

# DECELLULARIZZAZIONE

A cura di:  
Lorenzo Maltese  
Francesco Restaino  
Francesco Iacoponi  
Tommaso Minuti  
Federico Licari



# Indice

- Introduzione
- Matrice Extracellulare
- Metodi di decellularizzazione
- Analisi del tessuto decellularizzato
- Decellularizzazione Cardiaca
- Decellularizzazione Polmonare
- Decellularizzazione Epatica
- Considerazioni Finali

# Medicina rigenerativa

Si basa sulla rigenerazione *in vitro* di organi geneticamente compatibili con i pazienti cui sono destinati, in modo da sostituire organi interi.

Il trattamento delle patologie degenerative, che vedono la compromissione di un organo, consiste principalmente nel trapianto, che soffre di limitazioni che ne riducono applicabilità e successo:

- rigetto cronico
- effetti collaterali della terapia anti rigetto
- scarsa disponibilità di organi

Questo processo prevede una fase di **decellularizzazione** dell'organo, per l'ottenimento di matrici extracellulari (**ECM**) da utilizzare come *scaffold* per la semina e la coltura di nuove cellule in fase di **ricellularizzazione**.

Con il termine decellularizzazione si indica il processo mediante il quale avviene la rimozione cellulare da un organo/tessuto, che viene ridotto a sola ECM. Questo è un processo critico per evitare il rigetto dell'organismo ricevente.

# Decellularizzazione

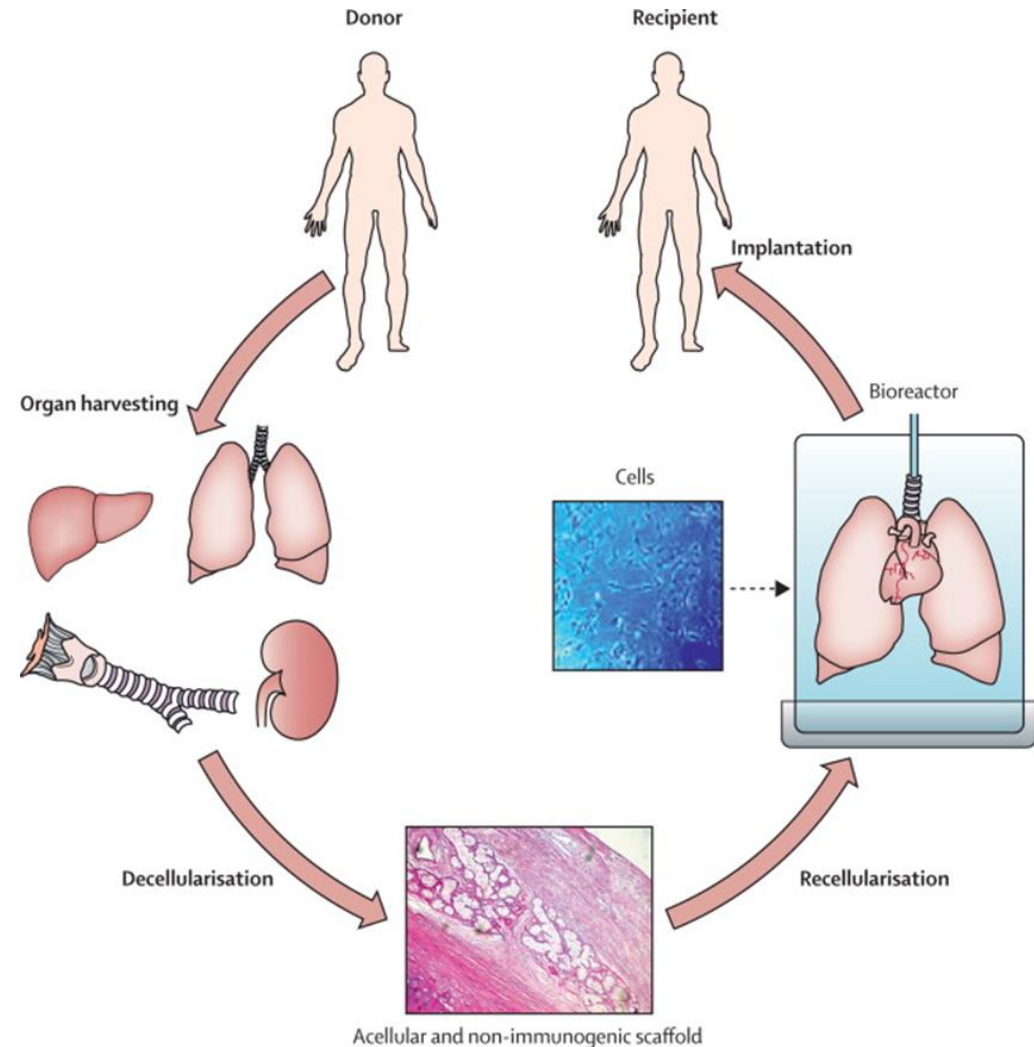
L'obiettivo è rimuovere tutto il materiale cellulare e nucleare, cercando di eliminare ogni danno su attività biologica e integrità meccanica della ECM.

Il tessuto da cui si estrae la ECM, la specie di origine ed il protocollo usato influiscono sulla risposta dell'ospite.

In bibliografia si trovano diversi protocolli, sviluppati e ottimizzati per la decellularizzazione degli organi:

- Perfusione degli organi con detergenti, agenti chimici/enzimatici
- Metodi fisici: congelamento, sonicazione, pressione e agitazione meccanica
- Combinazione dei precedenti

L'aspetto principale di tutti i protocolli consiste nel preservare l'integrità della ECM.



# Organi xenogenici

Il problema della disponibilità degli organi destinati al trapianto si potrebbe ridurre disponendo di una fonte alternativa, ovvero gli organi **xenogenici**, ed è una delle linee di ricerca perseguite.

Limiti principali dello xenotrapianto: rigetto iperacuto e trasferimento di agenti patogeni all'ospite.

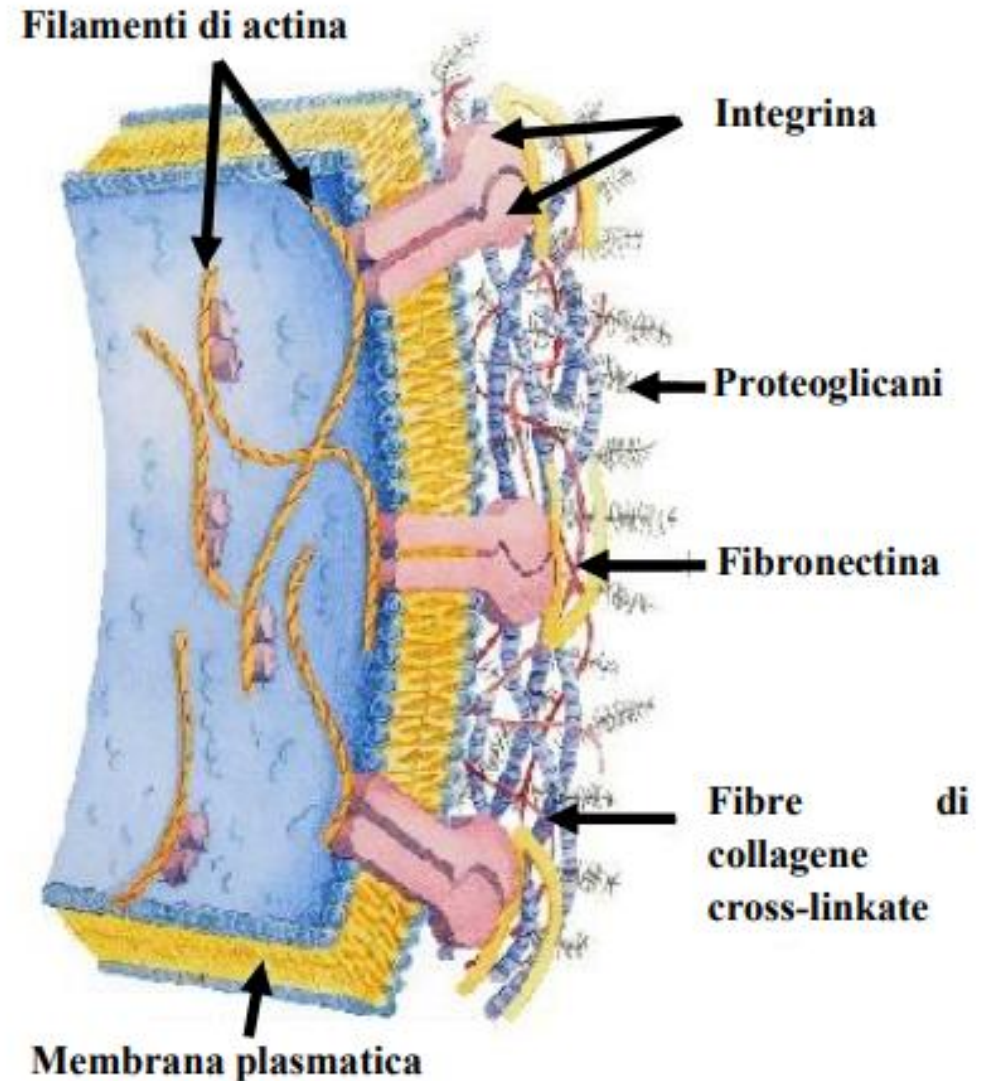
Queste problematiche possono essere evitate decellularizzando tali organi, che sono anatomicamente compatibili con l'essere umano, e utilizzandoli come scaffold.

A questo punto non vi sarebbero più problemi di rigetto, in quanto la ECM xenogenica ha il vantaggio della **compatibilità biologica** e contiene struttura e componenti ottimali per lo sviluppo cellulare, diversamente da quelle sintetiche, che si possono manipolare a seconda della necessità.

# ECM

Composto eterogeneo, costituito da diverse proteine strutturali e funzionali, glicoproteine e proteoglicani organizzati in una struttura 3D complessa, detta **sostanza di base**, che tiene unite le cellule di un tessuto e contiene numerosi pori attraverso cui le sostanze nutritive si diffondono verso le singole cellule.

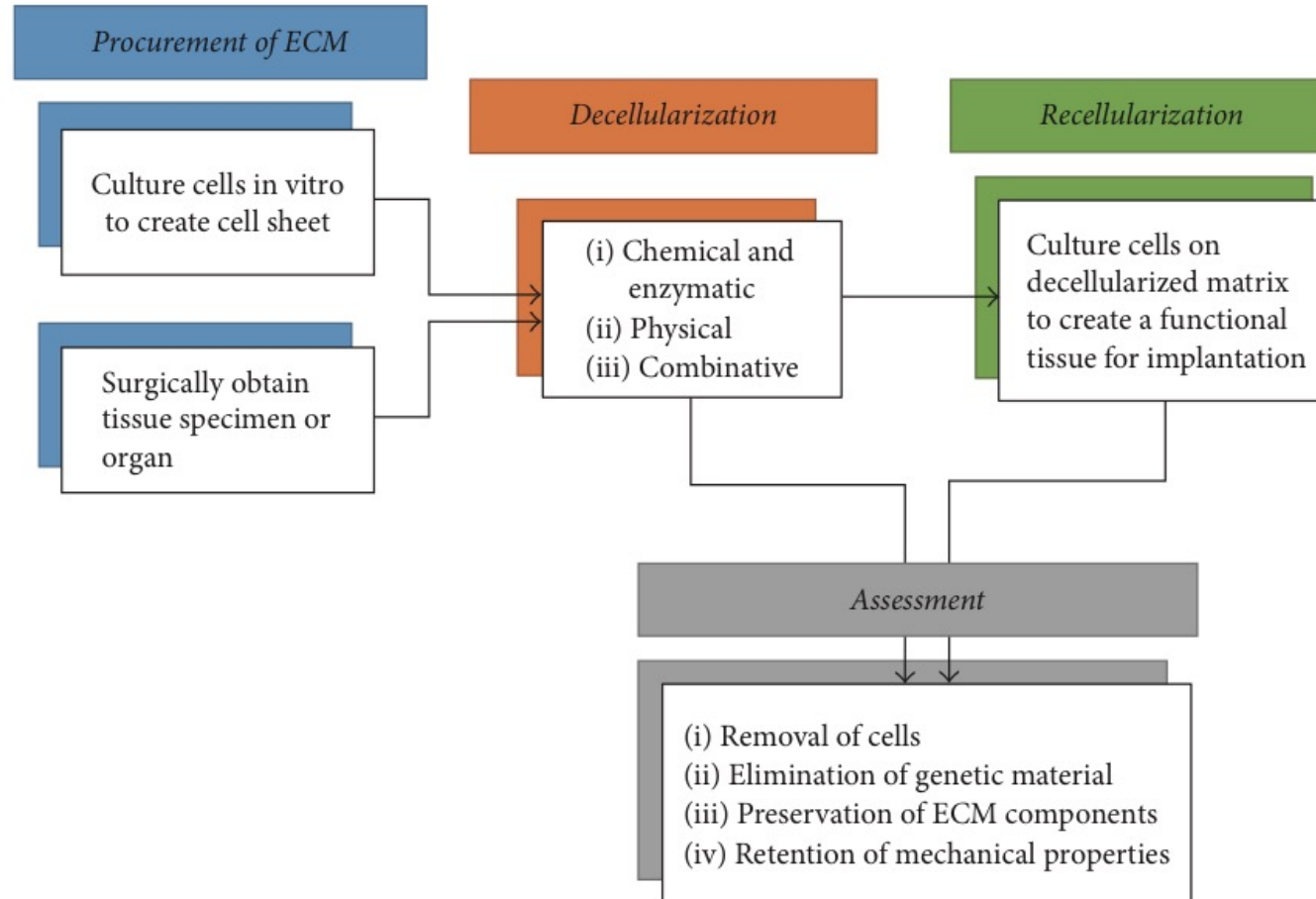
La ECM è il componente che determina le proprietà fisiche di ogni tessuto connettivo ed è costituita da una matrice di sostanza organica, detta **sostanza fondamentale**, e glicoproteine strutturali, che mediano le interazioni tra le cellule e gli altri costituenti.



