



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA



**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE**

**CORSO DI LAUREA IN** Ingegneria Biomedica

**Decellularizzazione e ricellularizzazione:  
fondamenti e sviluppi.**

**Relatore:** Prof.ssa Dettin Monica

**Laureando:** Zaffalon Andrea

**ANNO ACCADEMICO:** 2021–2022

**Data di laurea:** 21/09/2022



<b>1- introduzione</b>	<b>6</b>
<b>2- decellularizzazione</b>	<b>8</b>
2.1- definizione	8
2.1.1- valutazione del processo di decellularizzazione	8
2.2- metodi	10
2.2.1- trattamenti fisici	11
2.2.1.1- sonicazione	11
2.2.1.2- Freeze_Thawing	11
2.2.1.3- Immersione e agitazione	12
2.2.2- trattamenti chimici	12
2.2.2.1- detergenti	12
2.2.2.2- soluzioni ipertoniche e ipotoniche	13
2.2.2.3- acidi e basi	13
2.2.2.4- alcoli	13
2.2.2.5- chelati	14
2.2.3- trattamenti biologici	14
2.2.3.1- enzimi	14
2.2.4- combinazione	15
2.3- impianto ortotopico e impianto eterotopico	16
2.3.1- impianto ortotopico e relative applicazioni	16
2.3.2- impianto eterotopico e relative applicazioni	17
2.4- rimodellamento eterotopico	18
2.5- effetto della decellularizzazione sulla matrice	18
<b>3- ingegneria dell'intero organo</b>	<b>20</b>
3.1- criticità riscontrate	20
3.1.1- trombogenicità	20
3.1.2- anoikis	21
3.1.3- immunogenicità	21
3.2- utilizzo di <i>scaffold</i> suini	22
<b>4- ricellularizzazione e tipi cellulari</b>	<b>24</b>
4.1- cellule staminali embrionali	24

4.2- cellule staminali mesenchimali	25
4.3- cellule staminali pluripotenti indotte	26
4.4- ricellularizzazione di sistemi vascolari	27
4.4.1- cellule endoteliali	27
<b>5- ricellularizzazione parenchimale</b>	<b>28</b>
5.1- metodo	28
5.1.1- fegato	28
5.1.2- rene	29
5.1.3- polmone	30
5.1.4- cuore	30
5.2- ottimizzazione della semina parenchimale	31
<b>6- bioreattori</b>	<b>33</b>
6.1- parametri e applicazioni	33
6.2- bioreattori notevoli	33
6.2.1- fegato	33
6.2.2- rene	34
6.2.3- polmone	34
6.2.4- cuore	35
6.3- ottimizzazione della coltura del bioreattore	36
<b>7- applicazioni cliniche e commerciali</b>	<b>38</b>
<b>8- osservazioni conclusive</b>	<b>39</b>
<b>9- referenze bibliografiche</b>	<b>40</b>

## LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

ADM	=	Matrice dermica acellulare
AETII	=	Cellule epiteliali alveolari di tipo II
AFM	=	Atomic Force Microscopy
CHAPS	=	3-[(3-colamidopropil) dimetilammonio]-1-propanosulfonato
DAPI	=	4',6-diamidin-2-fenilindolo
DNA	=	Acido desossiribonucleico
ECM	=	Matrice extracellulare
EDTA	=	Acido etilendiamminotetraacetico
EGTA	=	Acido etilenglicole tetraacetico
ESC	=	Cellule staminali embrionali
FDA	=	Food and Drug Administration
GAG	=	Glicosamminoglicano
HA	=	Arteria epatica
H&E	=	Ematossilina ed eosina
HHP	=	Metodo della pressione idrostatica
MEC	=	Cellule mesendodermali
MSC	=	Cellule staminali mesenchimali
HUVEC	=	Cellule endoteliali della vena ombelicale umana
IPSC	=	Cellule staminali pluripotenti indotte
IVC	=	Vena cava inferiore
MHC	=	Complesso maggiore di istocompatibilità
PERV	=	Retrovirus porcino endogeno
PV	=	Vena porta
RCTE	=	Cellule tubolari corticali renali epiteliali
ROS	=	Specie reattive dell'ossigeno
SDC	=	Sodio desossicolato
SDS	=	Sodio dodecil solfato
SEM	=	Microscopia elettronica a scansione

## 1 - INTRODUZIONE

Gli enormi progressi raggiunti da parte di branche dell'ingegneria e della medicina nel corso degli ultimi decenni hanno consentito di ottenere una miglior qualità dello stile di vita della popolazione e l'incremento della vita media. La richiesta di tessuti e organi per trapianti è però cresciuta a dismisura e ciò ha portato all'esigenza di progettare e creare *in vitro* sostituti biologici per sopperire alle criticità del trapianto tradizionale, prime fra tutte la cronica difficoltà di reperire donatori e la necessità di utilizzare terapie immunosoppressive successive all'intervento.

Il vero passo decisivo in tale percorso proviene da uno strumento recente, ovvero la decellularizzazione, intesa come metodologia che consente di ottenere matrici biologiche (*scaffold*) acellulari da utilizzare come supporti per la ricostruzione di tessuti e di interi organi. Questo processo avviene mediante la rimozione delle cellule dalla matrice extracellulare (ECM) di un tessuto o di un organo proveniente da donatore, da cadavere o da altra specie, consentendo quindi di creare un'impalcatura tridimensionale acellulare utilizzabile per sviluppi successivi, oppure per essere trasformata in fogli, polveri o fili. Ciò consente di evitare molte problematiche, prima tra tutte, il rigetto.

La decellularizzazione di tessuti "semplici" è stata per la prima volta segnalata alla fine degli anni '80 da parte del gruppo guidato dal Prof. Lwebuga-Mukasa che ha sviluppato da allora molti prodotti in tessuto decellularizzato, e alcuni di questi hanno ottenuto risultati clinici soddisfacenti. Tuttavia, esistono anche evidenze di risultati negativi come episodi di stenosi, rottura o rigetto. Negli anni successivi l'attenzione si è spostata verso la decellularizzazione di interi organi. Prima di questo sviluppo, la creazione di uno *scaffold* a grandezza naturale, con l'intricata architettura e la composizione necessaria a consentire un adeguato funzionamento degli organi, era complicato o impossibile.

A seguito dei progressi riguardanti la creazione di interi organi acellulari, gli sforzi della comunità scientifica si sono naturalmente rivolti verso la ricerca di metodi per ripopolare questi supporti con le cellule del ricevente. Gli *scaffold* sono stati quindi seminati con varie tipologie cellulari, e ciò ha portato a ottenere funzionalità tessuto-specifica *in vitro*, e *in vivo* dopo un trapianto a breve termine in modelli animali.

Tutto ciò è culminato nel primo trapianto di cuore suino in un paziente, il 7 gennaio 2022, grazie a un team di chirurghi operante nell'ambito del corso di xenotrapianto cardiaco tenuto dal Dr. Muhammad Mohiuddin e dal Dr. Bartley Griffith dell'Università del Maryland (UMSOM).

Nonostante i notevoli progressi esistono ancora sfide significative, ovvero la necessità di trovare tipi cellulari clinicamente rilevanti che consentano un'efficace ricellularizzazione, la scelta di una corretta strategia di semina, e la ricostruzione completa della vascolarizzazione e del parenchima. Dove con parenchima si intende il tessuto specifico e caratterizzante di un determinato organo.

Infine, un aspetto da considerare è la valutazione dei possibili effetti avversi dovuti all'esposizione a questi nuovi materiali, attraverso analisi dell'immunogenicità e della biocompatibilità. Da qui la necessità di una specifica normativa che tenga anche in considerazione eventuali aspetti legati alla bioeticità delle procedure e dei trattamenti.

Lo scopo di questo elaborato è quindi quello di fornire una panoramica dei traguardi ottenuti, dei recenti progressi e delle sfide emergenti nell'ingegneria degli organi.

## **2 - DECELLULARIZZAZIONE**

### **2.1 - DEFINIZIONE**

Per decellularizzazione si intende un processo in cui le cellule vengono rimosse dai tessuti, o dagli organi interi, con l'obiettivo di preservare la composizione, l'architettura, la bioattività e le proprietà meccaniche della matrice extracellulare (ECM). Ad oggi, esiste una folta varietà di metodi di decellularizzazione, che rende tortuoso il confronto dei dati ottenuti; perciò, scegliere una procedura ottimale è alquanto complesso. Tuttavia, grazie ad un numero crescente di nuove pubblicazioni, la fattibilità di applicare questo processo a un organo intero non è messa in dubbio.

#### **2.1.1 - VALUTAZIONE DEL PROCESSO DI DECELLULARIZZAZIONE**

Dopo la ricellularizzazione, i componenti cellulari residui ancora presenti nell'ECM possono innescare una risposta immunitaria sfavorevole e il deterioramento della matrice può compromettere anche la bioattività delle cellule ripopolanti l'impianto. Diventa, così, necessario stabilire uno standard qualitativo per la decellularizzazione degli *scaffold*, per facilitare il rapido sviluppo dell'ingegneria degli organi e consentirne eventualmente un più facile utilizzo nelle applicazioni cliniche.

Al momento non esistono criteri unificati per la valutazione della qualità del tessuto decellularizzato. Nella maggioranza dei casi sono utilizzati studi qualitativi o semiquantitativi, sfruttando caratteristiche morfologiche e molecolari per valutare la qualità dello scaffold decellularizzato. La valutazione morfologica si basa sull'aspetto macroscopico, grazie anche alla colorazione H&E, e sull'osservazione tramite microscopia elettronica a scansione (SEM) della struttura microscopica dello *scaffold*. La valutazione molecolare include la quantificazione del DNA residuo e delle proteine dell'ECM. Inoltre, molti studi hanno confrontato le proprietà meccaniche delle matrici sottoponendole a tensionamento meccanico. I criteri generalmente rispettati sono i seguenti:

- 1) contenuto di DNA inferiore a 50 [ng/mg] di ECM a peso secco ("dry weight").
- 2) lunghezza del frammento di DNA inferiore a 200 [bp].
- 3) mancanza di contenuto nucleare visibile con colorazioni DAPI e H&E.

questi parametri non sono stati definiti e concordati universalmente, ma vengono comunque generalmente condivisi e seguiti. Recentemente è stato descritto un metodo che combina immagini a contrasto di fase e immagini a fluorescenza date dalla colorazione del DNA nei



nuclei cellulari, consentendo più velocemente la quantificazione del contenuto di DNA residuo.

Determinare i valori di DNA residuo in un determinato tessuto porta alla distruzione delle impalcature e richiede del tempo; pertanto, è essenziale sviluppare un nuovo metodo non invasivo per monitorare e regolare la decellularizzazione in tempo reale. Akhyari et al. hanno impiegato una valutazione reologica e analisi sulla composizione della biomassa in tempo reale e non invasivo rispetto alla decellularizzazione di tessuto cardiaco, scoprendo che il contenuto totale di proteine e DNA nel perfusato (fluido di lavaggio) era proporzionale alla viscosità del perfusato stesso. Sulla base di questa constatazione, il protocollo di decellularizzazione dovrebbe quindi essere adattato specificatamente per le particolari caratteristiche di ogni singolo organo.

L'attribuzione di giudizi sulla morfologia varia a seconda della competenza e della soggettività dell'osservatore; pertanto, è necessario creare un'analisi dell'immagine digitale per ridurre questa soggettività e ottenere una maggiore precisione. A questo proposito è stato sviluppato un software di analisi delle immagini *open source* veloce e intuitivo, "HisTOOLogy" ed è stato applicato per analizzare gli effetti di diversi protocolli di decellularizzazione, rivelando una relazione lineare tra la conta cellulare e il grado di colorazione dell'eosina, permettendo la quantificazione totale del DNA e delle proteine. Una nuova applicazione è stata poi sviluppata nel 2020, il software "ScaffAn", che utilizza l'analisi automatizzata dell'immagine basata sull'utilizzo di un nuovo sistema di valutazione morfologica multi-scala.

Comparativamente, l'analisi istologica semiquantitativa convenzionale si basa su sette criteri e su tre corrispondenti livelli di classificazione, utilizzando la qualità morfologica basata su colorazione H&E e osservazione tramite SEM. Nella nuova analisi quantitativa, la lunghezza della struttura sinusoidale e il numero di ramificazioni delle reti sinusoidali sono calcolati sulla base di scansioni di diapositive ad alta risoluzione di zone, colorate con H&E, utilizzando software di nuova concezione. Dunque, questo approccio integra l'analisi convenzionale e migliora efficacemente il potere discriminante. Recentemente è stata utilizzata una combinazione di valutazioni macroscopiche, microscopiche e morfologiche per sviluppare un metodo specifico per l'analisi della microstruttura di *scaffold* epatici murini che presentavano lievi danni istologici (steatosi epatica, fibrosi epatica e iperplasia rigenerativa nodulare). I risultati hanno indicato che questa procedura è promettente e consente di identificare con precisione i tessuti con la microstruttura e i componenti matriciali meglio

conservati; questi risultati sono fondamentali anche per lo sviluppo futuro delle tecniche di ripopolamento.

Da segnalare che anche le proprietà meccaniche svolgono un ruolo significativo a livello dell'omeostasi epatica; allo stesso modo, le proprietà viscoelastiche dello *scaffold* sono fondamentali per la morfologia, la vitalità e le attività metaboliche delle cellule ri-seminate. Per esempio, substrati rigidi o floschi hanno comportato una diminuzione della vitalità, della diffusione e dell'espressione di albumina in *scaffold* ripopolati con epatociti.

