivamente nei campioni nativi e decellularizzati mediante colorazione Weigert. I dati sono espressi come media \pm errore standard della media (SEM). Si è considerato un p-value minore di 0,05 come significativo; ns non ci sono differenze significative ($p > 0.05$).

1.3 Contenuto di DNA

La quantificazione del DNA residuo nei campioni decellularizzati è fondamentale per determinare l'efficacia del processo di decellularizzazione. La presenza di DNA residuo può causare una risposta immunitaria avversa a seguito dell'impianto *in vivo*. Pertanto, è essenziale verificare che la quantità di DNA sia ridotta al minimo per evitare potenziali reazioni avverse dell'organismo ricevente, confermando l'efficacia e la riproducibilità del protocollo applicato. Dopo aver elaborato i dati ottenuti dallo spettrofotometro (capitolo precedente, paragrafo 6.2) si ottiene il grafico in figura (Fig. 42), in cui si osserva che la quantità media di DNA residuo nella matrice decellularizzata è notevolmente inferiore rispetto a quella media misurata nei campioni nativi. Il protocollo di decellularizzazione applicato ai padiglioni ha dimostrato che residui di DNA sono ancora presenti all'interno della matrice dopo i trattamenti ma le quantità sono inferiori a 50 ng/mg di tessuto secco, soglia stabilita per poter considerare un tessuto decellularizzato correttamente, in grado di ridurre possibili risposte immunitarie in caso di impianto *in vivo* (Crapo et al., 2011).

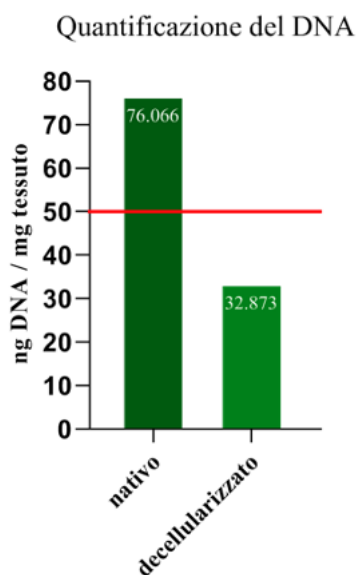


Figura 42: Quantificazione del DNA residuo nei campioni nativi e decellularizzati. Il contenuto di DNA è rappresentato come valore medio. La linea rossa rappresenta la soglia massima di DNA che può essere presente per considerare il tessuto correttamente decellularizzato.

In particolare, nei campioni nativi si ottiene una concentrazione di DNA di 76,066 ng/mg di tessuto secco. Dopo la decellularizzazione, le quantità di DNA nello scaffold (valore medio di 32,873 ng/mg di tessuto secco) risultano al di sotto del valore di soglia di 50 ng/mg di tessuto secco. Questo indica che il protocollo di decellularizzazione può essere considerato in grado di sopprimere il potenziale immunogenico a seguito di un impianto *in vivo*.

2. Citocompatibilità *in vitro*

Per valutare la compatibilità del padiglione auricolare decellularizzato con le cellule sono stati eseguiti test di contatto diretto e indiretto (capitolo precedente, paragrafo 5), con l'obiettivo di indicare la capacità dello scaffold ottenuto di supportare la vitalità delle cellule in coltura. Questi risultati prevedono il comportamento del tessuto una volta impiantato *in vivo*, riducendo il rischio di reazioni avverse e assicurando che il tessuto impiantato possa integrarsi correttamente e supportare le cellule dell'ospite.

I valori di assorbanza ottenuti mediante il saggio di vitalità cellulare MTS+PMS, rappresentativi della vitalità cellulare, sono riportati (in percentuale media) nel seguente grafico:

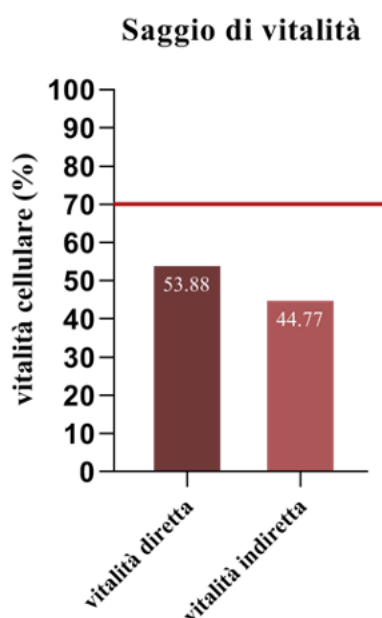


Figura 43: Risultati della vitalità cellulare diretta e indiretta espressi in percentuale.

