

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

Sede Amministrativa: Università degli studi di Padova

**Dipartimento di Scienze Medico-Diagnostiche e
Terapie Speciali**

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E
SPERIMENTALI**

Indirizzo Scienze Cardiovascolari

Ciclo: XXIII

TITOLO TESI

**Ingegneria Tissutale delle Valvole Cardiache:
valutazione di metodi di decellularizzazione e semine
cellulari su Pericardio Bovino e Porcino**

**Direttore della Scuola:
Chiar.mo Prof. Gaetano Thiene**

**Coordinatore d'indirizzo:
Chiar.mo Prof. Gaetano Thiene**

**Supervisore:
Chiar.mo Prof. Gino Gerosa**

**Dottoranda:
Alessandra Gastaldello**

A Dario
Ad Alessandro

Indice

1	Riassunto	1
2	Introduzione	7
2.1	Il Pericardio	7
2.1.1	Istologia del pericardio	10
2.1.2	Utilizzo del Pericardio come Biomateriale	14
2.2	Anatomia del cuore e delle valvole cardiache	15
2.2.1	Anatomia della valvola aortica	17
2.2.2	Istologia e citologia dei lembi valvolari aortici	18
2.2.3	Stress meccanici della valvola aortica	21
2.2.4	Biomeccanica delle valvole cardiache	23
2.3	Malattie delle valvole cardiache	24
2.4	Sostituzione Valvolare Aortica	25
2.4.1	Protesi valvolari meccaniche	27
2.4.2	Protesi valvolari biologiche	28
2.5	Deterioramento delle protesi valvolari cardiache	31
2.5.1	Calcificazione delle bioprotesi	32
2.5.2	Degradazione non calcifica delle bioprotesi	33
2.6	Tissue Enginerring of Heart Valve:TEHV	34
2.6.1	Substrati (scaffolds) per la TEHV	36
2.6.2	Scaffolds Biologici non Valvolari	38
2.7	Metodi di decellularizzazione nella TEHV	40
2.7.1	Metodi fisici	41
2.7.2	Metodi chimici	41
2.7.3	Metodi enzimatici	44
2.8	Ricellularizzazione degli Scaffold	45
2.8.1	Metodi di ricellularizzazione	46
2.8.2	Cellule per la TEHV	48
2.8.3	Biofunzionalizzazione dei biomateriali per il ripopola- mento cellulare <i>in-situ</i>	49
2.9	Valvole ingegnerizzate in commercio	51

3	Materiale e Metodi	53
3.1	Isolamento e coltura di fibroblasti da Pericardio Bovino (PB) (Pericardiociti)	53
3.2	Decellularizzazione del PB	54
3.3	Coltura di Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)	56
3.4	Semina Pericardiociti e HUVEC sul PB decellularizzato	56
3.5	Funzionalizzazione di scaffolds pericardici bovini UTRIDOC con un peptide pro-adesivo RGD di sintesi	57
3.6	Test di Landegren	58
3.7	Test MTT	58
3.8	Inclusione del tessuto pericardico in Optimal Cutting Temperature medium (OCT)	58
3.9	Inclusione del tessuto pericardico in Paraffina	59
3.10	Colorazione istologica con Ematossilina ed Eosina (H&E)	59
3.11	Orientamento ed organizzazione delle fibre collagene: colorazione istologica con Picosirius Red	60
3.12	Colorazione con DAPI	61
3.13	Semina di Pericardiociti e cellule HUVEC per Immunocitochimica (ICC)	61
3.14	Immunoistochimica (IHC), ICC ed Immunofluorescenza (IF)	62
3.15	Prelievo del tessuto pericardico per determinazione delle proprietà fisiche	63
3.16	Determinazione delle proprietà fisiche del tessuto pericardico	65
3.16.1	Massa espressa in grammi (g)	65
3.16.2	Area espressa in centimetri quadrati (cm ²)	65
3.16.3	Densità espressa in grammi su millilitro (g/ml)	66
3.16.4	Volume espresso in centimetri cubi (cm ³)	67
3.16.5	Spessore espresso in centimetri (cm)	68
3.16.6	Contenuto d'acqua espresso in percentuale rispetto al peso umido totale)	68
3.17	Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM)	68
3.18	Test per la determinazione dell'epitopo α -Gal	70
3.19	Analisi statistiche	72
4	Risultati	73
4.1	Pericardio Bovino (PB)	73
4.1.1	Caratterizzazione di Pericardiociti	73
4.1.2	Analisi istologiche ed Immunoistochimiche (IHC)	74
4.1.3	Semina di Pericardiociti	76
4.2	Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)	80

4.2.1	Caratterizzazione con Immunocitochimica (ICC) ed Immunofluorescenza (IF)	80
4.2.2	Semina su PB UTRIDOC e piastra per colture cellulari	84
4.2.3	Semina su PB UTRIDOC e TRITDOC	89
4.3	Pericardio bovino di Vitello (PBV) e Pericardio Porcino (PP): decellularizzazione TRITDOC	92
4.3.1	Analisi istologiche	92
4.3.2	Proprietà fisiche del PBV	94
4.3.3	Proprietà fisiche del PP	100
4.3.4	Confronto delle proprietà fisiche tra PBV e PP	108
4.3.5	Riassunto generale delle caratteristiche fisiche	109
4.3.6	Analisi istologiche con Picrosirius Red	112
4.3.7	Analisi al Microscopio Elettronico a Trasmissione (TEM)	117
4.3.8	Presenza dell'antigene α -Gal	119
5	Discussione	122
6	Conclusioni e prospettive future	141
	Bibliografia	143

Capitolo 1

Riassunto

PRESUPPOSTI DELLO STUDIO Nel mondo occidentale la patologia valvolare cardiaca presenta una prevalenza del 2% nella popolazione generale, ed è in costante crescita dato l'invecchiamento della popolazione. La terapia chirurgica attuale utilizza sostituti valvolari meccanici e biologici, che frequentemente portano i pazienti al reintervento o all'insorgenza di complicanze. L'Ingegneria Tissutale (TE), disciplina che unisce il contributo dell'ingegneria e della biologia, potrebbe permettere di creare sostituti valvolari dotati di patrimonio cellulare autologo e vitale in grado di andare incontro a rimodellamento e crescita in accordo con lo stato fisiologico dei pazienti, in particolare quelli pediatrici.

SCOPO DELLO STUDIO Gli scopi di questo studio sono stati: verificare la capacità di decellularizzazione dei metodi UTRIDOC, TRICOL e TRITDOC quando applicati al Pericardio Bovino (PB), al Pericardio Bovino di Vitello (PBV) e al Pericardio Porcino (PP); testare il potenziale di ricellularizzazione del PB UTRIDOC, TRICOL e TRITDOC e caratterizzare strutturalmente e fisicamente il PBV e il PP prima e dopo decellularizzazione TRITDOC che si è rivelato un promettente metodo per l'adesione cellulare endoteliale. Gli scaffolds ottenuti sono stati valutati come biomateriali di base per l'Ingegneria Tissutale delle valvole cardiache (TEHV).

MATERIALI E METODI Il PB è stato decellularizzato utilizzando tre metodi denominati rispettivamente: UTRIDOC, TRICOL E TRITDOC. Verificata la completa decellularizzazione del tessuto e l'organizzazione della Matrice Extracellulare (MEC) tramite tecniche istologiche ed immunohistochimiche, sulla superficie sierosa del tessuto sono stati seminati fibroblasti bovini (Pericardiociti) e cellule endoteliali umane (HUVEC). Le semine sono state eseguite in diverse condizioni sperimentali per testare la densità cellu-

lare più promettente e i terreni di coltura più adatti. I risultati delle semine sono stati indagati attraverso colorazione dei campioni con Ematossilina ed Eosina, Test di Landegren e Test MTT. Il PB UTRIDOC è stato successivamente funzionalizzato con una sequenza peptidica sintetica proadesiva RGD (arginina, glicina, acido aspartico), ed è stata testata l'adesione dei Pericardiociti.

Il protocollo TRITDOC è stato poi applicato anche al PBV e al PP. In quest'ultimi esperimenti i pericardi sono stati espianati dopo sacrificio degli animali e suddivisi in 4 aree anatomiche: VsxANT, VdxANT, VsxPOST, VdxPOST. Per ogni area dei pericardi trattati TRITDOC e non trattati sono stati determinati lo spessore, la densità e il contenuto d'acqua medi. La qualità della decellularizzazione e la preservazione delle matrici sono state valutate tramite istologia, DAPI, immunohistochimica (IHC) e microscopia elettronica a trasmissione (TEM). L'eliminazione dell'antigene xenogenico α -Gal dai PBV e dai PP TRITDOC, è stata valutata tramite test ELISA.

RISULTATI Tutti i metodi di decellularizzazione sono in grado di eliminare totalmente la componente cellulare dai tessuti pericardici, inoltre mantengono inalterata l'organizzazione generale della MEC. I test di semina cellulare hanno mostrato che i Pericardiociti aderiscono alla superficie sierosa del PB UTRIDOC dopo 6h e 18h dalla semina e cominciano ad entrare nella MEC dopo 7 giorni nel PB TRICOL e UTRIDOC, mantenendo un metabolismo attivo. In presenza del peptide proadesivo sintetico RGD, i pericardiociti aderiscono meglio al PB UTRIDOC anche utilizzando concentrazioni cellulari di semina minori.

Le cellule HUVEC riescono ad aderire alla superficie sierosa del PB UTRIDOC se seminate per 1h, 3h, 5h e 24h, ma non formano un monostrato continuo. Dopo un tempo di 7 giorni dalla semina invece, aderiscono più uniformemente sul PB UTRIDOC e formano un monostrato sul PB TRITDOC, mantenendo l'espressione dei marcatori endoteliali vWf e CD31.

Considerando l'intero PBV, il trattamento TRITDOC causa una riduzione dello spessore ($p > 0,05$), un incremento della densità ($p < 0,05$) e una parziale disidratazione del tessuto ($p < 0,05$). Nel PP TRITDOC, nel VsxANT e nel VdxANT lo spessore è aumentato non significativamente ($p > 0,05$) e il contenuto d'acqua si è ridotto invece in maniera significativa ($p < 0,05$), mentre nel VdxPOST e nel VsxPOST lo spessore e il contenuto d'acqua si sono ridotti in modo non significativo ($p > 0,05$). Dopo decellularizzazione, la densità del PP non si è modificata significativamente ($p > 0,05$) rispetto al tessuto nativo. Inoltre, le aree che ricoprono il VsxANT nel PB e il VdxANT nel PP sono risultate le più omogenee per le proprietà fisiche sopra menzionate, sia prima sia dopo decellularizzazione. Le analisi morfo-strutturali eseguite,

l'istologia e la valutazione al TEM hanno rilevato una struttura della matrice e un'organizzazione delle fibre collagene sostanzialmente preservata dal trattamento TRITDOC.

CONCLUSIONI I protocolli di decellularizzazione UTRIDOC, TRICOL e TRITDOC producono scaffolds pericardici bovini e porcini acellulari, non citotossici e con una MEC strutturalmente preservata. Il PB TRITDOC sembra lo scaffold più adatto per la semina di cellule umane endoteliali HUVEC. La decellularizzazione del PBV e del PP con il protocollo TRITDOC, ha inoltre permesso di individuare delle aree pericardiche di potenziale interesse per la TEHV. Studi approfonditi sulle prestazioni meccaniche e sul ripopolamento cellulare di queste matrici permetteranno una valutazione più accurata dell'effetto del trattamento.

Abstract

BACKGROUND In the western world the prevalence of valvular heart diseases in general population account for 2%, and is constantly increasing due to ageing phenomena of the population. Current surgical therapies imply the use of mechanical and biological valves for the replacement of the diseased valve. Unfortunately in the long term this substitute valves lead patients to complications or reoperations. By using Tissue Engineering (TE) technoligis, a science that combines contributions from engineering and biology, it is being investigated whether it is possible to create a new viable valve substitute that, similarly to healthy human valves, can withstand in vivo mechanical stress and undergo remodelling and growth after implantation, especially in paediatric patients.

AIM OF THE STUDY The purposes of this study are:

1. Understand efficacy of UTRIDOC, TRICOL and TRITDOC decellularisation methods applied to Bovine Pericardium (BP), Calf Pericardium (CP) and Porcine Pericardium (PP)
2. To test recellularisation potential of UTRIDOC, TRICOL and TRITDOC BP
3. Physical and structural characterisation of CF and PP, before and after TRITDOC treatment

The obtained acellular scaffolds are considered as potential materials to be used for TE heart valve production.

MATERIALS AND METHODS BP has been decellularized using three methods: UTRIDOC, TRICOL and TRITDOC. Istological and immunoistochemical techniques has been used to verify the complete decellularization of tissue and the organization of the Extracellular Matrix (ECM). Bovine fibroblasts (Pericardiocytes) and human endothelial cells (HUVEC) have then been seeded on serosal layer. Many seeding have been done in order to test

different cellular densities and culture media. Spectrophotometric Landegren and MTT Tests and Haematoxylin and Eosin (H&E) have been carried on to check the seeding processes. At the same time others samples of BP UTRIDOC have been funzionalized with a syntethic, proadhesive peptide RGD sequence and Pericardiocytes have been seeded.

TRITDOC protocol has been also applied to CP and PP. These Pericardia have been collected and cutted in four anatomical areas: VsxANT, VdxANT, VsxPOST, VdxPOST. Density, thickness and water content HAVE been determined for each area and have been compared with non-treated Pericardia. To check decellularisation and matrix preservation of these samples the following techniques have been applied: H&E, DAPI, immunohistochemistry and electron transmission microscopy (TEM). Removal of the xenoantigen α -Gal has been assessed by means of ELISA test.

RESULTS As been shown the three methods of decellularisation are able to remove cellular component from pericardial tissues and maintain ECM organization. Cellular seeding tests have showed Pericardiocytes adhesion on PB UTRIDOC serosal surface, after 6h and 18h of culture. Moreover, after 7 days Pericardiocyte begin to migrate into ECM of BP UTRIDOC e TRICOL maintaining an active metabolism. When using syntethic, proadhesive peptide RGD, Pericardiocytes better adhere to the BP UTRIDOC.

HUVEC cells are able to adhere to the BP UTRIDOC in 1h, 3h, 5h and 24h since seeding, but they does not form a continous layer. However, they form it after 7 days on the BP TRITDOC and they keep espression of vWf and CD31.

The whole TRITDOC CP display a significant decrease of water content ($p < 0,05$), a not significant decrease of thickness ($p > 0,05$), while density significantly increased ($p < 0,05$), compared to the non-treated samples. In TRITDOC PP, both the VsxANT and VdxANT showed a not significant increase of thickness ($p > 0,05$) and a significant decrease in water content ($p < 0,05$), compared to non-trated samples. On the contrary both VdxPOST and VsxPOST display a not significantly decrease of thickness and of water content and neither change in density ($p > 0,05$). Moreover, for the mentioned above physical features, the VsxANT area in CP and VdxANT area in PP proved to be the most homogeneous specimens, compared to the other areas in the same species. Structural analyses demonstrated complete decellularisation in both CP and PP TRITDOC. Matrix architecture and collagen fibres organization were grossly maintained by the TRITDOC treatment, as exhibited by histology and TEM analysis. The xenoantigen α -Gal was completely removed from CP and PP after TRITDOC decellularisation.

CONCLUSIONS the tested decellularisation protocols, UTRIDOC, TRICOL and TRITDOC, produce bovine and porcine pericardial scaffolds that are acellular, non-cytotoxic, and exhibit normal organisation of the ECM. The TRITDOC BP, seems to be suitable for cellular seeding of human endothelial cells HUVEC. TRITDOC decellularisation of CP and PP identified specific pericardial areas more prone for use in TEHV. Further studies should be carried out to assess the mechanical performances of such scaffold, prior and after *in-vitro* cell seeding.

Capitolo 2

Introduzione

2.1 Il Pericardio

Il pericardio (Pericardium) è un sacco fibroso che avvolge il cuore e lo sostiene all'interno del mediastino ed inguaina i tratti iniziali del tronco polmonare e dell'aorta, come pure le terminazioni delle vene cave (craniale/superiore e caudale/inferiore) e delle vene polmonari Fig. 2.1. La forma e le dimensioni del pericardio corrispondono a quelle del cuore, che si sposta liberamente al suo interno coerentemente con i cambiamenti volumetrici sisto-diaistolici [1]. Si distinguono un *Pericardio sieroso* e un *Pericardio fibroso*.

Il *Pericardium serosum* è un sacco chiuso che circonda il cuore. Si distinguono 2 foglietti: uno *parietale* e uno *viscerale*, in continuità solo a livello della zona di riflessione attorno ai grossi vasi alla base del cuore. Il *foglietto parietale* (Lamina Parietalis) è molto sottile e tappezza la faccia interna del pericardio fibroso, da cui non può essere staccato. È costituito da un mesotelio a cellule piatte o cubiche, sostenute da un sottile strato di tessuto connettivo ricco di fibre collagene ed elastiche, direttamente in continuità con il tessuto proprio del pericardio fibroso. Il *foglietto viscerale* (Lamina Visceralis) non è altro che l'epicardio, che riveste esternamente il miocardio ed è formato da un unico strato di cellule mesoteliali isoprismatiche o appiattite, che riposano su un sottile strato di tessuto connettivo [3]. Questo strato è ricco di fibre elastiche ed è provvisto di una rete capillare e di numerosi elementi nervosi. Tra i due foglietti è presente una cavità (Cavum Pericardii), che in condizioni normali è praticamente virtuale. I 2 foglietti scivolano liberamente l'uno sull'altro grazie alla presenza di una piccola quantità di liquido pericardico (da 2 a 3 ml nell'uomo). Abitualmente, il liquido pericardico è chiaro, trasparente o è leggermente citrino e un po' vischioso. È al tempo stesso prodotto e riassorbito dal mesotelio del pericardio sieroso. La

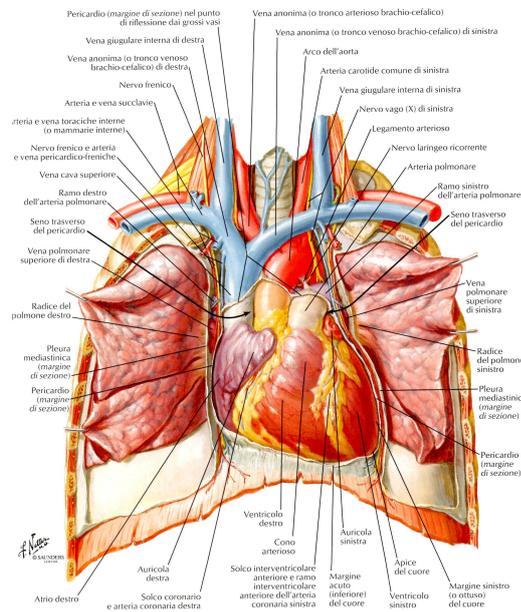


Figura 2.1: Immagine del sacco pericardico sezionato in modo da poter visualizzare il cuore sottostante [2]

sua composizione è variabile ma sempre povera di sali minerali (0.7-0.8%) e di sostanze organiche (2-3%).

Il *foglietto viscerale* forma 2 guaine distinte: una attorno all'aorta e al tronco polmonare, l'altra intorno alle terminazioni venose. Questa disposizione assicura l'indipendenza dei movimenti dei grossi tronchi arteriosi, rispetto agli atri e alle vene. Il rivestimento pericardico solidarizza le 2 arterie, le cui facce adiacenti sono infatti unite da uno spesso strato connettivale. La cavità pericardica forma tra le vene polmonari sinistre e destre una specie di tasca: il seno obliquo del pericardio o diverticolo di Haller. Questo seno è molto profondo nell'uomo, mentre è appena accennato nei mammiferi domestici e praticamente assente nei ruminanti [1].

Il *Pericardium fibrosum* è un sacco sottile, ma resistente e inestensibile, la cui forma riproduce praticamente quella del cuore. Presenta infatti una forma conica, leggermente appiattita da un lato all'altro nei Mammiferi domestici, in senso dorso-ventrale nell'uomo. Il suo asse maggiore è orientato come quello del cuore, con l'apice diretto verso l'angolo sterno-diaframmatico e con la base che avvolge i grossi vasi, arteriosi e venosi. Il suo colore è biancastro o madreperlaceo. La faccia interna di questa lamina fibrosa si continua direttamente con lo strato di sostegno della lamina parietale del pericardio

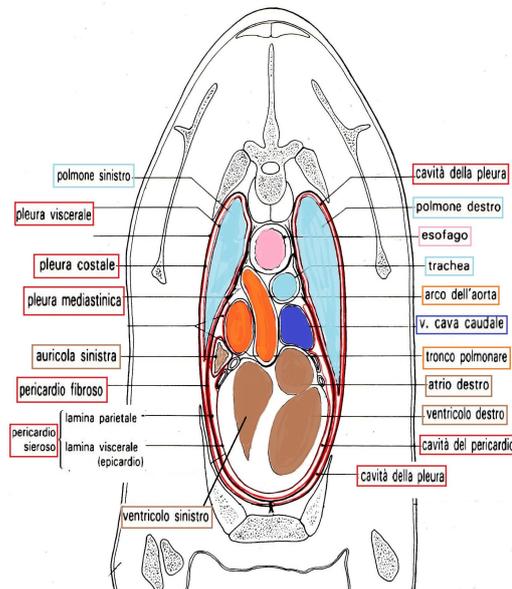


Figura 2.2: *Disposizione del pericardio: schema di una sezione trasversale del torace a livello del mediastino medio nel bovino [1]*

sieroso, dal quale non può essere separata. Al contrario, la sua faccia esterna è rivestita da *epipericardio* ed è unita alla lamina mediastinica della pleura, mediante un sottile strato di tessuto connettivo lasso, che in certi punti diviene adiposo, permettendone così la separazione tramite dissezione Fig. 2.2. Il foglietto parietale del pericardio sieroso, il pericardio fibroso e l'epipericardio, insieme, formano il cosiddetto *Pericardio parietale* [3].

Nell'uomo, il sacco pericardico aderisce, mediante una superficie relativamente larga, direttamente al versante ventrale del diaframma. Quest'unione avviene tramite tessuto connettivo lasso a livello periferico, mentre diviene una connessione intima nella zona centrale, dove le formazioni fibrose si fondono. Nei mammiferi domestici, invece, il pericardio rimane separato dal diaframma mediante una stretta parte del mediastino caudale, nel quale è presente il legamento freno-pericardico, più o meno distinto a seconda della specie e dell'individuo. Inoltre, nell'uomo il pericardio è unito allo sterno soltanto mediante due brevi legamenti sterno-pericardici, superiore e inferiore [4]. Questi legamenti hanno equivalenti solo nei ruminanti (bovini) e nel maiale. Infine, tralci fibrosi accompagnano i grossi vasi (arteriosi e venosi) unendo in modo efficace la base del cuore e il pericardio alle pareti e agli organi toracici. In questo modo, il cuore si trova sospeso nella regione mediastinica media in modo solido, ma al tempo stesso elastico, fissato allo

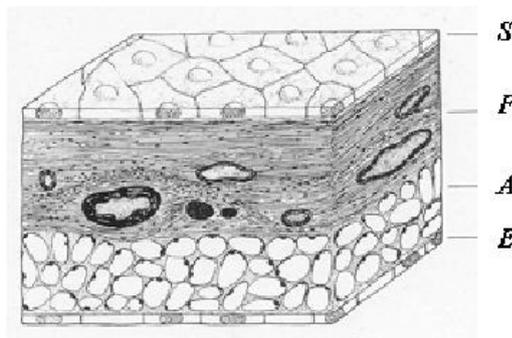


Figura 2.3: Sezione trasversale schematizzata del pericardio parietale: si distinguono lo strato sieroso (*S*), quello fibroso (*F*), lo strato di tessuto adiposo (*A*) e lo strato epipericardico (*E*) più esterno [5]

sterno, al diaframma e alla colonna vertebrale [1].

2.1.1 Istologia del pericardio

Il pericardio parietale, come detto sopra, è costituito da 3 strati Fig. 2.3:

1. lo *strato sieroso*, il più interno che guarda la cavità pericardica, formato da cellule mesoteliali
2. lo *strato fibroso*, intermedio, formato da tessuto connettivo
3. l'*epipericardio*, il più esterno [5]

Spesso ci si riferisce al pericardio parietale con il termine “pericardio”, anche se quest’ultimo comprenderebbe più propriamente anche il foglietto viscerale sieroso (l’epicardio). Fatto questo chiarimento, d’ora in poi useremo il termine “pericardio” per riferirci solo al pericardio parietale. L’*epipericardio* analogo al rivestimento mesoteliale esterno della pleura parietale, è formato da uno strato di cellule pavimentose dotate di microvilli.

Lo *strato sieroso* è tappezzato da cellule mesoteliali organizzate a formare un epitelio pavimentoso semplice. Le cellule mesoteliali hanno una forma esagonale o poligonale, con un rapporto nucleo/citoplasma piuttosto ampio. La loro superficie luminale, che guarda la cavità pericardica, è ricoperta di microvilli, più o meno lunghi quanto l’altezza delle cellule nel pericardio bovino e porcino, molto più corti, invece, nel pericardio umano. Alcune cellule possono inoltre presentare ciglia sulla loro superficie, a seconda delle condizioni fisiologiche in vivo [4]. La labilità di questo epitelio di rivestimento

è dovuta alla carenza di giunzioni intercellulari, quali desmosomi e giunzioni strette, e di strutture di ancoraggio tra membrana basale e mesotelio [5].

Lo *strato fibroso*, infine, è costituito da tessuto connettivo denso in cui si identificano una componente cellulare propria (fibroblasti) e una matrice extracellulare (MEC) [6]. I *fibroblasti* sono le cellule principali dei tessuti connettivi. Non hanno una forma ben definita ma spesso si presentano allungate con alcuni prolungamenti laterali. Sintetizzano e secernono tutti i componenti della MEC: collagene, proteoglicani, glicoproteine ed i componenti macromolecolari delle fibre elastiche. Queste cellule sembrano disporsi lungo le fibre collagene rimodellandole ed organizzando tutta la struttura tridimensionale tissutale, hanno numerosi mitocondri ed un reticolo endoplasmatico liscio e rugoso molto sviluppato. Il citoscheletro di queste cellule è molto ben organizzato allo scopo di rendere efficiente l'esocitosi delle numerose molecole per la formazione della MEC. I fibroblasti del pericardio sintetizzano principalmente collagene di tipo I e III [6].

La MEC oltre alla funzione di sostegno svolge anche un ruolo fondamentale nella modulazione della proliferazione, del differenziamento e dell'orientamento cellulare, influenzando il mantenimento dell'architettura tissutale e gli scambi metabolici fra i vari distretti. Nei tessuti connettivi fibrosi densi a funzione meccanica, come il pericardio, l'estensione della MEC è generalmente più abbondante della componente cellulare e la circonda completamente determinando così le proprietà fisiche del tessuto stesso. Nella MEC si distinguono 2 componenti principali:

- la sostanza fondamentale amorfa, che permette la diffusione delle sostanze nutrienti e dei cataboliti
- le proteine fibrillari (collagene, elastina), responsabili dell'elasticità e della resistenza meccanica del tessuto [7].

Sostanza Fondamentale Amorfa

La sostanza fondamentale amorfa è un gel altamente idratato che regola gli scambi di nutrienti e cataboliti tra sangue e tessuto e funge da filtro selettivo nel dirigere la migrazione cellulare attraverso la MEC. E' omogenea e trasparente, talvolta non apprezzabile nei preparati istologici dove può essere parzialmente solubilizzata se non fissata in maniera specifica. Le 2 classi di macromolecole che la compongono sono: i *proteoglicani* (PGs) e le *glicoproteine*.

I PGs sono complesse strutture molecolari costituite da un asse proteico su cui si inseriscono le catene polisaccaridiche acide, dette glicosaminoglicani (GAGs). I GAGs sono molecole molto lunghe in cui si ripetono delle unità

disaccaridiche legate insieme da legami O-glicosidici a formare delle macromolecole lineari [8]. In ognuna di queste unità che si ripetono, un residuo è sempre costituito da un'esosammina o un amminozucchero (glucosammina e galattosammina), mentre l'altro di solito è costituito da un acido uronico (per lo più acido D-glucuronico). I GAGs presentano un'elevata concentrazione di cariche negative e una spiccata idrofilia. Sono quindi in grado di assorbire grandi quantità di acqua, assolvendo ad un importante ruolo meccanico e biologico. In soluzione assumono una conformazione a spirale, conferendo al tessuto plasticità e resistenza alla compressione [9]. Inoltre, i GAGs sono capaci di legare i fattori di crescita e le citochine, influenzando la funzione e sopravvivenza cellulare [10]. Nel pericardio sono relativamente scarsi e i più rappresentati sono il *condroitin solfato* ed il *dermatan solfato*.

Nella sostanza fondamentale amorfa si trovano anche glicoproteine quali *laminina* e *fibronectina*. La *fibronectina* (Fn) è una glicoproteina strutturale dimerica, che esiste sia in forma solubile che in forma tissutale. La Fn è seconda solo al collagene, per quantità nella MEC. È particolarmente rappresentata nella sottomucosa, nella membrana basale e nel tessuto interstiziale. Contiene specifici domini di legame per gli altri componenti della MEC e per le proteine transmembrana delle cellule, svolgendo un ruolo centrale nell'adesione e migrazione cellulare. La *laminina* è un'altra proteina strutturale di adesione della MEC, localizzata soprattutto a livello della membrana basale. È uno dei fattori più importanti nella differenziazione, migrazione, crescita e adesione delle cellule epiteliali alla membrana basale, da cui discende la sua importanza durante lo sviluppo embrionale [11].

Collagene

Attualmente si conoscono una ventina di tipi di collagene geneticamente e immunologicamente distinti. I collagene interstiziali di tipo I e III sono presenti nel tessuto pericardico. Il collagene IV assieme alla laminina e ai PGs, contribuisce alla formazione di aggregati laminari quali le membrane basali. La caratteristica peculiare di una tipica molecola di collagene è la sua struttura a tripla elica di catene proteiche (catene α , ognuna composta da circa 1000 amminoacidi) contenenti sequenze regolarmente ripetute di Gly-X-Y, dove X e Y sono solitamente rappresentate da prolina, idrossiprolina, idrossilisina e alanina. La molecola che ne risulta, detta tropocollagene, raggiunge una lunghezza di circa 300 nm e un diametro di 1,5 nm [12]. Le unità di tropocollagene si associano testa-coda e parallelamente tra loro a formare fibrille di collagene (40-200 nm di diametro e lunghe centinaia di micrometri). Generalmente le fibrille si aggregano lateralmente e longitudinalmente a formare le fibre collagene che poi si associano in fasci più o meno ondulati, di spessore variabile. In ogni fascio, le singole fibre collagene sono parallele tra loro [13]. Nel pericardio bovino la componente collagenica è del 90% del

tipo I e del restante 10% del tipo III, mentre nel porcino la concentrazione è rispettivamente 80% e 20% [14].

Elastina

L'elastina è un componente molto importante del tessuto connettivo e del pericardio nello specifico, dove è presente in quantità pari al 5 - 6% [15]. E' una proteina fibrosa idrofobica e non glicosilata di 830 amminoacidi (72 KDa), che come il collagene è ricca di prolina e glicina ma, a differenza di quest'ultimo, contiene poca idrossiprolina ed è priva di idrossilisina. Viene sintetizzata e secreta nella MEC dai fibroblasti elastogenici sotto forma di tropoelastina, un precursore che si organizza con legami covalenti (cross-link) in una struttura molecolare altamente polimerizzata e random, dando origine a fibre di elastina. Le fibre elastiche sono composte per più del 90% da una porzione apparentemente amorfa, cioè un materiale omogeneo di densità elettronica variabile in microscopia elettronica a trasmissione, costituito da elastina e per il restante 10% da microfibrille (di diametro 10-12 nm), costituite dalla proteina microfibrillina e da una glicoproteina associata, la MAGP (glicoproteina associata alle microfibrille). Le fibre elastiche del tessuto subiscono modificazioni durante la vita dei mammiferi superiori: sono meno densamente distribuite proporzionalmente all'età dell'individuo [16]. La presenza di elastina, assieme alle fibre collagene ed ai PGs, contribuisce all'architettura tissutale e consente ai tessuti, come il pericardio, di recuperare le dimensioni originali dopo l'allungamento.

Membrana Basale

La membrana basale (MB) è una lamina di matrice extracellulare che separa gli epiteli dal tessuto connettivo Fig. 2.4. Nel caso del pericardio la membrana basale separa il mesotelio della sierosa parietale dal suo foglietto fibroso. La MB è prodotta dalle stesse cellule che vi risiedono, e modula l'adesione, il differenziamento, la morfogenesi, la divisione cellulare e la motilità cellulare nonché lo scambio selettivo di molecole tra le cellule ed il fluido interstiziale. La MB, in base al modo in cui può essere evidenziata al microscopio elettronico, può essere suddivisa come segue:

- Lamina lucida esterna: una regione elettron-trasparente rivolta verso le cellule parenchimali. Le cellule interagiscono con questo strato per mezzo di recettori per la laminina contenuta nella MB
- Lamina densa: una regione amorfa elettron - densa contenente collagene di tipo IV che si organizza a formare una rete tridimensionale che conferisce alla MB notevole resistenza meccanica e flessibilità
- Lamina lucida interna: una regione elettron - trasparente costituita da fibronectina e proteoglicani [17]

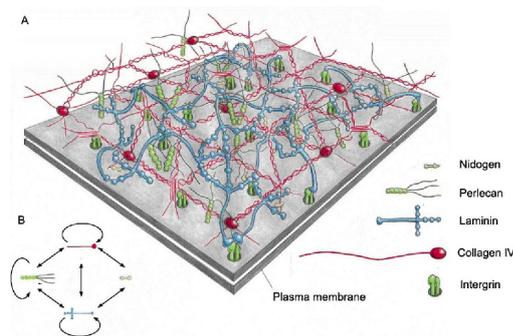


Figura 2.4: *Modello della struttura molecolare di una lamina basale formata da interazioni specifiche tra le proteine collagene IV, laminina, nidogeno e perlecano [18]*

2.1.2 Utilizzo del Pericardio come Biomateriale

Il pericardio di vari mammiferi (bovino, porcino, ovino ed umano) è un tessuto ampiamente utilizzato sia a scopo chirurgico che sperimentale. In ambito neurochirurgico, per esempio, il pericardio bovino ed ovino sono impiegati per la riparazione della dura madre in seguito a patologie delle meningi o a traumi di natura chirurgica/meccanica [19], negli interventi di tracheoplastica infantile è utilizzato allo scopo di correggere l'anomala saldatura degli anelli tracheali cartilaginei [20]. Inoltre, nella chirurgia maxillo-facciale, il pericardio bovino consente la ricostruzione del pavimento orbitario nella regione orbito-zigomatica, in seguito a fratture, in virtù del suo buon adattamento al sito di impianto [21]. Altri ambiti chirurgici in cui è utilizzato sono la chirurgia oftalmica e otorinolaringoiatrica. L'ambito cardiocirurgico è però quello in cui vi è il maggior impiego del tessuto pericardico. Negli interventi su pazienti pediatrici con cardiopatie congenite, il patch pericardico è utilizzato per riparare il setto interventricolare o interatriale, separando così il circolo sistemico (gestito dal ventricolo sinistro) da quello polmonare (gestito dal ventricolo destro)[22]. In modo similare, il patch pericardico consente anche la correzione chirurgica di anomalie delle arterie coronarie [23] e la riparazione del setto interventricolare dopo rottura post-infartuale. Inoltre, in ambito cardiovascolare, il pericardio bovino è il materiale di eccellenza per la costruzione dei lembi valvolari di bioprotesi valvolari cardiache (tradizionali e percutanee), tali valvole biologiche sono costruite ex-novo utilizzando alcune porzioni di pericardio scelte e selezionate da zone specifiche del tessuto intero. Queste zone devono presentare un alto grado di uniformità di orientamento e distribuzione delle fibre di collagene e uno spessore tissutale costante [24].

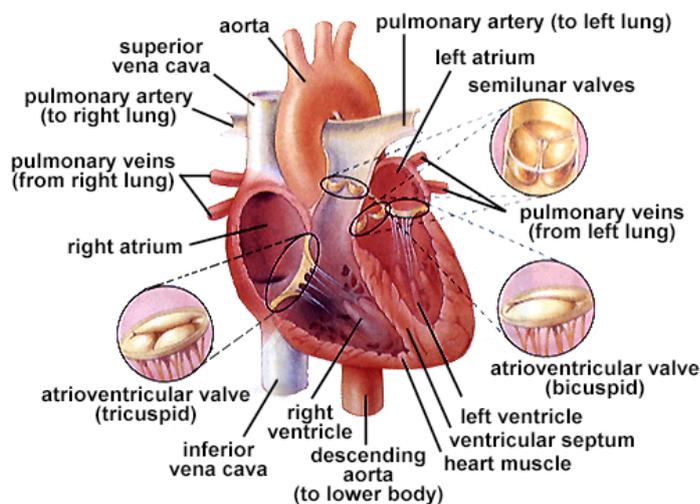


Figura 2.5: *Cuore: camere e valvole cardiache* [25]

A lungo il pericardio è stato considerato un materiale di qualità inferiore rispetto ai lembi valvolari porcini per la costruzione delle bioprotesi, tuttavia, le protesi in pericardio bovino hanno dimostrato una maggiore apertura dei lembi, più completa e simmetrica, con conseguenti vantaggi emodinamici. Inoltre, la maggiore percentuale di collagene presente nel tessuto pericardico, comporterebbe una maggiore durata della valvola stessa [16].

2.2 Anatomia del cuore e delle valvole cardiache

Il cuore ha quattro camere (atrio destro, ventricolo destro, atrio sinistro e ventricolo sinistro) e quattro valvole (tricuspide, polmonare, mitrale e aortica) (Fig. 2.5). La valvola tricuspide si trova tra l'atrio e il ventricolo destro, la polmonare tra il ventricolo destro e l'arteria polmonare, la mitrale tra l'atrio e il ventricolo sinistro e l'aortica tra il ventricolo sinistro e l'aorta. In seguito a questa collocazione anatomica, le valvole mitrale e tricuspide sono anche chiamate valvole atrioventricolari e le valvole polmonare ed aortica sono chiamate arterioventricolari. Le valvole aortica e polmonare sono anche chiamate semilunari poiché i loro lembi hanno una forma a semiluna (Fig. 2.5). Le valvole atrioventricolari sono attaccate al muscolo cardiaco (miocardio) per mezzo di muscoli papillari e corde fibrose e sono considerate

strutture attive in grado di rispondere alla contrazione miocardica. Le valvole semilunari, invece, non sono direttamente attaccate con le parti mobili dei lembi al miocardio e per questo in passato si pensava funzionassero passivamente in risposta al flusso sanguigno. E' stato però dimostrato che parti della valvola aortica sono attive [26].

Tutte le valvole permettono il flusso sanguigno in una direzione. Il sangue, povero di ossigeno, ritorna dal corpo al cuore attraverso la vena cava superiore e inferiore, all'atrio destro e, attraverso la valvola tricuspide va al ventricolo destro. Da qui, attraverso la valvola polmonare va in arteria polmonare e ai polmoni dove viene ossigenato. A questo punto passa nelle vene polmonari e quindi nell'atrio sinistro da dove, attraverso la valvola mitrale, passa nel ventricolo sinistro e attraversando la valvola aortica, ritorna alla circolazione sistemica Fig. 2.6.

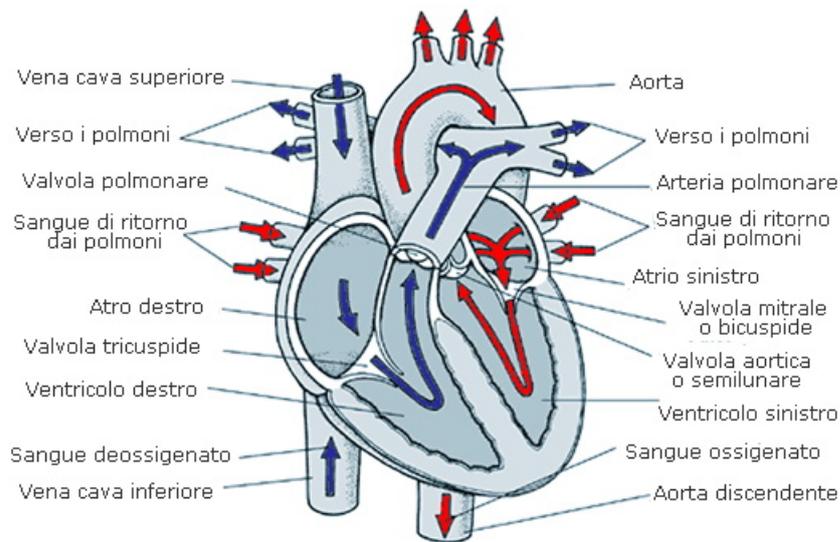


Figura 2.6: *Direzione del flusso sanguigno nel cuore* (www.cuoreanatomiafisiologia.it)

Il flusso del sangue è permesso dall'azione pompante del cuore. Durante l'eiezione ventricolare, le valvole polmonare ed aortica rimangono aperte e quelle mitrale e tricuspide rimangono chiuse Fig. 2.7, mentre durante il riempimento ventricolare avviene il contrario Fig. 2.8.

La valvola aortica si apre per permettere che il sangue fluisca in aorta e si chiude per prevenire il ritorno del sangue nel ventricolo. Questo "processo" avviene approssimativamente 103mila volte ogni giorno e circa 3,7 bilioni di

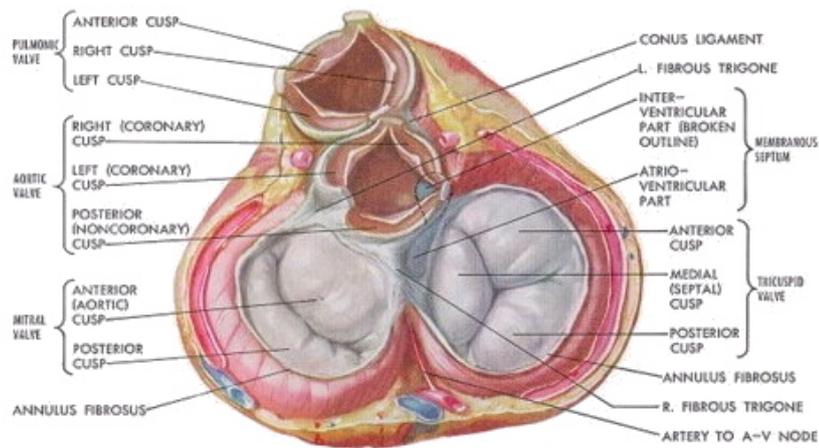


Figura 2.7: *Valvole cardiache durante la fase sistolica del cuore [2]*

volte in una vita. L'apertura e la chiusura della valvola è garantita dal movimento dei suoi 3 lembi. Sebbene la valvola aortica esegua lo stesso compito di una protesi valvolare fatta dall'uomo, il modo in cui lo realizza è unico, nessuna protesi, ad oggi infatti, garantisce la stessa efficienza e durata. Questo fatto diventa evidente quando una valvola aortica disfunzionante deve essere rimpiazzata con una protesi. Sebbene le disfunzioni di ognuna delle valvole cardiache possano compromettere la salute dell'individuo, quelle della valvola aortica e mitrale risultano essere molto più nefaste e per questo l'attenzione per il loro trattamento è maggiore.

2.2.1 Anatomia della valvola aortica

La valvola aortica è formata da tre lembi e da tre seni. I lembi sono la parte più mobile della valvola e i seni sono cavità oltre i lembi. Nel margine inferiore, i seni sono in continuità con il ventricolo sinistro, e nel margine superiore sono parte dell'aorta ascendente rappresentandone una dilatazione. Guardando all'interno della radice dall'apertura aortica, i seni possono essere visti come tasche divergenti che sporgono lateralmente al di sopra dei lembi chiusi. Le aperture delle arterie coronarie destra e sinistra sono presenti in due dei tre seni e in seguito a questo, i seni e così i lembi corrispondenti, sono denominati seno e lembo coronarico destro, seno e lembo coronarico sinistro e infine, seno e lembo non-coronarico Fig. 2.9. Il lembo coronarico destro è completamente circondato da miocardio ventricolare, il lembo coronarico sinistro invece, è in parte in continuità con il lembo anteriore o aortico della

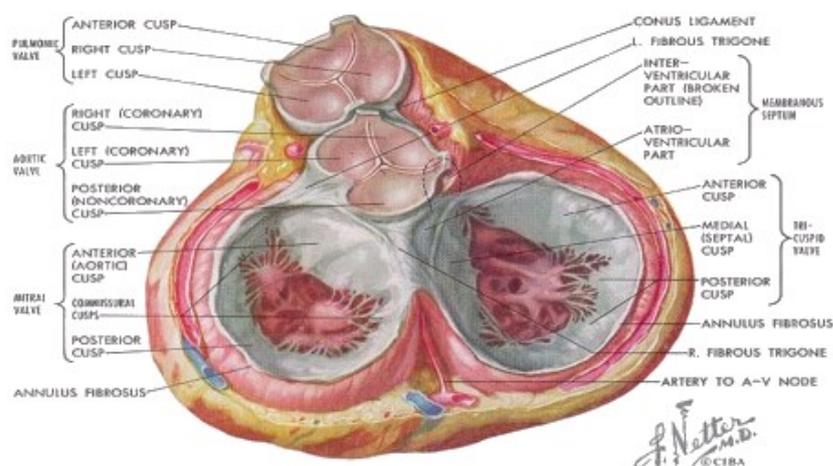


Figura 2.8: Valvole cardiache durante la fase diastolica del cuore [2]

valvola mitrale. Infine, il lembo non coronarico è l'unico che non è in relazione con nessun'arteria coronaria e per la maggior parte si trova in contatto con la valvola mitrale, in corrispondenza della cosiddetta continuità mitro-aortica Fig. 2.10 [27].