Così, stabilendo i criteri di valutazione della decellularizzazione sarà possibile migliorare la qualità e l'applicabilità clinica degli *scaffold* decellularizzati. Tuttavia, nuovi studi hanno dimostrato che anche il citoplasma e i componenti della membrana cellulare potrebbero causare risposte immunitarie e infiammatorie. Pertanto, i criteri fino ad ora utilizzati dovrebbero essere aggiornati per garantire precisione e uniformità con le più recenti scoperte.

## **2.2 - METODI**

Sono stati sviluppati vari metodi di decellularizzazione, approssimativamente classificabili in tre gruppi: trattamenti chimici (es. detergenti, acidi, basi e alcoli), trattamenti biologici (ad es. enzimi) e trattamenti fisici (ad es. congelamento e scongelamento, pressurizzazione ed elettroporazione). La rimozione delle cellule è influenzata da vari fattori come la densità cellulare, lo spessore e il contenuto lipidico del tessuto originario. Sebbene la maggior parte degli studi sui tessuti decellularizzati abbia riportato una rimozione cellulare avvenuta con successo, le caratteristiche delle strutture ECM risultanti variano a seconda del particolare metodo utilizzato; paragoni riguardanti la struttura, le proprietà fisiche e l'attività biologica possono chiarirne le differenze.

Confrontando ciò che è stato ottenuto dalla decellularizzazione dell'intima media aortica suina utilizzando il trattamento con SDS (un detergente), e il risultato del processo con il metodo della pressione idrostatica (HHP) è stato possibile osservare che il metodo di decellularizzazione ha effettivamente influenza sia sulla struttura dell'ECM, e di conseguenza sulle proprietà meccaniche, e sulla permeabilità alle proteine. Questo perché i campioni trattati con SDS erano più morbidi e deboli rispetto a quelli trattati con HHP; inoltre la permeabilità all'albumina sierica bovina era maggiore nei campioni trattati con SDS, sia rispetto all'originale che rispetto ai campioni trattati con HHP. Con il metodo della pressione idrostatica si intende un processo fisico unico in grado di distruggere le membrane delle

cellule a oltre 2000 [atm], le membrane di microrganismi a oltre 6000 [atm] e le capsule di virus a oltre 9000 [atm].

## **2.2.1 - TRATTAMENTI FISICI**

### **2.2.1.1 - SONICAZIONE**

La sonicazione utilizza un cosiddetto “bagno di ultrasuoni”, che permette di trasferire la potenza acustica attraverso un solvente contenente tessuti o organi, per distruggere le membrane cellulari. Il collasso di microscopiche bolle di vuoto, generate durante il processo, rilascia violente onde d'urto che riescono a “tagliare” la cellula; i detriti cellulari risultanti devono poi essere rimossi. L'energia generata dalla collisione delle onde sonore genera calore all'interno della soluzione; pertanto, il monitoraggio della temperatura durante il processo e il conseguente raffreddamento in un refrigeratore sono necessari per evitare il riscaldamento anomalo e dunque la denaturazione della struttura dello *scaffold*. La sonicazione viene utilizzata principalmente con l'ausilio di detergenti per decellularizzare tessuti densi, come tendini, legamenti e cartilagine oppure per tessuti sottili, come pelle e vasi sanguigni, dove permette ai detergenti di penetrare più efficacemente nei tessuti. La sonicazione è stata utilizzata ad oggi solo per decellularizzare strutture renali, e probabilmente non è stata utilizzata su organi di dimensioni maggiori come il fegato a causa dell'elevata potenza richiesta.

### **2.2.1.2 - FREEZE\_THAWING**

Rapidi cambiamenti termici dati dall'alternanza di situazioni gelo-disgelo consentono la lisi efficace delle cellule fornendo anche un aiuto per la loro successiva rimozione. Un singolo ciclo di congelamento-scongelo è comunemente usato come primo passo per ridurre la quantità di reagenti chimici da utilizzare nel processo; tuttavia, anche in questo modo è possibile avere un impatto sulla microstruttura e sulle proprietà meccaniche dell'ECM, a causa della formazione di cristalli di ghiaccio. Di conseguenza, alcuni ricercatori hanno avanzato la proposta di utilizzare dei crioprotettori per la decellularizzazione mediata dalla perfusione, per mitigare gli effetti dannosi senza però intaccare l'efficienza nella lisi cellulare. Con perfusione si intende l'uso della vascolarizzazione nativa di un organo per perfondere i reagenti in tutti i tessuti per la decellularizzazione.

### **2.2.1.3 - IMMERSIONE E AGITAZIONE**

Immergere matrici in un reagente è il metodo più semplice di decellularizzazione; e quando questo viene accoppiato con l'agitazione, i risultati sono ancora più promettenti.

L'efficienza della reazione dipende dal tipo di reagente, dalla durata dell'immersione e dall'intensità dell'agitazione. Per questa tecnica la durata totale del processo dovrebbe essere ridotta al minimo per evitare di danneggiare l'impalcatura ECM. Questo approccio è solitamente usato soltanto per tessuti epidermici e organi più piccoli, come la sottomucosa dell'intestino tenue, i vasi sanguigni, la trachea, la cornea e la tiroide, e non è appropriato per il parenchima di organi più grandi almeno che non se ne utilizzino delle porzioni. Nel caso del fegato l'indicazione di avere un contenuto di DNA di 50 [ng/mg] nel tessuto decellularizzato è raggiunto soltanto quando lo spessore delle sezioni di fegato è inferiore a 5 [mm].

## **2.2.2 - TRATTAMENTI CHIMICI**

### **2.2.2.1 - DETERGENTI**

Per la decellularizzazione sono comunemente impiegati detergenti ionici, non ionici e zwitterionici. I detergenti ionici più utilizzati sono il “sodio dodecil solfato” (SDS) e il “sodio desossicolato” (SDC), che solubilizzano le membrane cellulari e denaturano le proteine.

Triton X-100 è il detergente non ionico più utilizzato ed è in grado di rompere i legami tra lipidi e tra lipidi e proteine, è considerato un detergente meno aggressivo rispetto a SDS. In uno studio si è infatti visto utilizzare soltanto Triton X-100 ha permesso di conservare il collagene 1,5 volte di più e 2,5 volte più i GAG nel fegato, rispetto all'utilizzo di Triton X-100 accoppiato con SDS. Detergenti zwitterionici, come “3-[(3-colamidopropil) dimetilammonio]-1-propanosulfonato” (CHAPS), presentano sia caratteristiche ioniche che non, e sono meno dannosi per le proteine a causa della carica elettrica netta nulla sui gruppi idrofili. A causa della sua bassa permeabilità, CHAPS è spesso utilizzato nei tessuti sottili.

Sebbene diversi detergenti siano spesso combinati per una decellularizzazione ottimale, la loro efficienza varia linearmente con il tempo di esposizione e con la concentrazione, e varia inversamente con lo spessore e la densità del tessuto. Tempi di esposizione prolungati ed elevate concentrazioni massimizzano la rimozione cellulare; tuttavia, l'ECM può anche essere danneggiata e possono essere presenti residui di detergente, in particolare se viene utilizzato SDS, che può penetrare in profondità nel tessuto e si diffonde lentamente. Il danneggiamento dell'ECM e i residui di detergente possono dar luogo alla formazione di trombi e a citotossicità a seguito della ricellularizzazione dell'impianto, in

particolare nel fegato a causa della sua abbondante irrorazione.

#### **2.2.2.2 - SOLUZIONI IPERTONICHE E IPOTONICHE**

Le soluzioni ipertoniche e ipotoniche provocano, rispettivamente, restringimento e rigonfiamento cellulare dovuto all'osmosi e, infine, inducono la lisi, pur avendo un effetto trascurabile sull'ECM. Sebbene l'osmosi possa portare alla morte delle cellule, è inefficiente da sola, e deve essere accoppiata a detergenti o enzimi per eliminare la componente cellulare. Il trattamento sequenziale del fegato murino decellularizzato con soluzione ipotonica e Triton X-100 ha prodotto uno *scaffold* privo di cellule e mantenuto l'integrità strutturale, il tutto confermato dall'osservazione tramite SEM.

#### **2.2.2.3 - ACIDI E BASI**

Sebbene gli acidi abbiano la capacità di rimuovere il DNA dissolvendo il citoplasma e rompendo gli acidi nucleici durante la decellularizzazione, sono più comunemente usati come disinfettanti a causa del loro forte effetto ossidante. In una soluzione altamente alcalina, il DNA a doppio filamento denatura, rompe i legami idrogeno, e si svolge, ottenendo DNA a filamento singolo che viene facilmente rimosso per perfusione. Studi pertinenti hanno dimostrato che una soluzione altamente alcalina di solfuro di piombo (PbS) e idrossido di sodio (NaOH) potrebbe ottenere lo stesso effetto di SDS e CHAPS durante la decellularizzazione, migliorando anche la biocompatibilità e la rigenerazione vascolare degli *scaffold*. Inoltre, soluzioni altamente alcaline con un pH di 12 o più, possono inattivare anche batteri e virus convenzionali, così come prioni non convenzionali, che sono spesso agenti patogeni associati all'impiego di biomateriali. Tuttavia, acidi e basi possono danneggiare il collagene e indebolire i legami proteina-proteina, portando alla distruzione microstrutturale e diminuendo la viscoelasticità.

#### **2.2.2.4 - ALCOLI**

A causa dei gruppi ossidrilici polari, gli alcoli possono diffondere all'interno delle cellule e conseguentemente disidratano e lisano le cellule. Poiché l'alcol è più efficiente nel rimuovere i lipidi rispetto alla lipasi, alcoli (come il glicerolo) sono spesso usati per rimuovere i lipidi dal tessuto adiposo. Gli alcoli possono però danneggiare le proteine e distruggere l'ultrastruttura dell'ECM; pertanto, occorre prestare attenzione quando sono usati per la decellularizzazione. Rispetto agli acidi, gli alcoli sono usati più regolarmente per sterilizzare la matrice decellularizzata. L'etanolo (4%) e l'acido peracetico (0,1%) sono

frequentemente utilizzati per sterilizzare gli *scaffold* decellularizzati nell'ingegneria del fegato.

#### **2.2.2.5 - CHELATI**

Chelati (come l'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) e l'acido etilenglicole tetraacetico (EGTA)) legano ioni metallici che sono essenziali per l'interazione proteica, con conseguente disconnessione di proteine integrali intercellulari e la distruzione dell'adesione cellulare nella ECM. Tuttavia, i chelati da soli non sono in grado di rimuovere completamente le cellule e dovrebbero essere combinati con detergenti o enzimi. Inoltre, utilizzando EDTA nella tecnica di decellularizzazione si ottiene generalmente una matrice con pochi danni strutturali.

### **2.2.3 - TRATTAMENTI BIOLOGICI**

#### **2.2.3.1 - ENZIMI**

Le nucleasi, la tripsina, la lipasi e la collagenasi sono comunemente utilizzati nei processi di decellularizzazione. Gli enzimi possono rimuovere con precisione le componenti cellulari, prevenire risposte sfavorevoli da parte del sistema immunitario e migliorare l'efficacia dei detergenti.

Le nucleasi sono enzimi che scindono i legami fosfodiesterici tra nucleotidi negli acidi nucleici. In generale accelerano la rimozione dei nucleotidi e riducono al minimo il rischio di risposte immunitarie avverse. Endonucleasi, come la DNasi e la RNasi sono usate spesso per rimuovere gli acidi nucleici durante la decellularizzazione del fegato.

La tripsina è una "serina proteasi" che può idrolizzare le proteine coinvolte nell'adesione cellulare; di conseguenza, essa dissocia le cellule dalla matrice cellulare. La sostituzione regolare della tripsina è necessaria perché gli inibitori della proteasi, che vengono rilasciati dalla rottura cellulare, agiscono limitando l'attività della tripsina dopo una circolazione prolungata. Inoltre, gli enzimi possono penetrare più in profondità nel tessuto, in condizioni di pressione, aumentando la reazione tra enzima e substrato, facilitando la rimozione e riducendo il tempo di reazione.

#### **2.2.4 - COMBINAZIONE**

Ciascuno dei metodi fino a ora mostrati, presenta vantaggi e svantaggi. Anche se i metodi fisici sono meno dannosi per la microstruttura del tessuto, non sono in grado di rimuovere efficacemente i componenti cellulari. Comparativamente, sebbene gli agenti

chimici possano rimuovere in modo significativo i componenti cellulari, inevitabilmente portano anche alla distruzione della microstruttura e dell'ECM. Il metodo di decellularizzazione più adatto varia enormemente tra i diversi tessuti e organi, e il protocollo ideale dovrebbe includere almeno due dei suddetti metodi per massimizzare i rispettivi vantaggi e ridurre al minimo i danni alla matrice.

Uno studio dettagliato è stato eseguito vagliando multiple combinazioni tra diversi tipi di decellularizzazione e diversi tipi di lavaggio: Un'arteria carotidea suina è stata decellularizzata attraverso un trattamento HHP, a cui è seguito un lavaggio a due differenti temperature (37°C e 4°C). Sulla base di una successiva valutazione istologica è possibile affermare che la differente temperatura ha chiaramente influenzato la struttura del collagene che infatti è diminuito in quantità nell'arteria carotidea lavata a 37 ° C, mentre in quella lavata a 4°C la quantità e la struttura del collagene sono state preservate. In uno studio analogo, a seguito del trapianto singenico nel topo, le arterie carotidiche decellularizzate HHP/37 ° C si sono occluse dopo 2 settimane, ciò invece non è avvenuto per le arterie decellularizzate HHP/4 ° C. Per trapianto singenico si intende un trapianto in cui il donatore è un gemello monoovulare, geneticamente identico, per cui non è necessaria l'immunosoppressione. Questi risultati indicano quindi che le alterazioni strutturali dei tessuti decellularizzati influiscono nelle performance *in vivo*; in genere, un obiettivo della decellularizzazione è quello di mantenere inalterata la struttura dell'ECM il più possibile anche se è spesso difficile evitare danni indesiderati.

