



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**“Ingegneria tissutale per la riparazione del tessuto polmonare: le nuove
frontiere nei danni da Covid-19”**

Relatore: Prof. Gianfranco Santovito

Laureanda: Anna Scomparin

ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022

Data di laurea 22 settembre 2022

Sommario

PREFAZIONE	1
CAPITOLO 1: INTRODUZIONE ANATOMICA	2
1.1 L'apparato respiratorio	2
1.2 I polmoni	3
1.2.1 Gli alveoli polmonari	4
1.2.2 I bronchi e i bronchioli.....	5
1.3 Il tessuto polmonare	6
CAPITOLO 2: IL COVID-19	8
2.1 Cos'è il Covid-19	8
2.2 Epidemiologia.....	10
2.3 Patogenesi.....	11
2.4 I danni.....	12
2.4.1 I danni a livello polmonare	14
CAPITOLO 3: TISSUE ENGINEERING	16
3.1 Cos'è la tissue engineering.....	16
3.2 Il processo di sintesi di un tessuto	17
3.3 Gli scaffold	18
3.3.1 La progettazione degli scaffold.....	19
CAPITOLO 4: LUNG TISSUE ENGINEERING	20
4.1 Introduzione.....	20
4.2 Gli scaffold polmonari.....	22
4.2.1 Gli scaffold polmonari vascularizzati	22
4.2.2 Gli scaffold polmonari decellularizzati	24
4.3 Modelli in vitro.....	26
4.4 Applicazioni della TE al Covid-19.....	28
4.5 Prospettive future.....	30
CONCLUSIONI	32
BIBLIOGRAFIA	33

PREFAZIONE

Questa tesi presenta una breve panoramica su come l'applicazione dell'ingegneria tissutale a livello del tessuto polmonare possa ridurre i danni causati da una malattia come il Covid-19. Il Covid-19 è una malattia respiratoria acuta da SARS-CoV-2 e si tratta di una vera e propria epidemia che si è diffusa in tutto il mondo intorno all'autunno 2019 a partire dalla città di Wuhan in Cina. Essendo una malattia respiratoria, i polmoni sono gli organi più colpiti perché il virus accede tramite l'enzima ACE2 che è il più abbondante nelle cellule alveolari di tipo II dei polmoni. Poiché le attuali terapie per la nuova malattia da Coronavirus sono generalmente utilizzate per gestire piuttosto che curare questa malattia, che è altamente infettiva, si è alla ricerca di un trattamento sicuro ed efficace. Ad oggi, infatti, sono stati condotti numerosi studi per valutare i risultati ottenuti dall'ingegneria tissutale.

Quest'ultima è un settore terapeutico che si pone l'obiettivo di ricreare, ingegnerizzare o riparare tessuti e organi in modo da ristabilire o ricreare le loro originarie funzioni biologiche. L'obiettivo di questa tesi è analizzare le diverse strategie per la riproduzione e per la riparazione del tessuto polmonare. Verrà posta l'attenzione in modo particolare all'approccio con scaffold ingegnerizzati, che sono in fase di sviluppo, e le relative cellule utilizzate per popolarli.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE ANATOMICA

1.1 L'apparato respiratorio

Il sistema respiratorio, o apparato respiratorio, è l'insieme degli organi e dei tessuti deputati all'introduzione nell'organismo dell'ossigeno atmosferico contenuto nell'aria e, contemporaneamente, all'espulsione dell'anidride carbonica generata dall'attività cellulare e rappresentante un prodotto di scarto nocivo. Questo processo prende il nome di respirazione, la quale comprende due fasi:

- L'inspirazione che è il processo mediante il quale l'aria ricca di ossigeno giunge dall'ambiente esterno ai polmoni attraverso le vie aeree
- L'espirazione con cui l'aria più ricca di anidride carbonica proveniente dai polmoni ripercorre in senso inverso le vie aeree e viene emessa nell'ambiente esterno

Gli organi dell'apparato respiratorio oltre ad assicurare gli scambi gassosi (funzione respiratoria), provvedono anche al riscaldamento e all'umidificazione dell'aria inspirata.

Il sistema respiratorio è costituito dalle vie aeree, che si dividono in inferiori e superiori, che provvedono alla conduzione dell'aria, e dai polmoni che sono coinvolti anch'essi nella conduzione dell'aria ma anche nello scambio gassoso.

Le vie aeree sono strutture che consentono all'aria di essere immessa o espulsa, in modo ritmico, dai polmoni e il passaggio rapido dell'aria è consentito grazie alla loro particolare conformazione di condotti pervi. Le vie aeree si dividono in vie aeree inferiori e vie aeree superiori le quali sono in continuità anatomica tra loro. Al tratto respiratorio superiore appartengono il naso con le sue cavità nasali, la bocca e la faringe mentre al tratto respiratorio inferiore appartengono la laringe, la trachea, i bronchi e i bronchioli.

I polmoni invece sono organi parenchimatosi, ognuno dei quali è rivestito da due foglietti di una tonaca sierosa chiamata pleura. Quest'ultima è fondamentale per l'espansione polmonare durante l'inspirazione. All'interno dei polmoni troviamo numerose cavità, gli alveoli polmonari, nei quali arriva l'aria proveniente dalle vie aeree. [1] [2]

1.2 I polmoni

I polmoni sono gli organi principali dell'apparato respiratorio. All'interno di essi avviene l'ematosi che è un fenomeno che permette di trasformare il sangue in sangue ossigenato mediante l'assunzione dell'ossigeno e la cessione dell'anidride carbonica a livello dei capillari.

I polmoni sono due e si dividono in destro e sinistro. Sono contenuti all'interno delle logge pleuropolmonari della cavità toracica e sono divisi dal mediastino che è lo spazio mediano compreso tra la colonna vertebrale e lo sterno. Le logge sono delimitate lateralmente dalle coste e dai muscoli intercostali, medialmente dal mediastino, inferiormente dal diaframma e superiormente dalle strutture che si trovano nella parte superiore del torace.

Ognuno dei due polmoni ha, nell'estremità superiore, un apice che si estende fino alla base del collo e, all'estremità inferiore, poggia sul muscolo diaframmatico. Il polmone destro è diviso in tre lobi (superiore, medio ed inferiore) i quali sono separati da una fessura obliqua e da una orizzontale. Il polmone sinistro, invece, è diviso in due lobi (superiore e inferiore) separati da una fessura obliqua. (*figura 1*)

I polmoni sono avvolti da una membrana sierosa, la pleura, che a sua volta è formata da due foglietti pleurici, uno viscerale e uno parietale. Il primo aderisce alla superficie interna dell'organo dividendo i polmoni dalla parete toracica, il secondo invece tappezza la superficie delle logge pleuropolmonari dividendo i polmoni dalla parete toracica. I due foglietti pleurici sono in contatto continuo tra loro e, per favorire lo scorrimento l'uno sull'altro e per permettere ai polmoni di seguire i movimenti dei muscoli, è presente una pellicola di liquido pleurico situata tra i due foglietti.

Il polmone ha la forma di cono e ha un volume variabile a seconda dello sviluppo dell'organismo e a seconda del sesso. Generalmente il polmone sinistro risulta sempre più piccolo rispetto al polmone destro e nelle donne le dimensioni dei polmoni sono leggermente più piccole. Anche il peso dei polmoni varia nel corso dello sviluppo dell'organismo sino a raggiungere, nell'uomo, circa 680 grammi nell'età adulta.

La quantità di aria che i polmoni riescono a contenere è detta capacità polmonare ed è il parametro attraverso il quale i clinici valutano la funzionalità polmonare di un soggetto. Questo valore varia notevolmente a seconda dell'età, del sesso e della statura, dunque, i clinici usano algoritmi basati su questi parametri per individuare il valore atteso della capacità polmonare.

Quest'ultima può raggiungere i 3400-3700 cm³ nella fase di inspirazione regolare mentre nella fase di inspirazione forzata può raggiungere anche un valore di 5000-6000 cm³. [1] [3]

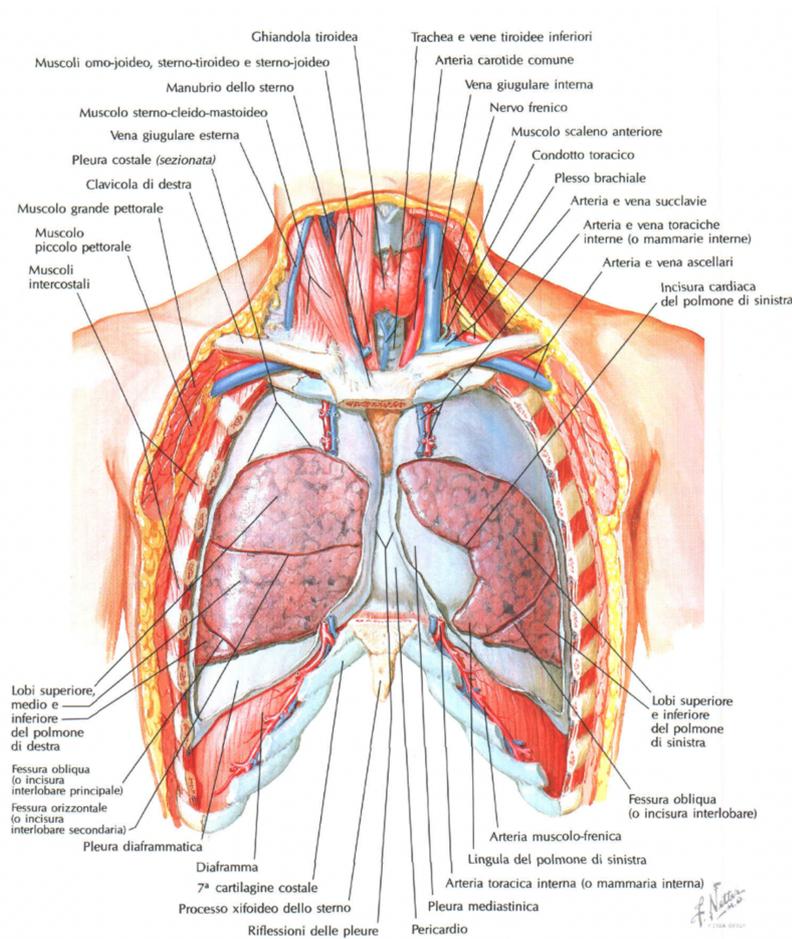


Figura 1: Polmoni in situ visti anteriormente

1.2.1 Gli alveoli polmonari

Lungo la parete dei bronchioli respiratori si notano delle estroflessioni emisferiche le quali prendono il nome di alveoli polmonari. Essi, infatti, rappresentano la parte terminale dell'albero bronchiale e si riuniscono in gruppi situati all'estremità di ogni bronchiolo respiratorio da cui poi ricevono l'aria atmosferica proveniente dalle vie aeree. Il numero di alveoli aumenta man mano che i bronchioli respiratori originano condotti di calibro inferiore. Dopo varie biforcazioni, il bronchiolo respiratorio termina in un dotto alveolare che si conclude con un rigonfiamento costituito da due o più gruppi di alveoli detti sacchi alveolari. (figura 2)

Il ruolo a cui sono preposti gli alveoli polmonari è definito ematosi e consiste nello scambio di gas respiratori tra il sangue e l'atmosfera. Per via di questo loro ruolo, gli alveoli sono definiti anche unità funzionale del polmone. Il loro compito, infatti, è quello di arricchire il sangue di

ossigeno eliminando l'anidride carbonica e il vapore acqueo. La superficie di scambio gassoso è molto estesa per via dell'elevata densità degli alveoli che rendono il polmone spugnoso. [1]
[4]