2.2.2 Istologia e citologia dei lembi valvolari aortici

I lembi valvolari aortici posseggono due distinte superfici. La superficie *ventricularis* che è rivolta verso il ventricolo e la superficie *fibrosa*, rivolta verso l'aorta ascendente. Entrambe queste superfici sono coperte da uno strato confluyente di *valvular endothelial cells* (VECs) o cellule endoteliali valvolari. Tra questi strati endoteliali vi è un strato di matrice extracellulare (MEC) popolata dalle cosiddette *valvular interstitial cells* (VICs) o cellule valvolari interstiziali. Le VECs hanno numerose funzioni, la più importante delle quali è quella di creare una superficie antitrombotica. Inoltre, svolgono un ruolo importante nel rispondere agli stress a cui è sottoposto il lembo e nel modulare il comportamento delle VICs sottostanti. Questa capacità sembra dovuta alla loro peculiare disposizione circonferenziale [29]. Sembrano avere un orientamento diverso rispetto alle cellule endoteliali vascolari. Mentre queste ultime si allineano parallele al flusso ematico, le VECs si allineano perpendicolarmente. Secondo alcune ipotesi questo comportamento potrebbe essere dovuto al fatto che le cellule endoteliali si orientano sempre nella direzione in cui lo stress meccanico è maggiore: parallelo al flusso ematico nei vasi, ma ortogonale allo stesso nelle cuspidi valvolari [30]. Secondo altre

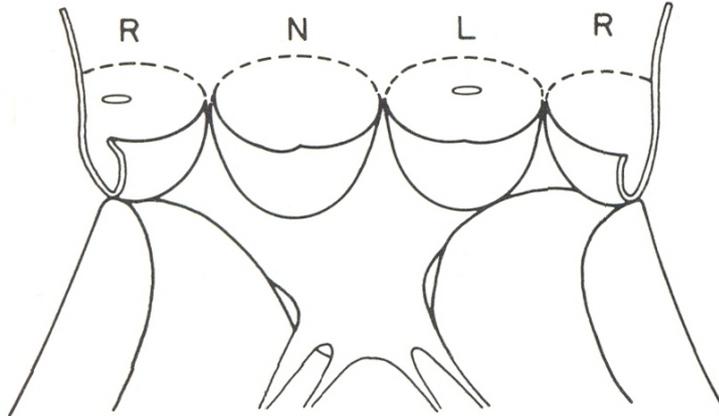


Figura 2.9: *Presentazione schematica della valvola aortica aperta con un'incisione longitudinale. Seni coronarici destro (R) e sinistro (L) che danno origine alle arterie coronarie e seno aortico non-coronarico (N) [26]*

ipotesi invece, questo comportamento sarebbe correlato ad una diversità dei 2 fenotipi cellulari. Infatti le cellule endoteliali valvolari e vascolari presenterebbero delle differenze nell'espressione genica anche se lo stimolo meccanico è lo stesso [31]. Al di sotto delle VECs si trova una lamina basale continua, composta da foglietti di collagene IV, laminina [32], perlecano (un proteoglicano) e nidogeno (una glicoproteina) [18]. Queste componenti assieme alla proteina fibronectina, sono fondamentali per il mantenimento dell'adesione e della proliferazione delle VECs [33].

Le VICs sono invece una popolazione di cellule eterogenea, che include fibroblasti, miofibroblasti, cellule muscolari lisce e cellule staminali mesenchimali [34]. Le VICs sintetizzano la MEC valvolare ed esprimono enzimi degradanti la matrice (incluse le metalloproteinasi: MMPs) e i loro inibitori che mediano e regolano il rimodellamento del collagene e delle altre componenti della MEC. Attraverso questo meccanismo di modulazione della funzione delle VICs, la valvola nativa mantiene la sua normale struttura e funzione. Questo consente un adattamento strutturale della valvola agli stati di stress e la riparazione dei danni subiti attraverso la sintesi, la riparazione e il rimodellamento delle componenti della MEC [35]. La perdita delle VICs è stata associata con la degenerazione età-correlata della valvola aortica nativa e la perdita della loro vitalità nelle bioprotesi è stata associata con il disfunzionamento precoce delle stesse [36]. Queste considerazioni sottoli-

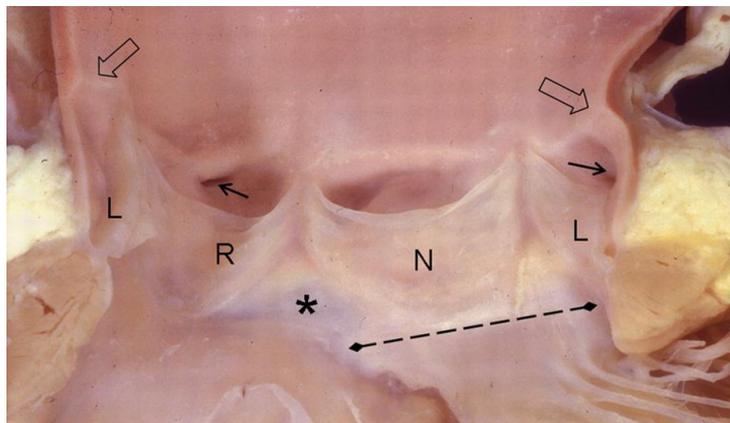


Figura 2.10: *Giunzione seno-tubulare (frecche grandi), orifici delle arterie coronarie (frecche piccole), continuità fibrosa mitro-aortica (linea tratteggiata). L'asterisco indica il setto membranoso [28]*

neano l'importanza delle VICs nel mantenimento dello stato di “salute” dei lembi della valvola aortica.

La MEC che compone la restante parte dei lembi e si trova in stretta relazione con le componenti cellulari viste, è suddivisa in tre strati o lamine: la lamina *fibrosa*, la lamina *ventricularis* e compresa tra queste, la lamina *spongiosa*.

La lamina *ventricularis*, affacciata verso il ventricolo, è composta prevalentemente da fibre elastiche orientate radialmente, così come lo è il collagene. L'elastina presente in questo strato si retrae in sistole ed aiuta ad assicurare l'apertura massima delle cuspidi [27, 37]. In diastole permette al lembo un incremento di dimensioni in direzione radiale con un incremento minimo dello stress. Questo permette una riduzione dell'usura e degli strappi assicurando la coaptazione dei lembi. La lamina *ventricularis* è inoltre particolarmente ricca di fibronectina [32].

La lamina *fibrosa* è lo strato più evidente, presente in corrispondenza della superficie aortica dei lembi. E' molto densa e composta da fibre collagene disposte principalmente in direzione circonferenziale. Queste fibre, costituite in maggioranza da collagene di tipo I, si pensa possano arrivare a interconnettersi nella parte centrale dei lembi. Data la sua densità e il suo spessore è la porzione più resistente dal punto di vista meccanico e la principale a sostenere lo stress della pressione diastolica [27, 37]. Durante la sistole il collagene della *fibrosa* presenta un evidente crimp pattern, poiché è represso dall'elastina presente nella lamina *ventricularis* [38]. Lo stiramento di questo

pattern ondulato durante la sistole ha un ruolo importante nell'assorbimento dello stress meccanico a cui la valvola è sottoposta durante il ciclo cardiaco [39].

La lamina spongiosa, è lo strato centrale del lembo. Contiene un'alta concentrazione di glicosamminoglicani (GAGs) e proteoglicani (PGs) altamente idratati. Sembra che questa struttura funga da cuscinetto tra la fibrosa e la ventricularis: avrebbe la capacità di assorbire e attenuare lo stress diastolico, conferendo plasticità al lembo e rendendo più fluidi i suoi movimenti di flessione [40]. Oltre alla loro funzione meccanica, i GAGs e i PGs valvolari avrebbero anche un'attività biologica nel regolare il sequestro di mediatori solubili come fattori di crescita e nutrienti e permettere la diffusione di ossigeno alle VICs residenti. Si pensa che la perdita dei GAGs sia implicata nella calcificazione dei lembi della valvola nativa e nella failure delle bioprotesi [32].

2.2.3 Stress meccanici della valvola aortica

Gli stress meccanici nella valvola aortica possono condizionarne la longevità. Il loro eccesso può infatti danneggiarla e causare alcuni tipi di patologia valvolare. La valvola aortica infatti, è sottoposta a una complessa deformazione durante il ciclo cardiaco. I lembi valvolari sostengono il carico pressorio in diastole ma non in sistole, quando il gradiente di pressione decresce quasi fino allo zero [26]. I lembi subiscono un'inversione della loro curvatura dalla sistole alla diastole e sono soggetti a un grande carico di flessioni, tra le quali l'apparente "rotazione" ogni qualvolta la valvola si apre. Tutti questi processi sono presenti in ogni ciclo cardiaco e possono produrre un grande carico di stress [26].

Gli stress meccanici a cui sono sottoposti i lembi aortici e i biomateriali utilizzati per la loro costruzione nelle protesi valvolari cardiache, possono essere studiati sperimentalmente attraverso la misurazione delle proprietà di *stress-strain*. Quando una forza esterna è applicata a un lembo, questo sviluppa una forza interna uguale a quella esterna. Lo *stress* è definito come la forza interna sezione trasversa del lembo. Lo *strain* rappresenta l'allungamento del lembo ed è spesso espresso come cambio percentuale della sua lunghezza. Ai fini della comprensione del lavoro di questa tesi, prenderemo in considerazione uno dei test eseguiti per determinare le proprietà meccaniche dei lembi in vitro. Questo test viene definito *test di stress-strain uniassiale* ed è applicabile anche ai biomateriali utilizzati per la costruzione di bioprotesi valvolari cardiache come lembi valvolari porcini e tessuto pericardico.

Tipicamente un test di questo tipo viene eseguito secondo la procedura descritta di seguito. Un campione rettangolare del tessuto di interesse è fissato da entrambe le estremità in una macchina utilizzata per valutare le

proprietà “di tensione” dei materiali. Il campione è spesso tagliato a forma di “manubrio” in modo da avere a disposizione del tessuto extra da utilizzare per il fissaggio. Nella macchina la parte superiore del tessuto è mantenuta fissa, mentre la parte inferiore è tirata verso il basso a una velocità costante. La forza sviluppata nel tessuto è registrata con un misuratore di tensione. La lunghezza del tessuto è proporzionale alla lunghezza del grafico registrato dato che sia la velocità e l’indice di traino del campione sono fissati. Un esperimento eseguito in questo modo, genera una curva forza-lunghezza continua, o una curva carico-allungamento, le quali devono essere convertite in una curva di *stress-strain*. Lo *stress* è ottenuto dividendo la forza con la sezione trasversale dell’area del campione di tessuto. Lo *strain* è ottenuto invece, dividendo l’incremento della lunghezza per la lunghezza iniziale.

E’ dimostrato che quasi tutti i tessuti contenenti collagene ed elastina hanno un comportamento anisotropo e non lineare. Ne risulta che le proprietà di *stress-strain* sono differenti nelle diverse direzioni (anisotropia) e lo *stress* varia in maniera non lineare con la tensione (*strain*) [41]. Poichè i lembi della valvola aortica e il pericardio sono composti principalmente di fibre collagene ed elastiche orientate preferenzialmente nella direzione della torsione prevalente, il loro comportamento *stress-strain* sarà prevedibilmente anisotropo e nonlineare.

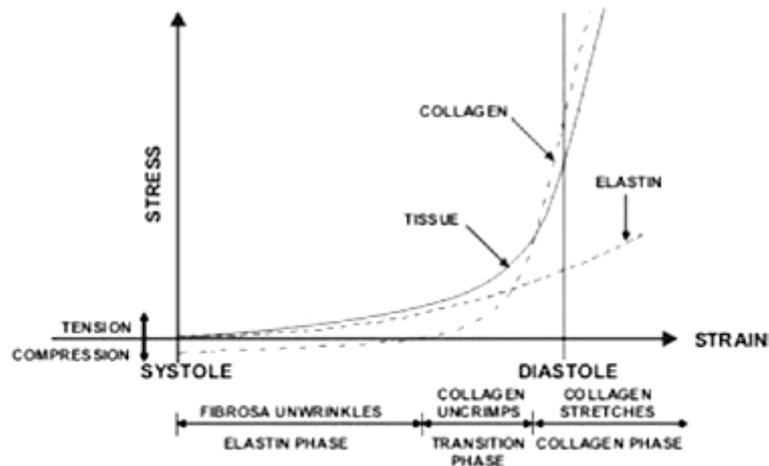


Figura 2.11: *Relazione struttura-proprietà dei lembi aortici all’interno di un intervallo fisiologico [37]*

2.2.4 Biomeccanica delle valvole cardiache

Il tessuto connettivo valvolare deve la sua funzione alla complessa morfologia strutturale, altamente adattabile e dinamica. Durante la sua funzione, la MEC dei lembi aortici è in grado di resistere a cicli di stress molto ampi così come a deformazioni dovute alle sollecitazioni del flusso sanguigno. Durante queste deformazioni esibisce un comportamento non-lineare nel quale lo stress cresce molto più rapidamente di quello previsto dalla legge di Hooke's ($F=k\delta x$). Il comportamento tipico di stress-strain del tessuto dei lembi aortici si ritrova all'interno di un range fisiologico in condizioni di tensione uniassiale Fig. 2.11. A questo comportamento contribuiscono il collagene e l'elastina del tessuto. Questo tipo di comportamento di stress-strain ha tre fasi distinte [42]. Nella prima fase (fase dell'elastina) il lembo pone una piccola resistenza all'allungamento poichè la trasmissione della forza e la sopportazione del carico sono sostenute principalmente dalle fibre elastiche. Durante questa fase lo strato di fibre collagene presente nella fibrosa si svolge e il collagene dà un contributo minimo alla trasmissione della forza. In questa fase il tessuto si comporta quasi come un solido elastico di Hooke con lo stress che cresce linearmente con lo strain. Nella fase di transizione, avviene il dispiegamento del collagene e più fibre collagene diventano gradualmente allineate e srotolate. Questo incrementa il contributo alla trasmissione della forza. Nella fase del collagene tutte le fibre sono srotolate e sopportano interamente il carico. La salita della curva di stress-strain in questa fase è ripida e quasi costante, riflettendo le proprietà del materiale e delle fibre collagene, che consentono un allungamento limitato evitando la frattura [43]. La fase del collagene normalmente continua bene oltre il range fisiologico, grazie alla riserva di resistenza. Alla fine della fase del collagene, la pendenza della curva comincia a decrescere e un ulteriore incremento del carico porta il tessuto a rompersi.

Come già accennato, il comportamento di stress-strain del tessuto valvolare è un comportamento visco-elastico non lineare. Sottoposto al carico ciclico va incontro a isteresi tra la fase di carico e quella successiva di perdita del carico. Questo periodo iniziale di "aggiustamento" dopo una grande perturbazione è chiamato preconditionamento ed avviene a causa dell'adattamento della struttura interna durante il ciclo. Con i cicli successivi l'isteresi decresce ed, eventualmente, è raggiunto uno stato stabile nel quale non avvengono ulteriori cambiamenti fino a che la routine del ciclo è modificata.

2.3 Malattie delle valvole cardiache

Le disfunzioni delle valvole cardiache stanno attirando una crescente attenzione nella medicina cardiovascolare in particolare a causa del cambiamento nella loro insorgenza e quindi della loro gestione, avvenuto negli ultimi 60 anni. Si stima che la prevalenza di queste disfunzioni sia del 2,5% nella popolazione degli USA e sia in netta crescita dopo i 65 anni. Nei paesi industrializzati, infatti, da una eziologia reumatica delle disfunzioni si è passati a un'eziologia prevalentemente degenerativa in seguito, soprattutto, all'invecchiamento della popolazione. Questo cambiamento ha portato una diversificazione delle caratteristiche dei pazienti e della distribuzione del tipo di lesioni valvolari [38].

In Europa, la stenosi aortica (SA) e l'insufficienza mitralica sono i due tipi più comuni di disfunzioni valvolari [44]. La stenosi aortica in particolare, risulta essere la lesione più comune per cui viene richiesto un trattamento nei paesi industrializzati [45].

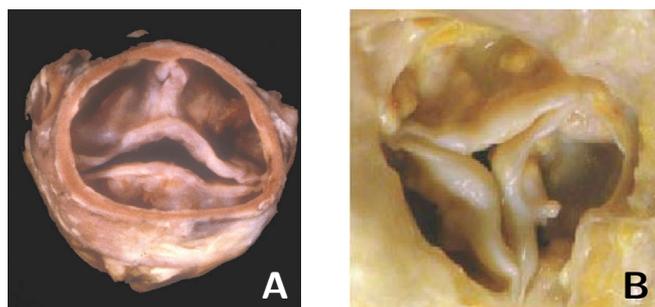


Figura 2.12: *Immagine A: valvola aortica bicuspide calcifica. Immagine B: stenosi aortica calcifica senile [28]*

Nella SA vi è un impedimento allo svuotamento del ventricolo sinistro a causa della degenerazione della valvola. Macroscopicamente la SA degenerativa è caratterizzata da ispessimento e irrigidimento dei lembi associati alla presenza di calcificazioni sul lato aortico. La degenerazione è causata da un attivo rimodellamento valvolare che coinvolge processi infiammatori e di calcificazione simili a quelli dell'aterosclerosi [46]. Le cause principali della SA sono la calcificazione di una valvola aortica bicuspide, la disfunzione post-infiammatoria fibrocalcifica e la degenerazione senile Fig. 2.12 [27]. Le caratteristiche dell'SA stanno subendo, però, delle variazioni: a causa dell'invecchiamento della popolazione la disfunzione degenerativa senile è diventata la causa più comune. La disponibilità sempre maggiore di una terapia anti-

biotica ha ridotto, invece, l'incidenza della febbre reumatica come causa di una SA post-infiammatoria [45].

La SA inizialmente causa un incremento del carico sul ventricolo sinistro compensato con ipertrofia concentrica, ma gradualmente produce una disfunzione ventricolare, sintomi di dispnea, sincope ed angina e anche morte improvvisa [47]. Il trattamento di questa disfunzione è tipicamente impiegato per i pazienti sintomatici ed è principalmente costituito dalla sostituzione della valvola disfunzionante con una protesi valvolare.

2.4 Sostituzione Valvolare Aortica

Il trattamento chirurgico della disfunzione valvolare aortica è di gran lunga il più frequente tipo di intervento di chirurgia valvolare. Ha raggiunto il 67% di tutte le procedure di questa tipologia, nell'anno 2009 [48]. Nella maggior parte dei pazienti adulti, la sostituzione valvolare aortica (Aortic Valve Replacement: AVR) è l'unico trattamento efficace per la SA severa e sintomatica. Secondo un approccio "classico" l'AVR avviene attraverso una procedura chirurgica a cuore aperto. Si stima però che in Europa circa il 30% dei pazienti con SA severa non siano candidabili a questo tipo di intervento [49]. La chirurgia non è praticabile principalmente per 2 ragioni: l'età troppo avanzata e la presenza contemporanea di gravi comorbidità che aumentano la mortalità e la morbilità. Per questi pazienti, recentemente, è emersa una procedura chirurgica meno invasiva: l'impianto transcateretere della valvola aortica (transcatheter aortic valve implantation: TAVI) attraverso un approccio transfemorale o transapicale [50, 51]. Attualmente, con questa procedura sono state impiantate più di 20mila protesi in tutto il mondo. Quello che è stato evidenziato è la sostenibilità dell'intervento in pazienti ad alto rischio con SA e un marcato miglioramento della funzione valvolare [52].

La sostituzione valvolare aortica prevede l'utilizzo di protesi valvolari. Ci sono diversi tipi di sostituti valvolari:

- protesi meccaniche
- protesi biologiche
- homografts ed autografts

Le *protesi meccaniche* sono costituite da materiali sintetici o non-biologici, mentre le *protesi biologiche o bioprotesi*, da tessuti biologici di altre specie. Gli *homografts* sono valvole provenienti dalla stessa specie e gli *autografts* dallo stesso individuo. La valvola polmonare è un esempio di autografts

quando utilizzata per la sostituzione della valvola aortica dello stesso individuo. Tutte le protesi valvolari cardiache posseggono un rivestimento in “tessuto” cucito attorno alla base della protesi, il quale funge da sito di attacco per la sutura della valvola all’interno dell’annulus valvolare nativo, dal quale la valvola viene rimossa.

Le protesi valvolari differiscono tra loro per diverse caratteristiche: il profilo emodinamico, la durata, l’effettiva area orifiziale e la trombogenicità. Le *valvole meccaniche* (*Mechanical Heart Valves, MHVs*), con rare eccezioni, hanno una durata media di 20 o 30 anni, ma richiedono una terapia anticoagulante a lungo termine. Quando il sangue infatti, entra in contatto con il materiale protesico forma dei coaguli. Durante la terapia anticoagulante i pazienti devono essere monitorati periodicamente perchè possono sviluppare complicanze emorragiche o tromboemboliche. Al contrario, le *valvole biologiche* (*Tissue Heart Valves, THVs*) non richiedono una terapia anticoagulante, ma sono fissate con glutaraldeide e, a causa di questo trattamento, vanno incontro a fenomeni di calcificazione, distrofia e disfunzione che ne limitano la durata a 10-15 anni. Gli *Homografts*, valvole umane derivate da donatori cadaveri, provvedono a una migliore emodinamica rispetto alle altre protesi, ma riproducono fenomeni di calcificazione e degenerazione simili a quelli delle bioprotesi oltre che essere di limitata disponibilità. Per queste ragioni si preferisce impiantare le valvole meccaniche nei pazienti giovani, in quelli con un’aspettativa di vita superiore a 10/15 anni o che richiedono una terapia anticoagulante per altre ragioni. Le valvole biologiche, invece, sono da preferirsi nei soggetti anziani o con un’aspettativa di vita inferiore ai 10/15 anni, o che non possono o non vogliono assumere la terapia anticoagulante [53]. Nel mondo il numero di protesi impiantate è intorno a 250mila all’anno, con un incremento annuale del 5-7%. Nei paesi sviluppati, circa il 55% delle protesi impiantate sono biologiche e il 45% sono meccaniche. L’uso delle MHVs aumenta del 3-5% per anno, mentre l’impianto delle THVs aumenta del 8-10% per anno [54].

Originariamente nel 1962 il chirurgo Dr. Dwight Harken stilò i criteri essenziali con cui dovevano essere realizzati i sostituti valvolari cardiaci e li estese anche alle protesi derivate da ingegneria tissutale (trattate successivamente in questa tesi):

- devono essere non ostruttivi e la loro chiusura deve essere tempestiva e completa
- devono essere costruiti con tessuto vivente non trombogenico che duri per tutta la vita del paziente

- devono essere sottoposti a un processo di rimodellamento che faciliti lo stato funzionale omeostatico e la riparazione di danni accumulati durante la vita del paziente
- devono rimodellarsi e crescere con la crescita fisiologica del paziente

L'ultima caratteristica è particolarmente rilevante nelle sostituzioni valvolari pediatriche. Le esistenti protesi meccaniche e biologiche infatti, non hanno la capacità di crescere, rimodellarsi e ripararsi in risposta soprattutto alla crescita fisiologica dei pazienti pediatrici. Inoltre, in questa fascia della popolazione, la terapia anticoagulante richiesta dalle valvole meccaniche è particolarmente pericolosa e i sostituti valvolari tissutali vanno incontro a un processo di calcificazione molto accelerato. Tutto questo porta alla necessità di continui reinterventi cardiocirurgici.

Nonostante i numerosi progressi fatti, attualmente, sia le protesi meccaniche che biologiche non posseggono tutte le caratteristiche di una valvola ottimale, come enunciate dal Dr. Harken.

2.4.1 Protesi valvolari meccaniche

Tutte le MHVs hanno una struttura di base simile, formata da 3 costituenti essenziali:

- Un occluder, rappresentato di solito da una o più parti rigide e mobili, come una palla (nelle protesi Starr-Edwards), un disco (nelle protesi Bjork-Shiley) o un "hinged leaflet" circolare o semicircolare. Deve essere in grado di aprirsi e chiudersi senza interferire con il flusso ematico e di adattarsi alle differenze di pressione
- Un housing, in cui è inserito l'occluder
- Un sewing ring, rappresenta la base o il corpo della protesi. È un anello di sutura in metallo o in graffite rivestito con cA destralbone pirolitico. È il punto di congiunzione della protesi con i tessuti del ricevente

Il movimento dell'occluder sull'housing influenza notevolmente il flusso ematico. Le MHVs si aprono e si chiudono grazie a un movimento passivo, che dipende dal gradiente pressorio e dai cambiamenti del flusso ematico. La competenza del sostituto valvolare dipende dalla struttura della protesi e, più nello specifico, dal modo in cui l'occluder è posizionato. La maggior parte delle MHVs ha un minimo grado di insufficienza (1-5%) per consentire un lavaggio retrogrado dei componenti protesici (potenzialmente) capace di inibire la trombosi. La protesi deve essere progettata in modo da minimizzare

le turbolenze del flusso ematico, il lavoro compiuto dal cuore, la probabilità di formazione di trombi e di comparsa di fenomeni emolitici. Le MHVs possono essere suddivise in 2 gruppi in base al pattern del flusso transvalvolare: protesi a flusso laterale (ball in cage valves); protesi a flusso centrale (tilting disc e bileaflets valves) Fig. 2.13 [55].

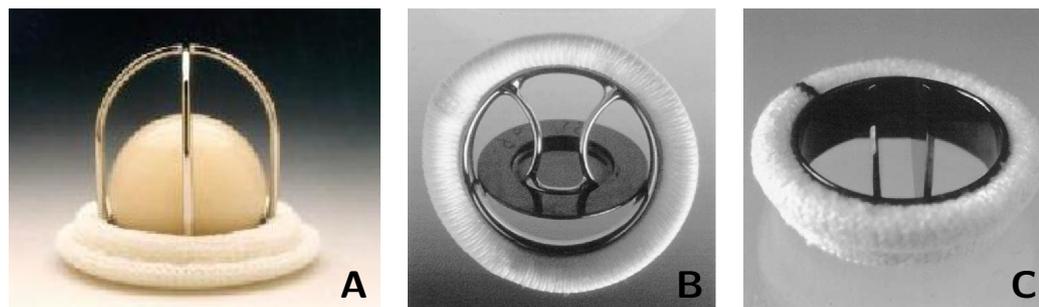


Figura 2.13: Immagine A: protesi Caged-ball (Starr-Edwards); Immagine B: protesi Single-Tilting disk (Bjorkor-Shiley); Immagine C: protesi Bileaflet-tilting disk (St. Jude Reagent) [55]

2.4.2 Protesi valvolari biologiche

Le protesi valvolari biologiche possono essere suddivise in:

- *bioprotesi* o *xenografts*, solitamente costituite da valvole aortiche porcine o tessuto pericardico bovino trattati con glutaraldeide
- valvole cardiache tissutali, rappresentate dagli *homografts* e dagli *autografts*

Le bioprotesi o le valvole biologiche tissutali imitano generalmente le proprietà di flusso e del materiale della valvola nativa. Questo le rende maggiormente compatibili rispetto alle valvole meccaniche. Gli *homografts* sono però sostituti valvolari di disponibilità limitata. Usualmente si tratta di una valvola aortica o polmonare prelevata da cadavere e preparata per essere usata come protesi. La causa principale di failure dell'allografts a distanza di 10 - 15 anni dall'impianto è la degenerazione protesica, soprattutto nei pazienti più giovani [56].

Gli *autografts* sono valvole polmonari utilizzate per sostituire la valvola aortica disfunzionante. A sua volta questa, è sostituita da un homograft. Entrambe le valvole appartengono allo stesso paziente. Questa procedura di

sostituzione valvolare è piuttosto complessa e viene eseguita soprattutto nei giovani pazienti con risultati eccellenti [57].

Gli *xenografts*, solitamente rappresentati da valvole aortiche porcine o valvole con tre cuspidi fatte di pericardio bovino, costituiscono la maggioranza delle protesi biologiche. Il tessuto di queste protesi è trattato con glutaraldeide. Si distinguono in: *stented* e *stentless*. Negli *xenografts stented* il tessuto è montato su un'impalcatura o stent in metallo o plastica, ricoperto da tessuto sintetico. Mentre, in quelli *stentless* lo stent non è presente e le commissure sono ancorate direttamente alla parete aortica nativa del paziente. Analogamente alle valvole native le bioprotesi hanno un flusso centrale e una buona emodinamica. La superficie biologica usualmente possiede delle buone proprietà antitrombotiche rispetto alle valvole meccaniche e questo consente ai pazienti con una singola bioprotesi, di poter evitare la terapia anticoagulante e di conseguenza, tutte le sue controindicazioni [57].

Protesi pericardiche

Negli ultimi 25 anni, assieme agli *xenografts* porcini, si sono sviluppate delle bioprotesi costituite da pericardio (bovino ed equino) trattato con glutaraldeide. Queste bioprotesi hanno un'emodinamica migliore rispetto alle porcine *stented* e numerose tipologie sono a disposizione nel mercato. La prima generazione di queste bioprotesi (le valvole Ionescu-Shiley) ha dimostrato problemi relativi alla progettazione ed è fallita rapidamente a causa soprattutto di rotture nei lembi valvolari. Per questo fu ritirata dal mercato alla metà degli anni '80. La seconda generazione di bioprotesi pericardiche (le CE Perimount) ha dimostrato un'emodinamica paragonabile alle valvole *stentless* ed è stata a lungo considerata la migliore, mostrando una durata di oltre 17 anni. Sfortunatamente, anche se più tardivamente, anche questa generazione di protesi va incontro a deterioramento principalmente per mineralizzazione delle cuspidi. Attualmente nella sostituzione valvolare aortica sono utilizzate le bioprotesi *Ionescu-Shiley standard* e *low-profile*, le *CE Perimount*, le *Mitroflow* e le *Sorin Pericarbon* Fig. 2.14.

Recentemente, sono state messe a disposizione altre bioprotesi pericardiche per la sostituzione valvolare aortica. Queste protesi sono impiantate con procedura TAVI e sono denominate *Percutaneous Aortic Valve*. Date le caratteristiche della tecnica chirurgica di impianto, posseggono una struttura diversa rispetto alle protesi viste precedentemente.

Ci sono 2 dispositivi utilizzati in Europa, approvati con il marchio CE nel 2007, che possono essere utilizzati per la sostituzione della valvola aortica attraverso la TAVI: il CoreValve ReValving System (Medtronic, Minneapolis,

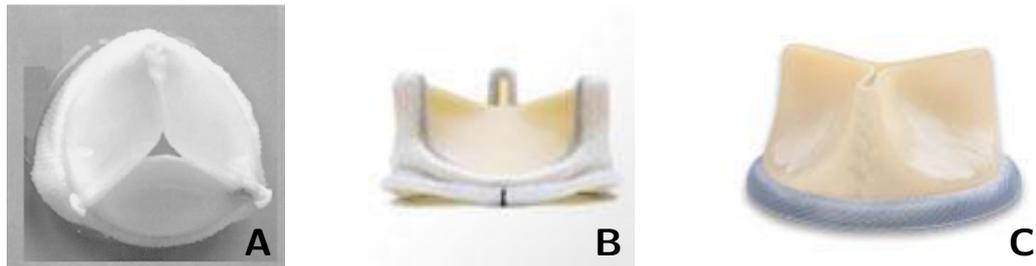


Figura 2.14: *Immagine A: protesi biologica Ionescu-Shiley Standard [55]; Immagine B: protesi biologica Carpentier-Edwards Perimount (Modello Magna Ease) (www.edwards.com); Immagine C: protesi biologica Sorin Mitroflow (www.sorin-hv.com)*

USA) e l'Edwards SAPIEN tissue heart valve (Edwards Lifescience, Irvine, California, USA).

L'*Edward SAPIEN heart valve* è una protesi espandibile con pallone, formata da uno stent cilindrico in acciaio inossidabile a cui sono attaccati i lembi in pericardio equino, inizialmente (Cribier-Edwards) e attualmente in pericardio bovino (Edwards-Sapien). Una fascia di tessuto (skirt) è cucita allo stent a livello della porzione valvolare all'interno dell'outflow del ventricolo sinistro, per limitare il rigurgito paravalvolare. La protesi è fissata in glutaraldeide Fig. 2.15 [58].

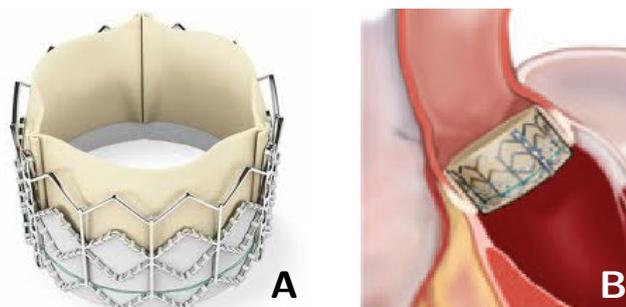


Figura 2.15: *Immagine A: Edwards SAPIEN Percutaneous Heart Valve; Immagine B: disegno che mostra la sede approssimativa della protesi all'interno della radice aortica [59]*

La *Core Valve ReValving System* è una bioprotesi con 3 lembi in pericardio montati e suturati su uno stent in nitinolo autoespandibile. Lo stent è molto esteso e può essere suddiviso in 3 parti. Il terzo superiore (outflow portion)

esercita una scarsa forza radiale ma conferisce stabilità longitudinale: si posiziona nell'aorta ascendente orientando la protesi nella direzione della radice aortica e del flusso ematico. Il terzo medio dello stent ospita i lembi valvolari e ha un'elevata forza circonferenziale per resistere alla deformazione e mantenere la normale funzione valvolare. Il terzo inferiore (inflow portion) si situa all'interno dell'outflow del ventricolo sinistro ed esercita un'importante forza radiale, in modo da espandere ed escludere i lembi calcificati nativi, senza recoil. Una striscia (skirt) di pericardio delimita la parte inferiore della valvola e, insieme all'inflow portion, aiuta a creare una "guarnizione" per prevenire il rigurgito paravalvolare [59]. Le valvole di I generazione erano in pericardio bovino, mentre quelle di II e III generazione, sono costituite da pericardio porcino Fig. 2.16.



Figura 2.16: *Immagine A: CoreValve ReValving System; Immagine B: disegno che mostra la sede approssimativa della protesi all'interno della radice aortica [59]*

2.5 Deterioramento delle protesi valvolari cardiache

La sostituzione di valvole cardiache disfunzionanti con protesi meccaniche o bioprotesi è una pratica chirurgica comune, salvavita e che migliora notevolmente la qualità di vita dei pazienti. Nonostante questo vi sono delle limitazioni fondamentali negli attuali sostituti valvolari, queste includono:

1. la necessità di una terapia anticoagulante a lungo termine per ridurre le complicanze tromboemboliche nei pazienti con protesi meccaniche e il conseguente rischio elevato di complicazioni emorragiche

2. il deterioramento calcifico e non calcifico che porta a danni strutturali delle protesi valvolari porcine o bovine fabbricate a partire da tessuti trattati con glutaraldeide e quindi non vitali

Entrambi questi problemi sono accentuati nei pazienti pediatrici.

Il 30% circa degli xenograft e il 10-20% degli homograft richiedono una sostituzione entro 10-15 anni, a causa di una degenerazione strutturale [60]. L'incidenza è maggiore nei pazienti di età inferiore ai 40 anni e in quelli con protesi mitralica [61]. La maggior parte delle valvole degenerate presentano una severa insufficienza a causa di una rottura di una o più cuspidi valvolari, diventate calcifiche e rigide. I meccanismi di deterioramento protesico dipendono dal tipo, dalla preservazione e manipolazione del tessuto e dalla modalità di attacco del tessuto al supporto/stent [29]. Due sono i principali meccanismi, potenzialmente sinergici, che causano il deterioramento strutturale delle bioprotesi: la *calcificazione* e la *degradazione non calcifica* della MEC.

2.5.1 Calcificazione delle bioprotesi

La *Calcificazione* delle cuspidi inizia a livello dei fosfolipidi delle membrane cellulari delle cellule devitalizzate in seguito al trattamento con glutaraldeide [62]. La reazione essenziale è tra i gruppi fosforici organici dei residui cellulari e il calcio plasmatico, con la formazione di minerali di fosfato di calcio, processo definito nucleazione [63]. Questi iniziali depositi calcifici possono coalescere e aumentare di dimensioni, formando dei noduli mineralizzati macroscopicamente evidenti. Si assiste così alla progressione della cristallizzazione. L'accrescimento dei nuclei di fosfato di calcio procede più o meno velocemente a seconda delle concentrazioni di calcio e di fosfato e in funzione del bilancio tra acceleratori e inibitori della mineralizzazione. Infatti, la calcificazione è più rapida nei pazienti giovani, in cui il metabolismo di calcio e fosfato è accelerato. I depositi di calcio seguono la direzione delle fibre collagene e si concentrano nei siti di più intenso stress meccanico, come le commissure Fig. 2.17. Questo causa un irrigidimento delle cuspidi con successivo malfunzionamento della protesi [64]. La fissazione in glutaraldeide sembra accelerare il processo, perché modifica la capacità delle VICs non vitali di estrusione degli ioni calcio. Proprio per questo motivo, nuove bioprotesi pre-trattate con agenti anticalcificanti (soprattutto quelli che rimuovono o alterano il substrato di fosfolipidi di origine cellulare) sono state introdotte sul mercato [65, 66].

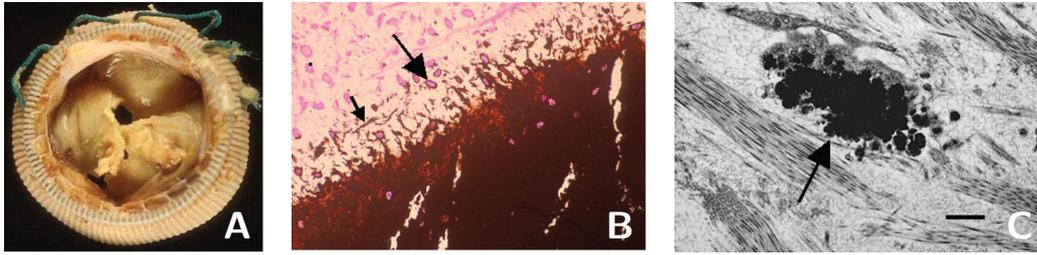


Figura 2.17: *Immagine A: bioprotesi porcina espantata dopo fallimento per calcificazione e rottura delle cuspidi; Immagine B: micrografia della cresta di un deposito calcifico in una bioprotesi porcina: si vedono densità calcifiche sia rotonde che allungate, che rappresentano la calcificazione iniziata nelle cellule (freccie grandi) e nel collagene (freccie piccole). Colorazione Von Kossa, Ingrandimento 400x; Immagine C: micrografia elettronica a trasmissione di depositi calcifici associati a frammenti cellulari (freccia). Barra=1 μ m [29]*

2.5.2 Degradazione non calcifica delle bioprotesi

La *degradazione non calcifica* della MEC sembra dovuta alla fissazione chimica con glutaraldeide che devitalizza le VICs (delle THVs porcine) e i fibroblasti (delle THVs in pericardio bovino) e fissa il collagene. Le cellule non più vitali sono incapaci di rimodellare e riparare i danni alla MEC, causati dagli stress meccanici valvolari. La fissazione delle fibre collagene in una singola configurazione, impedisce i naturali riarrangiamenti della MEC delle cuspidi (allineamento e crimping delle fibre collagene), che accompagnano il normale funzionamento valvolare [67]. Di conseguenza, durante la chiusura e apertura della bioprotesi fissata, lo stress meccanico determina la rottura delle fibre collagene e la deformazione delle cuspidi. Alcuni fattori sembrano favorire tale quadro: un movimento valvolare anomalo, la deplezione di GAGs e il danno diretto del trattamento chimico [68]. Nelle PHVs, inoltre, si aggiungono altri fattori causali specifici, legati alla loro peculiare architettura. Inanzitutto lo spessore medio dei lembi in pericardio è di 0,25 mm, a differenza di quello delle bioprotesi che è di 0,40 mm, questa riduzione del 40% potrebbe diminuire sostanzialmente la resistenza meccanica e quindi la durata del tessuto. Inoltre, per quanto riguarda le PAVs, la struttura tubulare dello stent non permetterebbe la deflessione radiale dei lembi, aumentando il picco di stress del tessuto. Anche la differente geometria dei lembi delle PAVs attualmente in commercio potrebbe essere uno dei fattori che influiscono sul failure valvolare [69].

2.6 Tissue Engineering of Heart Valve:TEHV

L'*Ingegneria dei Tessuti* o *Tissue Engineering (TE)* è una disciplina sorprendentemente “vecchia”. Il termine fu coniato da Fung nell’ottobre del 1987 a Washington, DC, durante un congresso della National Science Foundation [70]. La TE ha numerose definizioni, semplici e complesse. Una delle più semplici è quella trovata nel The Biomedical Engineering Handbook: *L’applicazione dei principi scientifici alla progettazione, costruzione, modificazione, crescita e mantenimento di un tessuto vivente.*

Una definizione più complessa è data nel World Technology Panel Report [71] fondato dal NIH, dalla FDA e da altre agenzie governative, nel quale la TE è stata definita: *L’applicazione dei principi e dei metodi dell’ingegneria e delle scienze della vita per ottenere la comprensione della relazione tra struttura e funzione nei tessuti nativi e patologici dei mammiferi e sviluppare sostituti biologici per ripristinare, mantenere o aumentare la funzione tissutale.*

La TE applicata alle valvole cardiache può essere considerata come la manipolazione di molecole biologiche e cellule con il proposito di creare nuove strutture che siano metabolicamente attive e che vadano a rimpiazzare quelle disfunzionanti o malformate [70]. L’interesse e la necessità di applicazione della TE alla realizzazione di sostituti valvolari cardiaci, sono dovuti alle attuali limitazioni delle protesi utilizzate (descritte nella sezione precedente). In particolare queste limitazioni sono particolarmente rilevanti se vengono considerati i pazienti pediatrici. Le disfunzioni cardiache congenite sono presenti in circa l’1% dei neonati e più di un terzo di queste anomalie coinvolgono la valvola aortica o polmonare. Vi è di conseguenza grande necessità di sostituzioni valvolari in bambini ed adolescenti [72]. Le protesi utilizzate, sia meccaniche che biologiche, non sono però in grado di crescere in concomitanza con la crescita fisiologica di questi pazienti, per cui essi necessitano di reinterventi continui al fine di impiantare valvole più larghe [35].

Il paradigma della TE classica *in-vitro* comprende:

- l’isolamento e l’espansione di cellule autologhe (del paziente)
- la loro semina successiva all’interno di un apposito substrato (naturale o sintetico)
- il condizionamento del costrutto per permettere la formazione di tessuto (per esempio in un bioreattore)
- l’impianto nel paziente, idealmente dopo che il costrutto sia stato testato

Fig. 2.18

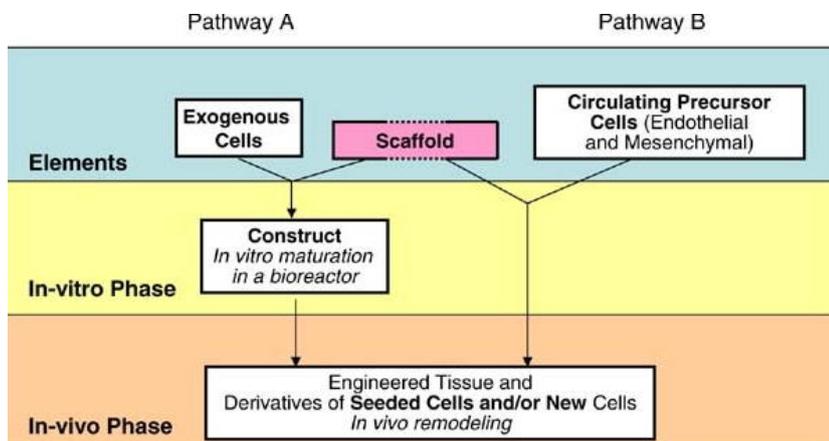


Figura 2.18: *Pathway A* Il paradigma convenzionale della TE: lo scaffold è seminato con cellule (possibilmente del paziente), condizionato successivamente in un bioreattore e impiantato in-vivo. I processi patofisiologici chiave avvengono durante la fase in-vitro e in-vivo e sono la proliferazione cellulare, la produzione e l'organizzazione della MEC, la degradazione dello scaffold e il rimodellamento tissutale. Il costrutto risultante potrebbe contenere una combinazione di cellule seminate e nuove cellule. *Pathway B* La modificazione del paradigma A potrebbe utilizzare uno scaffold non seminato, fabbricato con informazioni biologiche adeguate per attrarre e sostenere le cellule progenitrici circolanti in-vivo [73]

Altri approcci di TE possono omettere uno o più steps di questo schema. Per esempio con la formazione di “foglietti” di cellule senza substrati [74] e viceversa con l'utilizzo di substrati privi di cellule [75]. Mentre la TE *in-vitro* mira a creare sostituti tissutali all'esterno del corpo umano, gli approcci più recenti di TE *in-situ* riportano la creazione di nuovo tessuto all'interno del corpo in una specifica posizione usando substrati impiantabili privi di cellule. Questi inducono una “guarigione” endogena, attraverso lo scaffold “nudo” o funzionalizzato con apposite molecole capaci di influenzare il reclutamento e il destino cellulare e lo sviluppo di tessuto in-situ Fig. 2.18 [76]. In tutti questi approcci le cellule formano la componente vitale che secerne MEC e altre molecole bioattive (MMPs, molecole segnale, inibitori). La MEC provvede al “contesto” di base per il tessuto e diventa responsabile delle sue proprietà strutturali e meccaniche. Lo scaffold funziona come una matrice cellulare temporanea nella quale le cellule possono organizzarsi, crescere, proliferare e produrre matrice nativa [38].

Si possono distinguere quattro processi chiave che hanno luogo durante la fase di formazione e maturazione del tessuto *in-vitro* o *in-vivo* [77]:

1. migrazione, proliferazione e differenziamento cellulare
2. produzione di MEC
3. degradazione dello scaffold
4. rimodellamento e potenziale crescita del tessuto

Una volta combinati assieme nella corretta maniera, sembra possibile che si producano un fenotipo cellulare dinamico ed interattivo e nuova MEC. L'interazione di questi elementi potrebbe portare allo sviluppo di una microarchitettura comparabile a quella della valvola nativa, in grado quindi di crescere, svilupparsi, ripararsi e rimodellarsi [78]. Nel caso della TEHV lo scaffold su cui crescono le cellule e che viene modificato dalle stesse, deve avere anche una struttura e delle caratteristiche meccaniche che consentano una funzione simile a quella della valvola nativa, durante la sua “maturazione” in vivo [79]. Le caratteristiche e i criteri per la progettazione delle protesi valvolari cardiache convenzionali ed ingegnerizzate sono riportati in Tab. 2.1.

2.6.1 Substrati (scaffolds) per la TEHV

Probabilmente, i primi esempi di TEHV sono rappresentati dagli esperimenti di semina cellulare su substrati inerti. Questo approccio ha avuto però successo nell'ambito dei grafts vascolari [80] ma non in quello delle valvole cardiache. I materiali sintetici biocompatibili hanno fallito come sostituti dei lembi valvolari, non a causa di fenomeni tromboembolici ma come conseguenza dello stress subito dal materiale, correlato a microfratture, accumulo di proteine plasmatiche e conseguente mineralizzazione [81]. A causa di queste problematiche fondamentali, le matrici biologiche fissate in glutaraldeide hanno dominato la TE delle valvole cardiache. I residui aldeidici sono però tossici e le protesi valvolari non possono essere colonizzate da cellule. Per ragioni invece ancora non del tutto chiare, queste matrici non inducono fenomeni tromboembolici e rimangono strutture essenzialmente passive nel flusso sanguigno senza esercitare reazioni avverse [70]. Forse il primo esempio di TEHV proviene dall'università di Vienna nel 1991, quando un gruppo di ricercatori presentarono il loro successo nell'indurre la crescita di endotelio su pericardio bovino fissato con glutaraldeide. La crescita delle cellule era resa possibile grazie al trattamento con acido glutammico prima della semina, questo ero in grado di inattivare i residui aldeidici [82].

