

UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Medicina Molecolare

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOMEDICINA  
XXVI° CICLO

**SVILUPPO DI SCAFFOLDS BIOLOGICI  
DA OMENTO E MUSCOLO SCHELETRICO  
MEDIANTE PROCESSI  
DI DECELLULARIZZAZIONE**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Riccardo Manganelli

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Raffaele De Caro

**Dottoranda:** Maria Martina Sfriso





|   |       |
|---|-------|
| <b>RIASSUNTO</b>  | p. 1  |
| <b>ABSTRACT</b>   | p. 4  |
| <b>1. INTRODUZIONE</b>  | p. 7  |
| 1.1    BIOINGEGNERIA TISSUTALE  | p. 7  |
| 1.2    BIOINGEGNERIA TISSUTALE IN AMBITO RICOSTRUTTIVO                          | p. 7  |
| 1.3    PRINCIPI DELLA RIGENERAZIONE TISSUTALE                                   | p. 10 |
| 1.3.1    Cellule e fattori di crescita  | p. 10 |
| 1.4    GENERALITÀ SUGLI SCAFFOLDS   | p. 12 |
| 1.4.1    Il concetto di scaffold ideale   | p. 15 |
| 1.4.2    Gli scaffolds decellularizzati   | p. 16 |
| 1.4.3    Scaffolds decellularizzati da tessuto adiposo                          | p. 20 |
| 1.4.4    Scaffolds decellularizzati da muscolo scheletrico                      | p. 22 |
| <b>2. SCOPO DELLA TESI</b>  | p. 27 |
| <b>3. MATERIALI E METODI</b>  | p. 29 |
| 3.1    SVILUPPO DI UNO SCAFFOLD DA OMENTO                                       | p. 29 |
| 3.1.1    Preparazione dei campioni di omento                                    | p. 29 |
| 3.1.2    Protocollo di decellularizzazione                                      | p. 29 |
| 3.1.3    Analisi istologiche ed immunoistochimiche                              | p. 32 |
| 3.1.4    Colorazione con DAPI   | p. 33 |
| 3.1.5    Estrazione e quantificazione degli acidi nucleici                      | p. 33 |
| 3.1.6    Estrazione di cellule della Frazione Stromale Vascolare da ratto       | p. 34 |
| 3.1.7    Estrazione di cellule della Frazione Stromale Vascolare da uomo        | p. 34 |
| 3.1.8    Ricellularizzazione dello scaffold                                     | p. 35 |
| 3.2    SVILUPPO DI UNO SCAFFOLD DA MUSCOLO SCHELETRICO                          | p. 36 |
| 3.2.1    Modello animale  | p. 36 |
| 3.2.2    Prelievo microchirurgico del lembo                                     | p. 37 |
| 3.2.3    Decellularizzazione muscolare ed analisi istologiche                   | p. 39 |
| 3.2.4    Impianto del muscolo decellularizzato, ecografia e successivo prelievo | p. 40 |

|                                     |       |
|-------------------------------------|-------|
| <b>4. RISULTATI</b>                 | p. 43 |
| 4.1 SCAFFOLD DA OMENTO              | p. 43 |
| 4.2 SCAFFOLD DA MUSCOLO SCHELETRICO | p. 55 |
| 4.2.1 Impianto dello scaffold       | p. 58 |
| 4.2.2 Ecografia                     | p. 62 |
| <b>5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b> | p. 65 |
| 5.1 SCAFFOLD DA OMENTO              | p. 66 |
| 5.2 SCAFFOLD DA MUSCOLO SCHELETRICO | p. 72 |
| <b>6. PROSPETTIVE FUTURE</b>        | p. 77 |
| <b>7. BIBLIOGRAFIA</b>              | p. 79 |

# RIASSUNTO

## PRESUPPOSTI DELLO STUDIO

La disponibilità di organi e tessuti ottenuti in laboratorio da materiale biologico è, ad oggi, una delle maggiori richieste nei casi di perdita di sostanza a causa di difetti congeniti o post-traumatici. A fronte di ciò, si è cercato di realizzare dei tessuti bioingegnerizzati mediante l'applicazione di processi di decellularizzazione e successiva ricellularizzazione.

## SCOPO DELLO STUDIO

Gli obiettivi del presente lavoro sono stati i seguenti:

- Sviluppare un nuovo tipo di scaffold biologico derivato dall'omento che conservi l'integrità strutturale della matrice extracellulare e della rete vascolare del tessuto nativo anche dopo una fase di decellularizzazione.
- Sviluppare un ulteriore scaffold biologico da muscolo scheletrico, derivato dalla decellularizzazione del muscolo retto del coniglio, per la ricostruzione di un difetto della parete addominale.

## MATERIALI E METODI

Per quanto riguarda la prima parte sperimentale, campioni di omento, di ratto e di uomo, sono stati decellularizzati mediante l'impiego di una serie di reazioni fisiche (congelamento/scongelamento ed agitazione meccanica), chimiche (EDTA e isopropanolo) ed enzimatiche (tripsina, endonucleasi e lipasi) che comportano la rimozione delle cellule e della loro componente lipidica. I campioni sono stati analizzati

nelle varie fasi mediante colorazioni istologiche (ematossilina ed eosina, azan Mallory, van Gieson, PAS, Sudan, Oil Red), reazioni immunoistochimiche (anti-CD31, -CD34, - $\alpha$  actina del muscolo liscio) e colorazione con DAPI. Inoltre, sono state effettuate valutazioni quantitative allo spettrofotometro della concentrazione di DNA genomico al termine della decellularizzazione.

Sono stati effettuati tentativi di ricellularizzazione dello scaffold mediante cellule della frazione stromale vascolare (SVF), isolate da campioni di lipoaspirato umano.

È stato altresì sviluppato un ulteriore scaffold mediante decellularizzazione di campioni del muscolo retto di coniglio. Questi sono stati sottoposti a reazioni fisiche (congelamento/scongelo), chimiche (EDTA e Triton X-100) ed enzimatiche (DNasi) ed i risultati sono stati analizzati mediante colorazioni istologiche (ematossilina ed eosina, azan Mallory, van Gieson).

In seguito, lo scaffold è stato impiantato a tutto spessore in un coniglio ricevente in corrispondenza di un difetto della parete addominale con perdita di sostanza prodotto chirurgicamente. Dopo tre settimane, l'impianto è stato studiato mediante esame ecografico in vivo e, dopo sacrificio dell'animale, è stato analizzato mediante le colorazioni istologiche di cui sopra.

## RISULTATI

Le colorazioni istologiche hanno confermato l'efficacia del procedimento di decellularizzazione con la perdita totale della componente lipidica propria dell'omento. Ciò ha portato alla realizzazione di uno scaffold acellulare nel quale è stata mantenuta l'organizzazione tridimensionale delle fibre collagene, elastiche e reticolari. Inoltre è stata evidenziata la preservazione della rete di canali vascolari.

Studi preliminari hanno dimostrato, inoltre, la possibilità di ricellularizzare lo scaffold

mediante introduzione di cellule appartenente alla SVF.

Riguardo la seconda parte del progetto, è stato dimostrato che lo scaffold di derivazione muscolare ha mantenuto l'integrità della matrice extracellulare e della struttura dei canali vascolari, di cui rimangono apprezzabili i diversi strati che li compongono.

A seguito dell'impianto nel coniglio ricevente è stata evidenziata, mediante ecografia in vivo, l'integrazione dello scaffold con i tessuti adiacenti con buone proprietà meccaniche.

Dopo il sacrificio dell'animale l'analisi istologica dello scaffold ha delineato la presenza di tessuto riparativo e di nuovi canali vascolari nella sede del difetto addominale.

Obiettivo futuro sarà quello di ricellularizzare lo scaffold con cellule progenitrici muscolari per favorire la rigenerazione in senso muscolare dello scaffold stesso.

## CONCLUSIONI

Abbiamo ottenuto un nuovo tipo di struttura acellulare biologica derivante dall'omento, mediante l'applicazione del processo di decellularizzazione, il quale permette di minimizzare il più possibile le alterazioni della matrice extracellulare durante la rimozione delle cellule. In via preliminare lo scaffold è stato ricellularizzato con cellule appartenenti alla frazione stromale vascolare ma ulteriori esperimenti si focalizzeranno sul potenziamento della ricellularizzazione in vitro e su impianto in vivo.

La decellularizzazione del tessuto muscolare ed il suo impianto in vivo ha permesso di identificare una struttura biologica in grado di offrire una valida alternativa ai materiali attualmente impiegati per la riparazione dei difetti di parete addominale. Anche in questa direzione verrà valutata in futuro la possibilità di ricellularizzare lo scaffold con cellule progenitrici.

# ABSTRACT

## BACKGROUND

The availability of organs and tissues, obtained in laboratory from biological material, is one of the main demands in the event of loss of substance, due to congenital or post-traumatic defects. For this purpose, bioengineered tissues have been developed through decellularization and recellularization processes.

## AIM OF THE STUDY

The objectives of this study were:

- Development of a new type of biological scaffold derived from omentum that preserves the structural integrity of the extracellular matrix and the vascular network of the native tissue even after a phase of decellularization.
- Development of a further biological scaffold from skeletal muscle, derived from the decellularization of the rectus muscle of the rabbit, for the reconstruction of a defect in the abdominal wall.

## MATERIAL AND METHODS

As regards the first part of the experiment, samples of omentum, from rat and human, were decellularized through physical reactions (freezing/thawing and mechanical agitation), chemical (EDTA and isopropanol) and enzymatic (trypsin, lipases and endonucleases) methods involving the removal of cells and their lipid content.

Samples were analyzed at various stages by histological staining (hematoxylin and eosin, azan Mallory, van Gieson, PAS, Sudan, Oil Red), immunohistochemical reactions (anti-CD31, -CD34,  $\alpha$ -smooth muscle actin) and stained with DAPI. Furthermore, evaluations about the quantitative concentration of genomic DNA at the end of decellularization were

carried out with a spectrophotometer.

Attempts have been made to recellularize scaffold by cells of the stromal vascular fraction (SVF), isolated from samples of human lipoaspirate.

It has, also, developed an additional scaffolds by decellularization of samples of the rectus muscle of the rabbit. Samples were subjected to physical (freezing/thawing), chemical (EDTA and Triton X -100) and enzymatic (DNase) methods and results were analyzed by histological staining (hematoxylin and eosin, azan Mallory, van Gieson).

Thereafter, the scaffold was implanted in a rabbit receiver in correspondence with a surgical defect in the abdominal wall with loss of substance. After three weeks, the implant was studied by ultrasound examination in vivo and, after sacrifice of the animal, it was analyzed with the histological stainings mentioned above.

## RESULTS

Histological stainings confirmed the effectiveness of the decellularization process with the total loss of its lipid component of the omentum. This led to the creation of an acellular scaffold in which the three-dimensional organization of the collagen, elastic, and reticular fibers was preserved. Also, the preservation of the vascular network was highlighted.

Preliminary studies have shown, moreover, the possibility of recellularization of the scaffold through the introduction of SVF cells.

Regarding the second part of the project, it was shown that the muscle-derived scaffold has maintained the integrity of the extracellular matrix and the structure of the vascular channels, in the removal of cellular elements.

Following implantation in the receiving rabbit, a solution of continuity with the adjacent tissues has been highlighted, by ultrasound in vivo, with the absence of herniation .

After the sacrifice of the animal, histological analysis of the scaffold showed the presence of reparative tissue and new vascular channels in the seat of the abdominal defect.

Future perspectives will be to recellularize the scaffold with progenitor cells to promote muscle regeneration.

## CONCLUSIONS

We obtained a new type of acellular biological structure resulting from the omentum, through the application of the process of decellularization, which allows to minimize possible alterations of the extracellular matrix during the removal of the cells.

The scaffold was preliminarily recellularized with cells of the stromal vascular fraction, but further experiments will focus on the further evolution of in vitro recellularization and in vivo implantation.

The decellularization of the muscle tissue and its implantation in vivo has allowed to identify a biological structure capable of offering a valid alternative to the materials currently used for the defects repair in the abdominal wall.

Also in this direction we will evaluate in the future the possibility of recellularization of the scaffold with progenitor cells.



# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 BIOINGEGNERIA TISSUTALE

La bioingegneria tissutale è il campo di ricerca nato dalla fusione delle conoscenze e dei progressi in campo biotecnologico, immunologico, genetico e fisiopatologico. La realizzazione in vitro di sostituti tissutali o di interi organi è lo scopo principale di questa disciplina, la quale è supportata dalle innovazioni in campo tecnico-scientifico, e biologico, con particolare riferimento allo studio del potenziale differenziativo delle cellule staminali.

La creazione di un tessuto biologico o di un intero organo potrebbe permettere il superamento di alcuni ostacoli, quali il rigetto, che ancora oggi sussistono nel campo della trapiantologia e della medicina ricostruttiva.

Gli elementi che negli anni sono emersi come fondamentali nello sviluppo di sostituti di laboratorio per i tessuti biologici sono stati, nell'ordine, le cellule e i metodi per poterle espandere in vitro e differenziare, i fattori di crescita necessari alla sopravvivenza cellulare e all'eventuale differenziazione, e gli scaffold, per la sostituzione e riparazione di difetti localizzati in vari distretti corporei.

## 1.2 LA BIOINGEGNERIA TISSUTALE IN AMBITO RICOSTRUTTIVO

Le ricadute cliniche dei progressi della bioingegneria tissutale riguardano potenzialmente tutte le specialità biomediche. Alla base della medicina ricostruttiva vi è la necessità di ricostituire dal punto di vista morfologico e funzionale un tessuto affetto da patologia, congenita o acquisita, o da trauma, per poter ripristinare la fisiologia del distretto compromesso.

Il trapianto autologo, ossia il trasferimento di organi o tessuti appartenenti allo stesso

paziente, risulta essere il più efficace strumento di riparazione, sia dal punto di vista funzionale che immunologico. Tuttavia, la carenza di un'adeguata risorsa di tessuto, a causa di patologie o di scarsa quantità, ha spostato l'attenzione dei ricercatori verso la realizzazione di trapianti omologhi, cioè tra individui della stessa specie, ed eterologhi, tra individui di specie diversa. Sono classici esempi le riparazioni di perdite di sostanze con esposizione ossea o la ricostruzione mammaria con lembi microchirurgici o pedunculati nei casi in cui l'impiego di protesi sia scadente dal punto di vista morfologico (Chang et al., 2010; Howard et al., 2006). Tali soluzioni sono state studiate negli anni per il riparo di perdite di sostanza a carico di quasi tutti i distretti corporei, ma tutte implicano una perdita di sostanza secondaria a carico dell'area donatrice (Webster et al., 2012).

A sostegno di ciò, notevoli progressi sono stati compiuti proprio in questa direzione permettendo di raggiungere obiettivi innovativi in coordinazione con le canoniche procedure ricostruttive, come il trapianto da cadavere di un volto o di un arto (Siemionow et al., 2011; Kaufman et al., 2011).

Gli sviluppi della bioingegneria applicati a questi campi potrebbero, quindi, fornire una soluzione alternativa a queste difficoltà, essenzialmente mediante la produzione di costrutti biologici complessi finalizzati al trattamento di perdite di sostanza fino a quello di ripristino di funzione dell'organo.

Tra le varie possibilità oggi disponibili è importante lo sfruttamento di biomateriali che, una volta impiantati, siano utilizzati dall'organismo ricevente come impalcature (scaffold) per la ricrescita tissutale a seguito di una progressiva colonizzazione da parte di cellule in situ fino alla ricostituzione del tessuto in toto. Si possono ricordare, ad esempio, i sostituti dermici e cutanei attualmente in commercio e impiegati nella pratica clinica per il riparo anche di complesse perdite di sostanza. Ne sono esempio: Biobrane® (un reticolo di fibre di nylon unito ad un sottile strato di silicone e legato a polipeptidi di origine porcina),

TransCyte® (una membrana semipermeabile di silicone e fibroblasti umani), Dermagraft® (una rete in poliglactina riassorbibile ingegnerizzata con fibroblasti neonatali allogenici), Integra® (sostituto dermico composto da due strati: il primo formato da fibre di collagene bovino, il secondo da silicone che si rimuove durante il processo di guarigione della ferita) (Solanki et al., 2010; Tiengo et al., 2012). Solitamente si tratta di biomateriali che fungono da guida per la ricellularizzazione da parte dell'organismo ricevente e al tempo stesso vengono degradati e sostituiti da matrice extracellulare neoformata con il progredire del processo di colonizzazione. Il più importante limite di questi biomateriali risulta essere lo scarso potenziale angiogenetico che impedisce un'adeguata vascolarizzazione nel caso in cui il sostituto tissutale sia di spessore elevato. Si è pertanto ipotizzato di incorporare all'interno dei biomateriali una componente di cellule progenitrici della linea vascolare per superare questa limitazione (Keck et al., 2011).

Per quanto riguarda la ricostruzione del tessuto osseo, l'idrossiapatite risulta essere un esempio di biomateriale di largo impiego clinico. In questo caso la sua struttura porosa consente la migrazione e la differenziazione degli osteoblasti e di assicurare un adeguato trasporto di sostanze nutritive. Il risultato finale è la colonizzazione dell'idrossiapatite da parte degli osteoblasti dell'organismo ricevente e la conseguente formazione di un tessuto osseo neoformato in grado di produrre autonomamente matrice ossea mineralizzata, riassorbimento contemporaneamente la protesi (Damien et al., 2003). L'idrossiapatite rappresenta il paradigma di come dovrebbe comportarsi uno scaffold efficace, tuttavia la riparazione ossea risulta il campo di applicazione relativamente più semplice rispetto ad altri tessuti connotati da maggiore differenziazione cellulare e più complessa vascolarizzazione.

## 1.3 PRINCIPI DELLA RIGENERAZIONE TISSUTALE

### 1.3.1 CELLULE E FATTORI DI CRESCITA

Riguardo le cellule, le potenziali fonti di cellule staminali e le procedure descritte in letteratura per ottenerle sono innumerevoli: le fonti comunemente sfruttate sono il midollo osseo (per cellule staminali ematopoietiche, mesenchimali e progenitori endoteliali) (Spangrude et al., 1988), il sangue fetale (Campagnoli et al., 2001), il tessuto adiposo (Fraser et al., 2006; Puglisi et al., 2011), il lipoaspirato (Wilson et al., 2011) e la vena ombelicale (Weiss et al., 2006). La scelta della fonte di cellule staminali deve essere finalizzata alla specifica differenziazione e colonizzazione del tessuto da riparare, considerando appunto le proprie caratteristiche di disponibilità e i potenziali differenziativi delle diverse linee (Leeb et al., 2010).

Un parametro molto importante da considerare nella scelta delle cellule staminali è la loro capacità differenziativa residua; infatti più le cellule sono andate incontro ad un processo differenziativo e più il loro potenziale rigenerativo sarà limitato. Le cellule staminali adulte, pertanto, sono in grado di evolvere in un numero di fenotipi cellulari minore rispetto alle cellule staminali embrionali che presentano un potenziale differenziativo molto più vasto (Brignier et al., 2010).

Gli studi sulle cellule staminali embrionali, vere totipotenti, sono stati progressivamente abbandonati per motivazioni tecniche ed etiche, incentrandosi maggiormente sulle cellule staminali adulte.

I problemi più rilevanti riguardo l'utilizzo di una linea staminale sono:

- Difficoltà di realizzare una co-cultura in vitro. I tessuti sono composti da più tipi di cellule che si differenziano per embriogenesi, morfologia e funzioni pertanto è complesso realizzare in vitro la crescita contemporanea e ordinata di più tipi cellulari differenti;

- Necessità di garantire un adeguato supporto nutritivo. I tessuti hanno esigenze nutrizionali più complesse delle singole colture cellulari.
- Necessità di fornire adeguati fattori di crescita per lo sviluppo del tessuto. I medesimi fattori sono altresì regolati da precisi meccanismi e segnali di interazione fattore-cellula.

