

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA  
Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Scienze Cardio-Toraco-Vascolari e Sanità  
Pubblica

Direttore: Prof. Federico Rea

UOC Cardiochirurgia  
Direttore: Prof. Gino Gerosa

TESI DI LAUREA

**Valutazione *in vivo* della biocompatibilità del  
miocardio porcino decellularizzato in un  
modello preclinico animale di impianto  
sottocutaneo nel ratto**

Relatore: Prof. Gino Gerosa  
Correlatrice: Dott.ssa Saima Imran

Laureando: Alessio Colangelo

Anno Accademico 2023/2024



## INDICE

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>1</b>
<b>RIASSUNTO</b> .....	<b>3</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1. Epidemiologia delle malattie cardiovascolari</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2. Scompenso cardiaco avanzato</b> .....	<b>6</b>
<b>1.3. Alternative al trapianto cardiaco tradizionale</b> .....	<b>7</b>
1.3.1. Cuore artificiale totale .....	8
1.3.2. Xenotrapianto cardiaco .....	9
1.3.3. Cuore bioingegnerizzato .....	10
<b>1.4. Decellularizzazione del cuore</b> .....	<b>11</b>
<b>2. SCOPO DELLO STUDIO</b> .....	<b>13</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>14</b>
<b>3.1. Decellularizzazione</b> .....	<b>14</b>
3.1.1. Estrazione e quantificazione del DNA .....	15
3.1.2. Analisi istologica .....	15
<b>3.2. Decontaminazione dei tessuti</b> .....	<b>15</b>
<b>3.3. Impianto sottocutaneo nel ratto</b> .....	<b>16</b>
3.3.1. Tecnica chirurgica .....	16
3.3.2. Procedura post-operatoria .....	17
<b>3.4. Analisi istologica</b> .....	<b>18</b>
<b>3.5. Immunofluorescenza</b> .....	<b>18</b>
<b>3.6. Analisi statistica</b> .....	<b>18</b>
<b>4. RISULTATI</b> .....	<b>19</b>
<b>4.1. Decellularizzazione</b> .....	<b>19</b>
4.1.3. Quantificazione del DNA .....	19
4.1.2. Analisi istologica .....	20

<b>4.2. Analisi macroscopica .....</b>	<b>21</b>
<b>4.3. Analisi istologica .....</b>	<b>22</b>
4.3.1. Ematossilina-Eosina .....	22
4.3.2. Tricromica di Masson.....	24
4.3.4. Spessore dei tessuti .....	27
<b>4.4. Immunofluorescenza .....</b>	<b>27</b>
<b>5. DISCUSSIONE.....</b>	<b>29</b>
<b>6. CONCLUSIONE.....</b>	<b>32</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>33</b>

## ABSTRACT

**Background:** Cardiovascular disorders are the leading cause of global mortality and a major contributor to disability. The prevalence in Europe of heart failure, which can be considered the final consequence in almost all cases of cardiovascular diseases, is 1-2%, with the mortality rate of 53-67% generally after five years after diagnosis in all types of affected patients, and it increases significantly in advanced stages of disease. Currently, the gold-standard in the treatment of advanced heart failure is cardiac transplantation, which, however, has the major limitation of the scarcity of available organs. Tissue engineering represents a valuable tool to answer this problem in the future, aiming at regenerating heart muscle from a decellularized porcine heart repopulated with autologous stem cells. The present study is part of a novel decellularization protocol proposed by our research group and based on the use of Tergitol, which is found to be an efficient detergent. For the first time, this protocol was applied to a whole porcine heart.

**Aim of the study:** Evaluation of the effectiveness of the proposed decellularization protocol; *in vivo* evaluation of the biocompatibility of decellularized porcine myocardium, in order to understand if the proposed decellularization protocol can be applied for the development of scaffolds that can be used in further preclinical studies and, in the future, in the clinic

**Material and methods:** The decellularized porcine heart was studied by DNA extraction and quantification and histological analysis, in order to assess the effectiveness of decellularization and the damage caused to the extracellular matrix. For the biocompatibility study, patches of porcine myocardium taken from both the decellularized and native heart were implanted into the subcutaneous tissue of rats and subsequently explanted at 1, 4 and 8 weeks. The removed tissues were studied by histology (Hematoxylin-Eosin, Masson's Trichrome) and immunofluorescence (nucleus-specific DAPI staining).

**Results:** Analyses performed on the decellularized scaffold showed that, the proposed protocol is effective in terms of decellularization, while managing to keep

the extracellular matrix structurally intact. Histological and immunofluorescence analysis conducted on tissue samples removed from rats, after subcutaneous implantation of the decellularized myocardial patches, showed the absence of a long-term inflammatory and immune response, and no structural alterations in host tissues were detected.

**Conclusions:** Decellularized tissue has shown optimal properties in terms of biocompatibility and biodegradability, so it can be considered in further preclinical studies in higher animals, in the implementation of recellularization protocols, as well as in the development of hybrid biomaterials and decellularized scaffolds designed for the regeneration of ischemic myocardium or as models of heart disease.

## RIASSUNTO

**Presupposti dello studio:** I disturbi cardiovascolari rappresentano la principale causa di mortalità globale e uno dei principali fattori che contribuiscono alla disabilità. Lo scompenso cardiaco, che può essere considerato la conseguenza finale di quasi la totalità delle affezioni cardiovascolari, ha una prevalenza in Europa dell'1-2% e una mortalità a 5 anni dalla diagnosi, per tutti i tipi di pazienti affetti, del 53-67%, aumentando significativamente negli stadi avanzati di malattia. Attualmente, il gold-standard nel trattamento dello scompenso cardiaco avanzato è rappresentato dal trapianto cardiaco, il quale ha però l'importante limite della scarsità degli organi disponibili. L'ingegneria tissutale rappresenta un valido strumento per offrire in futuro una risposta a tale problematica, ponendosi come obiettivo la rigenerazione del muscolo cardiaco a partire da un cuore porcino decellularizzato e ripopolato con cellule staminali autologhe. Il presente studio si inserisce nell'ambito di un innovativo protocollo di decellularizzazione proposto dal nostro gruppo di ricerca e basato sull'utilizzo del Tergitolo, il quale è risultato essere un ottimo detergente. Per la prima volta, tale protocollo è stato applicato a un cuore porcino intero.

**Scopo dello studio:** Valutazione dell'efficacia del protocollo di decellularizzazione proposto; valutazione *in vivo* della biocompatibilità del miocardio porcino decellularizzato, al fine di comprendere se il protocollo di decellularizzazione proposto possa essere applicato per lo sviluppo di scaffolds utilizzabili in ulteriori studi preclinici e, in futuro, in clinica.

**Materiali a metodi:** Il cuore porcino decellularizzato è stato studiato attraverso estrazione e quantificazione del DNA e analisi istologica, al fine di valutare l'efficacia della decellularizzazione e il danno arrecato alla matrice extracellulare. Per lo studio di biocompatibilità, patches di miocardio porcino prelevati sia dal cuore decellularizzato che da quello nativo, sono stati impiantati nel tessuto sottocutaneo di ratti e successivamente asportati a 1, 4 e 8 settimane. I tessuti espuntati sono stati poi studiati mediante istologia (Ematossilina-Eosina e Tricromica di Masson) e immunofluorescenza (colorazione DAPI nucleospecifica).

**Risultati:** Le analisi condotte sullo scaffold decellularizzato hanno mostrato come il protocollo proposto sia efficace in termini di decellularizzazione, riuscendo al tempo stesso a mantenere intatta, dal punto di vista strutturale, la matrice extracellulare. L'analisi istologica e l'immunofluorescenza condotte sui campioni tissutali prelevati dai ratti, previo impianto sottocutaneo dei patches di miocardio decellularizzato, hanno mostrato l'assenza di una risposta infiammatoria e immunitaria a lungo termine e non sono state rilevate alterazioni strutturali nei tessuti dell'ospite.

**Conclusioni:** Il tessuto decellularizzato ha mostrato proprietà ottimali in termini di biocompatibilità e di biodegradabilità, tali per cui può essere considerato in ulteriori studi preclinici su animali di grossa taglia, nell'implementazione di protocolli di ricellularizzazione, oltre che nello sviluppo di biomateriali ibridi e scaffolds decellularizzati pensati per la rigenerazione del miocardio ischemico o per la realizzazione di modelli di malattia cardiaca.

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1. Epidemiologia delle malattie cardiovascolari

Le malattie cardiovascolari, in particolare la cardiopatia ischemica e l'ictus, rappresentano la principale causa di mortalità globale e uno dei principali fattori che contribuiscono alla disabilità. Considerando gli ultimi 30 anni, la prevalenza delle malattie cardiovascolari è quasi raddoppiata, passando da 271 milioni di casi al mondo nel 1990 a 523 milioni nel 2019, e il numero di decessi ad esse imputabili è costantemente aumentato, passando dai 12,1 milioni nel 1990 a 18,6 milioni nel 2019<sup>1</sup>. La cardiopatia ischemica è responsabile di circa la metà di questi decessi (49,2%), mentre in misura minore contribuiscono altre patologie cardiache come la cardiopatia ipertensiva (6,2 %), le cardiomiopatie (1,8%), la fibrillazione atriale (1,7%), le cardiopatie valvolari non reumatiche (0,9%), l'endocardite (0,4%)<sup>1</sup>.

Anche in Europa le malattie cardiovascolari rappresentano la principale causa di morte: nel 2019 si sono registrati 12,7 milioni di nuovi casi nei 57 paesi aderenti alla Società Europea di Cardiologia (ESC), con 2,2 milioni di morti nel sesso femminile e 1,9 milioni nel sesso maschile, dei quali circa il 26% sotto i 70 anni<sup>2</sup>. Per avere un'idea della gravità e dell'impatto che le malattie cardiovascolari hanno sulla salute pubblica, si può considerare il DALY (disability-adjusted Life year), indicatore che misura il numero di anni persi a causa della malattia per disabilità o per morte prematura: nel 2019 i DALYs per malattie cardiovascolari sono stati ben 85 milioni circa nei paesi membri dell'ESC<sup>2</sup>.

Quando si parla di disabilità nell'ambito delle malattie cardiache, si fa riferimento soprattutto allo scompenso cardiaco, condizione che può essere considerata la destinazione finale di quasi la totalità delle malattie cardiovascolari. Lo scompenso cardiaco è definito come una sindrome clinica caratterizzata dalla presenza di sintomi cardinali (ad es. dispnea, edemi declivi, astenia) che può essere accompagnata da segni quali turgore giugulare, edemi periferici o rumori umidi polmonari, ed è causata da alterazioni strutturali e/o funzionali del cuore che determinano elevate pressioni intracardiache e/o un'inadeguata portata cardiaca a riposo e/o durante l'esercizio fisico<sup>3</sup>. Le cause più comuni di scompenso cardiaco sono rappresentate dalla cardiopatia ischemica, dall'ipertensione e dalle cardiopatie valvolari; si riconoscono tuttavia numerose altre eziologie tra cui cardiomiopatie familiari o genetiche, miocardite, aritmie, malattie infiltrative del cuore, malattie

autoimmuni o reumatologiche, tireopatie e altri disordini endocrini o metabolici, abuso di sostanze (alcol, cocaina, metanfetamina)<sup>4</sup>.