# Vantaggi dell'uso della ECM come scaffold

- Collagene, elastina, fibronectina e laminina conferiscono un connubio tra elasticità e resistenza che rende la ECM un materiale ideale per la realizzazione di scaffold biologici
- La struttura e la composizione della ECM è in costante cambiamento, poiché risponde all'attività metabolica delle popolazioni cellulari residenti: **reciprocità biologica**.
- La ECM riveste un ruolo nel differenziamento cellulare

# Riepilogo





# Introduzione ai metodi (1/2)

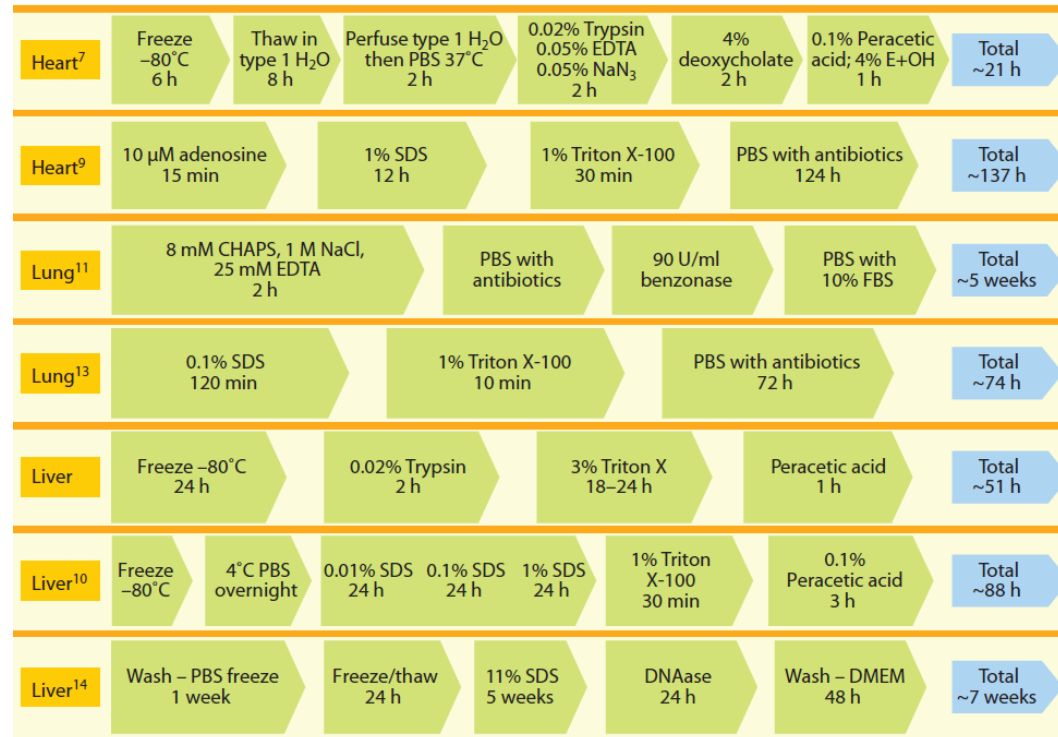
Le tecniche di decellularizzazione vengono classificate in tre tipologie di metodi: fisici, chimici ed enzimatici, i protocolli più efficaci prevedono una combinazione dei tre tipi di trattamenti.

La realizzazione di un processo completo può essere suddiviso in una serie di step:

- Lisi della membrana cellulare mediante approccio fisico o utilizzo di soluzioni ioniche;
- Separazione dei componenti cellulari dalla matrice per mezzo di trattamenti enzimatici;
- Solubilizzazione del citoplasma e dei componenti nucleari grazie a detergenti chimici;
- Agitazione meccanica.

# Introduzione ai metodi (2/2)

Diversi studi hanno mostrato che l'origine, la composizione e la densità del tessuto sono fattori che intervengono in maniera significativa sul successo di un processo di decellularizzazione ed è per questo che sarebbe opportuno elaborare per ogni organo o tessuto un protocollo differente.



# Metodi Fisici (1/2)

Utilizzati principalmente per facilitare la decellularizzazione in quanto non sono da soli sufficienti per una rimozione completa. Vengono di solito combinati con trattamenti chimici.

- Congelamento e scongelamento: formazione di cristalli di ghiaccio all'interno delle cellule che causano la lisi cellulare in seguito alla rottura della membrana. Minime conseguenze sulle proprietà meccaniche della ECM e dei tessuti e riduzione della risposta immunitaria. La ECM può essere distrutta o danneggiata in seguito a congelamenti rapidi.
- Pressione idrostatica: Processo relativamente breve e per questo più efficiente di gran parte di detergenti e enzimi. I valori di pressione devono essere controllati per non danneggiare la ECM.

## Metodi Fisici (2/2)

- Elettroporazione: prevede l'applicazione di pulsazioni elettriche della durata di microsecondi attraverso le cellule del tessuto che provocano la formazione di micropori nella membrana cellulare. La presenza di questi micropori provoca una perdita dell'omeostasi e quindi la morte cellulare. Ridotte dimensioni delle sonde che permettono il trattamento solo di piccole porzioni di tessuto.
- Agitazione meccanica e sonicazione: comunemente utilizzati per facilitare l'esposizione ad agenti chimici piuttosto che per la lisi cellulare, prevedono l'utilizzo di un piatto magnetico mescolante o di uno shaker. La velocità, la quantità di reagenti e la durata dell'agitazione meccanica dipendono dalle caratteristiche del tessuto quali composizione, volume e densità.

# Metodi Chimici (1/2)

Nell'utilizzo di metodi chimici risultano di particolare importanza due aspetti: alterazione della composizione della ECM e tossicità per le cellule del tessuto ospite nel caso di impianto in vivo dello scaffold.

- Acidi e Basi: provocano o catalizzano la degradazione idrolitica delle biomolecole, solubilizzano la componente citoplasmatica delle cellule e rimuovono gli acidi nucleici.
- Soluzioni ipertoniche e ipotoniche: le prime dissociano il DNA dalle proteine, le seconde possono causare la lisi cellulare a causa di uno shock osmotico. Minime conseguenze sull'architettura della matrice, i materiali trattati necessitano di risciacqui per rimuovere completamente i residui cellulari.

## Metodi Chimici (2/2)

- Detergenti ionici, non ionici e zwitterionici: solubilizzano le membrane cellulari e dissociano il DNA dalle proteine, molto efficienti nella rimozione dei residui cellulari dal tessuto decellularizzato. Distruggono le interazioni lipide-lipide, lipide-proteina e proteina-proteina.
- Solventi organici: solo recentemente usati come agente decellularizzanti. Buona capacità di rimozione delle componenti nucleari senza apportare danni alle fibre di collagene e senza provocare effetti negativi sul comportamento meccanico della ECM.
- Agenti chelanti: molecole che formano un complesso a forma di anello che lega e isola uno ione metallico centrale, vengono utilizzate nel distacco delle cellule dal substrato proteico. Tipicamente combinati ad altre sostanze in quanto inefficaci se utilizzati da soli.

# Metodi Enzimatici

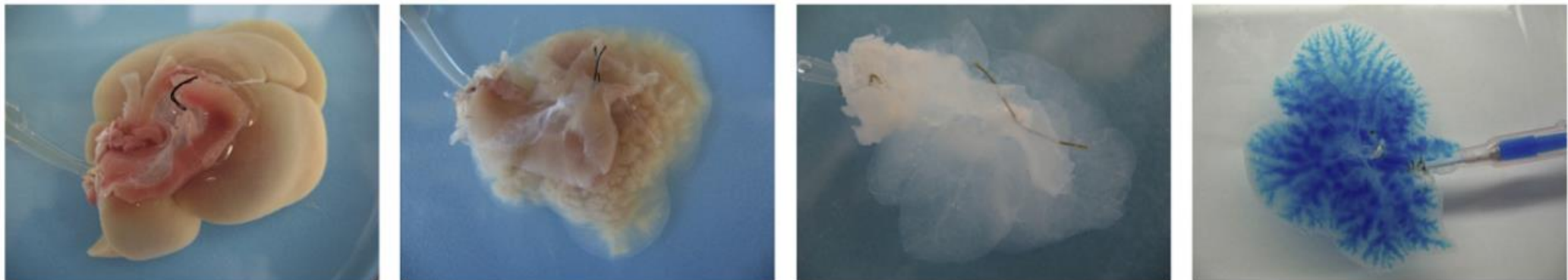
Prevedono l'impiego di enzimi di digestione, proteasi e nucleasi. È importante che gli agenti enzimatici vengano completamente rimossi alla fine del processo perché potrebbero provocare una risposta immunitaria avversa da parte dell'organismo ospite.

- Tripsina: rompe i legami peptidici all'estremità carbossilica dell'arginina e della lisina. Le proteine della ECM presentano una resistenza limitata alla tripsina, deve essere utilizzata con cautela. Rispetto ai detergenti più distruttiva nei confronti dell'elastina e del collagene. Azione molto lenta, di solito viene utilizzata in combinazione ad altri agenti.
- Endonucleasi ed esonucleasi: le prime catalizzano l'idrolisi dei legami interni alle catene nucleotidiche, le seconde i legami terminali, provocando la degradazione di DNA e RNA.

# Analisi del tessuto decellularizzato (1/2)

Le tecniche di analisi consentono di verificare il grado di decellularizzazione per valutare l'efficacia di un metodo rispetto ad un altro, l'efficienza di un particolare agente chimico o enzimatico o semplicemente per dimostrare l'avvenuta rimozione cellulare.

L'ispezione visiva è la prima tecnica di analisi applicata. Si tratta di un metodo puramente qualitativo ma comunque utile ai fini di una valutazione iniziale. In seguito al processo il colore dell'organo cambia notevolmente, passando da un colore rosa-marrone, tipico di organo nativo, ad un colore biancastro, tipico di un organo decellularizzato.



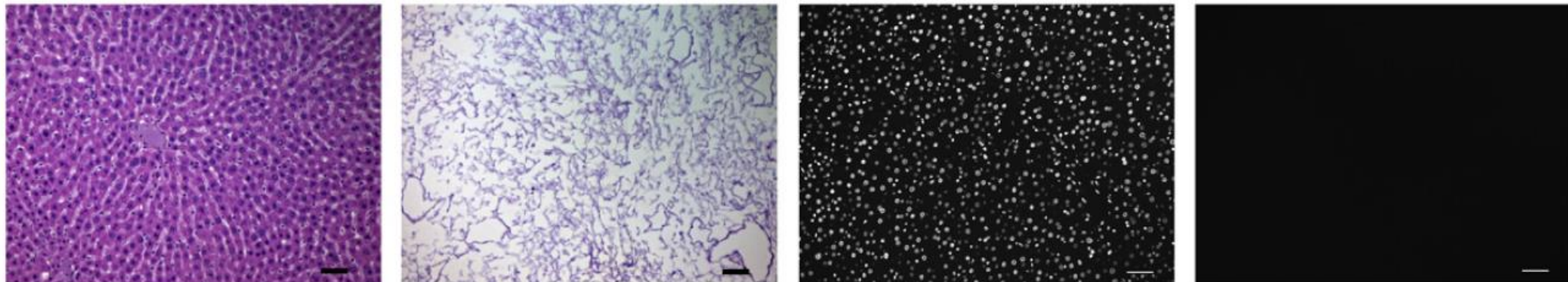


# Analisi del tessuto decellularizzato (1/2)

L'analisi istologica consente di mettere in evidenza le caratteristiche dei tessuti e delle cellule che li compongono sia da un punto di vista morfologico che funzionale. Mediante questa tecnica si ottengono delle sezioni dei campioni che possono essere osservate al microscopio.

La quantificazione del DNA consiste nella comparazione tra la quantità di DNA nel campione nativo e in quello sottoposto a decellularizzazione. È stato definito un valore limite relativo alla quantità di DNA rimanente nel tessuto, è necessario che l'organo decellularizzato presenti una quantità di DNA minore di 50 nanogrammi ogni milligrammo di EMC.