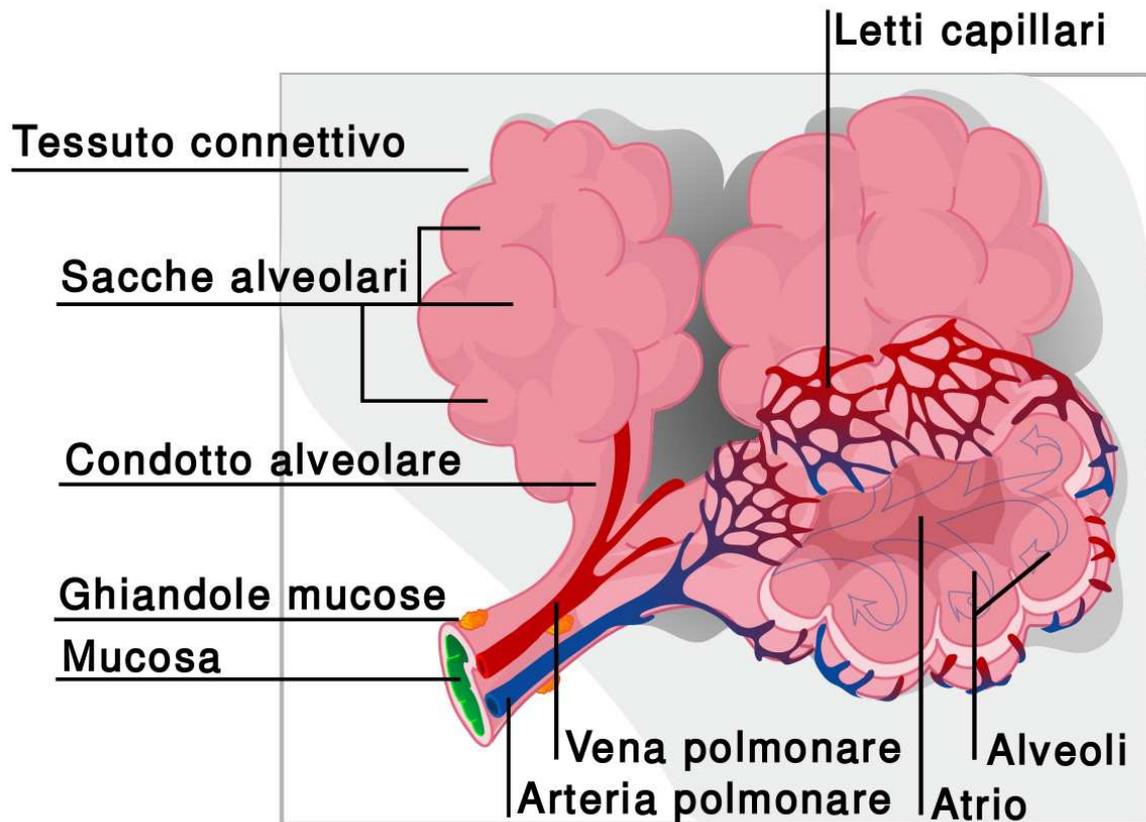


Figura 2: Diagramma degli alveoli polmonari

1.2.2 I bronchi e i bronchioli

I bronchi rappresentano le vie aeree contigue alla trachea che in corrispondenza della quarta vertebra toracica si deforma per dare origine ai due bronchi primari: uno per il polmone destro e uno per il polmone sinistro. Quest'ultimi si suddividono in rami di calibro sempre inferiore costituendo l'albero bronchiale.

I bronchi hanno il ruolo di trasportare l'aria dall'ambiente esterno agli alveoli nei quali poi avviene lo scambio gassoso. La loro struttura si compone di un supporto cartilagineo che poi si ramifica in condotti di calibro inferiore fino ad originare i bronchioli che perdono il supporto iniziale.

Il bronco primario destro si divide in tre bronchi che poi penetrano nei rispettivi lobi del polmone destro. Il bronco primario sinistro invece ha solo due biforcazioni per via della presenza del cuore che riduce il volume a disposizione del polmone sinistro. Questi lobi aggiuntivi sono definiti lobi secondari o lobari e sono caratterizzati dalla perdita della struttura di supporto cartilaginea in cambio di placche irregolari di cartilagine ialina. I bronchi secondari si dividono poi in rami più piccoli detti bronchi terziari. Questi si ramificano ulteriormente andando a toccare i segmenti broncopolmonari di cui si compone ciascun polmone. Dai bronchi terziari infine originano i bronchioli.

I bronchioli danno origine a condotti sempre più piccoli fino ad arrivare a formare i bronchioli terminali che costituiscono la parte terminale dell'apparato respiratorio che ha il compito di rifornire di aria gli acini polmonari dove avvengono gli scambi gassosi. Molto importanti per i bronchioli sono le cellule di Clara che sono cellule caliciformi mucipare che proteggono l'epitelio da tossine, batteri e dal collasso. Aiutano anche in caso di collasso alla rigenerazione dell'epitelio stesso. Infine, i bronchioli terminali concludono con i bronchioli respiratori che sono provvisti di alveoli direttamente sulla loro parete conferendo loro una duplice funzione: conduzione e scambio gassoso. [1] [5]

1.3 Il tessuto polmonare

Il parenchima polmonare è formato da un insieme di territori indipendenti delimitati da setti connettivali, i lobuli polmonari. Si possono distinguere nel lobulo polmonare due elementi: il bronchiolo e la porzione respiratoria. Ogni bronchiolo forma un acino polmonare che contiene bronchioli respiratori che presentano nel loro decorso gli alveoli. (*figura 3*)

I bronchioli e i loro rami hanno una struttura semplice: l'epitelio di rivestimento è di tipo cilindrico ciliato con cellule mucipare, al di sotto dell'epitelio si trova una tonaca fibromuscolare fatta di tessuto connettivo denso che accoglie anche fasci di tessuto muscolare liscio elicoidale. I bronchioli respiratori invece, sono formati da un epitelio respiratorio privo di cellule mucipare e di cellule ciliate che tende ad appiattirsi diventando pavimentoso semplice.

Gli alveoli sono costituiti da una parete sottile caratterizzata da un sottile strato di cellule epiteliali e priva di tessuto muscolare che altrimenti ostacolerebbe lo scambio gassoso. Gli alveoli sono però ricchi di fibre elastiche che consentono loro di estendersi durante l'inspirazione e ritornare durante l'espiazione. La regione tra due alveoli adiacenti è conosciuta come setto interalveolare ed è costituita da un epitelio alveolare, da capillari alveolari e da uno

strato di tessuto connettivo. L'epitelio alveolare si compone di tre tipi di cellule: pneumociti di tipo I, pneumociti di tipo II e macrofagi alveolari.

Gli pneumociti di tipo I sono cellule alveolari squamose e sono il principale costituente dell'epitelio alveolare. Sono cellule molto sottili il cui citoplasma si solleva nella porzione che accoglie il nucleo, verso la cavità dell'alveolo. Essendo molto sottili e strettamente connesse all'endotelio capillare, sono facilmente attraversabili dai gas respiratori

Gli pneumociti di tipo II sono noti anche come cellule settali. Essi sono cellule tondeggianti e sporgenti e sono più numerose, e più piccole, rispetto agli pneumociti di tipo I. Possono trovarsi isolate o raccolte in piccoli gruppi e hanno due principali funzioni: secernere un liquido ricco di fosfolipidi e proteine chiamato surfactante e riparare l'epitelio alveolare quando è danneggiato. Il surfactante ha un ruolo molto importante in quanto previene l'eccessiva estensione ed il collasso degli alveoli, oltre a rendere più agevole lo scambio di gas tra l'aria e il sangue. Senza questo liquido il soggetto svilupperebbe numerosi problemi respiratori: collasso totale o parziale del polmone ovvero atelettasia. Infine, gli pneumociti di tipo II aiutano anche nel minimizzare il volume di liquido, come acqua e soluti, presente negli alveoli.

I macrofagi alveolari sono invece cellule immunitarie deputate all'eliminazione delle sostanze dannose per il corpo come il pulviscolo atmosferico, batteri e particelle inquinanti. Da qui deriva il nome di "cellule da polvere" o "cellule spazzino" dell'alveolo polmonare. [1] [6] [7]

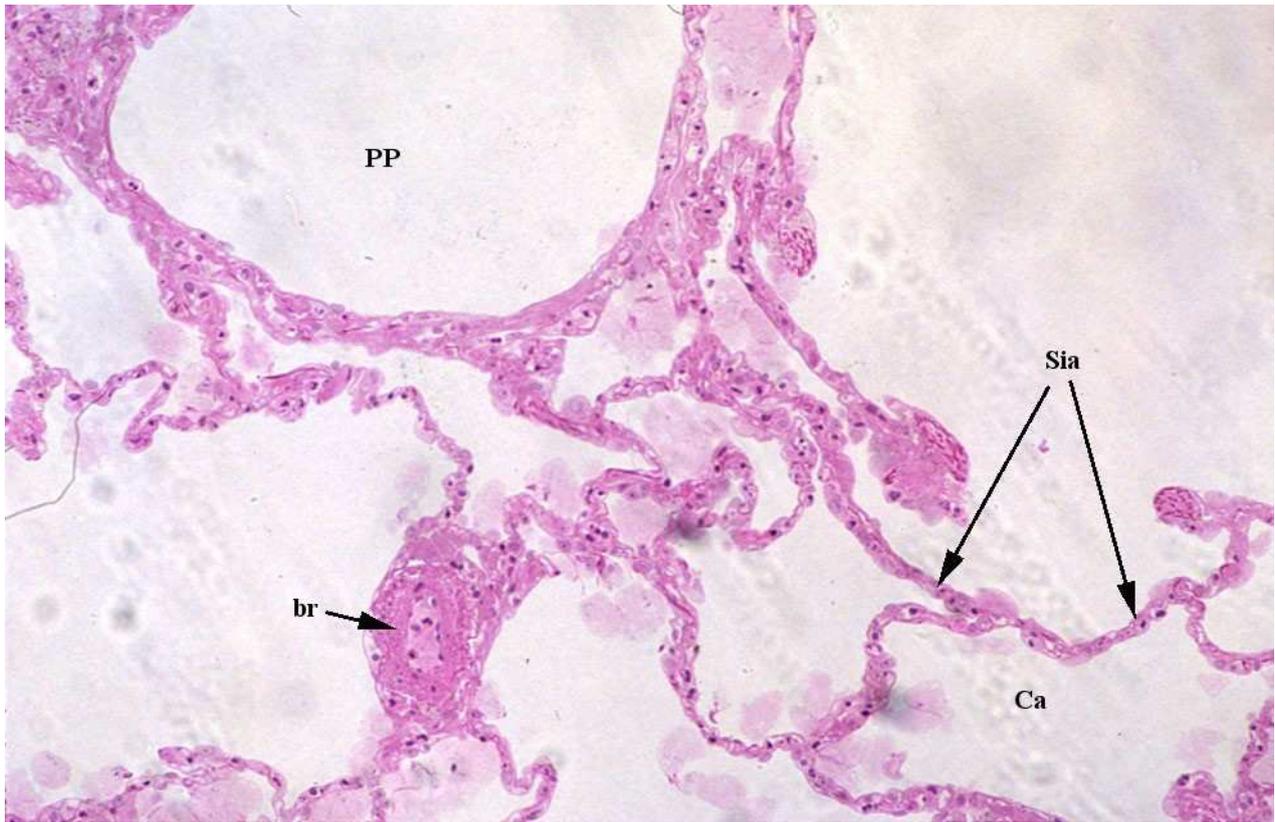


Figura 3: Ingrandimento del tessuto polmonare. L'insieme dei lobuli polmonari costituisce il parenchima polmonare (PP). Dal bronco lobulare hanno origine i bronchioli intralobulari (br). È poi presente la cavità alveolare (Ca) con i setti inter-alveolari (Sia)

CAPITOLO 2

IL COVID-19

2.1 Cos'è il Covid-19

I coronavirus sono virus con envelope e un genoma a RNA a polarità positiva che può fungere da mRNA una volta entrato nella cellula e liberato (*figura 4*). Sono noti già a partire dagli anni 50'-60'. Sono stati chiamati "coronavirus" per la presenza di una proteina anti-recettore che sporge dall'envelope, la spike protein, che sembra formare una coroncina sulla superficie del virus. Questi virus sono poi distinti in diversi gruppi che comprendono sia quelli che possono infettare l'uomo sia quelli che possono infettare solo i bovini, maiali e felini.