Parameter	Conventional (mechanical, bioprosthetic)	Tissue engineered
Closure of leaflets	Rapid and complete	Rapid and complete
Fluidic function	Good	Potentially identical to native valve in terms of effective orifice area and pulmonary and systemic pressure and flow levels
Risk of thrombosis	Yes (especially high in mechanical valves which require anticoagulation causing vulnerability to hemorrhage)	Endothelial surface should inhibit thrombogenesis
Surgical insertion	Easy and permanent	Easy and permanent
Risk of structural dysfunction	Degradation of materials which are rare in mechanical valves but high in bioprosthetic valves from tissue degradation and calcification	Potentially resistant to tissue degradation and calcification owing to tissue viability Rare in mechanical valves High in bioprosthetic valves from tissue degradation and calcification
Risk of infection	Ever present	Resistant
Cellular function	None	Physiological VIC and VEC function
Tissue function	Durable and stable, chemically inert, non-hemolytic	Durable and stable Functional anatomic characteristics: collagen, elastin, GAG distribution and structure Functional mechanical characteristics: anisotropy, high tensile strength, low effective flexural rigidity Remodel according to need Somatic growth
Geometry	Set by design (mechanical/pericardial bioprosthetic) or tissue source (porcine bioprosthetic)	Designed at time of implantbased patient-specific geometry Somatic growth adaption may require/allow for nonuniform changes
Surgical considerations	Sterility design and implantation procedures well established	Sterility Practical considerations in cell sourcing Implantation Suturing/physical handling
In vivo monitoring requirements	Standard hemodynamic function Degeneration/regurgitation	Hemodynamic conditions over initial and long-term remodeling periods Cellular physiological and phenotype, mass and content levels Changes in tissue components and mass changes Structure and mechanical properties Differences between neonate, juvenile, and adult

Tabella 2.1: *Criteri di progettazione delle valvole cardiache ingegnerizzate [38]*

Lo scaffold ideale per la TEHV dovrebbe soddisfare alcuni requisiti fondamentali:

1. adeguate proprietà meccaniche per sostenere le condizioni dinamiche del sito di impianto per tutta la vita del paziente. In particolare, dovrebbe essere sufficientemente elastico per mantenere una chiusura ermetica durante la fase diastolica del ciclo cardiaco
2. una microarchitettura simile a quella della AV nativa, dato che l'orientamento delle fibre collagene ed elastina influenza le proprietà meccaniche e la funzionalità cellulare
3. una superficie simile a quella della membrana basale della AV nativa, necessaria per lo sviluppo di uno strato confluyente di cellule endoteliali non trombogeno
4. capacità di rimodellamento, con una velocità di degradazione simile a quella della sintesi della MEC. In tal modo si conserverebbero la capacità di sostenere l'apertura valvolare ad elevati valori pressori in sistole e una completa chiusura in diastole
5. capacità di supportare l'adesione, la proliferazione e la differenziazione fenotipica delle VICs, delle VECs (o di qualsiasi altra tipologia cellulare scelta per replicare il loro comportamento), così da garantire l'antitrombogenicità e la non immunogenicità dello scaffold [79]

Gli scaffold utilizzati nella TEHV si distinguono in:

- Scaffold sintetici
- Scaffold naturali:
 1. formati dai costituenti puri della MEC (collagene e fibrina)
 2. biologici di origine non valvolare (pericardio)
 3. biologici di origine valvolare (allograft o xenograft)

In questa introduzione ci concentreremo nel descrivere gli scaffolds di origine non valvolare.

2.6.2 Scaffolds Biologici non Valvolari

Un tipo di matrice biologica molto utilizzata negli studi di TE è rappresentata dal *pericardio*. Il pericardio autologo umano ha dimostrato di possedere

le migliori caratteristiche per la TE. È un biomateriale a basso costo, non contaminato da patogeni propri del donatore, facilmente accessibile e che non stimola una risposta immunitaria, perché riconosciuto come self dal Sistema Immunitario [83]. Tuttavia, vi è una scarsa disponibilità di pericardio autologo umano a causa della reazione infiammatoria post pericardiotomia che altera le proprietà tissutali e per la necessità di una sternotomia per recuperare il tessuto (soprattutto in caso di un suo impiego extra-cardiaco) [84]. A fronte di questi limiti, oggi si utilizza ampiamente il pericardio xenogenico (bovino, porcino, ovino). Il tessuto pericardico utilizzato da più tempo nella TEHV e quindi meglio caratterizzato è rappresentato dal Pericardio Bovino (PB). Il suo utilizzo presenta numerosi vantaggi e svantaggi, il fattore più importante da considerare nell'impiego di questo biomateriale è la sua intrinseca variabilità. Infatti, anche se macroscopicamente il tessuto può apparire uniforme, risulta invece eterogeneo a livello istologico e biochimico, forse a causa dei diversi stress fisiologici cui le varie porzioni del tessuto sono sottoposte [85]. Questa variabilità ha reso la caratterizzazione delle proprietà meccaniche del PB un compito importante della ricerca, per migliorare il suo utilizzo quale biomateriale da ingegnerizzare. Per la produzione di TEHVs, è importante selezionare le aree di PB caratterizzate da struttura e proprietà meccaniche regolari. Le porzioni ideali di PB sono quelle a spessore uniforme, con una limitata variabilità dell'orientamento delle fibre collagene, un trascurabile quantitativo di tessuto adiposo e un'area sufficientemente ampia da poter costruire un lembo valvolare [24].

La decellularizzazione degli *xenografts* come il Pericardio, è una procedura obbligatoria ai fini di produrre un sostituto valvolare ingegnerizzato. La componente cellulare presente nel tessuto xenogenico se non eliminata indurrebbe infatti, una rapida reazione di rigetto conosciuta come *rigetto iperacuto*. Nelle bioprotesi attualmente utilizzate la “neutralizzazione” degli antigeni specie-specifici, che causano questa reazione, avviene attraverso la fissazione in glutaraldeide. In particolare il rigetto iperacuto è causato dalla presenza di un epitopo conosciuta come galattosio α 1-3 galattosio (α -gal) il quale è presente sulla superficie di quasi tutte le cellule di mammifero eccetto quelle umane e delle scimmie del vecchio-mondo. Questi organismi sviluppano anticorpi anti α -gal in risposta alla loro flora batterica intestinale, e questi anticorpi reagiscono anche con l'antigene presente nei tessuti od organi xenogenici impiantati e daneggiano il rivestimento endoteliale dei vasi sanguigni portando alla formazione di coaguli con conseguente blocco della circolazione, ipossia e necrosi [37]. In alcune bioprotesi disponibili in commercio, l'epitopo α -Gal è stato identificato nonostante la fissazione in glutaraldeide e si è dimostrato capace di stimolare la risposta del SI dei pazienti in cui la protesi era impiantata. Infatti, dopo AVR, questi pazienti presentavano un significa-

tivo rialzo dei livelli di anticorpi anti α -Gal, quando confrontati con pazienti sottoposti a bypass aorto-coronarico [86]. In valvole porcine ingegnerizzate, solo parzialmente decellularizzate, si ritrova la presenza di questo xenoantigene α -gal [87]. Se l'induzione di una risposta immuno-specifica contro questo antigene possa contribuire alla degenerazione valvolare, non è ancora stato chiarito. Nonostante ciò è chiaramente desiderabile evitare ogni reazione contro la valvola impiantata. Alcuni protocolli di decellularizzazione studiati sembrano comunque in grado di eliminare totalmente l'antigene α -gal [87, 88] e per questo costituiscono dei protocolli promettenti per la creazione di valvole cardiache ingegnerizzate.

2.7 Metodi di decellularizzazione nella TEHV

Esistono diversi metodi di decellularizzazione utilizzati sia per tessuti xenogenici che allogenici. I diversi trattamenti differiscono per l'efficacia nel rimuovere le cellule e i detriti cellulari, per la preservazione della struttura della MEC e della sua funzione e per la suscettibilità alla semina cellulare [89]. Tutti però devono soddisfare precisi requisiti considerati indispensabili:

- devono rimuovere tutte le cellule valvolari, i loro residui cellulari e i loro epitopi antigenici [90]
- devono conservare la struttura della MEC, dalla cui integrità dipende una corretta funzione valvolare. Un trattamento tissutale aggressivo può alterare le proprietà meccaniche, elastiche ed emodinamiche della TEHVs [91]
- deve produrre un substrato adeguato per la ricellularizzazione. Quindi, deve conservare una struttura tridimensionale e la membrana basale, che hanno un ruolo fondamentale nella crescita e migrazione cellulare ed eliminare i residui citotossici di detergente, per permettere la replicazione e la crescita cellulare [33, 90]

Un protocollo di decellularizzazione, di solito, comprende una combinazione di metodi fisici, chimici ed enzimatici. Generalmente si riconoscono le seguenti fasi:

1. lisi delle membrane cellulari, usando metodi fisici o soluzioni iper/ipotoniche
2. separazione delle componenti cellulari dalla MEC usando un trattamento enzimatico. Dato che gli enzimi utilizzati possono essere molto aggressivi, la loro azione deve essere controbilanciata da inibitori [89]

3. solubilizzazione del citoplasma e delle componenti nucleari, usando detergenti non ionici o zwitterionici
4. estrazione finale dei residui cellulari dal tessuto, usando detergenti ionici

Questi steps possono essere accoppiati all'agitazione meccanica, in modo da aumentarne l'efficacia del trattamento. Bisogna ricordare, però, che gli agenti usati per l'estrazione cellulare possono essere dannosi per la matrice: possono degradare o denaturare le proteine della MEC o lasciare residui tossici, che possono influire negativamente sulla meccanica funzionale o sulla risposta cellulare [92]. E' importante di conseguenza, valutare la combinazione delle varie fasi del processo di decellularizzazione, la scelta dei detergenti da utilizzare e la durata dei tempi di lavaggio.

2.7.1 Metodi fisici

I metodi fisici di decellularizzazione comprendono: il congelamento, la sonicazione, l'agitazione, l'applicazione diretta di pressione. Il rapido congelamento è utilizzato spesso nella decellularizzazione dei tendini, legamenti, tessuto nervoso. Questo approccio causa la formazione di cristalli di ghiaccio che distruggono le membrane cellulari e causano la lisi cellulare. La temperatura deve essere controllata attentamente per evitare danni alla MEC. Deve comunque essere seguito dalla rimozione del materiale cellulare dal tessuto. L'agitazione meccanica e la sonicazione sono utilizzate simultaneamente ai trattamenti chimici, per favorire la lisi cellulare e la rimozione dei residui cellulari [92].

2.7.2 Metodi chimici

Acidi e Alkali

Sono utilizzati nei protocolli di decellularizzazione per solubilizzare i componenti citoplasmatici delle cellule e per rimuovere gli acidi nucleici come l'RNA e il DNA. Per esempio, l'acido acetico, l'acido paraacetico, l'acido idroclorico, l'acido sulfidrico e l'idrossido di ammonio possono efficacemente distruggere le membrane cellulari e gli organelli intracellulari [93, 94]. Queste sostanze sembrano conservare le fibre collagene del tessuto trattato, preservare la struttura e funzione dei fattori di crescita residenti nella MEC e mantenere le proprietà meccaniche dello scaffold biologico, però causano la dissociazione d'importanti molecole della MEC come i GAG.

Detergenti

I detergenti sono molecole che hanno regioni polari e non polari, che gli consentono di agire come surfactanti. Si distinguono in *ionici* e *non ionici*. La loro struttura permette di abbassare la tensione superficiale e di formare micelle ad una concentrazione specifica per ogni detergente (nota come concentrazione micellare critica, CMC) [95]. Questa facoltà permette di solubilizzare le molecole idrofobiche.

Detergenti *non ionici*.

Sono ampiamente impiegati per il loro blando effetto sulla struttura del tessuto. I detergenti non ionici distruggono le interazioni lipidi-lipidi e lipidi-proteine, ma lasciano intatte le interazioni proteine-proteine. Quindi le proteine all'interno di un tessuto dovrebbero conservare la loro conformazione funzionale anche dopo trattamento con queste sostanze [96]. Il Triton X 100 (tert-octylphenylpolyoxyethylen) è il detergente non ionico più studiato. La decellularizzazione di tessuti con questo composto ha mostrato risultati variabili. Quando usato per decellularizzare valvole cardiache sono stati osservati la completa rimozione del materiale nucleare e la preservazione della struttura valvolare dopo 24h. L'analisi dei componenti della MEC mostrò però la completa perdita dei GAGs e un decremento del contenuto di laminina e fibronectina [33]. In esperimenti in cui il Triton X 100 veniva utilizzato per 24h a 4 °C per decellularizzare il PB si osservarono una incompleta rimozione cellulare, con la conservazione del collagene e dell'elastina e gradi diversi di estrazione dei GAG. Le proprietà meccaniche del tessuto erano conservate [15]. In altri casi si riuscì a decellularizzare completamente il PB ma si osservò una riduzione del 60% del contenuto di GAG, con conservazione delle fibre collagene e delle loro proprietà tensili [97]. Se usato a temperatura ambiente sempre su PB, altri lavori mostrarono una incompleta decellularizzazione e danni alla MEC [98]. Il Triton X 100 può essere quindi un metodo effettivo di decellularizzazione, ma la sua efficacia dipende dal tessuto che viene trattato e dai metodi a cui è associato.

Detergenti *ionici*.

Sono efficaci nella solubilizzazione sia della membrana cellulare che della membrana nucleare, ma tendono a denaturare le proteine distruggendo le interazioni proteina-proteina [96]. I detergenti ionici più utilizzati sono il sodio-dodecil-solfato (SDS), il sodio deossicolato (SD) e il sodio colato (SC). L'SDS rispetto agli altri detergenti, ottiene una migliore rimozione dei residui nucleari e delle proteine citoplasmatiche come la vimentina [99], ma tende a distruggere la struttura del tessuto nativo causando una riduzione della concentrazione dei GAGs e perdita di integrità del collagene. Questo danno provocato alla matrice potrebbe impedire una successiva ricellulariz-

zazione dello scaffold [91]. Quando utilizzato per decellularizzare Pericardio umano, l' SDS allo 0,1% portò una completa decellularizzazione senza danno alla MEC: la micro-architettura di fibre collagene, il contenuto di GAG e proteine strutturali erano conservate. Inoltre, non ci fu evidenza di citotossicità una volta seminati fibroblasti di derma umano [84]. Le differenze in questi risultati potrebbero essere dovute agli altri componenti utilizzati nelle procedure, come gli inibitori di proteasi o al diverso tessuto impiegato [100].

L' SD e il SC sono acidi biliari, carichi negativamente e non coniugati. Sono meno potenti rispetto agli altri detergenti ionici e quindi sono meno denaturanti e capaci di preservare meglio l'ultrastruttura delle TEHVs [96]. L' SD è stato ampiamente utilizzato in vari protocolli di decellularizzazione. Si è dimostrato efficace nella decellularizzazione di valvole aortiche porcine, e nel mantenimento della struttura della MEC. Inoltre queste valvole sono state efficacemente ripopolate da cellule progenitrici endoteliali che si mantenevano vitali e adese anche dopo 8 giorni di coltura [101]. Anche sul PB, la decellularizzazione del tessuto è stata raggiunta con successo [98]. L' SC è stato usato in combinazione con il Triton X 100 nel protocollo di decellularizzazione denominato TRICOL [102]. Questa tecnica associa il Triton, al SC, e prevede l' utilizzo di soluzioni ipo/ipertoniche e la rimozione degli acidi nucleici con una endonucleasi aspecifica. Nella decellularizzazione di valvole porcine aortiche e polmonari ha raggiunto una completa decellularizzazione, senza significativi cambiamenti nelle proprietà meccaniche valvolari. Sembra però determinare una riduzione dello spessore valvolare e un certo grado di perdita di componenti dei GAGs, uronato ed esosammine. Queste alterazioni potrebbero essere dovute alla presenza del Triton nel protocollo, dato che risultati simili sono stati riportati con l' utilizzo di quest' ultimo detergente [102]. Lembi valvolari polmonari umani e porcini decellularizzati con il metodo TRICOL furono ripopolati con cellule mesenchimali del midollo con successiva differenziazione in VICs [103].

Detergenti *Zwitterionici* Presentano le proprietà sia dei detergenti ionici sia di quelli non ionici. I detergenti Zwitterionici hanno una maggiore tendenza a denaturare le proteine rispetto a quelli non ionici. Fanno parte di questa categoria: il 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), studiato per la decellularizzazione dei vasi sanguigni; il sulfobetaine-10 (SB-10) e il sulfobetaine-16 (SB-16), che sono stati utilizzati per la decellularizzazione dei nervi [104]. Il tessuto arterioso trattato con CHAPS presenta una normale morfologia del collagene e dell' elastina all' esame istologico. Inoltre, il contenuto di collagene sembra rimanere simile a quello dell' arteria nativa. Questo trattamento determina una riduzione significativa della pressione di rottura e dello stress massimo del tessuto arterioso. Tale decremento, però, è comparabile a quello ottenuto con Triton X 100 e con soluzioni

ipotoniche/ipertoniche [104] .

Soluzioni Ipotoniche e Iperotoniche

Per aumentare l'azione dei detergenti, soluzioni ipotoniche e/o ipertoniche possono essere incorporate nei metodi di decellularizzazione. L'immersione in una soluzione ipotonica (dove la concentrazione dei soluti è minore di quella nel citoplasma cellulare) causa un rigonfiamento delle cellule e la loro successiva rottura. Processo conosciuto come lisi osmotica. Il rigonfiamento indotto dal movimento dell'acqua all'interno delle cellule può anche aumentare l'"assorbimento" del detergente nella membrana cellulare.

L'immersione in soluzione ipertonica (dove la concentrazione di soluto è più elevata di quella nel citoplasma) ha l'effetto opposto. L'acqua si muove all'esterno delle cellule nella soluzione circostante, causando la loro disidratazione e contrazione. Il risultato è la morte cellulare e il distacco dalla matrice [105]. Questo metodo, però, non è in grado di rimuovere i residui cellulari dal tessuto e i residui di DNA che, a causa della loro tendenza ad essere "appiccicosi", tendono ad aderire alle proteine della MEC. Si rende per cui necessaria l'associazione di ulteriori trattamenti enzimatici o chimici [104].

Agenti chelanti

Gli agenti chelanti, come l'EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), formano un complesso molecolare a forma di anello che lega saldamente e isola uno ione metallico al centro. È stato dimostrato che i cationi divalenti, come Ca^{2+} e Mg^{2+} , sono necessari per l'adesione delle cellule al collagene e alla fibronectina in corrispondenza della sequenza proteica RGD (Arg-Gly-Asp) [106]. Questi agenti facilitano quindi, la rimozione del materiale cellulare dal tessuto. L'EDTA è tipicamente usato in combinazione con la tripsina.

2.7.3 Metodi enzimatici

Tripsina

Le tecniche enzimatiche di decellularizzazione includono la digestione con proteasi e nucleasi [107]. La Tripsina è uno degli enzimi proteolitici più comunemente utilizzati. Il suo meccanismo di azione è il taglio delle proteine al c-terminale dei residui di lisina e arginina nel caso in cui l'amminoacido successivo non sia una prolina. E' in grado di rompere i legami tra le cellule che popolano la MEC, facilitandone il distacco e di distruggere i legami tra i vari componenti della matrice, creando così una struttura più aperta e favorendo il washout cellulare [108]. La tripsina è stata estesamente testata, ma

si è dimostrata ripetutamente incapace di una completa decellularizzazione e causa di un danno significativo alla MEC [109, 33]. Si deve fare molta attenzione all'uso di questo enzima per evitare un danno eccessivo alla struttura e alla biomeccanica della funzione valvolare [37].

Nucleasi

Le nucleasi si distinguono in 2 gruppi: le endonucleasi e le esonucleasi. Le prime catalizzano l'idrolisi dei legami interni della catena di ribonucleotidi o deossi-ribonucleotidi mentre le esonucleasi ne catalizzano l'idrolisi dei legami terminali. Entrambi i tipi di nucleasi determinano la degradazione del RNA e del DNA. Dato che gli acidi nucleici sembrano agire da siti di calcificazione e sembrano contribuire al prematuro fallimento della protesi, nei protocolli di decellularizzazione sarebbe opportuno l'utilizzo delle nucleasi in associazione agli altri agenti decellularizzanti [110, 109, 102, 103].

Inibitori di Proteasi

Durante i protocolli di decellularizzazione numerose proteasi possono essere rilasciate dalle cellule lisate e danneggiare l'ultrastruttura della MEC nativa dello scaffold. Questo danno può determinare delle alterazioni nel comportamento meccanico/emodinamico e nel potenziale di ripopolamento delle valvole [111, 92]. Per questa ragione, si aggiungono gli inibitori delle proteasi alle soluzioni in cui è immerso il tessuto. Anche l'utilizzo di una soluzione tampone a pH 7-8, il controllo della temperatura e del tempo di esposizione alle soluzioni di lisi cellulare, possono limitare/inibire l'attività delle proteasi cellulari. Alcuni esempi di inibitori di proteasi attualmente impiegati sono:

- gli antagonisti reversibili e competitivi delle serin-proteasi, quali aprotonina [100, 111], benzamidina (BA) e phenylmethanesulfonyl (PMSF) [102, 112]
- gli inibitori delle cistein-proteasi (che alchilano i residui di cisteina prevenendo la loro digestione), quali iodoacetamide (IA) e N-Ethylmaleimide (NEM) [103]

2.8 Ricellularizzazione degli Scaffold

Dopo la procedura di decellularizzazione, nella TEHV l'approccio ideale è quello di ripopolare lo scaffold biologico tridimensionale, in modo da rendere il costrutto vitale, capace di crescere e rinnovarsi. Il tipo cellulare più

adatto per il ripopolamento dovrebbe essere in grado di proliferare, di auto-rinnovarsi e di dare origine all'insieme eterogeneo di tipi cellulari necessario per formare un tessuto/organo funzionale. Solo in rari casi, però, è possibile isolare tipi cellulari differenziati organo-specifici, espanderli in vitro e utilizzarli per la ricellularizzazione dello scaffold. Nelle altre situazioni devono essere valutate altre fonti cellulari che comprendono cellule autologhe o cellule allogeniche, cellule somatiche o cellule staminali [113, 73]. Le caratteristiche della semina cellulare (via, tempistica, dose) dipenderanno dal tipo di cellule scelto e dall'obiettivo finale che si desidera ottenere [113].

2.8.1 Metodi di ricellularizzazione

Esistono due approcci essenziali per il ripopolamento di uno scaffold, biodegradabile o decellularizzato:

1. l'approccio tradizionale, cioè la *semina in-vitro*
2. l'approccio della rigenerazione tissutale guidata (*Tissue Guided Regeneration*)

Fig. 2.18

Semina in Vitro

L'approccio classico della TE prevede la pre-semina in vitro (prima dell'impianto in vivo) dello scaffold sviluppato, con il tipo cellulare prescelto. Le cellule vengono seminate sullo scaffold in presenza di segnali maturativi appropriati che includono fattori di crescita e citochine, in modo da favorire l'attecchimento e la proliferazione. Lo scaffold seminato viene quindi introdotto all'interno di un bioreattore per favorire la formazione di tessuto, la sua organizzazione e funzione. Il bioreattore espone il tessuto in via di sviluppo ad un condizionamento meccanico, attraverso un cambiamento ciclico nel flusso e nella pressione che mima le condizioni fisiologiche. Nel caso delle valvole cardiache, vengono riprodotte le condizioni fisiologiche caratteristiche dell'ambiente cardiocircolatorio. In particolare lo shear stress, cui sono sottoposte le cellule in vivo, sembrerebbe rappresentare uno stimolo critico anche durante la coltura cellulare in bioreattore. Il protocollo ottimale di condizionamento dipende ovviamente, da numerosi parametri come la responsività del fenotipo cellulare agli stimoli meccanici, il modo in cui questi vengono trasferiti alle cellule, lo scaffold utilizzato, la sua grandezza e il tipo di stimolazione meccanica. A questo condizionamento, segue l'impianto del costruito ingegnerizzato in vivo, dove il tessuto dovrebbe crescere e rimodellarsi [73]. L'utilizzo di un allograft polmonare decellularizzato seminato con

cellule autologhe e condizionato in un bioreattore ha avuto successo. L'allograft è stato usato per la ricostruzione del tratto di efflusso ventricolare destro in un adulto ed ad un anno dall'intervento, le cellule endoteliali erano ancora presenti, non c'era nè calcificazione, nè trombogenesi e la funzionalità meccanica era mantenuta [114]

Tissue Guided Regeneration

Questo approccio prevede l'impianto in vivo di uno scaffold non seminato, che contenga tutte le informazioni biologiche necessarie ad indurre l'entrata in circolo e attrarre le cellule progenitrici endogene circolanti (potenzialmente sia endoteliali sia mesenchimali) o quelle del tessuto circostante. Queste cellule del ricevente dovrebbero poi essere in grado di invadere lo scaffold e di differenziarsi nei fenotipi cellulari nativi, ripopolandolo completamente Fig. 2.19. In questo caso è l'organismo del ricevente a fungere da bioreattore, con segnali biomeccanici e citochinici endogeni. L'assenza di cellule pre-seminate minimizza e semplifica il processo di fabbricazione di una TEHV [73]. L'approccio della *Tissue Guided Regeneration* ha mostrato dei successi nel modello animale [115]. Una potenziale strategia per attrarre le cellule circolanti del ricevente, come le cellule progenitrici endoteliali EPC, è quella di ricoprire lo scaffold con delle molecole segnale appropriate per le cellule in modo da incoraggiare la loro adesione e il differenziamento. E' stato eseguito, per esempio, un esperimento utilizzando una valvola porcina aortica decellularizzata contenente fibronectina e fattore di crescita per gli epatociti ed è stato ottenuto un reclutamento di cellule progenitrici endoteliali e il rivestimento del graft [116].

Nonostante i promettenti risultati in modelli animali utilizzando come scaffolds xenografts decellularizzati [117], il passaggio all'uso clinico in pazienti ha avuto numerose difficoltà. Emblematico è stato il caso della valvola porcina decellularizzata SynergraftTM, prodotta da CryoLife Inc, USA Fig. 2.20.

Synergraft fu utilizzata nell'intervento di Ross per sostituire la valvola polmonare, in una popolazione pediatrica di 4 pazienti. La valvola non era stata pre-seminata né condizionata in un bioreattore prima dell'impianto, nella speranza che lo scaffold fosse in grado di attrarre le cellule endogene. Le valvole dimostrarono però un alto grado di fallimento, l'esame di quelle espianate post-failure rivelò una decellularizzazione incompleta, un mancato ripopolamento valvolare, una mancata endotelizzazione, una severa infiammazione con infiltrazione di neutrofili e macrofagi, formazione di panno fibroso, calcificazione e una severa degenerazione dei lembi e della parete [118]. Sembra che la causa del failure valvolare sia stata una risposta immunitaria iperacuta, con un'intensa reazione flogistica e conseguente cedimento strutturale valvolare [37].

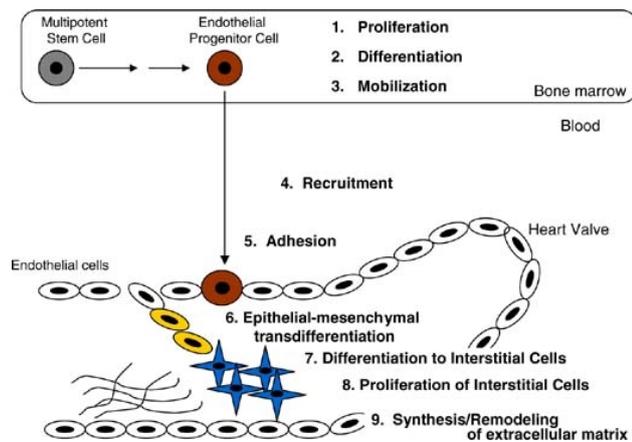


Figura 2.19: *Ipotesi rappresentativa per il ripopolamento di una valvola cardiaca ingegnerizzata da cellule endogene. I processi chiave comprendono la proliferazione, il differenziamento e la mobilitazione di cellule progenitrici endoteliali circolanti dal midollo osseo, a cui segue il passaggio nel sangue e l'adesione alla valvola. Successivamente, le cellule reclutate possono transdifferenziare in cellule mesenchimali e infine in cellule interstiziali che sintetizzano e rimodellano la MEC [73]*

2.8.2 Cellule per la TEHV

Per ripopolare la matrice delle valvole cardiache ingegnerizzate *in-vitro* esistono diverse fonti cellulari e diversi tipi cellulari. Queste comprendono cellule differenziate tessuto-specifiche (come le cellule endoteliali e/o le cellule muscolari lisce) e cellule staminali, che possono essere autologhe o allogene. Le cellule parenchimali, cioè la tipologia di cellule responsabile della funzione specifica dell'organo, sono strettamente necessarie. In aggiunta, le cellule non-parenchimali come i fibroblasti e le cellule endoteliali aumentano il fenotipo funzionale delle cellule parenchimali e contribuiscono all'organizzazione dell'architettura cellulare del tessuto [119]. Questo tipo di cellule sono comunemente utilizzate nella TE e nella TEHV. Le cellule endoteliali sono necessarie a creare una barriera antitrombotica per la matrice decellularizzata [120, 121, 122] ed assicurano che il flusso sanguigno in vivo sia confinato allo spazio vascolare e che le cellule parenchimali siano protette dallo shear stress [123]. Per quanto riguarda le valvole cardiache decellularizzate, la trombosi potrebbe essere un problema maggiormente affrontabile, in quanto dopo il trapianto in vivo solo la superficie più esterna della struttura è a contatto con il sangue [124, 125].

Un'altro tipo di cellule non-parenchimali importanti nella TE sono i fi-



Figura 2.20: Valvola Synergraft (www.cryolife.com)

broblasti, i quali secernono e rimodellano la MEC ed aumentano la funzione cellulare parenchimale in cocoltura. Nella TEHV sono stati utilizzati in associazione con cellule endoteliali e mesenchimali [120, 126].

2.8.3 Biofunzionalizzazione dei biomateriali per il ripopolamento cellulare *in-situ*

Nella TE avere a disposizione dei materiali che promuovono l'adesione cellulare *in-situ* degli impianti cardiovascolari, comprese le protesi valvolari cardiache, è altamente desiderabile. Questo consentirebbe di creare degli scaffold che se seminati *in-vitro* o direttamente impiantati *in-vivo* sono in grado di venire ripopolati con più efficacia dalle cellule (per esempio cellule endoteliali, o fibroblastiche o VICs) [127].

L'assorbimento di proteine e la conseguente adesione delle cellule in risposta a un materiale estraneo impiantato è determinata da una varietà di proprietà del materiale. Queste proprietà includono la chimica di superficie, la topografia, l'elasticità meccanica micro e macro. Le proprietà di superficie del materiale possono tuttavia, essere modificate dal punto di vista fisico e chimico e le superfici biofunzionalizzate, per promuovere le interazioni proteiche e cellulari. Le cellule sono infatti intrinsecamente sensibili agli stimoli fisici, chimici e biochimici che provengono dall'ambiente circostante in cui si trovano. In vivo, sono a stretto contatto con la MEC, la quale è formata da una complessa connessione di proteine, glicoproteine e proteoglicani. La MEC provvede, non solo a un sostegno strutturale ma contiene anche una riserva di motivi-segnale per le cellule e di fattori di crescita che

ne guidano l'adesione e il comportamento. L'ambiente "locale" o nicchia, provvede a stimoli locali che determinano il reclutamento selettivo cellulare, la proliferazione, il differenziamento e la produzione di numerose proteine necessarie per l'organizzazione gerarchica tissutale [128]. Esistono un gran numero di composizioni di MEC, ognuna delle quali contiene varie concentrazioni di macromolecole insolubili (proteine fibrillari, collagene e glicoproteine per esempio) le quali interagiscono con le proteine della superficie cellulare e macromolecole solubili come i fattori di crescita. L'organizzazione, la densità, la geometria spaziale e la biochimica di questi composti della MEC determinano la resistenza meccanica, la risposta cellulare e l'organizzazione tissutale [129]. L'uso di scaffold acellulari xenogenici come le radici aortiche porcine nella TEHV, potrebbe costituire un vantaggio anche per il ripopolamento e l'organizzazione cellulare in forza del fatto che queste matrici hanno un'organizzazione della MEC assimilabile a quella delle corrispondenti valvole umane. Il trattamento di questi costrutti con molecole bioattive, sembra però avvantaggiare significativamente l'adesione cellulare [116]. Per quanto concerne il nostro ambito di studio e sperimentazione, possiamo concentrare l'attenzione sui *Peptidi* e in particolare sui domini funzionali dei componenti della MEC, quali molecole utilizzate per gli scopi descritti sopra.

Varie sequenze peptidiche della MEC, che hanno dimostrato di influenzare il comportamento cellulare, sono state isolate e "legate" ai materiali per la TE, per aumentare le loro proprietà biologiche. Alcuni esempi sono le sequenze RGD e GRGDSP derivate dalla fibronectina, le sequenze di riconoscimento derivate dalla laminina e dal collagene I [130]. Tra i peptidi studiati, il peptide RGD è forse quello più utilizzato negli studi sui biomateriali [130, 131, 132] anche nell'ambito della TEHV [133].

Oltre che alle sequenze peptidiche possono essere utilizzati anche polimeri naturali come quelli derivati dalla MEC. Il collagene, la fibronectina, la laminina e la vitronectina hanno mostrato di facilitare l'adesione cellulare grazie ai loro siti di riconoscimento intrinseci riconosciuti dalle integrine cellulari [134]. Queste componenti della MEC o le loro parti funzionali sono ottenute come estratti naturali e proteine adesive purificate, oligopeptidi di sintesi o proteine ricombinanti geneticamente ingegnerizzate. Vi sono però degli effetti indesiderati che coinvolgono gli estratti naturali e le proteine adesive purificate, come la risposta immunitaria, il rischio di infezione, la purezza e la complessità strutturale. La sintesi di oligopeptidi è considerata una soluzione per evitare questi problemi [127]. I peptidi possono avere molti vantaggi rispetto alle proteine naturali più grandi. Per esempio la fibronectina (una proteina che contiene naturalmente la sequenza RGD) nonostante la sua affinità per il legame con le cellule endoteliali, ha mostrato di attivare le piastrine, mentre la proteina ricombinante di fusione-RGD ha



Figura 2.21: *CryoValve SGTM* (www.cryolife.com)

mostrato di favorire l'adesione cellulare e di inibire l'attivazione piastrinica [127]. Nonostante la loro ampia applicazione e i benefici, è stato però anche mostrato che alcuni oligopeptidi hanno una bassa attività comparata con i ligandi nativi, dovuta all'assenza di domini complementari o regolatori ed amminoacidi in siti lontani dal dominio di legame delle cellule [135]. Inoltre, il peptide RGDS, testato in coltura con cellule VICs ha mostrato di favorire fenomeni di calcificazione [136]. L'ingegneria genetica delle proteine ricombinanti elimina molte di queste problematiche e fornisce delle opzioni migliori per l'incorporazione di proteine che contengano il sito di legame completo per le cellule.

2.9 Valvole ingegnerizzate in commercio

CryoValve SGTM (prodotta da CryoLife Inc. USA)

Dopo il fallimento della protesi SynergraftTM e il suo ritiro dal commercio, è stato introdotto il modello CryoValve SGTM Fig. 2.21, che rappresenta il primo allograft valvolare polmonare umano decellularizzato in commercio, con approvazione FDA. SynerGraft (SG) è il nome del processo decellularizzante che viene attuato. Viene praticata una lisi ipotonica degli elementi cellulari, seguita da una digestione degli acidi nucleici, seguita da dei lavaggi sequenziali per eliminare i detriti cellulari. Il processo rimuove più del 99% delle cellule e degli acidi nucleici dalla MEC. La valvola sembra possedere buone proprietà meccaniche ed idrodinamiche in vitro, confermate anche dal suo uso clinico. Inoltre non si è verificata una risposta immune versus il graft dopo l'impianto [37]. Le indicazioni al suo uso clinico sono: la sostituzione della valvola polmonare o di una protesi in questa sede quando danneggiata, malformata o malfunzionante. In certe situazioni può anche essere utilizzata per sostituire la valvola polmonare nativa, durante l'intervento di Ross.



Figura 2.22: A e B: *Matrix PTM*. C: *Matrix P plusTM* (www.autotissue.de)

Matrix PTM, *Matrix P PlusTM* e *Matrix P Plus N* (prodotte da AutoTissue-Germany).

Matrix PTM Fig 2.22 è una valvola porcina decellurizzata, sviluppata impiegando un procedimento brevettato che prevede l'impiego dell'acido deossicolico all'1% v/v come detergente. Il trattamento conserva la MEC che contiene esclusivamente collagene ed elastina [114]. L'impianto del prodotto ingegnerizzato nel modello animale ovino, dopo 6 mesi, non ha dato riscontro di alcun focolaio di calcificazione e ha rivelato una buona emodinamica, proprietà biomeccaniche conservate e un iniziale ripopolamento cellulare del costruito (con fibroblasti e uno strato continuo di endotelio) [137]. *Matrix P PlusTM* è stata impiantata in 16 pazienti, nel periodo compreso tra luglio 2007 e dicembre 2008, nel tratto di efflusso ventricolare destro per curare patologie collegate a difetti cardiaci congeniti. Dopo un periodo medio di 10 mesi, 6 pazienti hanno subito un reintervento a causa della ostruzione del graft. Nei condotti espianati, è stato evidenziato un restringimento periferico del condotto senza calcificazione dei lembi valvolari. Le analisi istologiche hanno mostrato formazioni stenotiche causate da infiltrati infiammatori e da una severa reazione fibrogenica pseudo-intimale. In base a questi risultati a breve termine, la valvola polmonare decellularizzata *Matrix P PlusTM*, non può essere considerata come un sostituto ideale per la ricostruzione del tratto di efflusso ventricolare destro, poichè il suo largo utilizzo può incrementare la possibilità di frequenti fallimenti precoci del condotto [108].

Matrix P Plus N (Fig. 2.22) è invece la prima valvola polmonare acellulare con un patch di pericardio equino a sua volta decellularizzato. E' indicata in caso di correzione di cardiopatie congenite complesse.

Capitolo 3

Materiale e Metodi

3.1 Isolamento e coltura di fibroblasti da Pericardio Bovino (PB) (Pericardiociti)

Al macello locale è stato prelevato il PB dissezionandolo direttamente dal cuore dell'animale da poco macellato. L'isolamento è avvenuto con l'utilizzo di strumenti chirurgici sterili e il tessuto è stato immerso in Phosphate Buffered Saline (PBS) sterile fino all'arrivo in laboratorio. Qui sono avvenuti i seguenti passaggi:

- è stato eliminato il tessuto adiposo dalla superficie fibrosa del pericardio
- sono stati isolati 10 frammenti di tessuto delle dimensioni di 2cm circa di lato, successivamente trasferiti in pozzetti di piastre 6wells non tissue-culture (FalconTM) contenenti PBS sterile
- tolto il PBS, in ogni pozzetto è stato aggiunto 1ml di soluzione di Collagenasi II 2mg/ml in terreno DMEM Hepes Modification
- le piastre sono state messe in incubatore a 37 °C per 8 minuti, poi, ogni pozzetto trattato con 3ml di DMEM-Hepes Modification contenente il 15% di FBS per bloccare l'azione della Collagenasi II
- sono state eliminate le cellule mesoteliali dalla superficie sierosa utilizzando uno scraper. Ogni pezzo è stato trasferito su piastre Petri cell culture adagiando la superficie sierosa verso il fondo della piastra e tagliando il quadrato di tessuto in piccoli pezzi di circa 3 mm di lato
- sono stati aggiunti 2ml di terreno DMEM-Hepes Modification contenente il 15% di FBS, l'1% di Penicillina-streptomica e l'1% di Glutammina. Le piastre sono state poste in incubatore.

- una volta al giorno sono state esaminate al microscopio per vedere se i fibroblasti erano migrati sulla piastra. Quando circa il 50% della superficie della piastra era ricoperta di cellule, sono stati tolti i pezzetti di pericardio ed è stato cambiato il terreno di coltura
- le cellule sono state divise quando erano a confluenza e mantenute in coltura fino al III, IV passaggio, dopo di che congelate in azoto liquido fino al loro utilizzo
- per le semine dei pericardiociti su PB, le cellule sono state scongelate e coltivate in MEM- α , 10% FBS, 1% Glutamina, 1% Pen-Strep

3.2 Decellularizzazione del PB

Il prelievo del PB è avvenuto con la stessa procedura vista nella sezione precedente. Per i protocolli di decellularizzazione TRICOL, UTRIDOC E TRITDOC sono stati isolati dei tondini di tessuto del diametro di 1,5 cm. Tutte le soluzioni utilizzate nei vari passaggi dei protocolli sono state rese sterili con filtrazione su membrane NalgeneTM con pori di dimensioni di 0,22 μm , degasate sotto vuoto e flussate con azoto. Tutte le manipolazioni sia dei campioni sia delle soluzioni sono avvenute sempre in condizioni di sterilità, sotto cappa a flusso laminare. Prima di iniziare la decellularizzazione, i campioni di pericardio sono stati lasciati equilibrare in PBS sotto agitazione a 4 °C per 30 minuti. La decellularizzazione è avvenuta attraverso i seguenti passaggi:

- I STEP: trattamento ipotonico in presenza di Dimetilsolfossido (DMSO) e inibitori di proteasi. I campioni sono stati posti all'interno di tubi da 50 ml sospesi in una soluzione contenente 10% di tampone madre A (costituito da Ascorbato di Sodio 10 mM, EDTA 5 mM e NaN_3 0,04% w/v in PBS a pH fisiologico di 7,4), 10% DMSO, inibitori di proteasi (6,25 mM Benzamidina (Sigma–Aldrich), 1,25 mM Iodoacetamide (Fluka), 2,5 mM PMSF (Fluka) e 2,5 mM NEM (Fluka)) e acqua distillata per portare a volume la soluzione. I tubi sono stati posti a 4 °C per 8 ore su agitatore orbitale, per un'agitazione delicata della soluzione di sospensione. Segue la risospensione e la permanenza dei campioni a 4 °C per 8 ore in soluzione ipotonica, contenente 10% di TmA, senza DMSO e inibitori di proteasi.

Per i campioni trattati con il protocollo UTRIDOC, è stato effettuato un trattamento con una soluzione contenente il 10% di tampone madre A, lo 0,04% di NaN_3 , UREA 0,9 M e acqua distillata, a temperatura

ambiente per un'ora. A questo passaggio è seguito il lavaggio dei campioni con una soluzione al 10% di tampone madre A in PBS per 30 minuti.

- II STEP: estrazione dei detriti cellulari con detergente Triton X-100. I campioni sono stati sospesi in una soluzione contenente 10% di TmA, inibitori di protasi (come sopra) e 1% (v/v) Triton X-100 e lasciati in agitazione a 4 °C per 8 ore. Poi, sono stati risospesi in TmA contenente 0,1% Triton X-100, in assenza di inibitori di proteasi e messi in agitazione a 4 °C per 8 ore. I preparati sono stati quindi sospesi in soluzione ipertonica contenente NaCl 0,5M e 0,1% Triton X-100 disciolti in PBS e mantenuti in agitazione a 4 °C. Questo trattamento è stato ripetuto 2 volte, per una durata di 8 ore ciascuna. I campioni sono quindi stati sospesi in TmA con 0,1% Triton X-100, in agitazione a 4 °C per 1,5 ore. Questo lavaggio è stato ripetuto una seconda volta con 0,1% Triton X-100, disciolto però in PBS, in agitazione a temperatura ambiente per 1,5 ore.
- III STEP: estrazione dei detriti cellulari con Colato, Deossicolato o TauroDeossicolato di sodio. I campioni sono stati sospesi in una soluzione contenente 10% TmA con 4 mM TDOC disciolto in PBS, a pH 7,4. Questo step è stato ripetuto 2 volte a temperatura ambiente, al buio, sotto agitazione, per 8 ore ciascuna.
- IV STEP: lavaggi finali, per rimuovere i detersivi e i residui di matrice. Lavaggio in PBS sterile, sotto agitazione a temperatura ambiente, per 1,5 ore; Lavaggio in PBS sterile, sotto agitazione a 4 °C, per 1,5 ore; Lavaggio in soluzione fisiologica sterile (0,9% NaCl), sotto agitazione a 4 °C, per 30 minuti; Lavaggio in 10% (v/v) isopropanolo, disciolto in soluzione fisiologica, sotto agitazione a 4 °C, per 1 ora. Questo lavaggio è stato ripetuto due volte. I campioni sono stati conservati in PBS, a 4 °C.
- V STEP: digestione degli acidi nucleici con endonucleasi. I campioni sono stati trattati con 50 mM Tris-HCl e 1 mM MgCl₂ disciolti in acqua distillata e posti sotto agitazione a 4 °C per 12 ore. Segue il trattamento con BenzonasiTM (Novagen) 330 U/ml, disciolta in 50 mM Tris-HCl e 1 mM MgCl₂, come riportato sulle istruzioni del produttore. Questo trattamento è stato ripetuto due volte, sotto agitazione a 37 °C per 24 ore ciascuna. I campioni sono quindi stati lavati due volte con PBS sterile a 4 °C, sotto agitazione per 24 ore ciascuno, in modo da as-

sicurare la rimozione completa dei residui enzimatici. Infine, i preparati sono conservati in PBS sterile a 4 °C, fino ad ulteriore utilizzo.

3.3 Coltura di Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)

Visti i risultati positivi delle semine cellulari con Pericardiociti e le finalità dell'Ingegneria Tissutale (descritte nella sezione 2.6 dell'introduzione), si è deciso di continuare utilizzando cellule endoteliali di origine umana. Nello specifico si sono utilizzate le cellule HUVEC. Le cellule HUVEC primarie da cui sono derivate quelle impiegate negli esperimenti, sono state fornite dal laboratorio del Prof. Parnigotto. Sono state coltivate in terreno EGM[®]-2 (Lonza) su piastre Tissue Culture (TC).

In breve, la procedura è stata la seguente:

- le cellule congelate in azoto liquido in tubi da 2 ml sono state scongelate rapidamente in bagnetto a 37 °C
- sono state risospese in 10 ml di terreno EGM[®]-2 e centrifugate a rpm per 5 minuti
- eliminato il surnatante, sono state nuovamente portate in sospensione in 2 ml di terreno EGM[®]-2 e trasferite in fiasche TC
- è stata aggiunta una quantità di terreno di coltura adeguata alle dimensioni della fiasca e sono state trasferite in incubatore a 37 °C, 5% CO²
- il terreno EGM[®]-2 è stato cambiato ogni 2 giorni e le cellule sono state divise quando raggiungevano l'80% circa della confluenza

3.4 Semina Pericardiociti e HUVEC sul PB decellularizzato

1. Dopo il procedimento di decellularizzazione i dischetti di pericardio sono stati posti in pozzetti di piastre da 24 wells non TC e ricoperti con una soluzione di terreno MEM- α (per i Pericardiociti) ed EGM[®]-2 (per le cellule HUVEC) contenente i seguenti antibiotici:

- Fungizone: 2,5 μ g/ml

- Cafazolina: 240 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 - Vancomicina: 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 - Lincocina: 0,15 $\mu\text{g}/\text{ml}$
2. Le piastre sono state messe in incubatore e la soluzione è stata sostituita con soluzione fresca ogni 24h per quattro giorni consecutivi. Al quinto giorno è stata sostituita con terreno MEM- α o EBM[®]-2 e le piastre messe in incubatore per altre 24h per verificare l'assenza di contaminazioni batteriche e/o fungine. Sopra i dischetti di PB sono stati posti degli appositi anelli in plastica in modo che rimanessero il più possibile a contatto con il fondo del pozzetto
 3. Le cellule da seminare (precedentemente messe in coltura) sono state staccate dalle piastre di semina, contate con la camera di Burker e seminate alla densità desiderata in 700 μl di terreno di coltura
 4. Se il tempo di semina era sufficientemente lungo, dopo 30 minuti ai pozzetti è stato aggiunto 1 ml di terreno di coltura e le piastre nuovamente riposte in incubatore
 5. Trascorso il tempo di semina previsto il terreno è stato eliminato, è stato fatto un risciacquo con PBS contenente calcio e magnesio e i dischetti sono stati inclusi in paraffina o congelati in OCT o trattati per i test Landegren ed MTT.