Attualmente, il protocollo più utilizzato per la decellularizzazione del fegato è il ciclo di congelamento-scongelo seguito da una combinazione di detergenti, enzimi e agenti chelanti che vengono perfusi tramite arteria epatica (HA) e vena porta (PV); questo approccio garantisce che il massimo dell'integrità dell'ECM venga mantenuta. Uno studio ha consentito di osservare che l'applicazione di pressione ciclica, simulando condizioni respiratorie intra-addominali, a *scaffold* epatici murini perfusi con l'1% di Triton X-100 e l'1% di SDS, ha ulteriormente potenziato la microperfusione e l'omogeneità della decellularizzazione. Questo approccio ha richiesto anche un tempo relativamente breve, e più collagene e GAG sono stati trattenuti nel decellularizzato. Nel 2020 è poi stato notato che fegati suini decellularizzati attraverso la perfusione di PV di 1% Triton X-100 e 0,6% SDS, mantenendo una pressione di perfusione di 8-12 [mmHg], hanno preservato in modo ottimale le strutture del lobulo epatico.

Concludendo è importante dire che nonostante gli ingenti danni riscontrati, i processi a base di detergente sono ampiamente utilizzati perché sono metodi semplici che non necessitano di specifiche strutture; inoltre, non ci sono prove che mostrano che l'intero

volume di ECM originale è necessario per la ricostruzione di tutti i tipi di tessuto e organi funzionali. Per la scelta del metodo di decellularizzazione è quindi cruciale considerare quali siano le proprietà e le caratteristiche degli *scaffold* che si vogliono ottenere una volta concluso il processo.

### **2.3 - IMPIANTO ORTOTOPICO E IMPIANTO ETERTOPICO**

Gli impianti di tessuti decellularizzati sono utilizzati in molte applicazioni cliniche, e sono differenziabili sulla base delle diverse proprietà e caratteristiche: li possiamo quindi classificare in ortotopico ed eterotopico. Nella ricostruzione ortotopica i tessuti decellularizzati vengono impiantati in un sito che ne è carente, e il tessuto ricostruito mostra proprietà simili a quelle della fonte; in alternativa, nell'impianto eterotopico i tessuti decellularizzati impiantati sono originari di un sito completamente diverso rispetto a quello di provenienza, ad es. vengono impiantati tessuti dermici nei tendini. Si osservano quindi due differenti possibili procedure: la costruzione del tessuto di interesse avviene o tenendo in considerazione le necessità dettate dal sito di impianto, oppure essa avviene mantenendo le proprietà originarie.

#### **2.3.1 - IMPIANTO ORTOTOPICO E RELATIVE APPLICAZIONI**

L'utilizzo più semplice del tessuto decellularizzato avviene nella ricostruzione ortotopica. È possibile considerare la preparazione di cornee decellularizzate come un tipico esempio di questa categoria: la cornea è uno dei più difficili tessuti da decellularizzare senza che avvengano delle deformazioni strutturali; il che è fondamentale perché, se la struttura viene alterata, la trasparenza andrà persa. Si è infatti visto che l'uso di detergenti porta alla traslucenza o, addirittura, alla dissoluzione delle matrici di cornea; non è quindi un processo adeguato. Sono state infatti ottenute cornee decellularizzate attraverso trattamento HHP, ed esse hanno mantenuto struttura e proprietà meccaniche delle corrispettive originarie. Per valutarne poi le prestazioni, sono state impiantate nelle tasche corneali di coniglio; sebbene la cornea ingegnerizzata fosse leggermente traslucida subito dopo la decellularizzazione, la trasparenza è stata recuperata nel tempo successivo all'impianto. Basandosi sull'osservazione a seguito di colorazione con fluoresceina, si è potuto constatare che la riepitelizzazione è proceduta gradualmente, e si è rivelata completa a 6 mesi dall'impianto; una successiva valutazione istologica ha evidenziato che non era presente neo-vascolarizzazione, decrescita, o rigetto immunitario. Cellule simili a quelle epitelio-corneali andavano a ricoprire la cornea decellularizzata ed è stata osservata l'infiltrazione di cheratociti nella cornea decellularizzata.



Con cheratociti si intendono degli elementi cellulari appartenenti alla sostanza propria della cornea (stroma); di forma appiattita e disposti parallelamente alla superficie, tra le lamelle caratteristiche. In questo caso, quindi, è possibile affermare che il tessuto così decellularizzato era un'impalcatura efficace per la ricostruzione del tessuto originale nel momento dell'impianto nel sito ortotopico.

### **2.3.2 - IMPIANTO ETEROTOPICO E RELATIVE APPLICAZIONI**

In ambito clinico i tessuti decellularizzati vengono spesso utilizzati in siti diversi dal sito fonte originario; questa pratica viene indicata come impianto eterotopico. Il derma è uno dei tessuti più comunemente usati come fonte di prodotti decellularizzati che vengono impiegati non soltanto come alternative cutanee, ma anche per svariate protesi e sostituti di sostanze molli; come ad esempio nelle riparazioni all'ernia, nella ricostruzione del seno post-mastectomia, nella ricostruzione del tessuto periodontale, e nella riparazione del tendine della cuffia dei rotatori. Sebbene le strutture tridimensionali del seno, della gengiva e del tendine, siano diverse da quella del derma, quest'ultimo può essere utilizzato come base per la ricostruzione di ciascuna di esse sebbene le caratteristiche specifiche di ogni tipologia non gli siano proprie. Il tendine, ad esempio, richiede una forza sufficiente per collegare ossa e muscoli, il derma però non presenta questa peculiarità; tuttavia, molti ricercatori sono riusciti nell'impresa di utilizzarlo comunque come base per ricostruire il tendine, ottenendo una sufficiente somiglianza al tessuto originario. Per funzionare efficacemente nel nuovo sito, il derma decellularizzato deve essere quindi ricostruito come fosse una struttura tendinea; ciò significa che le cellule attorno al sito di impianto rigenereranno la struttura tridimensionale dell'ECM dei tessuti tendinei utilizzandolo come impalcatura.

La possibilità di sfruttare come base un tessuto decellularizzato, di provenienza diversa rispetto a quello specifico da sostituire, suggerisce quindi che le strutture tridimensionali dell'ECM non sono strettamente dipendenti dalle loro funzioni originarie. La costruzione del tessuto eterotopico viene dunque adattata alle necessità del determinato sito di impianto.

### **2.4 - RIMODELLAMENTO ETEROTOPICO**

Molte ricerche e studi clinici hanno riportato che quando i tessuti decellularizzati vengono impiantati in siti ortotopici o eterotopici, vengono conseguentemente generati tessuti caratteristici del sito di impianto, indipendentemente dalla fonte di tessuto decellularizzato

utilizzata. Si pensa quindi che le cellule che esistono intorno al sito di impianto siano indotte e vadano a svolgere un ruolo importante nelle costruzioni tissutali.

Alcuni studi hanno rivelato che il rimodellamento eterotopico si sviluppa quando i tessuti decellularizzati mantengono la struttura dell'ECM del tessuto originale; ad esempio, l'osso corticale decellularizzato induce l'osteogenesi eterotopica. Questa scoperta deriva da un esperimento in cui frammenti di osso corticale femorale, decellularizzati con HHP, sono stati assemblati a coppie e fissati insieme utilizzando filo di sutura e successivamente impiantati nei ratti in via sottocutanea con lo scopo di indagarne la risposta eterotopica. Dopo l'impianto, sono state osservate poche reazioni immunitarie, ma i frammenti ossei non furono assorbiti. A 2 e a 4 settimane dall'intervento, si è potuto osservare uno spazio vuoto tra i due frammenti, anche se esso non era facilmente distinguibile nelle immagini microTC a raggi X. Attraverso analisi istologiche è stato possibile osservare una matrice di collagene simile a tessuto osseo nello spazio vuoto tra le due porzioni. Questi risultati hanno suggerito che i frammenti ossei decellularizzati tramite HHP, così assemblati, inducono la formazione di matrice ossea per colmare il divario, anche se si trovano in un ambiente diverso. La formazione della matrice ossea avviene normalmente tramite osteoblasti, che esistono sulla superficie dell'osso ma non in regioni sottocutanee, come invece è avvenuto in questo caso.

Pertanto, è possibile che le cellule staminali mesenchimali migrino nel microambiente in cui si trovano tessuti decellularizzati, che sarebbero dunque capaci di controllarle, affinché sia garantita la localizzazione eterotopica e la differenziazione in cellule funzionali al fine di ricostruire il determinato tessuto. Saranno necessarie future analisi per comprendere come la combinazione tra il tipo di tessuto decellularizzato e il tipo di tessuto nel sito di impianto possa influenzare la ricostruzione eterotopica, e per chiarire le modalità attraverso cui i materiali impiantati possono controllare le funzioni cellulari.

## **2.5 - EFFETTO DELLA DECELLULARIZZAZIONE SULLA MATRICE**

Il mantenimento dell'architettura e della composizione dell'ECM è il più grande vantaggio che presenta trattare l'intero organo; tuttavia, è anche una delle sfide principali. Sebbene molte ricerche abbiano dimostrato la conservazione di collagene, laminina, elastina e fibronectina dopo il processo di decellularizzazione, altri invece hanno segnalato la riduzione o l'esaurimento delle proteine dell'ECM e dei fattori di crescita. I metodi di decellularizzazione vanno a influire in maniera differenziata sulle proteine dell'ECM, spesso infatti se un protocollo ha portato a una migliore conservazione delle proteine ECM, in gran parte non è riuscito a rimuovere i detriti cellulari. Al contrario, quando i detriti cellulari si

presentavano adeguatamente ridotti, la ritenzione delle proteine ECM non si è rivelata soddisfacente. In ogni applicazione è pertanto fondamentale trovare un equilibrio tra la rimozione delle cellule e la conservazione dell'ECM, considerando le differenze distintive di ogni organo a causa dell'anatomia unica e distintiva dello stesso.

La conservazione e ricostituzione della vascolatura è un aspetto cruciale per la riuscita della successiva ricellularizzazione. A questo proposito, ci sono stati studi e opinioni contrastanti che riflettono la variabilità delle diverse tecniche di rimozione cellulare. La decellularizzazione di fegati di ratto usando l'1% di Triton X-100 permette di preservare la struttura vascolare gerarchica; al contrario l'1% di SDS ha portato al collasso quasi completo della rete vascolare. Il metodo di erogazione del detergente influisce anch'esso: la pressione costante ha consentito di mantenere l'integrità vascolare di *scaffold* polmonari murini, a risultati opposti ha invece portato l'uso di un flusso costante. A tal fine, alcuni ricercatori utilizzano tecniche basate sulla gravità o sulla pressione controllata.

La meccanica dello *scaffold* dipende dalla composizione dell'ECM e dalla sua struttura; pertanto, per valutare le proprietà biofisiche delle impalcature, molti studiosi sono ricorsi a prove meccaniche uni o biassiali e alla microscopia a forza atomica (AFM). In molti casi, la decellularizzazione ha compromesso la tenacità e la rigidità della matrice a causa dei danni riportati dai componenti costituenti. Ad esempio, a seguito della decellularizzazione del pancreas murino si è ottenuto un modulo elastico di Young tre volte maggiore del valore nativo, indicando quindi un irrigidimento. Al contrario nell'ingegnerizzare tessuti polmonari, è stata dimostrata una rigidità minore, ciò è stato attribuito alla rimozione di tensioattivi e all'esaurimento dell'elastina. I cambiamenti nella rigidità dello *scaffold* sono capaci quindi di influenzare la vita cellulare, in particolare nelle cellule staminali che possono differenziarsi in base alla meccanotrasduzione: quando ne è stata valutata la differenziazione, le matrici che presentavano caratteristiche simili a quello del cervello si sono rivelate neurogeniche; mentre le matrici che imitavano il muscolo o l'osso risultavano, rispettivamente, miogeniche o osteogeniche. Si può quindi concludere dicendo che la decellularizzazione deve preservare le caratteristiche meccaniche per favorire la riuscita del successivo impianto, successivamente alla ricellularizzazione.

### 3 - INGEGNERIA DELL'INTERO ORGANO

La maggior parte degli studi sulla decellularizzazione si è finora concentrata sull'aspetto tissutale, con l'obiettivo di sviluppare materiali sostitutivi a lacune causate dal danneggiamento, traumatico o patologico, di determinati siti.

Alcuni ricercatori hanno riportato il successo della decellularizzazione di interi organi, come cuore, fegato, polmone e rene; in modo da poter poi sostituirci interamente il patrimonio cellulare originario con quello del ricevente, una volta ottimizzata la tecnologia. Per la preparazione di interi *scaffold* decellularizzati è stato necessario l'utilizzo delle reti vascolari, costituite da vasi di grande diametro fino ai capillari. I detergenti vengono quindi perfusi utilizzando queste vie, sfruttate anche per fornire nutrimento all'intero organo. Nel caso della ricellularizzazione *in vitro*, queste reti vascolari sono state spesso usate come vettori per promuovere la distribuzione in tutto il volume dello *scaffold* di cellule iniettate.

Il primo traguardo nella ricostruzione di un intero organo decellularizzato è stato raggiunto nel 2008 da Ott et al. in uno studio in cui sono stati creati *scaffold* cardiaci di ratto, seminati successivamente con cellule miocardiche; la ricerca ha avuto successo nella riproduzione parziale della funzione cardiaca, comprese le proprietà elettrofisiologiche. Nel 2013, in un altro progetto sono state seminate cellule progenitrici cardiovascolari multipotenti, derivate da cellule umane indotte staminali pluripotenti (iPSC), in cuori di topo decellularizzati: i cuori ricellularizzati mostravano contrazioni spontanee, generavano forza meccanica e rispondevano alle sollecitazioni indotte da farmaci, sebbene non in maniera sufficiente al funzionamento del cuore normale.