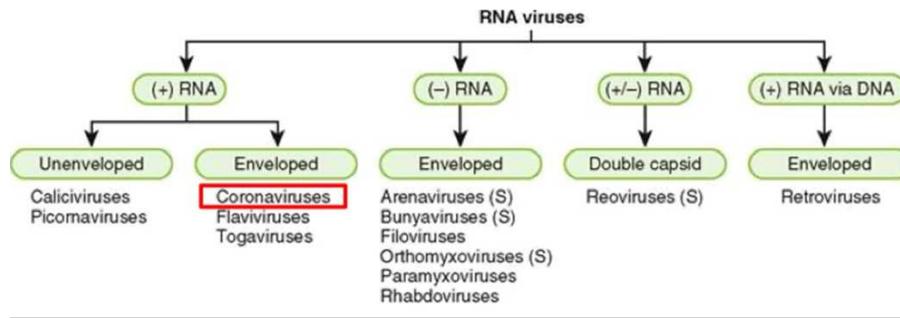


Figura 4

Il nuovo ceppo di Coronavirus SARS-CoV2 (Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus 2) è stato segnalato per la prima volta a Wuhan, in Cina, nel dicembre 2019 e da allora si è diffuso in tutti i paesi del mondo con una rapidità inaspettata. Il nome che è stato dato alla malattia associata al virus è proprio COVID-19.

Molti dei coronavirus umani che circolano sono di origine zoonotica. Molti derivano dai pipistrelli, altri dai roditori. Generalmente non sono in grado di infettare direttamente l'uomo, perché si legano a dei recettori diversi; quindi, generalmente c'è un passaggio attraverso un ospite intermedio che nel caso della SARS-CoV2 non è ancora stato individuato. (figura 5)

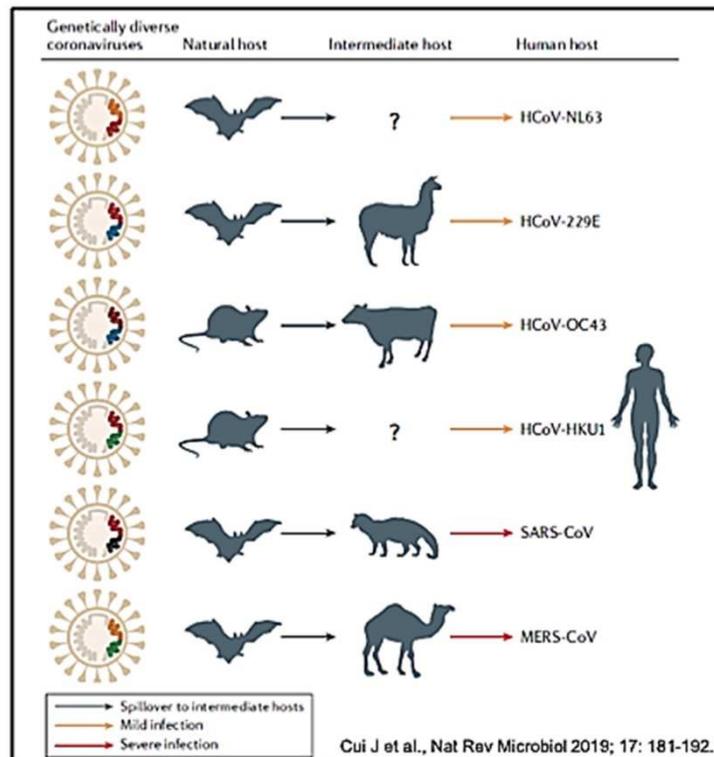


Figura 5: Con le frecce nere viene indicato il passaggio ad un ospite intermedio. Con le frecce viene indicata l'insorgenza di una lieve infezione, mentre con quelle rosse un'infezione grave come nel caso della SARS-CoV2

La trasmissione avviene principalmente tramite via aerea e il contagio avviene entro 5-7 giorni dall'esposizione da una persona all'altra attraverso droplets ovvero goccioline di saliva. Le droplets sono prodotte e diffuse nell'ambiente mentre parliamo, respiriamo, tossiamo o starnutiamo. SARS-CoV-2 si può però trasmettere anche per via oculare, infatti, l'occhio oltre ad essere una porta d'entrata per il virus è anche una fonte di trasmissione del contagio tant'è che la congiuntivite può essere anche uno dei sintomi da COVID-19. Un altro mezzo di trasmissione è il contatto diretto: dopo aver toccato superfici o oggetti contaminate da secrezioni infette, si toccano bocca, naso o occhi senza essersene correttamente lavate o igienizzate. La trasmissione per via oro-fecale, invece, deve ancora essere dimostrata. [8] [9]

2.2 Epidemiologia

Intorno all'autunno del 2019, le autorità sanitarie cinesi hanno riscontrato i primi casi di pazienti che mostravano sintomi di una polmonite di causa ancora sconosciuta. A gennaio 2020 i casi di polmonite severa, di origine probabilmente virale, aumentano e viene identificato un nuovo agente virale come causa di queste polmoniti. Il ceppo responsabile è stato individuato solo nel gennaio 2020 e denominato ufficialmente Coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta severa. Il virus si è rapidamente diffuso e l'11 marzo 2020 l'OMS dichiara che quella da SARS-CoV-2 è una pandemia ma, nonostante questo, il tasso di mortalità e morbilità a marzo 2020 era ancora sconosciuto. Inizialmente era stato rilevato un tasso di letalità compreso tra il 9% e l'11% ma successivi studi hanno smentito queste percentuali per via della presenza di numerosi pazienti asintomatici. Il valore del tasso di letalità effettivo IFR è stato ridotto e portato allo 0,8% dopo aver usato un approccio modellistico basato su dati francesi.

Le infezioni da Covid-19 sono state riscontrate in gran parte del mondo occidentale e asiatico in particolar modo tra coloro che provenivano dalla Cina continentale. Nel pieno della prima ondata in Italia si contavano più di 130.000 casi e un tasso di mortalità molto alto tant'è che era il secondo paese come numero di contagi. La situazione nei mesi estivi del 2020 migliora ma poi tutti i paesi assistono ad una seconda ondata di contagi negli ultimi mesi del 2020 e ad un'ulteriore terza ondata tra marzo e aprile 2021. A maggio 2022, nonostante il numero molto elevato di infezioni, la mortalità diminuisce di molto rispetto ai dati del 2020 e 2021. *(figura 6)* [8] [10]

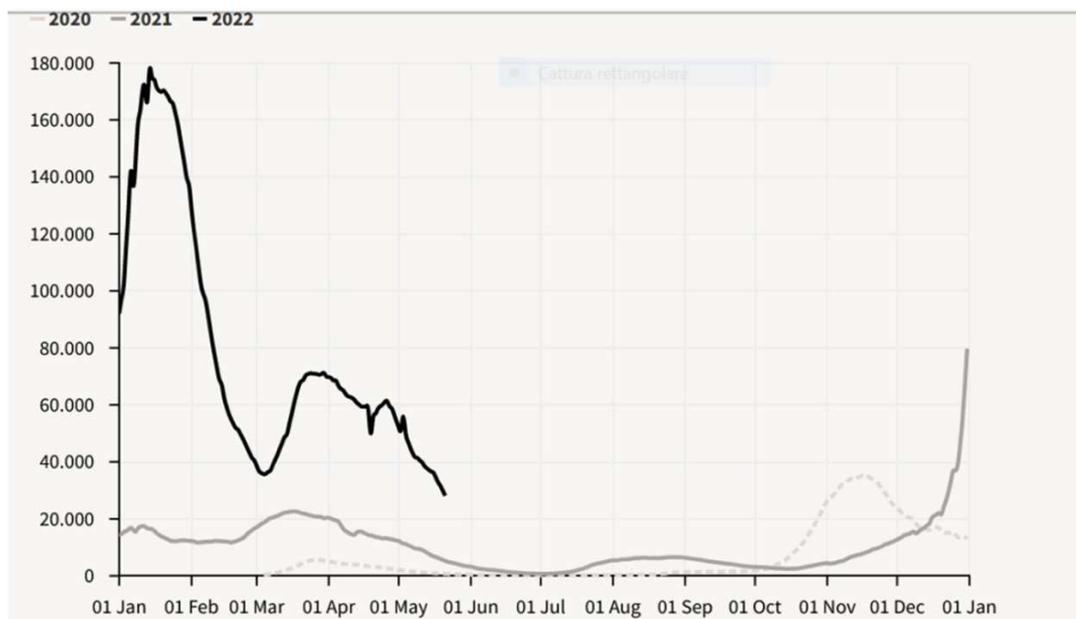


Figura 6: andamento della pandemia da SARS-CoV2 in Italia dall'inizio della pandemia fino a maggio 2022

2.3 Patogenesi

I coronavirus umani endemici danno un'infezione limitata prevalentemente alle vie aeree superiori, causando rinite, faringite e febbre. Il virus SARS-CoV-2 infetta inizialmente, attraverso l'enzima ACE2 di conversione dell'angiotensina, le cellule ciliate della mucosa respiratoria del tratto superiore e successivamente con altissima efficienza gli pneumociti di tipo II, responsabili della produzione del surfactante che evita il collasso degli alveoli, causando dunque un grave danno a livello polmonare. Questo danno è causato anche a seguito dell'infezione virale che scatena una forte infiammazione e una forte risposta immunitaria. A ingresso avvenuto, SARS-CoV-2 si appropria dei ribosomi dell'ospite e li sfrutta per tradurre il proprio genoma a RNA e creare le proteine necessarie alla replicazione dello stesso materiale genetico. Con la trascrizione e la replicazione del genoma virale, SARS-CoV-2 comincia a diffondersi nell'ospite dando il via alla malattia infettiva. A questo punto il virus agisce sull'organismo ospite andando ad uccidere le cellule e con meccanismi immuno-mediati (figura 7).

I sintomi più comuni sono tosse, febbre, dolori muscolari, perdita di gusto e olfatto e più raramente anche sintomi gastrointestinali. La sindrome da distress respiratorio acuto si caratterizza per dispnea, ipossiemia grave e a livello radiologico viene riconosciuta dalla presenza di opacità bilaterali a livello dei polmoni.