Considerando l'epidemiologia delle malattie cardiovascolari, è facile immaginare come lo scompenso cardiaco rappresenti una vera e propria epidemia: attualmente in Europa la prevalenza nella popolazione generale è dell'1-2%, con 3,2 nuovi casi l'anno ogni 1000 persone<sup>5</sup>. In Italia, lo scompenso cardiaco rappresenta la prima causa di ospedalizzazione dopo i 65 anni<sup>6</sup> e più della metà dei pazienti dimessi con tale diagnosi ha una re-ospedalizzazione entro i 12 mesi, per un costo complessivo per il Sistema Sanitario Nazionale pari a quasi 12 mila euro l'anno per paziente<sup>7</sup>. La mortalità a 5 anni dalla diagnosi, per tutti i tipi di pazienti con scompenso cardiaco, si attesta al 53-67%<sup>8,9</sup> e aumenta significativamente negli stadi avanzati di malattia<sup>10</sup>.

## **1.2. Scompenso cardiaco avanzato**

Considerando la classificazione ACC/AHA (American College of Cardiology/American Heart Association) dello scompenso cardiaco, la quale si concentra sullo sviluppo e sulla progressione della malattia, si distinguono quattro stadi: stadio A (paziente a rischio di scompenso cardiaco), stadio B (pre-scompenso cardiaco), stadio C (scompenso cardiaco sintomatico) e stadio D (scompenso cardiaco avanzato). Quest'ultimo è definito dalla presenza di un'importante sintomatologia da scompenso cardiaco che interferisce con la vita quotidiana e da ricorrenti ospedalizzazioni nonostante la terapia medica massimale. Si tratta di una condizione drammatica, che compromette in modo significativo la qualità della vita e caratterizzata da un'elevatissima mortalità, la quale, a 1 anno dalla diagnosi, arriva al 75%<sup>11</sup>.

Il trattamento gold standard per i pazienti con scompenso cardiaco avanzato, in assenza di controindicazioni, rimane il trapianto cardiaco: esso garantisce una sopravvivenza media di oltre 12 anni, che si estende a quasi 15 anni per i pazienti che sopravvivono al primo anno dal trapianto, con netti miglioramenti della qualità della vita oltre che dello status funzionale<sup>12</sup>.

Purtroppo, però, esiste un importante limite al trapianto cardiaco, ossia la scarsità di organi disponibili, il che si traduce in liste d'attesa troppo lunghe alle quali si associa un'aumentata mortalità nei pazienti che aspettano un cuore. Nel corso degli

ultimi anni sono state attuate diverse strategie al fine di risolvere, almeno in parte, tale problematica, tra cui l'estensione dei criteri di donazione e l'utilizzo di cuori provenienti da donatori in morte cardiocircolatoria (DCD). In merito a quest'ultimo punto, in Italia, il primo trapianto di cuore prelevato da donatore a cuore fermo è stato eseguito a Padova nel 2023 dell'equipe del Prof. G. Gerosa, superando così la grande barriera dell'ischemia cardiaca, una sfida piuttosto ardua considerando i 20 minuti di ECG piatto necessari per la constatazione di morte cardiocircolatoria secondo la legge italiana (uno dei più lunghi al mondo)<sup>13</sup>. Subito dopo altri 5 centri hanno replicato l'intervento, per un totale di 13 trapianti da donatore DCD nel 2023, dimostrando come la procedura di ricondizionamento del cuore messa in atto sia ripetibile e riproducibile.

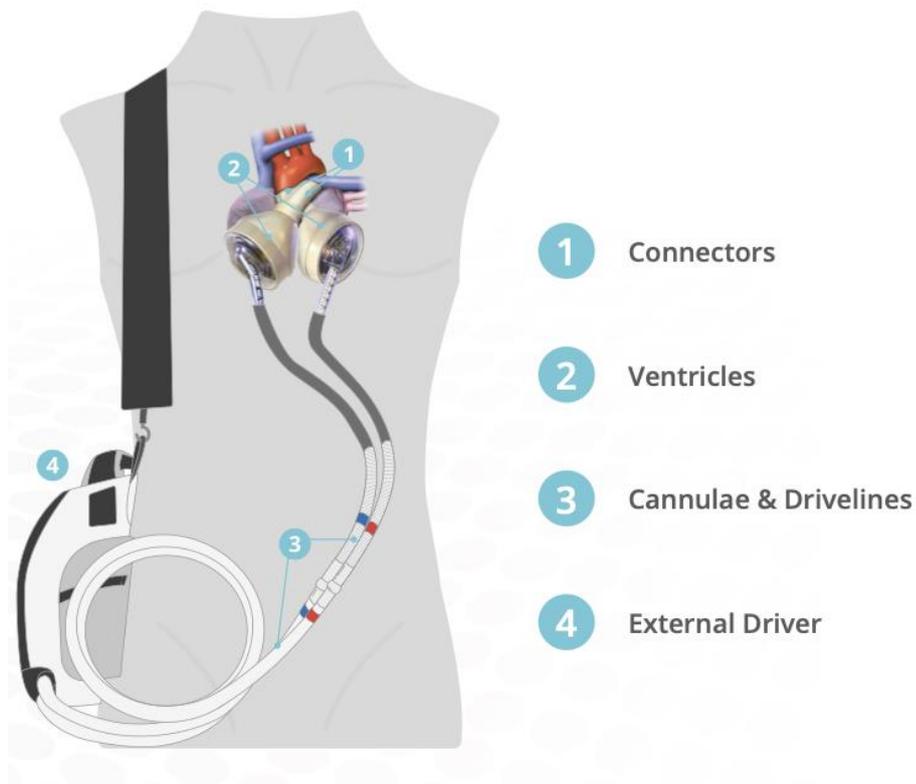
Tutto ciò, però, non è ancora sufficiente a soddisfare le richieste dettate dalle liste d'attesa. In Italia, secondo gli ultimi report del Centro Nazionale Trapianti, nel periodo che va dal 2002 al 2021, la probabilità di uscita della lista per decesso o peggioramento è stata del 8,8 % a 6 mesi e del 12,6% a 1 anno, più di 1 paziente su 10. Nel 2021 le iscrizioni in lista d'attesa di pazienti adulti sono state in totale 920 (pazienti iscritti ad inizio anno + nuovi ingressi dell'anno) nelle 14 strutture autorizzate al trapianto di cuore, con 226 trapianti nel corso dell'anno e 67 decessi in lista (mortalità in lista del 6,9%)<sup>14</sup>. I dati relativi al 2022 sono pressoché sovrapponibili<sup>15</sup>, invece nel 2023, secondo i dati preliminari, abbiamo assistito ad un incoraggiante aumento dei trapianti di cuore del 46%, in parte grazie anche alle strategie sopra menzionate, ma ciò non è ancora abbastanza<sup>16</sup>.

### **1.3. Alternative al trapianto cardiaco tradizionale**

È necessario, dunque, che la ricerca si spinga verso soluzioni alternative al trapianto cardiaco tradizionale che garantiscano risultati ad esso assimilabili. Allo stato attuale, esistono tre possibilità su cui si sta lavorando e che un giorno potrebbero diventare delle realtà applicabili in clinica: il cuore artificiale totale, lo xenotrapianto cardiaco e il cuore bioingegnerizzato.

### 1.3.1. Cuore artificiale totale

L'idea di un dispositivo artificiale che potesse sostituirsi al cuore umano vive ormai da molti decenni, ma nonostante i numerosi tentativi fatti nel corso degli anni, ad oggi un solo dispositivo è approvato per l'uso clinico: il SynCardia TAH. Esso è il risultato di numerose rifiniture attuate sul modello ideato già nella metà degli anni 60' dal Dr. Domingo Santo Liotta e si basa su un sistema biventricolare pulsatile ad azionamento pneumatico, con due ventricoli artificiali impiantabili collegati ad una unità esterna che funge da compressore<sup>17</sup>. Nonostante i buoni risultati dal punto di vista del supporto emodinamico, esso non garantisce una qualità di vita ottimale, soprattutto a causa dell'unità esterna piuttosto ingombrante e molto rumorosa, per questo può essere pensato soltanto come ponte al trapianto cardiaco e non come trattamento definitivo. Pochi altri dispositivi sono in corso di sviluppo, tra cui il Carmat TAH in Francia e il ReinHart in Germania<sup>18</sup>; anche in Italia, presso l'Università degli studi di Padova, si sta lavorando su questo obiettivo, e quella della realizzazione di un cuore artificiale totale che sia biocompatibile, di ridotte dimensioni e che garantisca una soddisfacente qualità di vita, rimane una sfida aperta.



**Figura 1:** SynCardia TAH (<https://www.syncardia.com/#anchor1>)

### 1.3.2. Xenotrapianto cardiaco

Anche l'idea dello xenotrapianto arde da sempre nella mente dei cardiocirurghi. Il primo tentativo risale addirittura al 1964 quando, presso l'Università del Mississippi, fu trapiantato un cuore di scimpanzé in un uomo di 64 anni affetto da una severa cardiopatia ischemica. A causa del rigetto iperacuto e delle dimensioni ridotte del cuore donato, non sufficienti per supportare il circolo di un uomo adulto, il paziente morì in sala operatoria<sup>19</sup>. Diversi altri tentativi sono stati descritti nel corso degli anni successivi, tutti senza successo, principalmente a causa della reazione di rigetto contestualmente all'utilizzo di terapie immunosoppressive non adeguate, per cui di fatto questa pratica è stata poi abbandonata. La svolta è arrivata con la scoperta e l'utilizzo di nuove tecniche di biologia molecolare, le quali hanno permesso lo sviluppo di organi geneticamente modificati al fine di superare quelle che sono le principali barriere nell'ambito dello xenotrapianto: le reazioni di rigetto, le disfunzioni della coagulazione, la trasmissione virale, la crescita dello xenograft<sup>20</sup>. Il primo maiale transgenico pensato per lo xenotrapianto era caratterizzato dall'espressione endoteliale del fattore di accelerazione del decadimento del complemento umano (CD55). Cuori provenienti da questi maiali sono stati trapiantati in primati non umani, riuscendo però ad ottenere solo un parziale controllo del rigetto iperacuto, principalmente a causa della risposta immune anticorpo-mediata diretta verso specifici antigeni di natura glucidica (tra cui l'alpha-1,3-galactosiltransferasi) espressi dalle cellule endoteliali del graft<sup>21</sup>. Usando tecniche di gene-editing si è passati quindi alla delezione degli antigeni Gal con lo scopo di controllare il rigetto iperacuto; numerose altre modifiche genetiche sono state poi sperimentate a carico di geni coinvolti nella risposta immune, nella coagulazione, nella risposta infiammatoria, nei processi di morte cellulare e di crescita dello xenograft, e parallelamente è stata messa a punto una adeguata terapia immunosoppressiva. Tutto ciò ha permesso di migliorare considerevolmente la sopravvivenza degli xenografts nei modelli preclinici<sup>22</sup> e di arrivare al primo xenotrapianto di cuore geneticamente modificato dal maiale all'uomo: l'intervento è stato eseguito nel Gennaio 2022 a Baltimora dall'equipe del Prof. B. P. Griffith, in seguito all'approvazione da parte dell'FDA, come trattamento compassionevole in un paziente di 57 anni affetto da scompenso cardiaco avanzato non candidabile a trapianto cardiaco tradizionale. Il paziente è sopravvissuto per 2 mesi, dimostrando che la funzione cardiaca dello xenograft è in grado di supportare il

circolo in un uomo adulto e che lo xenotrapianto potrebbe effettivamente diventare una realtà applicabile in ambito clinico<sup>23</sup>.