3.5 Funzionalizzazione di scaffolds pericardici bovini UTRIDOC con un peptide proadesivo RGD di sintesi

I dischetti di PB UTRIDOC sono stati liofilizzati e seccati sotto vuoto con P_2O_5 per un ora e 30 minuti e successivamente pesati. I campioni di controllo sono stati conservati in freezer a $-20\text{ }^\circ\text{C}$, mentre gli altri campioni funzionalizzati con il peptide secondo il seguente protocollo:

- trattamento con una soluzione 1 mg/0,5 ml di peptide per 6 ore sotto agitazione
- liofilizzazione ed essiccazione sotto vuoto con P_2O_5 per 5 ore
- irradiazione per 2 ore con luce UV a 336 nm

- tre lavaggi con tampone fosfato di sodio 0,1M pH=8. Il primo lavaggio della durata di una notte (15-16 ore), gli altri due di 2 ore ciascuno
- un lavaggio di un ora con acqua deionizzata
- liofilizzazione e successiva essiccazione sotto vuoto con P_2O_5 per 5 ore

3.6 Test di Landegren

Dopo il risciacquo con PBS sono stati messi nei pozzetti 340 μ l di Reagente di Landegren composto da p-nitrofenolo-N-acetile- β -D-glucoseamminide (concentrazione di 7,5 mM in tampone citrato 0,1 M a pH 5) e TRITON X-100 allo 0,5% in acqua. Le piastre sono state incubate a 37 °C per 2h al 100% di umidità. Trascorso questo tempo sono stati aggiunti 510 μ l/pozzetto di Tampone di Glicina composto da Glicina 50 mM pH 10,4 ed EDTA 5mM, per fermare la reazione. Sono stati poi trasferiti 150 μ l della soluzione totale in pozzetti di piastre da 96wells non TC ed è stata letta l'Assorbanza (A) a 405 nm.

3.7 Test MTT

Dopo il risciacquo con PBS sono stati messi nei pozzetti 250 μ l di terreno EBM[®]-2 e 25 μ l di reagente MTT. Le piastre sono state trasferite in incubatore per 3,5h. Sono stati aggiunti 250 μ l di una soluzione composta da HCl/isopropanolo e disciolti i cristalli di formazano che si erano formati. Dal volume presente in ogni pozzetto sono stati trasferiti 210 μ l in corrispondenti pozzetti di una piastra da 96wells. E' stata misurata l'A a 540 nM e 670 nM. Il valore di interesse finale è stato trovato sottraendo l'A dovuta ai residui cellulari e alla presenza del terreno di coltura (A_{540nm}), all'A delle cellule vitali (A_{670nm}).

3.8 Inclusione del tessuto pericardico in Optimal Cutting Temperature medium (OCT)

I campioni di pericardio sono stati posti sul fondo di apposite vaschette di plastica e ricoperti con il mezzo di inclusione OCT (Bio-Optica). Le vaschette sono state immerse in isopentano freddo e messe a contatto con azoto liquido fino a che l'OCT è diventato bianco e solido. I blocchetti così formati sono

stati tolti dalle vaschette e conservati a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. I campioni inclusi in OCT sono stati tagliati al criostato in sezioni di $7\text{ }\mu\text{m}$.

3.9 Inclusione del tessuto pericardico in Paraffina

I campioni, decellularizzati e non, sono stati fissati in formalina 10% in tampone fosfato, e inclusi in paraffina secondo il seguente protocollo di inclusione eseguito presso l'Istituto di Anatomia Patologica:

1. fissazione in PFA (Paraformaldeide) 4% al buio, a temperatura ambiente, overnight
2. lavaggio in acqua corrente per almeno 8 ore od overnight
3. passaggio in etanolo 50% per 2 ore
4. passaggio in etanolo 75% per 2 ore
5. passaggio in etanolo 100% per 2 ore
6. passaggio in xilolo 100% per 3 ore
7. passaggio in paraffina liquida 100% per 5 ore, a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$
8. i campioni sono stati inseriti in una formella di ghisa e ricoperti da una colata di paraffina liquida
9. i campioni inclusi in paraffina, sono stati tagliati al microtomo in sezioni di $3\text{-}4\text{ }\mu\text{m}$
10. i vetrini con le sezioni sono stati messi in stufa a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$
11. i vetrini sono stati immersi in xilolo per 15 minuti e poi idratati in etanolo, in concentrazioni decrescenti (100%, 75%, 50%) e successivamente messi in acqua

3.10 Colorazione istologica con Ematossilina ed Eosina (H&E)

La colorazione delle sezioni di pericardio è stata eseguita secondo il seguente protocollo:

- lavaggio dei vetrini in PBS per 5 minuti
- lavaggio in acqua distillata per 2 minuti
- immersione in Ematossilina di Mayer per 10 minuti
- immersione in acqua di rubinetto per 10 volte
- immersione nel Reagente di Viraggio per 10 volte
- immersione in Eosina per 20 secondi
- disidratazione attraverso passaggi sequenziali in etanolo a concentrazioni crescenti (50%, 75%, 100%) e chiarificazione in xilolo 100%, per 1 minuto ciascuno
- montaggio del vetrino copri-oggetto con un balsamo montante

Le immagini sono state acquisite al Microscopio Ottico Leica DC 300.

3.11 Orientamento ed organizzazione delle fibre collagene: colorazione istologica con Picrosirius Red

La colorazione delle sezioni è stata eseguita presso l'Istituto di Anatomia Patologica, secondo il seguente protocollo:

- preparazione della soluzione madre all'1% di Picrosirius red (100 mg Sirius red, 100 mg acido picrico)
- diluizione della soluzione madre all'1% (Soluzione di Lavoro)
- immersione delle sezioni di tessuto nella Soluzione di Lavoro per 30 minuti
- disidratazione attraverso passaggi in etanolo a concentrazioni crescenti (50%, 75%, 100%) e xilolo 100%
- montaggio dei vetrini copri-oggetto con balsamo di montaggio

Le immagini sono state acquisite al Microscopio a luce polarizzata Leica LAS AF 6000.

3.12 Colorazione con DAPI

Il DAPI (4,6-diamidino-2phenylindole) è un colorante fluorescente che si lega agli acidi nucleici. I campioni sono stati colorati nel modo seguente:

- lavaggio delle sezione in PBS per 5 minuti per rimuovere i residui di OCT
- immersione in 2,5 μ l di DAPI 500 nM, disciolto in PBS, per 5 minuti al buio, sotto agitazione
- tre lavaggi in PBS sotto agitazione, al buio per 5 minuti ciascuna
- rimozione del liquido in eccesso dalle sezioni con carta assorbente
- montaggio del vetrino copri-oggetto con agente montante acquoso

I vetrini sono stati conservati al buio fino alla visione al Microscopio a Fluorescenza Leica DC 300F.

3.13 Semina di Pericardiociti e cellule HUVEC per Immunocitochimica (ICC)

La semina dei due tipi cellulari è avvenuta seguendo i seguenti passaggi:

1. vetrini di 3 cm di diametro sono stati posti sul fondo di piastre a 6 pozzetti non TC e trattati con una soluzione di Collagene I (Sigma) 10 μ l/1 ml di PBS con calcio e magnesio (PBS with), per 1 ora a 37 °C
2. la soluzione è stata aspirata ed è stato fatto un lavaggio con 2 ml di PBS with, a sua volta eliminato
3. le cellule sono state seminate nei pozzetti alla densità di 50mila cellule per cm². Per i pericardiociti è stato usato terreno di coltura MEM- α , 10% FBS, 1% Glutammina, 1% Pen-Strep. Per le cellule HUVEC terreno EBM[®]-2 completo. Le piastre sono state messe in incubatore per 2-3 giorni, fino a quando le cellule non ricoprivano circa l'80% della superficie del vetrino.
4. il terreno di coltura è stato aspirato dai pozzetti ed è stato fatto un lavaggio con PBS with. Per fissare le cellule ai vetrini sono stati aggiunti 2 ml di acetone per ogni pozzetto e le piastre sono state messe a -20 °C per 10 minuti

5. l'acetone è stato eliminato e sono stati fatti 3 lavaggi di 5 minuti ciascuno con PBS with. La marcatura con gli anticorpi coniugati con perossidasi è avvenuta secondo il protocollo riportato sotto. Le differenze nella procedura sono state che i vari passaggi sono avvenuti all'interno dei pozzetti delle piastre e che i vetrini con le cellule sono stati trasferiti su un vetrino portaoggetto al momento del montaggio

3.14 Immunoistochimica (IHC), ICC ed Immunofluorescenza (IF)

Il protocollo seguito è riportato di seguito:

1. i vetrini con le sezioni di tessuto pericardico sono stati posti in lavaggio con PBS per 5 minuti
2. gli *anticorpi (Ab) primari* sono stati diluiti alla concentrazione appropriata in una soluzione di Albumina Sierica Fetale (BSA) all'1% in PBS
3. gli Ab primari sono stati centrifugati a 13000 rpm in Eppendorfs minispin plus centrifuge per 2 minuti
4. i vetrini sono stati asciugati e le sezioni sono state ricoperte con la soluzione di Ab primario
5. i vetrini sono stati lasciati ad incubare a 37 °C, al buio, in camera umida, per un tempo compreso tra i 30 minuti e un'ora
6. sono stati eseguiti 3 lavaggi con PBS, di 5 minuti ciascuno
7. nel frattempo *gli Ab secondari* coniugati con la Perossidasi (per IHC ed IC) o con diversi Fluorofori (per IF) sono stati diluiti alla concentrazione appropriata in una soluzione di Albumina Sierica Fetale 1% (BSA) in PBS, siero bovino 1:100 v/v per le sezioni di pericardio bovino e con siero porcino 1:100 v/v per le sezioni di pericardio porcino
8. gli Ab secondari sono stati centrifugati a 13000 rpm per 2 minuti EGM®
9. i vetrini sono stati asciugati e le sezioni sono state ricoperte con la soluzione di Ab secondario
10. i vetrini sono stati incubati a 37 °C, al buio, in camera umida, per 30 minuti

11. sono stati eseguiti 3 lavaggi con PBS, di 5 minuti ciascuno
12. durante l'incubazione degli Ab secondari, 2 tavolette di AEC (AminoEtilCarbazolo) sono state sciolte in 5 ml di N-dimetilformamide (Carlo Erba) in un contenitore asciutto
13. sono stati preparati 95 ml di buffer acetato (Acido Acetico 0,2 N, Acetato di Sodio 0,2 M e Acqua Distillata) con 50 μ l di H₂O₂ al 30%. La reazione rimane attiva per circa 30 minuti. Questa soluzione è stata aggiunta a quella del punto precedente
14. i vetrini in cui le sezioni erano state trattate con anticorpi primari coniugati alla perossidasi, sono state incubate in questa soluzione per 5/10 minuti a temperatura ambiente, al buio
15. sono stati eseguiti 3 lavaggi in PBS, di 5 minuti
16. i nuclei sono stati contrastati con Ematossilina di Mayer per 2 minuti
17. le sezioni sono state lavate in acqua distillata e acqua di fonte per un minuto
18. i vetrini in cui gli anticorpi primari erano coniugati a fluorofori sono stati trattati per la colorazione con DAPI
19. in tutti i campioni sono stati montati i vetrini copri-oggetto con un agente montante acquoso

Le immagini sono state acquisite al Microscopio ottico Leica DC 300.

3.15 Prelievo del tessuto pericardico per determinazione delle proprietà fisiche

Il pericardio parietale di vitelli e suini è stato prelevato da animali di allevamento, immediatamente dopo il loro sacrificio. Prima dell'espianto del tessuto, con suture continue in Vycril 2,0 zeri, sono state evidenziate 4 aree d'interesse nella porzione di pericardio che riveste i 2 ventricoli, seguendo una mappatura anatomica che ricalca la suddivisione in ventricolo destro e sinistro (Vdx e Vsx), faccia anteriore e posteriore (ANT e POST) del cuore sottostante Fig 3.1. Le 4 aree anatomiche del tessuto pericardico così identificate sono denominate in base alla camera cardiaca che ricoprono:

- VdxANT, l'area che ricopre la faccia anteriore del ventricolo destro

- VsxANT, l'area che ricopre la faccia anteriore del ventricolo sinistro
- VdxPOST, l'area che ricopre la faccia posteriore del ventricolo destro
- VsxPOST, l'area che ricopre la faccia posteriore del ventricolo sinistro

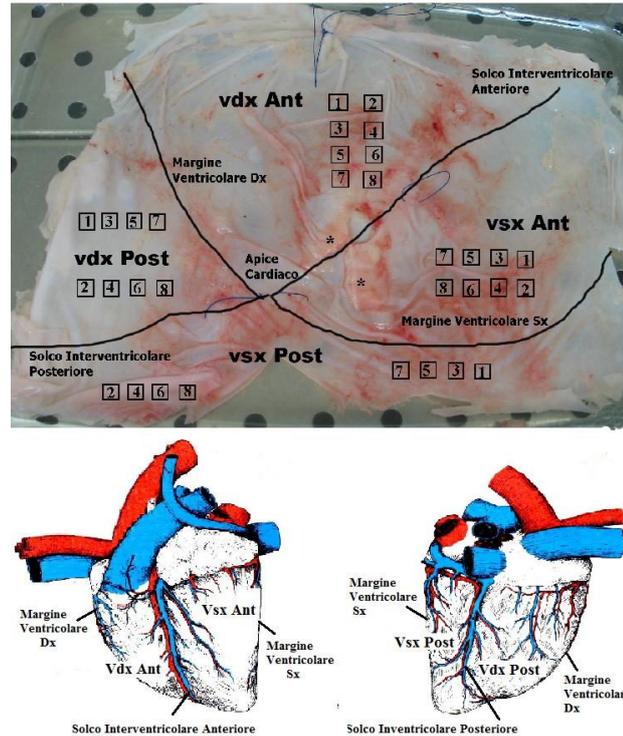


Figura 3.1: *Sopra*: foto del PB disteso dopo sezione trasversale a livello del solco atrio-ventricolare e sezione longitudinale a metà dell'area pericardica che riveste la faccia posteriore del ventricolo sinistro. Sono indicate le aree anatomiche considerate (Vsx=Ventricolo sinistro; Vdx=Ventricolo destro; Ant=Anteriore; Post=Posteriore). I legamenti sterno-pericardici sono indicati dall'asterisco; *Sotto a sinistra*: disegno della faccia anteriore del cuore bovino; *Sotto a destra*: disegno della faccia posteriore del cuore bovino. Sono indicate le aree cardiache corrispondenti a quelle pericardiche considerate

Quindi, con strumenti chirurgici sterili è stata espantata la porzione di sacco pericardico parietale che ricopre i ventricoli. Il tessuto è stato avvolto in garze sterili e immerso in PBS sterile e freddo 4 °C, fino al suo trasporto in laboratorio. Entro 2 ore dall'espianto, il tessuto è stato delicatamente

manipolato in condizioni di sterilità sotto cappa biologica a flusso laminare. Con pinze microchirurgiche sterili è stato rimosso lo strato epipericardico e il tessuto adiposo aderente alla superficie esterna. Usando le suture come reperi anatomici, sono stati prelevati 8 campioni di tessuto di forma rettangolare (5 mm x 8 mm) dalle 4 aree anatomiche d'interesse: VdxANT, VsxANT, VdxPOST, VsxPOST Fig 3.1. Questo procedimento è stato eseguito per tutti i campioni utilizzati per il processo di decellularizzazione, le analisi fisiche e istologiche, e la microscopia elettronica.

3.16 Determinazione delle proprietà fisiche del tessuto pericardico

Per caratterizzare il tessuto nativo e verificare l'effetto del protocollo di decellularizzazione sulle proprietà fisiche del Pericardio Bovino di Vitello e del Pericardio Porcino, sono stati misurati la massa, l'area, la densità, il volume, lo spessore e il contenuto d'acqua, prima e dopo trattamento TRITDOC. Sono stati espantati sei PB e sei PP, come descritto sopra. Da ogni pericardio sono stati prelevati con bisturi sterile 32 campioni di tessuto di forma rettangolare (5 mm x 8 mm): 8 campioni per ciascuna delle 4 aree di interesse. Altri 6 PB e 6 PP sono stati campionati in maniera analoga e sottoposti al processo di decellularizzazione TRITDOC, come descritto sopra. Per ogni pericardio (sia bovino sia porcino, sia nativo sia decellularizzato), i campioni totali (n=32) sono stati suddivisi in due sottogruppi. Sui campioni del primo gruppo (n=16, 4 campioni per ogni area d'interesse) sono stati misurati massa, area, densità, volume e spessore. Mentre i campioni del secondo sottogruppo (n=16, 4 campioni per ogni area d'interesse) sono stati utilizzati per determinare il contenuto d'acqua.

3.16.1 Massa espressa in grammi (g)

I campioni, sospesi in PBS, sono stati asciugati su carta da filtro/assorbente (Whatman, Schelicher & Schuell), posizionati in una piastra Petri, usata come tara, e pesati con una bilancia analitica (Sartorius research). La misura della massa è stata registrata dopo 2 minuti dMetodi chimici: al posizionamento del campione.

3.16.2 Area espressa in centimetri quadrati (cm²)

Dopo essere stati pesati, i campioni di tessuto sono stati posizionati in una piastra Petri con la superficie sierosa rivolta verso l'alto e coperti con un

vetrino porta-oggetto per istologia, in modo da distenderli. È stato aggiunto PBS per mantenere idratato e assicurare la completa distensione del tessuto. Un righello professionale è stato posizionato a lato dei campioni, per avere un'unità di misura di riferimento. Quindi i campioni sono stati fotografati con macchina fotografica digitale Canon EOS50D con macro-obiettivo Canon EF 100 mm, mantenuta a distanza fissa (20 cm) dal piano fotografato. Il programma MacBiophotonics ImageJ 1,42I è stato utilizzato per tracciare il contorno del campione di pericardio e misurarne l'area, prendendo il righello come riferimento.

3.16.3 Densità espressa in grammi su millilitro (g/ml)

La densità dei campioni è stata determinata preparando una scala di soluzioni di Percoll (Sigma-Aldrich), disciolto in PBS 10X, di diversa densità. La preparazione ha richiesto la misura della densità di un volume noto (100 ml) di PBS con concentrazione 10X:

- un matraccio da 100 ml, chiuso con il tappo, è stato posto sulla bilancia analitica che è stata quindi tarata
- il matraccio è stato rimosso dalla bilancia e riempito con PBS 10X fino all'indicatore di volume
- la massa è stata registrata dopo 2 minuti
- la densità è stata calcolata con la formula: Densità (g/ml) = massa (g)/volume (ml)

Usando la formula riportata di seguito è stato quindi calcolato il volume di Percoll da aggiungere al PBS 10X, per preparare la soluzione con densità prescelta:

$$V_p = V_f \frac{\rho_f - 0.1 \rho_{10X} - 0.9}{\rho_p - 1}$$

V_p è il volume di Percoll (ml)

V_f è il volume finale della soluzione (ml)

ρ_f è la densità finale della soluzione

ρ_{10X} è la densità del PBS concentrato 10 volte (10X)

ρ_p è la densità del Percoll, 1,130 g/ml

Nella Tab. 3.1 sono indicati i costituenti delle soluzioni preparate.

Sono stati posizionati in ordine crescente dei bicchieri Becker contenenti le soluzioni di Percoll di densità compresa tra 1,039 g/ml e 1,075 g/ml, con una

Densità finale (g/ml)	Volume Finale (ml)	Volume Percoll (ml)	Volume PBS10X	Volume H ₂ O mQ
1,039	100	25,46	10,00	64,54
1,042	100	27,77	10,00	62,23
1,045	100	30,08	10,00	59,92
1,048	100	32,38	10,00	57,62
1,051	100	34,69	10,00	55,31
1,054	100	37,00	10,00	53,00
1,057	100	39,31	10,00	50,69
1,060	100	41,61	10,00	48,39
1,063	100	43,92	10,00	46,08
1,066	100	46,23	10,00	43,77
1,069	100	48,54	10,00	41,46
1,072	100	50,85	10,00	39,15
1,075	100	53,15	10,00	36,85

Tabella 3.1: *Costituenti delle soluzioni di Percoll*

differenza di 0,003 g/ml tra una soluzione e l'altra. Per consentire una misura precisa della densità, l'esperimento è stato condotto a temperatura costante (24 °C ± 1 °C) mantenendo le soluzioni sempre ben miscelate, in modo che le microparticelle di Percoll fossero distribuite uniformemente. Iniziando dalla densità minore, i lembi sono stati immersi in successione in ogni Becker ed è stata osservata la fluttuazione del campione all'interno della soluzione. Quando il campione rimaneva galleggiante circa a metà della soluzione, senza risalire verso la superficie o depositarsi sul fondo del Becker, si assumeva che la sua densità fosse pari a quella della soluzione.

3.16.4 Volume espresso in centimetri cubi (cm³)

Il volume di ogni campione è stato calcolato usando la formula:

$$V = \frac{m}{\rho}$$

V è il volume in cm³

m è la massa in g

ρ è la densità in g/ml

3.16.5 Spessore espresso in centimetri (cm)

Lo spessore medio di ogni campione è stato calcolato con la seguente formula:

$$S = \frac{m}{\rho A}$$

S è lo spessore medio in cm

m è la massa in g

ρ è la densità in g/ml

A è l'area in cm^2

3.16.6 Contenuto d'acqua espresso in percentuale rispetto al peso umido totale)

I campioni sono stati immersi in acqua distillata mQ due volte, lasciati in agitazione a 4 °C per 2 ore ciascuna. L'acqua distillata è stata rimossa e i preparati sono stati congelati a -20 °C overnight e poi a 80 °C per 8 ore. Quindi sono stati crio-essiccati in liofilizzatore (Edwards) per 48 ore e successivamente posti sotto vuoto in presenza di P_2O_5 (pentossido difosfato), a 37 °C per 36 ore. I campioni liofilizzati sono stati pesati come descritto in precedenza per la determinazione della massa. Infine, il contenuto d'acqua è stato calcolato con la seguente formula:

$$\text{contenuto d'acqua} = 100\% - \frac{\text{peso secco}}{\text{peso idratato}} 100\%$$

Il valore del peso idratato indicato nella formula è quello della massa prima del lavaggio dei campioni in acqua distillata.

3.17 Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM)

Il TEM è stato impiegato per caratterizzare l'ultrastruttura del PB e del PP nativi ed eventuali cambiamenti apportati post trattamento TRITDOC. Sei campioni rettangolari (5 mm x 7 mm) sono stati prelevati dalla faccia sterno-costale del PB nativo (n=3) e del PP nativo (n=3) al macello locale subito dopo il sacrificio degli animali. I campioni sono stati immediatamente fissati in glutaraldeide 2,5% in tampone sodio cacodilato (0,1 M, ph 7,4). Altri 6 campioni di dimensioni analoghe sono stati prelevati dalla stessa area

del PB (n=3) e del PP (n=3), sottoposti a trattamento TRITDOC e fissati come descritto sopra. I campioni (n=12) sono stati quindi allestiti presso il Servizio di Microscopia Elettronica del Dipartimento di Biologia, secondo il seguente protocollo:

1. tre lavaggi in tampone sodio cacodilato (0,1 M, ph 7,4), per 10 minuti ciascuno
2. fissazione in tetrossido di osmio 1% in tampone cacodilato di sodio, a 4 °C per 2 ore
3. disidratazione attraverso soluzioni scalari di etanolo (25% 50% 75% 95% 100%): 3 lavaggi per ogni soluzione a 4 °C per 15 minuti ciascuna
4. tre passaggi in ossido di propilene a 4 °C per 1 ora ciascuno
5. inclusione in resina Epon–araldite e ossido di propilene in rapporto tre a uno, a 45 °C per 1 ora
6. inclusione in resina Epon–araldite e ossido di propilene in rapporto uno a uno, a 45 °C per 1 ora
7. inclusione in resina Epon–araldite e ossido di propilene in rapporto uno a tre, a 45 °C per 1 ora
8. inclusione in resina Epon–araldite a 37 °C per 1 ora
9. i campioni sono trasferiti nelle camerette d'inclusione per TEM
10. inclusione in resina Epon–araldite a 37 °C per 1 giorno
11. inclusione in resina Epon–araldite a 45 °C per 1 giorno
12. inclusione in resina Epon–araldite a 60 °C per 1 giorno
13. taglio di sezioni semi–fini (1 μ m) con microtomo (LKB Ultrame III) con lama di vetro e successiva colorazione con Blu di Toluidina 1%. Le immagini delle sezioni sono state acquisite al microscopio ottico (Leica DC300)
14. taglio di sezioni ultra–fini (80-100 nm) con microtomo (LKB Ultrame III) con lama di diamante e successiva colorazione con acetato di uranile 1% in acqua per 15 minuti, e citrato di piombo 1% per 6 minuti. Le immagini delle sezioni sono state acquisite al TEM (Tecnai Fei G²)

3.18 Test per la determinazione dell'epitopo α -Gal

Il test immunologico di tipo ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) è stato utilizzato per effettuare un dosaggio dell'epitopo α -Gal in campioni di tessuto di PBV e PP nativi e processati per l'eliminazione della componente cellulare con metodo TRITDOC. Il test è in grado di produrre dati quantitativi grazie alla comparazione del tessuto in analisi con una fonte standard di epitopi rappresentata dai globuli rossi di coniglio, ciascuno dei quali esprime sulla sua superficie 2^{10^6} epitopi [138]. Come rivelatore dell'epitopo è stato utilizzato l'anticorpo monoclonale M86, altamente specifico ed in grado di evitare la produzione di falsi positivi [88]. Il test è di tipo indiretto, ossia il campione da analizzare viene incubato con una quantità nota di anticorpo M86. Successivamente si separa per centrifugazione l'immunocomplesso creatosi e si effettua il dosaggio sull'anticorpo in soluzione rimasto libero. Per differenza si risale alla quantità legata all'antigene tissutale.

Protocollo:

1. Preparazione dei campioni. Il tessuto da analizzare deve rientrare in un range di massa compreso tra 25 e 40 mg (peso umido). Nel caso le dimensioni eccedano tale limite, il tessuto deve essere suddiviso in campioni più piccoli compresi nel peso sopra indicato
2. Determinazione della totalità degli epitopi. Successivamente alla pesata del campione il tessuto viene tagliato in piccoli pezzi. Al fine di rendere disponibili tutti gli epitopi presenti, viene effettuata una parziale digestione del tessuto con papaina, (volume finale 2 ml) a 60 °C nelle modalità e dosaggi indicati in Tab. 3.2. Terminato il tempo di digestione proprio del tessuto analizzato, si procede all'inattivazione della papaina ponendo la provetta in acqua bollente a 100 °C per 5 minuti. I campioni vengono lasciati raffreddare 15 minuti a temperatura ambiente
3. Test ELISA: preparazione della piastra. Su una piastra a 96 pozzetti (Polisorp 96 well plate–Nunc, Rochester, N.Y.) viene effettuato un coating con 50 μ l di α -Gal/HSA (5 μ g/ml) (Dextra Laboratories, U.K.) per pozzetto. La piastra viene coperta con pellicola protettiva (Sigma, St. Louis, U.S.) per evitare l'evaporazione, e incubata al buio per 90 minuti a 37 °C. Vengono quindi effettuati 3 lavaggi con 300 μ l per pozzetto di PBS sterile a temperatura ambiente; il primo lavaggio è lasciato agire per 5 minuti, il secondo e il terzo per 3 minuti ciascuno. Il blocking

viene effettuato con 300 μ l per pozzetto di 1% HSA (albumina sierica umana–Sigma, St. Louis, U.S.) in PBS sterile, seguito dalla copertura della piastra con pellicola protettiva e incubazione per 2 ore a temperatura ambiente, al buio. Vengono quindi effettuati altri 3 lavaggi, come sopra

4. Test ELISA: reazione immunologica. Dal surnatante di ogni campione precedentemente centrifugato, si esegue un prelievo di 100 μ l per ogni pozzetto di una singola colonna della piastra, si copre con pellicola protettiva e si lascia incubare per tutta la notte a 4 °C al buio. Vengono effettuati 3 lavaggi con PBS sterile come sopra indicato. Si aggiungono 100 μ l per pozzetto della soluzione contenente l'anticorpo secondario diretto contro l'M86 e coniugato all'enzima perossidasi (diluizione 1:500) (Dako Cytomation, Denmark), quindi si copre con pellicola protettiva e si lascia incubare al buio per 2 ore a 37 °C. Si effettuano nuovamente 3 lavaggi con PBS sterile come sopra indicato. In ogni pozzetto si aggiungono di 100 μ l della soluzione di sviluppo per l'enzima perossidasi (o-phenylenediamine 200 μ M in PBS con perborato di sodio, Sigma, St. Louis, U.S.), si copre la piastra con pellicola protettiva e si procede ad incubare i campioni per 30 minuti al buio a temperatura ambiente. Infine si esegue la lettura della piastra tramite apposito lettore di piastre (Lettore fotometrico per micro piastre DV990BV6, NT Laboratory, Italy) a 450 nm

Pericardio (Bovino e Suino)	
Tempo di Incubazione	60 minuti
Concentrazione Enzima	5,6 mg/ml
Rapporto Enzima/Substrato	1:100

Tabella 3.2: *Tempi di incubazioni e concentrazioni di papaina necessari per la digestione di Pericardio*

3.19 Analisi statistiche

Per tutti i dati relativi alle proprietà fisiche dei campioni sono stati calcolati i valori medi, riportati come media \pm deviazione standard (DS), utilizzando Microsoft Excel 2010. Per il confronto tra pericardi nativi e decellularizzati, i dati sono stati elaborati con Student's t-test non appaiato, con $p < 0,05$. Per verificare la significatività dei cambiamenti post-TRITDOC dei parametri fisici considerati nelle diverse aree d'interesse, i dati sono stati elaborati con Student's t-test appaiato, con $p < 0,05$, sia per il PB sia per il PP. Infine, per il confronto delle varie aree nei diversi pericardi nativi e decellularizzati (sia di bovino sia di porcino), i dati sono stati elaborati tramite ANOVA ad una via, utilizzando come soglia per la significatività statistica un valore $p < 0,05$.

Capitolo 4

Risultati

4.1 Pericardio Bovino (PB)

Tutte le indagini e gli esperimenti descritti in questa sezione riguardano il PB.

4.1.1 Caratterizzazione di Pericardiociti

La caratterizzazione dei Pericardiociti è stata condotta su cellule isolate al passaggio p4 mediante Immunocitochimica (ICC) utilizzando anticorpi anti Vimentina (DakoCytomation), anti Procollagene I (Hybridoma Bank) e anti α -Actina (Sigma). Come evidenziato in Fig. 4.1 le cellule reagiscono positivamente con tutti gli anticorpi. In particolare si può notare il forte segnale della Vimentina (Immagine A) che risulta diffuso in tutto il citoplasma, come pure quello perinucleare del Procollagene I (Immagine B).

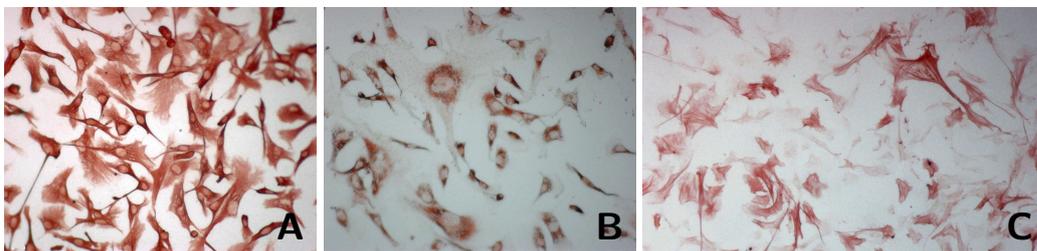


Figura 4.1: *ICC su Pericardiociti p4. A: Vimentina, B: Procollagene I e C: α -actina (Ingrandimento (Ing) 20X)*

4.1.2 Analisi istologiche ed Immunoistochimiche (IHC)

Per indagare e documentare l'organizzazione generale e la distribuzione degli elementi cellulari del PB nativo e decellularizzato con i due metodi UTRIDOC e TRICOL, i campioni sono stati inclusi in OCT, colorati con Ema-tossilina/Eosina (H&E) e i nuclei cellulari marcati con la sonda fluorescente DAPI. Nelle immagini A delle Fig. 4.2 e 4.3 è evidente il monostrato di cellule mesoteliali sulla superficie sierosa del PB nativo e la componente cellulare all'interno della matrice pericardica. Come evidente nelle immagini B e C in Fig. 4.2 e 4.3, nei campioni decellularizzati, sia con protocollo UTRIDOC che TRICOL, non sono invece più presenti cellule, nè sulla superficie nè all'in-terno del tessuto. Se consideriamo l'organizzazione generale della matrice, vediamo che nei campioni decellularizzati i fasci di fibre collagene sono più evidenti e separati da spazi vuoti. Nel PB Nativo questi spazi sono occupati da MEC, vasi sanguigni e cellule. La matrice extracellulare (MEC) del PB UTRIDOC e TRICOL presenta delle fenestrazioni, dei "pori" che non sono presenti nei campini Nativi.

L'IHC mostra la distribuzione del Collagene I, dell'elastina e del Collagene IV, sui campioni di tessuto pericardico Nativo e UTRIDOC. Il Collagene I è distribuito in tutta la matrice, le fibre di elastina sono evidenti soprattutto vicino alla superficie sierosa dove è presente il Collagene IV, evidenziato anche nelle regioni del tessuto in cui vi sono i vasi sanguigni (Fig. 4.4 e Fig. 4.5).

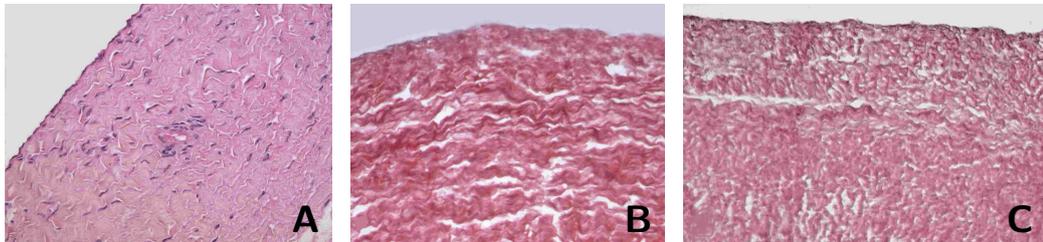


Figura 4.2: Colorazione istologica con H&E. A: PB nativo (Ing 10x), B: PB UTRIDOC (Ing 20x), C: PB TRICOL (Ing 10X). I nuclei cellulari (marcati in blu-viola) sono assenti nei campioni decellularizzati. La superficie sierosa è nella parte superiore delle immagini

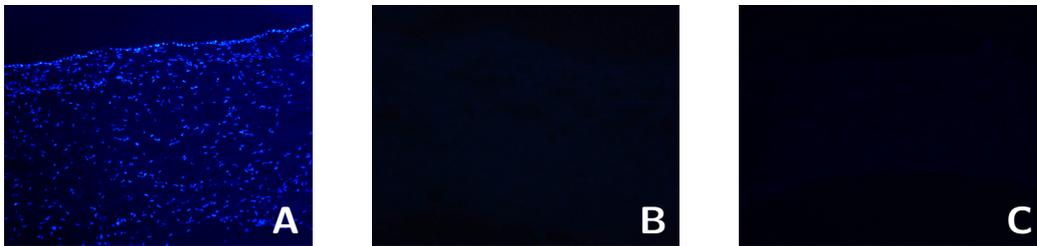


Figura 4.3: *Marcatura nucleare con DAPI. A: PB nativo, B: PB UTRIDOC, C: PB TRICOL (Ing 10x). I nuclei cellulari (marcati in blu) sono assenti nei campioni decellularizzati. La superficie sierosa è rivolta verso l'alto*

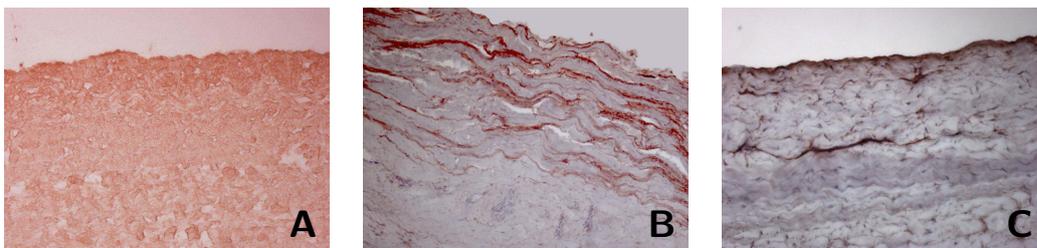


Figura 4.4: *IHC su PB Nativo. A: Collagene I (Ing 10X), B: Elastina (Ing 20X), C: Collagene IV (Ing 10X). La superficie sierosa è nella parte superiore delle immagini*



Figura 4.5: *IHC su PB UTRIDOC. A: Collagene I (Ing 10X), B: Elastina (Ing 10X), C: Collagene IV (Ing 10X). La superficie sierosa è nella parte superiore delle immagini*

4.1.3 Semina di Pericardiociti

PB decellularizzato

I pericardiociti al passaggio p4 sono stati seminati su scaffolds pericardici bovini decellularizzati UTRIDOC e TRICOL. Inizialmente le cellule sono state seminate in terreno MEM- α alla densità di 750mila e 2milioni di cellule per cm^2 , con o senza FBS, per poter individuare le condizioni migliori per la loro sopravvivenza ed adesione. La valutazione di queste condizioni è stata fatta su scaffolds di PB UTRIDOC per tempi di semina di 6h, 18h e 7giorni. Successivamente, visti i risultati incoraggianti ottenuti a 7giorni, le semine sono state eseguite anche su scaffolds di PB TRICOL.

In entrambe le densità di semina le cellule aderiscono al substrato e inoltre, la presenza o assenza dell'FBS non influisce sulla loro adesione. Se consideriamo i periodi di semina di 6h e 18h (Fig. 4.6, 4.7) si può rilevare, come era prevedibile, che la densità delle cellule adese è maggiore nel caso della semina operata con 2milioni di cellule per cm^2 (Immagini C e D in Fig. 4.6 e in Fig. 4.7). Sembra quindi, si sia mantenuto il rapporto (tra le quantità di cellule) che era presente al momento della semina. Se consideriamo il comportamento cellulare dopo 7giorni (Fig. 4.8), si vede che i Pericardiociti sono entrati nella matrice pericardica, colonizzandone un piccolo strato al di sotto della superficie sierosa. Questo comportamento è più evidente nei campioni in cui sono state seminate 750mila cellule per cm^2 (Fig. 4.8), mentre non si notano differenze per gli scaffolds UTRIDOC e TRICOL.

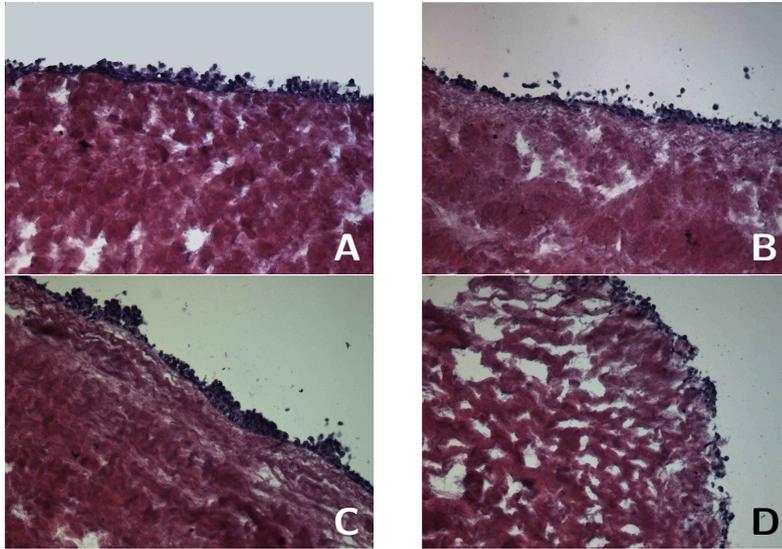


Figura 4.6: *PB UTRIDOC* seminato con *Pericardiociti*. A: 750mila cellule per cm^2 per 6h con FBS e B: senza FBS. C: 2milioni di cellule per cm^2 per 6h con FBS e D: senza FBS. La superficie sierosa è rivolta verso l'alto (Ing 10X)

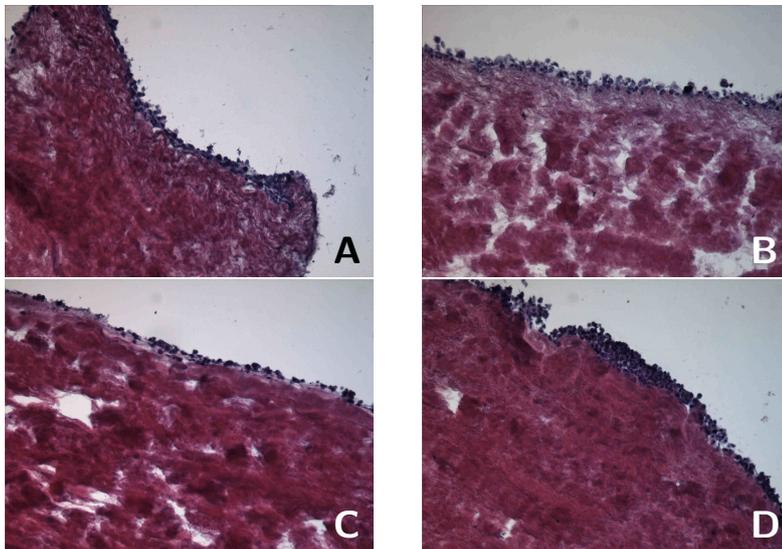


Figura 4.7: *PB UTRIDOC* seminato con *Pericardiociti*. A: 750mila cellule per cm^2 per 18h con FBS e B: senza FBS. C: 2milioni di cellule per cm^2 per 18h con FBS e D: senza FBS. La superficie sierosa è rivolta verso l'alto (Ing 10X)

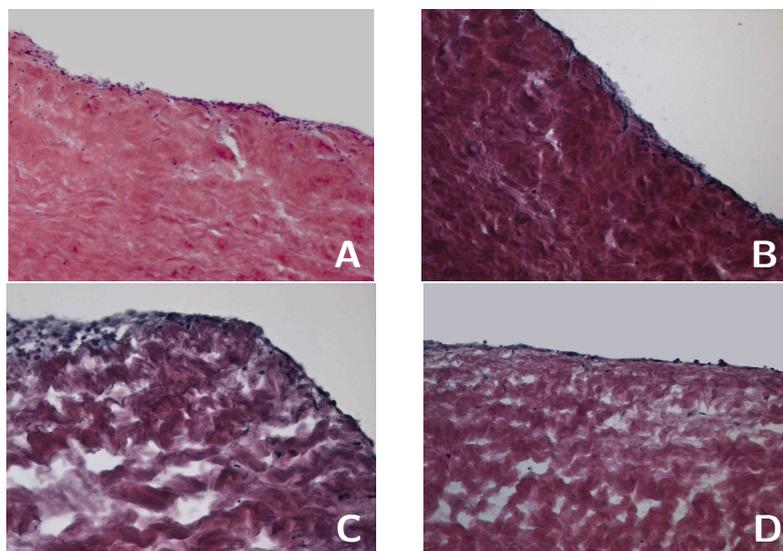


Figura 4.8: *PB TRICOL* seminato con *Pericardiociti*. A: 750mila cellule per cm^2 per 7giorni con FBS e B: senza FBS. C: 2milioni di cellule per cm^2 per 7giorni con FBS e D: senza FBS. La superficie sierosa è rivolta verso l'alto (Ing 10X)

Sulle sezioni di questi campioni sono state eseguite indagini di immunostochimica (IHC) per determinare l'espressione da parte dei Pericardiociti della proteina citoscheletrica Vimentina, del Procollagene I e del von Willebrand factor (vWf). Nelle Fig. 4.9 e 4.10, sono mostrate delle immagini rappresentative per tutti i campioni. E' interessante notare come anche dopo 7giorni di coltura, la Vimentina e il Procollagene I siano ancora espressi, indicando che i Pericardiociti mantengono le stesse caratteristiche evidenziate prima della semina. Il vWf, proteina tipicamente espressa dalle cellule di origine endoteliale ed analizzata in questo caso per escludere la presenza di questa popolazione cellulare, non è espressa. La presenza di FBS, la densità cellulare e i due tipi di scaffolds non influiscono in maniera evidente sui risultati delle semine.



Figura 4.9: *IHC su PB UTRIDOC seminato con Pericardiociti. A: Procollagene I, B: Vimentina e C: vWf a 6h dalla semina. La superficie sierosa è rivolta verso l'alto (Ing 10X)*



Figura 4.10: *IHC su PB UTRIDOC seminato con Pericardiociti. A: Procollagene I, B: Vimentina e C: vWf a 7giorni dalla semina. La superficie sierosa è rivolta verso l'alto (Ing 10X)*

PB UTRIDOC funzionalizzato con un peptide RGD

Dopo decellularizzazione del PB con metodo UTRIDOC, su metà dei campioni di tessuto è stato “legato” covalentemente un dodecapeptide pro-adesivo di sintesi costituito da 4 sequenze amminoacidiche RGD (Arginina-Glicina-Acido aspartico) come descritto nella Sez. 3.5 dei materiali e metodi. Per valutare l’effetto della funzionalizzazione, su questi campioni trattati e su quelli non trattati (campioni di controllo), i Pericardiociti p4 sono stati seminati alle densità di 100mila e 50mila cellule per cm² per tempi di semina di 30minuti e 3h. Le analisi istologiche con H&E indicano che le cellule aderiscono ad entrambi gli scaffolds pericardici, con entrambe le densità cellulari di semina già a 30minuti (Immagine B in Fig. 4.11). A 3h dalla semina l’adesione cellulare porta alla formazione di un monostrato continuo di cellule sulla superficie degli scaffolds pericardici funzionalizzati mentre sugli scaffolds pericardici di controllo le cellule adese mostrano una morfologia tondeggianti e un’adesione discontinua (Immagine F in Fig. 4.11).

Le analisi di IHC evidenziano che le cellule presenti sulle superfici del PB funzionalizzato con il peptide pro-adesivo di sintesi RGD e sul PB di controllo, esprimono Vimentina e Procollagene I sia a 30minuti che a 3h dalla semina Fig. 4.12. Mantengono quindi, un fenotipo simile a quello riscontrato prima della semina.