#### 3.1 - CRITICITÀ RISCONTRATE

##### 3.1.1 - TROMBOGENICITÀ

Il vantaggio principale di creare *scaffold* decellularizzati dell'intero organo è che la rete vascolare viene preservata intatta. Tuttavia, questo vantaggio è a scapito della perdita dello strato endoteliale. In assenza di uno strato endoteliale, i componenti esposti dell'ECM, in particolare il collagene, innescano processi di attivazione e aggregazione piastrinica e generano trombina e fibrina, che avvia la formazione di un trombo. Inoltre, il DNA residuo può attivare le piastrine ed esercitare significativi effetti pro-infiammatori e pro-trombotici nello spazio extracellulare. La conseguente trombosi contribuisce a un apporto inadeguato di nutrienti e ossigeno alle cellule impiantate, impedendo quindi la sopravvivenza a lungo termine dell'organo rigenerato. Pertanto, è necessario ristabilire il flusso sanguigno

costruendo un nuovo strato endoteliale che permetta di inibire la trombosi. Studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che la deposizione strato per strato di eparina, un anticoagulante, permette di immobilizzare tale molecola sulle pareti di *scaffold* decellularizzati prevenendo efficacemente la trombosi, senza che la successiva ricellularizzazione ne risenta.

Inoltre, *scaffold* che sono stati ricellularizzati con cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVEC) hanno mantenuto una perfusione sanguigna stabile al di sotto del livello di stress fisiologico quando sono stati impiantati eterotopicamente in suini immunosoppressi. Tuttavia, nessuno studio fino ad oggi ha ottenuto risultati a lungo termine *in vivo* a causa di rivascolarizzazione imperfetta, che rimane un problema critico che deve essere affrontato.

### 3.1.2 - ANOIKIS

Anoikis è un particolare tipo di apoptosi, morte cellulare programmata, che avviene a seguito della mancata adesione cellulare alla ECM. Il ripristino del flusso sanguigno a seguito del trapianto genera specie reattive dell'ossigeno (ROS) che ostacolano l'adesione cellulare all'ECM e inducono l'anoikis, portando a un basso attecchimento e scarsa sopravvivenza delle cellule impiantate. Pertanto, è stato proposto di integrare il trapianto di antiossidanti per eliminare i ROS e aumentare quindi la tolleranza delle cellule impiantate all'apoptosi. Inoltre, approcci di stimolo dei cross-link, come l'uso di nanogel, ossido di grafene in fogli, induttori anti-CD31, supporti condizionati e sequenze adesive per le cellule endoteliali REDV, migliorano anche significativamente l'adesione cellulare all'ECM e aumentano l'attecchimento nell'impianto. Questi approcci sono promettenti per la sopravvivenza a lungo termine, per lo meno per ciò che si è visto con fegati bioingegnerizzati, perché accelerano e migliorano la ricostruzione della vascolarizzazione, e aumentano l'attecchimento cellulare e i tassi di sopravvivenza. Sarà dunque necessario in futuro sviluppare queste tecnologie e testarle su più tipi di *scaffold* organici.

### 3.1.3 - IMMUNOGENICITÀ

Il prerequisito per la sopravvivenza *in vivo* di *scaffold* ricellularizzati è la bassa immunogenicità, che può essere determinata dagli indicatori critici di xenoantigeni residui, come DNA residuo e gli antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). La riduzione di questi implica il miglioramento del protocollo di decellularizzazione e la diminuzione della risposta immunitaria seguente l'impianto.

Cross-linking con genipina e glutaraldeide potrebbero ridurre al minimo l'esposizione delle cellule immunitarie all'ECM e aumentare l'adesione cellulare delle cellule impiantate.

Quando questo approccio è combinato con terapia immunosoppressoria, la biocompatibilità e la sopravvivenza a lungo termine dell'innesto possono migliorare ulteriormente; ciò si è potuto apprezzare in uno studio eseguito su *scaffold* epatici. Paragonata a glutaraldeide, la ECM epatica reticolata con genipina esibiva biocompatibilità e caratteristiche meccaniche superiori, e le risposte immunitarie *in vivo* dell'ospite erano inferiori. L'innesto di *scaffold* epatici ricellularizzati trapiantati in suini vivi ha portato a risposta immunitaria dopo 3 giorni senza terapie immunosoppressive. Comparativamente, questo periodo di tempo è aumentato a più di 15 giorni quando abbinato a un regime di immunosoppressione, e può dunque potenzialmente durare più a lungo se il trattamento immunosoppressivo viene sostenuto.

Pertanto, lo sviluppo della ricerca sul meccanismo che induce rigetto immunitario, e sulle strategie per evitarlo, è fondamentale per il successo dei trapianti a lungo termine di organi bioingegnerizzati.

### **3.2 - UTILIZZO DI SCAFFOLD SUINI**

Al fine di aumentare il numero di organi disponibili al trapianto, gli *scaffold* non possono essere ottenuti dal trattamento di organi sani, trapiantabili. Un approccio proposto da diversi ricercatori consiste quindi nell'utilizzare organi animali come fonte di impalcature da ricellularizzare con cellule umane e creare dunque dei surrogati di organo. Si parla di "xenotrapianto" nel caso di un trapianto tra specie diverse. Questa pratica sta ottenendo un'attenzione significativa, in particolare a seguito del trapianto di rene suino geneticamente modificato in un essere umano cerebralmente morto e del recente trapianto di cuore suino in un paziente. La decellularizzazione di organi suini è un'area attiva di ricerca la cui sfida principale è la rimozione di xenoantigeni, come il galattosio-alfa-1,3 dalla superficie cellulare in modo da poter evitare l'insorgere di risposte immunitarie e rigetto, rendendo la matrice immunologicamente inerte.

Un altro problema con l'utilizzo di organi di maiale come fonte di *scaffold* è il rischio di trasmissione di virus suini come PERV (retrovirus porcino endogeno), virus dell'epatite o herpesvirus suino linfotropico. Vari suini, geneticamente modificati, sono stati allevati con l'intento di ridurre l'immunogenicità dei loro organi; tuttavia, si è riscontrato che possono ancora provocare una risposta immunogenica. Poiché la decellularizzazione provoca la lisi delle cellule e rimuove i detriti cellulari, è stato ipotizzato che ciò possa essere sufficiente anche all'eliminazione degli xenoantigeni e dei virus suini dagli *scaffold*, ci sono però opinioni molto contrastanti sull'argomento sebbene qualche studio si sia rivelato promettente: la decellularizzazione con 0,1% SDS di sezioni di fegati suini è sembrata essere sufficiente ad

eliminare anche il galattosio-alfa-1,3-galattosio, così come gli antigeni dei leucociti suini e DNA PERV.

A causa dei rischi discussi è stato proposto di utilizzare *scaffold* provenienti da organi umani diversi da quello da sostituire, e a seguito della ricellularizzazione adattarli alle specifiche necessità. La milza e la placenta sono alternative adatte come fonte di *scaffold* per produrre fegati bioingegnerizzati perché sono prontamente disponibili, hanno una rete vascolare che consente scambio di sangue venoso e arterioso e contengono fattori di crescita diversificati che supportano l'impianto cellulare. Milza decellularizzata e placenta, che sono state ripopolate con epatociti primari e frammenti di fegato freschi, hanno mostrato una caratteristica struttura epatica a cordone e hanno espresso livelli notevoli di urea e glicogeno dopo il loro trapianto eterotopico in ratti e pecore.

#### **4 - RICELLULARIZZAZIONE E TIPI CELLULARI**

Dalla pubblicazione, considerata fondamentale, del 2008 in cui veniva dimostrata la decellularizzazione di un cuore di ratto, la bioingegneria dell'intero organo, comparsa con l'obiettivo di creare organi trapiantabili specifici per il paziente, ha guadagnato l'attenzione di scienziati e, allo stesso modo, dell'opinione pubblica. L'ottenimento di *scaffold* che conservino struttura tridimensionale e composizione di un organo è stato il primo passo, ma resta ora il compito di finalizzare un processo che permetta un efficace ripopolamento cellulare. La ricellularizzazione richiede un'appropriata fonte cellulare, un metodo di semina ottimale e un metodo di coltura fisiologicamente rilevante, da realizzare senza dubbio servendosi dell'ausilio di un bioreattore.

Per la completa rigenerazione dell'organo è necessario che il parenchima, il sistema vascolare e i componenti di supporto siano funzionanti. Molti gruppi di ricerca hanno iniziato a valutare possibili tecniche e ciò ha fornito progressi incoraggianti per lo sviluppo di strategie ottimali. Tuttavia, la tecnologia richiesta per l'intera coltura delle cellule dell'intero organo ha limitato le ricerche a causa della complessità, della specificità e, in alcuni casi, del costo; inoltre gli studi che comprendono l'impianto *in vivo* sono molto limitati. Tra le possibili fonti cellulari per la semina i ricercatori si sono principalmente rivolti verso le cellule staminali embrionali (ESC) e mesenchimali (MSC); queste due specifiche tipologie sono di estremo interesse in quanto facilmente espandibili in coltura e in grado di differenziarsi in più tipi cellulari. Inoltre, recenti evidenze hanno suggerito che la coltura nello *scaffold* organico consente alle cellule di persistere e proliferare meglio rispetto alla coltura tradizionale.

##### **4.1 - CELLULE STAMINALI EMBRIONALI**

Le ESC sono cellule pluripotenti che vengono spesso utilizzate per valutare il comportamento delle matrici organiche: si procede osservando l'espressione dei marcatori in modo da capire se la matrice possa promuovere, o eventualmente ostacolare, il differenziamento delle ESC in differenti tipi organo specifici.

*Scaffold* renali murini decellularizzati sono stati seminati con ESC di topo senza riscontrare segnali esogeni pro-differenziazione: al momento della semina, le ESC hanno espresso marcatori renali ed endoteliali, mentre la pluripotenza è diminuita. In un altro studio, sono stati seminati ESC umani su sezioni di polmone e rene di macaco rhesus e sebbene gli ESC abbiano espresso dei marcatori, l'espressione non era specifica dell'organo. Questi comportamenti potrebbero trovare spiegazione nel fatto che l'ECM dell'organo decellularizzato è probabilmente limitata nella sua capacità di fornire tutti i segnali necessari



per la differenziazione delle ESC. Questa idea ha portato i ricercatori a teorizzare che la pre-differenziazione delle ESC potrebbe condurre a un miglioramento della differenziazione organo-specifica. A questo proposito la semina di ESC umani è stata confrontata con la semina di ESC pre-differenziati nelle cellule mesendodermali (MEC), entrambe osservate su *scaffold* cardiaci murini. Dopo 6 settimane dall'impianto in topi immunodeficienti gli *scaffold* seminati con MEC contenevano più cellule ed erano meglio vascolarizzati rispetto alla semina con ESC. Sebbene il ruolo delle matrici nella differenziazione delle ESC non sia ancora del tutto chiaro, esse sono quindi più probabilmente adatte a migliorare la differenziazione delle ESC se abbinate con l'appropriato grado di differenziazione cellulare. La preoccupazione principale per l'impianto di ESC in uno *scaffold* è la tumorigenicità: si applicano infatti strategie per migliorare la sicurezza degli ESC includendo la garanzia di ottenere la differenziazione finale, eliminare il contenuto cellulare residuo, interferire con i geni associati alla proliferazione tumorale ed eseguire routine di controllo post-trapianto. Inoltre, la ricerca sugli ESC è eticamente controversa perché l'estrazione richiede la distruzione degli embrioni.

#### **4.2 - CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI**

L'utilizzo delle cellule staminali mesenchimali (MSC) costituisce un fronte molto promettente per l'ingegneria degli organi grazie alla loro applicabilità clinica. Le MSC possono infatti essere isolate da un paziente, da fonti come il midollo osseo o il tessuto adiposo, ed espanse in coltura fino a ottenere quantità fisiologicamente rilevanti. Oltre alla loro capacità di differenziarsi in vari tipi cellulari, le MSC sono coinvolte nella riparazione di tessuti e possono fornire supporto allo stroma attraverso la secrezione di citochine e chemochine, un ruolo che probabilmente faciliterà una migliore integrazione di organi seminati al momento del trapianto.

È interessante notare che ci sono prove che confermano che gli *scaffold* organici ne migliorano la differenziazione: MSC derivate dal midollo osseo di topo, seminate su *scaffold* epatici murini, sono state messe in coltura statica per 4 settimane. L'impalcatura epatica tridimensionale ne ha migliorato significativamente la differenziazione in epatociti rispetto alla tradizionale coltura cellulare 2D, migliorandone la sopravvivenza, la funzionalità e diminuendo la deposizione di collagene. Inoltre, sezioni di *scaffold* di fegato seminato hanno conservato la funzionalità in seguito al trapianto in un topo soggetto a insufficienza epatica fulminante. Analogamente *scaffold* cardiaci sono stati in grado di migliorare la differenziazione delle MSC in cardiomiociti, in particolare se accoppiati con stimolazione meccanica ed elettrica. Negli ultimi studi si è visto che anche fonti alternative di cellule

staminali possono essere utili al processo di ripopolamento organico: liquido amniotico, sangue del cordone ombelicale, placenta e mucosa olfattiva possono infatti fornire un contributo e dunque trovare un'applicazione negli studi di ingegneria organica. Nel 2014 è stato valutato l'uso di MSC prelevate dal sangue del cordone ombelicale per la semina di sezioni di *scaffold* cardiaci umani; queste MSC, infiltrate nella matrice, hanno mostrato un aumento della vitalità e del metabolismo quando sono cresciute in presenza della matrice. Il cordone ombelicale è la fonte ideale di MSC poiché queste cellule sono facilmente accessibili, abbondanti e proliferative rispetto alle cellule di altri tessuti.