Sintomi e letalità variano a seconda della fascia di età: i sintomi respiratori gravi si manifestano soprattutto in soggetti anziani e la mortalità aumenta nelle fasce over 65. Le morti inoltre sono più frequenti in soggetti con patologie precedentemente diagnosticate come: malattie cardiache, ipertensione, diabete ed obesità. [9] [10]

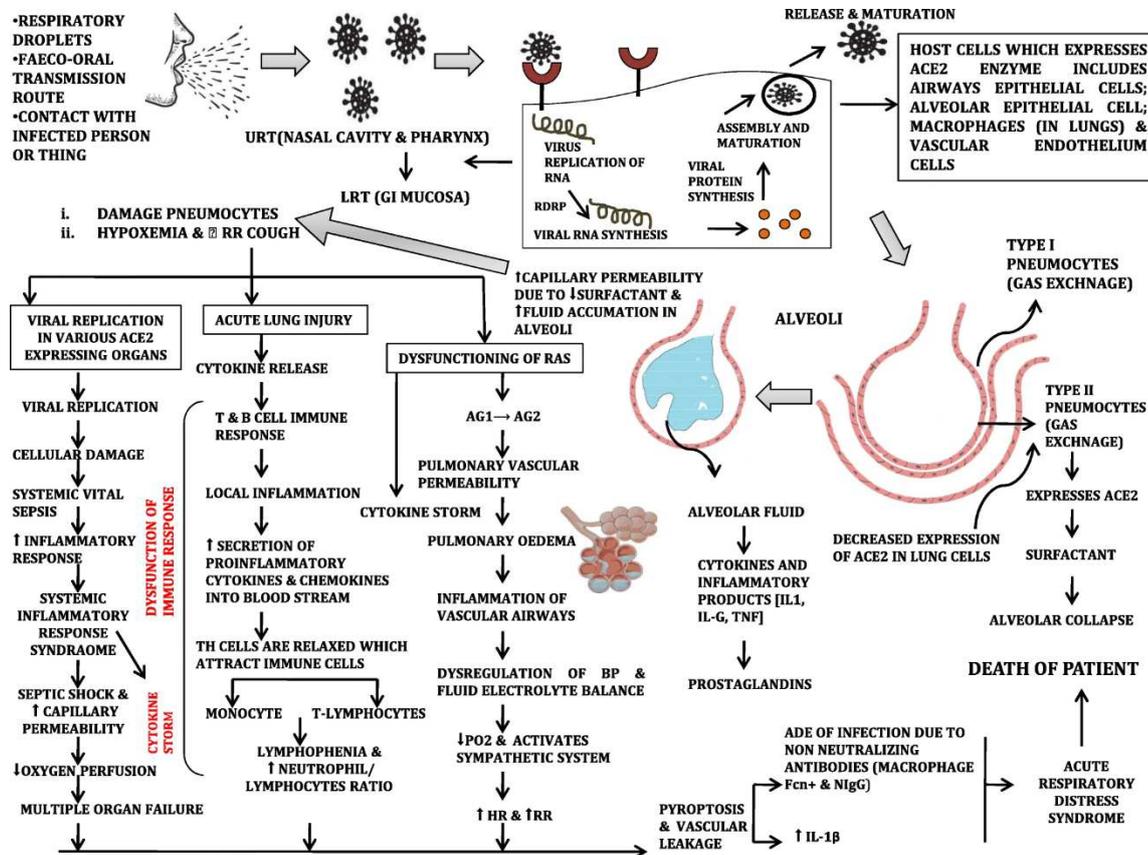


Figura 7: Patogenesi completa del Coronavirus

2.4 I danni

I danni provocati dal COVID-19 sono molteplici e vanno ad intaccare diversi organi del corpo oltre ai polmoni: il cuore, il cervello, i reni e molti altri (figura 8).

I danni al cuore vanno a colpire l'intero sistema cardiovascolare che per il nostro corpo è fondamentale in quanto fornisce alle cellule ossigeno e i nutrienti necessari. Tra le malattie provocate troviamo lesioni miocardiche, infarto miocardico acuto, aritmie e danni al sistema vascolare. Questi danni cardiovascolari possono avere varie spiegazioni, tra cui una grande risposta immuno-infiammatoria, l'ipossia da danno respiratorio acuto e l'infiammazione sistemica che oltre ad interrompere la stabilità delle placche vascolari causando infarto miocardico, aumenta anche il rischio di formazione di trombi.

I danni di tipo neuronale derivano dal fatto che i virus talvolta raggiungono anche il sistema nervoso centrale o per via ematogena o per via neuronale. A prova del fatto che il COVID-19 ha effetti di questo tipo è che una volta eseguita un'autopsia su pazienti deceduti per questa malattia, a volte sono stati ritrovati edemi del tessuto cerebrale e parziali degenerazioni neuronali.

I danni ai reni sono stati esaminati prendendo campioni di urina di pazienti affetti da COVID-19 e notando alti livelli di azoto ureico e creatina plasmatica. Il meccanismo del danno è ancora in fase di studio ma ci sono già alcune possibili cause. La prima potrebbe essere la tempesta di citochine che porta il rene a non essere più in grado di assolvere il suo ruolo. La seconda causa potrebbe essere dettata dal fatto che il virus entra direttamente nelle cellule renali accumulandosi e causando un danno tubulare acuto infettando i tubuli renali. La terza causa potrebbe derivare dal fatto che il danno renale sia una conseguenza della polmonite che contrae il paziente e che comporta un insufficiente livello di ossigeno nel sangue cambiando la funzionalità del rene stesso. [11]

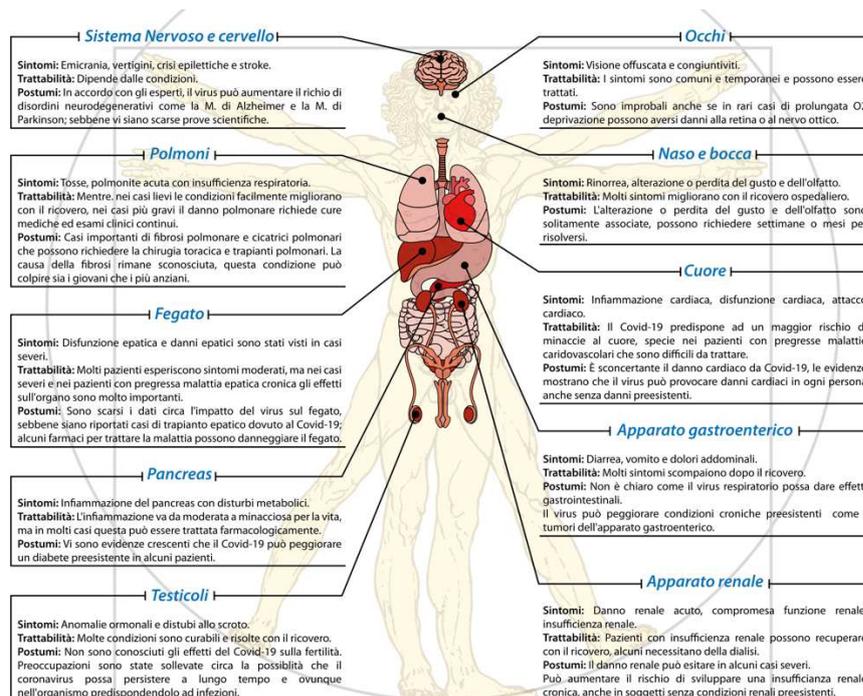


Figura 8: Come il COVID-19 colpisce l'organismo

2.4.1 I danni a livello polmonare

La SARS-CoV-2 provoca gravi danni al sistema respiratorio poiché progredendo si trasforma in gravi malattie respiratorie acute come bronchite, polmonite e fibrosi. Può danneggiare i polmoni in tre differenti modi: sindrome da distress respiratorio acuto con danno alveolare diffuso, occlusione microvascolare alveolare trombotica diffusa e infiammazione delle vie aeree. Questi tre danni causano alterazione dell'ossigenazione alveolare, ipossiemia e acidosi e, in assenza di una cura efficace, possono portare alla morte del paziente per insufficienza respiratoria o possono lasciare danni permanenti ai polmoni.

Nel caso della sindrome da distress respiratorio acuto, la SARS-CoV-2 attacca gli pneumociti di tipo II legandosi all'enzima ACE2 sulla superficie della cellula, distruggendoli. Dunque, in tal caso lo scambio dei gas e l'ossigenazione sono gravemente compromessi.

La trombosi del microcircolo alveolare da coagulopatia vede interessata l'integrità degli epitelii alveolari, i quali invece, vengono compromessi a causa dell'aggregazione di piastrine, e dall'attivazione del sistema del complemento. La conseguenza diretta è il rilascio di citochine pro-infiammatorie e una sovraregolazione delle molecole di adesione.

La SARS-CoV-2 non solo danneggia le funzioni di diffusione del gas alveolare ma induce anche una infiammazione delle vie aeree riducendo la ventilazione. Essa va a colpire e danneggiare i bronchioli, i bronchi e la trachea.

In conclusione, sia l'infiammazione delle vie aeree sia la formazione di trombosì intra-alveolare contribuiscono allo sviluppo della fibrosi polmonare, la quale viene promossa da una sovraregolazione delle molecole pro-fibrotiche. [11] [12]

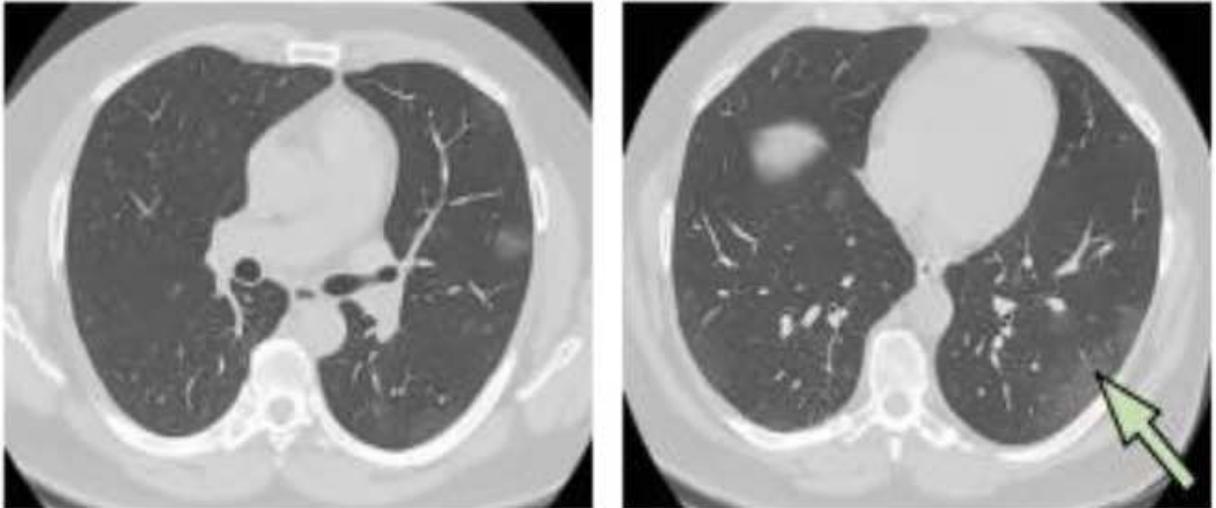
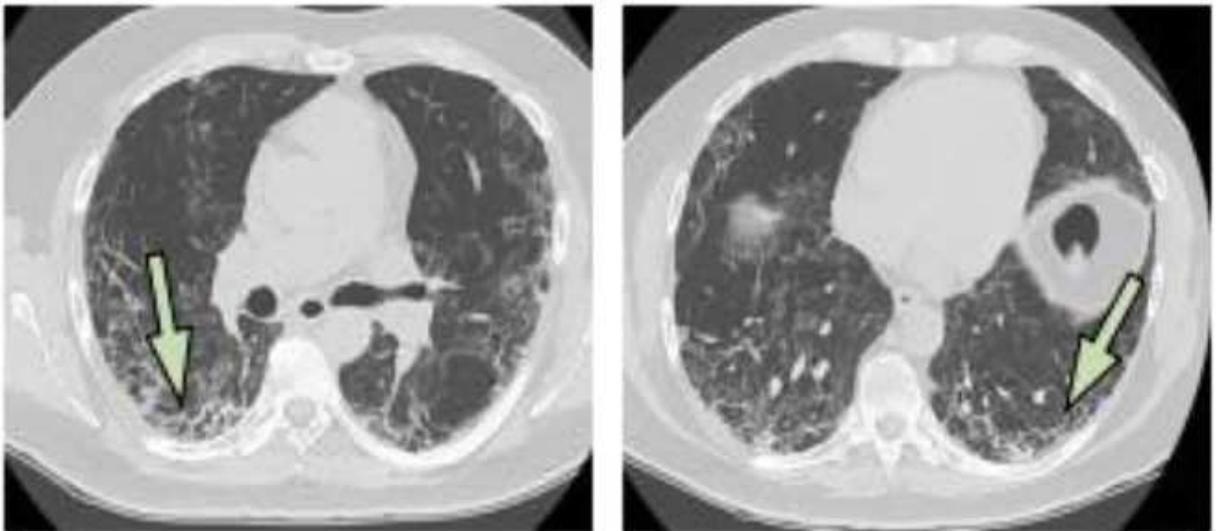
A**B**

Figura 9: (A) Nelle prime fasi della malattia, sono ben visibili alcune opacità nel polmone sinistro come indicato dalla freccia. (B) A tre settimane dalla prima TC è evidente la presenza di fibrosi.