I maggiori sforzi della ricerca si sono concentrati sulla ricerca e sulla somministrazione regolata secondo dosi e tempi adeguati di fattori di crescita specifici per ogni tipo di coltura cellulare e per le diverse fasi di sviluppo delle cellule. A tale proposito è noto l'utilizzo in letteratura del FGF (Fibroblast Growth Factor) per la differenziazione delle cellule staminali embrionali (Villegas et al., 2010) e del VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) per le cellule staminali di derivazione adiposa (Song et al., 2010). È bene precisare che entrambi i fattori presentano molteplici funzioni e sono implicati in numerosi processi di crescita tissutale.

Inizialmente, per ottenere una co-coltura cellulare sono stati sperimentati sistemi che prevedevano la semplice deposizione di due o più tipi cellulari differenti sullo stesso supporto (scaffold); la limitazione è costituita dal fatto che non è possibile ordinare e programmare la densità di un determinato tipo cellulare in una particolare zona dello scaffold. Per superare quest'ostacolo sono state pertanto messe a punto tecniche che consentano di ottimizzare la disposizione spaziale dei vari tipi cellulari, come ad esempio l'utilizzo di molecole di adesione, come la fibronectina, depositate sulla superficie di coltura, o l'utilizzo di substrati in grado di modificare le proprie caratteristiche se esposti ad agenti fisici come luce, calore e differenze di potenziale elettrico (Kaji et al., 2011). Esempi di co-coltura con due tipi cellulari sono stati: epatociti e fibroblasti (Bhatia et al., 1998; Fukuda et al., 2006) e fibroblasti con cellule endoteliali (Bianchi et al., 2007). Esempio di co-coltura con tre tipi cellulari è stato una struttura tridimensionale simil

vascolare composta da fibroblasti umani di derivazione polmonare, cellule muscolari lisce ed endoteliali di vena ombelicale umana (Tan et al., 2004).

#### 1.4 GENERALITA' SUGLI SCAFFOLDS

Per ottenere un tessuto funzionale è necessario predisporre di un adeguato supporto che permetta l'adesione, la crescita, la differenziazione e la proliferazione di cellule. Tale concetto è stato reso reale mediante la costruzione di uno scaffold, ovvero un'“impalcatura” che permetta la crescita ordinata delle cellule. La corretta scelta del supporto per la coltura dipende dalla tipologia di cellule che si vogliono far aderire, dal sito del ricevente nel quale esso sarà posizionato, e deve soddisfare precisi requisiti di biocompatibilità, proprietà biomeccaniche ed ultrastrutturali permettendo nel contempo una favorevole crescita e differenziazione cellulare. Attualmente possono essere classificati principalmente, a seconda della loro origine o sintesi, in scaffold di derivazione sintetica, semisintetica (Rosso et al., 2005) o biologica (Mano et al., 2007), e recentemente sono state descritte strutture tridimensionali ottenute con l'assemblaggio delle singole fibre mediante appositi software (Li et al., 2006).

La comprensione dell'importante ruolo svolto dall'interazione con la matrice extracellulare e dai fenomeni molecolari e meccanici che questa svolge ha permesso negli ultimi anni di ipotizzare che la sostituzione di interi tessuti complessi possa essere ottenuta non dalla costruzione ex-novo in laboratorio, bensì fornendo all'organismo degli scaffold “rigenerativi”. La base di partenza diviene il tessuto stesso che, mediante il processo definito di “decellularizzazione” diviene scaffold ideale per la sua stessa rigenerazione in un organismo ricevente.

Integrando i progressi ottenuti nel campo delle cellule staminali e della bioingegneria dei

materiali, si sono così ottenuti in vitro tessuti bioingegnerizzati trasferibili su animali o sull'uomo (Orlando et al., 2011). Ne sono esempi significativi l'impianto nel 2006 di una vescica bioingegnerizzata ottenuta da cellule uroteliali e muscolari lisce autologhe fatte aderire ad un supporto di collagene e acido poliglicolico per il trattamento di mielomeningocele. Tale metodica ha permesso di risparmiare l'utilizzo di segmenti gastrointestinali che vengono abitualmente impiegati nella ricostruzione vescicale (Atala et al., 2006). Il passo successivo è stato quello di potenziare la biocompatibilità dello scaffold mediante suo arricchimento con cellule del ricevente in fase pre-trasferimento, favorendo lo sviluppo dei trapianti omo-autologhi. Questa intuizione ha portato nel 2008 ad ottenere una trachea bioingegnerizzata decellularizzando una porzione di trachea da donatore omologo e ricellularizzandola con cellule epiteliali e mesenchimali staminali del ricevente. Il graft è stato poi impiantato con successo in un paziente affetto da ostruzione bronchiale severa (Macchiarini et al., 2008).

E' stato reso evidente che, per poter procedere ad un impianto in vivo del tessuto bioingegnerizzato, è necessario ottenere sia una buona integrazione delle cellule staminali all'interno dello scaffold e sia una giusta differenziazione verso il fenotipo desiderato. Inoltre è necessario garantire un'adeguata vascolarizzazione, che si distribuisca uniformemente all'interno del tessuto ottenuto in vitro per assicurare un'adeguata distanza tra vasi capillari e cellule, è necessario che il network vascolare soddisfi le esigenze metaboliche del tessuto e sia in grado di evitare gli effetti irreversibili dell'ischemia che conducono alla necrosi o all'apoptosi. Tale distanza può essere estremamente esigua e difficile da ottenere in uno scaffold bioingegnerizzato, basti pensare che per il tessuto cardiaco la distanza massima tra cellule e capillari per assicurare un'efficace diffusione di ossigeno e nutrienti è di appena 100  $\mu\text{m}$ . (Radisic et al., 2005).

Attualmente, la mancanza di una rete vascolare efficiente costituisce il maggior ostacolo alla realizzazione di un tessuto bioingegnerizzato tridimensionale di notevoli dimensioni.

Si è tentato di risolvere il problema utilizzando scaffold che contengono al loro interno dei fattori pro-angiogenetici che possono essere secreti e diffusi in tutto il tessuto.

Maggiormente funzionale apparirebbe il concetto di trasferire lo scaffold con un peduncolo vascolare ma ad oggi la realizzabilità di una adeguata decellularizzazione dei vasi che ne consenta al tempo stesso di essere immunologicamente inerti e funzionali ad un trasferimento microchirurgico appare complessa. Più semplice sembra la possibilità di realizzare uno scaffold con una struttura microvascolare preformata in grado di anastomizzare spontaneamente con l'apparato vascolare del ricevente dopo l'impianto in vivo, ripristinandone il flusso ematico (Moon et al., 2010).

Tra i diversi tessuti da cui ottenere materiale biologico per la produzione di scaffold biologici ricordiamo valvole cardiache (Bader et al., 1998; Kasimir et al., 2003), derma (Chen et al., 2004), sottomucosa intestinale (Tottey et al., 2011), muscolo scheletrico (Borschel et al., 2004), fegato (Lin et al., 2004), tendine (Deeken et al., 2011).

In alternativa agli scaffold decellularizzati sono stati progettati scaffold di origine sintetica che consentono un miglior controllo delle proprietà meccaniche e fisiche, possono essere facilmente manipolati chimicamente ad esempio incorporando fattori di crescita, recettori e proteine ligando per stimolare l'adesione, la crescita e la differenziazione cellulare (Yim et al., 2005; Derda et al., 2007).

Un ulteriore tentativo è stato l'assemblaggio di materiali sintetici e della matrice extracellulare per l'ottenimento di scaffold ibridi allo scopo di sfruttare al meglio ed integrare i vantaggi che offrono entrambi i materiali. Tuttavia sono emersi svantaggi dovuti a reazioni infiammatorie causate da materiali sintetici. Esempio di scaffold ibrido è rappresentato dall'unione di acido lattico-co-glicolico con sottomucosa del piccolo



intestino di derivazione porcina per la produzione di tessuto osseo bioingegnerizzato (Lee et al., 2004).

#### 1.4.1 IL CONCETTO DI SCAFFOLD IDEALE

Lo scaffold deve rappresentare un supporto ideale per la coltura delle cellule e, pertanto, deve essere in grado di soddisfare peculiari caratteristiche e proprietà.

Innanzitutto deve consentire una crescita cellulare rapida e uniforme. Per soddisfare tale requisito è preferibile che lo scaffold presenti una struttura porosa che permetta alle cellule in crescita di colonizzare efficacemente tutto il volume disponibile all'interno del supporto, e al tempo stesso, garantisca un adeguato trasporto di ossigeno e nutrienti. Inoltre, dal momento che in molti costrutti bioingegnerizzati vengono impiantate cellule staminali, la cui differenziazione deve essere indirizzata verso un determinato fenotipo, è stato proposto di incorporare all'interno dello scaffold citochine o fattori di crescita a rilascio programmato.

Lo scaffold deve riprodurre il più possibile l'ultrastruttura della matrice extracellulare del tessuto desiderato: da tempo è stato dimostrato che le interconnessioni tra le cellule e le componenti della matrice sono fondamentali non soltanto in termini di supporto meccanico ma anche per esercitare un'influenza diretta sull'attività delle cellule, regolandone la crescita (Tran et al., 2004), l'adesione (Mercurius et al., 2001), la corretta differenziazione (Moghal et al., 1998) e l'apoptosi (Kapila et al., 1999).

Il costrutto deve inoltre presentare una bassa immunogenicità. È noto da tempo infatti che l'organismo può reagire all'impianto di qualsiasi materiale esogeno con manifestazioni diverse, quali l'infiammazione acuta o cronica e la reazione da corpo estraneo granulomatosa (Anderson et al., 1988). Queste possono provocare una riduzione della

biocompatibilità, definita come la capacità di un biomateriale di interfacciarsi in maniera appropriata con il sistema immunitario dell'organismo ricevente.

Lo scaffold ideale dovrebbe, inoltre, nella fase successiva all' impianto, conservare nel tempo le sue caratteristiche biomeccaniche e strutturali. Per tale scopo, sono stati studiati scaffold sintetici costituiti da materiali assorbibili, i quali favoriscono una progressiva sostituzione da parte del tessuto ospite con la conseguente degradazione ed assorbimento della frazione sintetica. La fase di degradazione può condurre, però, ad un indebolimento strutturale e meccanico che successivamente viene generalmente compensato da un rimodellamento tissutale grazie alla colonizzazione con cellule del ricevente, come ad esempio verificato negli scaffold ottenuti da matrice extracellulare di sottomucosa intestinale (Badylak et al., 1999). Il risultato finale desiderabile in questo caso è pertanto la sostituzione dello scaffold con un tessuto di derivazione autologa (Musahl et al., 2004; Record et al., 2001).

Una caratteristica ulteriore dello scaffold ideale è quella di ripristinare la perfusione sanguigna dei tessuti: la soluzione è quella di mantenere la rete vascolare preformata e implementarla attraverso l'inserimento di fattori di crescita pro-angiogenetici, in grado di guidare e facilitare la connessione vascolare con il ricevente (Richardson et al., 2011; Crenshaw et al., 2011). Più complessa, ma al tempo stesso di maggiore efficacia, è la possibilità di eseguire anastomosi con i vasi del letto del ricevente al momento dell'impianto.

#### 1.4.2 GLI SCAFFOLDS DECELLULARIZZATI

Scaffold biologici derivati da tessuti decellularizzati sono già stati ampiamente sperimentati in studi pre-clinici su animali e clinici sull'uomo. Tra questi si ricorda Alloderm®, uno scaffold che deriva da derma umano decellularizzato, ampiamente

sfruttato nel trattamento di perdite di sostanza con esposizione della teca cranica o nelle ricostruzioni mammarie (Crenshaw et al., 2011; Jung et al., 2008).

Vi sono, inoltre, scaffold di derivazione xenologa attualmente già impiegati nella pratica clinica, come ad esempio lo Strattice®, prodotto derivato da derma porcino sottoposto a decellularizzazione e impiegato in riparazioni chirurgiche dei tessuti molli e difetti di parete tra i quali ricostruzioni della parete toracica, ricostruzioni mammarie e trattamento di ernie (Katerinaki et al., 2010; Huston et al., 2011).

Il processo di decellularizzazione per mezzo del quale si ottengono questi tipi di scaffold consiste nella rimozione delle cellule e dei loro componenti senza danneggiare eccessivamente la matrice extracellulare (ECM), sede della attività biologica e delle proprietà biomeccaniche del tessuto.

La specie di origine, il tipo cellulare prevalente e la quantità di tessuto prelevato influenzano la scelta del protocollo di decellularizzazione, pertanto in letteratura non esiste un protocollo univoco ma una lista di processi specifici che si adattano alla decellularizzazione del tessuto più consona. Solitamente consistono in una combinazione di trattamenti fisici, chimici e enzimatici: le prime fasi sono dedicate alla rottura delle membrane cellulari in modo da poter successivamente liberare i componenti intracellulari, che verranno poi separati, disgregati, e degradati mediante detergenti e soluzioni enzimatiche; le ultime fasi sono invece rivolte all'eliminazione dei detriti cellulari rimasti all'interno della matrice e ai residui dei reagenti impiegati nel processo di decellularizzazione che potrebbero interferire con la successiva ricellularizzazione dello scaffold o causare reazioni avverse nell'organismo ricevente (Gilbert et al., 2006).

Un esempio di trattamento fisico, impiegato con successo nelle procedure di decellularizzazione del tessuto tendineo e nervoso, è il ciclo rapido di congelamento/scongelo che induce un'efficace rottura delle membrane cellulari.

Alternativamente si può ricorrere all'applicazione di forze meccaniche (Freytes et al., 2004) oppure all'agitazione del materiale in combinazione con detergenti chimici per promuovere la solubilizzazione omogenea dei componenti membranosi (Schenke-Layland et al., 2003).

Per quanto riguarda i trattamenti chimici si ricorda invece l'utilizzo di soluzioni acide o alcaline che vengono impiegate per decellularizzare sottili strati di campioni tissutali come la sottomucosa vescicale (Gilbert et al., 2006). Questo tipo di trattamento è efficace nel rimuovere i detriti cellulari e al tempo stesso presenta un'azione antibatterica e antimicotica (Pruss et al., 1999; Wilshaw et al., 2006). Nonostante ciò, è stato dimostrato che l'uso di solventi chimici per tempi prolungati potrebbe alterare la struttura della matrice provocando il distacco dei glicosamminoglicani (GAG) dalle fibre collagene (Gilbert et al., 2006). Altra categoria di agenti chimici solitamente impiegati sono i detergenti ionici, dotati di efficacia nel rimuovere i frammenti citoplasmatici e nucleari ma tendono anche a denaturare le proteine della matrice, influenzando negativamente le interazioni proteina-proteina. In alternativa è possibile far ricorso a detergenti non ionici che hanno un'azione meno aggressiva sulla matrice extracellulare e sulle interazioni tra proteine, ma dall'altro lato alcuni studi hanno riportato una efficacia non sufficiente nel rimuovere il materiale cellulare (Seddon et al., 2004).

Nei protocolli di decellularizzazione vengono utilizzati anche agenti chelanti come l'EDTA, la cui funzione è quella di legare ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , i quali risultano essere indispensabili per il legame tra le cellule e i componenti della matrice, come il collagene e la fibronectina. Il loro sequestro, pertanto, facilita la perdita delle interconnessioni cellulari con conseguente disgregazione e rimozione del materiale cellulare (Gailit et al., 1988; Moore et al., 1994; Petersen et al., 2011).

Una decellularizzazione efficace è affiancata anche dall'utilizzo di soluzioni enzimatiche,

composte principalmente da tripsina, la quale svolge una funzione specifica nel clivare i legami proteici ed esercita la sua massima attività ad una temperatura di 37 °C e pH 8. Oltre alla tripsina si utilizzano spesso anche le endonucleasi, di cui fanno parte le deossiribonucleasi e le ribonucleasi, che catalizzano l'idrolisi dei legami covalenti presenti nelle catene degli acidi nucleici (Bader et al., 1998; Teebken et al., 2000). È tuttavia raccomandato non eccedere con l'esposizione dei campioni tissutali all'azione delle soluzioni enzimatiche in quanto sono state riportate alterazioni nella struttura della matrice extracellulare (Grauss et al., 2005). Trova largo impiego in tutti i processi di decellularizzazione anche l'implementazione di tutte le soluzioni con antibiotici e antimicotici, non per il processo di decellularizzazione in sé, ma per prevenire una contaminazione da parte di agenti esterni che possono influenzare negativamente la crescita delle cellule; vengono inoltre impiegati inibitori delle proteasi come il fenilmetilsulfonilfluoride (PMSF), il cui utilizzo è dovuto alla necessità di neutralizzare l'azione degradativa della ECM esercitata dalle proteasi liberate durante la lisi cellulare (Flynn et al., 2006).

Alla base dei processi di decellularizzazione vi è, quindi, lo scopo di eliminare le componenti antigeniche cellulari come recettori di superficie, proteine citoplasmatiche e acidi nucleici che sono immunogeni per definizione e che, quindi, possono scatenare una reazione difensiva del sistema immunitario del ricevente.

Al contrario, i componenti della matrice extracellulare sono ampiamente conservati tra individui della stessa specie e addirittura tra individui di specie diverse, e pertanto essendo meno immunogeni non innescano una violenta reazione immunitaria di rigetto. Tuttavia alcuni studi hanno dimostrato la presenza, almeno a livello istologico, di una reazione da parte del ricevente di bassa intensità (Zhou et al., 2010) e sono stati segnalati casi di importanti reazioni di rigetto, come descritto da Simon e suoi collaboratori,

successivamente all'impianto di protesi valvolari di derivazione porcina, in pazienti pediatrici (Simon et al., 2003). Risulta chiaro che l'aspetto fondamentale della realizzazione di uno scaffold è basato sulla capacità del microambiente extracellulare di indurre e indirizzare il processo differenziativo e replicativo delle cellule staminali garantendo in tal modo la colonizzazione dello scaffold.

Gli scaffold composti da matrice extracellulare intatta (Badylack et al., 2009), che quindi comprendono tutte le molecole strutturali e funzionali prodotte dalle cellule originarie, dovrebbero riprodurre con maggior fedeltà il microambiente strutturale e biochimico e dovrebbero pertanto esplicare con maggiore efficacia le funzioni proprie della matrice extracellulare nel supportare la crescita cellulare e indirizzare la differenziazione in senso voluto.

La decellularizzazione si è, pertanto, rivelata un aspetto chiave nella complessa ricerca dello scaffold ideale e della bioingegneria dei tessuti, divenendo il principale campo di studi e conducendo anche a complessi tentativi sperimentali come quello di decellularizzare un organo intero. Infatti, attraverso la perfusione coronarica e l'immersione diretta in particolari detergenti, è stato ottenuto un cuore di ratto decellularizzato e successivamente ricellularizzato con cellule cardiache neonatali della stessa specie (Ott et al., 2008).

#### 1.4.3 SCAFFOLDS DECELLULARIZZATI DA TESSUTO ADIPOSO

Numerosi tentativi clinici riguardanti il trasferimento di tessuto adiposo autologo sono falliti a causa della mancata vascolarizzazione dell'impianto e del conseguente riassorbimento del costruito stesso. Come citato precedentemente, sarebbe ideale l'utilizzo di costrutti tissutali composti contenenti una rete vascolare intatta ma le difficoltà tecniche e gli alti costi sono un ostacolo importante per la realizzazione in senso pratico

di questa ipotesi. L'utilizzo di impianti sintetici come sostituti del tessuto adiposo è stato via via limitato a causa delle ingenti conseguenze negative che portano alla formazione di estese capsule fibrose che possono danneggiare l'impianto stesso impedendone l'integrazione con il sito ospite o addirittura danneggiando l'impianto stesso (Flynn et al, 2010).