Genetic Modification	Mechanisms	Properties
<b>Xenogeneic Carbohydrate Knockout</b>		
<b>Galactose-<math>\alpha</math>-1,3-galactose KO (GTKO)</b>	Deletion of immunogenic Galactose- $\alpha$ -1,3-galactose (Gal) glycan through knockout of the synthetic enzyme alpha1,3-galactosyltransferase (GT)	Anti-Immunogenic
<b><math>\beta</math>1,4-N-acetylgalactosyltransferase KO (B4GalKO)</b>	Deletion of immunogenic blood group SDa antigen through knockout of the synthetic enzyme (B4GalINT2)	
<b>CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase KO (CMAHKO)</b>	Deletion of immunogenic glycan N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) through knockout of the synthetic enzyme CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMAH)	
<b>Growth Hormone Receptor Knockout (GHRKO)</b>	Reduction of downstream insulin growth factor-1 (IGF-1) signaling	Reduce intrinsic graft growth
<b>Human Transgene Expression</b>		
<b>CD46</b>	Suppress human complement activity by mediating cleavage of C3b and C4b complement deposition	Complement Regulation
<b>Decay Accelerating Factor (DAF)</b>	Inhibits C3 and C5 convertase enzymes and downstream complement activation	
<b>Endothelial Cell Protein C Receptor (EPCR)</b>	Activates Protein C	Anti-Coagulation
<b>Thrombomodulin (TBM)</b>	Binds human thrombin, and activates Protein C via activated thrombin	
<b>Hemeoxygenase-1 (HO-1)</b>	Decreases oxidative products	Anti-Inflammatory
<b>CD47</b>	Interacts with macrophage signal regulatory protein (SIRP) $\alpha$ to prevent opsonization and phagocytosis of xenogeneic tissue	

**Tabella I:** modifiche genetiche nel primo xenotrapianto di cuore maiale-uomo (Griffith, B. et al. *Genetically Modified Porcine-to-Human Cardiac Xenotransplantation. N Engl J Med. 2022 Jul 7;387(1):35-44. doi: 10.1056/NEJMoa2201422.*)<sup>23</sup>

### 1.3.3. Cuore bioingegnerizzato

I grandi passi avanti fatti dell'ingegneria tissutale e dalla medicina rigenerativa nel corso degli ultimi anni, hanno fatto in modo che si affiancasse a quelle del cuore artificiale totale e dello xenotrapianto cardiaco, un'ulteriore ambiziosa idea: sviluppare un un cuore bioingegnerizzato partendo da un cuore porcino decellularizzato e ripopolato con cellule staminali autologhe del ricevente; in quest'ambito si inserisce il presente lavoro di tesi.

Tre sono i pilastri su cui si basa l'ingegneria genetica: scaffolds, cellule staminali e fattori di crescita. Pioneristici in questo senso sono stati i lavori di Ott *et al* che nel

2008 descrissero per la prima volta una tecnica per lo sviluppo di un cuore bioingegnerizzato: partirono dalla decellularizzazione di un cuore intero di ratto che in seguito ripopolarono con cellule cardiache neonatali e con cellule endoteliali aortiche di ratto, dimostrando la presenza di attività elettrica contrattile nel costrutto ricellularizzato dopo 8 giorni di coltura cellulare in specifici bioreattori<sup>24</sup>. Sulla scia di questi lavori, numerosi altri gruppi negli anni successivi hanno sperimentato protocolli di decellularizzazione e ricellularizzazione in cuori di ratto, di topo, di coniglio, di maiale e, infine, anche in cuori umani. Wainwright *et al* descrissero per la prima volta nel 2010 un protocollo di decellularizzazione applicato ad un cuore porcino intero che ricellularizzarono con cardiomiociti embrionali di pollo livornese bianco<sup>25</sup>. Weymann *et al*, invece, svilupparono per la prima volta nel 2014 un cuore porcino intero bioingegnerizzato con attività elettrica intrinseca<sup>26</sup>. In tutti questi lavori, comune è l'utilizzo del Triton X-100 come detergente. Esso ha mostrato ottimi risultati in termini di decellularizzazione, tuttavia, come specificato in una nota emanata dall'FDA del 2017, possiede un profilo di sicurezza inadeguato per l'uso clinico<sup>28</sup>. La ricerca si è quindi spostata verso altri possibili sostituti.

#### **1.4. Decellularizzazione del cuore**

Il presente studio si inserisce nell'ambito di un innovativo protocollo di decellularizzazione proposto dal nostro gruppo di ricerca, il quale è stato in parte ripreso da quello pubblicato da Remlinger *et al* nel 2012<sup>27</sup>, ma con una sostanziale differenza, ossia l'uso del Tergitolo in sostituzione al Triton X-100 come detergente. Il protocollo in questione è stato per la prima volta applicato alla decellularizzazione di un cuore porcino intero e lo scopo di questo lavoro è quello di valutarne la biocompatibilità *in vivo* in un modello murino.

D'altra parte, quello trapiantologico non è l'unico possibile ambito di applicazione di tali tecniche di ingegneria tissutale. Per esempio, gli scaffolds decellularizzati sono ampiamente studiati nella rigenerazione del cuore, soprattutto post danno ischemico. Diversi lavori, condotti sia *in vitro* che *in vivo*, dimostrano come l'applicazione di cerotti cardiaci decellularizzati possa promuovere la rigenerazione del tessuto cardiaco; tra questi, scaffolds derivanti dal cuore porcino sono tra i più studiati.<sup>29, 30, 31</sup>

Ingegnerizzare il tessuto cardiaco è estremamente complesso, per cui c'è molta strada ancora da percorrere prima che scaffolds di questo tipo possano essere utilizzati di routine nella pratica clinica, tuttavia, i risultati fino ad ora ottenuti sono molto incoraggianti.

## 2. SCOPO DELLO STUDIO

Gli scopi del presente studio sono:

- Valutazione dell'efficacia del protocollo di decellularizzazione proposto, attraverso estrazione e quantificazione del DNA e analisi istologica dello scaffold decellularizzato ottenuto dal cuore porcino;
- Valutazione della biocompatibilità *in vivo* del miocardio porcino decellularizzato, al fine di comprendere se il protocollo di decellularizzazione proposto, basato sull'uso del Tergitolo, possa essere applicato per lo sviluppo di scaffolds utilizzabili in ulteriori studi preclinici e, in futuro, in clinica.

### 3. MATERIALI E METODI

Dopo aver decellularizzato il cuore, è necessario procedere alla caratterizzazione del tessuto, con lo scopo di valutare l'efficacia della decellularizzazione e il danno arrecato alla matrice extracellulare. A tal fine, è stato estratto e quantificato il DNA dal tessuto ottenuto e lo stesso è stato valutato attraverso analisi istologica. Patches ottenuti dal cuore decellularizzato e dal cuore nativo sono stati poi decontaminati, prima di procedere all'impianto sottocutaneo nei ratti. A 1, 4 e 8 settimane sono stati quindi asportati campioni tissutali dalle zone di impianto e sottoposti ad analisi istologica e immunofluorescenza al fine di valutarne la biocompatibilità.

#### 3.1. Decellularizzazione

I cuori di origine porcina sono stati forniti dal macello locale. Sono stati perfusi per 30 minuti con soluzione fisiologica contenente eparina (5 UI/ml, Pharmatex, Milano, Italia) e poi immersi nella stessa soluzione durante il trasporto in laboratorio. Una volta lavato il sangue residuo e rimosso il tessuto adiposo in eccesso, i cuori sono stati congelati a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Per la decellularizzazione, i cuori sono stati scongelati a  $4^{\circ}\text{C}$  per una notte intera, immersi in soluzione fisiologica. È stato utilizzato un apparato di decellularizzazione costruito su misura e caratterizzato da tubi in silicone connessi ad una pompa peristaltica (Stockert Shiley 10-10-00 CAPS Multiflow, Germania) per scambiare le soluzioni. Il protocollo di decellularizzazione, parzialmente ripreso da quello pubblicato da Remlinger *et al* e basato su un sistema di perfusione coronarica retrograda, ha compreso:

- cicli con Sodio Dodecil Solfato SDS (3%, 60 min per ciclo), per la denaturazione delle proteine;
- cicli con Tergitolo (3%, 60 min per ciclo), detergente non ionico che rimuove ogni tipo di cellula;
- risciacquo con acqua distillata;
- shock osmotico con PBS;
- un ciclo di Acido Peracetico 0,1% / Etanolo 4% (90 min) per la disinfezione e la rimozione della biomassa;

Per ogni ciclo sono stati applicati circa 3-4 litri di soluzione.

### **3.1.1. Estrazione e quantificazione del DNA**

Dopo la decellularizzazione, i tessuti sono stati congelati a  $-20^{\circ}\text{C}$  prima di procedere alla liofilizzazione degli stessi, necessaria per le analisi. Sono stati utilizzati sia tessuti ricavati dal cuore decellularizzato, sia tessuti ricavati dal cuore nativo, utili al confronto. Per l'estrazione del DNA è stato utilizzato il DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen®, USA) seguendo il protocollo previsto. In breve, i campioni sono stati trattati con Proteinase K per una notte intera (16 ore circa) nel Thermomixer 750 rpm, quindi con tamponi ed Etanolo forniti dal Kit, utilizzando specifiche colonne. Infine, è stata quantificata la concentrazione del DNA mediante Nanodrop One (thermo scientific).

### **3.1.2. Analisi istologica**

Al fine dell'analisi istologica, sono stati ricavati patches dal ventricolo sinistro, ventricolo destro, auricola sinistra e auricola destra, sia dal cuore decellularizzato che da quello nativo. I campioni sono stati congelati con OCT e sezionati al microtomo criostato rotativo (NX 70 HOMVDP Cryostar) con uno spessore di 7 micron. Dopo la sezione, i vetrini ottenuti sono stati colorati con Ematossilina-Eosina (Bio-Optica, 04-061010). Le immagini sono state ottenute utilizzando un microscopio Evos e processate con Fiji software (version 1.51n).

## **3.2. Decontaminazione dei tessuti**

Prima dell'impianto sottocutaneo nei ratti, i patches di miocardio decellularizzato e nativo sono stati sottoposti ad una procedura di decontaminazione, in accordo con le linee guida dell'European Pharmacopoeia, al fine di garantirne la sterilità. Nello specifico, i campioni sono stati trattati con una soluzione di antibiotici contenente Gentamicina 0,08%, Amfotericina 10%, Cefazolina 1% e Vancomicina 0.1%.