4.2 Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)

4.2.1 Caratterizzazione con Immunocitochimica (ICC) ed Immunofluorescenza (IF)

Le cellule HUVEC utilizzate per la semina su scaffolds pericardici bovini decellularizzati, sono state caratterizzate tramite l’ICC e l’IF utilizzando anticorpi anti-von Willebrand factor (vWf) e anti-CD31. Le cellule al passaggio p3, sono state seminate su vetrini coprioggetto (come descritto nella Sez. 3.13 dei materiali e metodi) per 24h, 48h e 7 giorni. I risultati delle indagini sono mostrati in Fig. 4.13 e in Fig. 4.14. Le cellule sono positive per la reazione ad entrambi gli anticorpi a tutti i tempi di semina, dimostrando in questo modo che mantengono l’espressione dei marcatori endoteliali per tutto il periodo in cui rimangono in coltura. A 24h e 48h è evidente il segnale perinucleare della proteina vWf e il segnale di membrana della proteina CD31 mentre a 7 giorni si nota la formazione di strutture-tubulari.

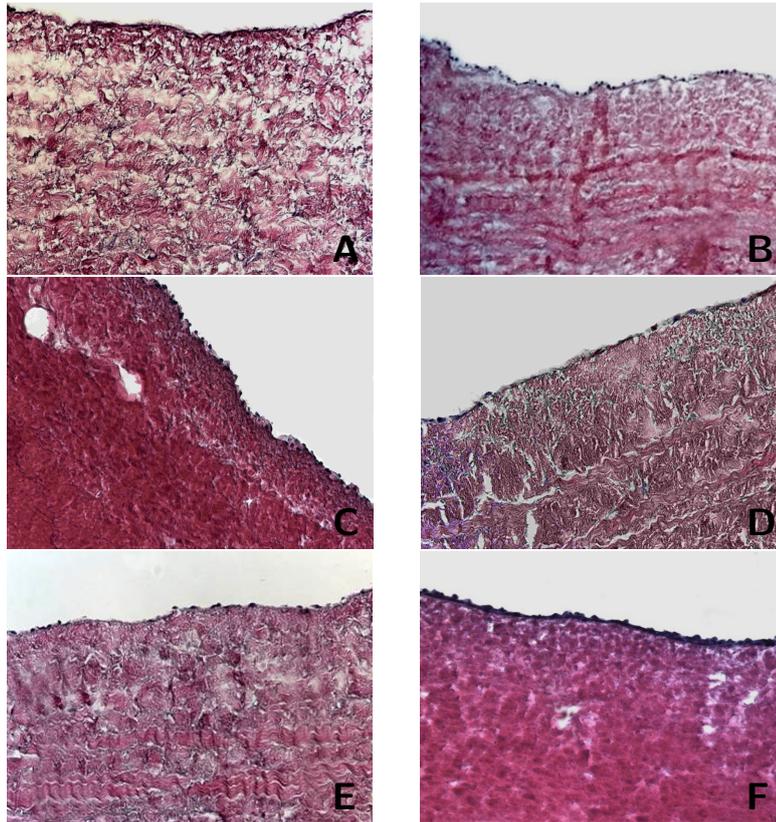


Figura 4.11: *H&E su PB UTRIDOC seminato con Pericardiociti p4. A: 50mila cellule per cm² per 30minuti su PB di controllo e B: su PB funzionalizzato con peptide pro-adesivo di sintesi RGD. C: 50mila cellule per cm² per 3h su PB di controllo e D: su PB funzionalizzato. E: 100mila cellule per cm² per 3h su PB di controllo ed F: su PB funzionalizzato. Si noti come a 3h le cellule formino un monostrato continuo sul PB funzionalizzato con il peptide pro-adesivo di sintesi RGD. La superficie sierosa è rivolta verso l'alto (Ing 10X)*

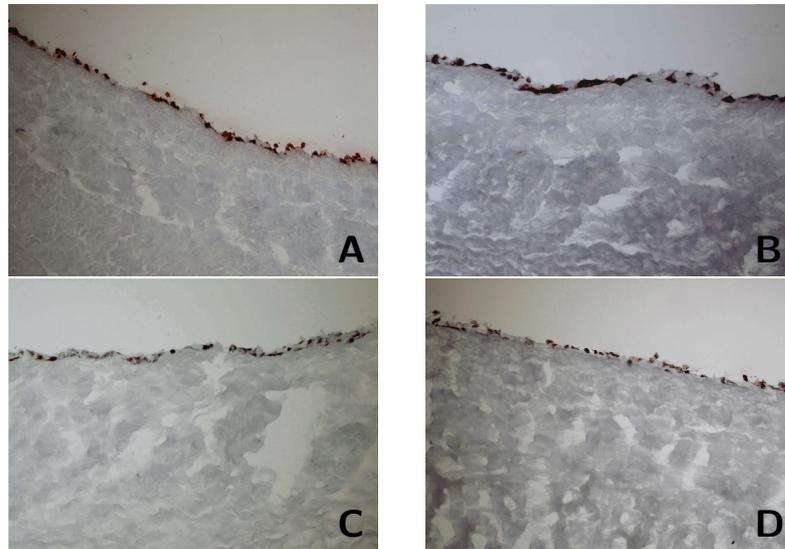


Figura 4.12: *IHC su PB UTRIDOC seminato con Pericardiociti. A: Vimentina su PB UTRIDOC di controllo a 30minuti dalla semina e B: su PB funzionalizzato con il peptide RGD. C: Procollagene I su PB UTRIDOC di controllo a 3h dalla semina e D: su PB funzionalizzato. La superficie sierosa è rivolta verso l'alto (Ing 10X)*

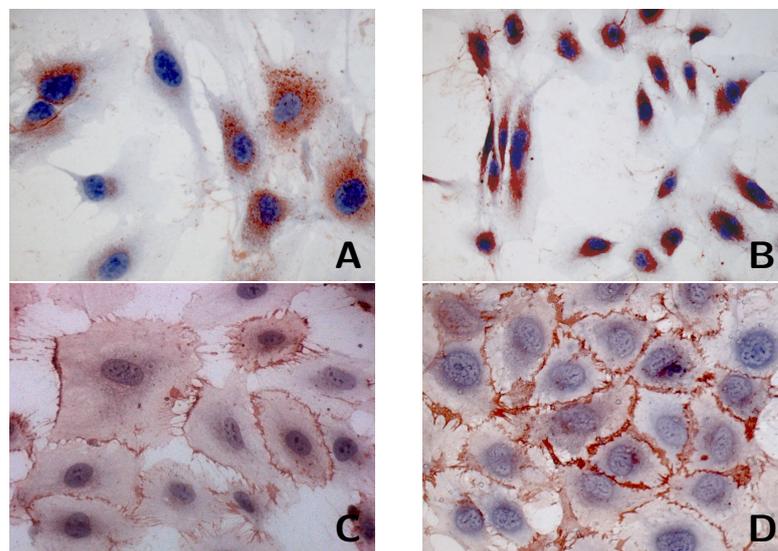


Figura 4.13: *ICC su cellule HUVEC. A: vWF su cellule seminate per 24h e B: per 48h. C: CD31 su cellule seminate per 24h e D: per 48h. Il segnale rosso-marrone di positività aumenta la sua intensità dopo 48h (Ing 40X)*

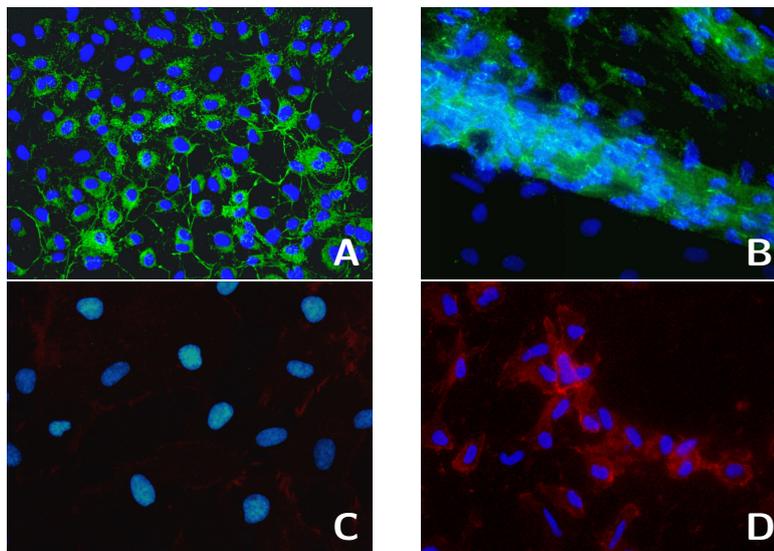


Figura 4.14: *IF su cellule HUVEC*: A: vWf su cellule seminate per 48h e B: per 7giorni. A 48h il segnale fluorescente verde di positività è presente prevalentemente in sede perinucleare (Ing 10X). Nell'immagine B è evidente la formazione da parte delle cellule di strutture allungate-tubulari a 7 giorni dalla semina (Ing 40X). C: CD31 su cellule seminate per 48h e D: per 7giorni. A 48h il segnale fluorescente rosso di positività è presente prevalentemente in corrispondenza della membrana cellulare (Ing 40X)

4.2.2 Semina su PB UTRIDOC e piastra per colture cellulari

Analisi istologiche

Le prime semine con cellule HUVEC sono state eseguite su scaffolds di PB UTRIDOC. La procedura è stata descritta nella sezione 3.4 dei materiali e metodi. Le HUVEC sono state seminate ai passaggi p3, p5, p9 alle densità di 50mila e 100mila cellule per cm^2 , per 1h, 3h e 5h. I risultati delle analisi istologiche condotte sugli scaffolds seminati con le HUVEC al passaggio p5, sono mostrati in Fig. 4.15. Le cellule HUVEC pur aderendo alla superficie di semina dello scaffold di PB UTRIDOC, non formano un monostrato continuo. Solo in alcuni punti, gruppi di cellule adiacenti ricoprono senza discontinuità il tessuto (immagini B, D ed E in Fig. 4.15). La diversa densità di semina non risulta essere influente sull'interazione delle cellule con il substrato.

Test di adesione (Landegren) e vitalità (MTT)

Parallelamente alle analisi istologiche, sono stati eseguiti i test di adesione e vitalità delle cellule HUVEC seminate su scaffolds di PB UTRIDOC. I dati ottenuti sono stati confrontati con quelli di semine eseguite su piastre per colture cellulari.

In Fig. 4.16 è mostrato il grafico relativo al “grado” di adesione delle cellule al PB UTRIDOC, ottenuto con il test di Landegren (procedura descritta nella Sez. 3.6 dei materiali e metodi). L'adesione cellulare è espressa come Assorbanza alla lunghezza d'onda di 405nm (A_{405nm}). Maggiore è il valore di A_{405nm} , maggiore è l'adesione delle cellule al substrato. Le HUVEC al passaggio p3, p5 e p9 sono state seminate per 1h e 3h. A 1h dalla semina il numero di cellule HUVEC al passaggio p3 e p5 che aderisce allo scaffold di PB UTRIDOC è paragonabile (significatività statistica pari a $p > 0,05$). Quelle al passaggio p9 mostrano un'adesione nettamente inferiore (significatività statistica pari a $p < 0,05$). A 3h dalla semina, si osserva che il numero di cellule HUVEC che aderisce al substrato decresce con l'aumentare del passaggio ($p < 0,05$). Rispetto a 1h, le cellule p3 mostrano però un aumento della loro adesione ($p < 0,05$), le cellule p5 un lieve decremento ($p > 0,05$) e le cellule p9 un'adesione invariata ($p > 0,05$).

In Fig. 4.17 è mostrato il grafico relativo al “grado” di adesione delle cellule HUVEC seminate su pozzetti di piastre da coltura 24wells, ottenuto con il test di Landegren. Le HUVEC al passaggio p5, p6 e p7 sono state seminate per 1h e 3h. Ad entrambi i tempi di semina, l' A_{405nm} e quindi il numero di cellule adese, aumenta con il passaggio cellulare ($p < 0,05$ tranne che per il confronto tra p5 e p7 a 1h). Questa osservazione è opposta a quella

che era stata fatta per l'adesione delle HUVEC su scaffold di PB UTRIDOC (grafico in Fig. 4.16). Se confrontiamo i diversi passaggi delle cellule HUVEC (p5, p6 e p7) ai 2 tempi di semina, si può osservare come il numero di cellule che aderisce è maggiore in tutti i casi dopo 3h semina rispetto a 1h ($p < 0,05$).

Se si vuole confrontare l'adesione delle HUVEC su scaffolds di PB UTRIDOC con l'adesione su piastra per colture cellulari, si devono mettere a confronto le adesioni delle cellule al passaggio p5. Il grafico mostrato in Fig. 4.18 rivela che a 1h di semina il numero di cellule che aderisce su piastra è minore rispetto a quello che aderisce sugli scaffold di PB, ma che a 3h la situazione si inverte (entrambi i confronti di adesione sono statisticamente significativi: $p < 0,05$. Il numero di campioni, N_c , è uguale a 4 per ogni substrato di semina).

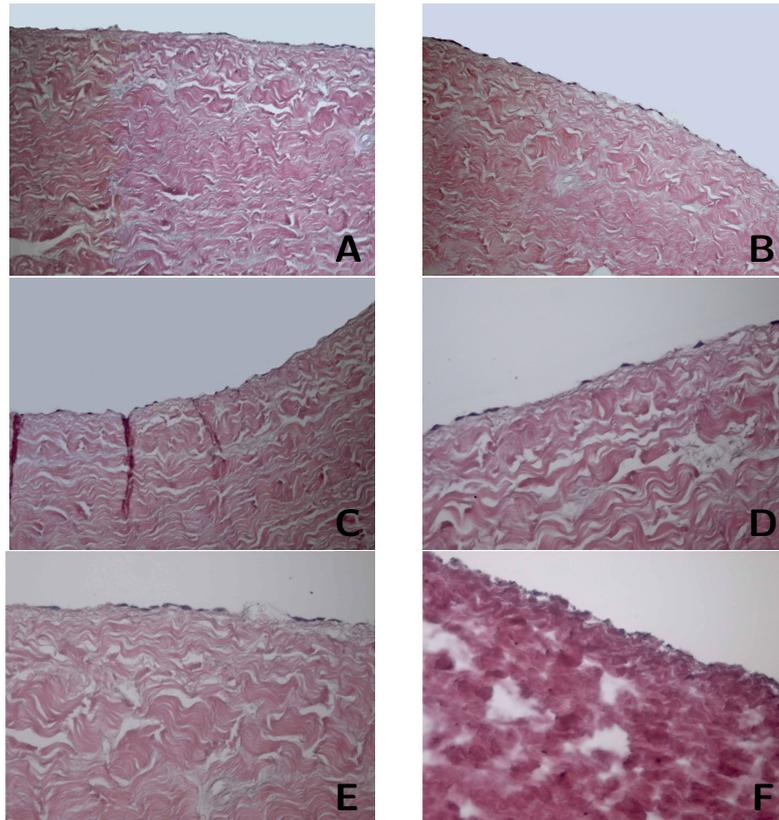


Figura 4.15: *H&E su scaffolds di PB UTRIDOC seminati con HUVEC. A, C ed E: 50mila HUVEC per cm². B, D ed F: 100mila HUVEC per cm². A e B: semina ad 1h. C e D: semina a 3h. E ed F: semina a 5h (Ing 6X e 12X). A 3h e 5h dalla semina si possono osservare piccoli gruppi di cellule adiacenti che ricoprono la superficie del tessuto. La superficie sierosa è rivolta verso l'alto*

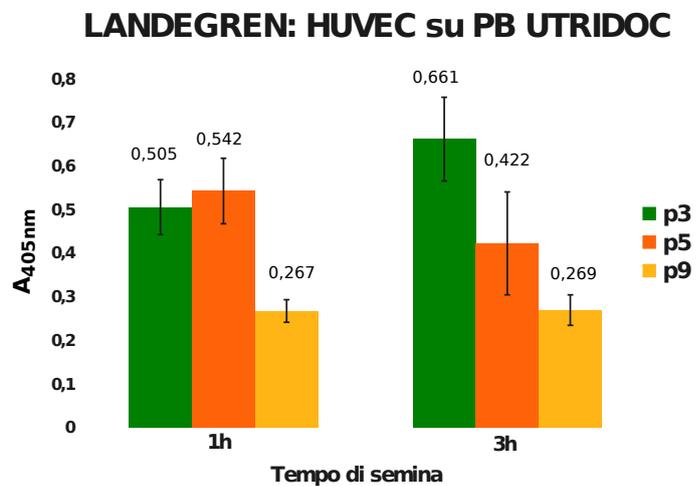


Figura 4.16: *Cellule HUVEC su scaffold di PB UTRIDOC: Test di Landegren ad 1h e 3h dalla semina*

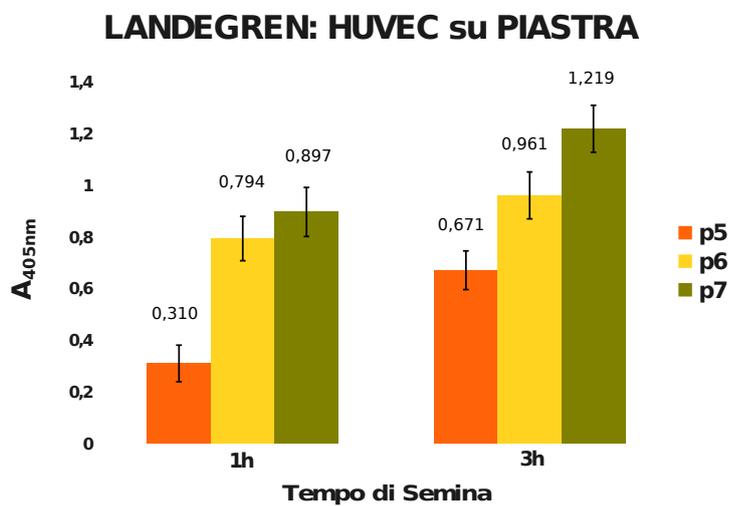


Figura 4.17: *Cellule HUVEC su Piastra per colture cellulari: Test di Landegren ad 1h e 3h dalla semina*

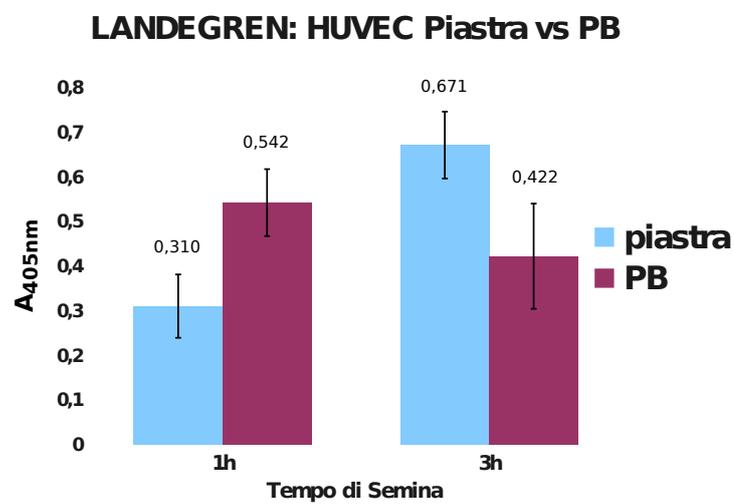


Figura 4.18: *Confronto fra l'adesione delle cellule HUVEC p5 seminate su scaffold di PB UTRIDOC e su Piastra: Test di Landegren. A un 1h dalla semina il numero di HUVEC che aderisce è maggiore sullo scaffold di PB ($p < 0,05$). A 3h la situazione è invertita ($p < 0,05$)*

4.2.3 Semina su PB UTRIDOC e TRITDOC

Analisi istologiche, IHC e test MTT

Visti i risultati ottenuti su PB UTRIDOC, le HUVEC al passaggio p3 sono state contemporaneamente seminate anche su scaffolds di PB ottenuti per decellularizzazione TRITDOC alla densità di 50mila cellule per cm². I tempi di semina sono stati aumentati per ambedue i substrati, a 24h e 7 giorni. Dopo 24h di semina (Fig. 4.19), si può apprezzare la presenza di cellule sulla superficie di entrambi i substrati, anche se è evidenziabile solo la presenza di residui nucleari senza chiara distinzione dell'intera morfologia cellulare. Se osserviamo le immagini in cui i campioni sono stati marcati con la sonda DAPI, i nuclei sono più nettamente riconoscibili e l'adesione cellulare sembra essere più marcata sui campioni di PB TRITDOC rispetto all'UTRIDOC. A 7 giorni (4.20) le cellule e i nuclei non sono nettamente distinguibili, ma sulla superficie di semina si osserva una "linea" viola-blu continua, non presente a 24h, che potrebbe corrispondere a uno strato di HUVEC marcate con ematossilina. Guardando infatti, le corrispondenti immagini ottenute con il DAPI, si osservano nuclei appartenenti a cellule adiacenti formare un monostrato continuo sul PB TRITDOC e discontinuo sul PB UTRIDOC. Come mostrato in Fig. 4.21 l'IHC evidenzia l'espressione delle proteine vWf e CD31 da parte delle cellule HUVEC adese.

Riassumendo, a 24h il numero di cellule adese sui due scaffolds pericardici è limitato e il legame alla superficie sembra essere labile, come evidenziato in particolare dai campioni colorati con H&E. A 7 giorni dalla semina il numero di cellule adese sulla superficie del PB è maggiore, soprattutto sul PB TRITDOC e non si evidenziano cellule staccate dalla superficie.

Oltre alle analisi istologiche e all'IHC, è stato condotto il test di vitalità MTT. Analogamente al Test di Landegren, anche questo test si basa su una misura di Assorbanza (A). Si assume che più elevata è l'A più vitali sono le cellule e maggiore è il loro numero. Come mostrato in Fig. 4.22, a 24h dalla semina le cellule HUVEC aderiscono in numero paragonabile sul PB UTRIDOC e TRITDOC ($p > 0,05$), mentre mostrano un'adesione superiore sulla Piastra da coltura ($p < 0,05$). A 7 giorni il numero di cellule che aderisce al PB TRITDOC è maggiore rispetto al PB UTRIDOC (Fig. 4.22). A questo tempo di semina, il numero di cellule che aderisce alla piastra è sempre notevolmente maggiore, sia rispetto ai due tipi di PB che rispetto al numero di cellule che aderisce sulla piastra a 24h ($p < 0,05$). Confrontando invece, i diversi tempi di semina, vediamo che il numero di cellule che aderisce al PB UTRIDOC diminuisce a 7gg rispetto a 24h, mentre aumenta nel caso del PB TRITDOC.

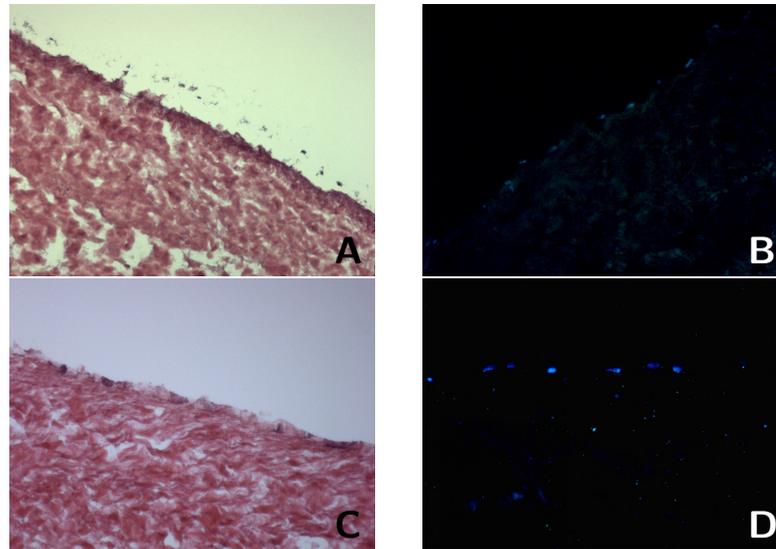


Figura 4.19: *H&E e DAPI*. A e B: PB UTRIDOC seminato per 24h con 50mila HUVEC per cm^2 . C e D: PB TRITDOC seminato per 24h con 50mila HUVEC per cm^2 (Ing 10X). La superficie sierosa è rivolta verso l'alto

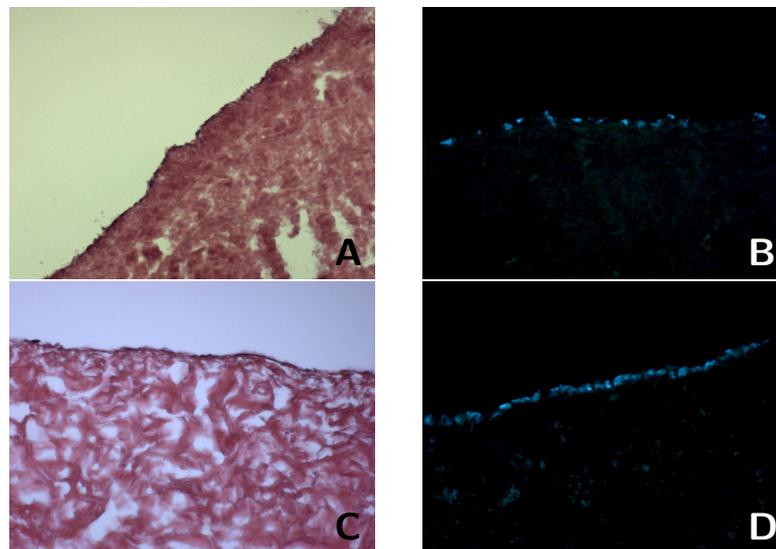


Figura 4.20: *H&E e DAPI*. A e B: PB UTRIDOC seminato per 7 giorni con 50mila HUVEC per cm^2 . C e D: PB TRITDOC seminato per 7 giorni con 50mila HUVEC per cm^2 (Ing 12X). La superficie sierosa è rivolta verso l'alto

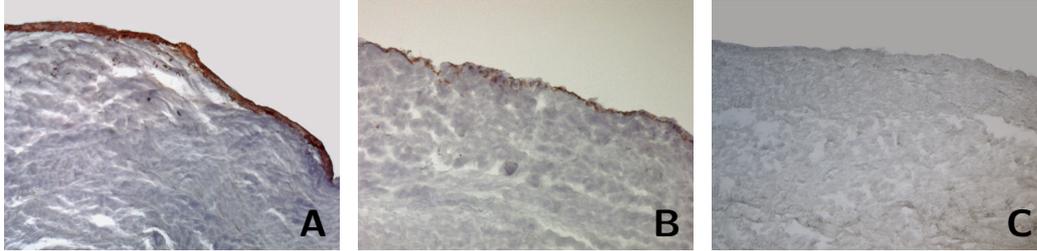


Figura 4.21: *IHC su PB TRITDOC seminato con 50mila HUVEC per cm². A: vWf dopo 7 giorni di coltura e B: CD31 (Ing 20X e 10X). C: sezione di controllo in cui il campione ha reagito solo con l'anticorpo secondario. L'assenza di segnale rosso-marrone conferma che le reazioni degli anticorpi nelle altre due immagini non è aspecifica (Ing 10X). La superficie sierosa è rivolta verso l'alto*

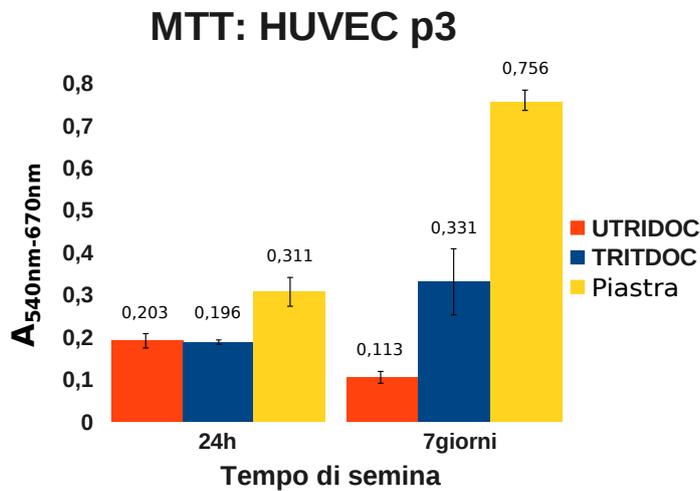


Figura 4.22: *Cellule HUVEC p3 su PB UTRIDOC, TRITDOC e su Piastra. Test MTT dopo 24h e 7giorni dalla semina. Dopo 7giorni l'adesione delle cellule al tessuto è maggiore sul PB TRITDOC rispetto al PB UTRIDOC*

4.3 Pericardio bovino di Vitello (PBV) e Pericardio Porcino (PP): decellularizzazione TRITDOC

Con lo scopo di valutare le proprietà fisiche e strutturali del Pericardio quale possibile biomateriale per la costruzione di bioprotesi valvolari cardiache percutanee, è stata condotta un'indagine sistematica del PBV e del PP (suddivisi in diverse zone (od aree) anatomiche). Sono stati valutati l'organizzazione istologica, ed ultrastrutturale, lo spessore, la densità, il contenuto d'acqua, oltre all'orientamento prevalente delle fibre collagene mediante osservazione dei campioni al microscopio a luce polarizzata. Le osservazioni sono state condotte sia su Pericardio Nativo sia dopo rimozione della componente cellulare mediante procedura TRITDOC.

4.3.1 Analisi istologiche

Il PBV e il PP, decellularizzati con il metodo TRITDOC, sono stati valutati istologicamente con H&E e con marcatura nucleare DAPI per verificare l'avvenuta decellularizzazione e l'organizzazione "grossolana" della struttura del tessuto. In Fig. 4.23 sono mostrati i risultati per il PBV e per il PP. Nei campioni decellularizzati (Immagini B, D, F ed H nelle foto) non si apprezzano più i nuclei e altre strutture cellulari rispetto ai campioni Nativi (Immagini A, C, E e G nelle foto) in cui si ha una distribuzione nucleare uniforme in tutta la matrice tissutale e sulla superficie sierosa. La colorazione con H&E inoltre, permette di apprezzare l'andamento definito, compatto ed ondulato dei fasci di fibre collagene nei campioni TRITDOC sia di PBV e PP. Nei campioni Nativi i fasci di fibre collagene non presentano questa morfologia, non si riconoscono ondulazioni.

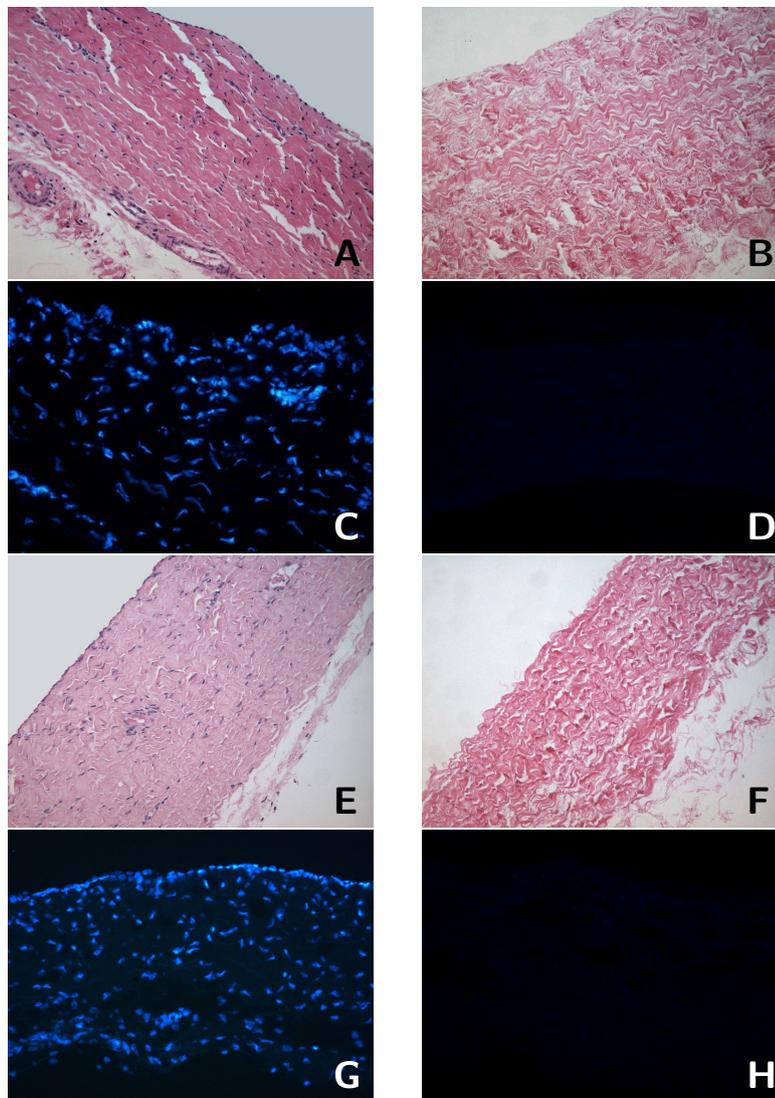


Figura 4.23: *H&E e DAPI su PBV e PP nativi e TRITDOC*. A e C: campioni nativi di PBV (Ing 10X) E e G: campioni nativi di PP (Ing 20X). In tutte le immagini si distinguono chiaramente i nuclei cellulari. B e D: PBV TRITDOC Ing 10X). F ed H: PP TRITDOC (Ing 20X). Si può notare come non siano più presenti i nuclei cellulari. La superficie sierosa è rivolta verso l'alto

4.3.2 Proprietà fisiche del PBV

Analisi dello Spessore

Uno degli scopi più importanti di questo studio del PBV e del PP è l'analisi della variabilità del tessuto pericardico, per poter individuare se ci sono delle aree meno variabili, sia prima che dopo decellularizzazione. I pericardi sono stati suddivisi in diverse zone anatomiche (VsxANT, VsxPOST, VdxANT e VdxPOST) come descritto nella Sez. 3.15 dei materiali e metodi, e le proprietà fisiche sono state analizzate per ogni singola zona.

In Fig. 4.24 è mostrata la misura dello Spessore (espresso in centimetri) prima e dopo trattamento TRITDOC, per ognuna delle aree considerate dei PBV. Rispetto ai campioni Nativi, nei VsxANT, VsxPOST, VdxANT lo Spessore si è ridotto dopo trattamento TRITDOC, mentre nel VdxPOST è aumentato. Queste variazioni non sono però risultate statisticamente significative ($p > 0,05$). Per avere un'idea del grado con cui sono avvenute, in Tab. 4.1 sono riportate le variazioni percentuali per tutte le aree e per i PBV presi in toto.

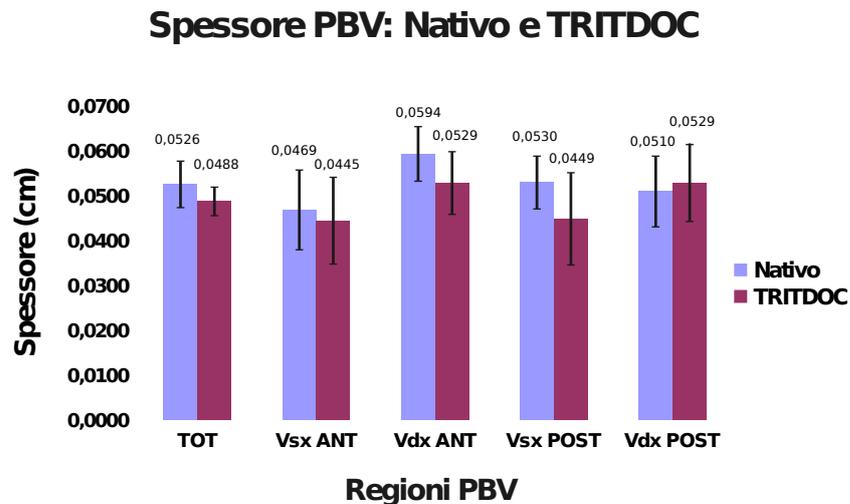


Figura 4.24: *Variazione dello Spessore medio delle diverse aree dei PBV analizzati prima e dopo decellularizzazione TRITDOC. I VsxANT, VsxPOST, VdxANT mostrano una tendenza alla diminuzione del loro spessore dopo trattamento TRITDOC, mentre i VdxPOST un aumento. I campioni analizzati per ogni area sono stati 24*

In Tab. 4.2 sono riassunti i valori di Spessore minimi e massimi, la Varianza e la significatività statistica delle variazioni, per ogni area dei PBV

	Tessuto				
	Totale	VsxANT	VdxANT	VsxPOST	VdxPOST
%Variazione	-6,51	-5,12	-8,79	-15,28	+3,72

Tabella 4.1: *Variazioni percentuali dello Spessore dopo trattamento TRITDOC, per il tessuto pericardico totale e le singole aree considerate*

Nativi. In questo modo si può analizzare qual'è quella più variabile e quella meno variabile, per quanto riguarda lo Spessore, prima della decellularizzazione. L'area meno variabile (varianza minore) è il VsxANT, quella più variabile (varianza maggiore) è il VdxANT. Inoltre, lo spessore dei VsxANT, dei VsxPOST e dei VdxPOST dei pericardi di vitello analizzati, varia significativamente tra i diversi bovini ($<0,05$). Non è così per il VdxANT ($>0,05$).

	VsxANT	VdxANT	VsxPOST	VdxPOST
Valore Min	0,0341	0,0362	0,0338	0,0367
Valore Max	0,0608	0,0848	0,0648	0,0646
Range	0,0267	0,0486	0,0310	0,0279
Varianza	1,5E-0,5	2,5E-0,4	2,3E-0,5	3,5E-0,5
p	$<0,05$	$>0,05$	$<0,05$	$<0,05$

Tabella 4.2: *Confronto della variabilità (espressa in termini di Varianza) dello Spessore delle diverse aree anatomiche considerate dei PBV Nativi. L'area più variabile è il VdxANT, quella meno variabile il VsxANT*

La stessa analisi si può condurre sulle zone anatomiche dei PBV decellularizzati TRITDOC e verificare se dopo il trattamento la variabilità delle aree si modifica rispetto ai PBV Nativi. Come mostrato in Tab. 4.3 l'area più variabile rimane quella del VdxANT e quella meno variabile il VsxANT. Invece, lo spessore dei VdxANT, dei VsxPOST e dei VdxPOST dei pericardi di vitello analizzati, varia in maniera non significativa tra i diversi bovini ($>0,05$) (variabilità inter-individuale). Non è così per il VsxANT ($<0,05$).

	VsxANT	VdxANT	VsxPOST	VdxPOST
Valore Min	0,0367	0,0343	0,0301	0,0339
Valore Max	0,0534	0,0856	0,0627	0,0744
Range	0,0167	0,0513	0,0326	0,0405
Varianza	1,5E-0,5	2,5E-0,4	2,3E-0,5	3,5E-0,5
p	>0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Tabella 4.3: *Confronto della variabilità (espressa in termini di Varianza) dello Spessore delle diverse aree anatomiche considerate dei PBV TRITDOC. Come per i PBV Nativi, l'area più variabile è il VdxANT, quella meno variabile il VsxANT*

Analisi della Densità

Dopo il trattamento TRITDOC, la densità media del PBV è aumentata in maniera significativa ($p < 0,05$), anche nelle diverse zone analizzate (Fig. 4.25). Se confrontiamo le aree tra di loro vediamo che presentano una densità simile sia nel caso del PBV Nativo che TRITDOC. In Tab. 4.4 sono riportate le variazioni percentuali della densità per ogni singola area e per i PBV presi in toto.

	Tessuto				
	Totale	VsxANT	VdxANT	VsxPOST	VdxPOST
%Variazione	+0,76	+0,76	+0,67	+0,67	+0,76

Tabella 4.4: *Variazioni percentuali della Densità, dopo trattamento TRITDOC, per il tessuto pericardico totale e le singole aree considerate*

Nel PBV Nativo, la variabilità inter-individuale della densità è significativa ($< 0,05$) per tutte le aree anatomiche considerate, tranne che per il VdxANT. In quest'area la differenza di densità tra diversi animali non risulta significativa ($> 0,05$). L'area più variabile (varianza maggiore) è il VdxANT, quella meno variabile (varianza minore) il VsxANT (Tab. 4.5).

Dopo trattamento TRITDOC, la variabilità inter-individuale della densità non è statisticamente significativa ($> 0,05$) per tutte le aree considerate, tranne che per il VsxANT, dove la differenza di densità tra i diversi animali risulta minore e più costante. Anche dopo trattamento di decellularizzazio-

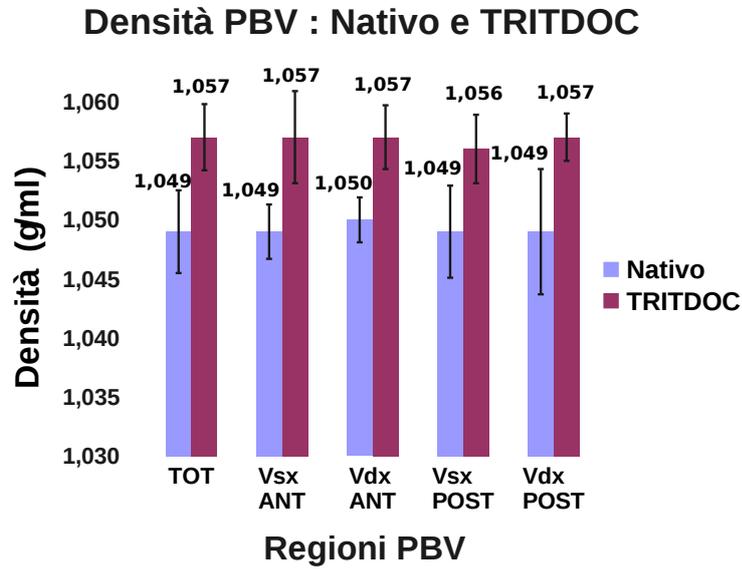


Figura 4.25: *Variazione della Densità media delle diverse aree dei PBV analizzati prima e dopo decellularizzazione TRITDOC. La Densità aumenta in maniera significativa in tutte le zone. I campioni analizzati per ogni area sono stati 24*

ne, l'area meno variabile rimane il VsxANT e quella più variabile il VdxANT (Tab. 4.6).

	VsxANT	VdxANT	VsxPOST	VdxPOST
Valore Min	1,044	1,0433	1,044	1,040
Valore Max	1,056	1,056	1,057	1,058
Range	0,012	0,013	0,013	0,018
Varianza	4,4E-0,6	1,9E-0,5	4,8E-0,6	7,2E-0,6
p	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05

Tabella 4.5: *Confronto della variabilità (espressa in termini di Varianza) della Densità delle diverse aree anatomiche considerate dei PBV Nativi. L'area più variabile è il VdxANT, quella meno variabile il VsxANT*

	VsxANT	VdxANT	VsxPOST	VdxPOST
Valore Min	1,045	1,042	1,048	1,046
Valore Max	1,064	1,066	1,064	1,065
Range	0,019	0,024	0,016	0,019
Varianza	6,2E-0,6	3,0E-0,5	1,8E0,5	1,9E-0,5
p	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Tabella 4.6: *Confronto della variabilità (espressa in termini di Varianza) della Densità delle diverse aree anatomiche considerate dei PBV TRITDOC. Come per i PBV Nativi, l'area più variabile è il VdxANT, quella meno variabile il VsxANT*

Analisi del contenuto d'acqua

Il contenuto d'acqua del PBV, si è modificato significativamente ($<0,05$) dopo decellularizzazione, nelle diverse aree anatomiche considerate, tranne che per il VdxPOST (Fig. 4.26). In quest'ultima zona il contenuto d'acqua non è significativamente diverso dopo trattamento TRITDOC ($>0,05$). Se confrontate tra di loro, le diverse aree inoltre, non presentano una differenza di contenuto d'acqua statisticamente significativa ($>0,05$), né prima né dopo trattamento TRITDOC. In Tab. 4.7 sono riportate le variazioni percentuali del contenuto d'acqua per ogni singola area e per i PBV presi in toto.

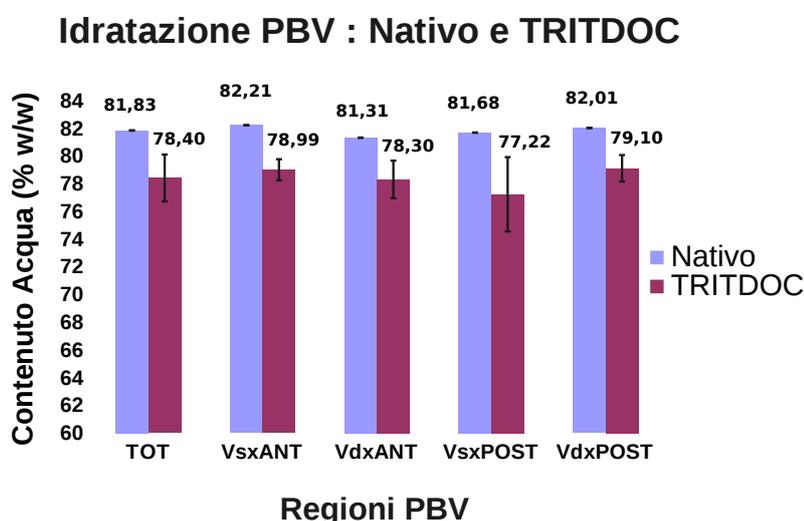


Figura 4.26: *Variazione del contenuto d'acqua medio delle diverse aree dei PBV analizzati prima e dopo decellularizzazione TRITDOC. La percentuale di acqua diminuisce in maniera significativa in tutte le zone tranne che nel VdxPOST. I campioni analizzati per ogni area sono stati 24*

Nel PBV Nativo, la variabilità inter-individuale del contenuto d'acqua non è statisticamente significativa ($p>0,05$) nel VdxANT e nel VsxPOST. Mentre lo è nel VsxANT e nel VdxPOST ($p<0,05$). I range dei valori del contenuto d'acqua delle diverse aree considerate sono riportati in Tab. 4.8. L'area più variabile è il VdxANT, le altre aree mostrano una variabilità molto simile tra loro.

Dopo trattamento TRITDOC, la variabilità inter-individuale del contenuto d'acqua non è statisticamente significativa ($p>0,05$) per tutte le aree

o Spessore prima e dopo decellularizzazione TRITDOC: PBV versus PP

	Tessuto				
	Totale	VsxANT	VdxANT	VsxPOST	VdxPOST
%Variazione	-4,19	-3,92	-3,70	-5,46	-3,55

Tabella 4.7: *Variazioni percentuali del contenuto d'acqua, dopo trattamento TRITDOC, per il tessuto pericardico totale e le singole aree considerate*

considerate, tranne che per il VdxANT ($p < 0,05$). I range di variazione del contenuto di acqua delle diverse aree sono riportati nella Tab. 4.9. L'area più variabile è il VdxPOST. Anche il VsxPOST presenta una variabilità molto elevata. Il VsxANT e il VdxANT mostrano invece, una variabilità molto simile tra loro.

Se prendiamo in considerazione le caratteristiche fisiche analizzate, sia prima che dopo decellularizzazione TRITDOC, possiamo individuare una zona del PBV che sembra essere meno variabile. Questa zona è il VsxANT.