Per tal motivo la bioingegneria tissutale ha provveduto ad incrementare la conoscenza e la progettazione di sostituti del tessuto adiposo per la rigenerazione. Per quanto riguarda questa tipologia di tessuto, la finalità che deve essere raggiunta dallo scaffold è quella di mantenere il più possibile il volume e la sua architettura tridimensionale dopo l'impianto.

La tipologia di composizione del sostituto del tessuto adiposo può includere le matrici decellularizzate o matrici di idrogel o una miscela di entrambi. Per questo lavoro di tesi è stato sfruttato il grande omento, il quale è stato impiegato in varie procedure chirurgiche in merito al ricco apporto vascolare che implementa un'elevata attività proangiogenetica importante per il supporto di tessuti ipossici ed ischemici. Inoltre espleta funzioni di immunoprotettive e secerne e immagazzina un'elevata concentrazione di fattori di crescita e fattori promuoventi l'omeostasi. In particolare, in condizioni di ipossia e di trauma, gli adipociti dell'omento sono in grado di aumentare l'espressione di fattori angiogenetici che esercitano un ruolo emoprotettivo, come il VEGF. Lo scopo di questo lavoro è quello di valutare gli effetti dell'utilizzo di un protocollo di decellularizzazione in campioni di omento di ratto e di uomo, che coinvolga processi meccanici e reazioni enzimatiche e di rimozione lipidica per ottenere uno scaffold adatto per la ricellularizzazione con cellule autologhe e il successivo impianto in un organismo ricevente. Successivamente, ulteriore finalità di questa tesi è quella di ottenere una nuova tipologia di scaffold derivanti dalla decellularizzazione del muscolo scheletrico, idoneo per la sostituzione di una parte della parete addominale di un coniglio ricevente fungendo da trapianto omologo.

#### 1.4.4 SCAFFOLDS DECELLULARIZZATI DA MUSCOLO SCHELETRICO

La seconda parte sperimentale di questo progetto si è focalizzata nella realizzazione di un altro sostituto derivante dalla decellularizzazione del muscolo scheletrico con la finalità di riparare un difetto della parete addominale.

Numerosi studi hanno potuto dimostrare che, anche nel muscolo scheletrico, la matrice extracellulare gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo del muscolo e nella sua rigenerazione. Infatti, sono stati individuati nella matrice extracellulare numerosi fattori di crescita coinvolti nel processo rigenerativo del muscolo, come ad esempio TGF-beta ed FGF (Schonherr et al., 1998; Matsuo et al., 2014). Inoltre, la matrice extracellulare muscolare partecipa ai meccanismi di migrazione cellulare, con particolare riferimento alla migrazione delle cellule satelliti. Per tali motivi, lo sviluppo di uno scaffold di derivazione muscolare scheletrica, che sia in grado di mantenere integra la struttura e la composizione della ECM, è risultato un obiettivo fondamentale per lo studio della rigenerazione muscolare.

Inizialmente sono stati realizzati scaffolds di derivazione muscolare mediante applicazione di protocolli di decellularizzazione del muscolo cardiaco (Akhyjari et al., 2008; Badylack et al., 2006; Ott et al., 2008) e del muscolo liscio (Badylack et al., 2005; Valentin et al., 2010) per far fronte alla ricostruzione dei medesimi tessuti.

Successivamente sono stati sviluppati degli scaffolds mediante applicazione di un protocollo di decellularizzazione al muscolo scheletrico.

Il primo protocollo di decellularizzazione è stato messo a punto da Carlson, il quale ha proposto una metodica a più passaggi. Il muscolo scheletrico è stato trattato con detergenti, quali EDTA e Triton X-100, per la rottura e la rimozione della componente membranosa delle cellule, poi sottoposto a digestione enzimatica con DNasi e infine trattato con sodio deossicolato per la rimozione dei detriti cellulari (Carlson et al., 1991).



Il protocollo di decellularizzazione è stato successivamente implementato e perfezionato mediante l'introduzione di cicli di congelamento e scongelamento (Ide, 1984) e di combinazioni di reazioni chimiche, con SDS, ed enzimatiche, con tripsina (Merritt et al., 2010; Perniconi et al., 2011; Woolf et al., 2012).

L'utilizzo di SDS risulta particolarmente efficace ad una concentrazione di 1% alla temperatura di 4°C e l'incubazione del campione deve essere inferiore alle 72 ore per evitare alterazioni della matrice extracellulare (Qin et al., 2009).

Trattamenti addizionali hanno previsto l'utilizzo del cloroformio per la rimozione della componente lipidica residua presente nel muscolo scheletrico (Merritt et al., 2010; Wolf et al., 2012).

In sostituzione all'utilizzo di detergenti è stata suggerita una fase di digestione enzimatica aggiuntiva mediante incubazione del campione con latrunculina B, la quale previene un'eccessiva degradazione della matrice (Gillies et al., 2011). Nonostante ciò, lo svantaggio sembra essere la ridotta degradazione del DNA rispetto gli scaffold realizzati con Triton X-100 e tripsina (Stern et al., 2009).

Lo sviluppo di queste matrici acellulari ha fornito una soluzione preliminare per il trattamento ricostruttivo di perdita volumetrica e funzionale del tessuto muscolare a causa di difetti congeniti o traumi (Cheng et al., 2014).

Infatti, in un recente studio del 2010 è stato, documentato il trasferimento di uno scaffold acellulare di muscolo gastrocnemio ottenuto mediante decellularizzazione in un ratto affetto da disfunzione muscolare. Dopo circa un mese dall'impianto è stato osservato un incremento del numero di miofibrille e di cellule endoteliali nella periferia dello scaffold, suggerendo l'azione di guida delle componenti della matrice extracellulare dello scaffold nel processo riparativo (Merritt et al., 2010a).

Esperimenti successivi hanno, invece, considerato la possibilità di impiantare uno

scaffold che viene precedentemente colonizzato con cellule progenitrici muscolari in vitro: in tale maniera è stato evidenziato che la semina di cellule progenitrici favorisce e potenzia la risposta rigenerativa del muscolo con la formazione di nuove miofibrille e nuovi canali vascolari (Merritt et al., 2010b).

Studi successivi hanno confermato che la sostanziale differenza tra l'impianto di uno scaffold decellularizzato rispetto ad uno ricellularizzato in vitro sta proprio nella presenza di cellule muscolari nello scaffold stesso. Nel primo caso, infatti, non si parla di rigenerazione ma di riparazione del tessuto: il sito di difetto viene sostituito con tessuto fibroso mentre la componente muscolare localizzata nella periferia è il risultato di processi chemoattrattivi esercitati dalla matrice extracellulare dello scaffold, il quale favorisce la crescita solo di quelle miofibrille preesistenti recise al momento dell'impianto. Nel secondo caso, invece, la presenza nello scaffold di cellule progenitrici muscolari è l'artefice della rigenerazione tissutale vera e propria con genesi di nuove miofibrille (Conconi et al., 2005).

Sfruttando tali metodi di decellularizzazione riportati in letteratura è stato messo appunto in laboratorio un protocollo per la generazione di uno scaffold per la correzione dei difetti della parete addominale.

Nell'ambito della medicina riparativa, il ripristino della continuità e della funzionalità della parete addominale, dovute a causa di difetti congeniti o a traumi, viene eseguito mediante una riparazione chirurgica diretta o mediante l'uso di materiali sostitutivi. Nei casi in cui vi sia perdita di sostanza o il tessuto presente non sia più in grado di adempiere al suo compito di sostegno del contenuto addominale, la ricostruzione può essere attuata mediante l'impiego di lembi muscolo-aponeurotici di scorrimento o, in assenza di questi ultimi, mediante l'inserimento di impianti ed innesti. In riferimento a questi, è necessario rispettare i principi fondamentali che garantiscono una corretta ricostruzione della parete

addominale, che includono la protezione e copertura dei visceri intra-addominali, la riparazione e prevenzione della formazione di ernie e il raggiungimento di un'acceptabile superficie di contorno. In merito a ciò, ci si avvale delle capacità di realizzare sostituti muscolari facendo ricorso a supporti di tipo tecnologico, biologico o bioingegneristico con lo scopo di determinare la guarigione di una lesione mediante stimolo e cooperazione con le residue capacità rigenerative del nostro organismo. Lo scopo dello scaffold diviene quello di pilotare una guarigione ordinata e fisiologica con gli stessi presupposti indicati per lo scaffold ideale. Numerosi scaffold, sia biologici che sintetici, sono attualmente presenti in commercio ed utilizzati in campo rigenerativo nella pratica clinica.

- Tessuti biologici omologhi o xenologhi (fascia lata, pericardio): capacità immunogene minime, possono venire integrate nel tessuto di granulazione fornendo al tempo stesso una protezione dei visceri assimilabile alle reti sintetiche.
- Tessuti bioingegnerizzati: di derivazione xenologa sono strutture quali il derma decellularizzato (Alloderm<sup>®</sup>, Strattice<sup>®</sup>) che fungono da scaffold per guidare una neovascolarizzazione ordinata divenendo biointegrati e con capacità di mediare una adeguata risposta alle infezioni a differenza dei mesh sintetici.
- Sostituti dermici: capacità di formare un neoderma previa vascolarizzazione dai margini su cui è possibile applicare un innesto cutaneo. Ne sono esempi quelli costituiti da collagene bovino e condroitin 6-solfato ricoperti di una lamina siliconica (Integra<sup>®</sup>).
- Dispositivi a pressione negativa: applicati quando non è possibile, una chiusura diretta o una ricostruzione e pertanto è necessario contenere i visceri, le perdite idroelettriche bilanciare le forze addominali, rimuovere essudati o materiali estranei in ferite molto contaminate.



## 2. SCOPO DELLA TESI

Gli obiettivi del presente lavoro sono stati i seguenti:

- Sviluppare un nuovo tipo di scaffold mediante decellularizzazione di campioni di *omento* umano e di ratto sfruttando meccanismi fisico-meccanici, chimici ed enzimatici. Dimostrare la possibilità di ricellularizzare lo scaffold con cellule della frazione stromale vascolare isolate dal lipoaspirato umano.
- Sviluppare un ulteriore scaffold biologico da *muscolo scheletrico*, derivato dalla decellularizzazione del muscolo retto del coniglio, utilizzabile per la ricostruzione di un difetto della parete addominale.



## **3. MATERIALI E METODI**

### **3.1 SVILUPPO DI UNO SCAFFOLD DA OMENTO**

#### **3.1.1 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DI OMENTO**

Sono stati prelevati diversi campioni di omento di ratto e di uomo. Sono stati utilizzati ratti sia di sesso femminile che maschile Sprague-Dawley attenendosi alla regolamentazioni italiane del Ministero della Salute e alla Direttiva del Comitato Europeo del 24 Novembre 1986 (86/609/EEC). Dopo un taglio eseguito nella regione addominale è seguita la resezione del grande omento che successivamente è stato risciacquato con un tampone salino sterile (PBS, Sigma-Aldrich, Milano, Italia) complementato con 20 mg/mL di albumina di siero bovino (BSA, Sigma-Aldrich) e mantenuto in soluzione fino a 2 ore dal momento della resezione.

I campioni di omento umano, invece, sono stati prelevati durante autopsie di soggetti adulti. Ciascun campione è stato trasportato in laboratorio immerso nella soluzione precedentemente descritta, PBS con 20 mg/mL di BSA.

#### **3.1.2 PROTOCOLLO DI DECELLULARIZZAZIONE**

I campioni di omento sono stati sottoposti ad una serie di trattamenti per la decellularizzazione che coinvolgono una rottura meccanica delle membrane, estrazione dei lipidi con solventi polari e la digestione enzimatica degli organelli e strutture intracellulari.

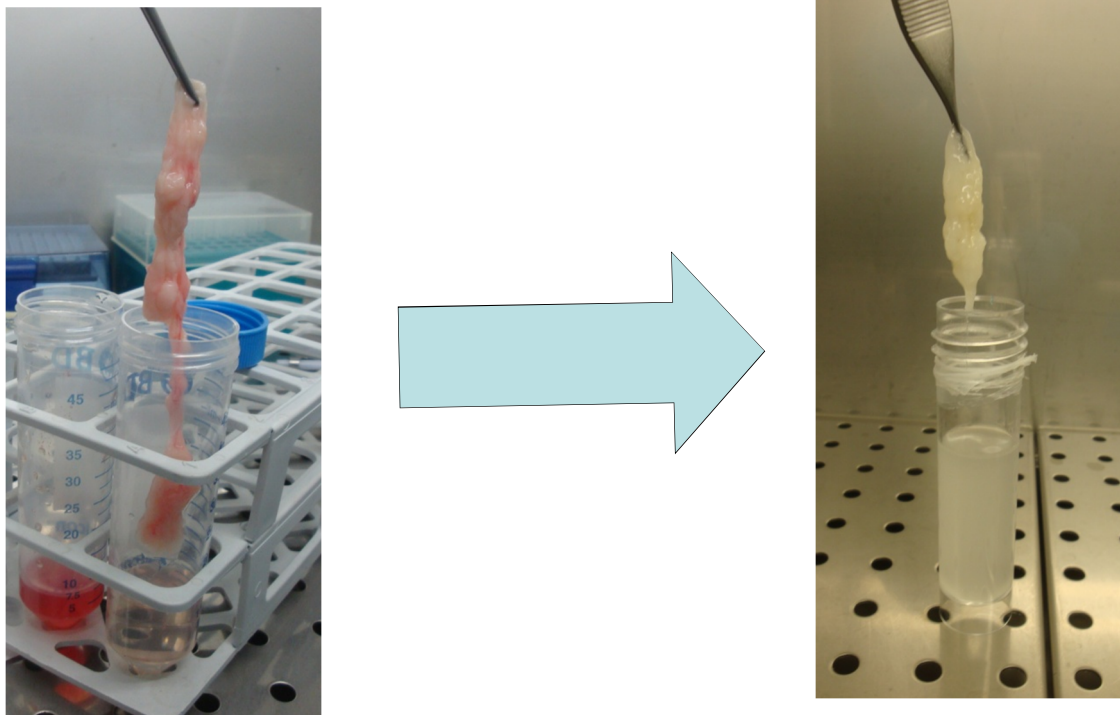
Il protocollo utilizzato che comporta la decellularizzazione in un tempo di 5 giorni è stato riportato in letteratura (Flynn et al., 2006, 2010) per la realizzazione di scaffold derivanti dalla placenta e dal tessuto adiposo, ma l'innovazione deriva proprio dalla sorgente di decellularizzazione, l'omento, la quale non è mai stata considerata. La specificità delle soluzioni impiegate e i tempi di incubazione sono stati monitorati giorno per giorno

mediante analisi istologiche e di quantificazione di DNA. Principalmente la differenza dei tempi di incubazione tra i campioni di ratto e quelli di uomo dipende dalle dimensioni e dallo spessore del frammento di omento considerato. Infatti il seguente protocollo si riferisce alla processazione di frammenti dalle dimensioni di 2x2 cm per l'umano e di 1x1 cm per il ratto. È evidente, infatti, che i canali vascolari che perfondono l'omento umano hanno un calibro vascolare decisamente maggiore rispetto a vasi che perfondono l'omento del ratto. Come detto in precedenza, tali differenze portano ad una riduzione dei tempi di incubazione di circa il 50% per quanto riguarda la decellularizzazione dell'omento del ratto.

Entro 2 ore dalla fase di campionamento, tutti i campioni sono stati sottoposti a 3 cicli di congelamento e scongelamento (da  $-80^{\circ}\text{C}$  a  $37^{\circ}\text{C}$ ) in una soluzione composta da 10 mM Tris base (Sigma-Aldrich) e 5 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, Sigma Aldrich) a pH 8.0. I tessuti sono stati poi trasferiti nella prima soluzione di digestione enzimatica costituita da 0.25% tripsina e 0.1% EDTA (Invitrogen, Milan, Italy) e incubati per 16 ore alla temperatura di  $37^{\circ}\text{C}$ , mantenendo un'agitazione costante che favorisce la separazione delle cellule. Il giorno seguente i campioni vengono trattati con un solvente polare, l'isopropanolo, 2-propanol 99.9% (Sigma-Aldrich) per 48 ore, che è in grado di sciogliere e rimuovere la componente lipidica dell'omento. Successivamente i campioni sono stati risciacquati 30 minuti per 3 volte nella soluzione di lavaggio costituita da 8 g/L NaCl, 200 mg/L KCl, 1 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , e 200 mg/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (tutti i reagenti sono distribuiti da Sigma-Aldrich) a pH 8.0, per rimuovere i residui dell'isopropanolo. I campioni sono stati incubati, poi, per 6 ore a  $37^{\circ}\text{C}$  in continua agitazione nella soluzione di digestione enzimatica costituita da 0.25% tripsina e 0.1% EDTA e in seguito risciacquati nella soluzione di lavaggio. Successivamente, è seguita l'incubazione per 16 ore in continua agitazione nella seconda soluzione di digestione enzimatica contenente 55



mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.9 mM MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 15,000 U deoxyribonuclease I type II (da pancreas bovino), 12.5 mg ribonuclease type IIIA (da pancreas bovino), 2000 U lipase type VI-S (da pancreas di maiale) (tutti i reagenti sono distribuiti da Sigma-Aldrich). Dopo una serie di 3 lavaggi si è proceduto ad una seconda fase di estrazione lipidica, incubando i tessuti con l'isopropanolo per 6 ore in continua agitazione. Alla fine del processo la matrice decellularizzata è stata accuratamente lavata e risciacquata 3 volte con la soluzione di lavaggio, 3 volte con alcool al 70% e conservata in PBS a +4°C fino al suo utilizzo (Fig 1). Tutte le soluzioni sono state implementate dell'1% di agenti antibiotici e antimicotici per evitare qualsiasi infezione e contaminazione (ABAM, A5955, Sigma-Aldrich). Inoltre per evitare un'eccessiva e incontrollata degradazione della matrice extracellulare, tutte le soluzioni fatta eccezione di quella di digestione enzimatica, sono state complementate con l'1% di inibitore delle proteasi, PMSF (phenylmethanesulphonylfluoride, Sigma-Aldrich).



**Fig. 1:** Campione di omento prima e dopo la decellularizzazione.

### 3.1.3 ANALISI ISTOLOGICHE ED IMMUNOISTOCHEMICHE

I campioni di omento umano e di ratto sono stati fissati in 10 % formalina neutra per 24 ore, sia prima che al termine del processo di decellularizzazione, poi inclusi in paraffina e tagliati in sezioni di spessore di 3  $\mu\text{m}$ . In particolare, campioni rappresentativi sono stati prelevati da varie regioni dello scaffold decellularizzato, comprese più centrali e le superfici esterne. Sono state eseguite le seguenti colorazioni istochimiche: ematossilina e eosina, azan Mallory, Van Gieson, PAS e alcian-PAS. Alcuni campioni, invece, sono stati congelati in OCT per le colorazioni specifiche per i lipidi Oil Red e Sudan, e per valutare la presenza dei nuclei al termine del processo, mediante la colorazione con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).