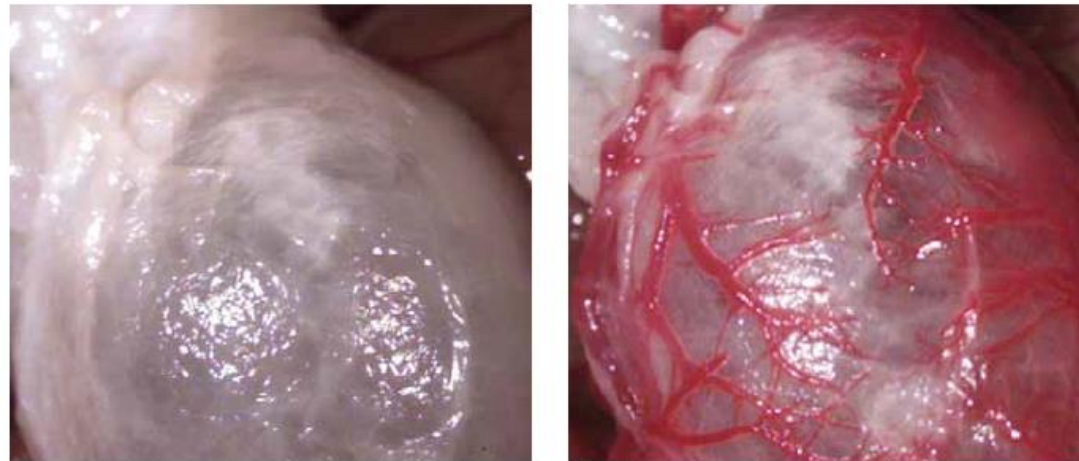
Un test meccanico può infine verificare il mantenimento dell'integrità della struttura e delle caratteristiche meccaniche della matrice extracellulare.



# DECELLULARIZZAZIONE CARDIACA

# Fonte

Ott, H. C., Matthiesen, T. S., Goh, S. K., Black, L. D., Kren, S. M., Netoff, T. I., & Taylor, D. A. (2008). Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature medicine*, 14(2), 213.



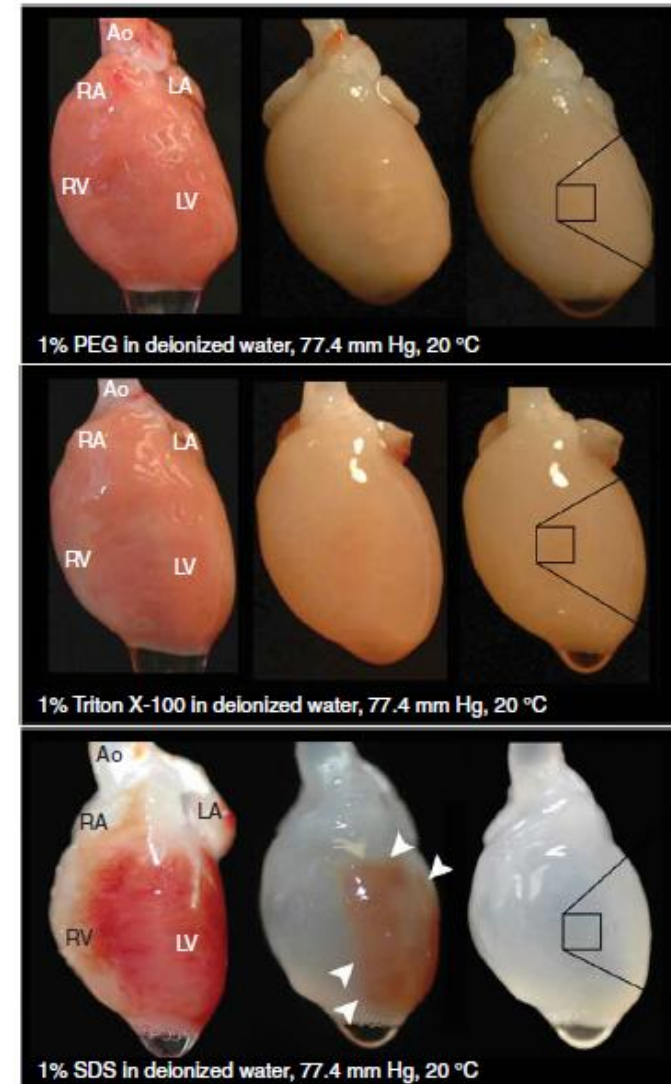
Primo tentativo (riuscito) di creare un cuore bioartificiale completamente funzionale

# Materiali e metodi

- Ott et al. hanno effettuato una perfusione coronarica, per un tempo di circa 12 ore, di 140 cuori prelevati da cadaveri di ratto con tre differenti soluzioni in alternativa: sodio dodecilsolfato (SDS), polietilene glicolico (PEG) e Triton X-100.
- Hanno confrontato dunque diversi metodi di *decellularizzazione* ottenuti al variare della componente del detergente.

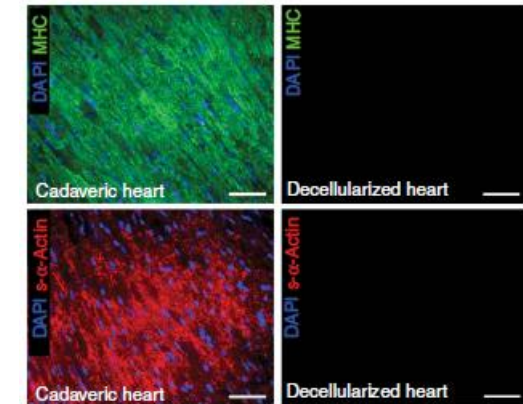
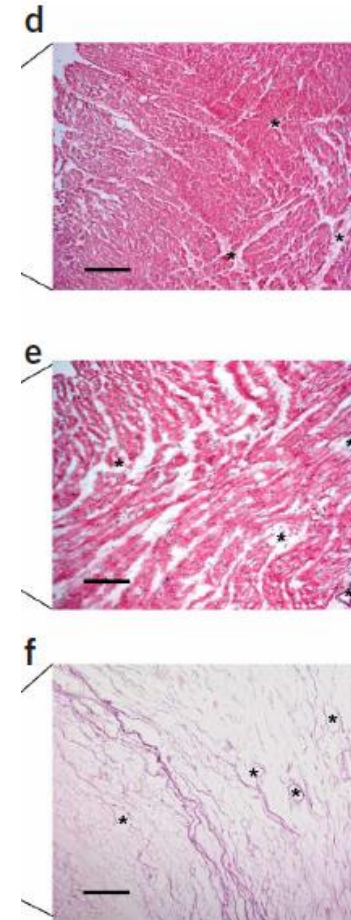
# Risultati (1/7)

- I risultati hanno dimostrato che l'uso di SDS è più vantaggioso per la rimozione del DNA delle strutture proteiche intracellulari e di tutte le componenti intracellulari, rispetto al PEG e al Triton X 100.
- Basti vedere infatti il colore assunto dai cuori nei tre casi per comprendere che solo con l'utilizzo di SDS si ottiene un organo di colore bianco, indice di un'avvenuta *decellularizzazione*.



## Risultati (2/7)

- Anche una colorazione istologica con H&E conferma questo risultato: i cuori trattati con PEG (d) e Triton X-100 (e) mostrano una *decellularizzazione* incompleta, testimoniata dalla presenza di nuclei e miofibre, mentre l'immagine istologica relativa al cuore perfuso con SDS (f) rileva la totale assenza di elementi cellulari.
- Un'immunofluorescenza delle sezioni cardiache trattate con SDS conferma una completa *decellularizzazione* del cuore che in questa immagine specifica è testimoniata dall'assenza di nuclei (blu), di actina (rosso) e di miosina (verde).

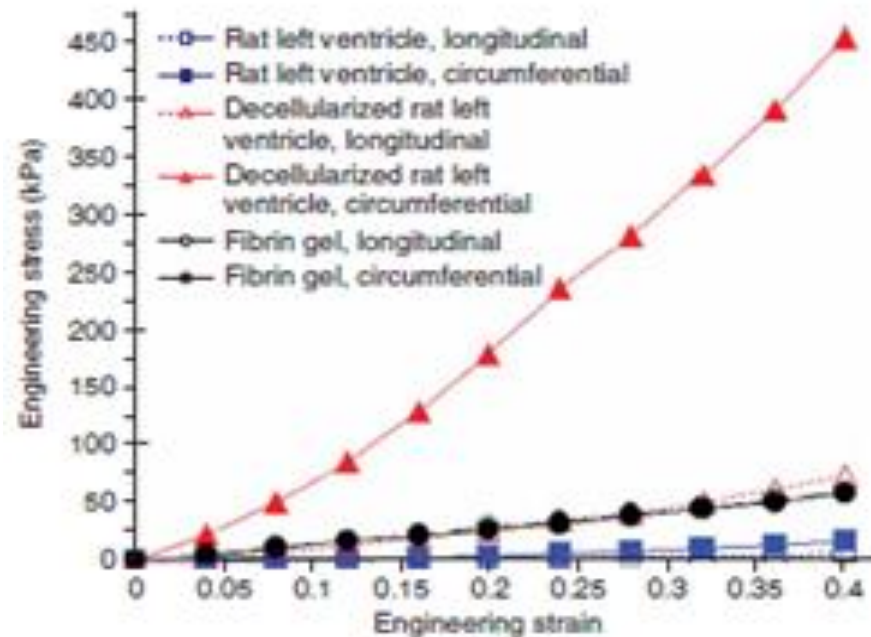


Nota: La colorazione ematossilina-eritrosina (H&E) rappresenta la tecnica di colorazione più frequentemente utilizzata in istologia.

## Risultati (3/7)

Sono stati eseguiti infine test meccanici:

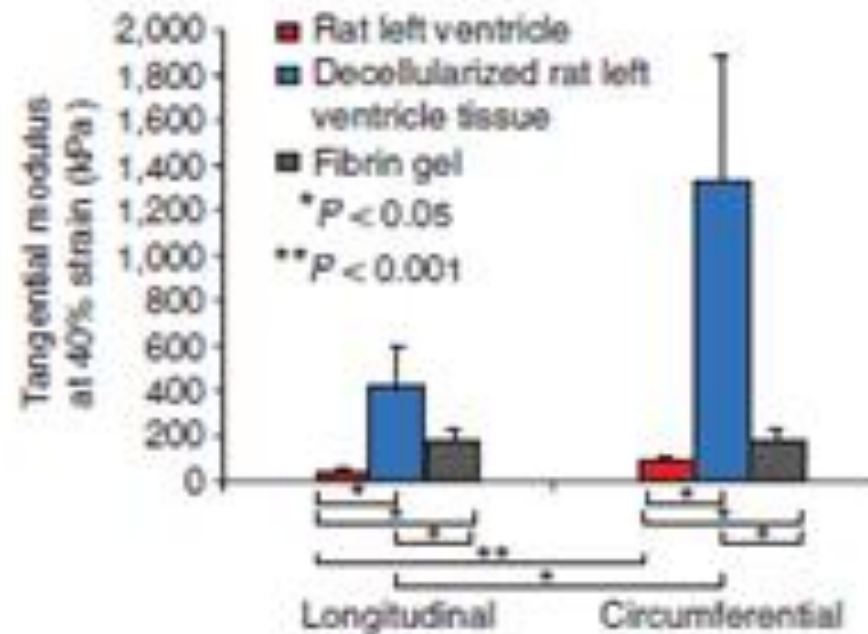
- Comportamento stress-strain: i campioni del cuore cadaverico e decellularizzato risultano anisotropi.





## Risultati (4/7)

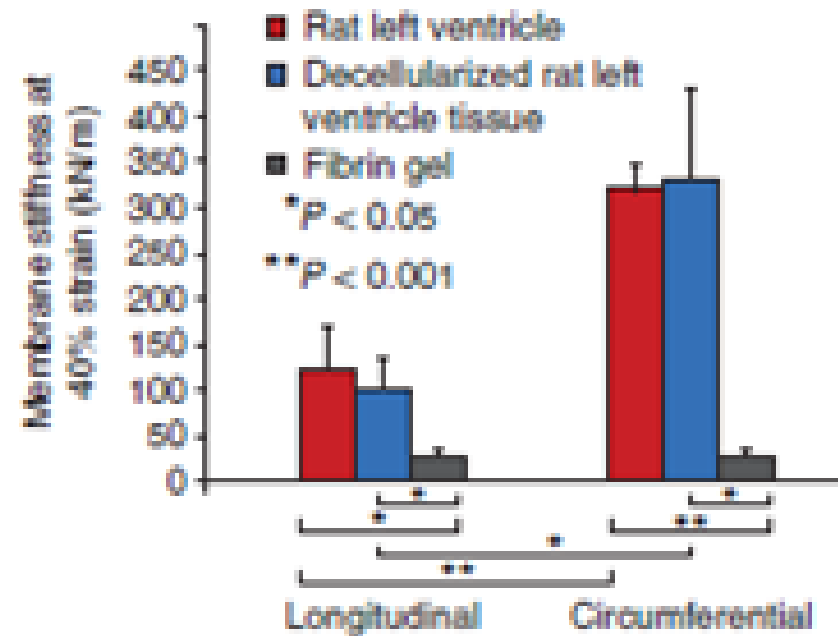
- Modulo elastico tangenziale al 40% di deformazione: i campioni decellularizzati hanno modulo elastico significativamente più elevato.