Cellule staminali organo-specifiche, sebbene non ancora applicate all'ingegneria organica, fornirebbero quindi una fonte cellulare fisiologicamente rilevante per la ricellularizzazione; inoltre, a differenza di ESC e iPSC, gli MCS sono privi di implicazioni etiche e problemi tumorigenici.

#### **4.3 - CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI INDOTTE**

Un'altra promettente tipologia cellulare per la ricellularizzazione degli organi è quella costituita dalle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC); esse vengono generate riprogrammando le cellule tissutali adulte attraverso specifici geni pluripotenti che le retrocedono ad uno stato "simil-embrionale".

Recenti indagini le hanno sfruttate per la ricellularizzazione polmonare. Le iPSC umane sono state differenziate in cellule epiteliali alveolari di tipo II (AETII) ad alta efficienza, cellule con questo particolare fenotipo esprimono tipici marcatori polmonari, tra cui la proteina C e la proteina B. Quando queste cellule sono state seminate in matrici polmonari, di ratto e umane, hanno prontamente aderito, proliferato e mantenuto l'espressione di marcatori alveolari.

Per la ricellularizzazione di matrici cardiache di topo, sono state perfuse cellule progenitrici dei miociti, derivati da iPSC, allo *scaffold* attraverso l'aorta. Le cellule hanno ripopolato efficacemente la matrice e hanno iniziato la contrazione spontanea dopo 20 giorni; tuttavia, l'ecocardiogramma ha rivelato una morfologia dell'onda irregolare, suggerendo che le cellule mancavano di un sistema di conduzione organizzato. Indipendentemente da ciò, l'endocardio ospitava strutture simili a muscoli e a vasi, formate da iPSC-miociti seminati. Il tessuto risultante ha dimostrato di essere farmaco-responsivo a un agonista adrenergico e, allo stesso modo, a un induttore di aritmie ventricolari. Altri hanno confrontato la ricellularizzazione del cuore con cardiomiociti derivati da iPSC, con quella da MSC e hanno

scoperto che iPSC-cardiomiociti aderivano con meno efficienza rispetto alle MSC, anche con l'aggiunta di fibronectina alle impalcature per migliorarne l'adesione.

Pertanto, l'utilizzo di iPSC per la ricellularizzazione dell'organo richiede futuri approfondimenti e ricerche, ma la loro capacità di differenziarsi in fenotipi appropriati secondo necessità, permetterebbe probabilmente di fornire un'adeguata risposta al problema della fonte cellulare eliminando la necessità di raccogliere campioni specifici dai pazienti.

#### **4.4 - RICELLULARIZZAZIONE DI SISTEMI VASCOLARI**

Il successo clinico di qualsiasi costrutto di ingegneria tissutale dipende dalla sua capacità di sopravvivenza e integrazione nel corpo, in particolare stabilendo una connessione con l'afflusso di sangue (anastomosi). La criticità principale risiede nel fatto che la vascolarizzazione decellularizzata degli *scaffold* organici è altamente trombogena, anche utilizzando un anticoagulante. Pertanto, il sistema di vasi di uno *scaffold* deve essere completamente ricellularizzato affinché il trapianto possa avvenire con successo. La semina viene normalmente eseguita per perfusione o con apparati a gravità.

##### **4.4.1 - CELLULE ENDOTELIALI**

Attualmente le cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVEC) sono la tipologia cellulare più utilizzata; ad esempio, nel creare un'impalcatura epatica l'impianto di HUVEC nello *scaffold* ha portato a una ricostruzione efficace del sistema endoteliale dei vasi. Un altro risultato incoraggiante è stato ottenuto grazie a degli *scaffold* polmonari murini seminati con HUVEC, impiantati poi ortotopicamente nei ratti. Essi, dopo 14 giorni, non hanno mostrato sanguinamento nelle vie aeree sebbene sia stato notato edema, sintomo di un possibile accumulo indesiderato di liquidi. Non tutti i risultati in merito si sono rivelati un successo, ad esempio la semina attraverso l'arteria polmonare di cellule endoteliali microvascolari polmonari in *scaffold* di ratto ha portato, successivamente all'impianto, a trombi e sanguinamento nelle vie aeree. Questo ha suggerito una rivascolarizzazione di tipo incompleto.

Concludendo quindi si può affermare che le cellule endoteliali hanno il potenziale per un ottimale ripopolamento vascolare; ciò unitamente alla perfusione da più vie di accesso e al controllo della pressione durante la semina, porterà allo sviluppo di protocolli sempre più efficaci.

## 5 - RICELLULARIZZAZIONE PARENCHIMALE

### 5.1 - METODO

Sebbene alcuni tipi comuni di cellule siano stati valutati per la ricellularizzazione di organi diversi, il metodo con cui esse vengono seminate è altamente dipendente dall'organo stesso. Un albero vascolare è un elemento comune a tutte le metodologie, ma in alcuni casi possono essere utili ulteriori vie non vascolari di semina. La scelta del metodo di distribuzione è importante anche a causa dell'influenza meccanica dello stress di taglio del fluido e della pressione. Vengono ora presentati i principali metodi di semina, specifici per ciascun organo.

#### 5.1.1 - FEGATO

Il fegato può essere seminato con l'ausilio di molteplici vie vascolari, vale a dire la vena porta, l'arteria epatica o la vena cava inferiore (IVC). Nella maggior parte degli studi venivano utilizzate indifferentemente o la vena porta o la vena cava, si è però osservato negli anni che impiegando percorsi multipli la disposizione spaziale delle cellule viene naturalmente facilitata. Per la semina per perfusione di *scaffold* epatici si è quindi incominciato a depositare cellule nella zona pericentrale attraverso la vena cava e cellule nell'area periportale attraverso la vena porta, portando a un miglior attecchimento rispetto agli standard dati dall'uso delle tecniche precedenti a singolo dotto. È, inoltre, interessante notare che la direzionalità del flusso durante la perfusione ha un ruolo nell'influenzare l'allineamento delle cellule.

In un altro studio si è visto che la semina attraverso la vena porta o attraverso la vena epatica non era efficiente tanto quanto la semina degli epatociti, sospesi in un gel di collagene, direttamente nel fegato usando un ago. Questi risultati sono però stati riconsiderati perché si è osservato che l'iniezione diretta di cellule può portare a degli effetti indesiderati come la formazione di agglomerati, scarso attecchimento cellulare e distribuzione insufficiente in tutto lo *scaffold*. Ciò è stato dimostrato valutando la ricellularizzare del parenchima epatico di *scaffold* di ratto con epatociti murini, seminati con cinque iniezioni nei lobi epatici, generando risultati scoraggianti con un attecchimento di cellule seminate inferiore al 13%. Possiamo quindi dire che l'inseminazione a perfusione ha portato a risultati omogeneamente più favorevoli, è infatti il processo che viene preferito e più spesso è stato adottato.

Cellule introdotte nel fegato attraverso la perfusione continua del mezzo all'interno di un bioreattore hanno ottenuto circa il 70% di attecchimento, mentre valori di circa l'86% sono

stati possibili infondendo le cellule direttamente nel fegato tramite un circuito di perfusione che incrementava il flusso ogni 10/15 minuti. Questo metodo "step-centrico" è stato utilizzato con successo (con una percentuale di attecchimento superiore al 95%) sia durante la semina di epatociti primari murini nello *scaffold* epatico di ratto che durante la semina di epatociti primari suini in fegati decellularizzati di maiale.

Infusioni multiple saranno probabilmente necessarie affinché sia fornito un numero adeguato di cellule per ricostituire sufficientemente il parenchima dell'organo; in effetti la tecnica dell'infusione seriale multifase è già stata utilizzata per aumentare il numero di cellule, seminate da 50 a 200 milioni (che rappresentano circa il 20% della massa epatica di un topo). La semina per perfusione sembra quindi essere nel complesso il metodo più efficiente nella distribuzione delle cellule attraverso lo *scaffold* epatico, e le indagini future probabilmente trarranno vantaggio dall'utilizzo di più percorsi di semina.

### 5.1.2 - RENE

Il rene può essere seminato o attraverso il sistema vascolare o attraverso l'uretere; tuttavia, la perfusione anterograda attraverso l'arteria renale è la via più comunemente utilizzata in letteratura. La semina di ESC di topo a 0,2 ml/min attraverso l'arteria renale ha riportato una distribuzione uniforme delle cellule con più del 97% di attecchimento cellulare. In un altro caso la semina per perfusione arteriosa a 25 ml/min, di 40 milioni di cellule tubolari corticali renali epiteliali (RCTE) umane ha portato a una copertura approssimabile al 50% dello *scaffold*.

Due differenti studi si sono concentrati nella valutazione dell'uretere come via di semina ottenendo però risultati differenti. Nella prima indagine gli esperimenti di coltura statica hanno evidenziato una peggior distribuzione e ritenzione delle cellule, con una percentuale del 50% di trattenuto; per confronto la semina attraverso l'arteria renale ha portato a una percentuale superiore al 95%. Nella seconda indagine è stata osservata adesione sito-specifica delle cellule renali neonatali di ratto, così come la polarizzazione nella disposizione spaziale; ciò ha quindi rivelato valori di adesione promettenti tanto che gli *scaffold* renali, una volta seminati e finalizzati, si sono rivelati capaci di produrre urina *in vitro* e *in vivo*. Il fatto che il metodo di semina attraverso l'uretere sia stato migliorato nel secondo studio rispetto al primo, generando un gradiente di pressione tramite il vuoto (via vacuum), potrebbe spiegare la discrepanza nelle osservazioni evidenziate nei due casi. Un'altra importante osservazione evidenziata dal secondo gruppo è stato lo scoprire che una pressione a vuoto superiore a 70 [cmH<sub>2</sub>O] ( $\approx 6865$  [Pa]) danneggia il tessuto parenchimale, mentre una pressione di 40

[cmH<sub>2</sub>O] ( $\approx 3923$  [Pa]) risultava accettabile; questo illustra l'importanza delle condizioni meccaniche durante la semina.

### 5.1.3 - POLMONE

Il polmone permette due differenti canali di semina: la via vascolare e la via aerea. Utilizzando la trachea per la semina di cellule fetali polmonari di ratto e l'arteria polmonare per la semina di HUVEC, si è dimostrato che la membrana alveolare-capillare così ricellularizzata si presta allo scambio di gas *in vitro* e *in vivo*. Entrambe le tipologie cellulari sono state seminate per gravità e coltivate in un bioreattore a una pressione impostata nell'intervallo di 10-15 [mmHg]. Lo stesso risultato è stato ottenuto in uno studio analogo in cui le cellule sono state instillate a 3 ml/min nel sistema vascolare e come bolo nelle vie aeree fino a quando i polmoni non sono stati completamente gonfiati; un effettivo scambio di gas è avvenuto dopo l'impianto dei polmoni rigenerati.

Altri gruppi hanno tentato la semina delle cellule attraverso la sola trachea, utilizzando la coltura d'organo basata sulla ventilazione a 180 atti respiratori/minuto oppure altri con un bioreattore rotante; i risultati sono stati sempre inferiori rispetto all'uso di entrambe le vie.

Dopo questi rapporti iniziali, molte altre ricerche hanno adottato metodi di semina simili per valutare il comportamento di diversi tipi cellulari. In definitiva, è probabile che la completa ricellularizzazione del polmone si realizzerà grazie a una semina attraverso entrambi i canali, aerei e vascolari, in particolare per quest'ultimo: sia attraverso l'arteria polmonare che attraverso le vene polmonari. La sfida principale sarà quindi quella di trovare il metodo ottimale di distribuzione di cellule in tutta la struttura ramificata delle due vie, per una copertura completa delle regioni prossimale e distale dello *scaffold*.

### 5.1.4 - CUORE

Per la ricellularizzazione del cuore, le cellule possono essere seminate nelle arterie coronarie attraverso l'aorta. Si è visto infatti in uno studio del 2013 che gli iPSC erogati tramite l'aorta sono stati in grado di ripopolare una matrice cardiaca di topo ma non senza difficoltà, poiché la coltura a perfusione continua portava al lavaggio della maggior parte delle cellule, i ricercatori impegnati in questo percorso hanno quindi deciso di perfondere il cuore a intervalli di 8 ore. Questa tecnica si rivelò efficace e alla fine del periodo di cultura, i cardiomiociti derivati da iPSC formavano miofilamenti, responsivi ai farmaci e a contrazione spontanea. Altri studiosi hanno invece seminato un singolo bolo di MEC o di ESC attraverso l'aorta in *scaffold* cardiaci di topo, a cui è seguita coltura statica per 2 settimane. Sebbene

nessun battito sia stato osservato a seguito dell'impianto sottocutaneo in ratti, gli *scaffold* seminati sono stati vascolarizzati dall'ospite e le cellule hanno espresso marker cardiaci e marker endoteliali. La semina delle arterie coronarie attraverso l'aorta è promettente, più difficile è invece la semina della parete ventricolare.

L'attecchimento cellulare nella parete ventricolare è stato ottenuto attraverso iniezione diretta, da almeno due gruppi. I ricercatori facenti parte del gruppo Ott et al. nel 2008 hanno utilizzato la tecnica che prevedeva cinque iniezioni in serie, di cellule cardiache di ratto neonatale, nel ventricolo anteriore sinistro di cuore murino; a ciò è seguita coltura in un bioreattore con 20 mL/min di flusso atriale e 6 ml/min di flusso coronarico, nonché stimolazione elettrica. Sebbene sia stata notata una densa cellularità nel sito di iniezione, le cellule non erano ben distribuite su tutto lo *scaffold*. Nel 2014 i ricercatori del gruppo Weymann hanno seminato cellule utilizzando cinque iniezioni nel ventricolo sinistro, questa volta di *scaffold* cardiaci suini, e hanno riportato circa il 50% di cellularità nel sito di iniezione, ma una minore semina nelle porzioni distali. Indipendentemente dalla distribuzione cellulare non omogenea, Weymann et al. hanno comunque potuto osservare la presenza di un'attività elettrica e Ott et al. hanno notato la formazione di fibre contrattili, la contrazione dei cardiomiociti in risposta a stimoli elettrici, il funzionamento della pompa cardiaca, e la reattività ai farmaci.