La linea rossa rappresenta la soglia minima affinché un biomateriale possa essere considerato non citotossico; il “non trattato” ha vitalità pari al 100%, rappresentato dalla linea tratteggiata.

I risultati illustrati nel grafico (Fig. 43) evidenziano una bassa vitalità cellulare nei padiglioni auricolari decellularizzati, sia in termini di vitalità diretta (53,88%) che indiretta (44,77%). Entrambi i valori sono significativamente inferiori alla soglia di riferimento del 70%, suggerendo che la decellularizzazione abbia avuto un impatto negativo sulla biocompatibilità del tessuto. Un biomateriale è considerato non citotossico se il numero di cellule vive raggiunge almeno il 70% rispetto al controllo non trattato (Hussein et al., 2016).

Il valore di vitalità diretta del 53,88% indica che circa la metà delle cellule poste a contatto diretto con i padiglioni auricolari decellularizzati è sopravvissuta all'impianto. Tuttavia, questo valore è ancora troppo basso per garantire una rigenerazione tissutale efficace.

La vitalità indiretta del 44,77% è un dato ancora più critico, in quanto indica che la capacità del tessuto decellularizzato di supportare la crescita e la proliferazione cellulare è particolarmente compromessa.

Sono diversi i fattori che possono aver contribuito alla bassa vitalità cellulare osservata, tra cui possibili danni strutturali e funzionali della matrice extracellulare in seguito al processo di decellularizzazione, che rendono l'ECM meno favorevole alla proliferazione e sopravvivenza cellulare; presenza di residui citotossici legati ai detergenti utilizzati, dannosi per le cellule impiantate; mancanza di fattori di crescita o altri segnali cellulari essenziali per la sopravvivenza e la proliferazione cellulare.

I risultati attuali evidenziano una citocompatibilità insufficiente dei padiglioni auricolari decellularizzati, suggerendo la necessità di ulteriori ottimizzazioni del protocollo di decellularizzazione e possibili trattamenti aggiuntivi per migliorare la biocompatibilità.

Conclusioni

Le attuali tecniche di chirurgia ricostruttiva del padiglione auricolare presentano risultati estetici e funzionali insoddisfacenti. La disciplina dell'ingegneria tissutale, area di ricerca in rapido avanzamento, è una soluzione promettente per la ricostruzione di organi o tessuti danneggiati del corpo umano. Mediante la realizzazione di strutture di supporto (scaffold) ottenute a partire dall'organo nativo e costituite da matrice extracellulare (ECM) decellularizzata, è possibile guidare la rigenerazione dell'organo/tessuto, attraverso la coltivazione di cellule autologhe sullo scaffold ottenuto. Con questo innovativo approccio si superano gli attuali limiti della chirurgia ricostruttiva, riducendo il rischio di possibili reazioni immunitarie o infiammatorie avverse che possono svilupparsi in seguito ad un impianto *in vivo*. La decellularizzazione dei tessuti consente di ottenere un'impalcatura di ECM biocompatibile e biomimetica, con la medesima microarchitettura dell'organo ma priva di materiale cellulare e nucleare; questo garantisce una corretta rigenerazione e funzionalità tissutale.

Nel presente lavoro, l'ottimizzazione del protocollo di decellularizzazione applicato ai padiglioni auricolari in modello animale di ratto (*Rattus norvegicus*), ha dimostrato la possibilità di ottenere scaffold di ECM correttamente decellularizzati, non immunogenici e con una risposta immunitaria significativamente ridotta in caso di impianto *in vivo*, avendo ottenuto una quantità di DNA residua al di sotto dei parametri di soglia stabiliti. Inoltre, sono assenti residui cellulari e nucleari, la presenza di tessuto muscolare è notevolmente ridotta, il contenuto di GAGs e fibre elastiche risulta correttamente preservato.