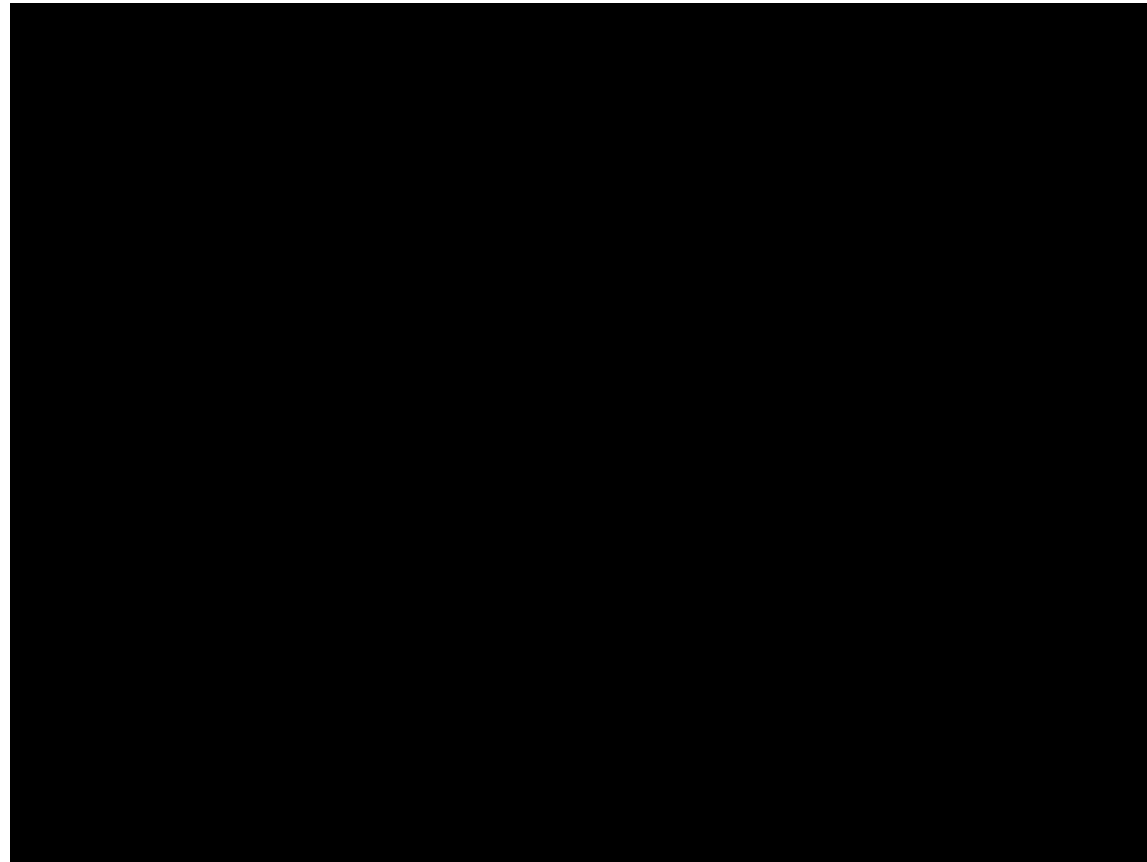
## Risultati (5/7)

- Rigidezza della membrana al 40% di deformazione: i valori non differiscono tra tessuti cadaverici e quelli decellularizzati.



## Risultati (6/7)

- E' stata anche verificata la bontà del costrutto tramite una perfusione di sangue.



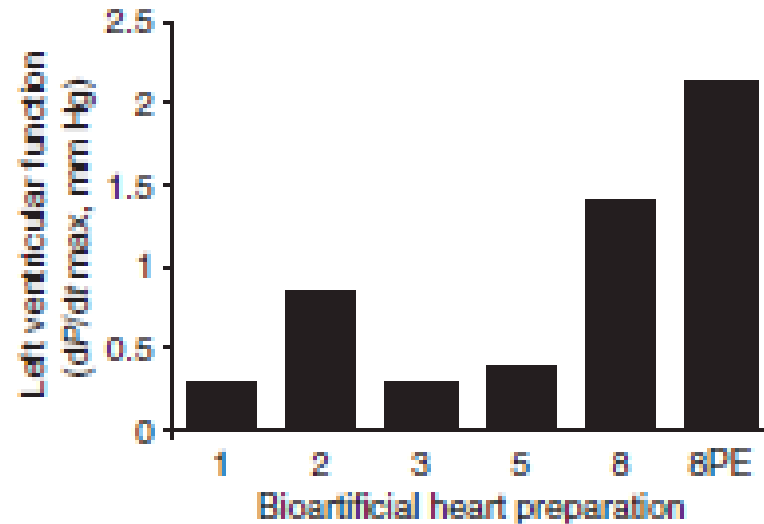
## Risultati (7/7)

- Dopo 4 giorni di coltura, si sono osservati agglomerati di cellule contrarsi, fino a raggiungere un ritmo sincrono al giorno 9.



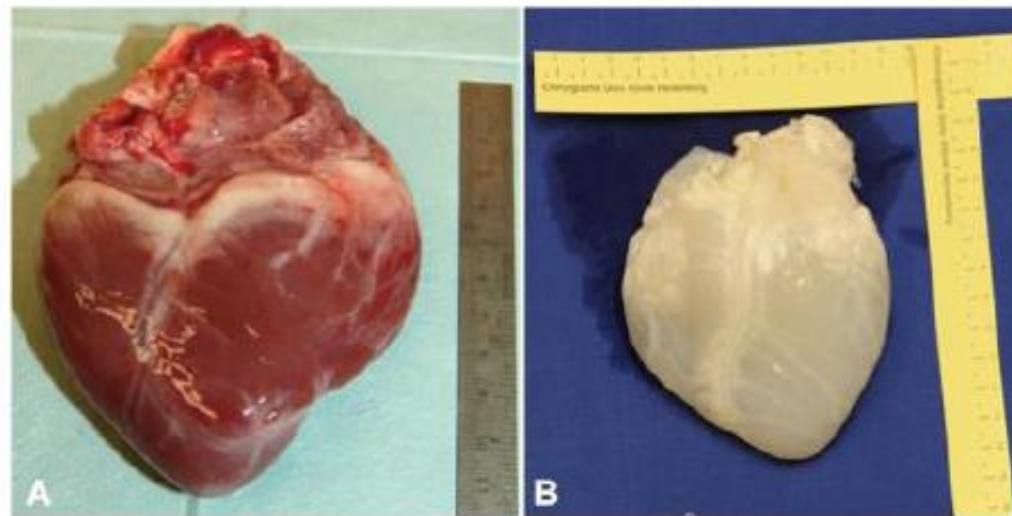
# Conclusioni

- Matrice ECM intatta, così come il sistema di vascolarizzazione.
- Test successivi svolti in bioreattori (per stabilire la funzionalità del pompaggio) hanno evidenziato come la forza di contrazione (nel best case) si mantiene costante a 2.4 mmHg, pari a circa il 2% della funzione cardiaca di un ratto adulto e il 25% della funzione cardiaca di un feto di 6 settimane. Quindi in definitiva il cuore non batte a un ritmo in grado di sostenere la vita.



# Fonte

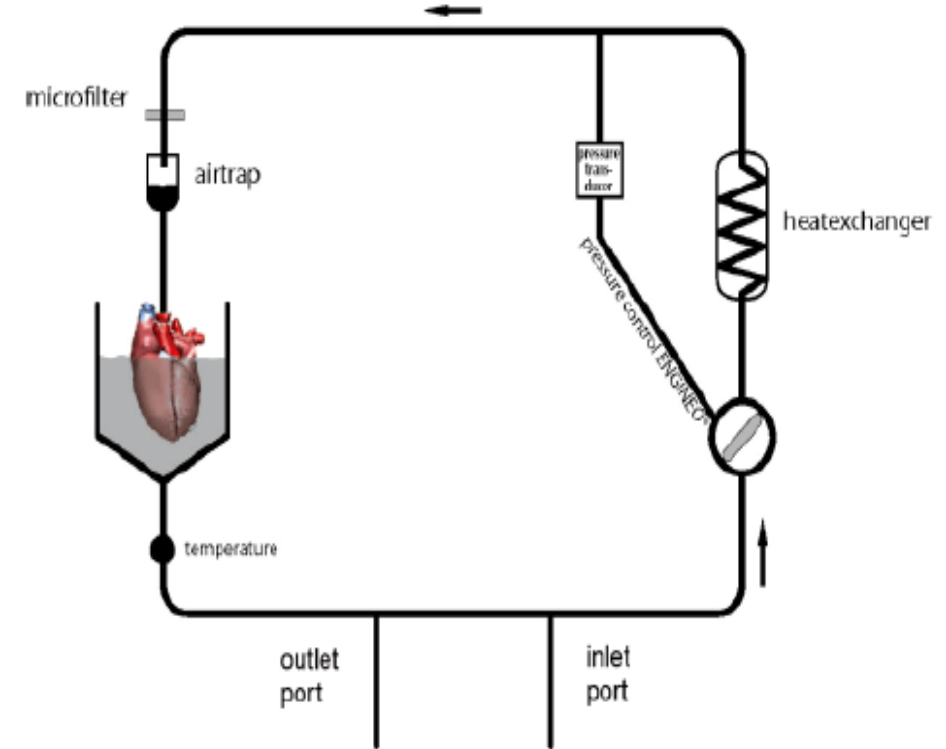
Weymann, A., Loganathan, S., Takahashi, H., Schies, C., Claus, B., Hirschberg, K., ... & Szabó, G. (2011). Development and evaluation of a perfusion decellularization porcine heart model. *Circulation Journal*, 75(4), 852-860.



Elaborazione di un protocollo specifico per decellularizzazione di cuori porcini.

# Materiali e metodi

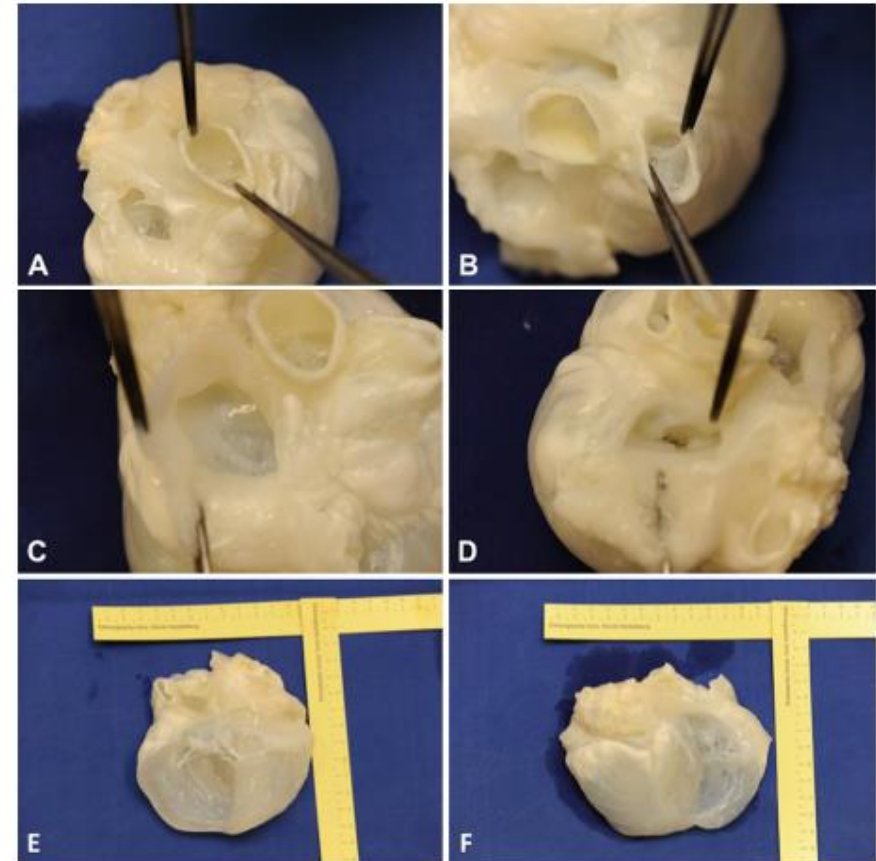
- Nel loro studio Weymann et al. hanno prelevato il cuore da dodici scrofe di razza Landrace tedesca.
- Il modello di decellularizzazione ideato consiste in un circuito di perfusione di 2,5 L di volume e un modulo di controllo della pressione. Uno scambiatore di calore mantiene la temperatura costante a 37°C, porte di ingresso e uscita permettono un rapido cambio di detergente. I cuori sono mantenuti a 100 mmHg e perfusi in una soluzione con PBS e 4% di SDS, a 2 L/min per 12h. Successivamente essi vengono lavati con PBS per 15 minuti ogni 3h per rimuovere eventuali residui.



PBS: tampone fosfato salino. E' una soluzione tampone che aiuta a mantenere il pH costante.