## **5.2 - OTTIMIZZAZIONE DELLA SEMINA PARENCHIMALE**

La semina cellulare può efficacemente essere migliorata attraverso l'uso di un rivestimento proteico applicato agli *scaffold*. In uno studio condotto nel 2014 matrici polmonari di ratto sono state rivestite con laminina e fibronectina ottenendo con successo un legame più forte degli ESC murini, con un aumento della cellularità di 2 o 3 volte, e una migliore distribuzione cellulare in tutto lo *scaffold*. Nella stessa ricerca si è evidenziato che l'integrina degli ESC murini consente l'adesione a laminina e fibronectina ma non al collagene I o IV.

In un'altra indagine, condotta con le stesse modalità e gli stessi obiettivi, è stato valutato il rivestimento di *scaffold* polmonari di topo con Matrigel e con collagene I. ESC murini hanno espresso marcatori polmonari (pro-SPC e TTF-1) in maniera simile sia negli *scaffold* rivestiti di Matrigel che in quelli che ne erano privi. Tuttavia, gli ESC di topo seminati in matrici rivestite di collagene I non hanno mostrato espressione pro-SPC, mostrando invece un'espressione minima di TTF-1. Pertanto, il rivestimento di collagene I è stato dannoso per la differenziazione di ESC di topo e quello con Matrigel non ha aumentato

la differenziazione; il che potrebbe supportare il fatto che gli ESC di topo non aderiscono al collagene I. La mancanza di differenziazione specifica potrebbe anche essere dovuta a una maggiore rigidità causata dal rivestimento di collagene. Infatti, è stato riscontrato che questo tipo di rivestimento ha modificato le proprietà meccaniche della matrice e, come già visto in precedenza, le cellule staminali possono differenziarsi diversamente in base alle caratteristiche dello *scaffold*.

Un passo fondamentale sarà determinare la densità cellulare e il numero di cellule necessarie per una semina ottimale. Attenzione va posta al fatto che aumentando la densità cellulare aumenta la possibilità di formazione di aggregati cellulari che potrebbero occludere vasi e causare necrosi impedendo il trasferimento dei nutrienti. Per prevenire i *cluster* è stato suggerito l'uso dell'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA). Utilizzare una cella di filtraggio potrebbe invece portare all'effetto opposto disperdendo gli aggregati ancor prima della semina. Tenendo in considerazione tutto questo sembra preferibile l'uso di basse concentrazioni cellulari e di infusioni cellulari multiple, piuttosto che un grande bolo cellulare concentrato.

Per la semina di più tipi cellulari, entrano in gioco molte variabili, è possibile eseguirla in sequenza per più tipologie attraverso la stessa via, oppure simultaneamente nella stessa sospensione cellulare. È, infine, stato appurato che la semina simultanea di epatociti e MSC consente risultati superiori rispetto al processo di semina sequenziale.



## **6 - BIOREATTORI**

### **6.1 - PARAMETRI E APPLICAZIONI**

Affinché la coltura degli organi rigeneranti sia possibile, è necessario munirsi di un bioreattore, ovvero uno strumento che consenta di fornire nutrienti allo *scaffold* tramite perfusione. Questo può essere realizzato con una struttura molto semplice, costituita da una pompa di perfusione e da una camera d'organo con almeno un ingresso (*inlet*) e un'uscita (*outlet*). Nel corso degli anni sono poi state sviluppate delle apparecchiature più sofisticate per il monitoraggio della portata, della pressione, del livello di ossigenazione e di altri parametri; esistono inoltre anche dei bioreattori che non solo inglobano queste funzioni permettendone il monitoraggio ma possono anche manipolarle. In questa categoria troviamo ad esempio bioreattori “ad autocorrezione” in grado di regolare la portata in base a una pressione massima o che possono infondere mezzi in base alle concentrazioni di glucosio e lattato che vengono rilevate.

Alcuni gruppi di ricerca si stanno oggi concentrando sulla standardizzazione delle modalità di funzionamento, sviluppando al contempo sistemi il più possibile automatizzati, che possano rendere più rapidi i processi e limitare l'intervento umano, ad esempio per il cambio di reagente o la preparazione dei campioni tra lavaggio, fasi di liofilizzazione, incubazione e centrifugazione. Da segnalare che, oltre alla perfusione, anche gli stimoli organo-specifici sono fondamentali per lo sviluppo di organi funzionanti. I segnali meccanici possono aiutare a mantenere i fenotipi e a promuovere la differenziazione delle cellule progenitrici. I bioreattori devono quindi generare un ambiente organo-specifico in grado di imitare le condizioni *in vivo*.

### **6.2 - BIOREATTORI NOTEVOLI**

#### **6.2.1 - FEGATO**

Per quanto riguarda l'ingegneria epatica, i bioreattori descritti in recenti pubblicazioni si basano comunemente sull'impiego della perfusione vascolare senza nessun'altra influenza meccanica. Ad esempio, più gruppi di ricerca utilizzano un semplice apparato costituito da una pompa peristaltica, un ossigenatore, una trappola per bolle e una camera (senza superfici rigide) per la coltura di fegato di maiale e di topo.

Per la coltura del fegato di furetto, in uno studio condotto nel 2012, è stato utilizzato anche un sistema basato sulla perfusione costituito da una camera di alloggiamento con una

cassetta d'organo sterile e ventilata, aggiunta modificando un LifePort Kidney Transporter. Tramite una pompa per infusione, il fluido è stato fatto circolare tra la cassetta e un serbatoio da 3 [L] attraverso un tubo dell'ossigenatore collegato a una miscela di aria e CO<sub>2</sub>. Per la rigenerazione del fegato, utilizzando la perfusione, il sistema duttale può rivelarsi utile anche se ciò non è stato ancora studiato o dimostrato; inoltre, un doppio sistema di perfusione per la vena porta e per l'arteria epatica del fegato potrebbe essere efficiente.

### **6.2.2 - RENE**

Per quanto riguarda i bioreattori ottimizzati per la ricellularizzazione di *scaffold* renali, nel 2015, un gruppo di ricercatori, ha costruito un sistema basato sulla perfusione munito di due flange di vetro adiacenti con valvola e setto. Gli *scaffold* renali di ratto sono stati seminati nel bioreattore ad una portata elevata di 25 [mL/min] (circa 30930 [Pa]) di perfusione pulsatile anterograda nell'arteria renale prima di diminuire la portata a 4 [mL/min] (circa 4949 [Pa]) per la coltura. Sebbene cellule RCTE umane siano state in grado di coprire circa la metà dell'area renale e di formare strutture tubolari, i ricercatori hanno osservato che l'accesso all'ossigeno era limitato in alcune aree dello *scaffold*, suggerendo quindi che è necessaria un'ulteriore ottimizzazione del processo di coltura del dispositivo.

Esistono poi dei bioreattori che facilitano la perfusione sia attraverso l'arteria renale che attraverso l'uretere, favorendo la rigenerazione renale. La camera di semina di questo particolare apparecchio include una porta per l'aspirazione dell'aria per permettere di generare un ambiente a pressione negativa e creare un gradiente di pressione transrenale per facilitare la semina attraverso l'uretere; tuttavia, per la successiva coltura dell'intero organo, è stata utilizzata soltanto la perfusione mentre all'uretere erano conferite funzioni di drenaggio passivo nella camera.

### **6.2.3 - POLMONE**

Per quanto concerne l'ambito dell'ingegneria polmonare, il processo di ventilazione di mezzi o aria, mediato da un bioreattore, si è rivelato essere fondamentale. Il passaggio dalla ventilazione umida a quella secca sembra essere un passo necessario affinché avvenga una corretta riepitelizzazione delle vie aeree. Nel 2011, per necessità di ricerca, è stato costruito un bioreattore personalizzato per il polmone, facile da usare ed economico; esso sfruttava per il suo funzionamento la ventilazione a pressione negativa, aspirando aria da una camera mediante una pompa a siringa. Questo bioreattore è stato utilizzato poi per la rigenerazione del tessuto polmonare di ratto per un trapianto.

Una successiva valutazione del sistema di coltura del bioreattore, per il mantenimento a lungo termine del tessuto polmonare nativo, ha indicato che potrebbe essere in grado di fornire i nutrienti sufficienti e il giusto sostegno meccanico per favorire la sopravvivenza cellulare. È interessante notare che la somministrazione di mezzi mediante ventilazione si è rivelata capace di fornire nutrienti al parenchima e al sistema vascolare, mentre la perfusione non sarebbe stata singolarmente adeguata al mantenimento delle cellule nel parenchima. Per quanto riguarda l'applicabilità a modelli animali più grandi, questo progetto di bioreattore è stato facilmente adattato per l'uso con polmoni di macaco rhesus.

#### **6.2.4 - CUORE**

Le applicazioni di ingegneria dei tessuti cardiaci impiegano sia sollecitazione meccanica tramite stiramento sia stimoli elettrici, e hanno mostrato risultati promettenti nel promuovere funzione e conduzione del battito organizzato. In una ricerca del 2008 è stato utilizzato un bioreattore il cui funzionamento era basato su un sistema cardiaco funzionante rivestito d'acqua della società "Radnoti". Questo bioreattore incorporava trasduttori di pressione e flussometri consentendo quindi la misurazione del pre-carico e del post-carico, nonché dell'afflusso e del deflusso, al fine di erogare pressioni intraventricolari fisiologicamente rilevanti. Inoltre, una stimolazione elettrica sincronizzata potrebbe essere erogata a 5–20 V per una corretta sollecitazione del costrutto cardiaco.

Nel 2013 un gruppo di ricercatori ha creato un bioreattore modulare a basso costo per la coltivazione dell'intero cuore che utilizzava la perfusione attraverso le coronarie e stimolazione meccanica triassiale. Usando una piattaforma operativa basata su "LabVIEW®", il ventricolo sinistro di cuori di ratto decellularizzato subisce uno stiramento controllato utilizzando un palloncino gonfiabile in lattice, il riempimento del quale è attivato da una pompa a siringa; una pompa a membrana è stata invece utilizzata per erogare espansioni volumetriche a frequenze prestabilite. La pressione all'interno del sistema veniva monitorata e controllata da un sensore di pressione. Per la perfusione, un trasduttore di pressione e una pompa peristaltica azionavano un sistema di tubazioni con sifone incorporato. Questo sistema altamente integrato è stato espanso attraverso un serbatoio di supporto costituito da un recipiente di agitazione a doppia camicia (*double jacket*) dotato di un agitatore a disco. Il serbatoio è stato dotato di un anello di spruzzaggio per fluidi gassanti, un sensore di pH, un sensore pO<sub>2</sub> e un sensore di temperatura per il monitoraggio delle condizioni dei fluidi. Un apparato di miscelazione del gas, personalizzato con un regolatore di flusso, ha consentito il condizionamento completamente automatizzato dei fluidi con aria/O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, e N<sub>2</sub> in risposta

ai valori di pH e pO<sub>2</sub>. I ricercatori coinvolti avevano anche notato che il monitoraggio e la stimolazione elettrofisiologica potrebbero essere facilmente integrati nel loro sistema di bioreattori in futuro.

Nel 2014 è stato utilizzato anche un sistema di bioreattore commerciale, il “BIOSTAT B-DCU II” di “Sartorius Stedim Biotech”, che consisteva di una torre di controllo collegata a un recipiente di coltura personalizzato in vetro dotato di strumenti per un controllo preciso della temperatura e del pH. Usando fino a sei pompe peristaltiche, 5 L di fluido possono essere continuamente fatti circolare attraverso cuori di maiale a una portata e pressione prestabilite.

### **6.3 - OTTIMIZZAZIONE DELLA COLTURA DEL BIOREATTORE**

Una corretta coltura tramite bioreattore richiederà l'ottimizzazione dello strumento a seconda del determinato organo che si desidera funzionalizzare; alcuni dei parametri che devono essere considerati quando si sviluppa un protocollo di coltura includono volume, pressione, portata, tempo di coltura e stimoli meccanici. È stato osservato che man mano che gli *scaffold* vengono popolati da cellule, la porosità diminuisce e la pressione deve quindi essere aumentata. Pertanto, il monitoraggio della pressione e la regolazione della portata durante la coltura saranno fondamentali, anche per la prevenzione di un eccessivo stress di taglio e del danno meccanico alle cellule seminate. I tipi cellulari comunemente usati per la ricellularizzazione dipendono dal grado di adesione di cui sono capaci in modo da evitare il più possibile l'anoikis che può verificarsi se le cellule ricircolano per lunghi periodi di tempo senza aderire alla matrice.