Tuttavia, la presenza di residui chimici citotossici ha determinato una percentuale di vitalità cellulare inferiore alla soglia minima stabilita, evidenziando un aspetto futuro da migliorare per poter ottenere una scaffold biocompatibile, nel quale le cellule seminate dovrebbero essere in grado di aderire, proliferare e differenziarsi. Sarà quindi necessario migliorare i livelli di biocompatibilità effettuando un'analisi dei residui dei detergenti utilizzati durante il processo di decellularizzazione e prolungando i tempi di lavaggio previsti al termine dell'azione di ciascun detergente, senza però danneggiare l'ECM, correttamente preservata con il protocollo applicato nel presente studio.

In futuro il lavoro di ricerca proseguirà con test meccanici e analisi dettagliate sulla distribuzione e orientamento delle fibre di collagene all'interno dello scaffold decellularizzato, informazioni essenziali per comprendere come la struttura dell'ECM influenza le proprietà meccaniche e bioattive dello scaffold.

Per aumentare i livelli di biocompatibilità e poter generare costrutti ingegnerizzati adatti alle applicazioni nella ricostruzione del padiglione auricolare *in vivo*, si dovrà ottimizzare e verificare la riduzione dei detergenti residui nel campione decellularizzato e prove microbiologiche di sterilizzazione. In seguito, sarà possibile ri-popolare lo scaffold ottimizzato con cellule staminali autologhe o con cellule mesenchimali staminali umane derivanti da tessuto adiposo.

Se gli studi sul modello preclinico animale si concluderanno con i risultati positivi previsti, il progetto sarà applicabile anche ai tessuti autoptici di origine umana, determinando un immediato impatto traslazionale alla ricerca.

Riferimenti Bibliografici

Al-Qurayshi Z., Wafa E., Rossi Meyer M.K., Owen S., Salemand A.K., (2021), Tissue Engineering the Pinna: Comparison and Characterization of Human Decellularized Auricular Biological Scaffolds, ACS Applied Bio Materials, 4(9), 7234-7242, DOI: 10.1021/acsabm.1c00766.

Ambrosetti U., Di Bernardino F., Del Bo L., (2018), Audiologia protesica: II edizione, Minerva Medica.

Badylak S.F., (2004), Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction, Transplant Immunology, Volume 12, Issues 3–4, 367-377, ISSN 0966-3274, <https://doi.org/10.1016/j.trim.2003.12.016>.

Badylak S.F., Taylor D., Uygun K., (2011), Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds, Annual review of biomedical engineering, 13, 27–53, <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071910-124743>.

Beauvillain de Montreuil C., Jourdain A., (2012), Tumori maligni dell'orecchio, EMC - Otorinolaringoiatria, Volume 11.4: 1-18.

Bologna M., Munzi P., Rocchi A., (2020), Tecniche di immunoistochimica. Un manuale operativo essenziale, Aracne, ISBN 8825538367, 9788825538366.

Boukamp P., Petrussevska R.T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., Fusenig N.E., (1988), Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line, J Cell Biol., 106(3):761-71, DOI: 10.1083/jcb.106.3.761, PMID: 2450098, PMCID: PMC2115116.

Cory A.H., Owen T.C., Barltrop J.A., Cory J.G., (1991), Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture, Cancer Commun, 3(7):207-12, DOI: 10.3727/095535491820873191.

Crapo P.M., Gilbert T.W., Badylak S.F., (2011), An overview of tissue and whole organ decellularization processes, *Biomaterials*, 32(12):3233-43, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.

Di Bello C., Bagno A., (2016), *Biomateriali. Dalla scienza dei biomateriali alle applicazioni cliniche* (II ed.), Pàtron Editore.

Drake R.L., Vogl A.W., Mitchell A.W.M., (2023), *Anatomia del Gray. I fondamenti: Terza Edizione*, Milano, Edra, 9788821437526.

Gilbert T.W., Sellaro T.L., Badylak S.F., (2006), Decellularization of tissues and organs, *Biomaterials*, 27(19), 3675–3683, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.02.014>.

Hussein K.H., Park K.M., Kang K.S., Woo H.M., (2016), Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*, 67:766-778, DOI: 10.1016/j.msec.2016.05.068.

Kelley P.E., Scholes M.A., (2007), Microtia and congenital aural atresia, *Otolaryngol Clin North Am*, 40(1):61-80, DOI: 10.1016/j.otc.2006.10.003, PMID: 17346561.