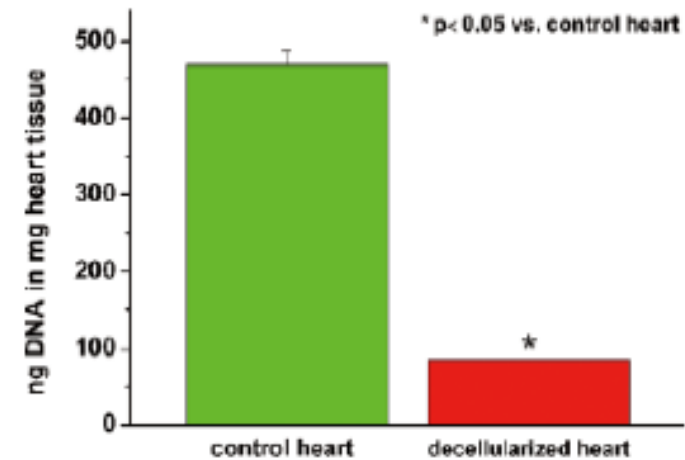
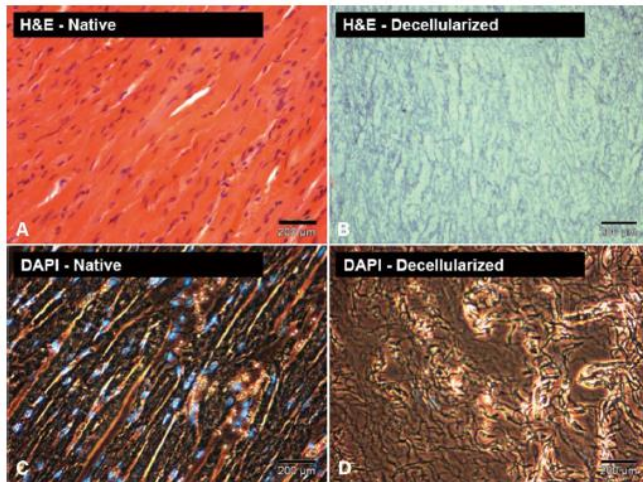
## Risultati (1/2)

- Non ci sono danni evidenti alla struttura del cuore, come viene confermato dalle immagini in cui vengono mostrati nel dettaglio la valvola aortica (A), la valvola polmonare (B), la valvola tricuspide (C), la valvola mitrale (D), il ventricolo sinistro (E), il ventricolo destro (F).



## Risultati (2/2)

- Analisi istologiche e analisi statistiche quantitative sulla frazione di DNA rimosso hanno evidenziato la bontà del protocollo di Weymann, migliore rispetto ad altri (vedi protocollo di Wainwright et al. sviluppato nel 2010).





# Conclusioni

- Sono necessari ulteriori studi per valutare potenziali reazioni e infezioni dettate dalla trasmissione di retrovirus presenti nelle cellule porcine.
- Il protocollo risulta un potenziale ottimo scaffold per successivi studi nell'ambito dell'ingegneria tissutale cardiaca.

**DECELLULARIZZAZIONE POLMONARE**

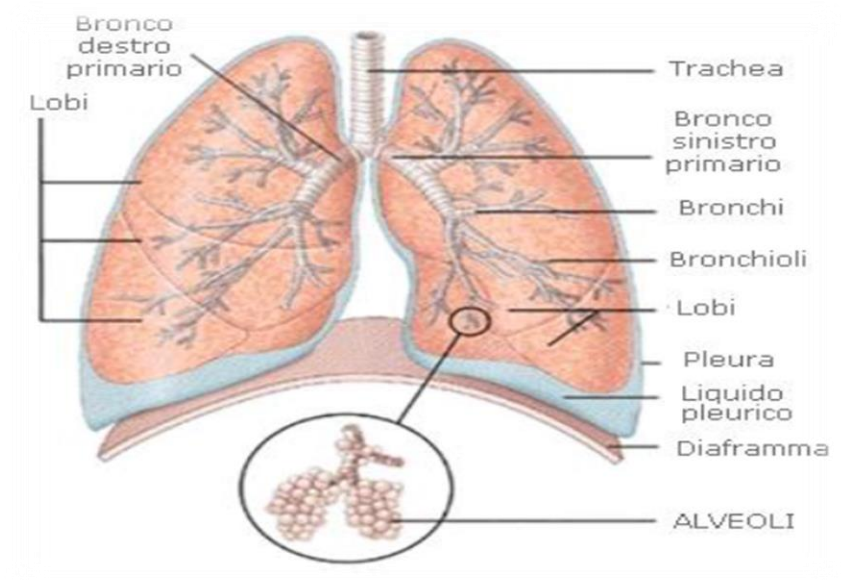
# Struttura del polmone

Ematosi: fornitura di ossigeno all'organismo e all'eliminazione dell'anidride carbonica dal sangue, ovvero agli scambi gassosi fra aria e sangue.

Tre principali tipi di cellule epiteliali:

- Pneumociti macrofagi
- Cellule alveolari di tipo I
- Cellule alveolari di tipo II

Assenza tessuto muscolare fibre collagene e elastina per ritorno elastico.



I vasi sanguigni coprono 80-90% della superficie alveolare

La vicinanza tra capillari e aria alveolare è essenziale per avere uno scambio gassoso rapidissimo

# Malattie Polmonari

## **Broncopneumopatia cronica ostruttiva (BCPO)**

affezione cronica caratterizzata da ostruzione del flusso bronchiale con limitazione del flusso aereo.

## **Fibrosi polmonare idiopatica (IPF)**

malattia cronica invalidante e con esito fatale, caratterizzata da un progressivo declino della funzionalità polmonare.

## **Tumore**

diverse tipologie di malattie a seconda tessuto polmonare stesso.

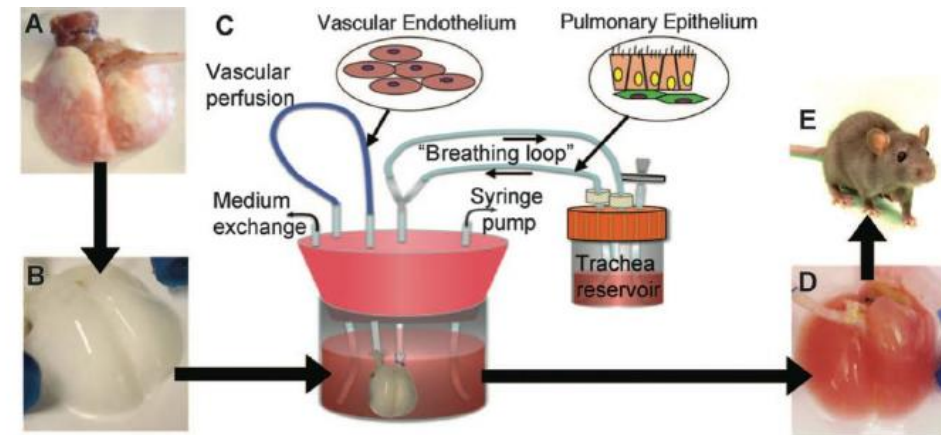
# Fonte (1/2)

Calle, E. A., Petersen, T. H., & Niklason, L. E. (2011). Procedure for lung engineering. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (49).

Obiettivo: decellularizzare col metodo della perfusione con PBS+SNP i polmoni estratti dai ratti e ricellularizzarli con cellule endoteliali e polmonari umane.

Risultati: le cellule umane si sono sviluppate molto meglio nel tessuto decellularizzato piuttosto che nel terreno di coltura.

Problematiche: il polmone del ratto è molto diverso per dimensioni, composizione di vie aeree e per la rete vascolare.



## Fonte (2/2)

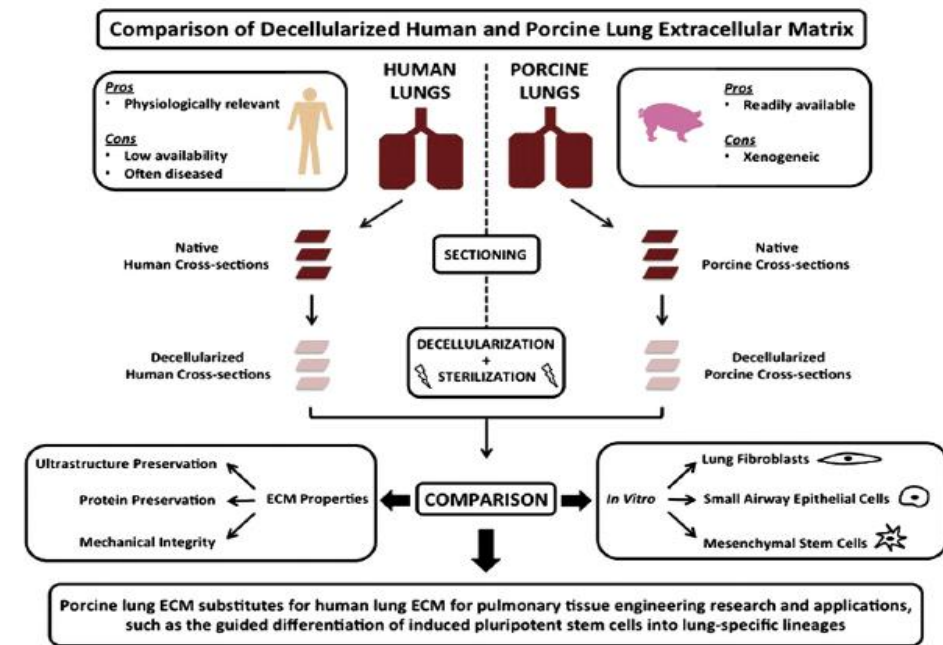
O'Neill, J. D., Anfang, R., Anandappa, A., Costa, J., Javidfar, J., Wobma, H. M., ... & Vunjak-Novakovic, G. (2013). Decellularization of human and porcine lung tissues for pulmonary tissue engineering. *The Annals of thoracic surgery*, 96(3), 1046-1056.

### Obiettivi:

- Verificare che la matrice extracellulare polmonare (LECM) sia un componente ottimale utilizzabile come scaffold biologico nella decellularizzazione del polmone.
- Osservare se ed in che misura il tessuto decellularizzato conserva l'architettura propria dell'organo nativo.
- Proporre una soluzione terapeutica non-immunogenica al fine di evitare il rigetto dell'organo che sia applicata a specie animale la cui conformazione polmonare si avvicini a quella umana.

# Procedura Sperimentale

- Rimozione organi :  
3 polmoni umani e 3 polmoni suini.
- Preparazione :  
pulitura dal sangue, conservazione a  $-80^{\circ}\text{C}$ ,  
lavaggio in PBS, sezionamento in fette.
- Decellularizzazione:
  - 1) SDS
  - 2) CHAPS
  - 3) metodo trifasico
- Sterilizzazione della matrice extracellulare.
- Test sulla matrice extracellulare.
- Analisi statistica



# Metodi di Decellularizzazione

- Metodo con impiego di SDS: 4 lavaggi di 2 ore ciascuno con SDS 1.8mM, seguito da lavaggio in H<sub>2</sub>O e da successivo lavaggio in PBS 2X.
- Metodo con impiego CHAPS: 4 lavaggi con CHAPS 8mM della durata di 2 ore ciascuno, seguito da lavaggio in H<sub>2</sub>O e da successivo lavaggio in PBS 2X.
- Metodo trifasico: lavaggio di 2 ore con polisorbato al 3%, lavaggio di 2 ore con acido desossicolico al 4% e lavaggio di 1 ora con acido paracetico all' 0.1%. Tutte le parti in oggetto di studio sono state poi soggette a lavaggi alternati in PBS 1X e a lavaggi in H<sub>2</sub>O. Somministrazione soluzione al 5% di penicillina e streptomicina.



# Test

Appropriatezza della matrice extracellulare polmonare (LECM) per la ripopolazione polmonare viene valutata in termini di **vitalità, crescita, attività metabolica** di fibroblasti polmonari, delle cellule epiteliali delle vie aeree e delle cellule staminali mesenchimali per un periodo di 7 giorni.

## Valutazione

- DNA : Quant-it PicoGreen dsDNA assay kit
- Collagene : sircon collagen assay kit
- Elastina: fastin assay elastin kit
- Glicosamminoglicani : dimethylene blue dye assay

## Analisi

- Analisi istologica
- Crescita cellulare
- Attività metabolica

## Test meccanici

## Microscopia elettronica a scansione

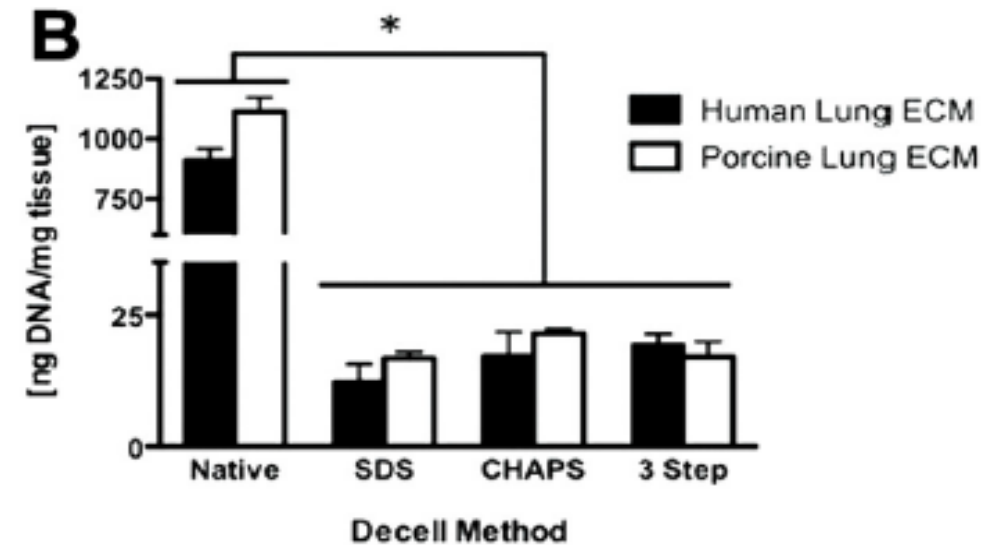
# Valutazione (1/2)

## DNA:

Campioni pesati e sottoposti all'azione enzima papaina per tutta una notte a -60°C. Uso kit di testing dell'azienda Invitrogen e lettura spettrofotometrica.

## Risultato:

Rimozione di più del 95% del materiale nucleare con ognuno dei 3 metodi.