CAPITOLO 3

TISSUE ENGINEERING

3.1 Cos'è la *tissue engineering*

La *tissue engineering* è una disciplina dell'ingegneria biomedica che integra la biologia con l'ingegneria per creare tessuti o prodotti cellulari al di fuori del corpo o per gestire la riparazione dei tessuti all'interno del corpo. Combina i principi dei materiali e del trapianto cellulare per sviluppare tessuti sostitutivi e promuovere la rigenerazione endogena. Questa disciplina è stata sviluppata per cercare di affrontare il problema del numero crescente di pazienti in lista d'attesa per il trapianto di organi. Con il passare degli anni questo problema affiora sempre di più e l'ingegneria tissutale sta tentando di risolverlo anche attraverso il ripristino del tessuto funzionale.

La *tissue engineering* organizza un gran numero di cellule in strutture come tessuti o organi ma la reingegnerizzazione di strutture anatomiche umane complesse non può avvenire solo attraverso singole cellule o masse di cellule non organizzate in uno scaffold poiché i tessuti hanno bisogno di essere visti dal punto di vista di sistema complesso. Quando si progetta un tessuto o un organo è necessario sviluppare una specifica di progettazione per il tessuto ingegnerizzato, dopo aver valutato la funzionalità di quest'ultimo.

L'ingegneria tissutale, inoltre, studia la progettazione e la realizzazione di bioreattori che vengono usati per produrre organi e tessuti partendo dall'inseminazione di cellule in opportuni scaffold. Quest'ultimi sono impalcature tridimensionali che sostengono le cellule e sono generalmente in materiale nanocomposito polimerico biocompatibile e vengono usati per permettere una migliore adesione, crescita e differenziazione e diffusione cellulare. Sono anche in grado di definire la forma finale che deve avere quel determinato organo o tessuto.

Il successo della *tissue engineering* deriva dalla capacità di produrre e ingegnerizzare materiali biomimetici che riproducono le funzioni e le caratteristiche della matrice extracellulare ECM ricreando un ambiente necessario nella sintesi dei vari tessuti. Assolvono questa funzione proprio gli scaffold che sono strutture artificiali che riproducono la ECM naturale del materiale che ovviamente varia a seconda del tessuto che si vuole ingegnerizzare. Lo scaffold deve avere importanti caratteristiche: biocompatibilità, corretta porosità, corretta interconnettività e degradazione ottimale.

La biocompatibilità è la capacità di un materiale di reagire appropriatamente nei confronti di un ambiente ospitante senza creare reazioni avverse e dipende da vari fattori, tra cui la quantità di nanomateriali. Un nanomateriale, infatti, può penetrare all'interno di un organismo vivente tramite inalazione, ingestione oppure attraverso l'epidermide ed essere fonte di tossicità. [13]

3.2 Il processo di sintesi di un tessuto

La sintesi di un tessuto si propone di sviluppare scaffold con caratteristiche chimiche, fisiche, meccaniche e strutturali simili al tessuto naturale da ingegnerizzare dunque, tenta di produrre fibre sintetiche con diametro nanometrico, disposizione ed orientazione delle fibre corretta e con dimensioni dei pori adeguate. Il processo di sintesi è suddiviso in sei fasi:

- Progettazione di uno scaffold biorisorbibile
- Inseminazione delle cellule nello scaffold
- Crescita di un pre-tessuto in coltura dinamica
- Crescita del tessuto maturo in ambiente fisiologico
- Trapianto chirurgico
- Assimilazione e rimodellamento del tessuto artificiale dall'ospite

Affinché questo processo avvenga bisogna mantenere lo scaffold esposto ad una quantità adeguata di mezzo di coltura in modo tale da ottenere un continuo rifornimento di sostanze nutrienti, scambio gassoso e controllo costante dell'ambiente. L'obiettivo è quello di creare un letto vascolarizzato capace di favorire la crescita e la rigenerazione cellulare.

Le tecniche di sintesi di un tessuto sono due: la prima prevede un sostegno da parte dello scaffold fino al trapianto nell'ospite, la seconda invece prevede il mantenimento delle proprietà meccaniche dello scaffold fino a quando il pre-tessuto viene posto nel bioreattore. [14]

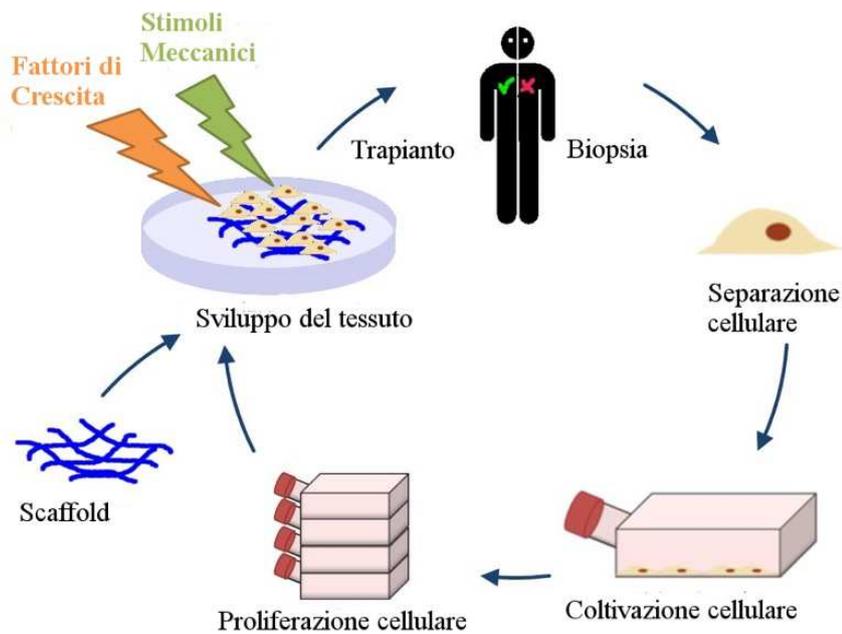


Figura 10: Ciclo di sintesi di un tessuto in ingegneria tissutale

3.3 Gli scaffold

I tessuti artificiali hanno proprietà molto inferiori rispetto a quelli naturali: la loro capacità di vascolarizzazione è molto limitata e ciò li rende molto meno applicabili e riproducibili. La vascolarizzazione è fondamentale per la produzione di nuovi tessuti poiché è il processo che favorisce il rifornimento di ossigeno e sostanze nutritive alle cellule del tessuto. Un aumento del grado di vascolarizzazione si può ottenere attraverso un rilascio controllato e localizzato di fattori angiogenetici da parte degli scaffold. L'ostacolo principale nella produzione di questi tessuti artificiali è imputabile ai nanomateriali e nanocompositi polimerici impiegati e dunque per cercare di ovviare questo problema si sta lavorando sull'ingegnerizzazione delle matrici extracellulari e sulla rapida formazione dell'ambiente cellulare. A tal proposito si sta cercando di riuscire a progettare tessuti tridimensionali con funzionalità sempre più specifiche a seconda del tessuto da ingegnerizzare.

Come già detto, un ruolo molto importante lo ha la progettazione dello scaffold, il quale influisce sulle proprietà biomeccaniche, biochimiche e biologiche del tessuto e delle cellule. Lo scaffold deve soddisfare alcuni requisiti:

- Adeguata porosità: per consentire la costruzione di un corretto reticolo capace di favorire la crescita, la disposizione cellulare, l'apporto di sostanze nutritive e lo smaltimento di prodotti metabolici

- Biocompatibilità: le fibre dello scaffold devono essere biorisorbibili e non tossiche e la loro velocità di riassorbimento deve essere controllata in modo tale che alla fine della sintesi si ottenga un tessuto costituito solamente da materiale biologico
- Alta area superficiale e adeguate proprietà fisico-chimiche superficiali: ci devono essere corrette interazioni cellula-scaffold in modo tale da favorire la proliferazione, l'adesione, la crescita, la differenziazione e la migrazione delle cellule
- Proprietà meccaniche simili a quelle del tessuto naturale: questa somiglianza è necessaria per poi innestare il tessuto *in vivo* che altrimenti subirebbe notevoli stress fisiologici e conseguente rottura accelerata talvolta anche dei tessuti adiacenti

L'architettura cellulare è molto importante nella formazione di un tessuto artificiale, infatti, per garantire proprietà analoghe a quelle del tessuto naturale è necessario avere un tessuto con le fibre di diametro nanometrico e le cellule disposte in modo ordinato e organizzato. A tal proposito sono state sviluppate tecniche innovative per simulare la ECM.

Come già elencato anche la porosità è un requisito molto importante, infatti, un livello corretto di porosità permette una migliore proliferazione delle cellule e una migliore vascolarizzazione. Nel caso di un alto valore di porosità vengono facilitate l'adesione e la crescita cellulare mentre vengono sfavorite le proprietà meccaniche dello scaffold per via di un troppo elevato valore di vuoto. Dall'altra parte invece, una porosità troppo bassa comporterebbe delle proprietà meccaniche elevate ma un'insufficiente vascolarizzazione, crescita e migrazione cellulare. [14]

3.3.1 La progettazione degli scaffold

Gli scaffold in nanofibre e nanocompositi risultano essere il metodo migliore per ottenere tessuti tridimensionali organizzati in quanto a livello strutturale risultano molto simili alla matrice extracellulare originaria. Per aumentare però la loro funzionalità molto spesso vengono aggiunti gruppi funzionali alle catene polimeriche che sono in grado di modificare le proprietà meccaniche e superficiali. Come additivi si possono anche utilizzare nanomateriali quali: polimeri funzionali, idrossiapatite, nanoparticelle metalliche e nanomateriali a base di carbonio.

Ci sono al momento tre tecniche di fabbricazione di nanofibre: *self-assembly*, *phase separation* ed *elettrospinning*.

Il *self-assembly* simula la ECM e avviene sfruttando la spontanea organizzazione, tramite legami covalenti, dei componenti del tessuto in strutture ordinate. È una tecnica difficile da applicare su scala industriale poiché molto complessa.

La *phase separation* è un processo termodinamico che genera due fasi libere che abbassano l'energia libera del sistema: una fase ricca di polimero e una ricca di solvente. La separazione delle fasi porta alla formazione di un gel a cui in seguito viene aggiunta l'acqua per estrarre il solvente. Quando si raffredda il gel, l'acqua si sublima e forma una schiuma polimerica. Il processo in sé rende possibile la formazione di un network fibroso che consiste in membrane polimeriche porose e scaffold simili ad una spugna. L'unico ostacolo di questa tecnica è il ridotto numero di polimeri processabili.

L'*elettrospinning* è al momento l'unica tecnica che permette il processing di nanofibre, producendo fibre polimeriche continue che raccolte, formano uno scaffold di fibre non intrecciate con orientazione random. Lo scaffold che deriva da questa tecnica ha una struttura simile all'ECM e ha tutte le caratteristiche regolabili in base alle funzionalità desiderate, dunque, trova un'alta applicabilità in molti settori biomedici. Un limite dell'elettrospinning, che frena la crescita del tessuto, è rappresentato dalla bassa velocità di infiltrazione cellulare dovuta alle piccole dimensioni dei pori dello scaffold. [14]

CAPITOLO 4

LUNG TISSUE ENGINEERING

4.1 Introduzione

Le malattie polmonari sono tra le più diffuse al mondo e al tempo stesso anche le più difficili da curare in quanto il trapianto polmonare è l'intervento principale per la malattia polmonare allo stadio terminale. In aggiunta a ciò, è rilevante la scarsità degli organi donatori, dunque, il campo dell'ingegneria tissutale sta diventando sempre di più l'unica via percorribile per le esigenze cliniche sopracitate.