La corretta scelta del tempo di coltura e del ricambio di nutrienti richiede ancora una volta una valutazione del singolo caso in esame. Il livello di ossigenazione e il *turnover* dei nutrienti sono correlati al metabolismo cellulare e, a sua volta, al numero di cellule. Ancora più importante, il monitoraggio del metabolismo può fornire informazioni su condizioni potenzialmente ipossiche (carenti di ossigeno) nel caso in cui la perfusione fosse inadeguata. In definitiva, il campo dell'ingegneria degli organi trarrà grandi benefici dallo sviluppo di ulteriori tecniche non invasive per la valutazione della completezza della rigenerazione organica, magari implementate direttamente sul bioreattore. Gli stimoli chimici, elettrici e meccanici, sono importanti per un'efficiente ricellularizzazione, e quindi questi segnali biofisici dovranno essere altamente regolati. Da citare il fatto che il possibile stimolo meccanico involontario che le cellule subiscono durante la semina e la coltura nel contesto di un bioreattore è ancora sconosciuto. Laddove alcuni ingegneri dei tessuti utilizzano

l'inoculazione diretta delle cellule attraverso una siringa o un ago, altri utilizzano procedure automatiche che sfruttano pompe di perfusione o pompe a siringa. A questo scopo, i ricercatori dovrebbero valutare gli effetti risultanti del flusso laminare, della pressione, dello stress di taglio durante la semina e la coltura dell'intero organo sulla cellula.

## 7 - APPLICAZIONI CLINICHE E COMMERCIALI

Attualmente l'utilizzo clinico di *scaffold* ottenuti da interi organi non è sviluppato ed è ancora in fase perlopiù sperimentale. Tuttavia, le valvole cardiache, i vasi sanguigni e l'ECM decellularizzato da pelle, vescica, pericardio e sottomucosa dell'intestino tenue, sono stati valutati e vengono spesso adoperati. Tra i prodotti acellulari più utilizzate nelle applicazioni cliniche ci sono le matrici tissutali, che non sono utilizzati soltanto per migliorare la rigenerazione cutanea (come fa ad esempio la matrice "AlloDerm"), ma anche in procedure chirurgiche come la ricostruzione della parete addominale, il trattamento di traumi complessi o ferite, la ricostruzione del tessuto della mammella e dell'areola post mastectomia. Nell'ambito dell'applicazione di *scaffold* provenienti da animale, è da segnalare l'uso della vescica urinaria suina ingegnerizzata, che è in grado di fornire aiuto nella rigenerazione del muscolo scheletrico in pazienti con perdita muscolare volumetrica. In via di sviluppo è l'innesto "Avance" di "Axogen", un'impalcatura nervosa decellularizzata che permetterebbe di riparare i nervi danneggiati. Tessuti ingegnerizzati possono anche essere utilizzati in un fronte di ricerca recentissimo; quello della bio-stampa: i prodotti decellularizzati possono fare da base per la sintesi di idrogel "bioinks" per la bio-stampa 3D di un organo umano funzionale.

Per quanto riguarda la commercializzazione, negli Stati Uniti la ricellularizzazione della matrice dermica acellulare (ADM) è spesso limitata alla migrazione cellulare dai tessuti dell'ospite adiacenti al sito, dopo l'impianto. Questo perché gli ADM sono soggetti a un processo regolatorio più rigido rispetto alle terapie tissutali standard, da parte della "Food and Drug Administration" (FDA). Le tecnologie di medicina rigenerativa rientrano infatti nella categoria dei prodotti combinati, la cui definizione è la seguente: "Un prodotto che comprende due o più componenti regolamentati, come ad esempio le seguenti combinazioni: farmaco/dispositivo, biologico/dispositivo, farmaco/biologico o farmaco/dispositivo/biologico; cioè componenti fisicamente, chimicamente o altrimenti combinate o mischiate, e successivamente prodotte come un'unica entità". Lo stesso percorso normativo spetterà agli *scaffold* ottenuti dall'intero organo.

## 8 - OSSERVAZIONI CONCLUSIVE

Molti studi hanno oramai dimostrato che la completa decellularizzazione è possibile; tuttavia, questi processi sono in gran parte limitati ad applicazioni di ricerca e non standardizzati per l'utilizzo su larga scala (ad esempio industriale). C'è poi una vera e propria mancanza di dispositivi di decellularizzazione specializzati e bioreattori nel mercato commerciale, forse a causa della recente nascita di questo campo. Tutto questo contribuisce alla difficoltà di ottenere grandi quantità di *scaffold* decellularizzati.

Grazie ai dati a disposizione possiamo dunque concludere che l'utilizzo di fonti cellulari clinicamente rilevanti, gli approcci di semina multipli e l'uso di bioreattori specifici sembrano essere le migliori fondamenta su cui costruire in futuro processi di trattamento di *scaffold* organici. Con queste considerazioni in mente e dai risultati ottenuti possiamo dunque affermare che i tipi cellulari ideali saranno le cellule staminali perché si espandono efficientemente in coltura, si differenziano attraverso più tipi cellulari e vengono isolate da fonti autologhe. Sebbene i metodi di semina varino per ciascun organo, i risultati più promettenti si sono ottenuti in generale utilizzando vie multiple di semina e diverse infusioni cellulari. Particolare attenzione va posta nell'ottimizzazione della riepitelizzazione dell'albero vascolare. Parallelamente, andranno posti vincoli condivisi su aspetti quali l'immunogenicità e la biocompatibilità.

Concludendo, l'integrazione di vari protocolli per massimizzare resa e qualità, riducendo al minimo le operazioni umane e la durata, potrebbe essere un passo decisivo per facilitare lo sviluppo di applicazioni su larga scala e di spicco per la medicina rigenerativa.

## 9 - REFERENZE BIBLIOGRAFICHE

- Akhvari**, P., Aubin, H., Gwanmesia, P., Barth, M., Hoffmann, S., Huelsmann, J., et al. (2011). The quest for an optimized protocol for whole-heart decellularization: a comparison of three popular and a novel decellularization technique and their diverse effects on crucial extracellular matrix qualities. *Tissue Eng. Part C Methods* 17, 915–926. doi:10.1089/ten.TEC.2011.0210
- Baptista**, P. M., Siddiqui, M. M., Lozier, G., Rodriguez, S. R., Atala, A., and Soker, S. (2011). The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology* 53, 604–617. doi:10.1002/hep.24067
- Barakat**, O., Abbasi, S., Rodriguez, G., Rios, J., Wood, R. P., Ozaki, C., et al. (2012). Use of decellularized porcine liver for engineering humanized liver organ. *J. Surg. Res.* 173, e11–e25. doi: 10.1016/j.jss.2011.09.033
- Bonandrini**, B., Figliuzzi, M., Papadimou, E., Morigi, M., Perico, N., Casiraghi, F., et al. (2014). Recellularization of well-preserved acellular kidney scaffold using embryonic stem cells. *Tissue Eng. Part A* 20, 1486–1498. doi:10.1089/ten.TEA.2013.0269
- Bonvillain**, R. W., Scarritt, M. E., Pashos, N. C., Mayeux, J. P., Meshberger, C. L., Betancourt, A. M., et al. (2013). Nonhuman primate lung decellularization and recellularization using a specialized large-organ bioreactor. *J. Vis. Exp.* 82, e50825. doi:10.3791/50825
- Calle**, E. A., Petersen, T. H., and Niklason, L. E. (2011). Procedure for lung engineering. *J. Vis. Exp.* 49, 2651. doi:10.3791/2651
- Caralt**, M., Uzarski, J. S., Iacob, S., Obergfell, K. P., Berg, N., Bijonowski, B. M., et al. (2015). Optimization and critical evaluation of decellularization strategies to develop renal extracellular matrix scaffolds as biological templates for organ engineering and transplantation. *Am. J. Transplant.* 15, 64–75. doi:10.1111/ajt.12999
- Chakraborty**, J., Roy, S., and Ghosh, S. (2020). Regulation of Decellularized Matrix Mediated Immune Response. *Biomater. Sci.* 8 (5), 1194–1215. doi:10.1039/c9bm01780a
- Cheng**, J., Wang, C., and Gu, Y. (2019). Combination of Freeze-Thaw with Detergents: A Promising Approach to the Decellularization of Porcine Carotid Arteries. *Bme* 30 (2), 191–205. doi:10.3233/BME-191044
- Choudhury** D, Yee M, Sheng ZLJ, Amirul A, Naing MW. Decellularization systems and devices: State-of-the-art. *Acta Biomater.* 2020 Oct 1;115:51-59. doi: 10.1016/j.actbio.2020.07.060. Epub 2020 Aug 7. PMID: 32771593.
- Crapo**, P. M., Gilbert, T. W., and Badylak, S. F. (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* 32, 3233–3243. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.057
- Dai** Q, Jiang W, Huang F, Song F, Zhang J, Zhao H. Recent Advances in Liver Engineering With Decellularized Scaffold. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022 Feb 10;10:831477. doi: 10.3389/fbioe.2022.831477. PMID: 35223793; PMCID: PMC8866951.
- Daly**, A. B., Wallis, J. M., Borg, Z. D., Bonvillain, R. W., Deng, B., Ballif, B. A., et al. (2011). Initial binding and recellularization of decellularized mouse lung scaffolds with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng. Part A* 18, 1–16. doi:10.1089/ten.TEA.2011.0301
- Engler**, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., and Discher, D. E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126, 677–689. doi:10.1016/j.cell.2006.06.044 + Schwarzbauer, J. E. (2007). Extracellular matrix elasticity directs stem cell differentiation. *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.* 7, 335.
- Everwien**, H., Ariza de Schellenberger, A., Haep, N., Tzschätzsch, H., Pratschke, J., Sauer, I. M., et al. (2020a). Magnetic Resonance Elastography Quantification of the Solid-To-Fluid Transition of Liver Tissue Due to Decellularization. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 104, 103640. doi:10.1016/j.jmbbm.2020.103640
- E. Scarritt** Michelle, Nicholas C. Pashos and Bruce A. Bunnell, A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs
- Faccioli**, L. A. P., Dias, G. S., Hoff, V., Dias, M. L., Pimentel, C. F., HochmanMendez, C., et al. (2020). Optimizing the Decellularized Porcine Liver Scaffold Protocol. *Cells Tissues Organs* 211, 1–10. doi:10.1159/000510297



- Felgendreff**, P., Schindler, C., Mussbach, F., Xie, C., Gremse, F., Settmacher, U., et al. (2021). Identification of Tissue Sections from Decellularized Liver Scaffolds for Repopulation Experiments. *Heliyon* 7 (2), e06129. doi:10.1016/j.heliyon.2021.e06129
- Flynn**, L. E. (2010). The Use of Decellularized Adipose Tissue to Provide an Inductive Microenvironment for the Adipogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells. *Biomaterials* 31 (17), 4715–4724. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.02.046
- Gao**, M., Wang, Y., He, Y., Li, Y., Wu, Q., Yang, G., et al. (2019). Comparative Evaluation of Decellularized Porcine Liver Matrices Crosslinked with Different Chemical and Natural Crosslinking Agents. *Xenotransplantation* 26 (1), e12470. doi:10.1111/xen.12470
- Gimble**, J. M., Bunnell, B. A., and Guilak, F. (2012). Human adipose-derived cells: an update on the transition to clinical translation. *Regen. Med.* 7, 225–235. doi:10.2217/rme.11.119
- Goh**, S. K., Bertera, S., Olsen, P., Candiello, J. E., Halfter, W., Uechi, G., et al. (2013). Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering. *Biomaterials* 34, 6760–6772. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.05.066
- Hulsmann**, J., Aubin, H., Kranz, A., Godehardt, E., Munakata, H., Kamiya, H., et al. (2013). A novel customizable modular bioreactor system for whole-heart *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology | Tissue Engineering and Regenerative Medicine* March 2015 | Volume 3 | Article 43 | 14 Scarritt et al. Cellularization of whole organs cultivation under controlled 3D biomechanical stimulation. *J. Artif. Organs* 16, 294–304. doi:10.1007/s10047-013-0705-5
- Hussein**, K. H., Park, K.-M., Yu, L., Kwak, H.-H., and Woo, H.-M. (2020). Decellularized Hepatic Extracellular Matrix Hydrogel Attenuates Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrosis. *Mater. Sci. Eng. C* 116, 111160. doi:10.1016/j.msec.2020.111160
- Jensen**, T., Roszell, B., Zang, F., Girard, E., Matson, A., Thrall, R., et al. (2012). A rapid lung de-cellularization protocol supports embryonic stem cell differentiation in vitro and following implantation. *Tissue Eng. Part C Methods* 18, 632–646. doi:10.1089/ten.TEC.2011.0584
- Jiang**, W. C., Cheng, Y. H., Yen, M. H., Chang, Y., Yang, V. W., and Lee, O. K. (2014). Cryo-chemical decellularization of the whole liver for mesenchymal stem cells-based functional hepatic tissue engineering. *Biomaterials* 35, 3607–3617. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.01.024
- Kadota**, Y., Yagi, H., Inomata, K., Matsubara, K., Hibi, T., Abe, Y., et al. (2014). Mesenchymal stem cells support hepatocyte function in engineered liver grafts. *Organogenesis* 10, 268–277. doi:10.4161/org.27879
- Kakabadze**, Z., Kakabadze, A., Chakhunashvili, D., Karalashvili, L., Berishvili, E., Sharma, Y., et al. (2018). Decellularized Human Placenta Supports Hepatic Tissue and Allows rescue in Acute Liver Failure. *Hepatology* 67 (5), 1956–1969. doi:10.1002/hep.29713
- Kim**, J. K., Koh, Y.-D., Kim, J. O., and Seo, D. H. (2016). Development of a Decellularization Method to Produce Nerve Allografts Using Less Invasive Detergents and Hyper/hypotonic Solutions. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 69 (12), 1690–1696. doi:10.1016/j.bjps.2016.08.016
- Kobes**, J. E., Georgiev, G. I., Louis, A. V., Calderon, I. A., Yoshimaru, E. S., Klemm, L. M., et al. (2018). A Comparison of Iron Oxide Particles and Silica Particles for Tracking Organ Recellularization. *Mol. Imaging* 17, 153601211878732. doi:10.1177/1536012118787322
- Lawrence**, B. J., Devarapalli, M., and Madihally, S. V. (2009). Flow dynamics in bioreactors containing tissue engineering scaffolds. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 935–947. doi:10.1002/bit.22106
- Le Bas-Bernardet**, S., Tillou, X., Poirier, N., Dilek, N., Chatelais, M., Devalliere, J., et al. (2011). Xenotransplantation of galactosyl-transferase knockout, CD55, CD59, CD39, and fucosyl-transferase transgenic pig kidneys into baboons. *Transplant. Proc.* 43, 3426–3430. doi:10.1016/j.transproceed.2011.09.024
- Lecht**, S., Stabler, C. T., Rylander, A. L., Chiaverelli, R., Schulman, E. S., Marcinkiewicz, C., et al. (2014). Enhanced reseeded of decellularized rodent lungs with mouse embryonic stem cells. *Biomaterials* 35, 3252–3262. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.12.093