Analisi di immunostochimica sono state effettuate con i seguenti anticorpi: anti-CD31 (Anti-CD31 umano, M0823, Dako, Milano, Italia), anti-CD34 (Anti- CD34 umano Classe II, M7165, Dako); anti- $\alpha$  actina del muscolo liscio (Mouse IgG2a kappa, clone 1A4, Code No. M0851, Dako ). Per la reazione immunostochimica con anti-CD31 e CD34 è stato necessario sfruttare lo smascheramento degli antigeni mediante incubazione in tampone di citrato di sodio 10 mM, pH 6, a 90 °C per 30 min. Lo smascheramento antigenico non è stato necessario per l'utilizzo dell'anticorpo anti- $\alpha$  actina del muscolo liscio. Le sezioni sono state incubate in 0,3% di perossido di idrogeno per 10 minuti a temperatura ambiente, per evitare l'attività della perossidasi endogena, poi in siero costituito da 0,04 % di albumina bovina (A2153, Sigma - Aldrich) e di capra 0,5 % (X0907, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) in PBS per 30 minuti a temperatura ambiente. Per quanto riguarda l'incubazione anticorpo primario, sia anti-CD31 e sia anti-CD34 sono stati diluiti 1:50 in siero e incubate per 1 ora a temperatura ambiente. L'anticorpo anti- $\alpha$  actina del muscolo liscio è stato diluito 1:100 in siero bloccante e incubato per 1 ora a temperatura ambiente. Le sezioni sono state poi lavate tre volte per 5 minuti in PBS e

incubate con il polimero secondario ImmPRESS (anti-topo Ig/anti-coniglio Ig, perossidasi, MP-7500, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) per 30 minuti. Infine, le sezioni sono state sviluppate in 3,3-diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich) e i nuclei contrastati con ematossilina.

#### 3.1.4 COLORAZIONE CON DAPI

Le sezioni congelate, precedentemente tagliate al criostato, sono state fissate in acetone per 15 minuti a temperatura ambiente, lavate con PBS per 10 minuti e incubate con il colorante DAPI, diluito 1:500 in metanolo, per 1 minuto. A seguito della breve incubazione le sezioni sono state lavate con il PBS, coperte ed osservate al microscopio a fluorescenza.

#### 3.1.5 ESTRAZIONE E QUANTIFICAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

Alcuni frammenti di omento di ratto e di uomo sono stati congelati prima e dopo la decellularizzazione e conservati a -80°C in vista dell'estrazione del DNA e della quantificazione. Il DNA genomico è stato estratto con il protocollo del kit commerciale Dneasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Italia) seguendo le istruzioni riportate nella confezione. La concentrazione totale di DNA è stata quantificata spettrofotometricamente, mediante utilizzo di Nanodrop, alla lunghezza d'onda specifica per gli acidi nucleici, ovvero 260 nm, corrispondente al massimo assorbimento delle basi azotate.

### 3.1.6 ESTRAZIONE DI CELLULE DELLA FRAZIONE STROMALE VASCOLARE DA RATTO

Le colture primarie delle cellule della SVF del ratto sono state performate seguendo le metodiche descritte da Ning e i suoi collaboratori nel 2012. Brevemente, il tessuto adiposo del ratto è stato resecato dalla regione inguinale sottocutanea, come approvato dal regolamento del Ministero della Salute Pubblica Italiana. I campioni di tessuto sono stati risciacquati 3 volte con PBS contenente 1% degli antibiotici penicillina e streptomina, poi centrifugati a 220g per 10 minuti a temperatura ambiente e digeriti per un'ora a 37°C con 0,075% di Collagenasi di tipo 1, in continua agitazione. Al termine della digestione enzimatica, i campioni sono stati ulteriormente centrifugati a 220g per 10 minuti a temperatura ambiente e dopo la rimozione della fase lipidica in sospensione, la soluzione rimanente è stata centrifugata per una terza volta a 220 g per 10 minuti. Dopo la rimozione della frazione liquida, il pellet rimasto sul fondo della provetta è stato risospeso con 10 ml di NH<sub>4</sub>Cl 160 mM per 10 minuti per favorire la lisi dei globuli rossi. Dopo una centrifugazione a 220g con PBD, la sospensione è stata risospesa con il terreno di coltura DMEM con 10% di FBS e messa in coltura a 37°C.

### 3.1.7 ESTRAZIONE DI CELLULE DELLA FRAZIONE STROMALE VASCOLARE DA UOMO

I campioni di lipoaspirato umano sono stati ottenuti con il consenso informato dei pazienti che sono stati sottoposti ad addominoplastica o a chirurgia addominale. I tessuti sono stati lavati con PBS e 20 mg/ml I albumina per rimuovere i residui di sangue e per preparare il tessuto per il processo di estrazione delle cellule. Successivamente il lipoaspirato è stato digerito con 0.2% Collagenasi IA (Sigma-Aldrich) per 45 minuti, a 37°C in continua agitazione. Un uguale volume di terreno di crescita DMEM con 10% di

FBS è stato aggiunto alla soluzione per l'inattivazione della collagenasi. Il tessuto digerito è stato mantenuto in posizione statica per 5 minuti per favorire la sedimentazione delle cellule per gravità nel fondo della provetta. Successivamente la fase lipidica, che per azione della forza di gravità è salita nella fase superiore della soluzione, è stata prontamente rimossa mediante aspirazione e la frazione liquida rimanente è stata centrifugata a 1200g per 5 minuti a temperatura ambiente. Il pellet è stato risospeso con terreno di coltura DMEM con 10% FBS e messo in coltura nelle apposite fiasche, a 37°C, 5% di CO<sub>2</sub>.

### 3.1.8 RICELLULARIZZAZIONE DELLO SCAFFOLD

Lo scaffold derivante dall'omento umano è stato fatto aderire alla plastica della fiasca mediante incubazione con fibronectina e incubato con terreno di coltura DMEM con 10% FBS per 24 ore, poi incubato con  $5 \cdot 10^5$  cellule in fiasche, con DMEM, 10% FBS, 1% antibiotici e antifungini, a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Il terreno di coltura è stato cambiato ogni 48 ore. Dopo 2 settimane dalla semina, lo scaffold è stato fissato in formalina ed analizzato mediante medesime colorazioni di cui sopra.

## **3.2 SVILUPPO DI UNO SCAFFOLD DA MUSCOLO SCHELETRICO**

### **3.2.1 MODELLO ANIMALE**

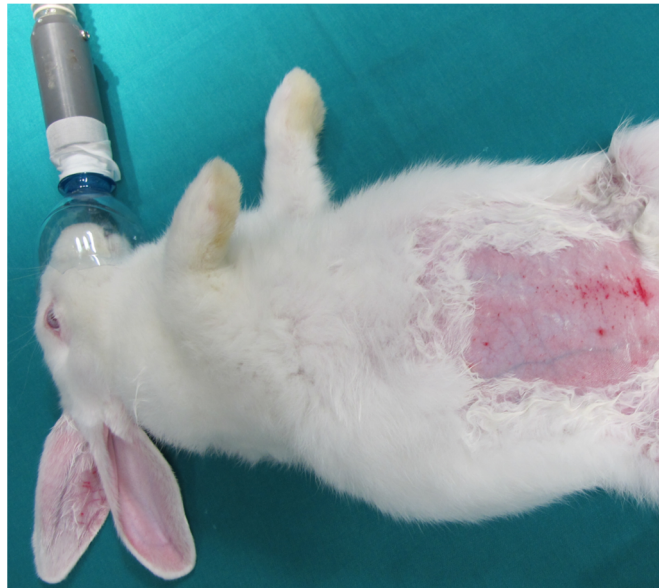
Campioni di muscolo retto dell'addome sono stati prelevati da conigli mantenuti nello stabulario di Chirurgia Sperimentale dell'Università di Padova. Il presente studio è stato approvato dal Comitato Etico della nostra Università, dal Ministero della Salute, conformemente alla legislazione in vigore (D.Lgs.116/1992) e secondo i principi della Dichiarazione di Helsinki sugli studi riguardanti gli animali.

Gli animali sottoposti alla presente fase sperimentale sono stati complessivamente 12, all'interno di un protocollo approvato complessivamente per 60 animali. La specie che è stata da noi prescelta è il coniglio adulto (*Oryctolagus cuniculus*), del ceppo "New Zealand White", di sesso maschile e peso medio compreso tra 2200 e 3300 grammi. Gli animali sono stati tenuti in gabbie adeguate secondo normativa, con sufficiente cibo, idratazione, toilette da parte del personale e controlli veterinari settimanali.

Dapprima si è provveduto al prelievo, sotto microscopio operatorio, di lembi di parete addominale.

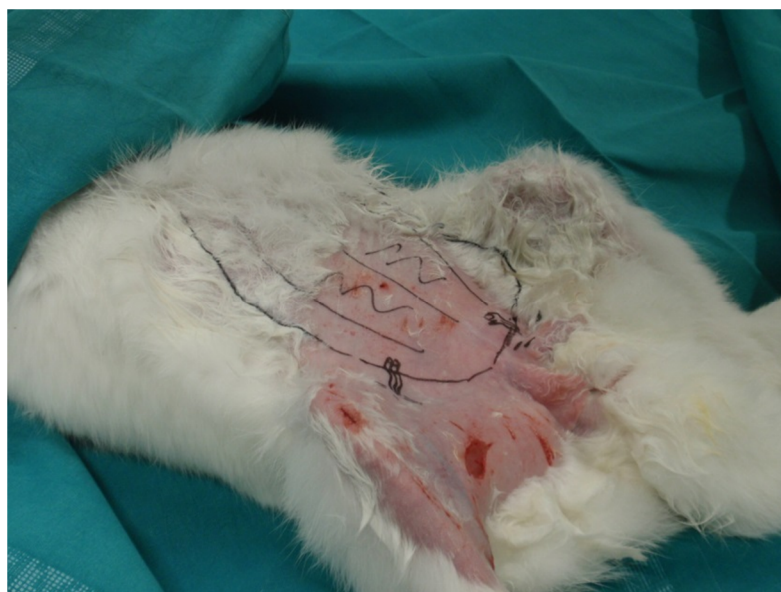
### 3.2.2 PRELIEVO MICROCHIRURGICO DEL LEMBO

L'animale è stato sottoposto ad anestesia intramuscolare mediante l'iniezione di 0,6 ml/kg di tiletamina cloridrato e zolazepam a livello dorso-lombare; l'anestesia generale è stata mantenuta durante tutto l'intervento mediante inalazione in maschera di isoflurano (Fig.2).



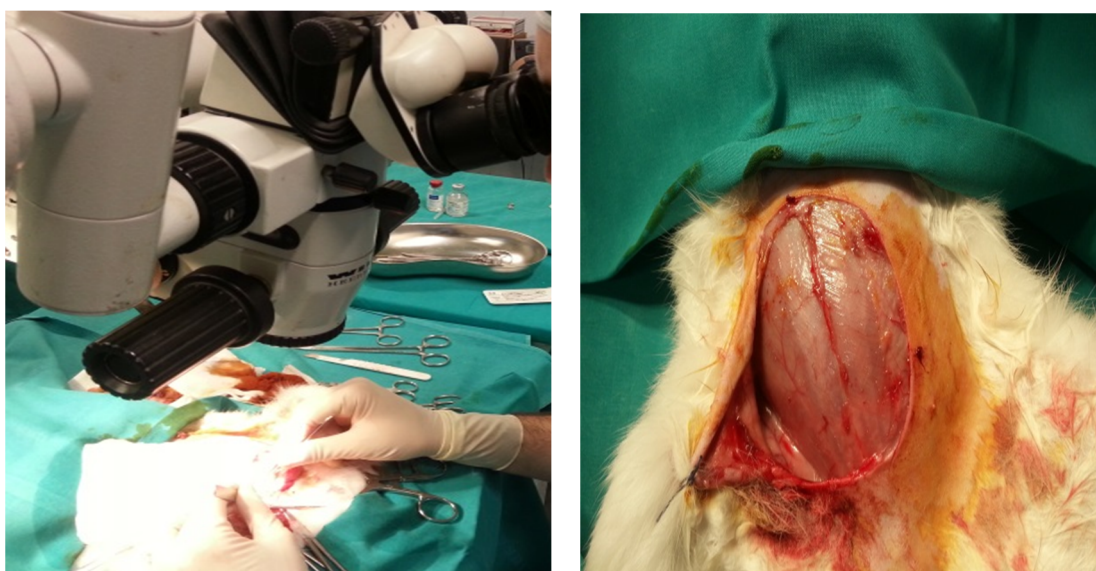
**Fig. 2:** Coniglio sottoposto ad anestesia generale.

I parametri e lo stato di anestesia sono stati monitorati dal personale mediante controllo delle escursioni respiratorie, risposta agli stimoli dolorosi e riflessi corneali. È stata somministrata anche una dose di anestesia loco-regionale sottocutanea di lidocaina al 1%, nel sito di incisione. La procedura chirurgica è stata eseguita in campo sterile ed entrambi gli inguini e la regione addominale sono stati disinfettati con soluzione di clorexidina e betadine alcolico. La regione addominale è stata opportunamente tracciata sull'animale per facilitare l'individuazione del sito di prelievo (Fig. 3).



**Fig. 3:** Individuazione del sito di prelievo.

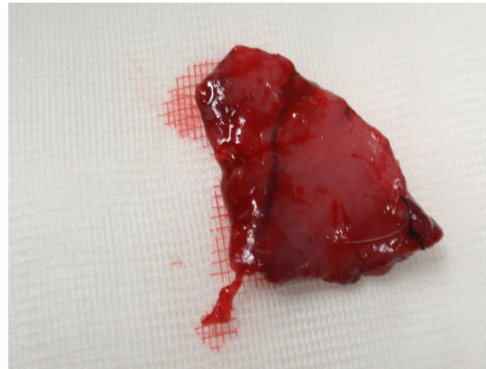
E' stata effettuata un'incisione obliqua di circa 5 cm a livello inguino-femorale e successivamente estesa prossimalmente, comprendendo i limiti del lembo addominale. La dissezione del lembo è stata eseguita con l'ausilio di microscopio operatorio (Carl Zeiss Inc., OPM1) e di strumentazione microchirurgica (Fig. 4).



**Fig. 4:** Microscopio operatorio e dettaglio dell'incisione addominale.



Infine si sono prelevate porzioni di muscolo retto con peduncolo vascolare principale (Fig. 5). Gli animali sono stati trattati per profilassi antibiotica con la dose di 5 mg/kg di enrofloxacin al momento dell'induzione anestetica, mantenuta successivamente per ulteriori 7 giorni. Al termine della procedura chirurgica, è stata somministrata la dose di 5 mg/kg di tramadolo, a scopo analgesico, ripetuto due volte nelle successive 48 ore.



**Fig. 5:** Prelievo di lembo muscolare della regione addominale.

### 3.2.3 DECELLULARIZZAZIONE MUSCOLARE ED ANALISI ISTOLOGICHE

I lembi muscolari sono stati conservati in soluzione di PBS, BSA (albumina bovina) 20 mg/ml, addizionato con una soluzione antibiotica ed antimicotica (ABAM) all'1% per evitare contaminazione batterica e fungina, e con PMSF all'1%.

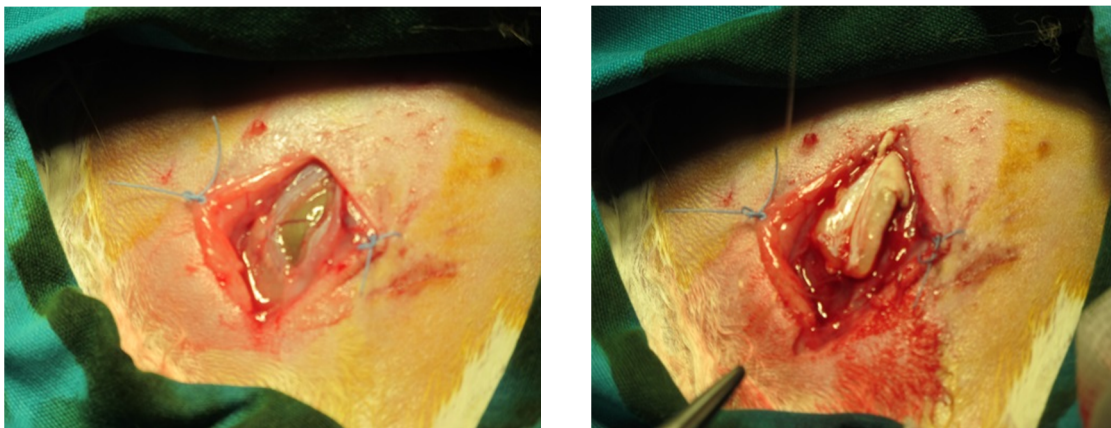
I campioni sono stati sottoposti a 3 cicli di congelamento/scongelo per la rottura delle membrane cellulari (-80°C a 37°C) e tenuti in agitazione in acqua distillata a 4°C per due giorni. Successivamente sono stati incubati con NaCl 0,5M per 4 ore e poi con una soluzione salina a concentrazione maggiore (NaCl 1M) in continua agitazione. Dopo un breve lavaggio in acqua distillata, è stata ripetuta questa serie di reazioni. Sono stati poi incubati in tripsina ed EDTA per 2 ore a 37°C per la digestione del tessuto e poi trattati con il detergente Triton X-100 per 5 giorni a temperatura ambiente in continua agitazione. Successivamente sono stati incubati con DNasi per 3 ore a 37°C e lavati in acqua distillata per eliminare tutti i reagenti. Al termine del processo di

decellularizzazione i campioni sono stati risciacquati con PBS e conservati a 4°C.

Al termine della procedura tutti i campioni sono stati inclusi in paraffina e sottoposti alle colorazioni ematossilina ed eosina, azan Mallory e Van Gieson.

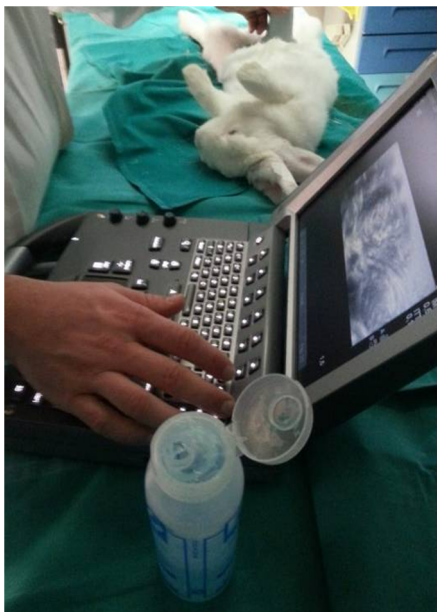
#### 3.2.4 IMPIANTO DEL MUSCOLO DECELLULARIZZATO, ECOGRAFIA E SUCCESSIVO PRELIEVO

Mediante l'ausilio del microscopio operatorio è stata effettuata un'incisione obliqua di circa 5 cm a livello inguino-femorale e successivamente estesa prossimalmente, comprendendo i limiti del lembo addominale. E' stata eseguita la dissezione del tassello addominale da sostituire e successivamente la matrice decellularizzata è stata posizionata nel sito del difetto e fatta aderire al tessuto muscolare circostante mediante fili di sutura riassorbibili (Fig. 6).

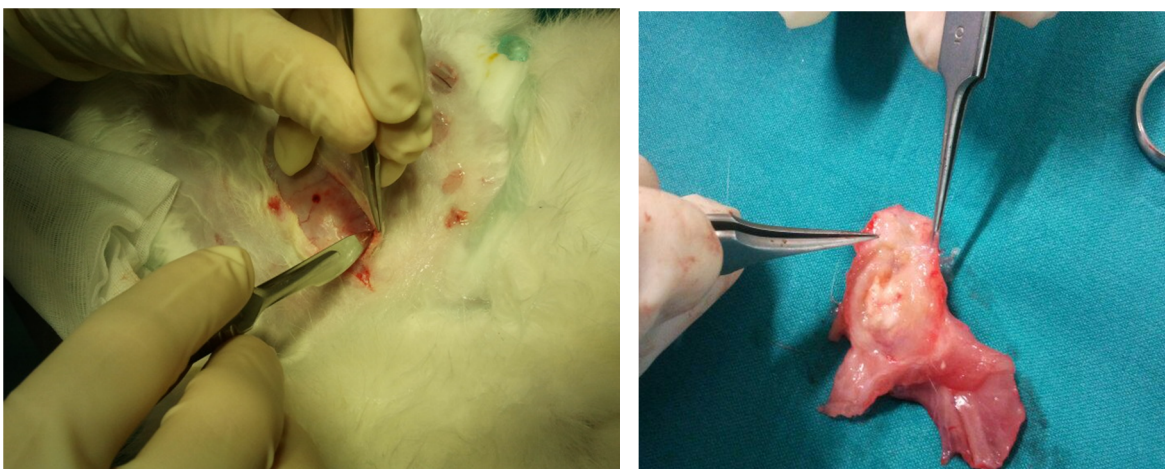


**Fig. 6:** Erniazione viscerale per rimozione del tassello di parete muscolare e copertura della stessa con la matrice muscolare decellularizzata.