### 3.3. Impianto sottocutaneo nel ratto

La chirurgia e l'allevamento dei ratti sono stati praticati in accordo con le linee guida Italiane sull'uso degli animali da esperimento, in seguito all'approvazione da parte del Comitato Etico dell'Università Degli Studi di Padova e del Ministero della Salute (Aut. no. 782/2021-PR. prot. 965E9.41, July, 14, 2021). È stato condotto uno studio di coorte su un totale di 22 ratti Sprague-Dawley. Per gli impianti sono stati utilizzati patches ovali con diametro di 8mm e spessore di 400  $\mu$ m, ricavati dal cuore decellularizzato e dal cuore nativo. I ratti dei gruppi di controllo hanno ricevuto la sola incisione cutanea e successiva sutura, senza l'applicazione alcuna di patches nel sottocute. I ratti sono stati così suddivisi:

- gruppo 'DC Week 1' (n=4 ratti): impianto sottocutaneo di patch di tessuto miocardico decellularizzato e prelievo dello stesso dopo 1 settimana;
- gruppo 'DC Week 4' (n=4 ratti): impianto sottocutaneo di patch di tessuto miocardico decellularizzato e prelievo dello stesso dopo 4 settimane;
- gruppo 'DC Week 8' (n=4 ratti): impianto sottocutaneo di patch di tessuto miocardico decellularizzato e prelievo dello stesso dopo 8 settimane;
- gruppo 'Native Week 1' (n=4 ratti): impianto sottocutaneo di patch di tessuto miocardico nativo e prelievo dello stesso dopo 1 settimana;
- 3 gruppi di controllo 'Ctrl' (n=2 ratti per ogni gruppo): incisione cutanea e successiva sutura della stessa, con prelievo del tessuto dopo 1, 4 e 8 settimane.

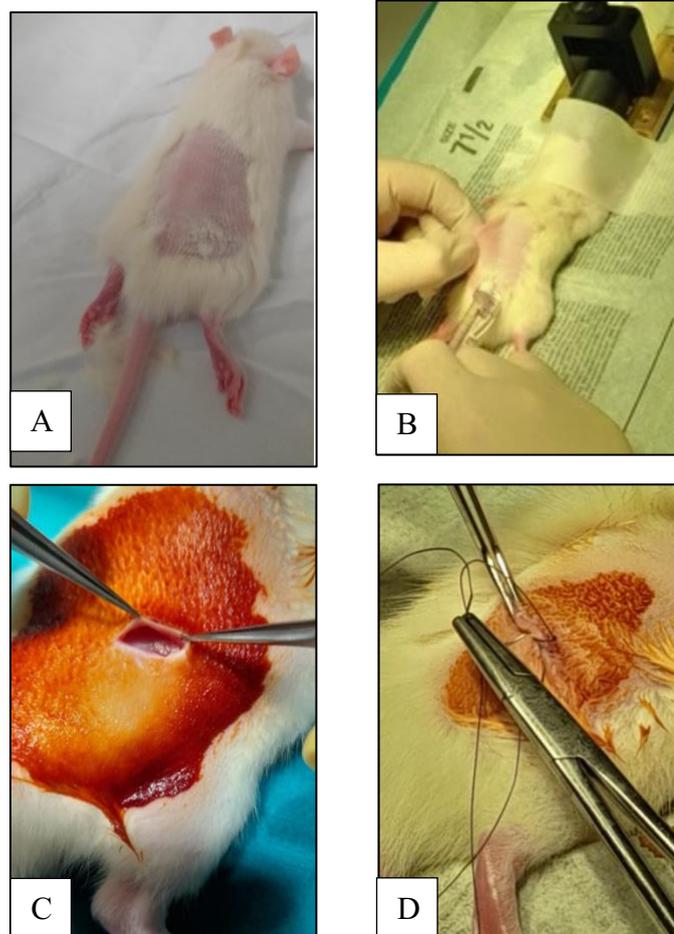
#### 3.3.1. Tecnica chirurgica

I ratti sono stati sottoposti ad anestesia profonda mediante Sevoflurano 5% (Sevorane, Abbott) durante la fase di induzione e ossigeno 1L/min durante la fase di mantenimento. Dopo aver accertato l'assenza dei riflessi, i ratti sono stati collocati sul tavolo operatorio e delicatamente rasati sul dorso. L'area di incisione è stata disinfettata con Iodopovidone 7,5% soluzione cutanea (Braunol, Braun) e una iniezione sottocutanea di Bupivacaina (1 mg/kg, Monico) e Cefazolina (1 g/kg, Teva) è stata effettuata al fine di assicurare un'adeguata analgesia e copertura antibiotica. Successivamente, è stata praticata un'incisione di 1-2 cm prima di

procedere all'impianto sottocutaneo del patch, il quale è stato fissato mediante una singola sutura 2.0 Novosyn (Braun). In seguito alla chiusura della laparotomia, gli animali sono stati risvegliati e tenuti in osservazione per 15 minuti in gabbie post-anestesia fino al ripristino delle normali funzioni motorie e respiratorie.

### 3.3.2. Procedura post-operatoria

Dopo l'intervento, gli animali sono stati alloggiati in gabbie con accesso ad libitum a cibo e acqua, fino all'eutanasia. Nessun ratto ha riportato complicanze post-operatorie. I ratti sono stati soppressi mediante aspirazione di CO<sub>2</sub> a 1 (n=10 ratti), 4 (n=6 ratti) e 8 (n=6 ratti) settimane dall'intervento. In seguito all'eutanasia, le aree di tessuto cutaneo e sottocutaneo interessate dall'impianto dei patches e le sezioni controllo, sono state espianate e preparate per le analisi.



**Figura 2:** procedura operatoria: rasatura (A), profilassi antibiotica (B), incisione cutanea per l'impianto del patch (C), sutura (D).

### **3.4. Analisi istologica**

I campioni tissutali prelevati dai ratti sono stati conservati in Formalina 10% v/v, quindi congelati con OCT e sezionati mediante microtomo criostato rotativo (NX 70 HOMVPD Cryostat) con spessore di 7  $\mu\text{m}$ . Al fine dell'analisi istologica, i vetrini ottenuti sono stati colorati con Ematossilina-Eosina (Bio-Optica, 04-061010) e Tricromica di Masson (Bio-Optica, 04-01082). Tutte le colorazioni sono state eseguite seguendo i protocolli forniti dai kit utilizzati. Successivamente, sono state ricavate le immagini mediante microscopio Evos, poi processate con ImageJ.app (versione 1.53).

### **3.5. Immunofluorescenza**

Per la valutazione della cellularità dei campioni tissutali espianati, è stata effettuata un'analisi di immunofluorescenza mediante colorazione DAPI, specifica per i nuclei. A tal fine, la procedura ha previsto:

- sezione dei campioni congelati mediante microtomo criostato rotativo (NX 70 HOMVPD Cryostat) con spessore di 7-9  $\mu\text{m}$ ;
- fissaggio con Metanolo per 10 min a  $-20^{\circ}\text{C}$ ;
- blocking con BSA 1% e Triton X-100 0,01% per 1 ora a temperatura ambiente;
- colorazione nucleare DAPI (Termo Fisher Scientific, R37606), seguendo il protocollo previsto dal kit utilizzato.

Sono state poi ottenute le immagini attraverso l'utilizzo del microscopio confocale Leica, in seguito processate con ImageJ.app (versione 1.53).

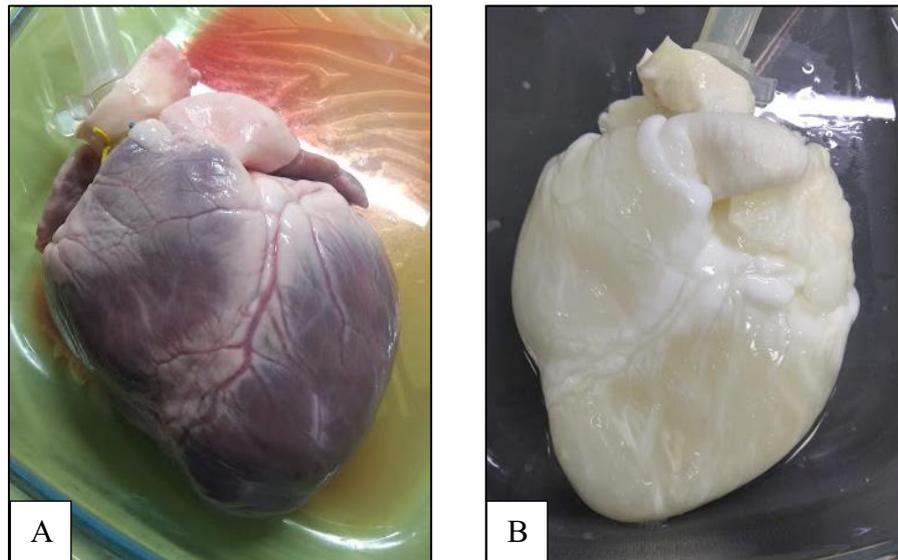
### **3.6. Analisi statistica**

I dati ottenuti sono stati calcolati come media  $\pm$  DS di ogni replica dell'esperimento. È stata eseguita un'ANOVA unidirezionale per confrontare i gruppi degli esperimenti e la differenza tra i due gruppi è stata presentata come statisticamente significativa quando  $p < 0,05$ .

## 4. RISULTATI

### 4.1. Decellularizzazione

Dopo la decellularizzazione, dal punto di vista macroscopico il tessuto appariva bianco, per l'effetto dell'acido peracetico, senza alcuna rottura o alterazione morfologica macroscopicamente evidente.



*Figura 3: Cuore porcino nativo (A) e decellularizzato (B).*

#### 4.1.3. Quantificazione del DNA

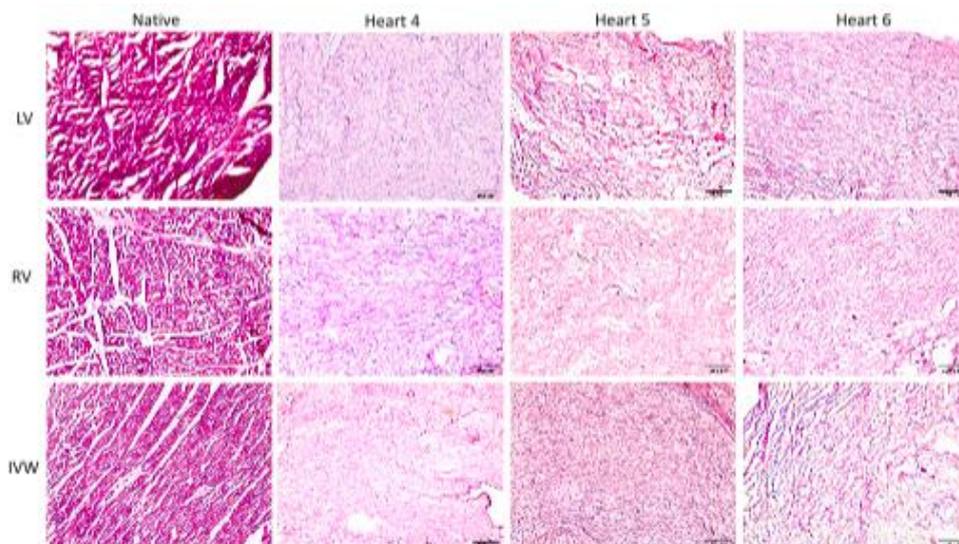
Dopo l'estrazione del DNA, la sua concentrazione è stata misurata tramite Nanodrop One. In tutti i campioni tissutali provenienti dal cuore decellularizzato è stata registrata una concentrazione di DNA minore di 50 ng/mg, soglia da rispettare affinché un tessuto possa essere considerato decellularizzato<sup>32</sup>. Come mostrato in Tabella II, la percentuale di riduzione del DNA dal tessuto nativo a quello decellularizzato, è risultata essere significativa, senza l'utilizzo di endonucleasi.