Il polmone ha una complessa struttura tridimensionale e per questo motivo la sua riproduzione è molto difficile. Il tessuto polmonare ingegnerizzato deve essere in grado di scambiare gas, perciò, deve avere una vasta rete di condotti vascolari sottili che siano adeguati a una rapida diffusione dei gas dentro e fuori il sangue. Questi condotti devono essere in grado di resistere alla trombosi e devono avere una funzione di barriera capace di prevenire l'allagamento degli alveoli con il sangue o emocomponenti.

Sono attualmente in fase di sviluppo numerosi approcci di impalcatura per integrare le strutture vascolari e le vie aeree in modo da ottenere lo scambio di gas. L'impalcatura fornisce l'architettura dell'organo e sostiene la funzione di quest'ultimo mantenendo scomparti multipli, indipendenti e ordinati. Il primo approccio in fase di studio prevede scaffold ingegnerizzati che usano polimeri porosi o reti microfluidiche per ricreare le strutture vascolari e lo spazio aereo del polmone. Il secondo approccio è quello degli scaffold decellularizzati: usa la struttura della matrice extracellulare nativa come impalcatura (figura 11).

La vera sfida della lung tissue engineering è la selezione e la gestione delle cellule usate per popolare gli scaffold, le quali conferiscono una funzione biologica aggiuntiva. L'obiettivo è quello di arrivare ad utilizzare cellule autologhe, primarie o staminali, per seminare i componenti vascolari e polmonari.

Attualmente si stanno facendo grandi passi avanti anche nel campo dei modelli in vitro che utilizzano sempre i principi dell'ingegneria tissutale. Questi modelli ci aiutano nella comprensione della biologia e della meccanica del polmone, accelerando così lo sviluppo del tessuto ingegnerizzato. [15]

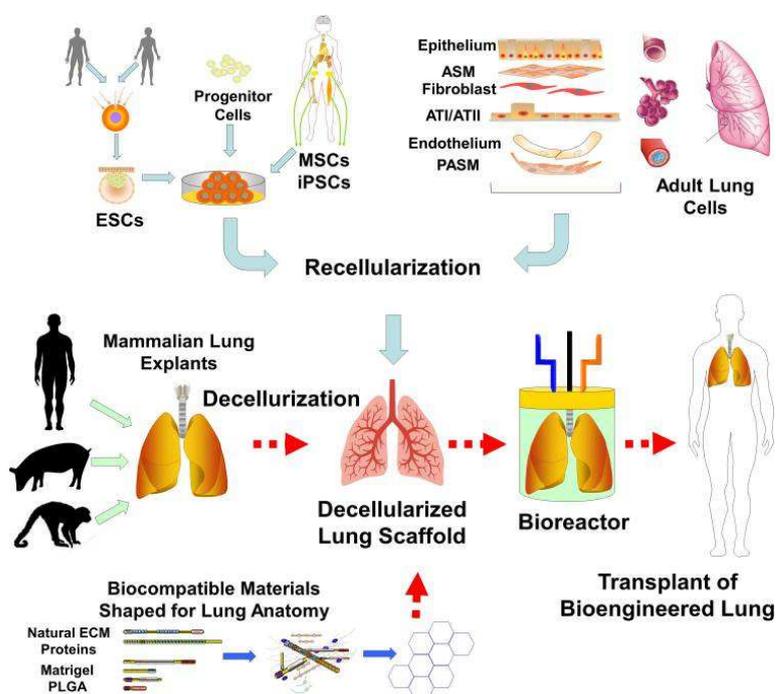


Figura 11: Per progettare un polmone ci sono due approcci. Il primo consiste nel generare uno scaffold polmonare con conseguente ricellularizzazione: si decellularizzano chimicamente ad enzimaticamente i polmoni di grandi mammiferi compreso l'uomo per creare uno scaffold contenente molte proteine dell'ECM nativa. Il secondo approccio prevede l'utilizzo degli elementi dell'ECM o di altri materiali biocompatibili per generare scaffold biocompatibili. Infine, gli scaffold decellularizzati possono essere seminati con cellule staminali embrionali, progenitrici, mesenchimali, pluripotenti indotte o anche polmonari adulte.

4.2 Gli scaffold polmonari

L'obiettivo che ha lo sviluppo di uno scaffold è quello di creare una rete vascolare ramificata e uno spazio aereo che portino direttamente a capillari e alveoli dove avviene lo scambio di gas. Questi due sistemi devono essere separati da una membrana permeabile ai gas dotata, quindi, di una superficie che consente la diffusione di ossigeno e anidride carbonica. La capacità di scambiare gas dipende da tre proprietà del polmone: ampia superficie, membrane capillari alveolari molto sottili e comportamento viscoelastico. [15]

4.2.1 Gli scaffold polmonari vascolarizzati

Per applicare l'ingegneria tissutale è necessario creare vasi sanguigni e di questo se ne occupa l'angiogenesi la quale però risulta essere un approccio limitato poiché non può affrontare la necessità di creazione di vasi più grandi da collegare alla rete capillare spontanea. Poiché un polmone ingegnerizzato deve affrontare immediatamente tutta la gittata cardiaca quando viene impiantato chirurgicamente nel paziente, i grandi vasi arteriosi e venosi devono essere completamente sviluppati e collegati ai vasi capillari fin da subito in modo da essere disponibili per un uso immediato.

Una delle prime architetture di scaffold vascolarizzate si basava sugli scaffold di ingegneria del tessuto epatico vascolarizzato, sviluppati per superare i limiti dell'angiogenesi. Il concetto che stava alla base di questa architettura era una rete di vasi sanguigni ramificati che partivano dall'arteria polmonare e andavano fino ai vasi capillari polmonari per poi essere raccolti nelle vene polmonari.

Lo scambio di ossigeno e anidride carbonica avviene attraverso una membrana respiratoria della quale ne sono state testate tre tipologie: siliconica spessa 64 micron, porosa e porosa con rivestimento in silicone da 3 micron. La differenza tra queste tre membrane non è rilevante in quanto si tratta di membrane di prima generazione su uno scaffold polmonare planare. Quest'ultimo è risultato efficiente nello scambio di gas ma la rete vascolare aveva una problematica: la mono-profondità e di conseguenza un flusso sanguigno non fisiologico in tutte le parti della rete. Per risolvere questo problema sono state prima studiate le proprietà dei vasi biomimetici, e poi è stato sviluppato uno scaffold polmonare vascolarizzato di seconda generazione.

Nella progettazione di un tessuto polmonare ingegnerizzato è molto importante anche il mantenimento all'interno di un intervallo controllato dello stress di taglio in modo da evitare l'attivazione piastrinica e la trombosi. Lo scaffold di seconda generazione presentava sforzi di taglio nell'intervallo del normale sforzo di taglio arterioso che si aggira intorno ai 10-70 dine/cm².

Le caratteristiche del flusso vengono analizzate in modo iterativo attraverso l'analisi della fluidodinamica computazionale (CFD) e grazie a questa analisi molti aspetti del progetto iniziale sono stati modificati.

Sono state introdotte numerose nuove tecnologie: inizialmente la fotolitografia che è un processo di fabbricazione per creare gli stampi ma limitatamente a una singola profondità e successivamente la microfresatura che, invece, con ottima precisione, è in grado di creare uno stampo 3D con ciascuno dei canali avente una profondità uguale alla larghezza del canale. Dai test eseguiti in vitro è stata dimostrata una eccellente correlazione con i flussi previsti dal CFD tant'è che gli scambi di gas all'interno della rete erano paragonabili a quelli negli attuali ossigenatori a fibra cava per unità di superficie, che utilizzavano una membrana di scambio in silicone. Questi dispositivi di silicone sono stati seminati anche con cellule endoteliali dopo il rivestimento con fibrinogeno e le cellule sono state fatte crescere fino alla confluenza. Sono state poi confrontate numerose geometrie di dispositivi microfluidici polmonari per verificare l'efficienza del trasferimento di gas. Successivamente è stato costruito e testato per lo scambio di ossigeno un dispositivo che utilizza un canale riempito a schermo per creare canali da 40 a 82 micron. Le analisi su questo dispositivo hanno confermato i principi generali dell'equilibrio dello scambio di gas e anche il fatto che canali di profondità minore hanno un aumento molto maggiore della pO₂ e della saturazione di ossigeno rispetto ai canali più profondi, a parità di tempo di permanenza. All'aumentare del tempo di permanenza, la percentuale di saturazione di ossigeno aumenta con un aumento maggiore per i canali di larghezza compresa tra i 40 e gli 82 micron. I dispositivi con queste dimensioni sono stati costruiti con membrane di scambio gassoso di silicone spesse 100 micron e hanno ottenuto un migliore trasferimento di ossigeno.

Nonostante quest'ultimo dispositivo progettato da Burgess abbia comportato notevoli progressi, è stato sviluppato un ulteriore dispositivo polmonare a canale rettilineo di tipo microfluidico con canali rettilinei larghi 300 micron e profondi 15 micron. Analizzandolo si è notato un aumento del trasferimento di ossigeno con una diminuzione del tempo di residenza ovvero maggiore è la velocità del flusso attraverso il dispositivo, maggiore è il trasferimento di ossigeno. Un altro dato che si è ottenuto riguarda la saturazione dell'ossigeno: i canali da 15

micron hanno presentato un aumento consistente della saturazione di ossigeno con un conseguente aumento del tempo di permanenza del sangue nei canali ma allo stesso modo i canali più superficiali di questa profondità hanno riscontrato tempi di residenza più brevi rispetto a quelli da 40 o 82 micron.

Per quanto riguarda l'ossigeno ci sono tre variabili fondamentali che influiscono sulla saturazione dell'ossigeno in questi dispositivi precedentemente elencati: tempo di permanenza del globulo rosso esposto alla membrana di scambio gassoso o velocità del sangue per una lunghezza di esposizione, profondità del canale e miscelazione del sangue. Per evitare la formazione di coaguli di sangue in questi dispositivi vanno evitate strategie di miscelazione, pertanto, le due variabili progettuali da considerare quando si costruisce un supporto sono la profondità del canale e il tempo di residenza.

Anche se idealmente sarebbe possibile utilizzare un canale con profondità di 10 micron o meno in modo simile al polmone nativo, esso risulterebbe quasi sicuramente fonte di trombosi. Dunque, l'aspettativa, derivante dagli studi, è che la dimensione minima del canale sia nell'intervallo di 50-100 micron ma potrebbe essere ridotta notevolmente se i canali fossero endotelializzati. Sebbene l'obiettivo finale sia quello di uno scaffold riassorbibile e un polmone basato su un tessuto completamente ingegnerizzato, potrebbe essere necessaria una fase intermedia che include canali endotelializzati con componenti di scaffold non riassorbibili che consentirebbero di ridurre la dimensione minima del canale vascolare. Gli attuali scaffold polmonari sono prodotti in silicone e si tratta di scaffold intermedi costituenti una fase nel processo di sviluppo per creare un'impalcatura riassorbibile adatta allo scambio di gas e alla semina con cellule epiteliali ed endoteliali polmonari. Lo scaffold in silicone non è adatto per la cellularizzazione ma può essere adatto per una funzione di assistenza polmonare o come ponte per un trapianto, dunque, si stanno conducendo studi su altri biomateriali che potrebbero essere riassorbibili come ad esempio il collagene. Quest'ultimo è un biomateriale molto resistente anche in fogli sottili ed è ideale per la cellularizzazione tant'è che dati preliminari hanno dimostrato che durante la coltura in vitro per sole due settimane con cellule endoteliali e pneumociti, lo spessore della membrana di collagene si riduce, probabilmente per via del rimodellamento cellulare. [15]

4.2.2 Gli scaffold polmonari decellularizzati

In seguito a numerosi progressi nella decellularizzazione di organi solidi si è cercato di applicare questa metodologia anche nel campo polmonare. Diversi gruppi hanno iniziato a sviluppare processi di decellularizzazione e ricellularizzazione per creare polmoni

ingegnerizzati basati su scaffold polmonari extracellulari nativi e le prime dimostrazioni sono state fatte su modelli animali.