La regione addominale e i piani cutanei sono stati successivamente richiusi mediante fili di sutura al termine della procedura chirurgica, è stata somministrata la dose di 5 mg/kg di tramadolo, a scopo antalgico, ripetuto due volte nelle successive 48 ore. La matrice decellularizzata è stata mantenuta nel coniglio ricevente per un mese e allo scadere del termine proposto l'animale è stato analizzato mediante ecografia (M-Turbo ultrasound system, SonoSite, FUJIFILM) (Fig. 7) e poi sacrificato. L'impianto è stato prelevato e analizzato mediante colorazioni istologiche (Fig. 8).



**Fig. 7:** M-TURBO ultrasound system.



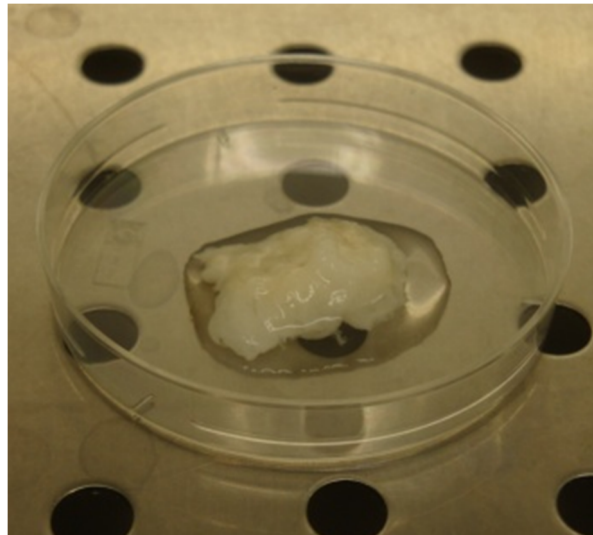
**Fig. 8:** Individuazione dell'impianto e suo prelievo.



## 4. RISULTATI

### 4.1 SCAFFOLD DA OMENTO

Il protocollo di decellularizzazione ha indotto la perdita della componente lipidica dei campioni di tessuto omentale grazie alle due incubazioni con isopropanolo: dal punto di vista macroscopico le micelle lipidiche sono osservabili nella soluzione come gocce d'olio. Grazie alla perdita dei lipidi, che in natura riflettono un colore giallo chiaro, è apprezzabile un cambiamento di colore del campione, il quale risulta essere biancastro (Fig. 9).

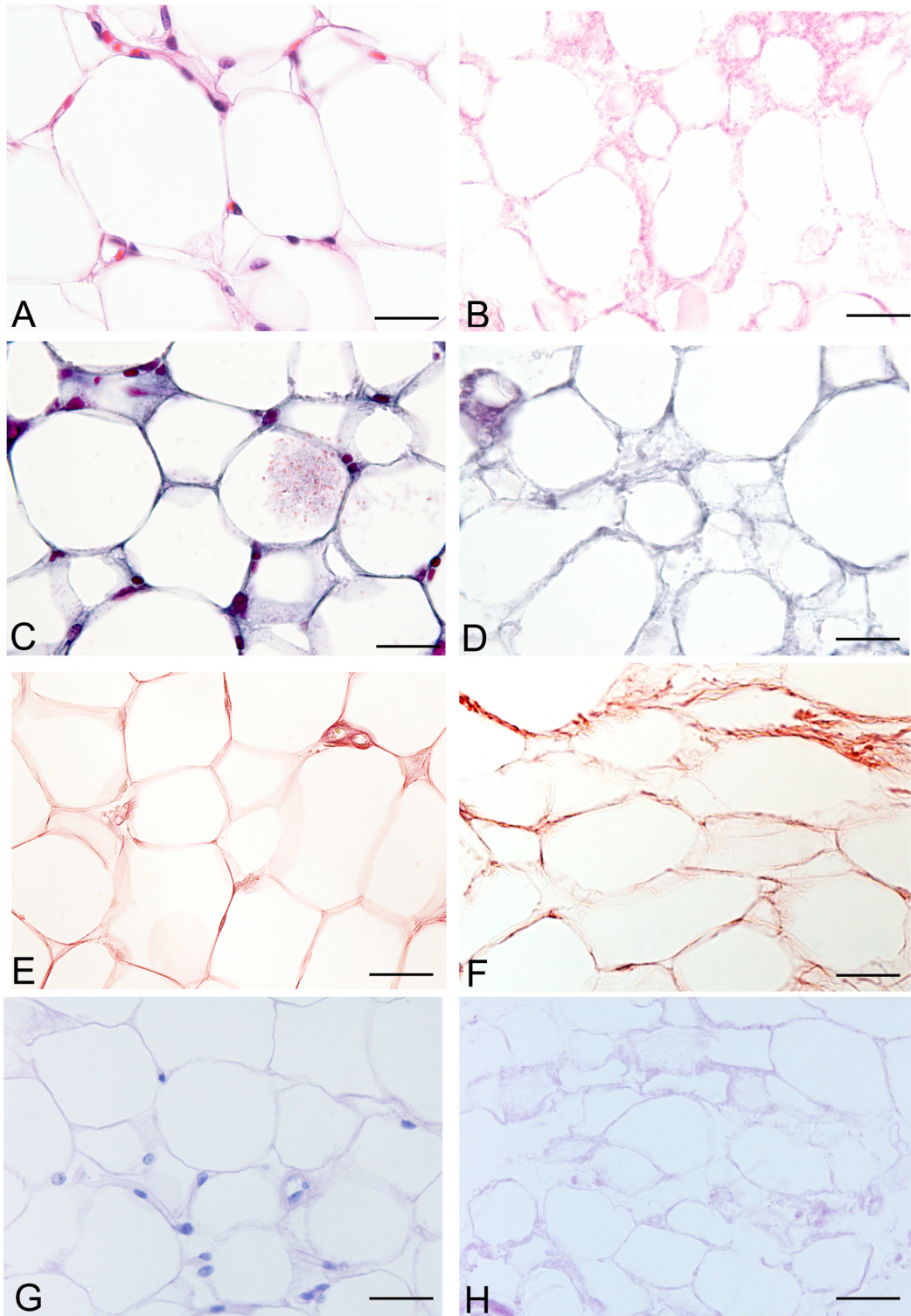


**Fig. 9:** Risultato del campione di omento al seguito della decellularizzazione.

Dal punto di vista morfologico, macroscopicamente i campioni hanno preservato il loro volume e non sono evidenti rotture del tessuto a seguito della continua immersione in sostanze ad effetto litico e la continua agitazione meccanica indispensabile per un'omogenea penetrazione dei reagenti all'interno dei campioni. Nonostante tutto, i campioni dimostrano una lieve riduzione della consistenza, dovuta alla perdita degli adipociti e delle cellule di sostegno del tessuto. In generale, sia nei campioni di ratto e sia in quelli di uomo, le colorazioni istologiche hanno evidenziato la perdita dei componenti

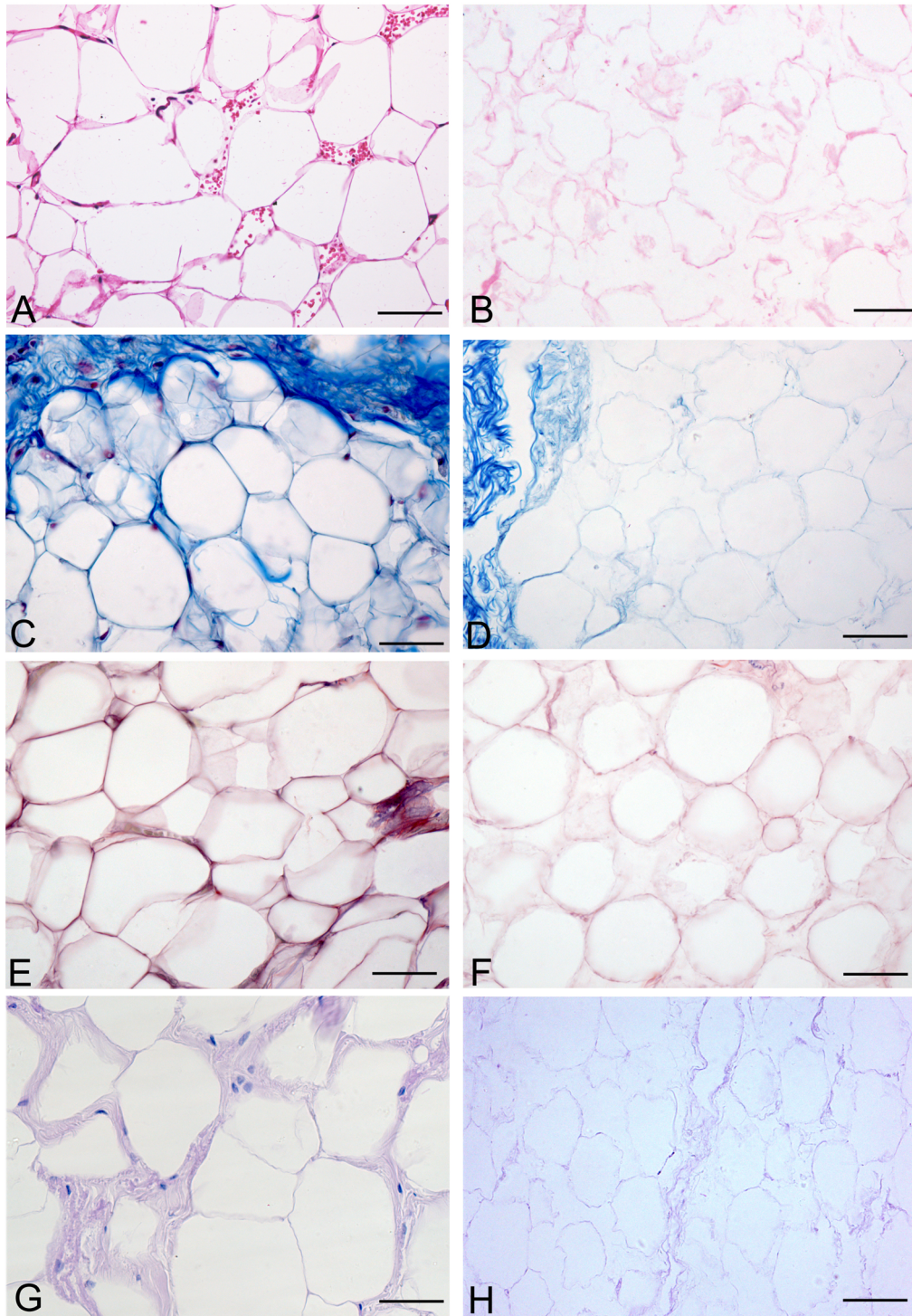
cellulari dell'omento e la preservazione della struttura tridimensionale delle fibre del tessuto connettivo. Mediante la colorazione base dei campioni istologici, ovvero l'ematosilina ed eosina, si è potuto osservare la scomparsa dei nuclei delle diverse tipologie cellulari, quali adipociti, cellule endoteliali e fibroblasti che costituiscono il tessuto. In particolare, attraverso la colorazione azan Mallory, si è potuto osservare che nella matrice decellularizzata è conservata la rete tridimensionale dei sottili setti connettivali ricchi di collagene (colorati in blu con tale metodica). La colorazione Van Gieson ha anche dimostrato la preservazione delle fibre elastiche, organizzate in una complessa rete tridimensionale, che prima della decellularizzazione circondava gli adipociti. Un'ulteriore colorazione, il PAS, ha rivelato, inoltre, la persistenza di fibre reticolari e di glicosamminoglicani, che risultano evidenziati in viola (Fig. 10, 11).





**Fig. 10:** Colorazioni istologiche dell'omento umano prima (sinistra) e dopo (destra) la decellularizzazione: A-B ematossilina ed eosina; C-D azan Mallory; E-F Van Gieson; G-H PAS. Scale bar: A-H 23,8  $\mu$ m. Si noti la perdita degli elementi cellulari e la preservazione della rete tridimensionale della matrice extracellulare.

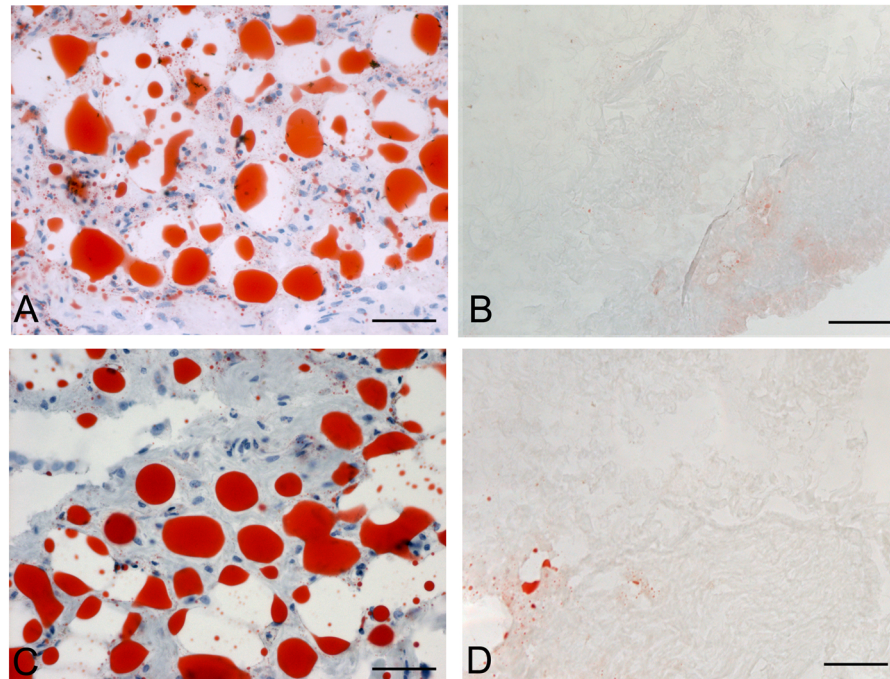




**Fig. 11:** Colorazioni istologiche dell'omento del ratto prima (sinistra) e dopo (destra) la decellularizzazione: A-B ematossilina ed eosina; C-D azan Mallory; E-F Van Gieson; G-H PAS. Scale bar: A-H 37,5  $\mu$ m.

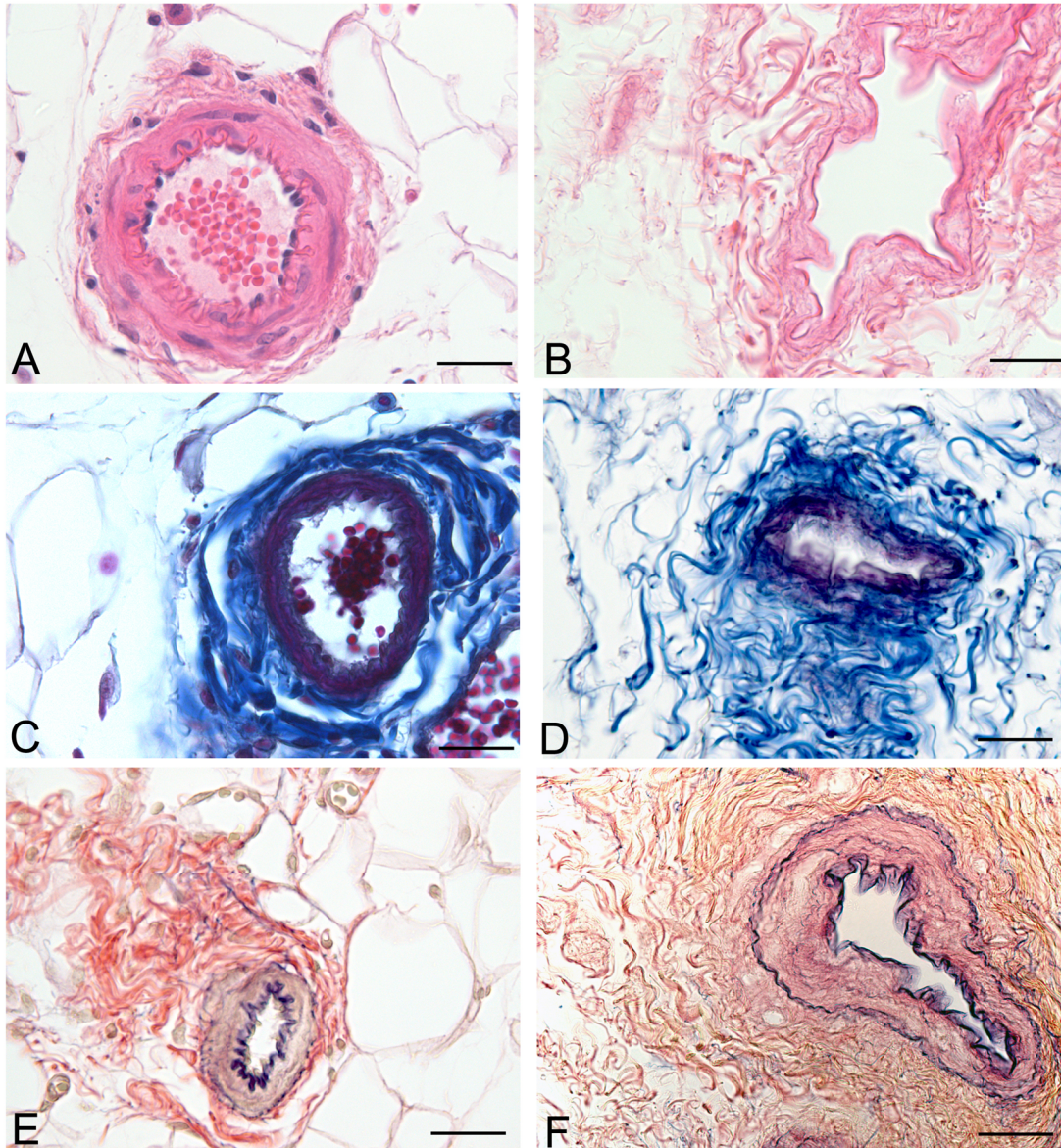


Colorazioni specifiche per i lipidi (Oil Red e Sudan) hanno altresì dimostrato la scomparsa della loro componente lipidica dalla matrice biologica a seguito della decellularizzazione (Fig. 12).