DNA reduction (%)	Heart 1	Heart 2	Heart 3
LA	94.3	97.9	98.4
LV	5.1	93.0	96.9
IVW	81.7	95.0	97.7
RA	89.0	98.3	96.4
RV	71.8	85.9	93.7
Apex	44.6	90.9	93.8
Mean value	64.4	93.5	96.1

*Tabella II: percentuale di riduzione del DNA dal tessuto nativo al tessuto decellularizzato in campioni prelevati dall'atrio sinistro (LA), ventricolo sinistro (LV), setto interventricolare (IVW), atrio destro (RA), ventricolo destro (RV) e apice (Apex) del cuore.*

#### 4.1.2. Analisi istologica

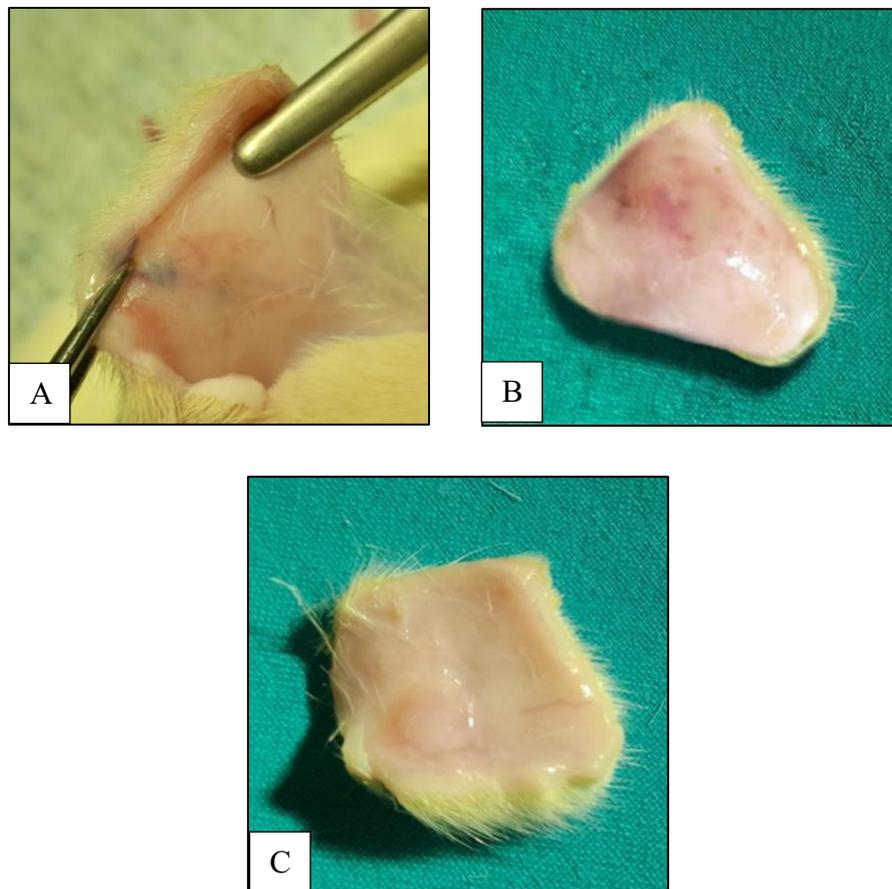
L'analisi istologica dello scaffold decellularizzato, effettuata in seguito alla colorazione in Ematossilina-Eosina, ha mostrato la totale assenza di nuclei e una ECM conservata dal punto di vista strutturale (Figura 4).



*Figura 4: Ematossilina-Eosina, campioni tissutali prelevati dal ventricolo sinistro (LV), ventricolo destro (RV) e setto interventricolare (IVW) del cuore nativo (Native) e decellularizzato (Heart 4, Heart 5 e Heart 6). Nei campioni di cuore decellularizzato si apprezza la totale assenza totale di nuclei.*

#### 4.2. Analisi macroscopica

Al momento dell'espianto dei patches, è stato possibile valutare le caratteristiche macroscopiche delle aree di tessuto che avevano accolto l'impianto sottocutaneo. Nei ratti che avevano ricevuto l'impianto del patch di miocardio nativo (gruppo Native Week 1), il tessuto appariva leggermente infiammato, con edema ed iperemia (figura 5). Tali caratteristiche erano del tutto assenti nel tessuto espantato dai ratti con patches decellularizzati (gruppi DC). I patches non erano più individuabili nei tessuti espantati a 4 e 8 settimane dall'intervento (gruppi DC Week 4 e DC Week 8).

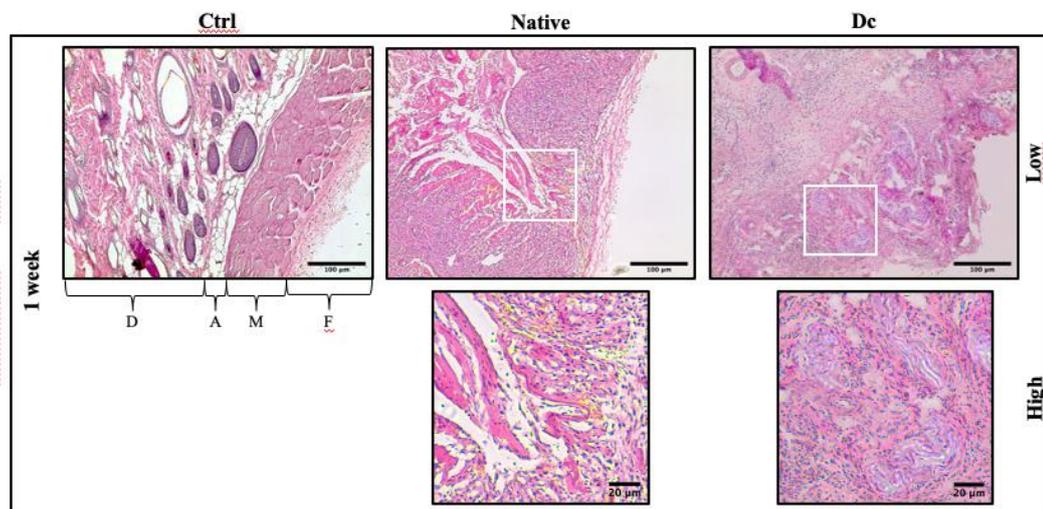


**Figura 5:** prelievo del tessuto nei gruppi Native Week 1 (A, B) e DC Week 1 (C). Nel tessuto con patch decellularizzato (C) non sono apprezzabili caratteristiche macroscopiche di infiammazione.

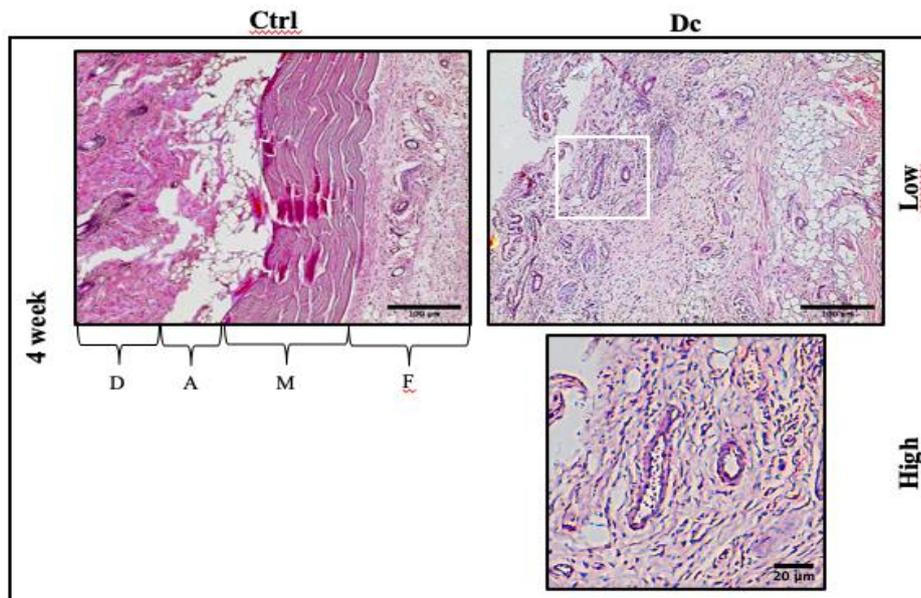
### 4.3. Analisi istologica

#### 4.3.1. Ematossilina-Eosina

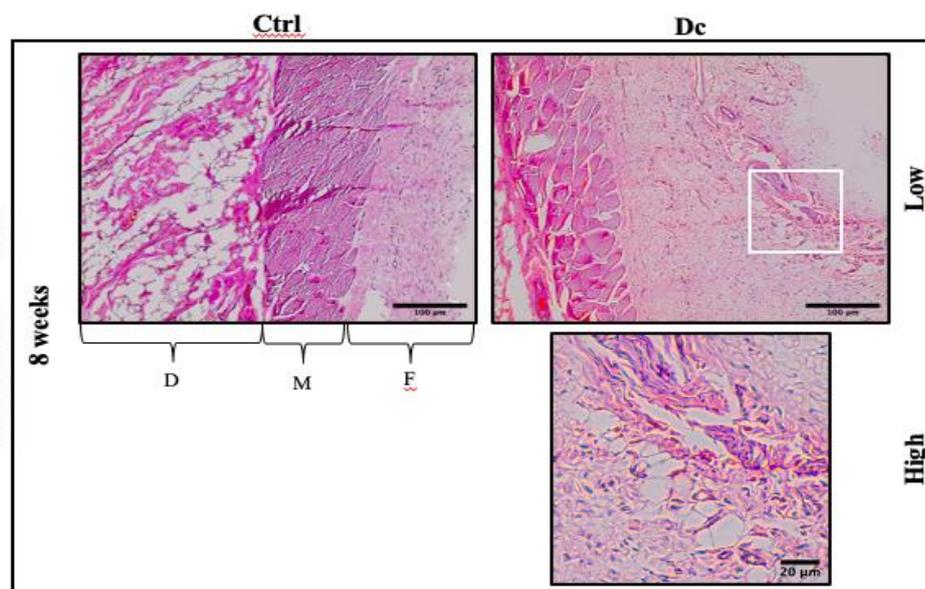
La colorazione con Ematossilina-Eosina mostra in rosa il tessuto (collagene, laminina, elastina) e in viola i nuclei. Il gruppo Native, comprendente i ratti con impianto di patch di miocardio nativo, a 1 settimana dall'intervento ha mostrato un'importante risposta tissutale, con evidente iperemia e infiltrato di cellule infiammatorie (Figura 6). Inoltre, lo spessore del tessuto sottocutaneo appariva aumentato rispetto al controllo. Nei gruppi DC, comprendenti ratti con impianto di patches decellularizzati, tali caratteristiche risultavano meno accentuate: dopo 1 settimana il tessuto appariva ispessito, con iperemia e infiltrato cellulare meno presenti rispetto al gruppo Native. A 4 settimane dall'intervento il tessuto iniziava a riorganizzarsi, con un infiltrato infiammatorio minimo (Figura 7). Dopo 8 settimane dall'impianto del patch decellularizzato, il tessuto ospite appariva privo di importanti alterazioni, sovrapponibile al controllo (Figura 8).