- Liu, P.**, Tian, B., Yang, L., Zheng, X., Zhang, X., Li, J., et al. (2019). Hemocompatibility Improvement of Decellularized Spleen Matrix for Constructing Transplantable Bioartificial Liver. *Biomed. Mater.* 14 (2), 025003. doi:10.1088/1748-605X/aaf375
- Lu, T.**, Yang, B., Wang, R., and Qin, C. (2019). Xenotransplantation: Current Status in Preclinical Research. *Front. Immunol.* 10, 3060. doi:10.3389/fimmu.2019.03060
- Lu, T. Y.**, Lin, B., Kim, J., Sullivan, M., Tobita, K., Salama, G., et al. (2013). Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells. *Nat. Commun.* 4, 2307. doi:10.1038/ncomms3307
- Maghsoudlou, P.**, Georgiades, F., Smith, H., Milan, A., Shangaris, P., Urbani, L., et al. (2016). Optimization of Liver Decellularization Maintains Extracellular Matrix Micro-architecture and Composition Predisposing to Effective Cell Seeding. *PLoS One* 11 (5), e0155324. doi:10.1371/journal.pone.0155324
- Magliaro, C.**, Tirella, A., Mattei, G., Pirone, A., and Ahluwalia, A. (2015). HisTOOLogy: an Open-Source Tool for Quantitative Analysis of Histological Sections. *J. Microsc.* 260 (3), 260–267. doi:10.1111/jmi.12292
- Manalastas, T. M.**, Dugos, N., Ramos, G., and Mondragon, J. M. (2021). Effect of Decellularization Parameters on the Efficient Production of Kidney Bioscaffolds. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 193 (5), 1239–1251. doi:10.1007/s12010-020-03338-2
- Mattei, G.**, Magliaro, C., Pirone, A., and Ahluwalia, A. (2017). Decellularized Human Liver Is Too Heterogeneous for Designing a Generic Extracellular Matrix Mimic Hepatic Scaffold. *Artif. Organs* 41 (12), E347–E355. doi:10.1111/aor.12925
- Moulisová, V.**, Jiřík, M., Schindler, C., Červenková, L., Pálek, R., Rosendorf, J., et al. (2020). Novel Morphological Multi-Scale Evaluation System for Quality Assessment of Decellularized Liver Scaffolds. *J. Tissue Eng.* 11, 204173142092112. doi:10.1177/2041731420921121
- Narciso, M.**, Otero, J., Navajas, D., Farré, R., Almendros, I., and Gavara, N. (2021). Image-Based Method to Quantify Decellularization of Tissue Sections. *Ijms* 22 (16), 8399. doi:10.3390/ijms22168399
- Nakamura Naoko**, Tsuyoshi Kimura, and Akio Kishida, Overview of the Development, Applications, and Future Perspectives of Decellularized Tissues and Organs, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062 Japan
- Nakayama, K. H.**, Lee, C. C., Batchelder, C. A., and Tarantal, A. F. (2013). Tissue specificity of decellularized rhesus monkey kidney and lung scaffolds. *PLoS ONE* 8:e64134. doi:10.1371/journal.pone.0064134
- Neumann, A.**, Sarikouch, S., Breyman, T., Cebotari, S., Boethig, D., Horke, A., et al. (2014). Early systemic cellular immune response in children and young adults receiving decellularized fresh allografts for pulmonary valve replacement. *Tissue Eng. Part A* 20, 1003–1011. doi:10.1089/ten.TEA.2013.0316
- Ng, S. L.**, Narayanan, K., Gao, S., and Wan, A. C. (2011). Lineage restricted progenitors for the repopulation of decellularized heart. *Biomaterials* 32, 7571–7580. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.06.065
- Ott, H. C.**, Clippinger, B., Conrad, C., Schuetz, C., Pomerantseva, I., Ikonomou, L., et al. (2010). Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat. Med.* 16, 927–933. doi:10.1038/nm.2193
- Ott, H. C.**, Matthiesen, T. S., Goh, S. K., Black, L. D., Kren, S. M., Netoff, T. I., et al. (2008). Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat. Med.* 2008, 14, 213–221. doi:10.1038/nm1684
- Park, S. M.**, Yang, S. R., Hong, S. H., and Woo, H. M. (2013). Preparation of immunogen-reduced and biocompatible extracellular matrices from porcine liver. *J. Biosci. Bioeng.* 115, 207–215. doi:10.1016/j.jbiosc.2012.08.023
- Park, J.**, Kim, B., Han, J., Oh, J., Park, S., Ryu, S., et al. (2015). Graphene Oxide Flakes as a Cellular Adhesive: Prevention of Reactive Oxygen Species Mediated Death of Implanted Cells for Cardiac Repair. *ACS Nano* 9 (5), 4987–4999. doi:10.1021/nn507149w
- Petersen, T. H.**, Calle, E. A., Zhao, L., Lee, E. J., Gui, L., Raredon, M. B., et al. (2010). Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science* 329, 538–541. doi:10.1126/science.1189345

- Prasertsung**, I., Kanokpanont, S., Bunaprasert, T., Thanakit, V., and Damrongsakkul, S. (2008). Development of Acellular Dermis from Porcine Skin Using Periodic Pressurized Technique. *J. Biomed. Mater. Res.* 85B (1), 210–219. doi:10.1002/jbm.b.30938
- Robertson**, M. J., Dries-Devlin, J. L., Kren, S. M., Burchfield, J. S., and Taylor, D. A. (2014). Optimizing recellularization of whole decellularized heart extracellular matrix. *PLoS ONE* 9:e90406. doi:10.1371/journal.pone.0090406
- Ross**, E. A., Williams, M. J., Hamazaki, T., Terada, N., Clapp, W. L., Adin, C., et al. (2009). Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 2338–2347. doi:10.1681/ASN.2008111196
- Sassi**, L., Ajayi, O., Campinoti, S., Natarajan, D., McQuitty, C., Siena, R. R., et al. (2021). A Perfusion Bioreactor for Longitudinal Monitoring of Bioengineered Liver Constructs. *Nanomaterials* 11 (2), 275. doi:10.3390/nano11020275
- Sengvoku**, H., Tsuchiya, T., Obata, T., Doi, R., Hashimoto, Y., Ishii, M., et al. (2018). Sodium Hydroxide Based Non-detergent Decellularizing Solution for Rat Lung. *Organogenesis* 14 (2), 94–106. doi:10.1080/15476278.2018.1462432
- Shah** AM, Han JJ. First successful porcine to human heart transplantation performed in the United States. *Artif Organs.* 2022 Apr;46(4):543-545. doi: 10.1111/aor.14203. Epub 2022 Feb 28. PMID: 35224761.
- Shaheen**, M. F., Joo, D. J., Ross, J. J., Anderson, B. D., Chen, H. S., Huebert, R. C., et al. (2020). Sustained Perfusion of Revascularized Bioengineered Livers Heterotopically Transplanted into Immunosuppressed Pigs. *Nat. Biomed. Eng.* 4 (4), 437–445. doi:10.1038/s41551-019-0460-x
- Shi**, C., Yang, L., Braun, A., and Anders, H.-J. (2020). Extracellular DNA-A Danger Signal Triggering Immunothrombosis. *Front. Immunol.* 11, 568513. doi:10.3389/fimmu.2020.568513
- Shirakigawa**, N., Takei, T., and Ijima, H. (2013). Base structure consisting of an endothelialized vascular-tree network and hepatocytes for whole liver engineering. *J. Biosci. Bioeng.* 116, 740–745. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.05.020
- Sicari**, B. M., Rubin, J. P., Dearth, C. L., Wolf, M. T., Ambrosio, F., Boninger, M., et al. (2014). An acellular biologic scaffold promotes skeletal muscle formation in mice and humans with volumetric muscle loss. *Sci. Transl. Med.* 6, 234ra58. doi:10.1126/scitranslmed.3008085
- Song**, J. J., Guyette, J. P., Gilpin, S. E., Gonzalez, G., Vacanti, J. P., and Ott, H. C. (2013). Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. *Nat. Med.* 19, 646–651. doi:10.1038/nm.3154
- Song**, J. J., Kim, S. S., Liu, Z., Madsen, J. C., Mathisen, D. J., Vacanti, J. P., et al. (2011). Enhanced in vivo function of bioartificial lungs in rats. *Ann. Thorac. Surg.* 92, 998–1005. doi:10.1016/j.athoracsur.2011.05.018
- Soto-Gutierrez**, A., Zhang, L., Medberry, C., Fukumitsu, K., Faulk, D., Jiang, H., et al. (2011). A whole-organ regenerative medicine approach for liver replacement. *Tissue Eng. Part C Methods* 17, 677–686. doi:10.1089/ten.tec.2010.0698
- Stahl**, E. C., Bonvillain, R. W., Skillen, C. D., Burger, B. L., Hara, H., Lee, W., et al. (2018). Evaluation of the Host Immune Response to Decellularized Lung Scaffolds Derived from  $\alpha$ -Gal Knockout Pigs in a Non-human Primate Model. *Biomaterials* 187, 93–104. doi:10.1016/j.biomaterials.2018.09.038
- Struecker**, B., Butter, A., Hillebrandt, K., Polenz, D., Reutzel-Selke, A., Tang, P., et al. (2017). Improved Rat Liver Decellularization by Arterial Perfusion under Oscillating Pressure Conditions. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 11 (2), 531–541. doi:10.1002/term.1948
- Suss**, P. H., Ribeiro, V. S. T., Motooka, C. E., de Melo, L. C., and Tuon, F. F. (2021). Comparative Study of Decellularization Techniques to Obtain Natural Extracellular Matrix Scaffolds of Human Peripheral-Nerve Allografts. *Cell Tissue Bank.* Online ahead of print. doi:10.1007/s10561-021-09977-x
- Tao**, M., Liang, F., He, J., Ye, W., Javed, R., Wang, W., et al. (2021). Decellularized Tendon Matrix Membranes Prevent post-surgical Tendon Adhesion and Promote Functional Repair. *Acta Biomater.* 134, 160–176. doi:10.1016/j.actbio.2021.07.038
- Uvgun**, B. E., Soto-Gutierrez, A., Yagi, H., Izamis, M. L., Guzzardi, M. A., Shulman, C., et al. (2010). Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat. Med.* 16, 814–820. doi:10.1038/nm.2170

- Verstegen**, M. M. A., Willemse, J., van den Hoek, S., Kremers, G.-J., Luider, T. M., van Huizen, N. A., et al. (2017). Decellularization of Whole Human Liver Grafts Using Controlled Perfusion for Transplantable Organ Bioscaffolds. *Stem Cell Develop.* 26 (18), 1304–1315. doi:10.1089/scd.2017.0095
- Wang**, Y., Bao, J., Wu, X., Wu, Q., Li, Y., Zhou, Y., et al. (2016). Genipin Crosslinking Reduced the Immunogenicity of Xenogeneic Decellularized Porcine Whole-Liver Matrices through Regulation of Immune Cell Proliferation and Polarization. *Sci. Rep.* 6, 24779. doi:10.1038/srep24779
- Wang**, B., Wang, G., To, F., Butler, J. R., Claude, A., McLaughlin, R. M., et al. (2013). Myocardial scaffold-based cardiac tissue engineering: application of coordinated mechanical and electrical stimulations. *Langmuir* 29, 11109–11117. doi:10.1021/la401702w
- Wang**, G., Bunnell, B. A., Painter, R. G., Quiniones, B. C., Tom, S., Lanson, N. A., et al. (2005). Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 186–191. doi:10.1073/pnas.0504161102
- Weymann**, A., Patil, N. P., Sabashnikov, A., Jungebluth, P., Korkmaz, S., Li, S., et al. (2014). Bioartificial heart: a human-sized porcine model – the way ahead. *PLoS ONE* 9:e111591. doi:10.1371/journal.pone.0111591
- Weng**, J., Chen, B., Xie, M., Wan, X., Wang, P., Zhou, X., et al. (2021). Rabbit Thyroid Extracellular Matrix as a 3D Bioscaffold for Thyroid Bioengineering: a Preliminary In Vitro Study. *Biomed. Eng. Online* 20 (1), 18. doi:10.1186/s12938-021-00856-w
- Willemse**, J., Verstegen, M. M. A., Vermeulen, A., Schurink, I. J., Roest, H. P., van der Laan, L. J. W., et al. (2020). Fast, Robust and Effective Decellularization of Whole Human Livers Using Mild Detergents and Pressure Controlled Perfusion. *Mater. Sci. Eng. C* 108, 110200. doi:10.1016/j.msec.2019.110200
- Wu**, G., Wu, D., Lo, J., Wang, Y., Wu, J., Lu, S., et al. (2020). A Bioartificial Liver Support System Integrated with a DLM/GelMA-based Bioengineered Whole Liver for Prevention of Hepatic Encephalopathy via Enhanced Ammonia Reduction. *Biomater. Sci.* 8 (10), 2814–2824. doi:10.1039/c9bm01879d
- Yu**, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917–1920. doi:10.1126/science.1151526