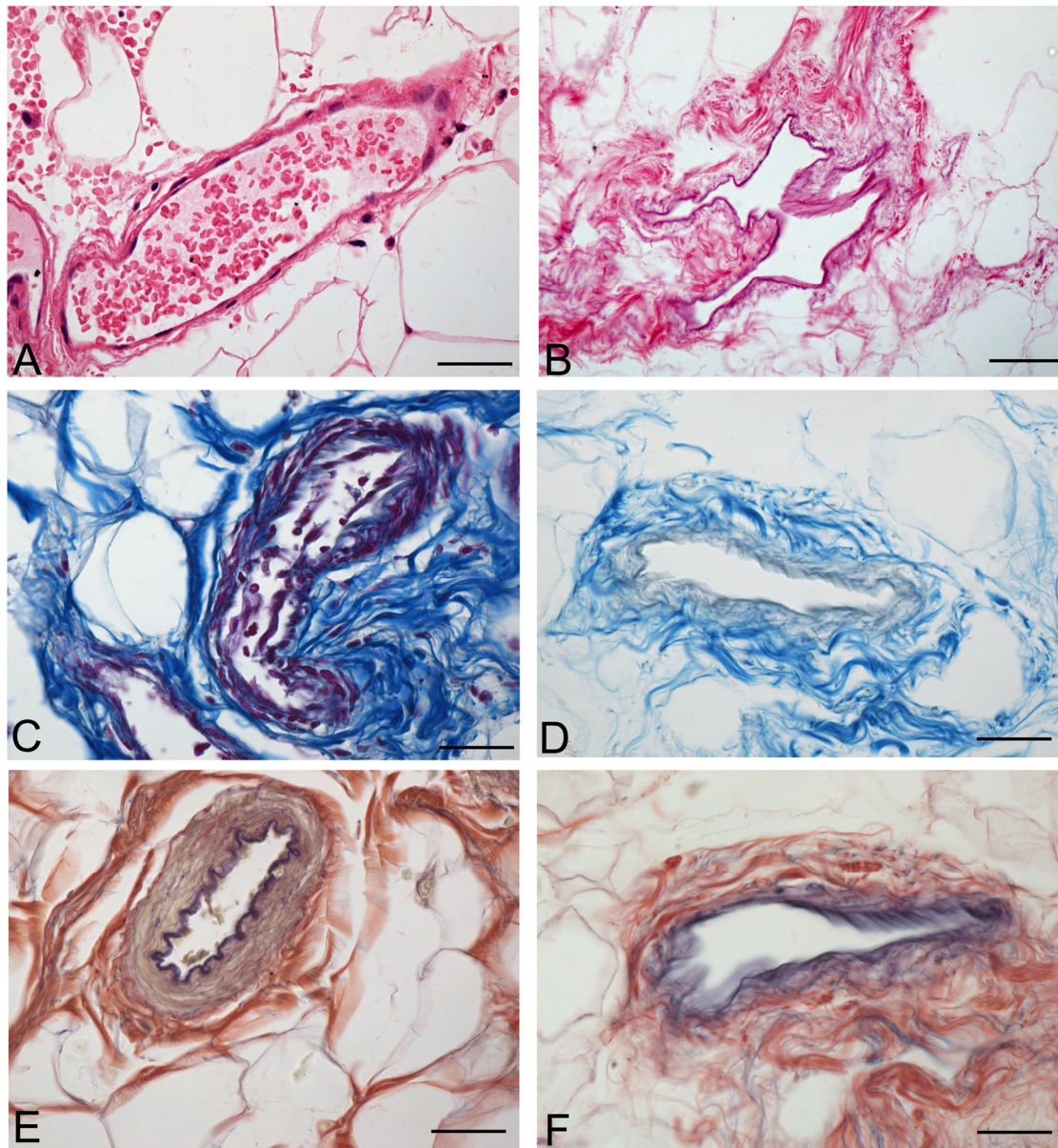
**Fig. 12:** Colorazione Oil Red su omento umano (A-B) e di ratto (C-D) prima (A-C) e dopo (B-D) la decellularizzazione. Scale bar: A-D 75  $\mu$ m.

Un'ulteriore analisi riguarda lo studio degli effetti della decellularizzazione sui canali vascolari: osservando le sezioni colorate si può notare come il lume e la pervietà vascolare siano stati mantenuti, così come la componente elastica e collagenica (Fig. 13, 14).



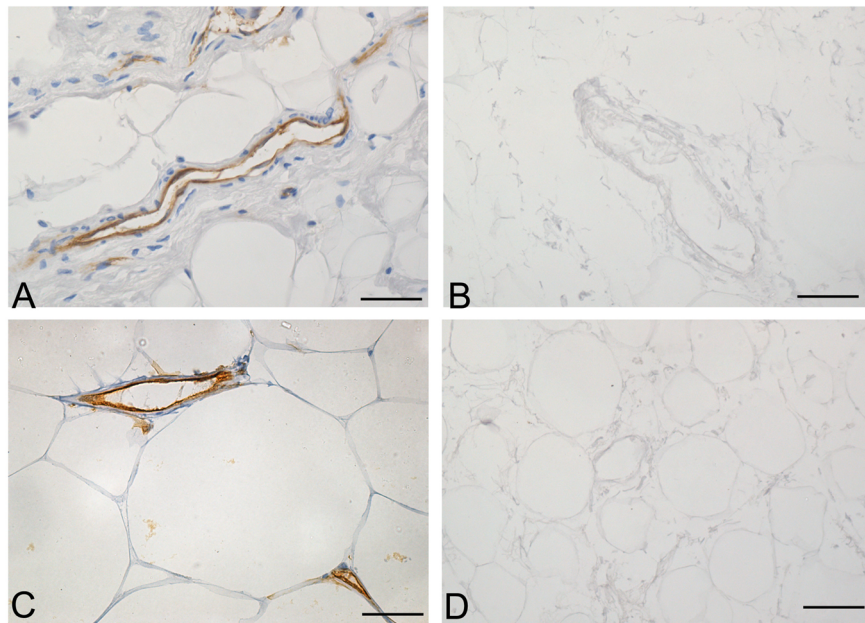
**Fig. 13:** Strutture vascolari dell'omento umano prima (A-C-E) e dopo (B-D-F) la decellularizzazione. A-B ematossilina ed eosina; C-D azan Mallory; E-F Van Gieson. Scale bar: A-F 37,5  $\mu\text{m}$ .



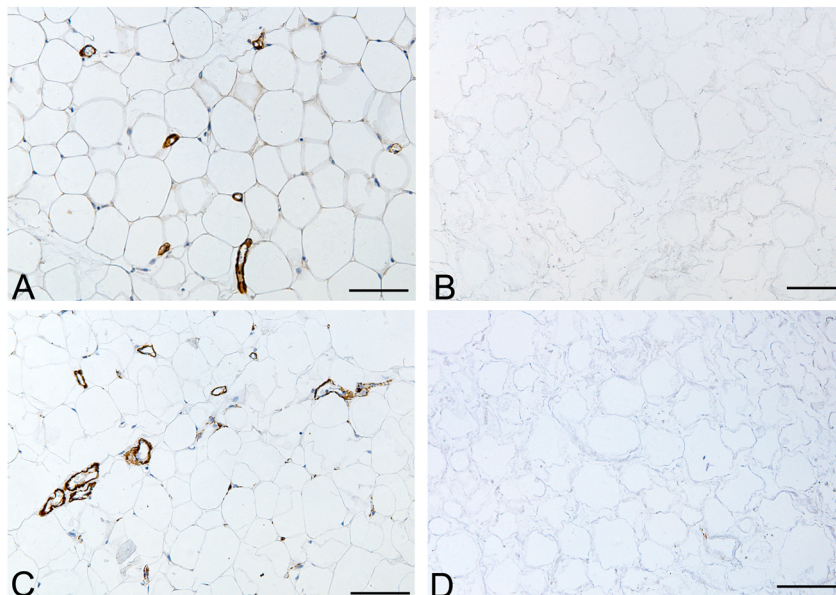


**Fig. 14:** Strutture vascolari dell'omento di ratto prima (A-C-E) e dopo (B-D-F) la decellularizzazione. A-B ematossilina ed eosina; C-D azan Mallory; E-F Van Gieson. Scale bar: A-F 37,5  $\mu\text{m}$ .

L'analisi immunohistochimica anti-CD31 e anti-CD34 ha confermato la completa rimozione delle cellule endoteliali. Per quanto riguarda la reazione immunohistochimica anti- $\alpha$  actina del muscolo liscio è stata evidenziata la rimozione delle cellule muscolari lisce dalle pareti vasali (Fig. 15, 16).



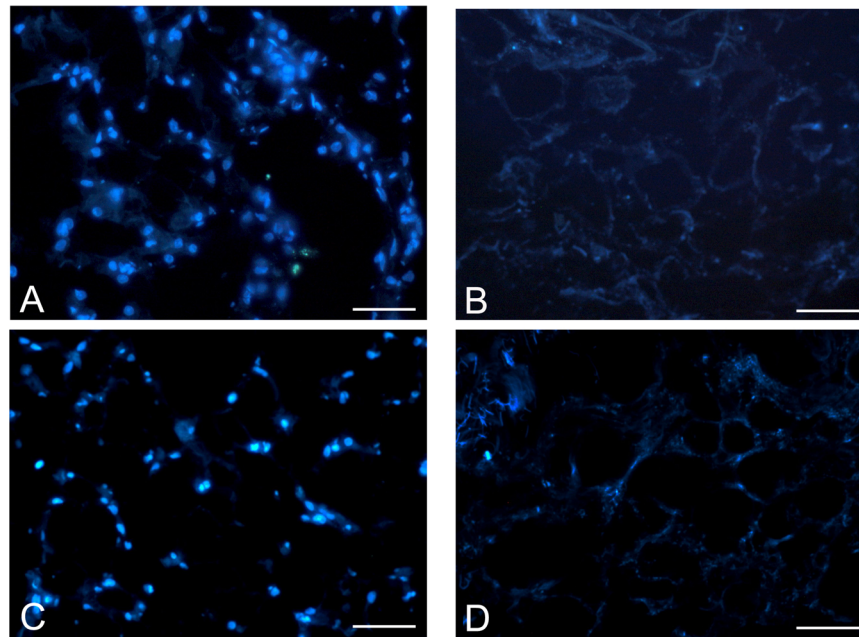
**Fig. 15:** Reazione immunohistochimica anti-CD31 (A-B) e anti-CD34 (C-D) su omento umano prima (A e C) e dopo (B e D) la decellularizzazione. Scale bar: A-D 37,5  $\mu$ m.



**Fig. 16:** Reazione immunohistochimica anti- $\alpha$  actina del muscolo liscio su omento umano (A-B) e su omento di ratto (C-D) prima (A e C) e dopo (B e D) la decellularizzazione. Scale bar: A-D 75  $\mu$ m.



Anche la colorazione DAPI ha confermato la rimozione dei nuclei a seguito della decellularizzazione (Fig. 17).

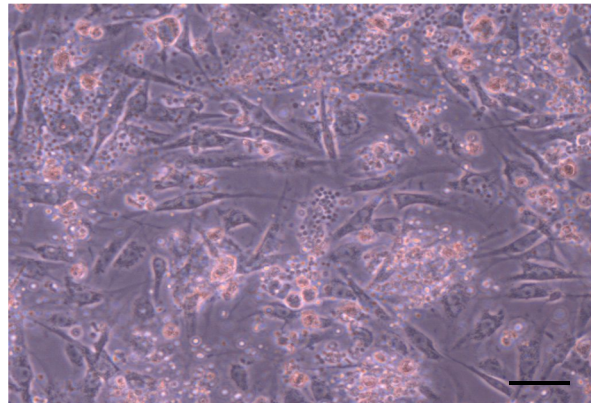


**Fig. 17:** Reazione nucleare con DAPI (in blu), prima (A e C) e dopo (B e D) la decellularizzazione (A-B omento umano, C-D omento di ratto). Scale bar: A-D 75  $\mu$ m.

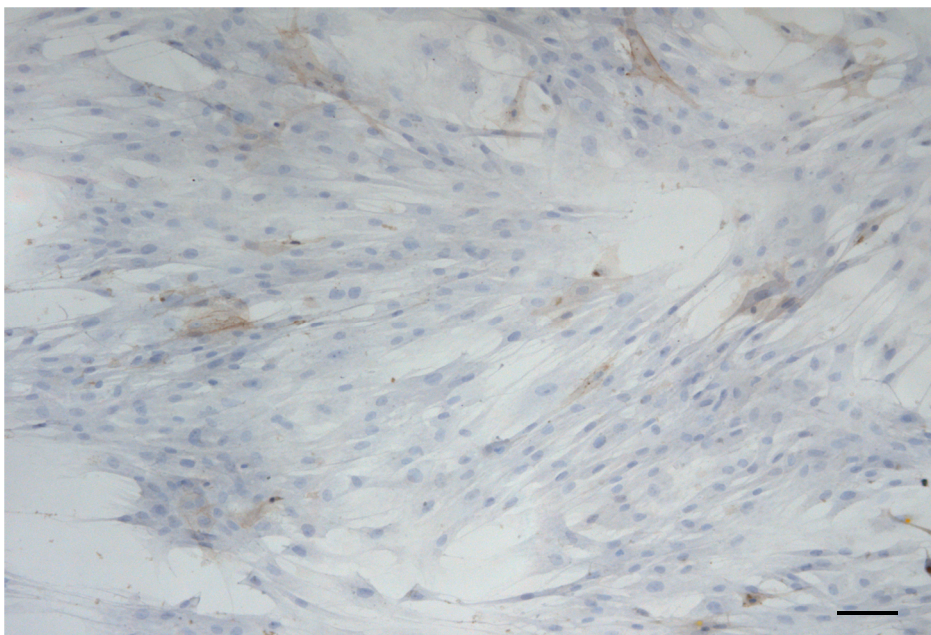
L'analisi quantitativa del DNA allo spettrofotometro ha dimostrato una presenza di acido deossiribonucleico inferiore ai 50 ng per mg in peso secco, in accordo con quanto previsto dalla letteratura per buoni standard di decellularizzazione (Zheng et al., 2005).

I risultati preliminari del processo di decellularizzazione dell'omento sono stati oggetto di pubblicazione (Porzionato et al., 2013).

Le cellule della SVF (Fig. 18), invece, sono risultate composte da una varietà di tipi cellulari, come cellule endoteliali (CD31 e CD34 positive, fig. 19, e Ki67 positive, fig. 20), fibroblasti e cellule staminali di derivazione adiposa, dette ADSC (Adipose Derived Stem Cells).

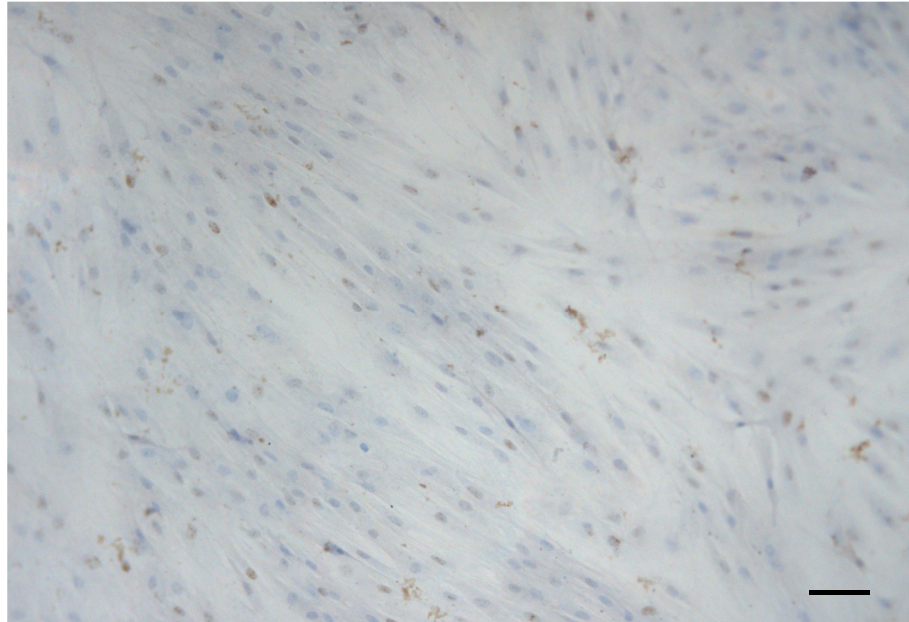


**Fig. 18:** Cellule della Frazione Stromale Vascolare di uomo. Scale bar: 37,5  $\mu\text{m}$ .



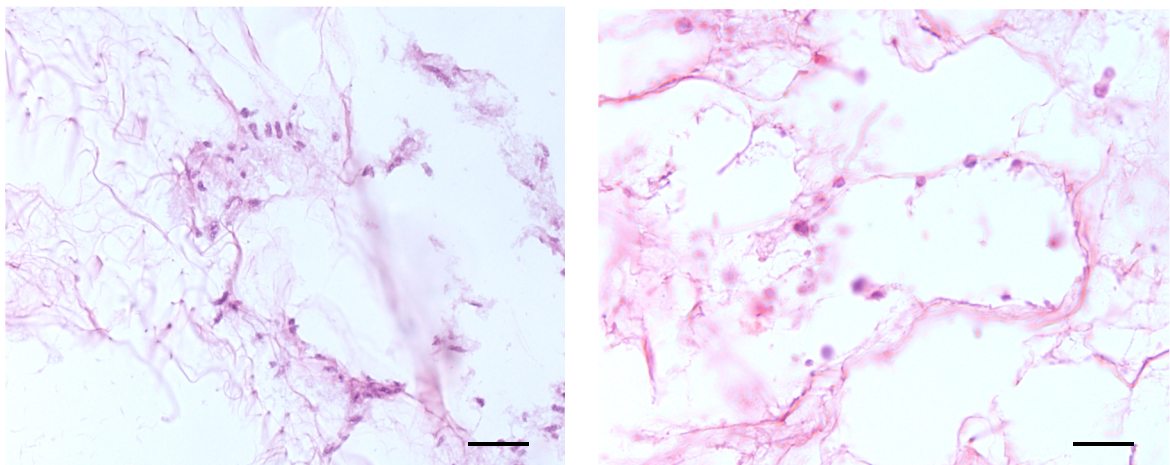
**Fig. 19:** Reazione immunoistochimica anti-CD31. Si può notare positività citoplasmatica di alcune cellule della popolazione appartenente alla Frazione Stromale Vascolare di uomo. Scale bar: 37,5  $\mu\text{m}$ .

La proliferazione di alcune cellule è stata evidenziata mediante reazione immunostochimica anti-Ki67 (Fig. 20).



**Fig. 20:** Positività nucleare delle cellule della Frazione Stromale Vascolare di uomo in coltura mediante reazione immunostochimica anti-Ki67. Scale bar: 37,5  $\mu\text{m}$ .

Una valutazione preliminare indica la possibilità da parte delle cellule della Frazione Stromale Vascolare di recellularizzare lo scaffold di omento in vitro (Fig., 21).



**Fig. 21:** Analisi preliminare dopo 2 settimane dalla semina delle cellule. Si osserva la migrazione e l'attaccamento delle cellule verso la regione centrale dello scaffold. Scale bar: Scale bar: 75  $\mu\text{m}$ .

Si può osservare che, solo dopo 2 settimane, tali cellule sono in grado di colonizzare lo scaffold, penetrando attraverso di esso fino a raggiungere la regione più interna. Nello scaffold, quindi, dopo la decellularizzazione, sono ancora presenti quei fattori trofici che permettono la migrazione e l'allocazione delle cellule per riproporre un tessuto biologico funzionale. Sono previsti ulteriori studi finalizzati all'induzione del differenziamento cellulare in senso adipogenico e/o endoteliale.

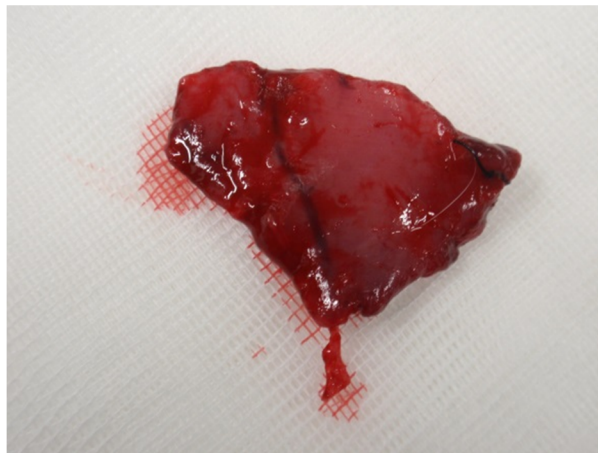


#### 4.2 SCAFFOLD DA MUSCOLO SCHELETRICO

Lo studio del processo di decellularizzazione è stato eseguito mediante osservazione microscopica di preparati istologici sottoposti a diverse colorazioni specifiche (H&E, AM, VG), sia nella fase immediatamente successiva all'espianto e sia durante le varie procedure del protocollo al fine di valutarne l'efficacia della decellularizzazione.