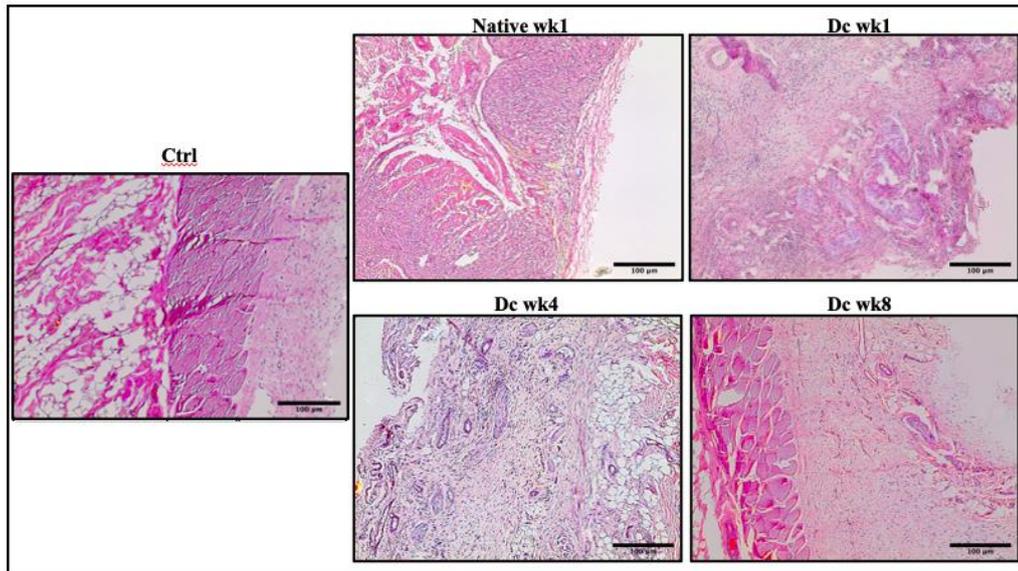
**Figura 6:** Ematossilina-Eosina, settimana 1. Cute di ratto dei gruppi Ctrl, Native e DC. Nel gruppo Ctrl si apprezzano gli strati del tessuto cutaneo: derma (D), tessuto adiposo (A), strato muscolare (M), tessuto connettivo fasciale sottocutaneo (F). Nei gruppi Native e DC si apprezza il tessuto sottocutaneo sede d'impianto dei patch di miocardio rispettivamente nativo e decellularizzato. Si noti l'importante iperemia presente nel gruppo Native, meno accentuata nel gruppo DC.



**Figura 7:** Ematossilina-Eosina, settimana 4. Cute di ratto dei gruppi Ctrl e DC. Rispetto alla settimana 1, nell'area di impianto del patch decellularizzato (gruppo DC), l'iperemia e l'infiltrato cellulare diminuiscono.



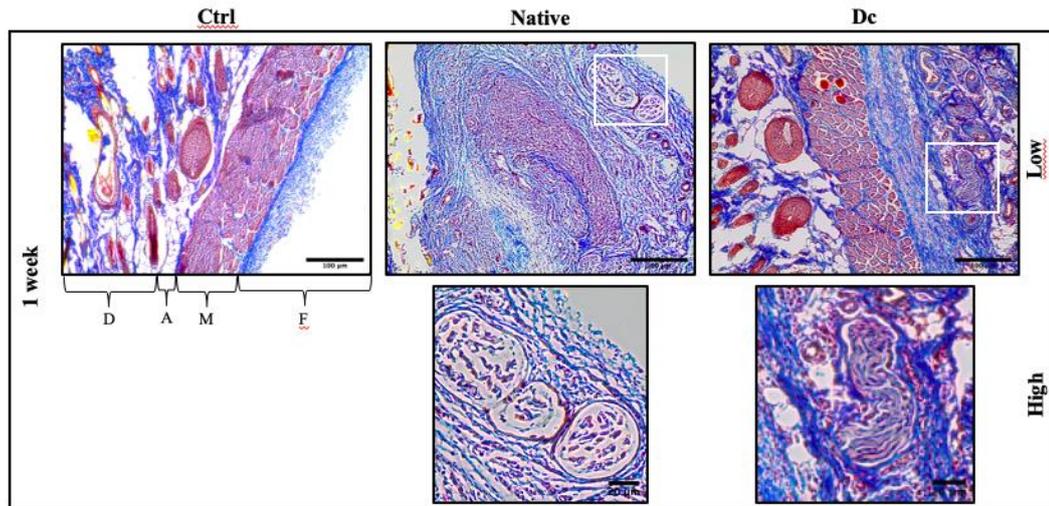
**Figura 8:** Ematossilina-Eosina, settimana 8. Cute di ratto dei gruppi Ctrl e DC. Il tessuto che ha accolto il patch decellularizzato è sovrapponibile al controllo, l'infiltrato cellulare è minimo ed è assente iperemia.



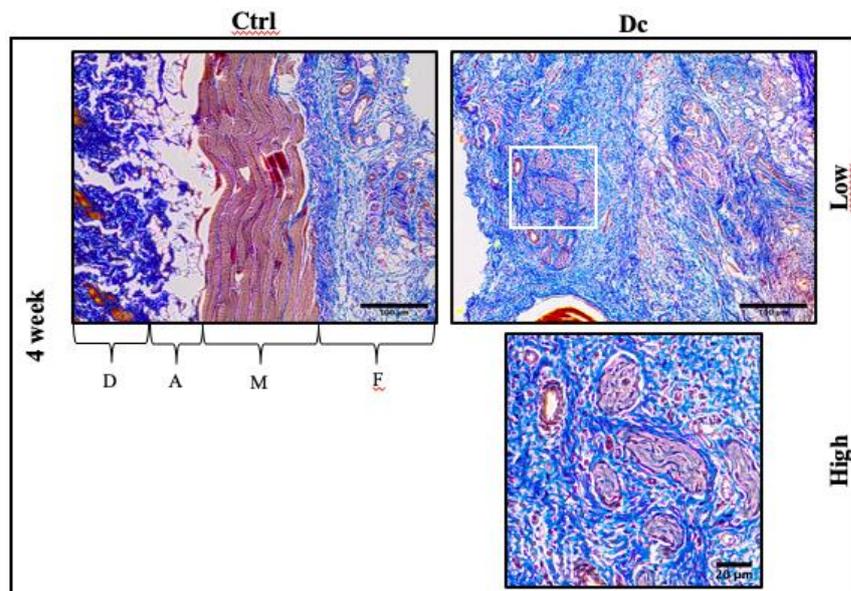
**Figura 9:** Ematossilina-Eosina, cute di ratto dei gruppi Ctrl Week 8, native e DC. Confronto tra i campioni tissutali dei 5 gruppi.

#### 4.3.2. Tricromica di Masson

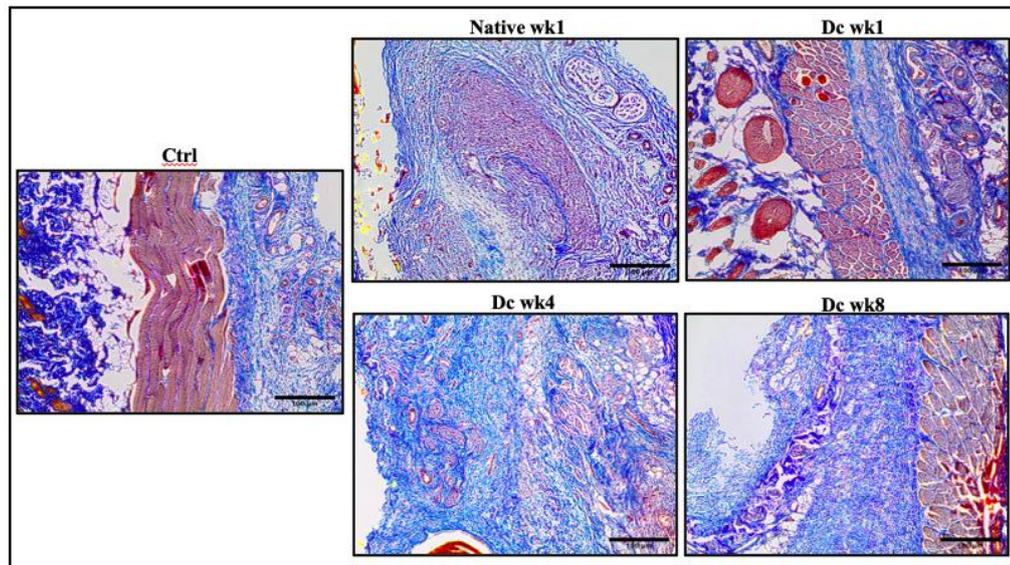
La colorazione Tricromica di Masson permette di visualizzare in nero i nuclei, in rosso il citoplasma e le fibre muscolari e in blu il collagene. Attraverso questo metodo è stato possibile studiare, in modo particolare, il comportamento del collagene. Nel gruppo Native, il tessuto appariva completamente disorganizzato, con importante produzione di nuovo collagene a circondare l'area di impianto del patch e l'infiltrato infiammatorio (Figura 10). Nel gruppo DC Week 1 si apprezzava una risposta tissutale meno accentuata, con produzione di nuovo collagene circoscritta all'area sotto muscolare e un'organizzazione del tessuto nel complesso maggiore rispetto al gruppo Native (Figura 10). A 4 e 8 settimane dall'impianto del patch decellularizzato, il tessuto progressivamente si riorganizzava alla naturale morfologia, senza significative differenze rispetto al controllo (Figure 11 e 12).



**Figura 10:** Tricromica di Masson, settimana 1. Cute di ratto dei gruppi Ctrl, Native e DC. In blu più chiaro si apprezza il nuovo collagene, il blu scuro indica il collagene più vecchio<sup>33</sup>. Nel gruppo Native, si noti la completa disorganizzazione del tessuto sottocutaneo, il quale appare enormemente ispessito. Più organizzato appare, invece, il tessuto sede del patch decellularizzato (gruppo DC). In alto ingrandimento, dettagli dell'area di impianto del patch.