Liaw J., Patel V.A., Carr M.M., (2017), Congenital anomalies of the external ear, *Operative Techniques in Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 28(2), 72-76, <https://doi.org/10.1016/j.otot.2017.03.012>.

Luquetti D.V., Heike C.L., Hing A.V., Cunningham M.L., Cox T.C., (2012), Microtia: Epidemiology and genetics, *Am. J. Med. Genet.*, 158A: 124-139, <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.34352>.

Niekrash C.E., (2021), Anatomy of the External Ear. In: Ferneini E.M., Goupil M.T., McNulty M.A., Niekrash C.E., (2021), *Applied Head and Neck Anatomy for the Facial Cosmetic Surgeon*, Springer, Cham, https://doi.org/10.1007/978-3-030-57931-9_10.

Peloso A., Dhal A., Zambon J.P., Li P., Orlando G., Atala A., Soker S., (2015), Current achievements and future perspectives in whole-organ bioengineering, *Stem Cell Res Ther* 6-107, <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0089-y>.

Punjabi A.P., Haug R.H., Jordan R.B., (1997), Management of injuries to the auricle, *J Oral Maxillofac Surg*, Jul, 55(7):732-9, DOI: 10.1016/s0278-2391(97)90589-9, PMID: 9216507.

Qiagen, (2023), DNeasy® Blood & Tissue Handbook, Qiagen, Hilden, Germany.

Schunke M., Schulte E., Schumacher U., (2015), Prometheus. Testo atlante di Anatomia. Testa, collo e neuroanatomia, II edizione, Edises, 9788879598491.

Siegert R., Magritz R., (2007), Reconstruction of the auricle, *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, Vol. 6, PMID: 22073078; PMCID: PMC3199840.

Storck K., Staudenmaier R., Buchberger M., Strenger T., Kreutzer K., von Bomhard A., Stark T., (2014), Total reconstruction of the auricle: our experiences on indications and recent techniques, *Biomed Res Int*, 373286, DOI: 10.1155/2014/373286, PMID: 24822198, PMCID: PMC4005147.

T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA.

Thomassin J.M., Barry P., (2016), Anatomia e fisiologia dell'orecchio esterno, *EMC - Otorinolaringoiatria*, Volume 15, Issue 4, ISSN 1639-870X, [https://doi.org/10.1016/S1639-870X\(16\)80762-X](https://doi.org/10.1016/S1639-870X(16)80762-X).

Vernice N. A., Dong X., Matavosian A. A., Corpuz G. S., Shin J., Bonassar L. J., Spector J. A., (2024), Bioengineering Full-scale auricles using 3D-printed external scaffolds and decellularized cartilage xenograft, *Acta biomaterialia*, 179, 121–129, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2024.03.012>.

Zhang T.Y., Bulstrode N., Chang K.W., Cho Y.S., Frenzel H., Jiang D., Kesser B.W., Siegert R., Triglia J.M., (2019), International Consensus Recommendations on Microtia, Aural Atresia and Functional Ear Reconstruction, *J Int Adv Otol*, 15(2): 204-8.

Sitografia

Data Sheet ALCIAN BLU pH 2,5, Kit Bio-Optica 04-160802, Bio-Optica, Milano, Italia, https://www.bio-optica.it/ftp/Sito/technical_datasheet/160802.pdf.

Data Sheet MASSON TRICROMICA con blu di anilina, Kit Bio-Optica 04-010802, Bio-Optica, Milano, Italia, https://bio-optica.it/ftp/Sito/technical_datasheet/010802.pdf.

Data Sheet WEIGERT Kit Bio-Optica 04-050802, Bio-Optica, Milano, Italia, https://bio-optica.it/ftp/Sito/technical_datasheet/050802.pdf.

Product information DAPI 4', 6-Diamidino-2-phenylindole, Catalog Numbers D9542, Sigma Aldrich, MO, USA, <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/247/438/d8417pis.pdf>.

Sampias C. & Rolls G., Panoramica sulla colorazione E&E: Guida alle buone pratiche, Anatomical Pathology Equipment & Workflow Solutions: Leica Biosystems, <https://www.leicabiosystems.com/it-it/knowledge-pathway/he-staining-overview-a-guide-to-best-practices>.