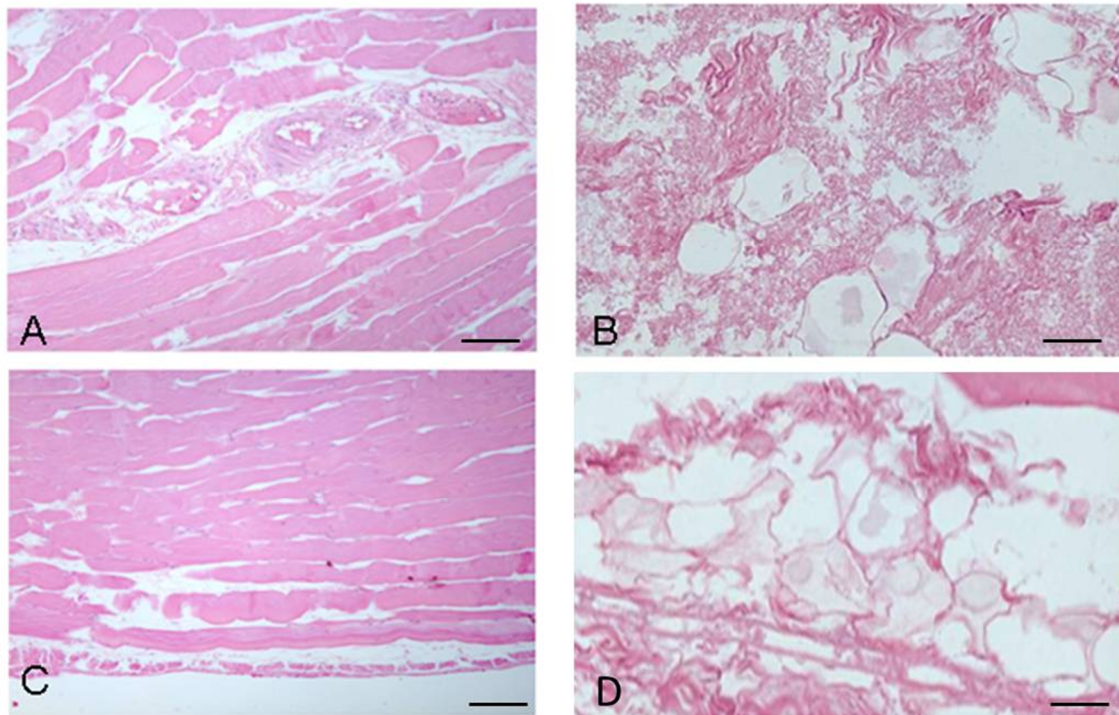
Il protocollo di decellularizzazione muscolare è stato adattato da protocolli pubblicati in letteratura scientifica (Rizzi et al., 2012), in base ai quali erano risultati eccessivamente presenti i nuclei cellulari e le fibre muscolari residue, risultando inadatti alle nostre esigenze. Alla fine il processo da noi realizzato, più lento e meno aggressivo, ha permesso di ottenere un quadro confrontabile con quanto precedentemente pubblicato da altri autori, fornendo un modello compatibile al trasferimento in vivo senza il rischio di scatenare eccessive risposte immunitarie.

Dal punto di vista macroscopico il campione muscolare sottoposto a processo di decellularizzazione ha subito una serie di alterazioni, fino a diventare alla settima giornata una struttura bianco-opalescente, di consistenza paragonabile al lembo originario (Fig. 22).



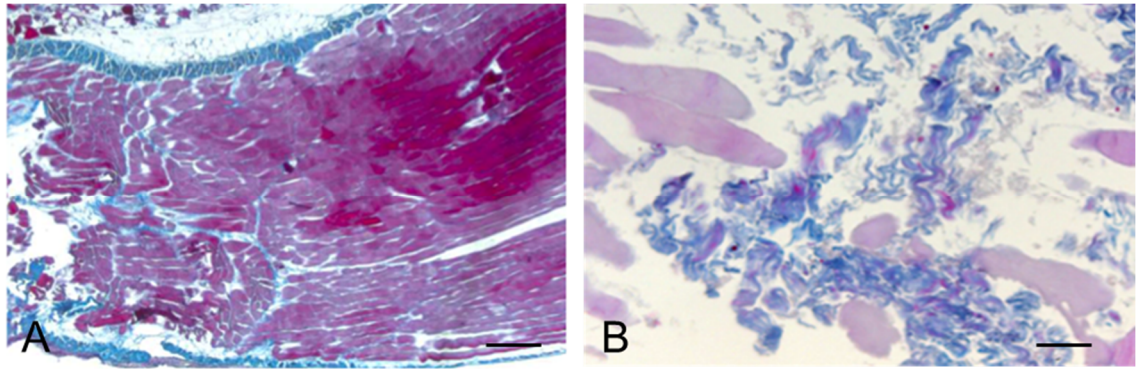
**Fig. 22:** Prelievo di tessuto muscolare dalla regione addominale del coniglio prima della decellularizzazione.

L'analisi istologica dei frammenti prelevati dallo scaffold muscolare decellularizzato prescelto per il successivo impianto su animale omologo ricevente ha messo in evidenza, nella colorazione con ematossilina ed eosina, la totale scomparsa di elementi nucleari (Fig. 23), la preservazione discreta di fibre elastiche, la distribuzione ordinata dei residui elastico-connettivali delle fibre muscolari.



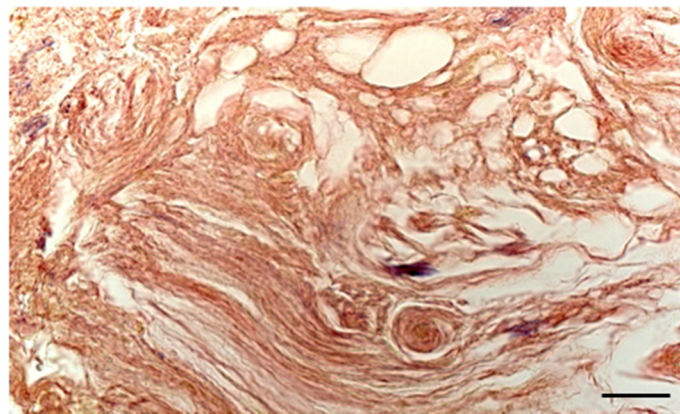
**Fig. 23:** Colorazione ematossilina ed eosina del muscolo scheletrico prima (A-C) e dopo (B-D) la decellularizzazione. Scale bar: A-D 37,5  $\mu$ m.

La colorazione azan Mallory ha evidenziato una grossa quantità di fibre collagene, colorate in blu, nel muscolo decellularizzato, pressoché paragonabile all'originale. E', inoltre, possibile distinguere l'ordinata organizzazione di tali fibre lungo tutto lo scaffold facendo particolare riferimento alla loro disposizione lungo l'asse vasale (Fig. 24).



**Fig. 24:** Colorazione azan Mallory prima (A) e dopo (B) la decellularizzazione. Scale bar: A-B 75  $\mu$ m.

Infine la colorazione di Van Gieson ha permesso di dimostrare la persistenza di carattere strutturalmente ben composto delle fibre elastiche sino a quelle vascolari, dimostrando un processo di decellularizzazione rispettoso dell'architettura di base della parete muscolare addominale. La presenza delle fibre elastiche nella matrice acellulare è un indice qualitativo importante in quanto la preservazione può essere associata a criteri di buona tollerabilità al processo (Fig. 25).

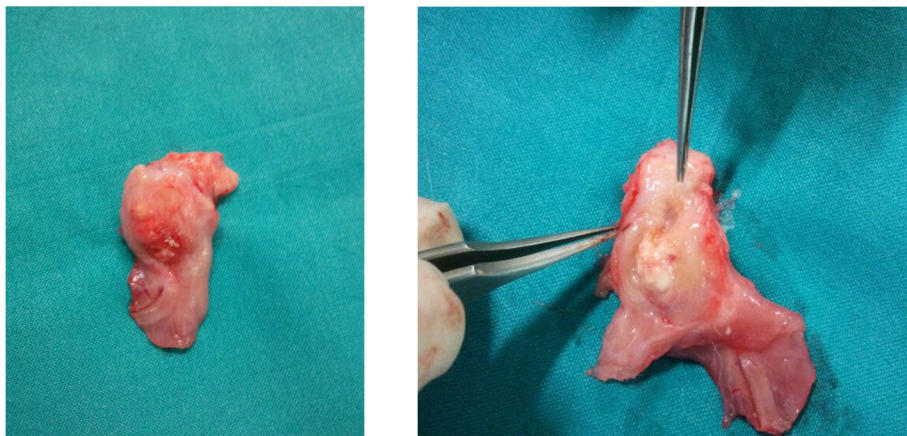


**Fig. 25:** Colorazione van Gieson del muscolo decellularizzato. Scale bar: 37,5  $\mu$ m.

#### 4.2.1 IMPIANTO DELLO SCAFFOLD

Lo scaffold muscolare ottenuto dal processo di decellularizzazione sopra descritto è stato trasferito in un animale ricevente riparando un difetto della parete addominale che ha portato ad una perdita di sostanza con erniazione dei visceri. Nella fase post-operatoria l'animale è stato quotidianamente osservato per 3 settimane, ove si è mosso liberamente, si è nutrito regolarmente, senza dimostrare disfunzioni e segni di rigetto. A 3 settimane dall'impianto l'animale è stato sacrificato e l'impianto è stato prelevato assieme a tessuto muscolare originale limitrofo.

Macroscopicamente l'impianto si è presentato con aspetto roseo, simile al contesto muscolare originale. Una porzione è apparsa ancora di aspetto perlaceo, morbida e inglobata in una sorta di tessuto lasso con evidenza di flogosi in distretti localizzati (Fig. 26).

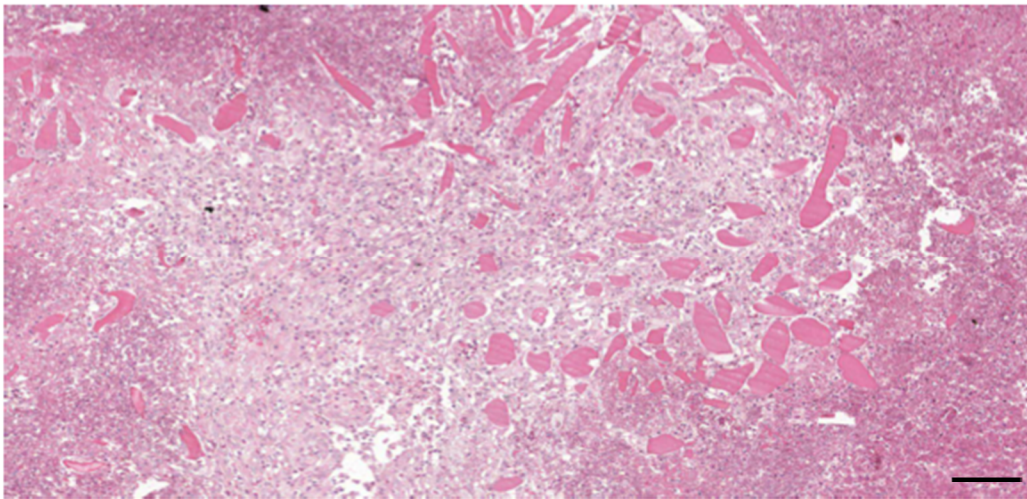


**Fig. 26:** Particolare della matrice decellularizzata dopo 3 settimane dall'impianto.

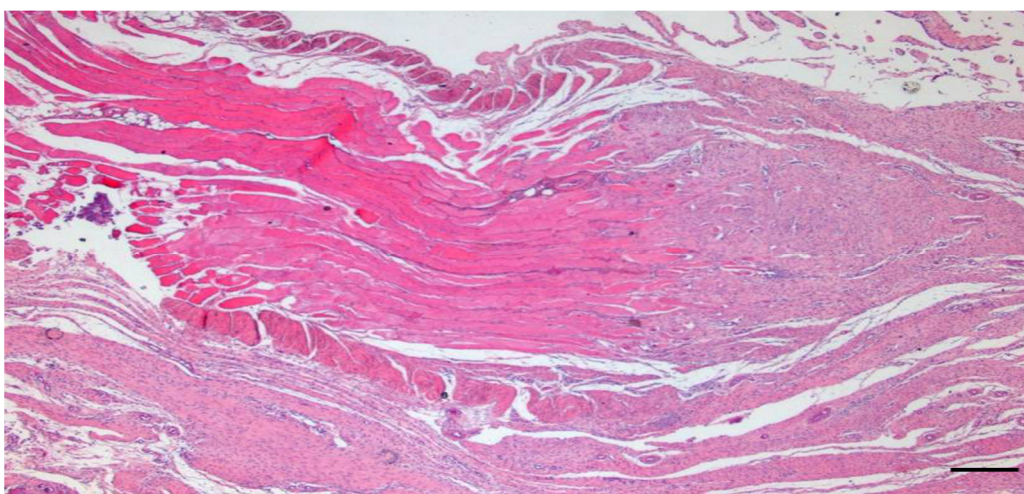
All' esame istologico si è potuto evidenziare, mediante colorazione con ematossilina ed eosina, la presenza di una reazione infiammatoria di tipo granulomatoso solo in alcuni punti, in assenza di abbondanti infiltrati flogistici con distruzione cellulare (infezione/rigetto), probabilmente raccolti nelle aree di sutura (filo riassorbibile Monosyn ancora presente all'espianto) (Fig. 27). Inoltre è possibile distinguere nuclei cellulari



ordinati ed organizzati in una struttura complessivamente preservata ed una ricca rete vascolare neoformata (neoangiogenesi). Si può osservare la presenza di tessuto connettivo di riparazione nella giunzione con il tessuto muscolare dell'animale ricevente con fusione delle fibre muscolari originali con quelle elastiche e collageniche del connettivo. Non è stata evidenziata una rigenerazione dello scaffold in senso muscolare, nonostante sia visibile un'evoluzione del processo riparativo accompagnata da neovascolarizzazione. Pertanto lo scaffold ha svolto un'azione di guida per la riparazione del difetto di parete addominale (Fig 28, 29).

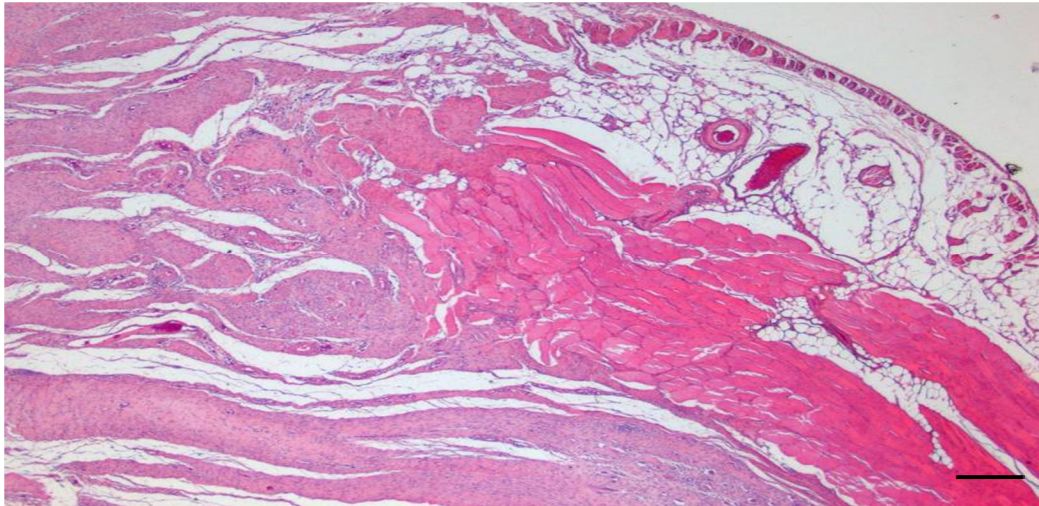


**Fig 27:** Reazione infiammatoria da corpo estraneo con infiltrato granulomatoso nelle aree di sutura. Scale bar: 75  $\mu$ m.



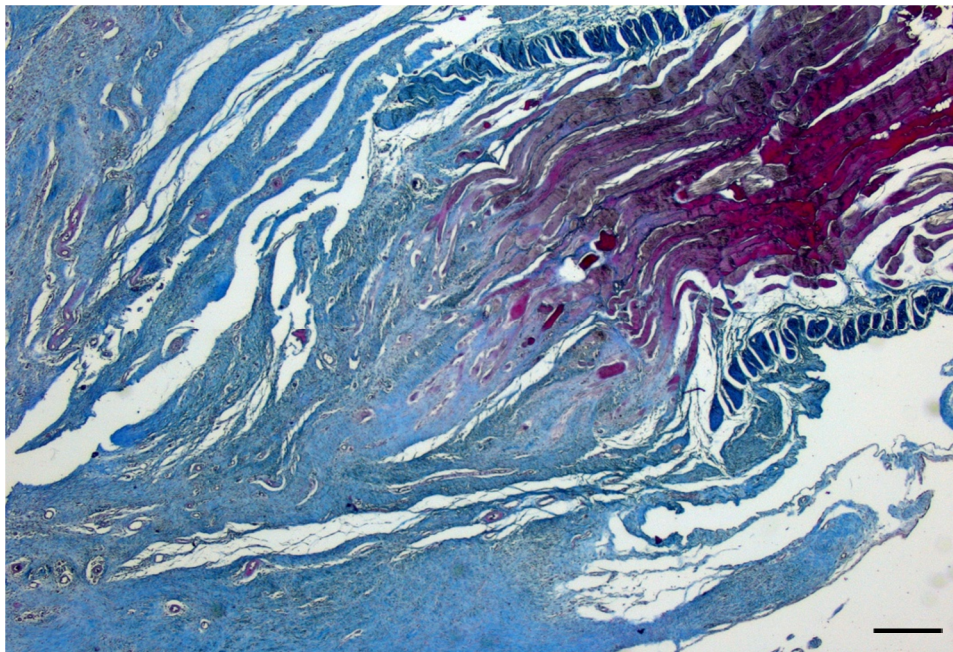
**Fig. 28:** Fusione delle fibre di tessuto muscolare nativo con il tessuto di riparazione (versante destro). Scale bar: 75  $\mu$ m.





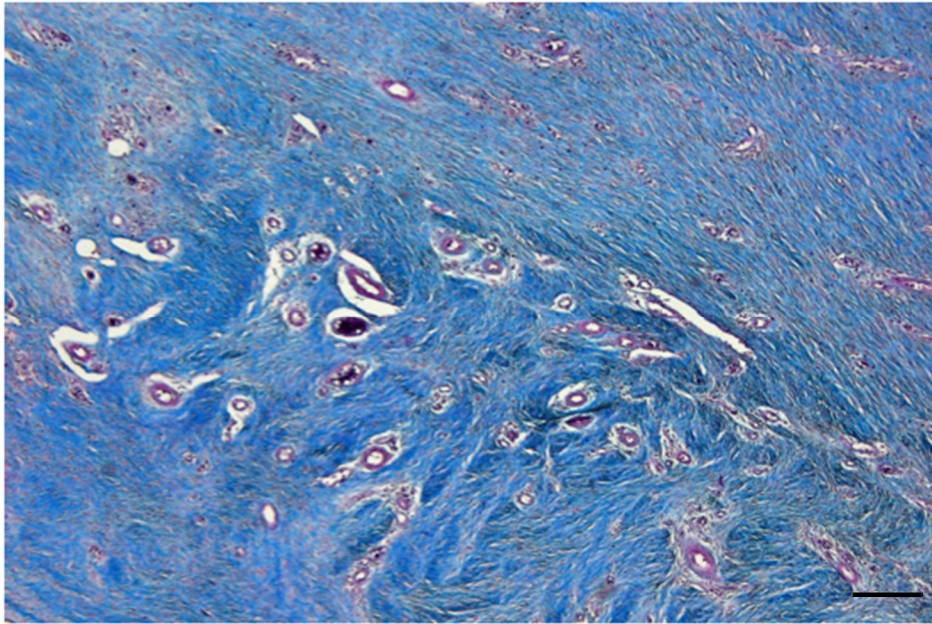
**Fig. 29:** Fusione delle fibre di tessuto muscolare nativo con il tessuto di riparazione (versante sinistro). Scale bar: 75  $\mu$ m.