**Figura 11:** Tricromica di Masson, settimana 4. Cute di ratto dei gruppi Ctrl e DC. Il tessuto che ha accolto il patch decellularizzato si riorganizza progressivamente verso la normale morfologia.



**Figura 12:** Tricromica di Masson, cute di ratto nei gruppi Ctrl Week 4, Native e DC. Confronto tra i campioni tissutali dei 5 gruppi: si noti che a 8 settimane dall'impianto del patch decellularizzato, il tessuto sottocutaneo è sovrapponibile al controllo, senza importanti differenze morfologiche (Nei gruppi Ctrl, le caratteristiche tissutali si mantenevano immutate a 1, 4 e 8 settimane).

#### 4.3.4. Spessore dei tessuti

Rispetto ai controlli, dopo una settimana dall'impianto il tessuto appariva decisamente ispessito. Dopo 4 settimane, la differenza di spessore tissutale era meno significativa, mentre ad 8 settimane dall'intervento, il tessuto con impianto del patch decellularizzato risultava sovrapponibile al rispettivo controllo (Figura 14).

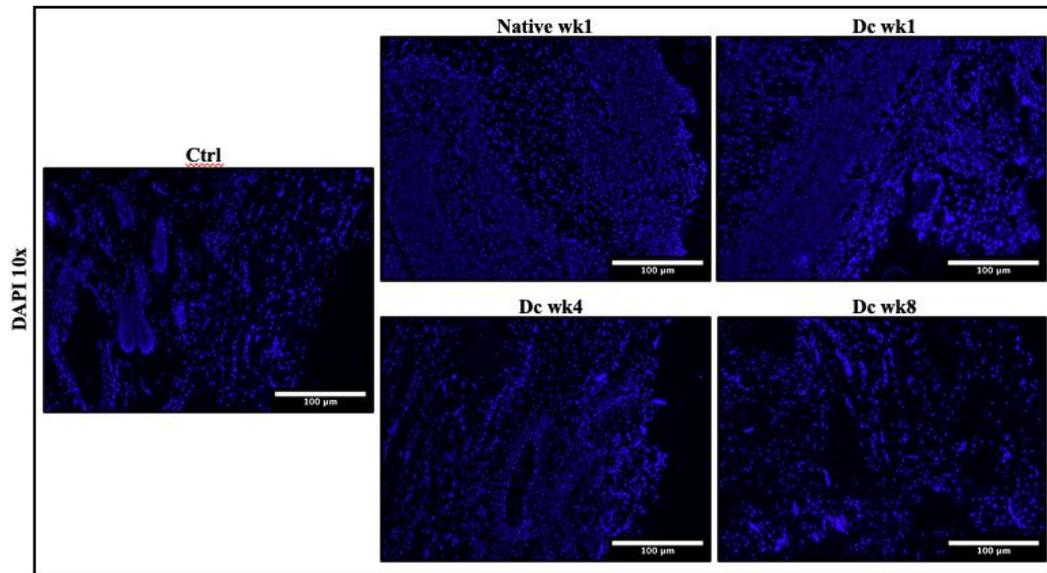


**Figura 14:** Ematossilina-Eosina, cute di ratto dei gruppi Ctrl e DC a 1, 4 e 8 settimane. Confronto dello spessore tissutale rispetto ai controlli nei gruppi DC. Si noti come la differenza di spessore, rispetto ai controlli, diminuisca progressivamente dopo 1, 4 e 8 settimane dall'intervento.

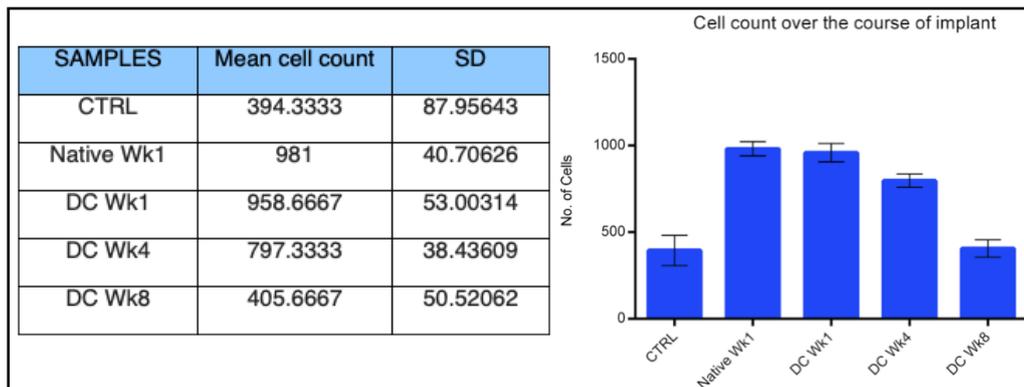
#### 4.4. Immunofluorescenza

L'analisi di immunofluorescenza tramite colorazione DAPI, specifica per la componente nucleare, ha permesso di quantificare dettagliatamente la cellularità nei campioni tissutali, intesa come indicatore di infiltrato infiammatorio. Dopo una settimana dall'intervento, la cellularità nei tessuti dei gruppi Native e DC risultava significativamente aumentata, in accordo con le informazioni ottenute dall'analisi istologica; a 4 settimane la conta cellulare diminuiva, fino a diventare sovrapponibile al controllo dopo 8 settimane dall'impianto del patch decellularizzato (figura 15). Questo trend è stato confermato numericamente

attraverso la conta cellulare effettuata all'interno di sezioni delle immagini ottenute, utilizzando il software ImageJ (Figura 16).



**Figura 15:** colorazione DAPI nucleo-specifica, cute di ratto dei gruppi Ctrl Week 8, Native e DC. Confronto della cellularità tra i campioni tissutali: si noti come il numero di cellule, a 8 settimane dall'impianto, sia sovrapponibile al controllo.



**Figura 16:** conta cellulare misurata all'interno di sezioni delle immagini proposte in Figura 15.

## 5. DISCUSSIONE

L'ingegneria tissutale e la medicina rigenerativa rientrano attualmente tra i più promettenti strumenti in grado di proporre innovative soluzioni terapeutiche in medicina. In ambito cardiologico, lo sviluppo di un cuore bioingegnerizzato rappresenta una valida alternativa futura al trapianto cardiaco tradizionale, al fine di contribuire al superamento dell'importante ostacolo dato della scarsità di organi disponibili. Inoltre, tecniche di ingegneria tissutale possono essere applicate per lo sviluppo di sostituti valvolari bioingegnerizzati o cerotti cardiaci per rigenerazione del cuore.

L'utilizzo di uno scaffold rappresenta la prima colonna portante di questo approccio e, in tal senso, scaffolds ricavati da organi animali decellularizzati sono tra i più studiati, in virtù delle caratteristiche strutturali particolarmente adatte al ripopolamento cellulare. Nell'ambito della decellularizzazione del cuore, nei diversi lavori precedentemente pubblicati in letteratura e che riguardano cuori di ratto<sup>34,35</sup>, di maiale<sup>25,27</sup>, ma anche di altre specie, comune è l'utilizzo del Triton X-100 come detergente. Tale agente ha però dimostrato un profilo di sicurezza inadeguato al fine del suo utilizzo in clinica, ma anche in studi preclinici su modelli animali. Come evidenziato in una nota emanata nel 2017 dall'FDA<sup>28</sup>, esso è in grado di interferire con la funzione endocrina dell'organismo, oltre ad essere altamente tossico per l'ambiente. La ricerca si è quindi spostata su possibili alternative al Triton X-100, che garantiscano la stessa efficacia in termini di decellularizzazione e con un miglior profilo dal punto di vista della biocompatibilità e della sicurezza ambientale.

In questo studio, è stato proposto come sostituto il Tergitolo, un agente non ionico, inserendolo all'interno di un protocollo di decellularizzazione sviluppato apportando alcune modifiche procedurali a quello pubblicato nel 2012 da Remlinger *et al.* Tale protocollo è stato poi applicato, per la prima volta, alla decellularizzazione di un cuore porcino intero. Si è quindi valutata l'efficacia della decellularizzazione, prima di studiare la biocompatibilità dello scaffold ottenuto in un modello murino.

I risultati ottenuti dall'estrazione e quantificazione del DNA, hanno mostrato che il tessuto appartenente ad ogni area del cuore (ventricolo destro, ventricolo sinistro, setto interventricolare, auricole), dopo la decellularizzazione, conteneva meno di 50 ng/mg di DNA, soglia sotto la quale un tessuto può essere considerato

decellularizzato. Questi dati dimostrano come il protocollo proposto sia in grado di rimuovere ogni tipo di cellula dal tessuto trattato.

Tuttavia, affinché un protocollo di decellularizzazione possa essere considerato ottimale, oltre alla rimozione delle cellule, deve garantire anche la preservazione della matrice extracellulare del tessuto. Per cui, in seguito alle analisi quantitative, sullo scaffold decellularizzato è stata effettuata un'analisi qualitativa di tipo istologico, con lo scopo di confermare l'assenza di cellule e valutare il danno arrecato alla matrice extracellulare. I campioni tissutali sono stati quindi colorati con Ematossilina-Eosina, metodo che permette una rapida valutazione in merito alla presenza di nuclei e alle caratteristiche generali del tessuto. Dall'analisi dei preparati istologici è emersa la totale assenza dei nuclei e una matrice extracellulare generalmente conservata, in assenza di evidenti alterazioni morfologiche.

Dopo aver valutato quantitativamente e qualitativamente l'efficacia del protocollo di decellularizzazione proposto, si è passati allo studio della biocompatibilità dello scaffold ottenuto, con lo scopo di valutare la tollerabilità del tessuto trattato con Tergitolo, in un organismo vivente.

A tal fine, si è optato per un modello che ha previsto l'impianto sottocutaneo nel ratto di patches di miocardio porcino decellularizzato e nativo, come proposto anche da altri lavori, presenti in letteratura, finalizzati alla valutazione della biocompatibilità di diversi biomateriali<sup>36,37</sup>. I tessuti, espianati a 1, 4 e 8 settimane, sono stati analizzati dal punto di vista istologico dopo colorazione con Ematossilina-Eosina e Tricromica di Masson, al fine di valutare la risposta tissutale in seguito all'applicazione del patch.

Al momento del prelievo, i tessuti con impianto del patch decellularizzato non mostravano segni macroscopici di infiammazione né altre significative alterazioni strutturali; al contrario, nei tessuti che avevano ricevuto il patch di miocardio nativo erano apprezzabili un lieve edema ed iperemia.

L'analisi istologica ha poi confermato questo risultato: a 1 settimana dall'impianto, nei tessuti con patch decellularizzato si apprezzava un infiltrato infiammatorio e un'iperemia più contenuti rispetto alle sezioni tissutali con impianto di patch nativo. Dopo 4 settimane, tali caratteristiche progressivamente diminuivano e, ad 8 settimane dall'intervento, il tessuto che aveva accolto il patch decellularizzato appariva sovrapponibile al controllo ed era privo di significative alterazioni morfologiche. Attraverso la colorazione Tricromica di Masson è stato possibile

studiare specificatamente il comportamento del collagene: rispetto al tessuto con patch di miocardio nativo, nei ratti con impianto di patches decellularizzati è stata rilevata una risposta tissutale più organizzata e limitata. A 4 settimane dall'impianto, il tessuto cominciava a riorganizzarsi verso la normale morfologia, la quale veniva pressoché raggiunta nelle sezioni prelevate dopo 8 settimane, in assenza di esiti significativi.