Il gruppo Niklason ha decellularizzato polmoni di ratto e il processo ha prodotto una matrice polmonare acellulare con vie aeree e strutture vascolari preservate. Queste matrici sono state seminate con cellule epiteliali polmonari di ratto neonatale e cellule endoteliali lunghe microvascolari in un bioreattore fisiologico. Dopo un periodo di crescita *ex vivo*, un polmone sinistro è stato impiantato nel torace sinistro di un ratto e poi perfuso. Analizzando lo scambio gassoso ha dimostrato che il polmone ingegnerizzato è in grado di saturare il sangue con ossigeno con rimozione di anidride carbonica. Il polmone ingegnerizzato risultante aveva una microarchitettura simile a quella dei polmoni nativi con un'ottima cellularizzazione su tutto lo scaffold (figura 12).

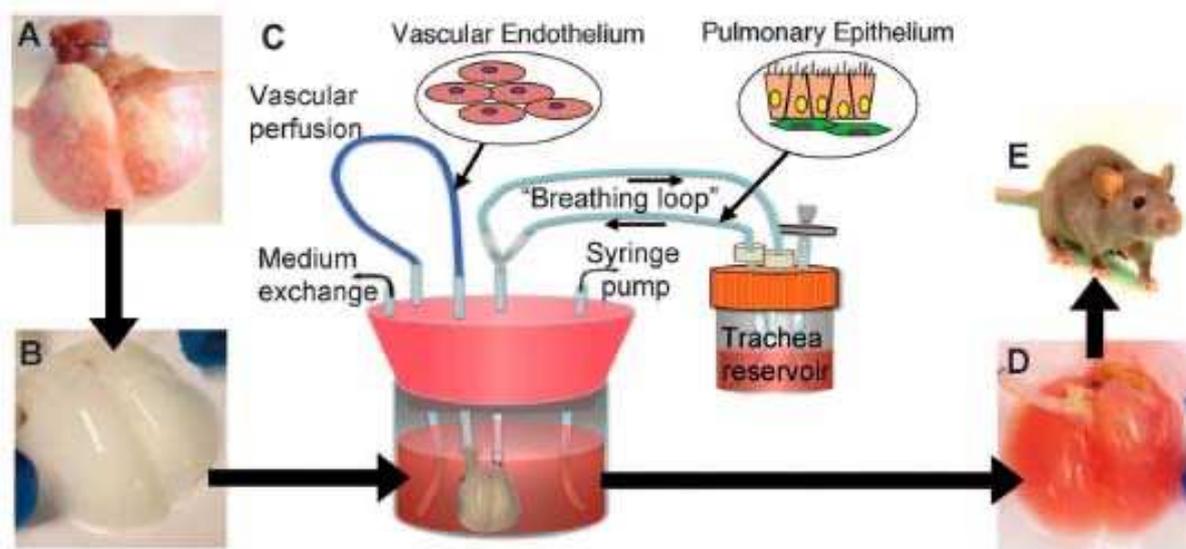


Figura 12: Processo eseguito dal gruppo di lavoro di Niklason. (A) Il polmone di ratto viene cannulato nell'arteria polmonare e nella trachea per l'infusione di soluzioni di decellularizzazione. (B) La matrice polmonare viene decellularizzata. (C) La matrice decellularizzata viene montata in un bioreattore biomimetico. (D) Dopo 4-8 giorni il polmone ingegnerizzato viene rimosso dal bioreattore. (E) Il polmone ingegnerizzato viene impiantato nel ratto ricevente.

Un'altra squadra che ha contribuito nello sviluppo di polmoni ingegnerizzati è quella di Ott e colleghi, i quali hanno utilizzato una matrice decellularizzata con soluzione di perfusione a base di sodio dodecil solfato per generare polmoni liberi da cellule con strutture alveolari e vascolari conservate. Le matrici sono state poi ricellularizzate attraverso cellule epiteliali polmonari di ratto neonatale, ottenendo la crescita di cellule alveolari di tipo II all'interno dello scaffold. Impiantando un polmone ricellularizzato si è notato che nella radiografia questo appariva

uguale al polmone nativo con tanto di scambio di ossigeno. Queste matrici acellulari sono state messe in un bioreattore personalizzato capace di ventilare gli scaffold polmonari, i quali hanno dimostrato di avere una quantità di collagene trattenuto simile a quella dei polmoni nativi, una quantità di elastina ridotta a 63% e una presenza di lamina e GAG anche nella matrice extracellulare decellularizzata.

La matrice extracellulare polmonare risultante è stata usata anche come membrana basale per la coltura di cellule staminali embrionali ESC per valutarne l'effetto che ha su quest'ultime durante la differenziazione in cellule polmonari. In queste cellule staminali embrionali si è notata una minor apoptosi sulla matrice polmonare decellularizzata e una maggiore differenziazione verso i tipi di cellule endoteliali ed epiteliali. Le ESC sono state poi usate anche nei polmoni interamente decellularizzati e anche in questo contesto si è osservata la loro capacità di differenziazione.

A seguito di queste evidenze si è compiuto un gran progresso nel campo della metodologia applicata all'ingegneria dei tessuti polmonari ma rimangono ancora molti ostacoli inclusa la fonte clinica delle cellule delle vie aeree, alveolari ed endoteliali. [15]

4.3 Modelli in vitro

L'obiettivo principale per riprodurre la struttura del polmone è quello che le cellule siano capaci di: aderire allo scaffold decellularizzato dopo essere giunte al compartimento appropriato, essere sopravvissute, aver proliferato ed essersi differenziate. Per ottenere un ripopolamento di successo bisogna: usare un fenotipo cellulare maturo, applicare stimoli fisiologici appropriati, esporre il compartimento delle vie aeree all'aria. Il tempo di coltura richiesto varia tra i 7 e i 10 giorni.

Il polmone ripopolato contiene diversi tipi cellulari e ogni tipo cellulare deve esistere in una regione del polmone differente. Le cellule polmonari di ratto neonatale hanno una maggiore varietà ed abbondanza di tipi di cellule polmonari mature e mostrano anche maggiore specificità regionale quando sono seminate nel compartimento delle vie aeree dei polmoni decellularizzati. Tuttavia, le popolazioni immature progenitrici possono essere utilizzate per produrre epitelio differenziato all'interno di una matrice acellulare quando viene fornito un supporto aggiuntivo come quello creato da cellule staminali embrionali murine predifferenziate mESC. L'impianto sottocutaneo fornisce un microambiente fisiologico che favorisce la sopravvivenza, la proliferazione e la differenziazione cellulare. Dopo due settimane di coltivazione, il polmone ripopolato e impiantato conteneva cellule positive per i marcatori epiteliali del polmone distale

ma anche cellule sparse che indicavano la presenza di cellule delle vie aeree prossimali. Dopo dieci giorni di coltura, i progenitori derivati da mESC hanno mostrato un'espressione sia regionale appropriata che robusta di marcatori epiteliali alveolari associati alla maturazione. Le mESC indifferenziate coltivate in un mezzo minimo erano disorganizzate e prive di marcatori epiteliali polmonari. I segnali biochimici sono importanti per l'incoraggiamento di tipi di cellule epiteliali polmonari specifiche a livello regionale e funzionale ma anche i segnali meccanici rivestono un ruolo importante per la maturazione delle cellule polmonari durante il loro sviluppo.

Tra i segnali meccanici c'è la ventilazione dei costrutti polmonari che promuove i fenotipi polmonari nei costrutti decellularizzati ripopolati evitando l'accumulo della proteina nelle vie aeree dei polmoni coltivati per otto giorni. I polmoni che sono stati contemporaneamente ventilati e perfusi mostravano una vitalità cellulare uguale a quella dei polmoni di ratto appena espantati infatti sia la sola ventilazione che la perfusione sono risultate essere molto più soddisfacenti rispetto alla sola coltura statica.

Con l'avvento della microfluidica sono stati condotti numerosi studi per sviluppare sistemi di test in vitro su numerosi organi, tra cui anche il polmone. I dispositivi polmonari microfluidici inizialmente presentavano un modello di interfaccia aria-liquido con un fluido che scorre sul lato delle cellule endoteliali mentre un dispositivo più recente incorporava un flusso d'aria e sangue controllato, cercando di riprodurre l'analogo anatomico dell'alveolo naturale. Quest'ultimo era composto da due canali, uno per l'aria e uno per il sangue, separati da una membrana porosa capace di essere allungata per raggiungere livelli e velocità di deformazione fisiologica. Le cellule epiteliali polmonari sono state coltivate sul lato dell'aria della membrana e le cellule endoteliali sul lato del sangue.

Infine, per un efficace ripopolamento epiteliale, le cellule staminali e progenitrici che devono essere ricapitolate sono le cellule basali, le cellule di Clara e le cellule alveolari di tipo II in quanto sono indispensabili per l'epitelio di ciascuna delle tre regioni principali del polmone: la trachea, le vie aeree e gli alveoli. Se non è possibile ottenere questo tipo di organizzazione, si deve ricorrere a fenotipi più maturi. [15] [16]

4.4 Applicazioni della TE al Covid-19

L'ingegneria tissutale è particolarmente adatta per offrire soluzioni a complesse questioni cliniche. Attualmente molte tecnologie della tissue engineering sono ancora in fase di sviluppo per aiutare sfere della medicina molto complesse come le pandemie, infatti, gli ingegneri tissutali sono al lavoro per applicare principi ingegneristici ai sistemi biologici e combattere virus noti come la SARS-CoV-2.

Il Covid-19 come già anticipato, a causa della sovraespressione delle citochine, danneggia i polmoni. Le cellule staminali mesenchimali MSC sono delle ottime candidate per la riparazione del tessuto polmonare danneggiato in quanto sono capaci di: stabilizzare la fuoriuscita del liquido endoteliale, ridurre la funzione di barriera alveolare-capillare e ridurre conseguentemente lo sviluppo di edema polmonare interstiziale. Le MSC sono in grado, secondo alcuni studi preclinici, di riparare i danni causati da: sindrome da distress respiratorio acuto, malattia cronica delle vie respiratorie inferiori e displasia broncopolmonare; infatti, queste cellule sono state testate su modelli animali sperimentali e hanno dato buoni risultati in termini di alcune malattie polmonari.

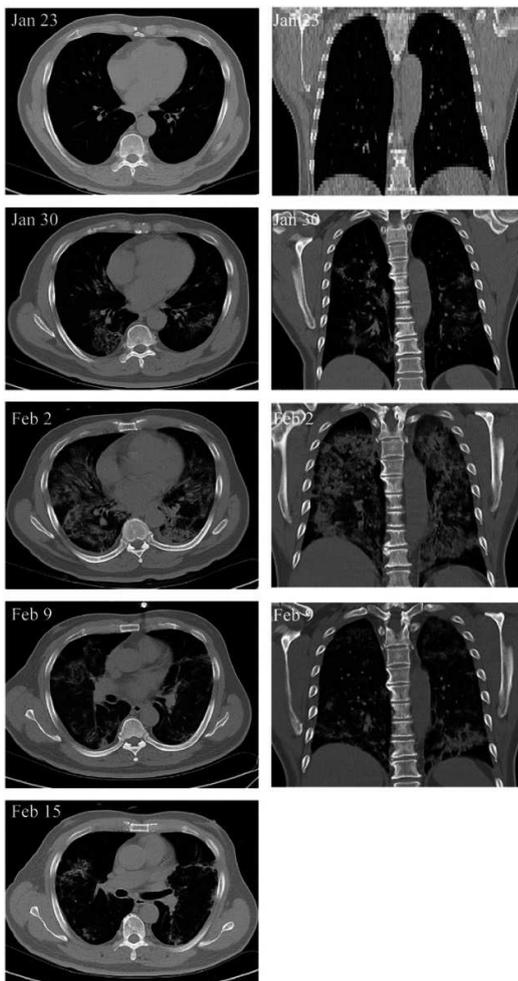


Figura 13: Il trapianto di cellule staminali mesenchimali (MSC) migliora l'esito dei pazienti con polmonite da COVID-19. Infatti, la TC ha mostrato che la polmonite era ampiamente ridotta 9 giorni dopo il trapianto delle cellule staminali mesenchimali.