	VsxANT	VdxANT	VsxPOST	VdxPOST
Valore Min	78,76	79,07	79,61	79,16
Valore Max	85,60	84,79	85,00	86,94
Range	6,84	5,72	5,39	7,78
Varianza	1,3	2,3	1,2	1,2
p	<0,05	>0,05	>0,05	<0,05

Tabella 4.8: *Confronto della variabilità (espressa in termini di Varianza) del Contenuto d'acqua delle diverse aree anatomiche considerate dei PBV Nativi. L'area più variabile è il VdxANT*

4.3.3 Proprietà fisiche del PP

Analisi dello Spessore

Le diverse aree anatomiche considerate (VsxANT, VdxANT, VsxPOST, VdxPOST) non presentano tra di loro una differenza di spessore statisticamente

	VsxANT	VdxANT	VsxPOST	VdxPOST
Valore Min	76,30	75,47	51,97	74,00
Valore Max	82,20	82,00	79,70	91,25
Range	5,90	6,53	27,73	17,25
Varianza	2,5	2,3	38,4	67,2
p	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05

Tabella 4.9: *Confronto della variabilità (espressa in termini di Varianza) del contenuto d'acqua delle diverse aree anatomiche considerate dei PBV TRITDOC. L'area più variabile è il VdxPOST*

significativa ($p > 0,05$), né prima né dopo trattamento TRITDOC. Dopo decellularizzazione, lo spessore non si è modificato significativamente ($p > 0,05$) rispetto al tessuto nativo, nemmeno quando sono considerate le diverse aree anatomiche (Fig. 4.27). Le variazioni di spessore nelle singole aree sono riportate in Tab. 4.10. Si sono avute sia diminuzioni (VsxPOST e VdxPOST) che aumenti (VsxANT e VdxANT) dello spessore.

	Tessuto				
	Totale	VsxANT	VdxANT	VsxPOST	VdxPOST
%Variazione	+0,53	+12,20	+14,44	-6,88	-20,08

Tabella 4.10: *Variazioni percentuali dello Spessore, dopo trattamento TRITDOC, per il PP totale e per le singole aree considerate*

Nel PP Nativo, la variabilità inter-individuale dello spessore (tra i diversi sacchi pericardici) è significativa ($p < 0,05$) per tutte le aree anatomiche considerate, tranne che per il VdxANT (Tab. 4.11). Dopo trattamento TRITDOC, diventa statisticamente significativa ($p < 0,05$) anche per quest'area (Tab. 4.12). Il VdxPOST è la zona più variabile nel PP nativo e il VdxANT quella meno variabile (Tab. 4.11). Nel PP TRITDOC la variabilità (rappresentata dalla varianza in Tab. 4.12) è molto simile tra le diverse aree anatomiche.

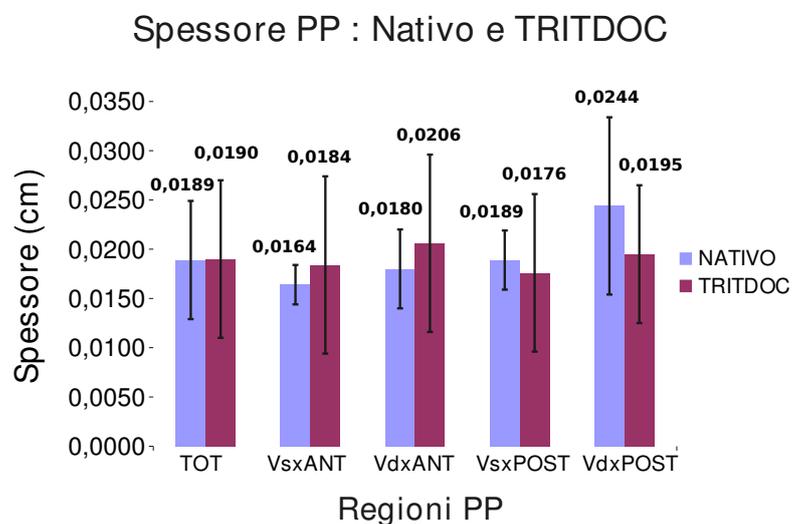


Figura 4.27: *Variazione dello Spessore medio delle diverse aree dei PP analizzati prima e dopo decellularizzazione TRITDOC. Lo spessore non è variato in maniera significativa dopo trattamento TRITDOC. I campioni analizzati per ogni area sono stati 24*

Analisi della Densità

Le varie aree d'interesse non presentano tra di loro una differenza di Densità statisticamente significativa ($p > 0,05$), né prima né dopo trattamento TRITDOC. La densità non si è modificata significativamente ($p > 0,05$) dopo decellularizzazione (Fig. 4.28), anche quando si considerano le diverse aree anatomiche, eccetto per il VsxPOST. Le variazioni della Densità nelle singole aree sono riportate in Tab. 4.13. Come si può constatare si sono avuti degli aumenti di densità (VsxPOST e VdxPOST), delle diminuzioni (VsxANT) e dei valori rimasti invariati (VdxANT).

Nel PP Nativo, la variabilità inter-individuale della densità è significativa ($p < 0,05$) per tutte le aree anatomiche considerate. I range dei valori della densità delle diverse aree sono riportati nella Tab. 4.14. La variabilità (espressa in termini di varianza) delle diverse zone è molto simile. Dopo trattamento TRITDOC, la variabilità inter-individuale della densità risulta statisticamente significativa ($p < 0,05$) per tutte le aree considerate, tranne che per il VdxPOST (Tab. 4.15). Quest'area risulta essere anche la più variabile.

	VsxANT	VdxANT	VsxPOST	VdxPOST
Valore Min	0,0129	0,0126	0,0150	0,0090
Valore Max	0,0257	0,0250	0,0294	0,0372
Range	0,0128	0,0124	0,0144	0,0282
Varianza	1,4E-0,5	9,0E-0,6	1,6E-0,5	2,6E-0,4
p	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05

Tabella 4.11: *Confronto della variabilità (espressa in termini di Varianza) dello Spessore delle diverse aree anatomiche considerate dei PP Nativi. L'area più variabile è il VdxPOST e quella meno variabile il VdxANT*

	VsxANT	VdxANT	VsxPOST	VdxPOST
Valore Min	0,0113	0,0103	0,0108	0,0106
Valore Max	0,0434	0,0440	0,0395	0,0399
semina Range	0,0321	0,0337	0,0287	0,0293
Varianza	1,2E-0,5	2,1E-0,5	1,8E-0,5	1,7E-0,5
p	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Tabella 4.12: *Confronto della variabilità (espressa in termini di Varianza) dello Spessore delle diverse aree anatomiche considerate dei PP TRITDOC*

	Tessuto				
	Totale	VsxANT	VdxANT	VsxPOST	VdxPOST
%Variazione	+0,28	-0,19	0	+0,95	+0,19

Tabella 4.13: *Variazioni percentuali della Densità, dopo trattamento TRITDOC, per il PP totale e per le singole aree considerate*

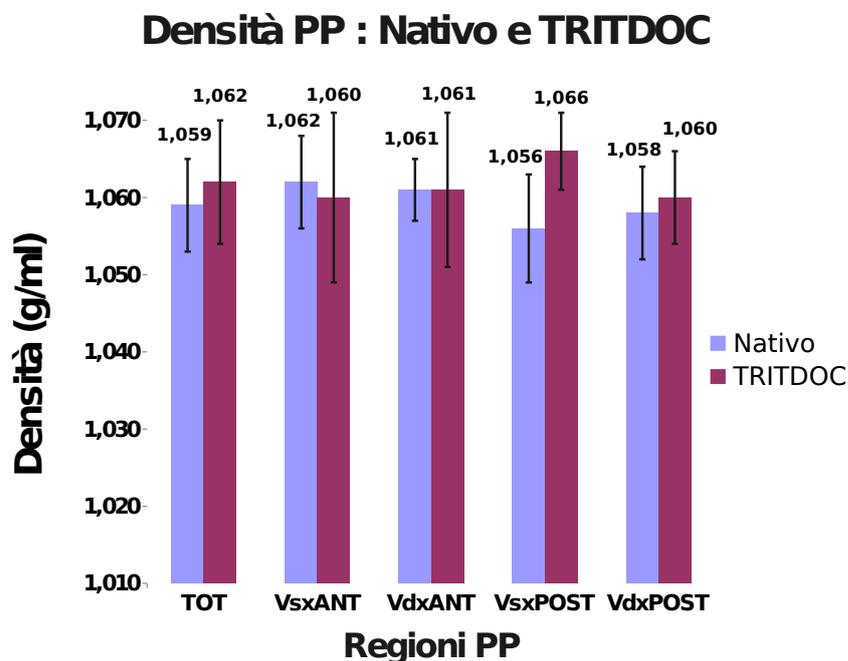


Figura 4.28: *Variazione della Densità media delle diverse aree dei PP analizzati prima e dopo decellularizzazione TRITDOC. La densità è variata in maniera significativa ($p < 0,05$) solo per il VsxPOST. I campioni analizzati per ogni area sono stati 24*

	VsxANT	VdxANT	VsxPOST	VdxPOST
Valore Min	1,0449	1,046	1,041	1,050
Valore Max	1,071	1,070	1,067	1,072
Range	0,027	0,024	0,026	0,022
Varianza	2,7E-0,5	1,8E-0,5	1,6E-0,5	1,7E-0,5
p	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Tabella 4.14: *Confronto della variabilità (espressa in termini di Varianza) della Densità delle diverse aree anatomiche considerate dei PP Nativi*

	VsxANT	VdxANT	VsxPOST	VdxPOST
Valore Min	1,040	1,044	1,046	1,037
Valore Max	1,071	1,072	1,072	1,071
Range	0,031	0,028	0,026	0,022
Varianza	2,0E-0,5	1,7E-0,5	3,2E-0,5	7,4E-0,5
p	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05

Tabella 4.15: *Confronto della variabilità (espressa in termini di Varianza) della Densità delle diverse aree anatomiche considerate dei PP TRITDOC*

Analisi del Contenuto d'acqua

Le diverse aree anatomiche considerate non presentano tra di loro una differenza di contenuto d'acqua statisticamente significativa ($p > 0,05$), né prima né dopo trattamento TRITDOC. L'idratazione del tessuto è diminuita significativamente ($p < 0,05$) dopo decellularizzazione (Fig. 4.29). Se consideriamo le diverse zone del PP il contenuto d'acqua è diminuito in tutte (Tab. 4.16 anche se significativamente nel Vsx e dxANT ($p < 0,05$), mentre non significativamente nel Vsx e dxPOST ($p > 0,05$).

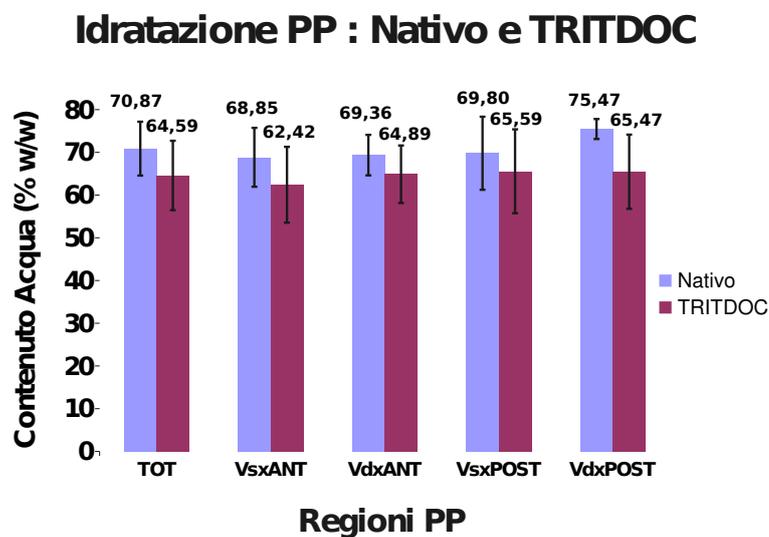


Figura 4.29: *Variazione del Contenuto d'acqua medio nelle diverse aree dei PP analizzati prima e dopo decellularizzazione TRITDOC. L'idratazione del tessuto è diminuita in tutte le zone. In maniera significativa ($p < 0,05$) nel VsxANT, nel VdxANT e considerato il PP nella sua totalità. I campioni analizzati per ogni area sono stati 24*

Nel PP Nativo, la variabilità inter-individuale del contenuto d'acqua è statisticamente significativa ($p < 0,05$) nel VsxANT e POST, mentre non risulta significativa ($p > 0,05$) nel VdxANT e POST. I range dei valori del contenuto d'acqua delle diverse aree del Pericardio nativo sono riportate in Tab. 4.17. L'area con la maggiore variabilità è il VsxPOST. Dopo trattamento TRITDOC, la variabilità inter-individuale del contenuto d'acqua è statisticamente significativa ($p < 0,05$) per tutte le aree considerate (Tab. 4.18. Il VsxPOST rimane la zona più variabile (varianza maggiore).

	Tessuto				
	Totale	VsxANT	VdxANT	VsxPOST	VdxPOST
%Variazione	-8,86	-9,34	-6,44	-6,04	-13,25

Tabella 4.16: *Variazioni percentuali del Contenuto d'acqua, dopo trattamento TRITDOC, per il PP totale e per le singole aree considerate*

	VsxANT	VdxANT	VsxPOST	VdxPOST
Valore Min	63,88	65,76	58,51	69,96
Valore Max	77,17	77,14	79,19	80,81
Range	13,29	11,38	20,68	10,85
Varianza	5,3	7,8	14,2	10,7
p	<0,05	>0,05	<0,05	>0,05

Tabella 4.17: *Confronto della variabilità (espressa in termini di Varianza) del Contenuto d'acqua delle diverse aree anatomiche considerate dei PP Nativi*

	VsxANT	VdxANT	VsxPOST	VdxPOST
Valore Min	56,06	62,48	46,54	60,08
Valore Max	72,52	76,54	78,12	77,72
Range	16,46	14,06	31,58	17,64
Varianza	15,4	11,1	17,5	16,4
p	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Tabella 4.18: *Confronto della variabilità (espressa in termini di Varianza) del Contenuto d'acqua nelle diverse aree anatomiche considerate dei PP TRITDOC*

4.3.4 Confronto delle proprietà fisiche tra PBV e PP

Confronto degli Spessori

Lo spessore del PBV Nativo è significativamente superiore ($p < 0,05$) rispetto a quello del PP Nativo, anche quando sono considerate le diverse aree anatomiche (Fig. 4.30). Dopo trattamento TRITDOC, la differenza di spessore tra i pericardi delle 2 specie di mammifero rimane significativa ($p < 0,05$), per tutte le aree considerate (Fig. 4.30).

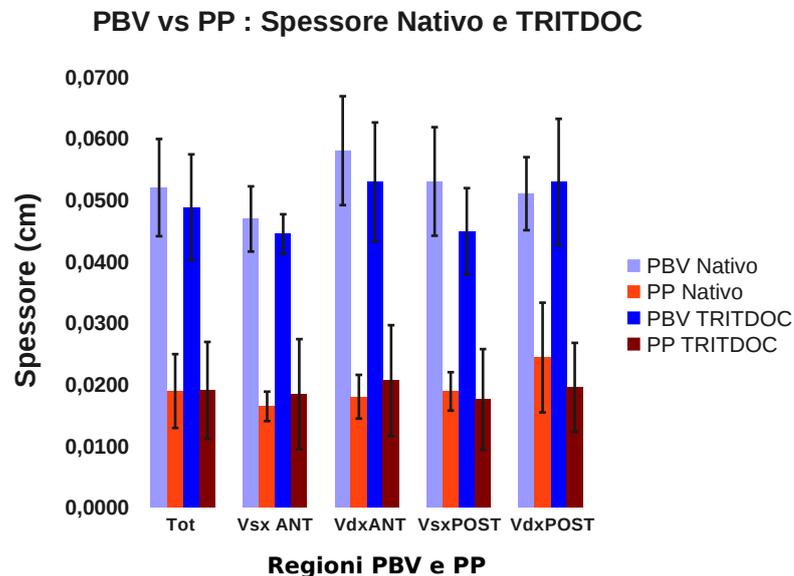


Figura 4.30: Spessori del PBV e del PP prima e dopo decellularizzazione TRITDOC. Il PBV è significativamente più spesso del PP, sia prima che dopo trattamento TRITDOC e in tutte le aree considerate ($p < 0,05$)

Confronto delle Densità

Il PP Nativo presenta una densità significativamente ($p < 0,05$) superiore rispetto a quella del PBV Nativo. Se si considerano le diverse aree anatomiche, il VsxPOST delle due specie di mammifero presenta una densità non significativamente differente ($p > 0,05$). Dopo trattamento TRITDOC, la densità del PP risulta ancora significativamente superiore ($p < 0,05$) a quella del PBV.

Tuttavia, quando considerate le diverse aree anatomiseminache, la differenza di densità tra i due tipi di pericardio non raggiunge la significatività statistica ($p>0,05$), eccetto che per il VsxPOST (Fig. 4.31).

PBV vs PP : Densità Nativo e TRITDOC

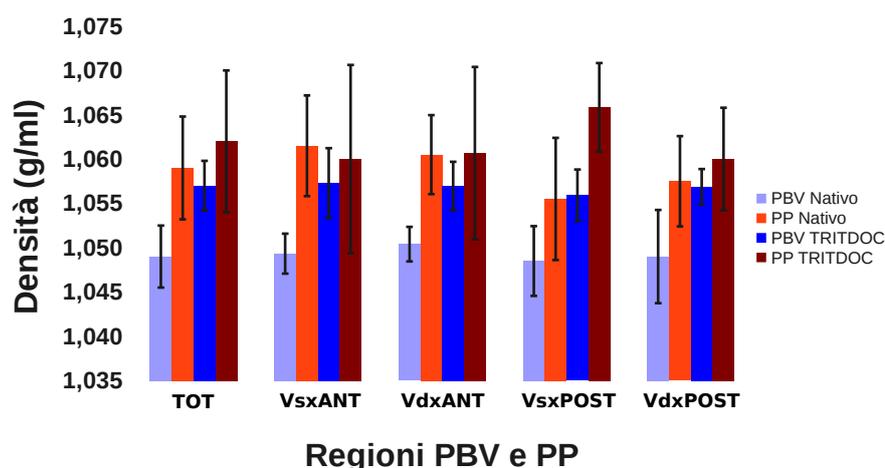


Figura 4.31: *Densità del PBV e del PP prima e dopo decellularizzazione TRITDOC. Il PP è significativamente più denso rispetto al PBV, sia prima che dopo trattamento TRITDOC*

Confronto del Contenuto d'acqua

Il PBV Nativo presenta un contenuto d'acqua significativamente superiore ($p<0,05$) rispetto a quello del PP Nativo, anche quando sono considerate le diverse aree anatomiche (Fig. 4.32). Dopo trattamento TRITDOC, la differenza di contenuto d'acqua tra i 2 tipi di pericardio risulta ancora significativa ($p<0,05$), per tutte le aree anatomiche considerate (Fig. 4.32).

4.3.5 Riassunto generale delle caratteristiche fisiche

Nella Tab. 4.19 e nella Tab. 4.20 sono riassunti i risultati ottenuti sui campioni di PBV e di PP nativi e decellularizzati con il metodo TRITDOC. Il numero

PBV vs PP : Idratazione Nativo e TRITDOC

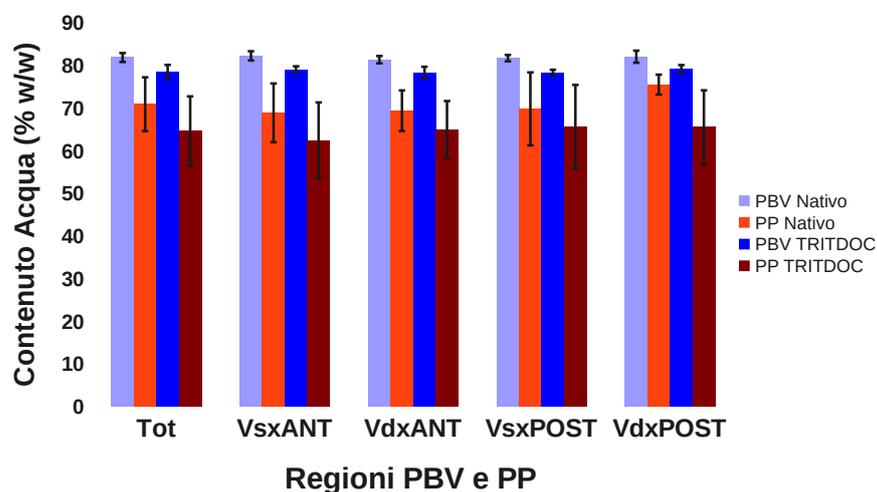


Figura 4.32: *Grado di Idratazione (Contenuto d'acqua) del PBV e del PP prima e dopo decellularizzazione TRITDOC. Il PBV è significativamente più idratato rispetto al PP, sia prima che dopo trattamento TRITDOC*

di campioni totali su cui sono state fatte le analisi è indicato come N_c e le significatività statistiche delle differenze come $p > o <$ di 0,05. Nel caso del PBV (Tab. 4.19) lo spessore non si è modificato significativamente dopo il trattamento TRITDOC ($p > 0,05$), mentre la densità e il grado di idratazione sono variati significativamente ($p < 0,05$). Nel caso del PP (Tab. 4.20), lo spessore e la densità aumentano dopo trattamento TRITDOC in maniera non significativa ($p > 0,05$), mentre il contenuto d'acqua è significativamente diminuito ($p < 0,05$).

	PBV Nativo	PBV TRITDOC	N_c	p
Spessore (cm)	0,0526±0,0052	0,0488±0,0086	96	>0,05
Densità (g/ml)	1,049±0,0035	1,057±0,0028	96	<0,05
Contenuto d'Acqua Percentuale	81,83±1,052	78,40±1,695	96	<0,05

Tabella 4.19: *Spessore, densità e contenuto d'acqua percentuale del PBV prima e dopo decellularizzazione TRITDOC. Lo Spessore diminuisce ma non in maniera significativa ($p > 0,05$), la Densità aumenta e il grado di Idratazione diminuisce, entrambi in maniera significativa ($p < 0,05$). N_c = Numero di campioni analizzati*

	PP Nativo	PP TRITDOC	N_c	p
Spessore (cm)	0,0189±0,0060	0,0190±0,0079	96	>0,05
Densità (g/ml)	1,059±0,0058	1,062±0,0080	96	>0,05
Contenuto d'Acqua Percentuale	70,87±6,306	64,59±8,128	96	<0,05

Tabella 4.20: *Spessore, densità e contenuto d'acqua percentuale del PP prima e dopo decellularizzazione TRITDOC. Lo Spessore e la Densità aumentano in maniera non significativa ($p > 0,05$) e il grado di Idratazione diminuisce significativamente ($p < 0,05$). N_c = Numero di campioni analizzati*

4.3.6 Analisi istologiche con Picrosirius Red

Sono stati valutati gli effetti della decellularizzazione sull'orientamento e l'organizzazione delle fibre collagene nelle diverse aree del PBV e del PP. I campioni Nativi e TRITDOC sono stati colorati con Picrosirius Red secondo il protocollo in Sez. 3.11 dei materiali e metodi e sono stati osservati al microscopio a luce polarizzata. L'insieme delle molecole di collagene nei tessuti di mammifero mostra un orientamento parallelo e una struttura altamente ordinata. A causa di ciò, la birifrangenza è una delle caratteristiche delle entità collageniche, nelle quali le molecole aggregate formano delle strutture visibili al microscopio ottico ed elettronico. Poichè le molecole di collagene sono ricche di amminoacidi basici, esse reagiscono fortemente con sonde acide. Il Sirius Red è una molecola allungata la quale reagisce con il collagene e promuove un aumento della normale birifrangenza. Questo perchè molte molecole di sonda si allineano parallelamente con l'asse lungo di ogni molecola di collagene. L'aumento della birifrangenza dovuto al metodo di polarizzazione Picrosirius è oltretutto specifico per le strutture di collagene composte da aggregati di molecole orientate.

Microscopia a luce polarizzata: PBV

L'osservazione alla luce polarizzata del PBV Nativo colorato con il Picrosirius red ha evidenziato delle differenze nell'organizzazione delle fibre di collagene nelle diverse aree anatomiche (VsxANT, VsxPOST, VdxANT, VdxPOST). Nel VsxANT le fibre sono evidenziate prevalentemente in colore verde e presentano un andamento ondulatorio, perpendicolare alla direzione di osservazione (Immagine A in Fig. 4.33). Nelle altre aree, le fibre collagene mantengono una colorazione verde, in prevalenza, ma mostrano un andamento ondulatorio solamente in alcune zone della sezione. Nelle restanti porzioni di tessuto non è possibile distinguere un'organizzazione spaziale definita delle fibre (Immagini B,C e D in Fig. 4.33).

Dopo trattamento TRITDOC, le aree del PBV colorate con il Picrosirius Red ed osservate al microscopio a luce polarizzata, mostrano delle diversità rispetto alle corrispondenti zone del PBV Nativo. Innanzitutto, i colori con cui appaiono le fibre collagene sono diversi. Nei campioni TRITDOC esse si presentano in prevalenza rosso-arancioni e in alcune zone gialle. Questo in tutte le regioni (VsxANT, VsxPOST, VdxANT, VdxPOST) considerate (Fig. 4.34). Inoltre, l'ondulamento delle fibre collagene che era ben visibile nel VsxANT del PBV Nativo, è ora presente in misura maggiore anche nel tessuto delle altre aree anatomiche (Fig. 4.34). Nonostante in queste per-

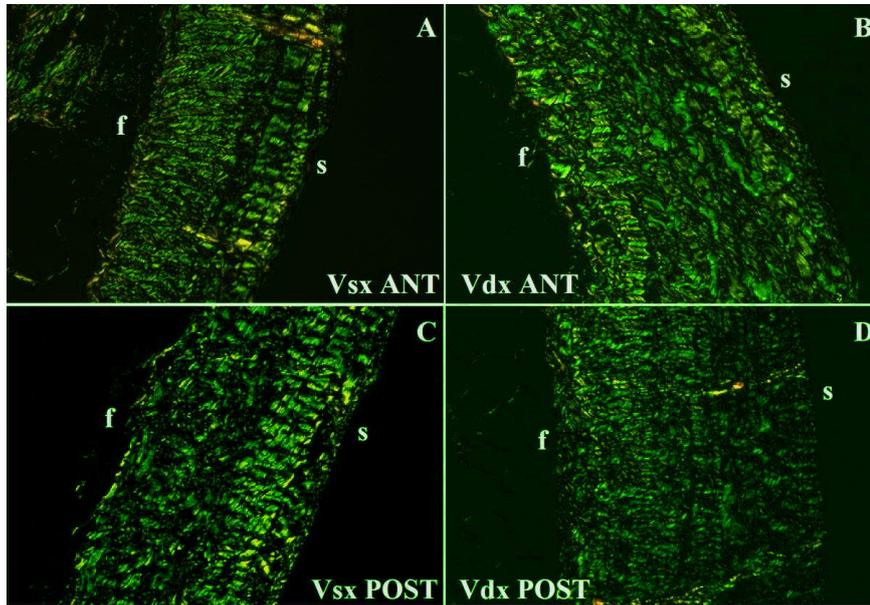


Figura 4.33: *Microscopia a luce polarizzata delle aree del PBV Nativo colorate con il Picrosirius Red. Le fibre collagene sono visibili in colore prevalentemente verde con sfumature di giallo. Nel VsxANT (immagine A) esse presentano una disposizione spaziale preferenziale resa evidente dalle ondulazioni dei fasci di fibre (Ing10X). f= superficie fibrosa, s= superficie sierosa*

mangono delle regioni in cui le fibre di collagene presentano un andamento non ondulatorio. Sembra quindi che il trattamento TRITDOC, conservi l'organizzazione delle fibre collagene nel VsxANT accentuandone l'andamento ondulatorio e la modifichi nelle altre aree, rendendola più definita e simile a quella del VsxANT.

Microscopia a luce polarizzata: PP

Anche per il PP è stata eseguita la colorazione con il Picrosirius Red e i campioni sono stati osservati al microscopio a luce polarizzata. Le aree anatomiche del PP considerate per queste analisi sono state il VdxANT e il VdxPOST. Le fibre collagene si presentano in prevalenza di colore verde nel VdxANT e in prevalenza rosso-arancioni nel VdxPOST (Fig. 4.35). Sono quindi diverse se confrontate con quelle del PBV Nativo in cui si presentavano sostanzialmente verdi. Nel VdxANT del PP Nativo è possibile identificare un andamento delle fibre collagene più regolare, in cui i fasci sono disposti

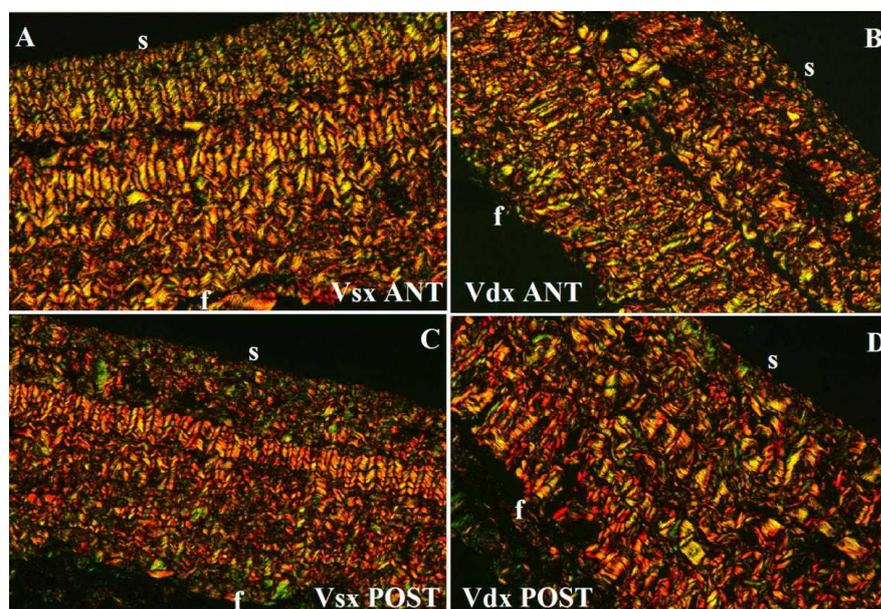


Figura 4.34: *Microscopia a luce polarizzata delle aree del PBV TRITDOC colorate con il Picrosirius Red. Le fibre collagene sono visibili in colore prevalentemente rosso-arancione con sfumature di giallo. f= superficie fibrosa, s= superficie sierosa Ing10X*

a formare delle ondulazioni. Nel VdxPOST invece, le fibre collagene sono orientate diversamente. In alcune zone presentano brevi tratti ondulatori, ma nella maggior parte del tessuto non mostrano questa organizzazione (Fig. 4.35).

Dopo trattamento TRITDOC, nelle due aree anatomiche considerate del PP, le fibre collagene mostrano una colorazione prevalentemente giallo-arancione (Fig. 4.36). Vi è stata quindi una variazione della colorazione visibile al microscopio a luce polarizzata per il VdxANT, che nel Nativo si presentava prevalentemente verde. Nel PP la decellularizzazione sembra alterare leggermente l'orientamento delle fibre collagene nelle due aree anatomiche considerate. Infatti, le caratteristiche ondulazioni delle fibre collagene, osservate nel tessuto nativo (Fig. 4.35), sembrano diventare meno visibili dopo trattamento, soprattutto nel VdxPOST (Fig. 4.36).

Per riassumere le nostre osservazioni, possiamo evidenziare come il trattamento TRITDOC abbia influito sull'organizzazione delle fibre collagene del tessuto pericardico. Nel PBV c'è stata una forte modificazione nella colorazione (birifrangenza) delle fibre colorate con il Picrosirius Red ed osservate al microscopio a luce polarizzata. Inoltre, c'è stato un cambiamento di or-

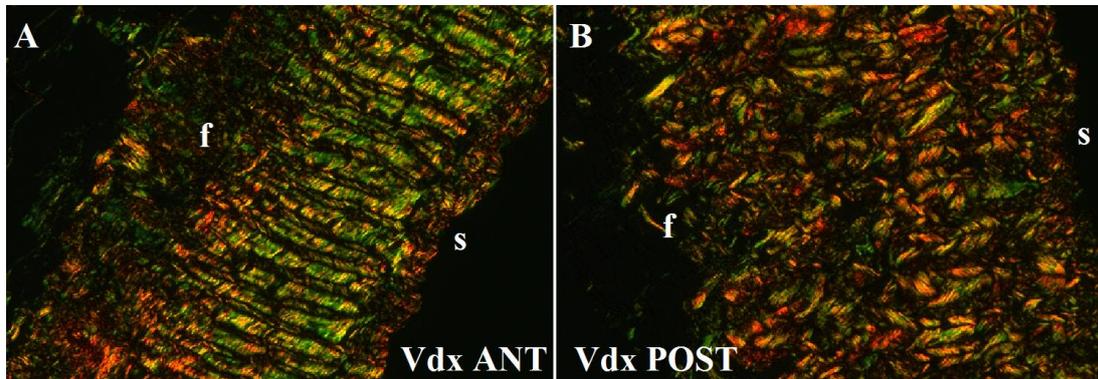


Figura 4.35: *Microscopia a luce polarizzata del VdxANT e del VdxPOST del PP Nativo colorati con il Picrosirius Red. Le fibre collagene sono visibili in colore prevalentemente verde nel VdxANT e in rosso-arancione nel VdxPOST. Il loro andamento ondulatorio è visibile prevalentemente nel VdxANT. f= superficie fibrosa, s= superficie sierosa Ing20X*

ganizzazione delle fibre del collagene: nei campioni Nativi sono disposte a formare delle strutture ondulate nel VsxANT e in alcune zone delle altre aree anatomiche, nei campioni TRITDOC questa disposizione è accentuata in tutto il tessuto.

Nel PP la modificazione della birifrangenza delle fibre collagene è avvenuta in particolare per il VdxANT, ed è stata meno accentuata nel VdxPOST. Contrariamente a quanto visto per il PBV, le fibre collagene dopo trattamento TRITDOC, non risultano essere più ondulate e definite, ma mostrano una disposizione meno definibile.

In Fig. 4.37 sono mostrati degli ingrandimenti delle porzioni del PBV e del PP in cui le fibre collagene sono disposte a formare delle strutture ondulate e regolari.

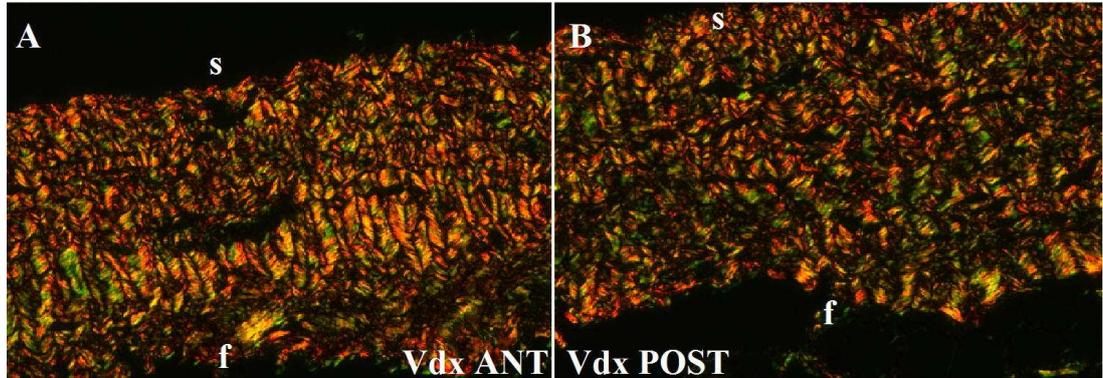


Figura 4.36: *Microscopia a luce polarizzata del VdxANT e del VdxPOST del PP TRITDOC colorati con il Picrosirius Red. Le fibre collagene sono visibili in colore prevalentemente rosso-arancione in entrambe le aree. L'andamento ondulatorio è maggiormente distinguibile nel VdxANT. f= superficie fibrosa, s= superficie sierosa. Ing20X*

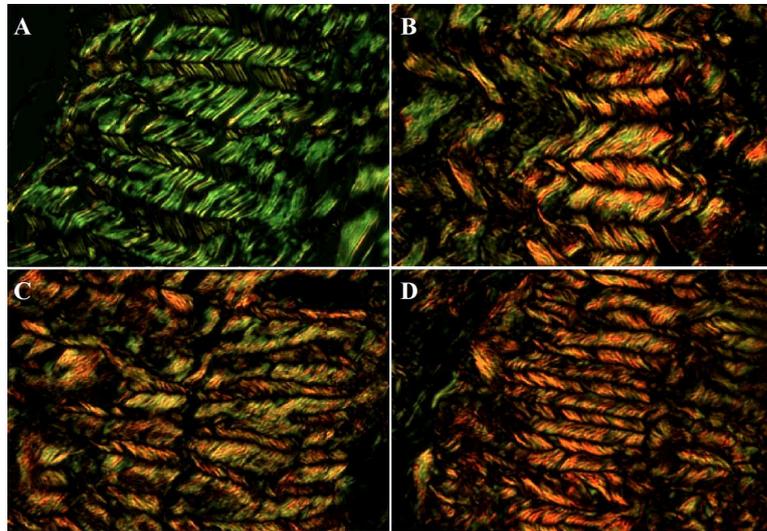


Figura 4.37: *Microscopia a luce polarizzata. A: VsxANT del PBV Nativo. B: VsxANT del PBV TRITDOC. C: VdxANT del PP Nativo. D: VdxANT del PP TRITDOC f= superficie fibrosa, s= superficie sierosa. Ing 40X*

4.3.7 Analisi al Microscopio Elettronico a Trasmissione (TEM)

PBV

Per verificare l'assenza delle componenti cellulari all'interno del tessuto pericardico dopo decellularizzazione e analizzarne la struttura della matrice ed identificare eventuali modificazioni, sono state condotte le analisi al TEM.

Il PBV Nativo mostra uno strato superficiale continuo di cellule mesoteliali, dotate di lunghi microvilli, che poggiano sulla membrana basale (Immagine A in Fig. 4.38). All'interno dello strato fibroso, si riconoscono fibroblasti (pericardiociti), circondati da fasci di fibre collagene ed elastiche (Immagine B in Fig. 4.38). Nel citoplasma dei Pericardiociti sono evidenti numerosi ribosomi e cisterne del reticolo endoplasmatico rugoso e dell'apparato di Golgi, di aspetto vescicolare. I fasci di fibre collagene mostrano un orientamento fortemente anisotropo: i fasci si intrecciano con angolature diverse (Immagine B e C in Fig. 4.38). Tuttavia, all'interno di ogni fascio, le fibre sono orientate in modo uniforme e parallelo tra di loro (Immagine C e D in Fig. 4.38) e risultano strettamente ravvicinate. Inframmezzate alle fibre collagene, si riconoscono le fibre elastiche, numericamente inferiori alle prime. Quando le fibre elastiche sono tagliate trasversalmente, si riesce a distinguerne la componente micro-fibrillare che circonda esternamente quella glicoproteica amorfa (Immagine D in Fig. 4.38).

Nel PBV TRITDOC, il trattamento ha rimosso efficacemente sia le cellule mesoteliali dello strato sieroso sia i pericardiociti dello strato fibroso. Si possono evidenziare ampie fenestrazioni e spazi vuoti, probabilmente lasciati proprio dalla rimozione degli elementi cellulari interstiziali (Immagine E in Fig. 4.38). I fasci di fibre collagene sembrano conservare il loro orientamento anisotropo dopo decellularizzazione. Tuttavia, lo spazio tra i fasci sembra essere aumentato determinando un'architettura più lassa. Le fibre collagene all'interno dei fasci risultano più compatte, e probabilmente possiedono un diametro trasverso ridotto rispetto alle fibre del Pericardio Nativo (Immagine F in Fig. 4.38). In prossimità della superficie, sia sierosa che fibrosa, la struttura della MEC risulta danneggiata, perdendo la propria compattezza e organizzazione (Immagine E in Fig. 4.38). Le fibre elastiche sembrano più dense rispetto a quelle del tessuto nativo e sono circondate da spazio vuoto che le separa dai circostanti fasci di fibre collagene (Immagine F in Fig. 4.38).

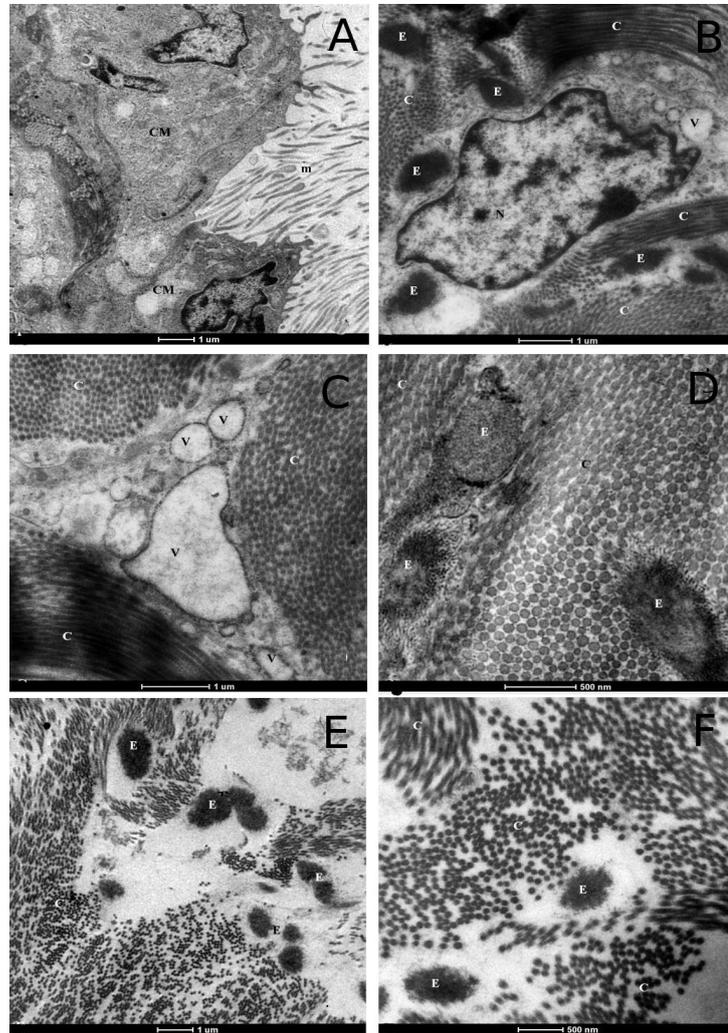


Figura 4.38: *TEM del PBV Nativo (A,B,C,D) e TRITDOC (E,F)*. A: strato sieroso con cellule mesoteliali. B: pericardiocita circondato da fibre collagene ed elastiche nello strato fibroso. C: dettaglio degli allungamenti cellulari di un Pericardiocita. D: dettaglio delle fibre collagene ed elastiche. E: strato fibroso in prossimità della superficie sierosa con fenestrazioni, fibre collagene ed elastiche, dopo decellularizzazione. F: dettaglio delle fibre collagene ed elastiche dopo trattamento TRITDOC (CM=Cellule Mesoteliali; m=microvilli; E=fibre elastiche; C=fibre collagene; N=Nucleo; V=cisterne vescicolari di reticolo endoplasmatico rugoso)

PP

Sulla superficie sierosa del PP Nativo, si riconosce uno strato continuo di cellule mesoteliali che poggiano sulla membrana basale. A differenza del PBV, nel PP queste cellule presentano dei microvilli più corti (Immagine A in Fig. 4.39). La struttura dello strato fibroso ricalca quella del PBV: numerosi Pericardiociti con lunghe propaggini cellulari, inframmezzati ai fasci di fibre collagene e di elastina (Immagine A e B in Fig. 4.39). Le fibre collagene hanno un orientamento parallelo tra di loro all'interno dei fasci che invece si intrecciano con angolature diverse (Immagine A, b e C in Fig. 4.39).

Il trattamento di decellularizzazione sembra efficace nel rimuovere tutte le cellule del tessuto: sia il mesotelio della superficie sierosa, sia i Pericardiociti dello strato fibroso. Anche nel PP si riconoscono spazi vuoti nello strato fibroso, probabilmente lasciati dai fibroblasti rimossi dal trattamento (Immagine E in Fig. 4.39). I fasci di fibre collagene conservano il loro orientamento anisotropo dopo decellularizzazione e risultano più distanziati. Mentre le fibre collagene ed elastiche appaiono più compatte e dense (Immagine F in Fig. 4.39). La MEC appare più disorganizzata e danneggiata in prossimità della superficie sierosa e fibrosa (Immagine E in Fig. 4.39).

4.3.8 Presenza dell'antigene α -Gal

La presenza dell'antigene xenogenico α -Gal nel tessuto di PBV e PP Nativo e TRITDOC, è stato determinato quantitativamente attraverso un test di tipo ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) come descritto nella Sez. 3.18 dei Materiali e Metodi. Il contenuto di antigeni è espresso come numero di epitopi per 10mg di tessuto, i campioni analizzati sono stati 6 per il PP Nativo e TRITDOC e il PBV TRITDOC e 9 per il PBV Nativo. Come mostrato in Fig. 4.40, il PP presenta un quantitativo di epitopi significativamente inferiore ($p < 0,05$) rispetto al PBV. Dopo decellularizzazione TRITDOC in entrambi i tessuti l'antigene α -Gal è praticamente assente.