Lo spessore dei campioni prelevati è stato considerato come ulteriore indicatore di risposta tissutale: dopo 8 settimane dall'impianto dei patches decellularizzati, non si osservavano differenze significative rispetto ai controlli.

Infine, è stata condotta un'analisi tramite immunofluorescenza con lo scopo di studiare dettagliatamente la cellularità dei campioni tissutali. A tal fine, le sezioni tissutali sono state trattate con colorazione DAPI nucleo-specifica e in seguito osservate al microscopio confocale. Le immagini ottenute hanno mostrato un'aumentata cellularità nei tessuti prelevati a 1 settimana, più accentuata nei campioni con patch nativo rispetto ai tessuti con patch decellularizzato. In seguito, il numero di cellule presenti nel tessuto progressivamente diminuiva, come dimostrato nei campioni prelevati a 4 settimane dall'intervento. Dopo 8 settimane, il numero di cellule presenti nel tessuto con patch decellularizzato era sovrapponibile al controllo.

I risultati dell'analisi di immunofluorescenza, dunque, sono concordi con i dati ricavati dalla precedente analisi istologica ed entrambi depongono a favore di una ottimale tollerabilità dei patches ricavati dal cuore decellularizzato.

## 6. CONCLUSIONE

Avere a disposizione un protocollo di decellularizzazione che permetta di ottenere uno scaffold adeguatamente decellularizzato, strutturalmente intatto e biocompatibile, è un primo importante obiettivo da raggiungere affinché, nell'ambito dell'ingegneria tissutale, si possano sviluppare soluzioni applicabili in clinica.

Attraverso questo studio è stato dimostrato che il protocollo proposto dal nostro gruppo di ricerca è innanzitutto adeguato alla decellularizzazione del miocardio porcino. Esso permette di ottenere uno scaffold privo di cellule mantenendo l'integrità morfologica della matrice extracellulare.

Lo studio di biocompatibilità *in vivo*, effettuato sul modello murino, ha poi dimostrato che lo scaffold decellularizzato ottenuto, dal punto di vista istologico, possiede proprietà ottimali in termini di biocompatibilità e biodegradabilità.

Gli impianti dei patches decellularizzati sono stati ottimamente tollerati dagli organismi riceventi e nessuna risposta infiammatoria e immunitaria a lungo termine è stata riscontrata nei tessuti dell'ospite.

Questi risultati aprono dunque la strada ad ulteriori studi di biocompatibilità su animali di grossa taglia, prossimo step da raggiungere prima della possibile applicazione in ambito clinico. D'altra parte, il protocollo proposto consente di ottenere un valido scaffold che può essere considerato in lavori finalizzati al ripopolamento cellulare, allo sviluppo di cerotti cardiaci per la rigenerazione del miocardio e alla realizzazione di modelli di malattia cardiaca.

Tutto ciò è fondamentale affinché, in futuro, si possano avere a disposizione innovativi strumenti terapeutici, in grado di superare almeno alcune delle limitazioni che attualmente si riscontrano in clinica, grazie alle applicazioni tecniche dell'ingegneria tissutale e della medicina rigenerativa.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Roth, G. A. *et al.* Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol.* 2020 Dec 22;76(25):2982-3021. doi: 10.1016/j.jacc.2020.11.010.
2. Timmis, A. *et al.* European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021, *European Heart Journal*, Volume 43, Issue 8, 21 February 2022, Pages 716–799, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab892>
3. McDonagh, T. A. *et al.* 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC, *European Heart Journal*, Volume 42, Issue 36, 21 September 2021, Pages 3599–3726, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab368>
4. Heidenreich, P. A. *et al.* 2022 AHA/ACC/HFSA Guideline for the Management of Heart Failure: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2022 May 3;79(17):1757-1780. doi: 10.1016/j.jacc.2021.12.011.
5. Savarese, G. *et al.* Global burden of heart failure: a comprehensive and updated review of epidemiology, *Cardiovascular Research*, Volume 118, Issue 17, December 2022, Pages 3272–3287, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvac013>
6. Ministero della Salute. Alleanza Italiana per le Malattie Cerebro-Cardiovascolari. [Accessed June; 2023 ].
7. Maggioni, A. P. *et al.* The Real-World Evidence of Heart Failure: Findings from 41 413 Patients of the ARNO Database. *European Journal of Heart Failure.*, vol. 18, no. 4, 2016, pp. 402–10, <https://doi.org/10.1002/ejhf.471>.
8. Gerber, Y. *et al.* A contemporary appraisal of the heart failure epidemic in Olmsted County, Minnesota, 2000 to 2010. *JAMA Intern Med.* 2015 Jun;175(6):996-1004. doi: 10.1001/jamainternmed.2015.0924
9. Tsao, C. W. *et al.* Temporal Trends in the Incidence of and Mortality Associated With Heart Failure With Preserved and Reduced Ejection Fraction. *JACC Heart Fail.* 2018 Aug;6(8):678-685. doi: 10.1016/j.jchf.2018.03.006.
10. Ammar, K. A. *et al.* Prevalence and prognostic significance of heart failure stages: application of the American College of Cardiology/American Heart

Association heart failure staging criteria in the community. *Circulation*. 2007 Mar 27;115(12):1563-70. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.666818.

11. Fang, J. C. *et al.* Advanced (Stage D) Heart Failure: A Statement From the Heart Failure Society of America Guidelines Committee, *Journal of Cardiac Failure*, Volume 21, Issue 6, 2015, Pages 519-534, ISSN 1071-9164, <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2015.04.013>.
12. Khush, K. K. *et al.* The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-sixth adult heart transplantation report — 2019; focus theme: Donor and recipient size match, *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, Volume 38, Issue 10, 2019, Pages 1056-1066, ISSN 1053-2498, <https://doi.org/10.1016/j.healun.2019.08.004>.
13. Gerosa, G. *et al.* Overcoming the Boundaries of Heart Warm Ischemia in Donation After Circulatory Death: The Padua Case. *ASAIO Journal* ():10.1097/MAT.0000000000002141, February 09, 2024. | DOI: 10.1097/MAT.0000000000002141
14. Valutazione di qualità dell'attività del trapianto di cuore 2002-2021 - CNT, Aprile 2024.
15. Report analitico 2022 - L'attività della Rete Nazionale Trapianti, 2023.
16. Donazione e trapianto di organi, tessuti e cellule staminali emopoietiche - Report preliminare dell'attività 2023.
17. Essandoh, M. *et al.* Total artificial heart system. *International Anesthesiology Clinics* 60(4): p 39-45, Fall 2022. | DOI: 10.1097/AIA.0000000000000377
18. Arabía, F. A. *et al.* The total artificial heart: where have we been, where are we now, where are we going? *Indian J Thorac Cardiovasc Surg* **39** (Suppl 1), 198–205 (2023). <https://doi.org/10.1007/s12055-023-01559-8>
19. Hardy, J. D. *et al.* The first heart transplant in man: historical reexamination of the 1964 case in the light of current clinical experience. *Transplant Proc.* 1969 Jun;1(2):717-25. PMID: 4939669.
20. Singh, A. K. *et al.* Cardiac Xenotransplantation: Progress in Preclinical Models and Prospects for Clinical Translation. *Transpl Int.* 2022 Mar 23;35:10171. doi: 10.3389/ti.2022.10171.
21. Cooper, D. K. C. *et al.* *Xenotransplantation the Transplantation of Organs and Tissues between Species*. Berlin: Springer Berlin (2013).
22. Reichart, B. *et al.* Cardiac xenotransplantation: from concept to clinic. *Cardiovasc Res.* 2023 Feb 3;118(18):3499-3516. doi: 10.1093/cvr/cvac180.

23. Griffith, B. *et al.* Genetically Modified Porcine-to-Human Cardiac Xenotransplantation. *N Engl J Med.* 2022 Jul 7;387(1):35-44. doi: 10.1056/NEJMoa2201422. Epub 2022 Jun 22.
24. Ott, H.C. *et al.* Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med.* 2008 Feb;14(2):213-21. doi: 10.1038/nm1684.
25. Wainwright, J. M. *et al.* Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010 Jun;16(3):525-32. doi: 10.1089/ten.
26. Weymann, A. *et al.* Bioartificial heart: a human-sized porcine model--the way ahead. *PLoS One.* 2014 Nov 3;9(11): e111591. doi: 10.1371/journal.pone.0111591.
27. Remlinger, N.T. *et al.* Procedure for decellularization of porcine heart by retrograde coronary perfusion. *J Vis Exp.* 2012 Dec 6;(70): e50059. doi: 10.3791/50059.
28. *COMMISSION REGULATION (EU) 2017/ 999 - of 13 June 2017 - amending Annex XIV to Regulation (EC) No 1907 / 2006 of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH).* (n.d.).
29. Wainwright, J.M. *et al.* Right ventricular outflow tract repair with a cardiac biologic scaffold. *Cells Tissues Organs.* 2012; 195:159–170. doi: 10.1159/000331400.
30. Shah, M. *et al.* In vivo assessment of decellularized porcine myocardial slice as an acellular cardiac patch. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2019; 11:23893–23900. doi: 10.1021/acsami.9b06453.
31. Shah, M. *et al.* A thin layer of decellularized porcine myocardium for cell delivery. *Sci. Rep.* 2018;8:16206. doi: 10.1038/s41598-018-33946-2
32. *European Pharmacopoeia 5.0-Biological Tests.* (n.d.).
33. Boennelycke, M. *et al.* Tissue response to a new type of biomaterial implanted subcutaneously in rats. *Int Urogynecol J.* 2011 Feb;22(2):191-6. doi: 10.1007/s00192-010-1257-3.

34. Carvalho, J. *et al.* Characterization of decellularized heart matrices as biomaterials for regular and whole organ tissue engineering and initial in-vitro recellularization with ips cells. *J. Tissue Sci. Eng.* 2012;11:002. doi: 10.4172/2157-7552.S11-002.
35. Lee K.M. *et al.* Natural Cardiac Extracellular Matrix Sheet as a Biomaterial for Cardiomyocyte Transplantation, *Transplantation Proceedings*, Volume 47, Issue 3, 2015, Pages 751-756, ISSN 0041-1345, <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2014.12.030>.
36. Kim, M. S. *et al.* An in vivo study of the host tissue response to subcutaneous implantation of PLGA- and/or porcine small intestinal submucosa-based scaffolds. *Biomaterials*. 2007 Dec;28(34):5137-43. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.08.014.
37. Wu, Q. *et al.* In vivo effects of human adipose-derived stem cells reseeded on acellular bovine pericardium in nude mice. *Exp Biol Med* (Maywood). 2016 Jan;241(1):31-9. doi: 10.1177/1535370215597193.