Negli studi sull'uomo sono state utilizzate le cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo umano e le cellule staminali mesenchimali derivate dal tessuto adiposo umano, le quali sono state preparate per essere coltivate su un'impalcatura priva di cellule. Da questa coltura, i risultati ottenuti sono stati molto soddisfacenti, infatti, è stato dimostrato che queste cellule sono adatte per la rigenerazione e per il trattamento del polmone danneggiato e che quindi i tessuti polmonari danneggiati potrebbero essere rigenerati dopo il Covid-19.

Anche le cellule progenitrici polmonari, che sono appropriate per la vascolarizzazione del tessuto polmonare, hanno un ottimo effetto clinico sulla riparazione dei danni polmonari causati da Covid-19, infatti, le attuali strategie di semina consentono a tutti gli scaffold polmonari di essere distribuiti uniformemente attraverso le cellule endoteliali raggiungendo un'ottima copertura.

Lo sviluppo di modelli in vitro fisiologicamente rappresentativi della malattia virale può aiutare in due ruoli critici durante una pandemia: migliorare la caratterizzazione e la comprensione dell'interfaccia ospite-patogeno e dei meccanismi di infezione e come piattaforma per lo screening ad alto rendimento delle terapie. Anche se per ora capire il decorso dei pazienti affetti da SARS-CoV-2 è piuttosto impegnativo si sta cercando un modo per ottenere una migliore modellizzazione in vitro e una più accurata identificazione dei biomarcatori in modo da comprendere la risposta dell'ospite.

I biomateriali sono un'altra tecnica per riparare il tessuto polmonare danneggiato da Covid-19. I polimeri sintetici più utilizzati sono il policaprolattone, l'acido polilattico, l'acido poliglicolico e l'acido polilattico-co-glicolico poiché possono essere facilmente modificati per avere le caratteristiche desiderate. I biomateriali naturali come la cheratina, la seta, il collagene e l'elastina, forniscono una facile adesione e differenziazione delle cellule poiché contengono proteine speciali. Per la rigenerazione del tessuto polmonare vengono solitamente utilizzati materiali naturali come Matrigel e Gelfoam poiché sono in grado di supportare la crescita del tessuto polmonare ma ci sono alcune limitazioni nell'uso di matrice extracellulare sintetica o naturale. L'acido poliglicolico seminato con le cellule staminali derivate dal tessuto adiposo è stato usato come cerotto in un polmone modello e i risultati ottenuti hanno dimostrato che i tessuti alveolari e vascolari del topo erano stati rigenerati. La decellularizzazione di polmoni interi da cadaveri umani o maiali, invece, è usata come scaffold acellulare nell'ingegneria tissutale. Esistono vari biomateriali, Ling et Al. ha mostrato che lo scheletro di gelatina o di microbolle seminato con cellule staminali o progenitrici di topo è in grado di ricreare una struttura alveolare capace di supportare la proliferazione, la differenziazione e l'angiogenesi,

dunque, questi materiali costituenti questo scheletro potrebbero essere in grado di ristabilire il tessuto polmonare danneggiato. Un altro studio eseguito da parte di Horv rth et Al. ha dimostrato come l'utilizzo della biostampa 3D sia in grado di riportare la barriera del tessuto sanguigno umano in vitro, ricordando cos  il tessuto polmonare nativo umano. La biostampa 3D ricrea un modello di cellule endoteliali con strato doppio e con matrice extracellulare in Matrigel. [11] [17] [18]

4.5 Prospettive future

Negli ultimi anni sono stati compiuti molti passi avanti per quanto riguarda l'ingegneria del tessuto polmonare funzionale in vitro tant'  che il lavoro nella lung tissue engineering ha superato anche quello relativo al cuore, al fegato e al rene; ci sono stati, infatti, vari casi di decellularizzazioni di polmoni umani e suini.

Nonostante i numerosi progressi resta ancora molto lavoro e uno studio molto dettagliato soprattutto riguardo ai tre elementi centrali dell'ingegneria dei tessuti: lo scaffold, le cellule e le strategie di ricellularizzazione per produrre le cellule usate dallo scaffold e il bioreattore usato per coltivare il tessuto. Gli scaffold a matrice extracellulare decellularizzata sono attualmente i pi  usati nel campo dell'ingegneria tissutale dell'intero organo, dunque, uno degli obiettivi futuri sar  quello di identificare una fonte di scaffold affidabile in grado di avere una buona qualit  e dare una minima variabilit  tra gli scaffold. Per ripopolare gli scaffold e per generare il tessuto polmonare sar  necessario studiare attentamente le cellule staminali, progenitrici e polmonari specifiche regionali, infatti, ad oggi nessuno ha ancora trovato un metodo per la differenziazione diretta delle cellule polmonari definitive. Sar  quindi necessario determinare il numero e il tipo di cellule necessarie per generare una quantit  adeguata di tessuto polmonare funzionale che sia in grado di supportare un organismo.

Anche il bioreattore   un elemento cardine della lung tissue engineering e anche lui come gli altri elementi deve fare progressi in modo da ottenere un migliore monitoraggio del tessuto in via di sviluppo e un controllo pi  preciso degli stimoli fisici come la ventilazione e la perfusione. Per migliorare la sopravvivenza epiteliale ed endoteliale e la proliferazione, sar  necessario un maggior controllo della frequenza e del volume di ventilazione ma sar  anche di estremo aiuto portare in tre dimensioni gli strumenti molecolari e cellulari.

Tutte queste sfide sono superabili e il successo finale della rigenerazione polmonare in vitro dipender  dalla capacit  dei ricercatori di produrre un organo sufficientemente endotelializzato

evitando superfici trombogeniche per il flusso sanguigno, creando strette giunzioni cellula-cellula e producendo sostanze vasoattive dilatative. È inoltre necessaria una buona perfusione dei condotti in prossimità dell'aria altrimenti il polmone non sarà in grado di effettuare lo scambio dei gas.

In conclusione, anche se molte tecnologie sono ancora in fase di sviluppo, sono stati individuati numerosi progressi nel campo dell'ottimizzazione, del design e del ridimensionamento dei dispositivi di assistenza polmonare basati sulla microfluidica. Il perfezionamento degli scaffold decellularizzati e gli approcci di semina sono l'obiettivo della creazione di polmoni ingegnerizzati completamente funzionali per il trapianto. Ci sono stati numerosi risultati incoraggianti, come il trapianto di trachea totalmente ingegnerizzata, che suggeriscono la realizzabilità di organi solidi simili ingegnerizzati. [16] [15]

CONCLUSIONI

Le malattie polmonari sono e saranno sempre di più un problema di salute pubblica mondiale in quanto riducono la qualità della vita aumentando la necessità di ricoveri ospedalieri e il rischio di morte prematura. La scarsità di polmoni per il trapianto e la necessità dei pazienti, che hanno subito trapianto, di continuare a prendere farmaci immunosoppressori per il resto della vita sta avvicinando sempre di più l'ingegneria tissutale all'anatomia del polmone. Sebbene la bioingegneria polmonare sia ancora in una fase nascente, sono stati compiuti numerosi progressi nella comprensione degli aspetti importanti delle matrici biocompatibili che consentiranno la risemina delle cellule per generare tipi cellulari adeguati capaci di aderire, proliferare, migrare e funzionare nelle posizioni appropriate del polmone. Molti organi solidi utilizzano già questa nuova tecnologia, ne sono un esempio il cuore, la pelle, i nervi e la vescica e pertanto, nel prossimo futuro anche i polmoni bioingegnerizzati dovrebbero rivelarsi una terapia clinica efficace e alternativa per il trattamento delle malattie polmonari che attualmente richiedono un trapianto di polmone.

BIBLIOGRAFIA

- [1] G. Anastasi, M. Cannas, G. Cavaletti, S. Cinti, O. Cremona, V. D'Agata, R. De Caro, R. F. Donato, G. Familiari, F. Fornai, E. Gaudio, M. Gulisano, L. Manzoli e F. Michetti, *Anatomia Umana Splancnologia*, Milano: edi-ermes, 2020.
- [2] D. U. Silverthorn, *Fisiologia Umana: un approccio integrato*, Milano,Torino: Pearson, 2020.
- [3] R. Mypersonaltrainer, «Polmoni: anatomia e funzione,» Mondadori Media S.p.A, [Online]. Available: <https://www.my-personaltrainer.it/fisiologia/polmoni.html>.
- [4] R. Mypersonaltrainer, «Alveoli polmonari,» Mondadori Media S.p.A, [Online]. Available: <https://www.my-personaltrainer.it/fisiologia/alveoli-polmonari.html>.
- [5] R. Mypersonaltrainer, «Bronchi e bronchioli,» Mondadori Media S.p.A, [Online]. Available: <https://www.my-personaltrainer.it/fisiologia/bronchi-bronchioli.html>.
- [6] Wikipedia, «Polmone Umano,» [Online]. Available: https://it.wikipedia.org/wiki/Polmone_umano.
- [7] R. Mypersonaltrainer, «Polmoni e apparato respiratorio,» Mondadori Media S.p.A, [Online]. Available: <https://www.my-personaltrainer.it/fisiologia/polmoni1.html>.
- [8] M. Park, A. R. Cook, J. T. Lim, Y. Sun e B. L. Dickens, «A systematic Review of COVID-19 Epidemiology Based on Current Evidence,» *Journal of Clinical Medicine*, p. 967, 2020.
- [9] A. Griguolo, «SARS-CoV-2: Struttura,Proteine e Patogenesi del Nuovo Coronavirus,» Mondadori Media S.p.A, [Online]. Available: <https://www.my-personaltrainer.it/salute-benessere/sars-cov-2-struttura-proteine-patogenesi-nuovo-coronavirus.html>.
- [10] wikipedia, «COVID-19,» [Online]. Available: <https://it.wikipedia.org/wiki/COVID-19>.
- [11] A. Aydin, G. Cebi, Z. E. Demirtas, H. Erkus, A. Kucukay, M. Ok, L. Sakalli, S. Alpdagtas, O. Gunduz e C. B. Ustundag, «Combating COVID-19 with tissue engineering: a review,» *Emergent Materials*, pp. 329-349, 2021.
- [12] F. Wang, R. M. Kream e G. B. Stefano, «Long-Term Respiratory and Neurological Sequelae of COVID-19,» *Medical Science Monitor*, 2020.
- [13] R. Langer e J. Vacanti, «Advances in tissue engineering,» *Journal of Pediatric Surgery*, pp. 8-12, 2016.

- [14] wikipedia, «Ingegneria tissutale,» [Online]. Available: https://it.wikipedia.org/wiki/Ingegneria_tissutale#Proprietà_dello_scaffold_e_influenza_dei_nanomateriali_sulle_proprietà_finali.
- [15] D. M. Hoganson, E. K. Bassett e J. P. Vacanti, «Lung tissue engineering,» *Frontiers in Bioscience-Landmark*, pp. 1227-1239, 2014.
- [16] E. A. Calle, M. Ghaedi, S. Sundaram, A. Sivarapatna, M. K. Tseng e L. E. Niklason, «Strategies for whole lung tissue engineering,» *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, pp. 1482-1496, 2014.
- [17] A. M. Tatara, «Role of Tissue Engineering in COVID-19 and Future Viral Outbreaks,» *Tissue Engineering Part A*, pp. 468-474, 2020.
- [18] A. Shafiee, L. Moradi, M. Lim e J. Brown, «Coronavirus disease 2019: A tissue engineering and regenerative medicine perspective,» *Stem Cells Translational Medicine*, pp. 27-38, 2021.