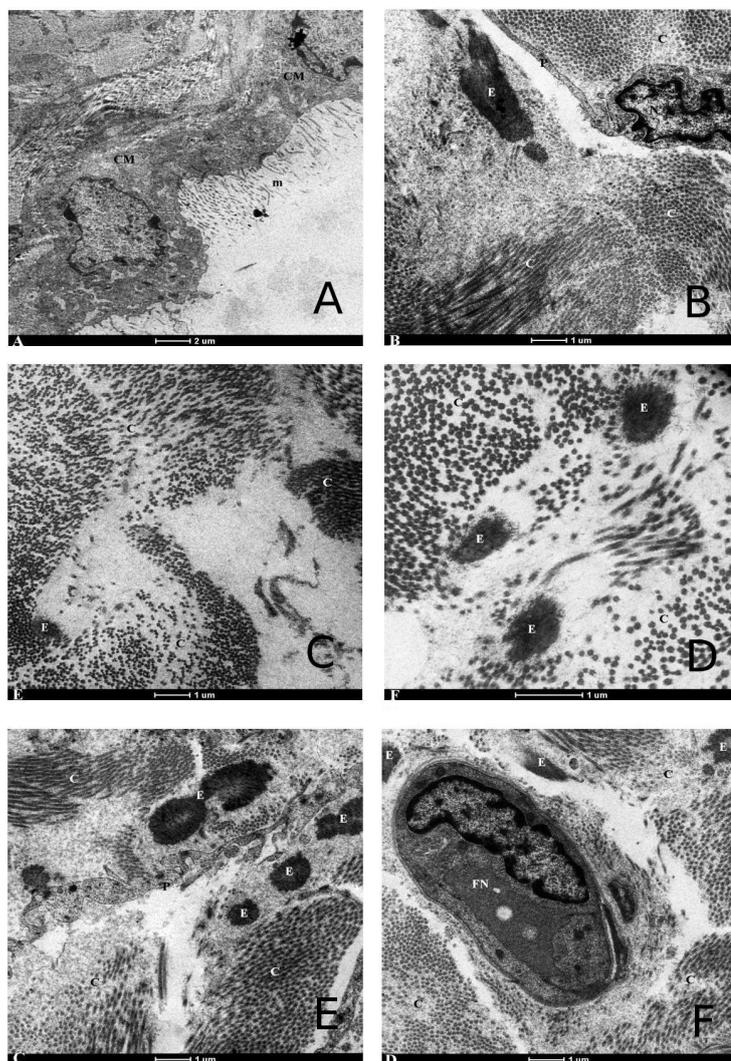


Figura 4.39: *TEM del PP Nativo (A,B,C,D) e TRITDOC (E,F)*. A: strato sieroso con cellule mesoteliali. B: pericardiocita circondato da fibre collagene ed elastiche nello strato fibroso. C: dettaglio delle propaggini cellulari di un Pericardiocita. D: dettaglio delle fibre collagene ed elastiche. E: strato fibroso in prossimità della superficie sierosa con fenestrazioni, fibre collagene ed elastiche, dopo decellularizzazione. F: dettaglio delle fibre collagene ed elastiche dopo trattamento TRITDOC (CM=Cellule Mesoteliali; m=microvilli; E=fibre elastiche; C=fibre collagene; N=Nucleo; P=propaggini cellulari; FN=fibra nervosa)

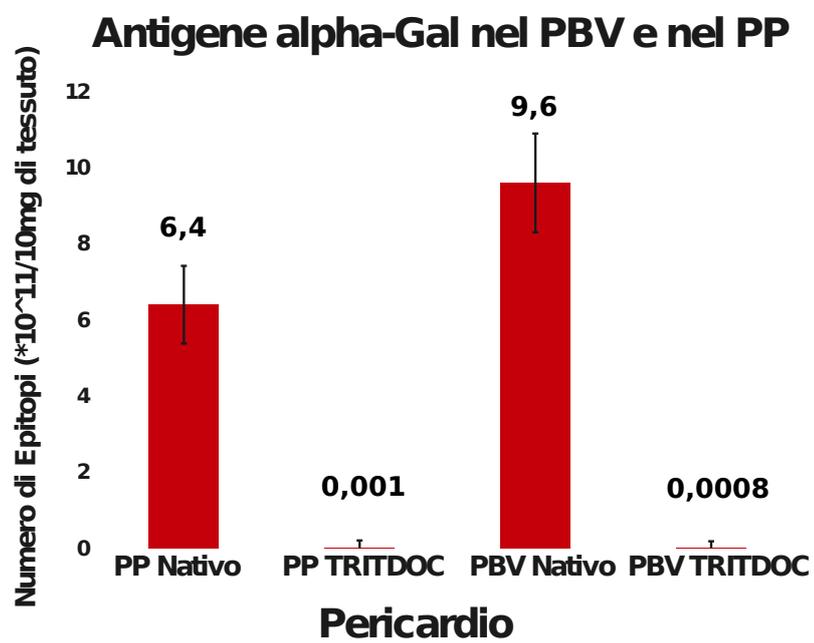


Figura 4.40: *Contenuto di epitopi dell'antigene α -Gal nel PBV e nel PP prima e dopo decellularizzazione TRITDOC*

Capitolo 5

Discussione

Le protesi biologiche xenografts attualmente utilizzate per le sostituzioni valvolari cardiache, vanno incontro a degenerazione strutturale entro 10-15 anni dall'impianto e per questo nel 30% dei casi devo essere espianate e sostituite [60, 65]. Uno dei motivi principali di questa degenerazione è la fissazione del tessuto xenogenico con glutaraldeide. Questo fissativo è utilizzato per sterilizzare il tessuto, mascherare la componente cellulare ed antigenica e per rendere il tessuto con cui la bioprotesi viene costruita, più resistente dal punto di vista meccanico. Questo trattamento però impedisce il ripopolamento cellulare da parte delle cellule autologhe del paziente [29, 62].

L'Ingegneria Tissutale delle Valvole Cardiache (TEHV) si propone di evitare l'utilizzo della glutaraldeide. L'eliminazione della componente cellulare avviene attraverso la decellularizzazione del tessuto xenogenico. Questa componente, se non eliminata, indurrebbe infatti una rapida reazione di rigetto conosciuta come *rigetto iperacuto*. Successivamente, una volta eliminate le cellule xenogeniche, vi è il potenziale ripopolamento cellulare dello scaffolds con cellule staminali o cellule somatiche autologhe del paziente per creare protesi vitali, non immunogeniche e di durata probabilmente più lunga [38].

Esistono diversi metodi di decellularizzazione utilizzati. Come descritto nella Sez. 2.7 dell'Introduzione, i diversi trattamenti differiscono per l'efficacia nel rimuovere le cellule e i detriti cellulari, per la capacità di preservare la struttura e la funzione della MEC e per la suscettibilità alla semina cellulare [89]. Tutti però devono soddisfare precisi requisiti considerati indispensabili, quali:

- devono rimuovere tutte le cellule valvolari, i loro residui cellulari e i loro epitopi antigenici [90]

- devono conservare la struttura della MEC, dalla cui integrità dipende una corretta funzione valvolare. Un trattamento tissutale aggressivo può alterare le proprietà meccaniche, elastiche ed emodinamiche della TEHVs [91]
- deve produrre un substrato adeguato per la ricellularizzazione. Quindi, deve conservare una struttura tridimensionale e la membrana basale, che hanno un ruolo fondamentale nella crescita e migrazione cellulare ed eliminare i residui citotossici di detergente, per permettere la replicazione e la crescita cellulare [33, 90]

Il nostro approccio di TEHV ha previsto l'utilizzo di Pericardio Bovino adulto (PB), di Vitello (PBV) e di Pericardio Porcino (PP), tessuti xenogenici impiegati per la costruzione di bioprotesi cardiache tradizionali e percutanee. Questi tessuti sono stati decellularizzati attraverso diverse metodiche che utilizzano detergenti in condizioni non denaturanti (TRITON X-100, Colato di sodio, Deossicolato di sodio, e Taurodeossicolato di sodio), abbinati a soluzioni ipo ed ipertoniche, inibitori di proteasi ed endonucleasi.

Il metodo TRICOL (TRITON X-100 e COLato di sodio) è stato utilizzato in quanto il primo ad essere stato sviluppato e testato nel nostro laboratorio. Il metodo UTRIDOC (Urea, TRITON X-100 e DeOssiColato di sodio) è stato usato invece, perchè è il metodo "più aggressivo", con maggiore capacità "estrattiva" nei confronti dei componenti della Matrice ExtraCellulare (MEC). Entrambi sono stati impiegati per gli esperimenti iniziali sul PB.

Il metodo TRITDOC (TRITON X-100 e TauroDeOssiColato di sodio) è stato usato in quanto metodo "innovativo" di decellularizzazione poichè impiega il Taurodeossicolato di Sodio, un detergente mai utilizzato precedentemente, dalle proprietà chimiche particolarmente interessanti (vedi Introduzione Sez. 2.7.2). Il protocollo di decellularizzazione TRITDOC è stato testato su tutti i tessuti scelti per il nostro studio (PB, PBV e PP).

Le analisi istologiche con H&E e la marcatura nucleare con DAPI, hanno evidenziato la completa decellularizzazione dei tessuti pericardici con tutti tre i metodi di decellularizzazione. Tutti i detergenti (Colato, Deossicolato e Taurodeossicolato di Sodio) utilizzati in associazione al TRITON X-100 sono stati in grado di eliminare la componente cellulare sia a livello della superficie sierosa del tessuto pericardico sia all'interno della MEC. Inoltre, le analisi al Microscopio Elettronico a Trasmissione (TEM) condotte sul PBV e sul PP prima e dopo decellularizzazione con metodo TRITDOC, hanno confermato l'assenza delle cellule nel tessuto pericardico. Al loro posto sono presenti degli spazi che separano le fibre collagene e le fibre elastiche. Inoltre, come confermato dai risultati ottenuti con i Test ELISA per l'antigene α -Gal, viene eliminata anche questa componente antigenica causa del rigetto

iperacuto negli impianti di tessuti xenogenici ([88]). Questo è un risultato fondamentale in quanto non tutti i protocolli di decellularizzazione utilizzati sperimentalmente e commercialmente sono in grado di eliminare l'antigene α -Gal [87, 88]. Non solo, questo epitopo è stato identificato, nonostante la fissazione in glutaraldeide, anche in alcune bioprotesi disponibili in commercio, e si è dimostrato capace di stimolare la risposta del sistema immunitario dei pazienti in cui la protesi era impiantata [86]. Se l'induzione di una risposta immuno-specifica contro questo antigene possa contribuire alla degenerazione valvolare, non è ancora stato chiarito. Nonostante ciò sarebbe chiaramente desiderabile evitare ogni reazione che possa compromettere la funzionalità della valvola impiantata, sia essa una valvola fissata in glutaraldeide o una valvola ingegnerizzata.

I protocolli di decellularizzazione che abbiamo utilizzato sembrano costituire quindi, dei protocolli estremamente promettenti da utilizzare nella TEHV per eliminare le cellule xenogeniche e la componente immunogenica dai tessuti pericardici. Essi soddisfano totalmente il primo requisito fondamentale che deve possedere un metodo di decellularizzazione. Ovviamente, per essere dei protocolli completi e pienamente applicabili devono soddisfare gli altri requisiti che consentano di produrre degli scaffolds adeguati alla costruzione di una valvola cardiaca ingegnerizzata [89, 91, 33, 90]. Il lavoro svolto con questa tesi ha avuto proprio lo scopo di verificare se parte di questi requisiti fossero soddisfatti dai protocolli di decellularizzazione TRICOL, UTRIDOC e TRITDOC.

Come visto, un metodo di decellularizzazione deve conservare la struttura della MEC, dalla cui integrità dipende una corretta funzione valvolare. Per comprendere con maggiore chiarezza gli effetti dei nostri protocolli di decellularizzazione sulla struttura della matrice del tessuto pericardico e trarre delle conclusioni, si possono analizzare i risultati ottenuti con le tecniche istologiche, immunoistochimiche e microscopiche:

1. Ematossilina & Eosina (H&E). Nell'osservare i campioni di PB, di PBV e di PP TRICOL, UTRIDOC e TRITDOC al microscopio, si è verificato che l'organizzazione generale della MEC è mantenuta, le fibre collagene appaiono più definite e compatte rispetto al tessuto non decellularizzato e si distinguono spazi vuoti prima presumibilmente occupati dalla componente cellulare e da molecole "estratte" dal processo di decellularizzazione, come i GAGs.
2. Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM). Le analisi al TEM condotte sul PBV e sul PP prima e dopo decellularizzazione con metodo TRITDOC, hanno confermato il compattamento delle fibre collage-

ne che era stato grossolanamente osservato con la colorazione istologica H&E. Hanno inoltre evidenziato un maggior compattamento anche delle fibre elastiche e un certo grado di “disfacimento” della MEC in corrispondenza della superficie del tessuto.

3. Picrosirius Red e Microscopia a luce polarizzata. Il tessuto pericardico è un materiale anisotropo, in cui i fasci di fibre collagene sono birifrangenti. La birifrangenza è la scomposizione di un raggio di luce in due raggi che avviene quando esso attraversa particolari mezzi anisotropi, a seconda della polarizzazione della luce. Sfruttando questa proprietà e osservando al microscopio a luce polarizzata sezioni di pericardio è possibile evidenziare la disposizione spaziale dei fasci di fibre collagene. Diverse zone anatomiche, Ventricolo Sinistro Anteriore (VsxANT), Ventricolo Sinistro Posteriore (VsxPOST), Ventricolo Destro Anteriore (VdxANT) e Ventricolo Destro posteriore (VdxPOST) del PBV e del PP, sono state analizzate dopo colorazione con Picrosirius Red (che esalta la birifrangenza naturale delle fibre collagene), utilizzando un microscopio a luce polarizzata prima e dopo trattamento TRITDOC. Nel PBV e nel PP Nativi si può identificare una zona in cui le fibre collagene sono prevalentemente disposte parallele alla direzione di osservazione e i fasci di fibre si organizzano a formare delle strutture ondulate chiaramente distinguibili. Nel PBV questa zona è il VsxANT e nel PP il VdxANT. Questa disposizione è maggiormente “ordinata” rispetto a quella che si riscontra nelle altre zone, in cui le fibre collagene si incrociano senza avere una direzione preferenziale di organizzazione. Questa struttura delle fibre collagene potrebbe avere degli effetti sulle proprietà meccaniche delle diverse zone del tessuto pericardico analizzato. Nella prospettiva di utilizzare questo biomateriale per la costruzione di bioprotesi valvolari cardiache, è importante quindi studiare il suo comportamento se sottoposto a situazioni di stress biomeccanico come quelle che si verificano durante il funzionamento valvolare cardiaco. Esso deve infatti essere in grado di sopportare il “lavoro” svolto dalle valvole cardiache per garantire alla protesi un corretto funzionamento e una lunga durata ([42, 43, 26]. Attualmente, a seguito delle analisi condotte con la microscopia a luce polarizzata, sono in corso degli esperimenti di stress-strain (vedi Sez. 2.2.3 dell’Introduzione) sulle diverse aree anatomiche del PBV e del PP per comprendere come l’andamento (ondulato o meno) dei fasci di fibre collagene influisca sulle proprietà meccaniche del tessuto sia prima che dopo decellularizzazione con metodo TRITDOC. Il trattamento TRITDOC ha avuto infatti delle conseguenze sull’organizzazione dei fasci di fibre collagene che potrebbero aver portato a un

cambiamento nelle proprietà di resistenza meccanica del tessuto.

Nel PBV TRITDOC l'osservazione alla luce polarizzata, ha evidenziato un incremento della disposizione ondulata del collagene in tutte le zone anatomiche considerate. Inoltre, mentre nel tessuto Nativo i fasci di fibre appaiono di colore prevalentemente verde, nel PBV TRITDOC la colorazione è in prevalenza rosso-arancione. Dati presenti in letteratura, suggeriscono che questa variazione di colorazione visibile al microscopio a luce polarizzata, potrebbe indicare un cambiamento nell'organizzazione strutturale delle fibre del collagene [139].

Nel PP vi è stato un cambiamento analogo. La modificazione però è stata meno evidente. I campioni Nativi presentavano già una colorazione prevalentemente arancione-rosso dei fasci delle fibre collagene. Questo pattern è stato accentuato dal trattamento di decellularizzazione. L'andamento ondulato e più regolare delle fibre collagene nel VdxANT e in alcune zone del VdxPOST, sembra invece sia stato in parte perduto. I test meccanici che si stanno eseguendo chiariranno come i cambiamenti avvenuti nell'organizzazione della matrice abbiano influito sulle proprietà di resistenza allo stress meccanico del PBV e del PP TRITDOC. E' noto comunque, che l'architettura delle fibre collagene del Pericardio mostra una variabilità all'interno dello stesso sacco e tra sacchi pericardici diversi ([24]) come conseguenza delle forze fisiologiche eterogenee a cui è sottoposto il tessuto. In generale i siti ottimali scelti per la produzione di bioprotesi valvolari cardiache, sono quelli in cui vi è una bassa variazione nell'orientamento delle fibre collagene ([24]). Anche per la produzione e i test odierni delle Percutaneous Aortic Valve (PAVs) vengono usate quelle aree del PB e del PP in cui le fibre collagene sono allineate prevalentemente in una direzione, poichè posseggono delle proprietà meccaniche superiori alle altre zone [140]. Quindi teoricamente secondo le nostre analisi, il VsxANT per il PBV e il VdxAT per il PP sono le due zone ideali dal punto di vista dell'orientamento delle fibre collagene.

Come descritto, il trattamento di decellularizzazione ha avuto effetti in parte diversi sul PBV e sul PP. Nel valutare questo bisogna tenere conto anche del fatto che i tessuti nativi di partenza provenivano da animali non ancora adulti nel caso del PBV e da animali invece già "maturi" nel caso del PP. Il colore (e quindi le proprietà di Birifrangenza) con cui appaiono le fibre collagene colorate con il Picrosirius Red ed osservate al microscopio a luce polarizzata, varia in tessuti di animali adulti rispetto a quelli di animali "giovani" [139]. In particolare il collagene non ancora "maturo" appare verde-giallo mentre quello "maturo"

arancione-rosso. Questo indica che con il processo di maturazione del tessuto connettivo cambia l'organizzazione spaziale, e il grado di "addensamento", delle fibre collagene. Questo potrebbe spiegare perché il PBV Nativo presentava una colorazione in prevalenza verde, mentre il PP Nativo una colorazione in prevalenza arancione-rossa. La variazione di colorazione avvenuta dopo decellularizzazione ha portato un aumento della Birifrangenza del collagene in tutti i campioni di PBV e PP (colorazione arancione-rossa). Questo cambiamento non può essere dovuto a una "maturazione" fisiologica delle fibre collagene, ma è probabilmente da attribuire all'aumento del compattamento e quindi della densità delle fibre stesse, avvenuto sul PBV e sul PP dopo trattamento TRITDOC. E' riconosciuto infatti, che fibre più spesse, formate da fibrille più densamente impaccate, colorate con Picrosirius Red presentano alla luce polarizzata un colore arancione-rosso, mentre le fibre più sottili, formate da fibrille meno addensate, presentano una colorazione giallo-verde [139]. Come visto, un presumibile aumento del compattamento delle fibre collagene era stato messo in evidenza per mezzo della colorazione con H&E e attraverso le analisi con il TEM e, come vedremo in seguito nel corso di questa trattazione, verrà evidenziato anche con le prove fisiche condotte sul tessuto pericardico.

4. Immunoistochimica (IHC). La presenza e distribuzione del Collagene I, dell'elastina e del Collagene IV nel tessuto pericardico è stata valutata sul PB prima e dopo decellularizzazione UTRIDOC, utilizzando la "marcatura" con Anticorpi specifici. Quello che si è evidenziato è che questa "marcatura" si mostra meno intensa nei campioni decellularizzati, in particolare per l'elastina. E' probabile che questa minore reattività sia stata causata dalla perdita o dal "mascheramento", in seguito al processo di decellularizzazione, di siti specifici a cui si legano gli anticorpi usati per le analisi di IHC. L'addensamento delle fibre collagene e dell'elastina potrebbero, per esempio, essere state causa di questa condizione.

Per quanto riguarda quindi la capacità o meno di mantenere inalterata la struttura della MEC possiamo dire che il metodo di decellularizzazione che è stato maggiormente valutato da questo punto di vista è stato il metodo TRITDOC, in quanto metodo non ancora studiato per la produzione di scaffolds per la TEHV. Inoltre, abbiamo voluto confrontare gli effetti che questo protocollo di decellularizzazione produceva sul tessuto pericardico, con quelli evidenziati su radici aortiche porcine (risultati in pubblicazione). Le nostre analisi del PBV e del PP prima e dopo trattamento TRITDOC hanno

mostrato che il protocollo mantiene l'organizzazione generale della MEC pericardica, provocando però l'addensamento delle fibre collagene e delle fibre elastiche, una esigua variazione nella disposizione spaziale delle fibre collagene in alcune aree del tessuto e la "disgregazione" dello stesso a livello delle superfici sierosa e fibrosa. D'altronde, quest'ultima condizione potrebbe non essere stata causata dal trattamento, ma dal procedimento utilizzato per la preparazione dei campioni per le osservazioni al TEM. In ogni modo, per valutare se queste modificazioni siano influenti sulle proprietà meccaniche del tessuto sono in corso, come accennato precedentemente, dei test di Stress-Strain. Solo queste ulteriori analisi ci permetteranno di capire se le diverse aree anatomiche (V_{sxANT} , V_{sxPOST} , V_{dxANT} e V_{dxPOST}) del PBV e del PP TRITDOC abbiano diverse proprietà meccaniche. In base a questo, successivamente si potranno indirizzare i nuovi esperimenti (di semina cellulare per esempio) in modo da aumentare le possibilità di selezionare il tessuto (e la zona) più adatto quale biomateriale di partenza per la TEHV.

Le caratteristiche strutturali della MEC del tessuto pericardico UTRIDOC e TRICOL sono invece state valutate attraverso le analisi istologiche con la colorazione H&E e le analisi IHC. Possiamo quindi fare solamente delle considerazioni "grossolane" sugli effetti che questi protocolli hanno avuto sull'organizzazione della matrice del PB. L' H&E e la marcatura anticorpale mostrano che non c'è stata una evidente disorganizzazione delle componenti della MEC, ma non avendo analisi più approfondite a disposizione, come analisi al TEM o alla luce polarizzata, non possiamo valutare con accuratezza i cambiamenti avvenuti nel PB UTRIDOC e TRICOL. Anche se attualmente ci stiamo concentrando sul metodo di decellularizzazione TRITDOC, gli studi proseguiranno anche sugli altri metodi di decellularizzazione come il metodo TRICOL. Il protocollo UTRIDOC è stato invece momentaneamente "abbandonato". Nonostante non comporti apparentemente dei cambiamenti importanti nella struttura delle MEC del PB, studi precedentemente condotti hanno mostrato come questo procedimento, se paragonato al protocollo TRICOL per esempio, abbia un maggiore effetto di "estrazione" di componenti della MEC (Collagene, Elastina e GAGs). Tutti e tre i metodi producono, in ogni modo, una matrice più "porosa" rispetto a quella del tessuto pericardico nativo. Questo è dovuto in parte all'eliminazione della componente cellulare, in parte alla perdita di componenti della MEC (Collagene, Elastina e GAGs), e con molta probabilità, anche all'impaccamento delle fibre collagene e delle fibre elastiche. La "porosità" dei biomateriali per Ingegneria Tissutale (TE) è una caratteristica molto importante per permettere alle cellule, *in-vitro* o *in-vivo*, di colonizzare lo scaffolds entrando al suo interno [141]. In alcuni studi, accanto al protocollo di decellularizzazione vengono utilizzati specifici agenti, come l'acido acetico, proprio per aumentare la porosità della matrice

e quindi incrementare la penetrazione cellulare [141]. I protocolli di decellularizzazione UTRIDOC, TRICOL e TRITDOC mostrano quindi anche delle proprietà di aumento della porosità del PB, del PBV e del PP. Per verificare che questa porosità fosse effettivamente vantaggiosa per l'attecchimento cellulare e la colonizzazione del tessuto da parte delle cellule, il lavoro di questa tesi ha compreso anche degli esperimenti preliminari di semina *in-vitro*. Questi esperimenti ci hanno posto di fronte a diverse problematiche, come la scelta della tipologia di cellule da seminare.

La scelta della popolazione cellulare da utilizzare in TEHV è infatti di fondamentale importanza. Innanzitutto, per evitare risposte immunitarie dell'organismo in cui la futura protesi valvolare verrà impiantata, le cellule devono essere di origine umana, idealmente dello stesso paziente in cui verrà impiantata la valvola. Poi, le cellule seminate dovrebbero essere in grado di colonizzare lo scaffold andando a formare un endotelio che ricopra il tessuto ingegnerizzato e differenziandosi nei tipi cellulari normalmente presenti all'interno della matrice delle valvole native, come i miofibroblasti, le cellule muscolari lisce e i fibroblasti [34]. Le cellule utilizzate sperimentalmente possono essere cellule differenziate come quelle appena citate, o meno differenziate come cellule endoteliali progenitrici circolanti (EPCs) o cellule staminali come le cellule mesenchimali [142, 113].

Nel nostro caso volevamo innanzitutto verificare che i PB UTRIDOC e TRICOL, con cui avevamo cominciato a lavorare, non fossero citotossici. Nel tessuto decellularizzato possono infatti rimanere residui di detergenti provenienti dal protocollo di decellularizzazione utilizzato. Questi residui se presenti in sufficiente quantità possono provocare la morte delle cellule che vengono a contatto con il tessuto. Per questo inizialmente per le semine cellulari non sono state utilizzate cellule di origine umana ma sono stati utilizzati fibroblasti isolati da PB (Pericardiociti). Prendendo in considerazione dati presenti in letteratura [101, 120], le cellule sono state seminate a due differenti densità (750mila e 2milioni di cellule/cm²) in presenza o meno di Siero Fetale Bovino (FBS), in modo da verificare quale fosse quella che produceva un'adesione e/o una migrazione cellulare migliore. Inoltre il tempo di semina è stato di 6h e 18h per valutare l'adesione delle cellule al tessuto e di 7 giorni per verificare una possibile migrazione delle cellule nella MEC.

Le semine su PB UTRIDOC hanno mostrato che a 6h e a 18h le cellule aderiscono alla superficie sierosa in modo simile per entrambe le densità di semina, con o senza FBS. A 7 giorni i Pericardiociti sono presenti al di sotto della superficie sierosa, all'interno della MEC del PB UTRIDOC e TRICOL. Qualitativamente questa infiltrazione iniziale sembra essere migliore alla densità di semina di 750mila cellule/cm² e simile per i due tipi di scaffolds pericardici utilizzati. Le analisi di Immunoistochimica (IHC) inoltre, hanno

mostrato che i Pericardiociti adesi alla superficie dei pericardi decellularizzati e che sono migrati al loro interno, esprimono la proteina Procollagene I. Questo indica che le cellule mantengono un metabolismo attivo anche quando presenti sul e nel tessuto. Nonostante questi esperimenti posseggano delle limitazioni dovute al fatto che le cellule utilizzate appartengono alla stessa specie animale che ha fornito lo scaffolds di semina, essi hanno fornito delle indicazioni incoraggianti. Innanzitutto i trattamenti di decellularizzazione non sembravano lasciare nella matrice sostanze citotossiche o perlomeno non in quantità tale da determinare la morte dei Pericardiociti. Inoltre queste cellule, non solo aderiscono alla superficie di semina del tessuto, ma iniziano a infiltrarsi tra le fibre del connettivo. La penetrazione delle cellule nelle matrici degli scaffolds per TEHV è una condizione fondamentale per creare una bioprotesi che sia vitale e responsiva nei confronti degli stimoli biomeccanici a cui è sottoposta. In particolare i fibroblasti e i miofibroblasti sono le principali cellule che secernono e rimodellano la matrice extracellulare nei lembi valvolari cardiaci [113]. E' quindi fondamentale che siano presenti all'interno del tessuto ingegnerizzato per la costruzione delle bioprotesi valvolari cardiache. La loro attività di secrezione e rimodellamento del collagene e dell'elastina consentirebbe alla bioprotesi di rispondere agli stimoli meccanici e patofisiologici dell'organismo.

A questo punto, grazie a una collaborazione con il dipartimento di Ingegneria chimica, si delineava la possibilità di continuare gli esperimenti di semina cellulare con Pericardiociti trattando il PB UTRIDOC con una sequenza peptidica adesiva sintetica. Questo trattamento poteva aumentare l'adesione e/o la migrazione dei fibroblasti nel tessuto, diminuendo anche la densità cellulare necessaria nelle semine (condizione vantaggiosa nell'eventualità di utilizzo di cellule difficilmente reperibili e/o particolarmente delicate quando coltivate in vitro). Il peptide che avevamo a disposizione conteneva quattro sequenze amminoacide RGD (arginina, glicina, acido aspartico). Questa sequenza è naturalmente presente in molecole del tessuto connettivo come il collagene e la fibronectina e viene riconosciuta dalle cellule attraverso le integrine, che la legano [143]. Questa interazione è fondamentale per l'adesione e il comportamento cellulare così come per il signalling del ciclo cellulare. Inoltre, la sequenza RGD è la sequenza più usata per stimolare l'adesione cellulare su superfici artificiali e su biomateriali anche in ambito cardiovascolare [132, 130, 131, 133]. La coniugazione di peptidi che contengono questa sequenza, su scaffolds per l'ingegneria tessutale delle valvole cardiache potrebbe migliorare l'efficienza dell'adesione e della proliferazione cellulare [141]. Per quanto riguarda il peptide che abbiamo valutato per il proseguimento del lavoro, era stato testato per la sua capacità di aumentare l'adesività cellulare in vitro e in vivo utilizzando superfici biomimetiche,

cellule osteoblastiche ed endoteliali [144, 131, 145, 146]. Per cui dopo aver valutato la compatibilità del procedimento di coniugazione del peptide al PB UTRIDOC, sono iniziate le semine cellulari, utilizzando due quantitativi di cellule nettamente inferiori (100mila e 50mila cellule/cm²) rispetto a quelli utilizzati precedentemente sul tessuto non coniugato con peptide [147, 148]. Inoltre si è deciso di valutare l'adesione a poche ore dalla semina (30 minuti e 3h), in modo da capire la "cinetica" con cui avveniva questo processo. La valutazione dell'adesione è stata fatta attraverso preparati istologici quindi in termini qualitativi. A 30 minuti con entrambe le densità di semina le cellule aderiscono alla superficie sierosa sia al PB non trattato sia al PB trattato con il peptide adesivo, anche se non formano uno strato continuo. A 3h i Pericardiociti invece, formano un monostrato continuo di cellule sulla superficie degli scaffolds funzionalizzati con il peptide, mentre questo non avviene sul PB UTRIDOC di controllo in cui le cellule adese formano uno strato discontinuo. Sembra quindi che dopo 3h i Pericardiociti traggano vantaggio dalla presenza del peptide sulla superficie del PB UTRIDOC rimanendo presenti in numero maggiore rispetto alla superficie del PB UTRIDOC di controllo. Le analisi di IHC hanno comunque mostrato che in entrambi i tipi di PB le cellule sono metabolicamente attive ed esprimono Procollagene I.

Il peptide adesivo sintetico che abbiamo utilizzato sembra quindi avere delle potenzialità nell'aumentare l'adesione cellulare sullo scaffolds pericardico studiato. Ulteriori studi dovranno essere condotti per confermare le nostre osservazioni, in particolare utilizzando PB decellularizzato con altri metodi come il TRICOL e il TRITDOC e seminato con altre tipologie cellulari, possibilmente di origine umana. In particolare, dato che questo peptide rimane legato alla superficie del PB decellularizzato, potrebbe essere utile nel promuovere l'adesione di cellule endoteliali. Nell'Ingegneria Tissutale delle valvole cardiache (TEHV) vengono ampiamente utilizzate cellule vascolari endoteliali umane di diversa origine come cellule vascolari periferiche [?, 149], cellule vascolari del cordone ombelicale [150, 151], cellule endoteliali da sangue di cordone ombelicale [126], cellule endoteliali progenitrici (EPCs) [101] cellule endoteliali isolate dalla vena safena (HSVEC) [152, 147], cellule endoteliali venose ombelicali (HUVEC) [148]. Il motivo per cui questo tipo di cellule viene ampiamente utilizzato nelle semine in vitro è che la loro presenza sulla superficie degli scaffolds per ingegneria tissutale li dovrebbe rendere antitrombotici [120, 121, 122]. Questa proprietà è fondamentale per le bioprotesi valvolari ingegnerizzate per impedire il loro deterioramento e garantire la loro funzionalità una volta che siano state impiantate. I fenomeni trombotici (così come quelli infiammatori) deriverebbero dall'esposizione delle componenti della matrice tissutale della protesi stessa o da una sua endotelizzazione inadeguata [153, 124]. Questo può avvenire soprattutto in

quei casi in cui i procedimenti di decellularizzazione utilizzati non preservino la membrana basale del tessuto [122, 110, 79]. Nel nostro caso abbiamo visto che dopo trattamento UTRIDOC il Collagene IV della membrana basale era ancora presente a livello della superficie sierosa del PB, dove sono stati seminati i Pericardiociti. Questa può essere stata una condizione che ha permesso l'adesione delle cellule e rappresenta una indicazione positiva sui trattamenti di decellularizzazione che abbiamo utilizzato.

Considerando questi aspetti e avendo a disposizione Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUVEC), si è deciso di continuare gli esperimenti di semina cellulare su PB decellularizzato UTRIDOC e TRITDOC utilizzando queste cellule. Inizialmente sono stati eseguiti esperimenti per valutare le migliori condizioni sperimentali per la semina sul PB UTRIDOC (analogamente a quanto era stato fatto con i Pericardiociti). Le densità di semina erano 100mila e 50mila cellule/cm² per 1h, 3h e 5h. Le HUVEC utilizzate sono state inoltre seminate a diversi passaggi cellulari (p3, p5 e p9). La valutazione dell'adesione cellulare è avvenuta attraverso analisi istologiche con H&E e attraverso test colorimetrici di Adesione (Landegren) e Vitalità (MTT). Le analisi istologiche hanno mostrato che per tutte le condizioni considerate le HUVEC non formavano un monostrato continuo sulla superficie di semina del PB UTRIDOC, ma aderivano solamente in alcuni punti del tessuto. Il test di adesione Landegren condotto ai tempi di semina di 1h e 3h ha evidenziato che a 1h il numero di HUVEC al passaggio p3 e p5 che aderisce al PB UTRIDOC è paragonabile, mentre quello delle HUVEC p9 è significativamente inferiore. A 3h dalla semina, il numero di cellule adese decresce in maniera significativa all'aumentare del passaggio cellulare. Questo indica che HUVEC più "vecchie" hanno una capacità minore di aderire al PB UTRIDOC e che questa condizione è maggiormente visibile dopo la prima ora di semina, probabilmente a causa di un processo cellulare graduale di adattamento in cui le HUVEC più "giovani" riescono ad aderire meglio al tessuto. Il test di adesione Landegren condotto su cellule HUVEC adese su piastra ha mostrato invece una tendenza opposta. Il numero di HUVEC che aderisce al substrato è maggiore all'aumentare del passaggio cellulare. Questo è evidente in particolar modo a 3h dalla semina cellulare, ma è presente anche ad 1h. Supponiamo che questo differente comportamento che le HUVEC mostrano in realtà sia dovuto al test colorimetrico che abbiamo utilizzato. E' noto infatti che le cellule HUVEC coltivate su piastra vanno incontro a una senescenza progressiva [154] con il passare del tempo in coltura. E quindi, presumibilmente anche a una capacità minore di "reagire" a stimoli come quelli di adesione. Nel test di Landegren [155] viene sfruttata l'attività delle esosaminidasi lisosomiali delle cellule vitali. La soluzione di reazione del Test contiene un substrato cromogeno che viene convertito da

questi enzimi. L'intensità della colorazione del prodotto della reazione può essere misurata allo spettrofotometro a una determinata lunghezza d'onda. Questa intensità è riportata essere proporzionale al numero delle cellule che hanno convertito il substrato cromogeno [155]. In realtà possono verificarsi dei casi in cui l'attività misurata delle esosaminidasi lisosomiali è più elevata non perchè il numero di cellule adese è maggiore, ma perchè ogni singola cellula è più attiva [155]. Probabilmente il PB UTRIDOC è un substrato che riesce ad attivare in maniera minore gli enzimi lisosomiali delle cellule HUVEC che sono più senescenti. La coltivazione su piastra invece, ha l'effetto opposto anche se non necessariamente comporta un numero maggiore di cellule adese.

Visto che le HUVEC, restando in coltura per 1h e 3h, non riuscivano a formare uno strato continuo sulla superficie di semina del PB UTRIDOC, abbiamo deciso di aumentare i tempi a 24h e 7 giorni, mantenendo una densità di semina di 50mila cellule/cm² e di utilizzare come substrato anche il PB decellularizzato con metodo TRITDOC. All'analisi istologica dopo 24h, si osserva la presenza di cellule sulla superficie sierosa, ma sono presenti in maniera discontinua. Dopo 7 giorni le HUVEC sul PB TRITDOC formano un monostrato continuo mentre quelle sul PB UTRIDOC, anche se visibili e adese in numero maggiore rispetto alle 24h, non riescono ancora a formarlo. L'IHC ha inoltre evidenziato che lo strato di HUVEC adese esprime il Von Willebrand Factor e il CD31, due marcatori di fenotipo endoteliale. Al tempo di semina di 7 giorni è stato eseguito anche il Test colorimetrico MTT. Analogamente al test di Landegren, questo test sfrutta l'attività enzimatica delle cellule vitali per convertire un substrato incolore in un prodotto colorato, la cui intensità di colorazione può essere misurata spettrofotometricamente. In questo caso gli enzimi "sfruttati" sono le deidrogenasi mitocondriali che trasformano l'MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide) in formazano. In letteratura è riportato che l'assorbanza del prodotto della reazione è proporzionale al numero di cellule ma che cellule attivate (come linfociti T attivati dall'interleuchina-2) possono produrre più formazano rispetto a cellule non attivate, anche in assenza di proliferazione [156]. Il test MTT (e il suo analogo MTS) viene utilizzato frequentemente negli esperimenti di ingegneria tissutale delle valvole cardiache, per valutare la vitalità e/o lo stato di proliferazione delle cellule seminate sugli scaffolds [157, 120, 112] e in alcuni casi anche per valutare il numero effettivo di cellule aderenti [158]. Nel nostro caso abbiamo osservato che a 1h di semina il numero di cellule HUVEC che aderiva al PB UTRIDOC e TRITDOC era paragonabile mentre a 7 giorni il numero era significativamente superiore sul PB TRITDOC rispetto al PB UTRIDOC. Quindi il Test MTT confermava le osservazioni fatte attraverso i preparati istologici. Da questi esperimenti abbiamo potuto

evidenziare che il PB TRITDOC è un substrato più adatto per l'adesione delle cellule HUVEC rispetto al PB UTRIDOC. Con tutta probabilità la presenza del TauroDeOssiColato (TDOC) rispetto al DeOssiColato (DOC) è il motivo di questo. Il DOC è un detergente che viene eliminato più difficilmente dal tessuto rispetto al TDOC e forse esso possiede un certo grado di tossicità nei confronti delle HUVEC (tossicità che non era stata evidenziata seminando i pericardiociti) [159, 87]. Attraverso queste prove di semina cellulare, abbiamo quindi voluto valutare in maniera preliminare se i protocolli di decellularizzazione UTRIDOC, TRICOL e TRITDOC producessero un PB adatto ad essere ricellularizzato e quindi utilizzato nella TEHV. Dai risultati ottenuti si può affermare innanzitutto, che tutti e tre i protocolli consentono l'adesione cellulare e non sono citotossici. Il PB UTRIDOC e TRICOL sono inoltre degli scaffolds in cui cellule fibroblastiche bovine invadono la MEC. Il confronto tra PB UTRIDOC e TRITDOC ha poi mostrato che il secondo substrato è più adatto alla formazione di uno strato endoteliale quando vengono utilizzate cellule HUVEC. I metodi di decellularizzazione utilizzati soddisfano, almeno in maniera preliminare, il requisito di creare uno scaffolds adatto alla ricellularizzazione e che non contiene sostanze citotossiche.

Visto che il PB TRITDOC si era rivelato così promettente per il potenziamento di endotelizzazione, sono stati approfonditi gli effetti di questo trattamento sul PBV e sul PP. In particolare sono state prese in considerazione le variazioni di alcune caratteristiche fisiche dei tessuti dopo decellularizzazione. Questo tipo di indagini erano già state condotte dopo l'applicazione del protocollo TRITDOC a radici aortiche porcine. Abbiamo ritenuto quindi opportuno indagare anche le caratteristiche fisiche del tessuto pericardico perchè esse possono influenzarne le proprietà meccaniche. Sono stati analizzati lo spessore, la densità e il contenuto d'acqua. Come per le analisi condotte con la microscopia a luce polarizzata, allo stesso modo i Pericardi analizzati sono stati suddivisi in quattro zone (VsxANT, VsxPOST, VdxANT e VdxPOST) per meglio individuare quella che possedesse le caratteristiche ideali per la costruzione di una TEHV. Questa scelta è stata fatta anche in base a dati presenti in letteratura. In questi studi, il PBV veniva suddiviso in diverse aree e venivano studiati lo spessore e la distribuzione delle fibre collagene e in alcuni casi la correlazione esistente con la resistenza meccanica [85, 160, 24].

Il nostro studio ci ha permesso di stimare che il PBV Nativo ha uno spessore medio di $0,0526 \pm 0,0052$ cm, con variazioni non significative ($p > 0,05$) tra lo spessore medio delle diverse aree anatomiche considerate (VsxANT, VdxANT, VsxPOST, VdxPOST). Anche se non significativamente diverso, lo spessore medio dell'area che ricopre il VdxANT risulta maggiore rispetto a quello delle altre aree. Questo dato non è inaspettato dato che la vicinanza di questa zona ai legamenti sterno-pericardici determina un incremento dello

spessore del tessuto. Nonostante questo, bisogna tener conto anche dell'elevata variabilità che esiste tra i sacchi pericardici di diversi animali (variabilità inter-individuale). Nella nostra analisi le differenze inter-individuali dello spessore medio si sono dimostrate significative ($p < 0,05$). L'area che ha dimostrato la maggiore variabilità è stata quella che ricopre il VdxANT, con uno spessore che varia tra 0,0362 cm e 0,848 cm, (Varianza 2,5E-0,4), mentre quella che ha evidenziato una maggiore uniformità di spessore ricopre il VsxANT, e presenta degli spessori che variano tra 0,0341 cm e 0,0608 cm (Varianza 1,5E-0,5). La variabilità inter-individuale dello spessore osservata nel tessuto nativo si è mantenuta significativa ($p < 0,05$) anche dopo trattamento. L'area che ricopre il VdxANT presenta una variabilità maggiore (0,0343-0,0856 cm, con Varianza 1,2E-0,4) rispetto a tutte le zone considerate, mentre quella al di sopra del VsxANT mostra una variabilità inferiore (0,0367-0,0534 cm con Varianza 2,3E-0,5). Questi dati sullo spessore sono supportati da precedenti valutazioni di Trowbridge [85], Simionescu [160] e Hiester [24] che rilevarono aree di tessuto più spesse in prossimità dei legamenti sterno-pericardici e aree con maggiore uniformità di spessore al di sopra del Vsx, soprattutto in prossimità della regione apicale. Dopo trattamento TRITDOC, lo spessore medio del PBV è risultato di $0,0488 \pm 0,0086$ cm, senza significative ($p > 0,05$) differenze tra le varie aree considerate. La decellularizzazione non sembra quindi aver modificato significativamente lo spessore del tessuto. Escludendo l'area che ricopre il del PBV e del PP prima e dopo decellularizzazione TRITDOCVdxPOST, dove si è registrata una lieve tendenza all'aumento dello spessore dopo decellularizzazione, nelle altre aree considerate si è registrata una tendenza statisticamente significativa ($p < 0,05$) alla diminuzione dello spessore, del $-9,73 \pm 5,15\%$ dopo trattamento TRITDOC. Questa tendenza alla diminuzione dello spessore nelle singole aree è molto interessante se consideriamo gli scopi di questo studio: individuare quale siano il tessuto e la zona anatomica del tessuto pericardico bovino e porcino, più adatti ad essere utilizzati come biomateriali nella TEHV. Il PB utilizzato per la costruzione di bioprotesi valvolari cardiache impiantate chirurgicamente ha uno spessore medio di 0,04 cm e quello utilizzato per le Percutaneous Aortic Valves (PAVs) uno spessore di 0,025 cm. Le nostre misurazioni indicano dei valori leggermente superiori a 0,04 cm, ma indicano anche un'elevata variabilità inter-individuale dei sacchi pericardici e una tendenza alla diminuzione dello spessore dopo trattamento TRITDOC. Si può quindi pensare che, per quanto riguarda lo spessore del tessuto, il PBV TRITDOC potrebbe rappresentare uno scaffolds promettente per la TEHV in particolare per le PAVs che necessitano spessori tali da consentire alla valvola, (eventualmente costruita a partire dal tessuto decellularizzato) di essere compressa e introdotta in cateteri di piccolo diametro. Selezionando le aree del PBV meno spesse

prima e dopo trattamento TRITDOC e aggiungendo il trattamento utilizzato industrialmente per omogeneizzare e comprimere il tessuto, si potrebbero ottenere degli scaffolds maggiormente adatti per le PAVs rispetto a quelli fissati in glutaraldeide attualmente utilizzati. Nonostante però uno spessore minore possa costituire un vantaggio per la costruzione di PAVs potrebbe anche rappresentare una limitazione per la resistenza meccanica del tessuto. Sembra infatti che minore sia lo spessore con cui vengono costruiti i lembi delle PAVs, minore sia la resistenza del tessuto allo stress meccanico [69].

Continuando con l'analizzare le proprietà fisiche del PBV, vediamo che la sua densità media è risultata di $1,049 \pm 0,0035$ g/ml. Nonostante non si sia registrata una differenza significativa ($p > 0,05$) dei valori medi di densità tra le varie aree, la sua variabilità inter-individuale è piuttosto marcata ($p < 0,05$). Come nel caso dello spessore, l'area con variabilità maggiore della densità è risultata al di sopra del VdxANT ($1,043$ - $1,056$ g/ml, con Varianza $1,9E-0,5$), mentre quella con variabilità minore ricopre il VsxANT ($1,044$ - $1,056$ g/ml, con Varianza $4,4E-0,6$). Dopo decellularizzazione, la densità media è risultata $1,057 \pm 0,0028$ g/ml, con un incremento medio di $+0,61 \pm 0,05\%$, rispetto alla densità del tessuto nativo. Tale aumento della densità media dopo trattamento è risultato significativo ($p < 0,05$), anche se in valore assoluto non era molto elevato (da $1,049$ a $1,057$ g/ml). La variabilità inter-individuale della densità sembrerebbe ridursi dopo trattamento ($p > 0,05$), tranne che per l'area che ricopre il VsxANT. Quest'area possedeva già prima del trattamento TRITDOC una ridotta variabilità intrinseca ($1,045$ - $1,064$ g/ml, con Varianza $6,2E-0,6$) rispetto alle altre aree considerate. La densità sembrerebbe essere fortemente influenzata da fattori individuali, che verrebbero uniformati dalla decellularizzazione, rendendo il tessuto più omogeneo per questa caratteristica fisica, al contrario di quello che è stato osservato per lo spessore.

Per quanto riguarda la terza caratteristica fisica presa in esame, abbiamo rilevato un contenuto d'acqua medio nel PBV nativo di $81,83 \pm 1,052\%$ rispetto al peso umido del tessuto, senza differenze significative tra i valori medi delle varie aree del tessuto. Le differenze inter-individuali risultano tuttavia significative ($p < 0,05$) nel caso delle zone che ricoprono il VsxANT e il Vdx-POST. Mentre nelle aree del tessuto che rivestono il VsxPOST e il VdxANT, la diversità del contenuto d'acqua tra i diversi animali non risulta significativa ($p > 0,05$). Dopo trattamento TRITDOC, il contenuto d'acqua medio del PBV risulta di $78,40 \pm 1,695\%$, con una riduzione media del $-4,16 \pm 0,76\%$, statisticamente significativa ($p < 0,05$) in tutte le aree considerate. Questa riduzione del contenuto d'acqua potrebbe spiegare l'incremento di densità e la lieve diminuzione dello spessore osservate. La variabilità inter-individuale del contenuto d'acqua del tessuto invece, sembra essere incrementata dalla decellularizzazione, soprattutto nei settori nelle zone del VsxPOST ($51,97$ - $79,70\%$,

con Varianza 38,4) e il VdxPOST (74,00-91,25%, con Varianza 67,2).

In conclusione, nel PBV il trattamento TRITDOC causa una lieve riduzione dello spessore ($p>0,05$), un incremento della densità ($p<0,05$) e una parziale disidratazione del tessuto ($p<0,05$). Queste modifiche delle proprietà fisiche, nell'insieme, potrebbero avere una ricaduta sulle proprietà meccaniche del pericardio trattato, come ad esempio sulla sua resistenza alla trazione e/o compressione. Questo, come già discusso in precedenza, potrebbe a sua volta influire sull'utilizzo del PBV TRITDOC per la futura realizzazione di una TEHV. L'aumento della densità per esempio, potrebbe diminuire la resistenza meccanica e la diminuzione della percentuale d'acqua del tessuto potrebbe portare a un tessuto più rigido e/o meno adatto al ripopolamento cellulare. Questi effetti sono in corso di verifica, anche se non trattati in questa tesi. Nonostante queste considerazioni possiamo affermare che dopo trattamento TRITDOC, l'area del PBV con spessore, densità e contenuto d'acqua più costanti tra diversi animali e all'interno dello stesso sacco pericardico, è quella che riveste il VsxANT. Secondo le nostre analisi, ipotizziamo che questa zona sia una buona candidata come fonte di biomateriale per la costruzione di TEHVs in quanto presenta una minore variabilità rispetto alle altre zone. Inoltre, in base al nostro campionamento il VsxANT risulta essere anche quello con superficie maggiore.