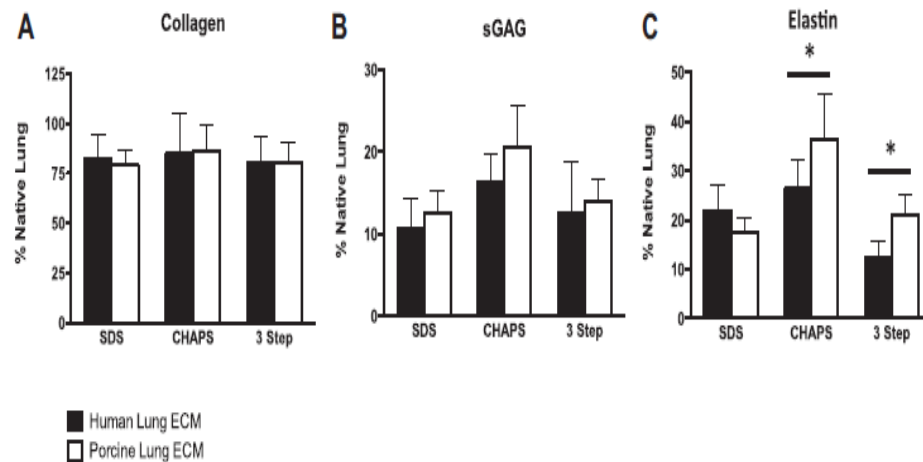
# Valutazione (2/2)

## Collagene, sGAG, Elastina:

Collagene: campioni pesati e sottoposti all'azione enzima pepsina a  $-60^{\circ}\text{C}$  per una notte . Kit specifico (Biocolor )per la quantificazione.

sGAG: campioni pesati, sottoposti all'azione della papaina insieme al colorante Blue di metilene per una notte a  $-60^{\circ}\text{C}$ . Successiva misura assorbanza per la quantificazione.

Elastina: specifico kit dell'azienda Biocolor.

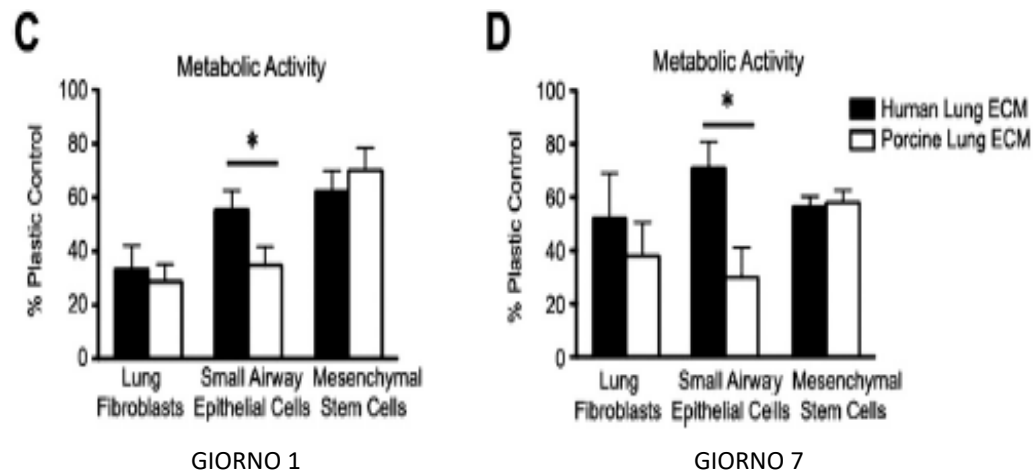


## Risultato:

- Diminuzione di sGAG, senza apparente differenza LECM umana e suina, maggior conservazione (10-15%) con metodo CHAPS.
- Conservazione migliore di elastina con metodo CHAPS (26% LECM umana, 37% LECM suina).
- Conservazione dell'80% di collagene totale per entrambe le tipologie di LECM.

# Analisi (1/2)

**Attività metabolica:** misura compiuta usando Alamar Blue, aggiunto a vari istanti di tempo nelle culture cellulari e messo in incubazione per 9/12 ore. È stata poi eseguita una lettura spettrofotometrica.



## Risultato:

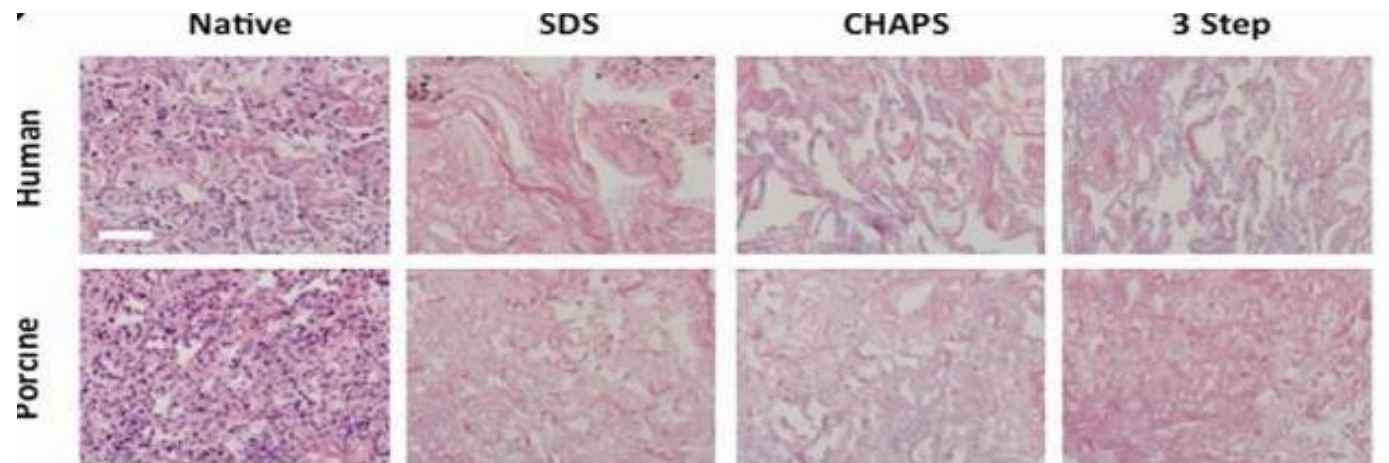
L'unica apprezzabile differenza nel metabolismo cellulare tra uomo e suino, riguarda le cellule epiteliali che al giorno 7 sono particolarmente attive nell'uomo.

**Crescita cellulare:** analizzata determinando la quantità di DNA presente negli scaffold ricellularizzati, usando medesimo kit per la valutazione di DNA usato in precedenza.

**Risultato:** tutti i tipi di cellule presentano un grado di proliferazione comparabile durante i 7 giorni di incubazione.

## Analisi (2/2)

**Istologica:** campioni fissati in formalina al 3.7%, immersi poi in paraffina. Impiego di specifici e diversi coloranti per la valutazione generale e valutazione di collagene, fibre di elastina e proteoglicani. Con coloranti ematossilina e eosina si è potuto osservare meglio l'assenza di nuclei ben distinguibili.



### Risultato:

- Presenza di piccole regioni nere negli umani che rappresentano delle aggregazioni antracotiche.
- Laminina e fibronectina non si sono ben conservate con **metodo SD** e **metodo trifasico**.

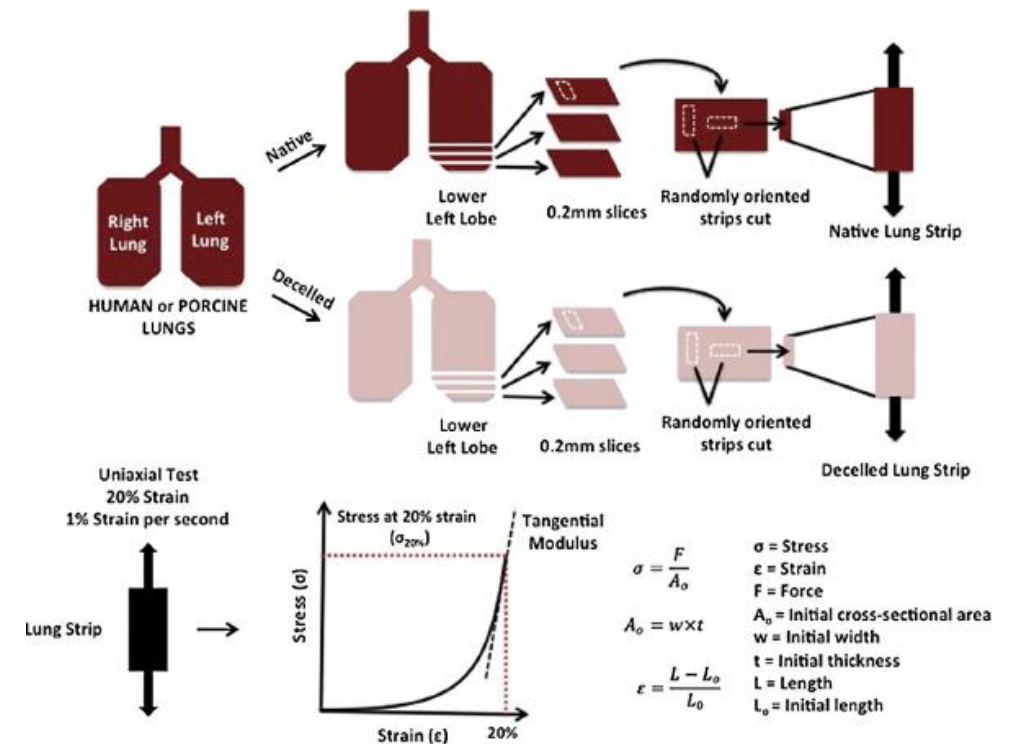
# Test Meccanici

## Test uniassiale con Instron Modello 5848:

- Cella di carico di 10 N.
- Dimensioni 3cmx1cm.
- Precarico di 0.003N.
- Deformazione al 20%.
- Test tangenziale e longitudinale.

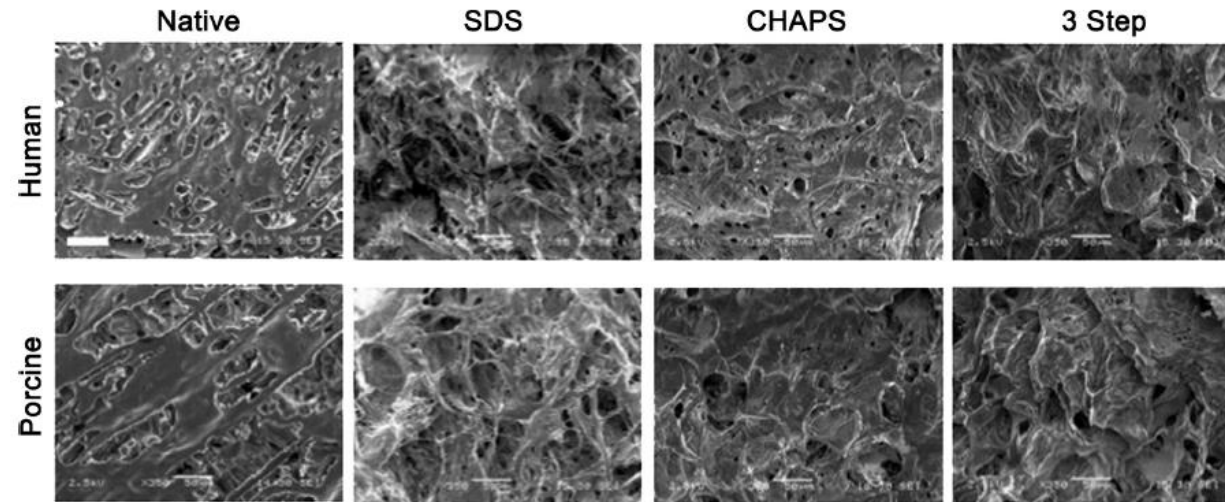
## Risultato:

- Modulo elastico tangenziale più alto per il tessuto polmonare umano.
- **Il metodo CHAPS produce tessuto più rigido** rispetto agli altri metodi in entrambi le direzioni.
- **LECM** umana più cedevole con metodo trifasico e suina con impiego SDS.



# Microscopia elettronica a scansione

I campioni sono stati congelati, liofilizzati e successivamente disposti su un supporto cilindrico per compiere imaging con microscopio elettronico a scansione per analizzare morfologicamente la matrice extracellulare prima e dopo il processo.



## Risultato:

- La morfologia dell'ultrastruttura analizzata è rimasta simile prima e dopo la decellularizzazione in entrambe le tipologie di matrice extracellulare.
- La superficie è risultata essere più rugosa dopo la decellularizzazione.
- La tecnica SDS mantiene una struttura più fibrillare rispetto alla condizione iniziale liscia.

# Conclusioni

- La decellularizzazione con metodo **CHAPS** produce una LECM con migliore ritenzione e integrità rispetto agli altri metodi, per cui possiamo affermare che è il miglior reagente con cui effettuare la decellularizzazione del polmone col protocollo da noi proposto.
- La decellularizzazione riduce del 20% la quantità di collagene e dell'80% quella dei sGCG, mentre il valore di elastina è statisticamente rilevante nel CHAPS in quanto le cellule suine ne mantengono di più rispetto a quelle umane.
- I tessuti sono stati testati fino a un **allungamento del 20%** che equivale alla distensione del tessuto polmonare in fase di respirazione.
- La **differenza di rigidità** evidenziata nel modulo elastico tangenziale può essere dovuta alle temperature a cui vengono conservati i tessuti prima della decellularizzazione (-80°C) oppure dall'età dei donatori.
- Il metodo proposto nel seguente studio propone le cellule suine come valida alternativa per decellularizzare il tessuto polmonare umano *in vitro*, oltre che perfezionare i protocolli di decellularizzazione applicati.



# DECELLULARIZZAZIONE EPATICA

# Fonte

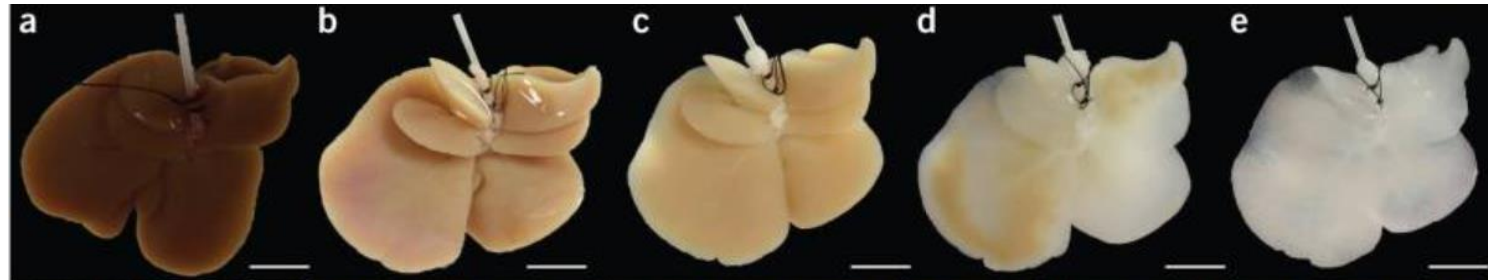
- Uygun, B. E., Soto-Gutierrez, A., Yagi, H., Izamis, M. L., Guzzardi, M. A., Shulman, C., ... & Hertl, M. (2010). Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nature medicine*, 16(7), 814.
- In questo articolo è stato esaminato un metodo di decellularizzazione con detergente chimico. I campioni sono stati prelevati da ratti ischemici.

# Decellularizzazione perfusiva

Dopo il prelievo, il fegato è stato immerso in una soluzione salina per 1 ora, lavato con 20 ml di soluzione fisiologica allo 0.9 % e congelato alla T di -80 °C prima della decellularizzazione.

Dopo aver portato i campioni alla T di 4°C inizia il processo. Una soluzione di PBS viene pompata attraverso la vena porta con portata di 1 ml/min. Dopodiché inizia l'iniezione di SDS per 72h a quote crescenti di concentrazione( 0.01%,0.1%,1%). Il lavaggio finale con acqua distillata e 1% di Triton X-100 provvede all'eliminazione dei residui di detergente ionico.

L'immagine mostra l'azione del detergente nel tempo, rispettivamente all'istante: 0 h (a), 18 h (b), 48 h(c), 52 h(d) e 72 h(e).

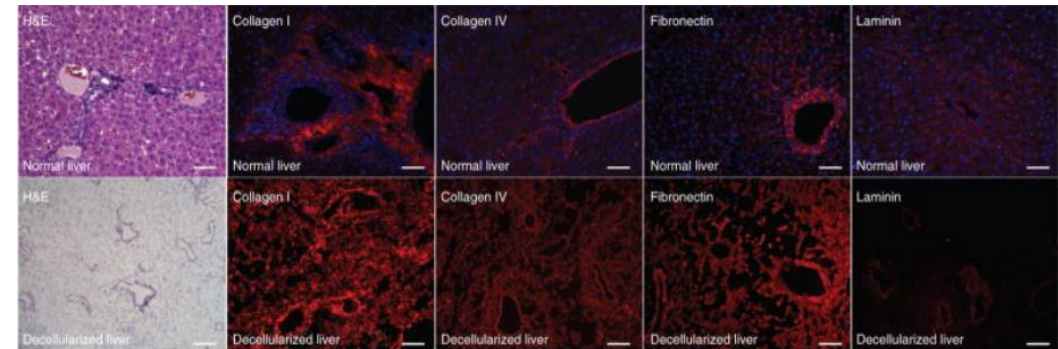


# Analisi post decellularizzazione

Per verificare l'efficacia del protocollo è stata effettuata sia un'analisi istologica che un test adatto a cercare le proteine all'interno dell'ECM.

Una colorazione con ematossilina ed eosina evidenzia nuclei e proteine.

Sia l'analisi istologica che l'analisi biochimica evidenzia l'efficacia del metodo in quanto il DNA risulta inferiore al 3%, il collagene è rimasto invariato mentre i Gag sono diminuiti del 50 %.



**Supplementary Table 1** - Biochemical analysis of decellularized liver compared to normal liver

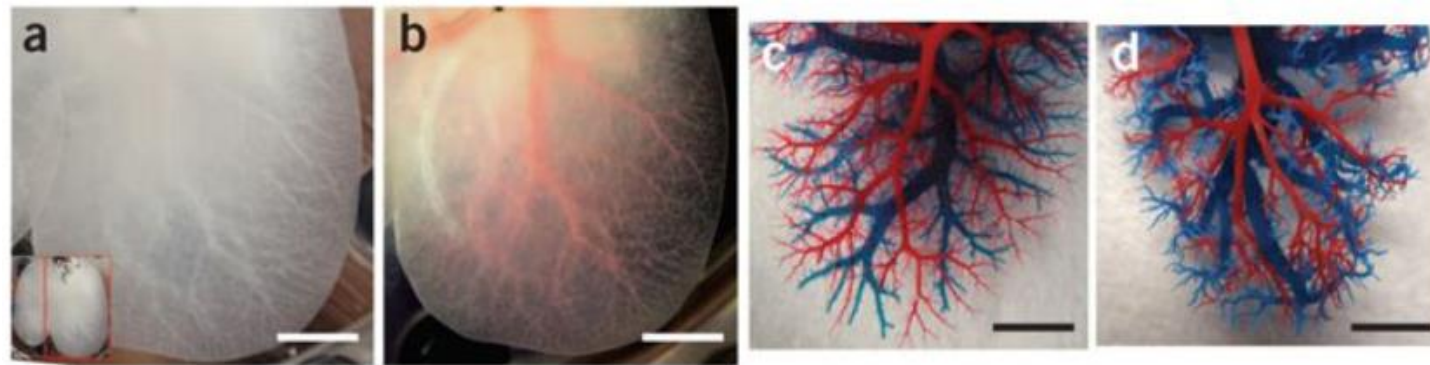
	Fresh liver <sup>a</sup> <i>n</i> = 4	Decellularized liver matrix <sup>a</sup> <i>n</i> = 8	<i>p</i> -values	% of fresh liver
<b>Collagen</b> (mg g liver <sup>-1</sup> )	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.03	0.56	114%
<b>Glycosaminoglycans</b> (μg g liver <sup>-1</sup> )	73.1 ± 6.7	34.2 ± 2.9	0.004	47%
<b>DNA</b> (μg g liver <sup>-1</sup> )	14.9 ± 5.6	0.44 ± 0.08	3.3×10 <sup>-5</sup>	2.9%

# Micro e macrostruttura dei vasi

Mediante l'iniezione di un colorante attraverso la vena porta si può notare come l'albero sanguigno sia rimasto intatto.

Un'ulteriore colorazione della rete arteriosa e venosa, rispettivamente in rosso e in blu, mostra come sia la macro che la microvascolarizzazione restano intatte in seguito al processo di *decellularizzazione*.

Risultato notevole per l'innesto degli epatociti durante il processo di ricellularizzazione.



# Fonte

Mattei, G., Di Patria, V., Tirella, A., Alaimo, A., Elia, G., Corti, A., ... & Ahluwalia, A. R. T. I. (2014). Mechanostructure and composition of highly reproducible decellularized liver matrices. *Acta biomaterialia*, 10(2), 875-882.

In quest'articolo i campioni sono stati prelevati da maiali da macello, sono stati sezionati i lobi e congelati alla temperature di - 20 °C. In seguito allo scongelamento alla T di 4°C, per ogni lobo sono stati prelevati 3 cilindri di 14 mm. Alla fine del sezionamento si ricongela alla T di -20°C tranne alcuni campioni che sono stati utilizzati per la prova di trazione.

# Analisi comparativa

Le variabili di interesse esaminate nell'articolo sono sia il tempo mediante il quale si arriva alla totale decellularizzazione sia il detergente da accoppiare ad un'azione meccanica.

I gruppi analizzati si dividono in: I, NI, DF, FF, FF-NS.

Decellularization protocols used to obtain liver dECM; percentages refer to the weight/volume ratio (w/v) of detergent solutions in deionized H<sub>2</sub>O; only PBS 1× was used in the final washing day for DF protocols, since the contribution of 0.1% w/v Triton X-100 to cell removal is very poor and not significant compared with that of 1% w/v Triton X-100 or 0.1% w/v SDS used in the other protocols.

Family	Protocol	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
Ionic	I3	PBS 1×	SDS 0.1%	½ d Triton X-100 0.1% + ½ d PBS 1×		
	I4	PBS 1×	SDS 0.1%	SDS 0.1%	½ d Triton X-100 0.1% + ½ d PBS 1×	
	I5	PBS 1×	SDS 0.1%	SDS 0.1%	SDS 0.1%	½ d Triton X-100 0.1% + ½ d PBS 1×
Non-ionic	NI3	PBS 1×	Triton X-100 1%	½ d Triton X-100 0.1% + ½ d PBS 1×		
	NI4	PBS 1×	Triton X-100 1%	Triton X-100 1%	½ d Triton X-100 0.1% + ½ d PBS 1×	
	NI5	PBS 1×	Triton X-100 1%	Triton X-100 1%	Triton X-100 1%	½ d Triton X-100 0.1% + ½ d PBS 1×
Detergent-free	DF3	PBS 1×	PBS 1×	PBS 1×		
	DF4	PBS 1×	PBS 1×	PBS 1×	PBS 1×	
	DF5	PBS 1×	PBS 1×	PBS 1×	PBS 1×	PBS 1×
Not treated (control)	FF	Fresh liver frozen at −20 °C, then thawed at 4 °C overnight				
	FF-NS	Same as FF, but not equilibrium swollen prior to testing				

# Analisi del coefficiente di equilibrio

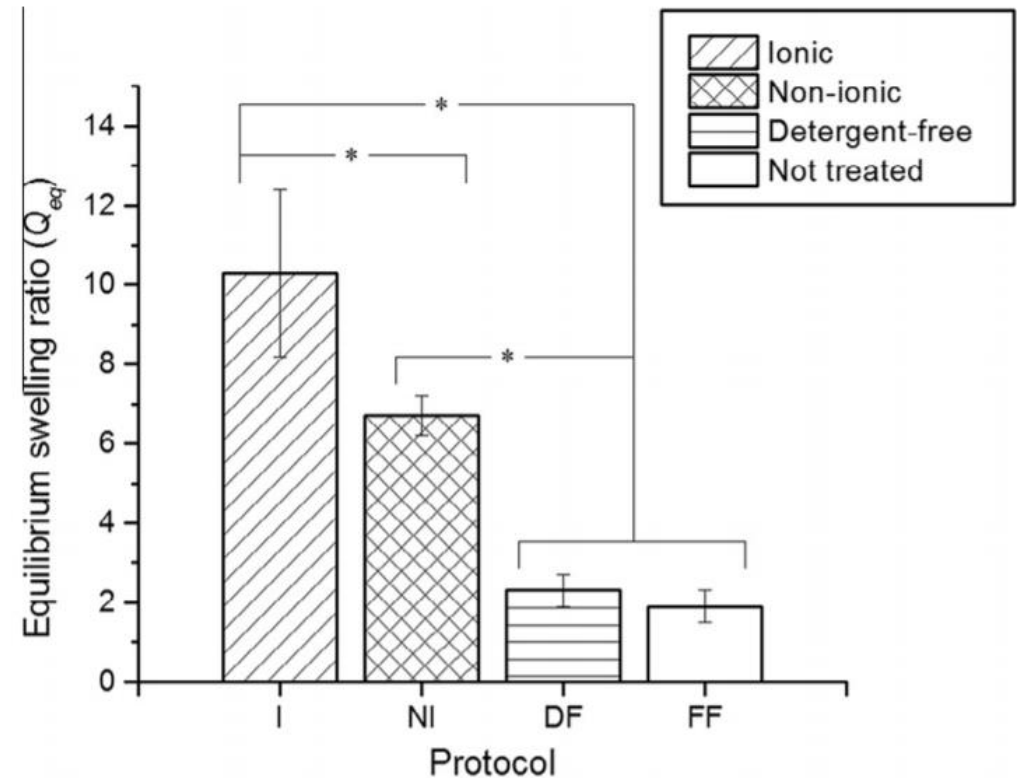
I campioni sono stati congelati alla T di – 50°C alla P di 0.45 mbar per 48 h allo scopo di ottenere il peso secco.

Successivamente immersi in soluzione PBS 1x a T ambiente e pesati ogni 12 ore fino ad ottenere un peso indipendente dal tempo.

$$Q_{eq} = \frac{W_{eq}}{W_d};$$

L'analisi del coefficiente di equilibrio rileva una sostanziale differenza tra i protocolli di decellularizzazione.