Al contrario del PBV, attualmente in letteratura sono presenti solo pochi studi sulle proprietà fisiche, meccaniche e ultrastrutturali del tessuto pericardico porcino fissato in glutaraldeide o dopo decellularizzazione [161, 69]. L'interesse nei suoi riguardi è cresciuto negli ultimi anni quale tessuto impiegato per la fabbricazione delle PAVs, impiantate con procedura TAVI. Lo spessore minore del Pericardio Porcino (PP) ne rende più agevole la compressione sui cateteri di rilascio utilizzati per l'impianto della protesi per via transfemorale retrograda o per via transapicale.

Dal nostro studio lo spessore medio del PP Nativo è $0,0189\pm 0,0060$ cm, senza significative differenze tra i valori medi delle varie aree anatomiche ($p>0,05$). Anche per questo tessuto si è riscontrata una significativa variabilità inter-individuale ($p<0,05$), che sembra quindi essere prerogativa del tessuto pericardico, a prescindere dalla specie di appartenenza. L'area che presenta una maggiore uniformità dello spessore è rappresentata da quella che ricopre il VdxANT (0,0126-0,0250 cm, con Varianza 9,0E-0,6), mentre la zona con variabilità maggiore è rappresentata dall'area del VdxPOST (0,0090-0,0372, con Varianza 2,6E-0,4). Dopo trattamento TRITDOC, lo spessore medio del PP è $0,0190\pm 0,0079$, sostanzialmente invariato rispetto allo spessore del tessuto nativo ($p>0,05$). Tuttavia, le zone anteriori del PP hanno mostrato una tendenza non significativa ($p>0,05$) all'incremento dello spessore del $+13,32\pm 1,58\%$ dopo decellularizzazione, mentre nelle zone po-

steriori si è registrata una tendenza non significativa ($p > 0,05$) alla riduzione dello spessore del $-13,48 \pm 9,33\%$ post-TRITDOC. Inoltre, tra le diverse aree del PP, lo spessore medio non risulta significativamente diverso ($p > 0,05$). La variabilità inter-individuale dello spessore sembra essere accentuata dal trattamento TRITDOC rispetto a quella osservata nel tessuto nativo, soprattutto per l'area che ricopre il VdxANT, che presenta la variabilità di spessore maggiore dopo decellularizzazione ($0,0103-0,0440$ cm, con Varianza $2,1E-0,5$). L'area che invece presenta uno spessore più omogeneo dopo trattamento è quella che ricopre il VsxANT ($0,0113-0,0434$ cm, con Varianza $1,2E-0,5$). I dati dello spessore del PP ottenuti con le nostre misurazioni, concordano con quelli presenti in letteratura [69] e supportano le motivazioni dell'utilizzo del PP per la costruzione delle PAVs. Come già visto infatti, lo spessore tipico dei lembi in pericardio in una protesi di questo tipo è di $0,025$ cm. Poichè questi spessori, anche se adatti alla costruzione di protesi valvolari cardiache percutanee, sembrano diminuire la resistenza meccanica del tessuto, attualmente sono in fase di studio, anche da parte del nostro gruppo, le proprietà meccaniche del PP prima e dopo decellularizzazione TRITDOC. Questo tipo di decellularizzazione anche se sembra mantenere invariato lo spessore del PP, potrebbe influire su altre proprietà del tessuto e quindi sulle sue proprietà meccaniche. Di seguito analizzeremo gli effetti sulla densità e sul contenuto d'acqua.

La densità media del PP nativo è $1,059 \pm 0,0058$, senza significative differenze dei valori medi tra le diverse aree anatomiche considerate ($p > 0,05$). Il PP nativo risulta più omogeneo per spessore e più eterogeneo per densità, con una significativa variabilità inter-individuale della densità ($p < 0,05$). Dopo trattamento TRITDOC la densità media è risultata $1,062 \pm 0,0080$ g/ml senza modifiche statisticamente significative ($p > 0,05$) rispetto a quella registrata nel tessuto nativo. L'unica area in cui si è osservata una variazione significativa (incremento del $+0,95\%$) è quella che ricopre il VsxPOST. A differenza del PBV, nel PP non si è osservata un'omogeneizzazione della densità dopo trattamento TRITDOC: la variabilità interindividuale del tessuto nativo rimane significativa ($p < 0,05$) anche dopo decellularizzazione, tranne che per l'area al di sopra del VdxPOST. Infatti in questa zona la differenza di densità tra diversi individui non risulta significativa ($p > 0,05$).

Nel PP Nativo, il contenuto d'acqua medio è $70,87 \pm 6,306\%$, senza significative differenze tra i valori medi delle varie aree considerate ($p > 0,05$). Per questo parametro fisico esiste una variabilità inter-individuale significativa ($p < 0,05$) nelle aree di sinistra del tessuto, mentre in quelle di destra il contenuto d'acqua risulta più omogeneo tra i diversi animali ($p > 0,05$). Dopo decellularizzazione, il contenuto d'acqua medio è $64,59 \pm 8,128\%$, con una riduzione significativa ($p < 0,05$) del $-7,80 \pm 2,88\%$, rispetto a quello del PP

nativo. Considerando le aree anatomiche d'interesse, la riduzione del contenuto d'acqua è significativa nel VdxANT e nel VsxANT ($p < 0,05$), mentre non è significativa ($p > 0,05$) nel VdxPOST e nel VsxPOST, forse a causa di una maggiore variabilità inter-individuale di queste aree.

In conclusione, dopo decellularizzazione del PP, lo spessore e il contenuto d'acqua hanno subito un cambiamento diverso nelle aree anteriori e posteriori. Infatti, nelle aree del PP che rivestono i Vsx e dxANT lo spessore medio tende ad aumentare dopo trattamento, anche se non significativamente ($p > 0,05$), mentre il contenuto d'acqua si riduce in modo evidente e significativo ($p < 0,05$). Al contrario, nelle aree del PP che rivestono i Vsx e dxPOST lo spessore e il contenuto d'acqua si riducono in modo non significativo ($p > 0,05$). Infine dopo trattamento, la densità media del PP non si è modificata significativamente ($p > 0,05$). Tuttavia, nelle diverse aree del tessuto si è registrato un cambiamento eterogeneo della densità media dopo trattamento. Nella zona che riveste il VdxANT la densità media è risultata invariata rispetto al controllo nativo, mentre nell'area al di sopra del VsxPOST la densità è aumentata significativamente ($p < 0,05$) dopo decellularizzazione. Nelle restanti aree i cambiamenti di densità registrati dopo protocollo TRITDOC sono risultati non significativi ($p > 0,05$). Quindi, sembra che la decellularizzazione riduca il contenuto d'acqua del tessuto e causi una riduzione dello spessore parallela ad un incremento della densità nel VdxPOST e nel VsxPOST del PP. Nel VdxANT e nel VsxANT, invece, lo spessore e la densità sembrano essere maggiormente conservati dalla decellularizzazione, rispetto al controllo nativo. L'area del PP nativo più omogenea per spessore, densità e contenuto d'acqua sembra essere quella che ricopre il VdxANT. Tuttavia il trattamento TRITDOC aumenta la variabilità inter-individuale dei parametri fisici considerati in tutte le aree d'interesse, compresa quella al di sopra del VdxANT. Tenendo in considerazione queste osservazioni, questa zona del PP potrebbe essere più adatta come fonte di materiale per la TE delle valvole cardiache.

Mettendo a confronto le proprietà fisiche del pericardio delle due specie di mammifero analizzate emerge che il PP presenta uno spessore significativamente inferiore ($p < 0,05$) rispetto al PBV, sia prima che dopo decellularizzazione. La variabilità interindividuale dello spessore del PP è confrontabile con quella del PB, anche dopo trattamento TRITDOC. Se consideriamo lo spessore del tessuto quindi, il PP, dato il suo minore spessore, sembrerebbe il tessuto pericardico più adatto per la costruzione delle PAVs, consentendo il crimpaggio della protesi su cateteri di calibro minore. Il PBV, invece, sarebbe meglio candidato alla costruzione delle bioprotesi tradizionali o di PAVs di diametro maggiore.

La densità media del PP, nativo e dopo trattamento, è superiore rispetto

a quella registrata nel PBV nativo e TRITDOC. Questa differenza nel tessuto nativo delle due specie di mammifero è risultata significativa ($p < 0,05$) per tutte le aree considerate, tranne che per quella che riveste il VsxPOST, forse a causa di una variabilità intraspecie troppo diversa per essere confrontata tra PP e PBV. Nel tessuto trattato, la differenza di densità tra PP e PBV è risultata significativa ($p < 0,05$) solo per il VsxPOST, se si considerano le diverse aree. Considerando la densità quindi, il PP risulta essere più eterogeneo e più denso rispetto a quello bovino. Resta ancora da valutare se e come questa differenza di densità dei due tessuti, prima e dopo trattamento TRITDOC, possa riflettersi sulle proprietà meccaniche del PP e PBV. Ad ogni modo, la densità dopo decellularizzazione aumenta in maniera significativa ($p < 0,05$) per entrambi i Pericardi e questo conferma le osservazioni che erano state fatte utilizzando la microscopia elettronica a trasmissione. Le immagini al TEM avevano mostrato infatti delle fibre più elettron-dense nel PBV e nel PP TRITDOC.

Il contenuto d'acqua medio del PP, nativo e dopo decellularizzazione, risulta inferiore rispetto a quello del PBV nativo e TRITDOC. Questa osservazione potrebbe essere alla base della sua minore densità rispetto al PP e potrebbe riflettere la presenza di una maggiore quantità di GAGs. La variabilità del contenuto d'acqua del PP risulta maggiore rispetto al PBV, sia prima sia dopo trattamento. Questo fenomeno potrebbe però essere dovuto anche ad un maggiore errore sperimentale, legato alla difficoltà superiore nel maneggiare un tessuto così sottile quale il PP.

In accordo con le nostre osservazioni possiamo affermare che il protocollo TRITDOC, quando applicato al PBV e al PP, induce un aumento significativo della densità del PBV e una diminuzione significativa del contenuto d'acqua di entrambi i tessuti.

Capitolo 6

Conclusioni e prospettive future

Con il lavoro di questa tesi sono stati testati i protocolli di decellularizzazione UTRIDOC, TRICOL e TRITDOC, applicati a tessuti di origine xenogenica quali il Pericardio Bovino (PB), il Pericardio Bovino di Vitello (PBV) e il Pericardio Porcino (PP).

Tutti i protocolli sono risultati in grado di decellularizzare completamente il PB, di preservare la struttura della Matrice Extracellulare (MEC) e creare uno scaffold “poroso” potenzialmente adatto alla ricellularizzazione.

Esperimenti preliminari di semina cellulare hanno indicato che fibroblasti bovini (Pericardiociti) sono in grado di aderire alla superficie sierosa ed entrare nella MEC dei PB UTRIDOC e TRICOL, rimanendo metabolicamente attivi. Il trattamento di questi due scaffolds con una sequenza peptidica proadesiva sintetica contenente il peptide RGD, sembra inoltre aumentare la capacità dei Pericardiociti di aderire alla loro superficie sierosa.

Cellule endoteliali di origine umana, HUVEC, seminate per almeno 5h su PB UTRIDOC, non riescono invece a formare un monostrato endoteliale continuo sulla superficie di semina dello scaffold. Questa condizione è maggiormente evidente se vengono utilizzate cellule ad un passaggio superiore. HUVEC “giovani” seminate per 7 giorni su PB UTRIDOC e TRITDOC si dispongono invece a formare uno strato non continuo di cellule allungate sul PB UTRIDOC e continuo sul PB TRITDOC. Sembra quindi che questo scaffold sia più promettente per gli esperimenti di ricellularizzazione e quindi come biomateriale da utilizzare nell’Ingegneria Tissutale delle valvole cardiache (TEHV). Per questo motivo è stato utilizzato per decellularizzare anche il PBV e il PP. I due tessuti vengono completamente decellularizzati dal trattamento, che mantiene intatta l’architettura generale della MEC, producendo però una leggera variazione nella disposizione spaziale delle fibre collagene

nel PP. Nel PBV, il trattamento causa una lieve riduzione dello spessore, un incremento della densità e una parziale disidratazione del tessuto. Nel PP la decellularizzazione riduce il contenuto d'acqua del tessuto, determina una riduzione dello spessore ed un incremento della densità nelle zone del VdxPOST e del VsxPOST, mentre non modifica lo spessore e la densità nelle zone del VdxANT e del VsxANT. Le indagini eseguite con test ELISA, hanno inoltre evidenziato che il protocollo TRITDOC è in grado di eliminare la componente xenoantigenica rappresentata dall'epitopo α -Gal.

Il protocollo TRITDOC si profila come un protocollo di decellularizzazione potenzialmente adatto alla produzione di scaffolds acellulari xenogenici, "porosi", con una MEC preservata e in cui non è più presente l'antigene α -Gal. Questi possono essere potenziali biomateriali da utilizzare sia per la creazione di protesi valvolari cardiache tradizionali e percutanee, sia in altri ambiti della Tissue Engineering (TE).

La suddivisione anatomica del pericardio ed il confronto delle proprietà fisiche nelle diverse aree considerate, forniscono elementi di valutazione per la scelta della zona tissutale più adatta da utilizzare per esperimenti futuri di TE e in particolare di TEHV.

Attualmente sono in corso le valutazioni biomeccaniche del PBV e del PP TRITDOC per verificare gli effetti del trattamento di decellularizzazione sulle proprietà di resistenza meccanica dei tessuti. Queste valutazioni consentiranno di individuare in modo più accurato le zone del PBV e del PP più adatte a proseguire gli esperimenti di TE, quali la ricellularizzazione *in-vitro* e successivamente *in-vivo*.

Bibliografia

- [1] Barone R. *Anatomia comparata dei mammiferi domestici*, volume 5. Bortolami R and Callegari E eds, 1993. pp 69 - 74.
- [2] Netter F. *Atlas of Human Anatomy*, chapter Chest:Heart, pages 207 – 225. Masson Publ, Milano, 2005.
- [3] Spodick DH. *The Pericardium*. Dekker M eds, New York, 1997. pp 7-26.
- [4] Ishihara T, Ferrans VJ, Jones M, Boyce SW, Kawanami O, and Roberts WC. Histologic and ultrastructural features of normal human parietal pericardium. *Am J Cardiol*, 46:744 – 753, 1980.
- [5] Fentie IH, Allen DJ, Schenck MH, and Didio LJA. Comparative electron microscopic study of bovine, porcine and human parietal pericardium, as material for cardiac valve bioprostheses. *J Submicrosc Cytol*, 18:53 – 65, 1986.
- [6] Simionescu DT and Kefalides NA. The biosynthesis of proteoglycans and interstitial collagens by bovine pericardial fibroblasts. *Exp Cell Res*, 195:171 – 176, 1991.
- [7] Whittaker M and Ayscough A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. current status and future challenges. *Cell transmission*, 17:3–14, 2000.
- [8] Hardingham TE and Fosang AJ. Proteoglycans: many forms, many functions. *FASEB J*, 6:861 – 870, 1992.
- [9] Sacks MS and Yoganathan AP. Heart valve function: a biomechanical perspective. *Phil Trans R Soc B*, 362:1369 – 1391, 2007.
- [10] Johnson NA, Sengupta S, and Saidi SA. Endothelial cell preparing to die by apoptosis initiate a program of transcriptome and glycome regulation. *FASEB J*, 18:188 – 190, 2004.

- [11] Li S, Harrison D, Carbonetto S, Fassler R, Smith N, and Edgar D. Matrix assembly, regulation and survival function of laminin and its receptors in embryonic stem cell differentiation. *J Cell Biol*, 157:1279 – 1290, 2002.
- [12] Van der Rest M and Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J*, 5:2814 – 2823, 1991.
- [13] Bateman JF, Lamandè SR, and Ramshaw JAM. *Collagen superfamily. In: Extracellular Matrix. Molecular components and interactions.* Gordon and Breach Pub, 1996. pp 22 - 67.
- [14] Naimark WA, Lee JM, Limeback H, and Cheung DT. Correlation of structure and viscoelastic properties in the pericardia of four mammalian species. *Am J Physiol*, 263:1095 – 1106, 1992.
- [15] Courtman DW, Pereira CA, Kashef V, McComb D, Lee JM, and Wilson GJ. Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: Biochemical and mechanical effects of cell extraction. *J Biomed Mater Res*, 28:655 – 666, 1994.
- [16] Hiester ED and Sacks MS. Optimal bovine pericardial tissue selection sites. i. fiber architecture and tissue thickness measurements. *J Biomed Mater Res*, 39:207 – 214, 1998.
- [17] Inoue S. Ultrastructure of basement membranes. *Int Rev Cytol*, 117:57 – 98, 1989.
- [18] Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Watson J. *Molecular biology of the cell.* New York: Garland Publishing Inc, 1994.
- [19] Baharuddin A, Go BT, Firdaus MN, and Abdullah J. Bovine pericardium for dural graft: clinical results in 22 patients. *Clin Neurol Neurosurg*, 104:342 – 344, 2002.
- [20] Backer CL, Mavroudis C, Gerber ME, and Holinger LD. Tracheal surgery in children: an 18-year review of four techniques. *Eur J Cardiothorac Surg*, 19:777 – 784, 2001.
- [21] Rinna C, Ungari C, Saltarel A, Cassoni A, and Reale G. Orbital floor restoration. *J Craniofac Surg*, 16:968–972, 2005.

- [22] Schoof PH, Hazekamp MG, Van Ulzen K, Bartelings MM, et al. Autologous pericardium for ventricular septal defect closure. *J Heart Valve Disease*, 7:407 – 409, 1998.
- [23] Bonnet D, Bonhoeffer P, Sidi D, Kachaner J, Acar P, et al. Surgical angioplasty of the main coronary arteries in children. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 117:352 – 357, 1999.
- [24] Hiester ED and Sacks MS. Optimal bovine pericardial tissue selection sites. ii. cartographic analysis. *J Biomed Mater Res*, 39:215 – 221, 1998.
- [25] Baldacchini NE, Capanna E, Franzoni MF, and Zavanella T. *Anatomia Comparata*. Antonio Delfino editore, 2005.
- [26] Thubrikar M. *The aortic valve 1st ed*. Boca Raton: CRC Press, 1990.
- [27] Westaby S and Piwnica A. *Surgery for Acquired Aortic Valve Disease*. Taylor and Francis, 1997.
- [28] Ho SY. Structure and anatomy of the aortic root. *Eur J Echocardiogr*, 10:i3 – 10, 2009.
- [29] Schoen FJ. Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering. *Circulation*, 118:1864 – 80, 2008.
- [30] Deck JD. Endothelial cell orientation on aortic valve leaflets. *Cardiovasc Res*, 20:760 – 767, 1986.
- [31] Butcher JT, Penrod AM, Garcia AJ, and Nerem RM. Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid flow environments. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24:1429 – 1434, 2004.
- [32] Latif N, Sarathchandra P, Taylor P, Antoniw J, and Yacoub M. Localization and pattern of expression of extracellular matrix components in human heart valves. *J Heart Valve Dis*, 14:218 – 227, 2005.
- [33] Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger de Groot AC, and DeRuiter MC. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardiothorac Surg*, 27:566 – 571, 2005.

- [34] Della Rocca F, Sartore S, Guidolin D, Bertiplaglia B, Gerosa G, Casarotto D, and Pauletto P. Cell composition of the human pulmonary valve: a comparative study with the aortic valve - - the vesalio project. *vitalitate exornatum succedaneum aorticum labore ingegnoso obtinebitur. Ann Thorac Surg*, 70:1594 – 1600, 2000.
- [35] Schoen FJ. Heart valve tissue engineering: quo vadis? *Current opinion in Biotechnology*, 22:698 – 705, 2011.
- [36] Taylor PM, Batten P, Brand NJ, Thomas PS, and Yacoub MH. The cardiac valve interstitial cell. *Int J Biochem Cell Biol*, 35:113 – 118, 2003.
- [37] Knight RL, Wilcox HE, Korossis SA, Fisher J, and Ingham E. The use of acellular matrix for the tissue engineering of cardiac valves. *Proc Inst Mech Eng H*, 222:129 – 143, 2008.
- [38] Sacks, Schoen FJ, and Mayer JE. Bioengineering challenges for heart valve tissue engineering. *Annu Rev Biome Eng*, 11:289 – 313, 2009.
- [39] Valente M, Minarini M, Maizza AF, Bortolotti U, and Thiene G. Heart valve bioprosthesis durability: a challenge to the new generation of porcine valves. *Eur J Cardiothorac Surg*, 6(Suppl 1):s82 – s90, 1992.
- [40] Simionescu DT, Lovekamp JJ, and Vyavahare NR. Degeneration of bioprosthetic heart valve cusp and wall tissues is initiated during tissue preparation: an ultrastructural study. *J Heart Valve Dis*, 12:226 – 234, 2003.
- [41] Yamada H. *Strength of Biological Materials*, volume 111. Williams and Wilkins, Baltimore, 1970.
- [42] Sauren AA, van Hout MC, van Steenhoven AA, Veldpaus FE, and Janssen JD. The mechanical properties of porcine aortic valve tissues. *J Biomech*, 16:327 – 337, 1983.
- [43] Korossis SA, Booth C, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, Fisher J, and Ingham E. Tissue engineering of cardiac valve prostheses ii: biomechanical characterization of decellularized porcine aortic heart valves. *J Heart Valve Dis*, 11:463 – 471, 2002.
- [44] Lung B and Vahanian A. Epidemiology of valvular heart disease in the adult. *Nature Reviews:Cardiology*, 2011.

- [45] Iung B, Baron G, Butchart EG, Delahaye F, Gohlke-Barwolfe C, Levang OW, and Vahanian A. A prospective survey of patients with valvular heart diseases in europe: the euro heart survey on valvular heart disease. *Euro Heart J*, 24:1231 – 1243, Jul 2003.
- [46] Parolari A et al. Nonrheumatic calcific aortic stenosis: an overview from basic science to pharmacological prevention. *Eur J Cardiothorac*, 35:493 – 504, 2009.
- [47] Bonow R, Carabello B, Chatterjee K, de Leon AJ, Faxon D, Freed M, and Shanewise JS. Focused update incorporated into the acc/aha 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the american college of cardiology/american heart association task force on practice guidelines (writing committee to revise the 1998 guidelines for the management of patients with valvular heart disease): endorsed by the society of cardiovascular anesthesiologists, society for cardiovascular angiography and interventions, and society of thoracic surgeons. *Circulation*, 118:e523 – e661, 2008.
- [48] The society of Thoracic Surgeons. Adult cardiac surgery database, executive summary, 10 years sts report-period ending 12/31/2009. <http://www.sts.org/documents/pdf/ndb2010/istHarvestExecutive-Summary%5B15D.pdf>, 2010. online.
- [49] Bramstedt KA. Aortic valve replacement in the elderly: frequently indicated yet frequently denied. *Gerontology*, 49:46 – 49, 2003.
- [50] Rodeš-Cabau J, Webb JG, Cheung A, Ye J, Dumont E, Feindel CM, Osten M, Natarajan MK, Velianou JL, et al. Transcatheter aortic valve implantation for the treatment of severe symptomatic aortic stenosis in patients at very high or prohibitive surgical risk: acute and late outcomes of the multicenter canadian experience. *J Am Coll Cardiol*, 55:1080 – 1090, 2010.
- [51] Thomas M, Schymik G, Walther T, Himbert D, Lefèvre T, Treede H, Eggebrecht H, Rubino P, Michev I, Lange R, Anderson WN, and Wendler O. Thirty-day results of the sapien aortic bioprosthesis european outcome (source) registry: A european registry of transcatheter aortic valve implantation using the edwards sapien valve. *Circulation*, 122:62 – 69, 2010.
- [52] Himbert D, Descoutures F, Al-Attar N, Iung B, Ducrocq G, Détaint D, and Brochet E. Results of transfemoral or transapical aortic valve

- implantation following a uniform assessment in high-risk patients with aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol*, 54:303 – 311, 2009.
- [53] Vongpatanasi W, Hillis LD, and Lange RA. Prosthetic heart valves. *The New England Journal of Medicine*, 335:407 – 416, 1996.
- [54] Silver MD, Gotlieb AI, and Schoen FJ. *Cardiovascular pathology*, chapter Pathology of heart valve substitution with mechanical and tissue prostheses, pages 629 – 677. Churchill Livingstone Pub, Philadelphia, 2001.
- [55] Butany J, Ahluwalia MS, Munroe C, Fayet C, Ahn C, Blit P, Kepron C, Cusimano R.J, and Leask RL. Mechanical heart valve prostheses: identification and evaluation. *Cardiovascular pathology*, 12:1 – –22, 2002.
- [56] Takkenberg JJM, Eijkemans MJC, van Herwerden LA, Steyerberg EW, Lane MM, and Elkins RC. Prognosis after aortic root replacement with cryopreserved allografts in adults. *Ann Thorac Surg*, 75:1482 – 1490, 2003.
- [57] Butany J, Fayet C, Ahluwalia MS, Blit P, Ahn C, Munroe C, Israel N, Cusimano RJ, and Leask RL. Biological replacement heart valves. identification and evaluation. *Cardiovascular Pathology*, 12:119 – 139, 2003.
- [58] Webb JG, Chandavimol M, and Thompson CR. Percutaneous aortic valve implantation retrograde from the femoral artery. *Circulation*, 113:842 – 850, 2006.
- [59] Piazza N, de Jaegere P, Schultz C, Becker AE, Serruys PW, and Anderson RH. Anatomy of the aortic valvar complex and its implications for transcatheter implantation of the aortic valve. *Circ Cardiovasc Intervent*, 1:74 – 81, 2008.
- [60] Grunkemeier GL, Jamieson WRE, Miller DC, and Starr A. Actuarial versus actual risk of porcine structural valve deterioration. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 108:709 – 718, 1994.
- [61] Gallo I, Ruiz B, Nistal F, and Duran CMG. Degeneration in porcine bioprosthetic cardiac valves: incidence of primary tissue failures among 938 bioprostheses at risk. *Am J Cardiol*, 53:1061 – 1065, 1984.

- [62] Valente M, Bortolotti U, and Thiene G. Ultrastructural substrates of dystrophic calcification in porcine bioprosthetic valve failure. *Am J Pathol*, 119:12 – 21, 1985.
- [63] Bailey MT, Pillarisetti S, Xiao H, and Vyavahare NR. Role of elastin in pathologic calcification of xenograft heart valves. *J BioMed Mat Res*, 66:96 – 102, 2003.
- [64] Schoen FJ and Levy RJ. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg*, 79:1072 – 1080, 2005.
- [65] Vesely I, Barber JE, and Ratliff NB. Tissue damage and calcification may be independent mechanisms of bioprosthetic heart valve failure. *Heart Valve Dis*, 10:471 – 477, 2001.
- [66] Thiene G and Valente M. Anticalcification strategies to increase bioprosthetic valve durability. *J Heart Valve Dis*, 20:37 – 44, 2011.
- [67] Vesely I, Boughner D, and Song T. Tissue buckling as a mechanism of bioprosthetic valve failure. *Ann Thorac Surg*, 46:302 – 308, 1988.
- [68] Fisher J and Davies GA. Buckling in bioprosthetic valves. *Ann Thorac Surg*, 48:147 – 148, 1989.
- [69] Kewei LI and Wei Sun. Simulated thin pericardial bioprosthetic valve leaflet deformation under static pressure-only loading conditions: Implications for percutaneous valves. *Annals of Biomedical Engineering*, 8:2690 – 2701, 2010.
- [70] Vesely I. Heart valve tissue engineering. *Circulation Research*, 97:743 – 755, 2005.
- [71] McIntire LV, Greisle HP, Groffith L, et al. Wtec panel report on tissue engineering reaserch. *Loyola College*, 2002.
- [72] Jain R, Rentschler S, and Epstein JA. Notch and cardiac outflow tract development. *Ann NY Acad Sci*, 1188:184 – 190, 2010.
- [73] Mendelson K and Schoen FJ. Heart valve tissue engineering: Concepts, approaches, progress, and challenges. *Ann Biomed Eng*, 12:1799 – 1819, 2006.

- [74] Shimuzu T, Yamato M, Kikuchi A, and Okano T. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials*, 24:2309 – 2316, 2003.
- [75] Dai W, Wold LE, Dow JS, and Kloner RA. Thickening of the infarcted wall by collagen injection improves left ventricular function in rats: a novel approach to preserve cardiac function after myocardial infarction. *J Am Col Cardiol*, 46:714 – 719, 2005.
- [76] Bouten CVC, Dankers PYW, Driesse-Mol A, Pedron S, Brizard AM, and Baaijens FP. Substrates for cardiovascular tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, 63:221 – 241, 2011.
- [77] Rabkin E and Schoen FJ. Cardiovascular tissue engineering. *Cardiovascular pathology*, 11:305 – 317, 2002.
- [78] Rabkin E, Hoerstrup SP, Aikawa M, Mayer JE Jr, and Schoen FJ. Evolution of cell phenotype and extracellular matrix in tissue-engineered heart valves during in-vitro maturation and in-vivo remodeling. *J Heart Valve Dis*, 11:308 – 314, 2002.
- [79] Brody S and Pandit A. Approaches to heart valve tissue engineering scaffold design. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 83:16 – 43, October 2007.
- [80] Meinhart JG, Deutsch M, Fischlein T, Howanietz N, Fröschl A, and Zilla P. Clinical autologous in vitro endothelialization of 153 infrainguinal eptfe grafts. *Ann Thorac Surg*, 71(5 suppl):S327 – S331, may 2001.
- [81] Alferiev I, Stachelek SJ, Lu Z, Fu AL, Sellaro TL, Connolly JM, Bianco RW, Sacks MS, and Levy RJ. Prevention of polyurethane valve cusp calcification with covalently attached bisphosphonate diethylamino moieties. *J Biomed Mater Res*, 66:385 – 395, 2003.
- [82] Leukauf C, Szeles C, Salaymeh L, Grimm M, Grabenwöger M, Losert U, Moritz A, and Wolner E. In vitro and in vivo endothelialization of glutaraldehyde treated bovine pericardium. *J Heart Valve Dis*, 2:230 – 235, 1993.
- [83] Duran CG and Gometza B. New uses of pericardium for valve surgery. In LC D’Alessandro (Ed), editor, *In Heart Surgery 1993, Proceedings of the 5th International Symposium on Cardiac Surgery, Rome, Italy*,

pages 69 – 82. Casa Editrice Scientifica Internazionale, Rome, Italy, 1993.

- [84] Mirsadraee S, Wilcox HE, Korossis SA, Kearney JN, Watterson KG, Fisher J, and Ingham E. Development and characterization of an acellular human pericardial matrix for tissue engineering. *Tissue Engineering*, 4:763 – 773, 2004.
- [85] Trowbridge EA. Mechanical characteristics of pericardial tissue and their relevance to bioprosthetic design. *Biocompatibility*, 5:105 – 172, 1989.
- [86] Konakci KZ, Bohle B, and Blumer R. Alpha-gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery. *Eur J Clin Invest*, 35:17 – 23, 2005.
- [87] Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, Wolner E, Weigel G, and Simon P. Presence and elimination of the xenoantigen gal (alpha1, 3) gal in tissue-engineered heart valves. *Tissue Eng*, 11:1274 – 1279, 2005.
- [88] Naso F, Gandaglia A, Iop L, Spina M, and Gerosa G. First quantitative assay of alpha-gal in soft tissues: Presence and distribution of the epitope before and after cell removal from xenogeneic heart valves. *Acta Bionat*, 7:1728 – 1734, 2010.
- [89] Steinhoff G, Stock U, and Karim N. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits. *Circulation*, 102:50 – 55, 2000.
- [90] Ketchedjian A, Jones AL, Krueger P, and Robinson E. Recellularization of decellularized allograft scaffolds in ovine great vessel reconstructions. *Ann Thorac Surg*, 79:888 – 896, 2005.
- [91] Rieder E, Kasimir MT, and Silberhumer G. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 172:399 – 405, 2004.
- [92] Gilbert TW, Sellaro TL, and Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, 27:3675 – 3683, 2006.
- [93] De Filippo RE, Yoo JJ, and Atala A. Urethral replacement using cell seeded tubularized collagen matrices. *J Urol*, 168:1789 – 1792, 2002.

- [94] Freytes DO, Badylak SF, Webster TJ, Geddes LA, and Rundell AE. Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials*, 25:2353 – 2361, 2004.
- [95] Bhairi SM and Mohan C. Detergents: a guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry. *Biosciences*, 2007.
- [96] Seddon AM, Curnow P, and Booth PJ. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta*, 1666:105 – 117, 2004.
- [97] Mendoza-Novelo B, Avila EE, Cauch-Rodríguez JV, Herrero EJ, and Rojo FJ. Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content. *Acta Biomater*, 7:1241 – 1248, 2011.
- [98] Gonçalves AC. Decellularization of bovine pericardium for tissue-engineering by targeted removal of xenoantigens. *J Heart Valve Dis*, 14:212 – 217, 2005.
- [99] Woods T and Gratzner PF. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone–anterior cruciate ligament–bone graft. *Biomaterials*, 26:7339 – 7349, 2005.
- [100] Wilcox HE, Korossis SA, Booth C, Watterson KG, Kearney JN, and Fisher J. Biocompatibility and recellularization potential of an acellular porcine heart valve matrix. *J Heart Valve Dis*, 14:228 – 236, 2005.
- [101] Fang Ning-tao, Xie Shang-zhe, Wang Song-mei, et al. Construction of tissue-engineered heart valves by using decellularized scaffolds and endothelial progenitor cells. *Chin Med J*, 120:696 – 702, 2007.
- [102] Spina M, Ortolani F, El Messlemani A, Gandaglia A, Bujan J, and Garcia-Honduvilla N. Isolation of intact aortic valve scaffolds for heart-valve bioprostheses: extracellular matrix structure, prevention from calcification, and cell repopulation features. *J Biomed Mater Res A*, 67:1338 – 1350, 2003.
- [103] Iop L, Renier V, Naso F, Piccoli M, Bonetti A, Gandaglia A, Pozzobon M, Paolin A, Ortolani F, Marchini M, Spina M, De Coppi P, Sartore S, and Gerosa G. The influence of heart valve leaflet matrix characteristics on the interaction between human mesenchymal stem cells and decellularized scaffolds. *Biomaterials*, 30:4104 – 4116, 2009.

- [104] Dahl SL, Koh J, Prabhakar V, and Niklason LE. Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell Transplant*, 12:659 – 666, 2003.
- [105] Lodish. *Molecular cell Biology, 4th edition*, chapter Transport across cell membranes, pages 633–664. WH Freeman and Company, New York, 2000.
- [106] Moore R, Madara JL, and MacLeod RJ. Enterocytes adhere preferentially to collagen iv in a differentially regulated divalent cationdependent manner. *Am J Physiol*, 266:1099 – 1107, 1994.
- [107] Teebken OE, Bader A, Steinhoff G, and Haverich A. Tissue engineering of vascular grafts: human cell seeding of decellularised porcine matrix. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 19:381 – 386, 2000.
- [108] Ruffer A, Purbojo A, Cicha I, Glöckler M, Potapov S, and Dittrich S. Early failure of xenogenous de-cellularised pulmonary valve conduits - a word of caution! *Eur J Cardiothorac Surg*, 38:78 – 85, 2010.
- [109] Yang M, Chen CZ, Wang XN, Zhu YB, and Gu YJ. Favorable effects of the detergent and enzyme extraction method for preparing decellularized bovine pericardium scaffold for tissue engineered heart valves. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 91:354 – 361, 2009.
- [110] Zhou J, Fritze O, Schleicher M, Wendel H, Schenke-Layland K, and Harasztosi C. Impact of heart valve decellularization on 3-d ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity. *Biomaterials*, 31:2549 – 2554, 2010.
- [111] Booth C, Korossis SA, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, and Fisher J. Tissue engineering of cardiac valve prostheses i: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold. *J Heart Valve Dis*, 11:457 – 462, 2002.
- [112] Zeltinger J, Landeen LK, Alexander HG, Kidd ID, and Sibanda B. Developmente and characterization of tissue-engineered aortic valves. *Tissue Eng*, 7:9 – 22, 2001.
- [113] Badylak SF, Taylor D, and Uygun K. Whole-organ tissue engineering: Decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Ann Rev Biomed Eng 2011*, 13:27 – 53, 2011.

- [114] Dohmen PM, Lembcke A, Hotz H, Kivelitz D, and Konertz WF. Ross operation with a tissue-engineered heart valve. *Ann Thorac Surg*, 74:1438 – 1442, 2002.
- [115] Ruiz CE, Iemura M, Medie S, Varga P, Van Alstine WG, Mack S, Deligio A, and Fearnot N. Transcatheter placement of a low-profile biodegradable pulmonary valve made of small intestinal submucosa: A long-term study in a swine model. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 77:477 – 484, 2005.
- [116] Ota T, Sawa Y, Iwai S, Kitajima T, Ueda Y, Coppin C, Matsuda H, and Okita Y. Fibronectin-hepatocyte growth factor enhances reendothelialization in tissue-engineered heart valve. *Ann Thorac Surg*, 80:1794 – 1801, 2005.
- [117] Elkins RC, Dawson PE, Goldstein SP, Walsh SP, and Black KS. Decellularized human valve allografts. *Ann Thorac Surg*, 71:S428 – S432, 2001.
- [118] Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Salzer-Muhar U, Rieder E, and Wolner E. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve synergraft in paediatric patients. *Eur J cardio-Thorac Surg*, 23:1002 – 1006, 2003.
- [119] Hermanns MI, Unger RE, Kehe K, Peters K, and Kirkpatrick CJ. Lung epithelial cell lines in coculture with human pulmonary microvascular endothelial cells: development of an alveolo-capillary barrier in vitro. *Lab Invest*, 84:736 – 752, 2004.
- [120] Schopka, Schmid FX, Hirt S, Birnbaum DE, Schmid C, and Lehle K. Recellularization of biological heart valves with human vascular cells: in vitro hemocompatibility assessment. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 80, 2009.
- [121] Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, Wolner E, Weigel G, and Simon P. Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue - engineered porcine heart valves. *J Heart Valve Dis*, 15:278 – 86, 2006.
- [122] McGuigan AP and Sefton MV. The influence of biomaterials on endothelial cell thrombogenicity. *Biomaterials*, 28:2547 – 2571, 2007.

- [123] Vunjak-Novakovic G, Tandon N, Godier A, Maidhof R, Marsano A, et al. Challenges in cardiac tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*, 103:309 – 329, 2010.
- [124] Kasimir MT, Weigel G, Sharma J, Rieder E, Seebacher G, Wolner E, and Simon P. The decellularized porcine heart valve matrix in tissue eng: platelet adhesion and activation. *Thromb Haemost*, 94:562–567, 2005.
- [125] Lichtenberg A, Tudorache I, Cebotari S, Suprunov M, Tudorache G, Goerler H, and Park JK. Preclinical testing of tissue-engineered heart valves re-endothelialized under simulated physiological conditions. *Circulation*, 114:1559 – 1565, 2006.
- [126] Sodian R, Schaefermeier P, Abegg-Zips S, Kuebler WM, Shakibaei M, Daebritz S, and Reichart B. Use of human umbilical cord blood-derived progenitor cells for tissue-engineered heart valves. *Ann Thorac Surg*, 89:819 – 828, 2010.
- [127] de Mel A, Jell G, Stevens MM, and Seifalian AM. Biofunctionalization of biomaterials for accelerated in situ endothelialization: a review. *Biomacromolecules*, 9:2969 – 2979, 2008.
- [128] Watt FM and Hogan BL. Out of eden: stem cells and their niches. *Science*, 287:1427 – 1430, 2000.
- [129] Kleinman HK, Philp D, and Hoffman MP. Role of extracellular matrix in morphogenesis. *Curr Opin Biotechnol*, 14:526 – 532, 2003.
- [130] Weber LM, Hayda KN, Haskins K, and Anseth KS. The effects of cell-matrix interactions on encapsulated beta-cell function within hydrogels functionalized with matrix-derived adhesive peptides. *Biomaterials*, 28:3004 – 3011, 2007.
- [131] Dettin M, Conconi MT, Gambaretto R, Bagno A, Di Bello C, Menti AM, Grandi C, and Parnigotto PP. Effect of synthetic peptides on osteoblast adhesion. *Biomaterials*, 26:4507 – 4515, 2005.
- [132] Hersel U, Dahmen C, and Kessler H. Rgd modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*, 24:4385 – 4415, 2003.
- [133] Shi JW, Dong NG, and Sun ZQ. Immobilization of decellularized valve scaffolds with arg-gly-asp-containing peptide to promote myofibroblast adhesion. *J Huazhong U Sci Med*, 29:503 – 507, 2009.

- [134] Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, and Barbarisi A. From cell-ecm interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol*, 199:174 – 180, 2004.
- [135] Heilshorn SC, DiZio KA, Welsh ER, and Tirrell DA. Endothelial cell adhesion to the fibronectin cs5 domain in artificial extracellular matrix proteins. *Biomaterials*, 24:4245 – 4252, 2003.
- [136] Xiaoxiao G and Kristyn S. Regulation of valvular interstitial cell calcification by adhesive peptide sequences. *J Biomed Mat Res Part A*, 93a:1620 – 1630, 2009.
- [137] Dohmen PM, Scheckel M, Stein-Konertz M, Erdbruegger W, et al. In vitro hydrodynamics of a decellularized pulmonary porcine valve, compared with a glutaraldehyde and polyurethane heart valve. *Int J Artif Organs*, 25:1089 – 1094, 2002.
- [138] Galili U, LaTemple DC, and Radic MZ. A sensitive assay for measuring alpha-gal epitope expression on cells by a monoclonal anti-gal antibody. *Transplantation*, 65:1129 – 1132, 1998.
- [139] Montes GS and Junqueira LCU. The use of the picosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Cruz*, 86:1 – 11, 1991.
- [140] Smuts AN, Blaine DC, Scheffer C, Weich H, Doubell AF, and Dellimoe KH. Application of finite element analysis to the design of tissue leaflets for a percutaneous aortic valve. *J Mech Behav Biomed Mater*, 4:85 – 98, 2011.
- [141] Dong X, Wei X, Yi W, Gu C, Kang X, Liu Y, Li Q, and Yi D. Rgd-modified acellular bovine pericardium as a bioprosthetic scaffold for tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*, 20:2327 – 2336, 2009.
- [142] Schnell AM, Hoerstrup SP, Zund G, Kolb S, Sodian R, Suter A, and Turina M. Optimal cell source for cardiovascular tissue engineering: venous vs. aortic human myofibroblasts. *Thorac Cardiovasc Surg*, 49:221 – 225, 2001.
- [143] Pierschbacher MD, Hayman EG, and Ruoslahti E. The cell attachment determinant in fibronectin. *J Cell Biochem*, 28:115 – 126, 1985.
- [144] Dettin M, Bagno A, Gambaretto R, Iucci G, Conconi MT, Tuccitto N, Menti AM, and Polzonetti G. Covalent surface modification of titanium oxide with different adhesive peptides: surface characterization and osteoblast-like cell adhesion. *J Biomed Mater Res A*, 90:35 – 45, 2009.

- [145] Dettin M, Bagno A, Morpurgo M, Cacchioli A, Conconi MT, Di Bello C, Ravanetti F, and Guglielmi M. Evaluation of silicon dioxide-based coating enriched with bioactive peptides mapped on human vitronectin and fibronectin: in vitro and in vivo assays. *Tissue Eng*, 12:3509 – 3523, 2006.
- [146] Bagno A, Piovan A, Dettin M, Chiarion A, Brun P, Gambaretto R, Fontana G, Di Bello C, Palù G, and Castagliuolo I. Human osteoblast-like cell adhesion on titanium substrates covalently functionalized with synthetic peptides. *Bone*, 40:693 – 699, 2007.
- [147] Jansson K, Bengtsson L, Swedenborg J, and Haegerstrand A. In vitro endothelialization of bioprosthetic heart valves provides a cell monolayer with proliferative capacities and resistance to pulsatile flow. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 121:108 – 115, 2010.
- [148] Wissink MJB, Van Luyn MJA, Beernink R, Beugeling T, van Aken WG, and Feijen J. Endothelial cell seeding on crosslinked collagen: effects of crosslinking on endothelial cell proliferation and functional parameters. *Thromb Haemost*, 84:325 – 331, 2000.
- [149] Shinoka T, Ma PX, Langer R, Vacanti JP, and Mayer JE Jr. Tissue engineered heart valve. autologous valve leaflet replacement study in a lamb model. *Circulation*, 94:II164 – 8, 1996.
- [150] Kadner A, Zund G, Kadner G, Turina M, and Hoerstrup SP. Human umbilical cord cells for cardiovascular tissue engineering: a comparative study. *Eur J Cardiothorac Surg*, 25:635 – 641, 2004.
- [151] Sodian R, Lueders C, Reichart B, Daebritz S, and Hetzer R. Tissue engineering of autologous human heart valves using cryopreserved vascular umbilical cord cells. *Ann Thorac Surg*, 81:2207 – 2216, 2006.
- [152] Bader A, Schilling T, Teebken OE, Steinhoff G, and Haverich A. Tissue engineering of heart valves-human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *Eur J Cardiothorac Surg*, 14:279 – 284, 1998.
- [153] Wagner DD and Burger P. Platelet in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23:2131 – 2137, 2003.
- [154] Kalashnik L, Bridgeman CJ, King AR, Denyer SP, Crossman D, and Faragher RG. A cell kinetic analysis of human umbilical vein endothelial cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, 120:23 – 32, 2000.

- [155] Landegren U. Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. applications to detection of lymphokines and cell surface antigens. *J Immunol Methods*, 67, 1984.
- [156] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65:55 – 63, 1983.
- [157] Cushing NC, Jaeggli MP, Masters KS, Leinwand LA, and Anseth KS. Serum deprivation improves seeding and repopulation of acellular matrices with valvular interstitial cells. *J Biomed Mater Res A*, 75:232 – 241, 2005.
- [158] Zund G, Qing Y, Hoerstrup SP, et al. Tissue engineering in cardiovascular surgery: Mtt, a rapid and reliable quantitative method to assess the optimal human cell seeding on polymeric meshes. *Eur J Cardiothorac Surg*, 15:519 – 524, 1999.
- [159] Cebotari S, Tudorache I, Jaekel T, Hilfiker A, Dorfman S, Ternes W, Haverich A, and Lichtenberg A. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: Toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. *Artif Organs*, 3:206 – 210, 2010.
- [160] Simionescu D, Simionescu A, and Deac R. Mapping of glutaraldehyde-treated bovine pericardium and tissue selection for bioprosthetic heart valves. *J Biomed Mater Res*, 27:697 – 704, 1993.
- [161] Zhang J, Wang GY, Xiao YP, Fan LY, and Wang Q. The biomechanical behavior and host response to porcine-derived small intestine submucosa, pericardium and dermal matrix acellular grafts in a rat abdominal defect model. *Biomaterials*, 29:7086 – 7095, 2011.