Le differenze riscontrate stanno nella struttura e nella grandezza dei pori della matrice.



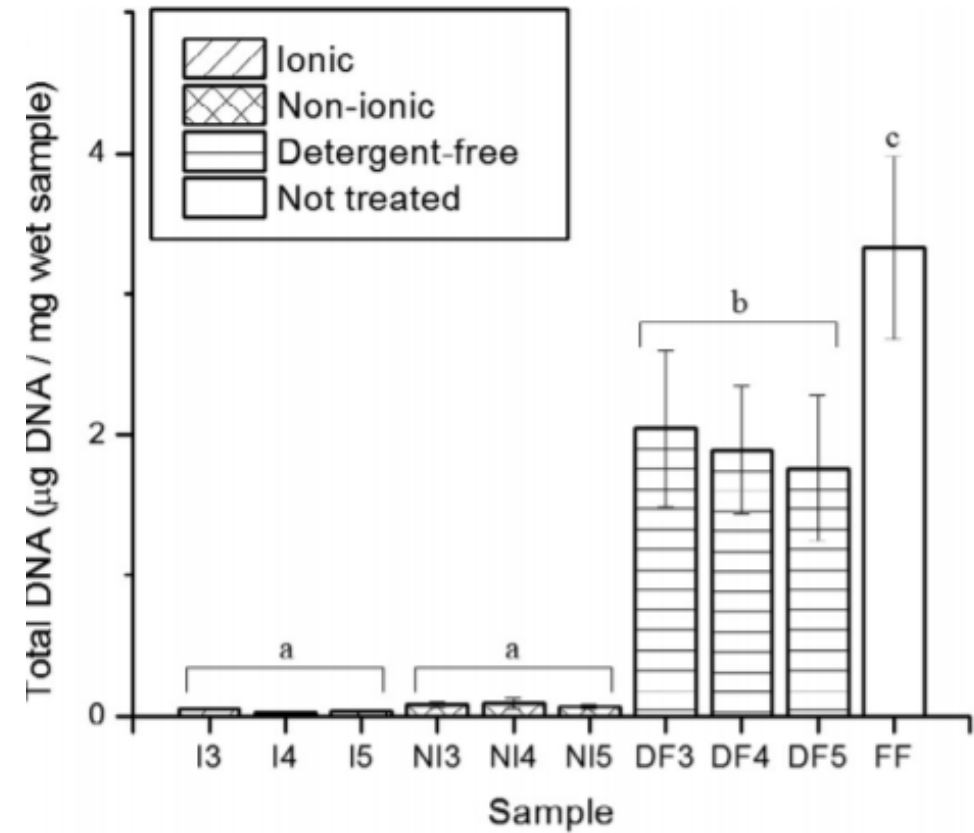


# Analisi quantitativa

Come si evince dal grafico, l'azione meccanica da sola non è in grado di eliminare le componenti cellulari.

Sia il protocollo con SDS che con TRX-100 risulta efficace. Entrambi eliminano più del 97% della componente cellulare.

Tempo di realizzazione del processo in entrambi i casi: 3 giorni.

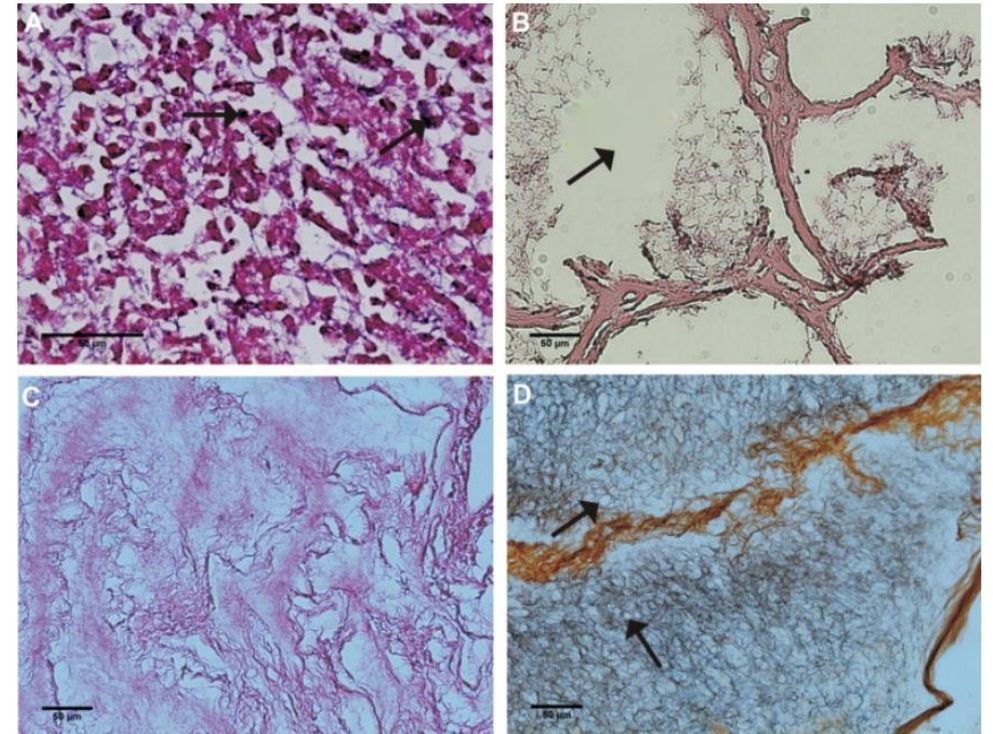


# Analisi istologica

La figura A rivela l'inefficienza del processo meccanico senza detergente. Le frecce indicano le cellule che non sono state eliminate.

La figura B mostra l'aggressività del processo mediante detergente ionico.

La C e la D mostrano gli effetti di un lavaggio con detergente non ionico e le frecce indicano la grandezza dei pori della matrice.



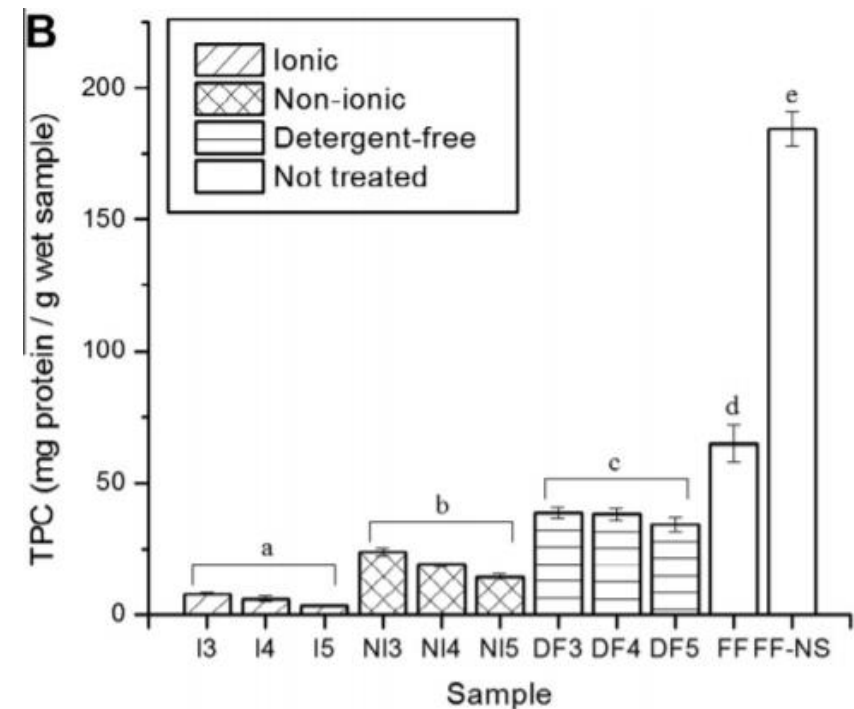
# Valutazione costituenti della ECM

Il test in esame permette di calcolare i mg di proteine in un g di campione in soluzione PBS, considerando il Weq.

La famiglia dei campioni freschi non sottoposti a rigonfiamento mostrano come una perdita di proteine sia dovuto proprio all'immersione del tessuto in soluzione.

La procedura con NI preserva di più la componente proteica.

Sia con NI che con I l'analisi varia nel tempo fino al terzo giorno.



# Proprietà meccaniche

Il campione è stato sottoposto ad un carico di 10 N in condizioni quasi statiche. Si è estrapolata la curva stress-strain e calcolato il modulo elastico dei vari campioni.

Ipotesi di lavoro: il tessuto epatico è stato considerato ISOTROPICO.

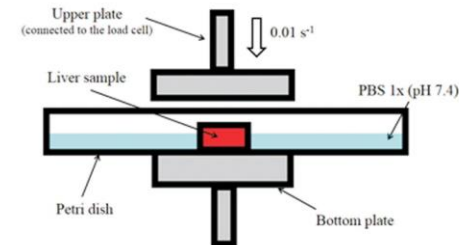
Nessuna differenza è stata rilevata sia tra dECM I e NI, sia tra FF e campioni freschi.

L'unica differenza significativa si è verificata nel confronto tra fegato decellularizzato e non decellularizzato.

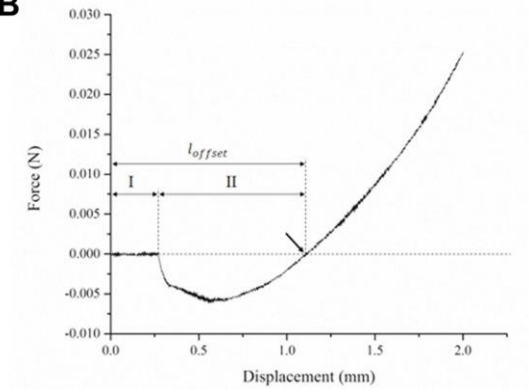
Il modulo elastico non dipende dal protocollo di decellularizzazione, per cui la matrice extracellulare non influisce sulle component meccaniche del tessuto.

Durante la prova i campioni sono stati disposti in piastre di Petri e parzialmente immerse in soluzione PBS 1x.

**A**



**B**



# Conclusioni

L'articolo mostra come la sola azione meccanica non sia in grado di portare risultati notevoli. Dall'analisi istologica e del DNA si nota come l'accoppiamento dell'agitazione meccanica con detergente ionico sia più aggressivo rispetto al detergente non ionico, con riduzione cellulare che si attesta per entrambi sul 97 %.

Il protocollo di trattamento di 3 giorni (NI3) è stato scelto come processo ottimale in quanto ha dato risultati migliori in tutte le analisi svolte.

# Considerazioni finali

- Ogni metodo deve essere valutato singolarmente, il successo dipende dalla specifica applicazione;
- Metodi ideali fornirebbero ECM completamente prive di cellule e materiale genetico, in grado di mantenere le proprietà strutturali, biochimiche e biomeccaniche cruciali per l'interazione cellulare;
- Migliorare e ottimizzare i metodi per ottenere tale equilibrio, ad esempio usando modelli dinamici e/o parametrici;
- Opportuno utilizzare modelli scalati.

# References (1/2)

## Introduzione

- S. Mantero, A. Remuzzi, M.T. Raimondi, A. Ahluwall. Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa. Patron Editore (2010);
- Badylak, S. F., Taylor, D., & Uygun, K. (2011). Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annual review of biomedical engineering*, 13, 27-53. Thomas W. Gilbert, Tiffany L. Sellaro, Stephen F. Badylak. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* vol.27, 2006: p.3675-3683
- Gilbert, T. W., Sellaro, T. L., & Badylak, S. F. (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, 27(19), 3675-3683.
- Badylak, S. F., Freytes, D. O., & Gilbert, T. W. (2009). Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function. *Acta biomaterialia*, 5(1), 1-13.5.
- Arenas-Herrera, J. E., Ko, I. K., Atala, A., & Yoo, J. J. (2013). Decellularization for whole organ bioengineering. *Biomedical materials*, 8(1), 014106.
- Crapo, P. M., Gilbert, T. W., & Badylak, S. F. (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 32(12), 3233-3243.

# References (2/2)

## Cuore

- Ott, H. C., Matthiesen, T. S., Goh, S. K., Black, L. D., Kren, S. M., Netoff, T. I., & Taylor, D. A. (2008). Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature medicine*, 14(2), 213.
- Weymann, A., Loganathan, S., Takahashi, H., Schies, C., Claus, B., Hirschberg, K., ... & Szabó, G. (2011). Development and evaluation of a perfusion decellularization porcine heart model. *Circulation Journal*, 75(4), 852-860.

## Polmone

- O'Neill, J. D., Anfang, R., Anandappa, A., Costa, J., Javidfar, J., Wobma, H. M., ... & Vunjak-Novakovic, G. (2013). Decellularization of human and porcine lung tissues for pulmonary tissue engineering. *The Annals of thoracic surgery*, 96(3), 1046-1056.
- Calle, E. A., Petersen, T. H., & Niklason, L. E. (2011). Procedure for lung engineering. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (49).

## Fegato

- Uygun, B. E., Soto-Gutierrez, A., Yagi, H., Izamis, M. L., Guzzardi, M. A., Shulman, C., ... & Hertl, M. (2010). Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nature medicine*, 16(7), 814.
- Mattei, G., Di Patria, V., Tirella, A., Alaimo, A., Elia, G., Corti, A., ... & Ahluwalia, A. R. T. I. (2014). Mechanostructure and composition of highly reproducible decellularized liver matrices. *Acta biomaterialia*, 10(2), 875-882.