Mediante colorazione azan Mallory è stato possibile evidenziare la preservazione ordinata delle fibre collagene, paragonabile alla struttura pre-impianto, a dimostrazione di una buona immunotollerabilità (Fig. 30, 31, 32).

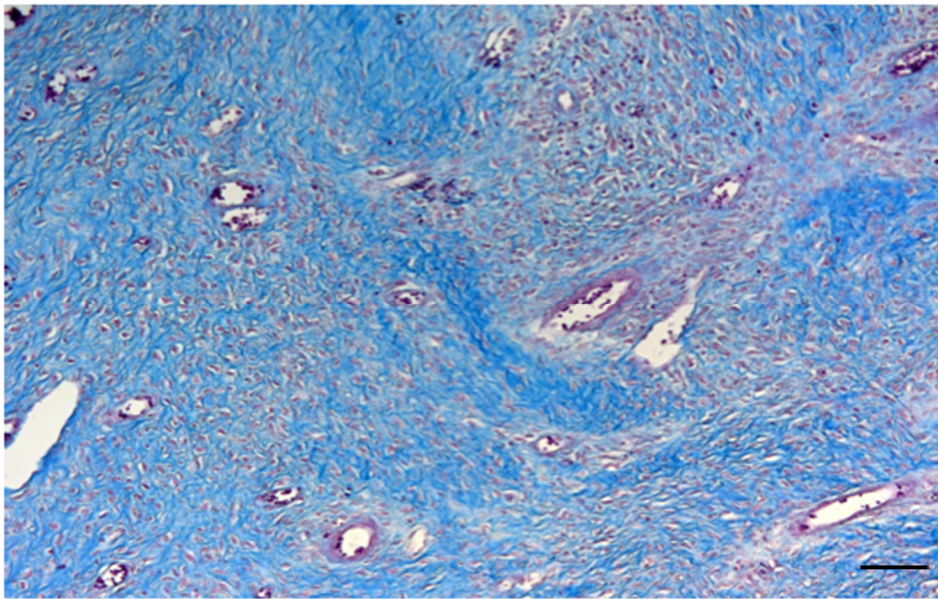


**Fig. 30:** Colorazione azan Mallory delle fibre di tessuto muscolare nativo fuse con il tessuto di riparazione (versante sinistro). Scale bar: 75  $\mu$ m.





**Fig. 31:** Numerosi vasi neoformati a livello del tessuto riparativo evidenziati con la colorazione azan Mallory. Scale bar: 75  $\mu$ m.

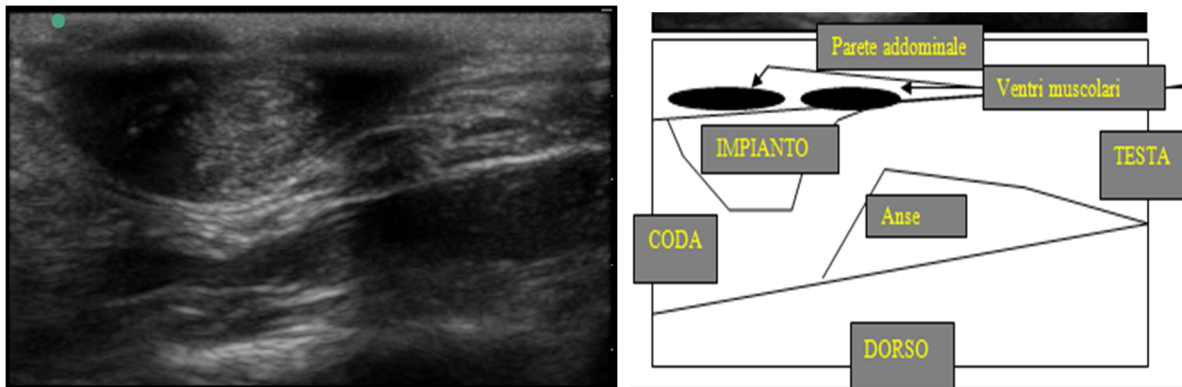


**Fig. 32:** Particolare delle nuove strutture vascolari formate evidenziate dalla colorazione azan Mallory. Scale bar: 75  $\mu$ m.

#### 4.3.1 ECOGRAFIA

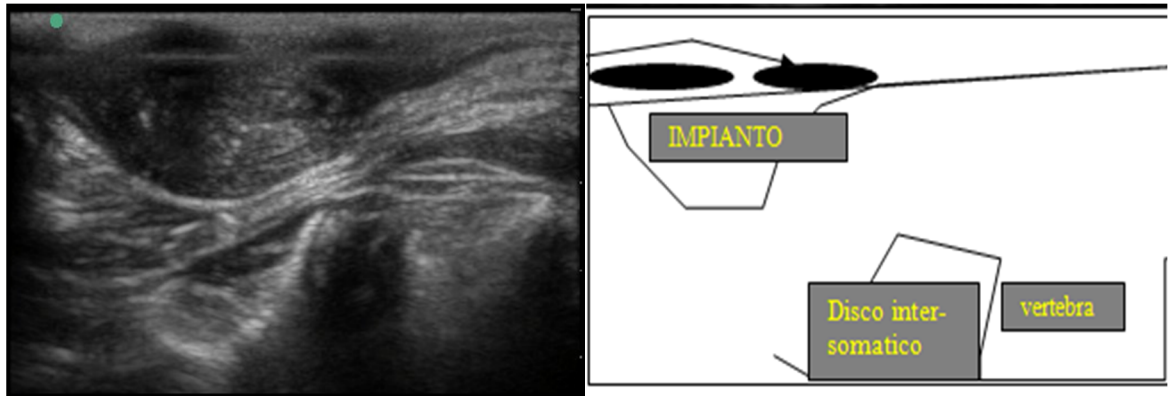
L'esame ecografico ha permesso di aggiungere, accanto alle valutazioni istologiche e macroscopiche, una valutazione di tipo qualitativo della situazione e del funzionamento dell'impianto decellularizzato nell'animale ricevente. L'esame è stato condotto sotto anestesia iniettiva da un Medico Radiologo specializzato, il quale ha acquisito sia immagini ecografiche classiche che ecodoppler.

Sia la valutazione durante la procedura che la successiva elaborazione hanno permesso di asserire che l'impianto si presenta come massa opaca, inserito nel contesto dei ventri muscolari dei retti dell'addome e delle relative guaine in posizione statica e le anse intestinali non presentano segni di erniazione (Fig. 33). In posizione dinamica, con pressione della sonda, non vi sono rapporti con le anse intestinali che vengono spostate e schiacciate e si muove contestualmente al gruppo muscolare con caratteristiche di resistenza elastica simile (Fig. 34).



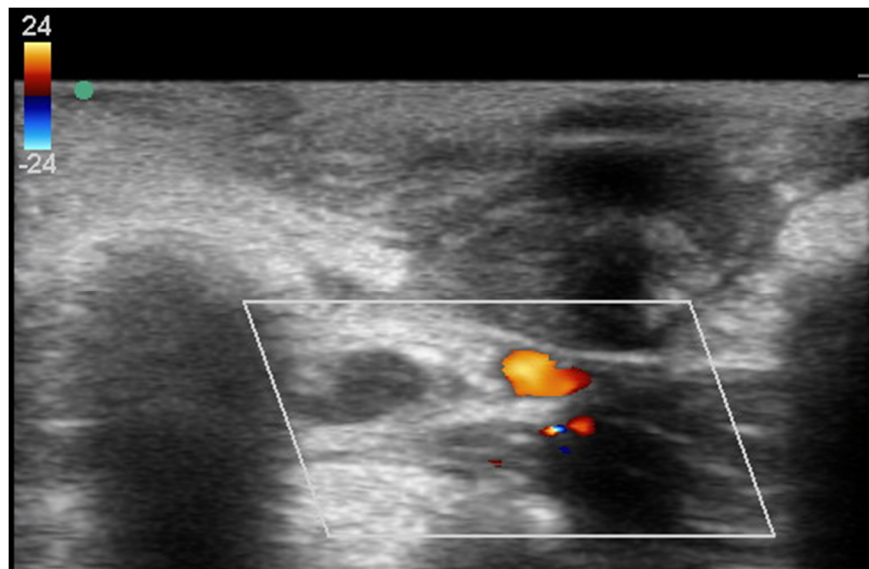
**Fig. 33:** In condizione statica si apprezzano fisiologicamente le anse intestinali al di sotto dell'impianto. I margini dell'impianto sono ad angolo acuto verso la porzione terminale dato che origina dalla parete addominale e non dalla cavità peritoneale.





**Fig. 34:** Alla pressione della sonda scompaiono le anse intestinali a conferma che queste non sono in rapporto con l'impianto e non c'è fibrosi estesa tra i 2 elementi. Con la pressione, lo spazio sottocutaneo rimane costante di spessore, come pure l'impianto: quindi questo è contenuto nella parete addominale.

All'esame ecodoppler si apprezza l'aorta addominale al di sotto dell'impianto e non vi sono soluzioni di continuità con la parete addominale; le anse intestinali si muovono indipendentemente dall'impianto (Fig. 35).



**Fig. 35:** Immagine ecocolordoppler. Aorta passante poco sotto all'impianto e separata dal margine muscolare; le anse intestinali sono spostate dalla pressione della sonda.

A maggiore ingrandimento l'impianto si confonde in parte con la porzione connettivale/vascolare dei muscoli (integrazione) che risulta opaca all'ecografia. Non sono evidenti segni di rottura, erniazione e raccolte di essudato infiammatorio (Fig. 36).



**Fig. 36:** Immagine a maggior ingrandimento: meglio apprezzabili i margini dell'impianto ad angolo acuto (vedi sopra) e la parete addominale che lo contiene. Alcuni tratti appaiono sfumati ed indistinguibili dai ventri muscolari circostanti; si apprezza un'area iper riflettente che corrisponde macroscopicamente alla porzione non integrata dell'impianto.

## 5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le scoperte relative al differenziamento delle cellule staminali, all'utilizzo dei fattori di crescita, ai meccanismi di interazione intercellulare e ai processi di apoptosi hanno rappresentato i capisaldi per la realizzazione di biostrutture in vitro. Tuttavia lo sviluppo di strutture complesse, utili al campo ricostruttivo, sono state limitate dalle principali difficoltà costituite dall'ottenimento di una crescita cellulare ordinata e funzionale, la cui base era insita nello sviluppo e nelle interazioni di diversi tipi cellulari e nella struttura necessaria alla loro nutrizione. Relativamente a queste necessità, la procedura di decellularizzazione dei tessuti nativi ha rappresentato una chiave di svolta nella realizzazione di biocostrutti, ponendo le basi per la prosecuzione delle teorie in merito allo sviluppo dei tessuti umani in laboratorio. Il fondamento razionale si basa sulla constatazione che il tessuto biologico è una struttura complessa nella sua costituzione, funzionamento e interazione con gli altri tipi di tessuti, pertanto risulta difficile da riprodurre in vitro.

L'impalcatura cui è costituito un tessuto, definita matrice extra-cellulare, non svolge solo funzioni di sostegno meccanico ma è coinvolta anche nei processi di cross-talking, nella crescita e nella proliferazione delle cellule. Ne è derivato, pertanto, un approccio teso a ricostituire un tessuto partendo dalla sua impalcatura originaria piuttosto che da materiali di sintesi o di diversa origine biologica, privi delle necessarie ultrastrutture regolatrici e funzionali. Per ottenere questo, gli studi si sono concentrati nella realizzazione di diverse procedure con lo scopo di ottenere una struttura biologica acellulare mediante la decellularizzazione del tessuto nativo.

Nasce pertanto il concetto di scaffold, ovvero una impalcatura biologica che riproponga il più possibile la struttura e la composizione della matrice extracellulare del tessuto di partenza e che divenga la base utile per la differenziazione cellulare.

É indispensabile fornire nutrimento allo scaffold, pertanto è necessario che sia preservata la rete vascolare, la quale può inoltre favorire l'eventuale flusso di cellule circolanti.

Per poter potenziare la capacità riparativa e rigenerativa dello scaffold si è giunti all'introduzione di fattori di crescita cellulo-specifici che possono essere combinati con cellule staminali adulte di diversa origine in modo da ottenere potenzialmente una struttura tridimensionale in grado di integrarsi in vivo e ricostituirsi nel tessuto originario.

L'importanza della struttura tridimensionale è stata evidenziata negli studi condotti sulla trachea decellularizzata, dove il mantenimento della matrice extracellulare ha permesso di riprodurre uno scaffold dotato di quella sua forma unica e altamente funzionale (Zang et al., 2012).

Sulla base della letteratura pubblicata in merito alla decellularizzazione, abbiamo realizzato in questo lavoro due tipi di costrutti biologici, l'uno derivante dall'omento e l'altro dal muscolo scheletrico.

## 5.1 SCAFFOLD DA OMENTO

L'omento è stato frequentemente utilizzato, come lembo libero oppure assieme al suo peduncolo vascolare, in diversi tipi di intervento chirurgico, grazie alle sue proprietà rigenerative e angiogeniche (Muller et al., 1992; Darzi et al., 1993; Merad et al., 1998; Tocchi et al., 2000; Maeda et al., 2005). Per esempio, è stato utilizzato come rivestimento del colon/retto, per le anastomosi dell'esofago/esofagogastriche e tracheali/bronchiali, per gestire ulcere gastroduodenali perforate e per ridurre il sanguinamento in epatectomia o pancreaticoduodenectomia (Bhat et al., 2006; Collins et al., 2009).

Nei casi di irradiazione pelvica, la trasposizione del lembo omentale è stata utilizzata anche per escludere e proteggere il piccolo intestino e la vescica dal fascio di radiazioni (Russ et al., 1984; Kim et al., 2010).

Nelle situazioni laparotomiche e laparoscopiche, i lembi omentali hanno avuto largo impiego nel campo della chirurgia ricostruttiva delle grandi strutture extra-addominali. Per esempio, sono stati impiegati nel trattamento di grandi difetti del cuoio cappelluto (McLean et al., 1972), nel trattamento di infezioni allo sterno causate da sternotomia a seguito di impianto di bypass coronarici (van Wingerden et al., 2010), nella ricostruzione scrotale, nel riempimento di tessuti molli nel seno e nel trattamento dei difetti del volto.

Nei ratti, è stato dimostrato potenzialmente utile il trasferimento di frammenti di omento, cotrapiantati con preadipociti e non, per riempimento di tessuti molli. In altre specie animali, come il maiale, l'omento è servito come impalcatura per lo sviluppo di vescica e neoureteri bioingegnerizzati: il lembo è stato avvolto da uno strato di sottomucosa del piccolo intestino e sono state seminate cellule autologhe uroteliali e cellule muscolari lisce. In questi casi l'omento funge da supporto autologo per la crescita e la differenziazione delle linee cellulari seminate, agendo da bioreattore nel vivente. Recentemente è stato anche approvato un brevetto per l'estrazione del grasso dall'omento e per l'applicazione della decellularizzazione di tale tessuto per scopi clinici. In questo lavoro di tesi è stata dimostrata la possibilità di decellularizzare l'omento per ottenere uno scaffold biologico in grado di mantenere la struttura tridimensionale della matrice extracellulare. Numerosi scaffold biologici, sia umani che di altri animali, sono stati ottenuti mediante l'applicazione dei protocolli di decellularizzazione e dell'utilizzo delle risultanti matrici in pazienti umani. In particolare, studi sulla decellularizzazione della placenta umana hanno suggerito l'importanza della preservazione dei numerosi canali vascolari al fine di una successiva rivascolarizzazione del tessuto a seguito dell'impianto in vivo (Flynn et al, 2008).

Gli scaffold biologici xenogenici derivati da mesotelio suino (Meso BioMatrix™, Kensey Nash Corp.) sono anche commercialmente disponibili. Viceversa, a parte il

brevetto sopracitato, scaffold biologici ottenuti mediante decellularizzazione dell'omento umano e animale non sono ancora stati considerati in letteratura scientifica finora e non sono disponibili in commercio.

In particolare, l'omento allogenico potrebbe essere ottenuto da viventi ma anche da defunti donatori. Potrebbe essere, infatti, ricellularizzato in vitro attraverso la semina di cellule staminali autologhe derivate da tessuto adiposo e poi impiantato per la ricostruzione dei tessuti molli.

Il protocollo di decellularizzazione sfruttato per questo lavoro di tesi è stato ideato per garantire la rimozione di tutti i residui di materiale cellulare e per preservare la citoarchitettura, l'ultrastruttura e la composizione della matrice extracellulare nativa. La componente cellulare residua potrebbe indurre reazioni avverse nell'ospite dopo l'impianto. Una matrice extracellulare preservata può indurre processi di mitosi cellulare, chemiotassi e differenziazione, favorendo come risposta un rimodellamento costruttivo del tessuto dell'ospite (Crapo et al., 2011; Vorotnikova et al., 2010; Sellaro et al., 2010). L'integrità del materiale dovrebbe evitare eventuali fenomeni di degradazione dopo la ricostruzione dei tessuti e dovrebbe promuovere i fenomeni di rigenerazione tissutale. Gli scaffold biologici decellularizzati hanno il vantaggio di possedere una matrice extracellulare ricca di segnali intracellulari ed extracellulari i quali sono componenti essenziali per l'adesione cellulare, la migrazione, proliferazione e la differenziazione (Yow et al., 2006).

I protocolli di decellularizzazione si avvalgono dell'utilizzo di reazioni chimiche, fisiche e biologiche. I principali metodi fisici possono essere l'esercitazione di una pressione diretta, dell'agitazione, della sonicazione, o dei cicli di congelamento/scongelo.

Il brevetto da Yang et al. (2012) ha comportato una prima fase di rimozione del grasso coinvolgendo solventi disidratazione (metanolo, etanolo, isopropanolo o propanolo) ed

estrazione con solventi, sia polari (acetone, diossano o acetonitrile) e non polari (esano, xilene, benzene, toluene o acetato di etile).

Nel presente lavoro, è stato applicato un protocollo di decellularizzazione che ha coinvolto l'uso di più metodi, cioè, cicli di congelamento/scongelo, agitazione meccanica, digestione con tripsina ed EDTA, deossi e ribonucleasi, lipasi, e trattamento con isopropanolo ed etanolo. L'uso di più metodi aumenta l'efficacia di decellularizzazione mediante l'applicazione di differenti meccanismi di rimozione delle cellule e dei loro componenti intracellulari. Ad esempio, come già detto, congelamento e scongelamento sono utili per rompere e frammentare le membrane cellulari e causare la lisi delle cellule, ma devono essere integrati con altri protocolli per rimuovere i prodotti di lisi cellulare. In questa direzione, l'EDTA e la tripsina sono solitamente utilizzati insieme per rimuovere il materiale cellulare. L'EDTA ha il compito di impedire l'adesione delle cellule alla matrice extracellulare.

La tripsina, invece, cliva i legami peptidici di arginina e lisina quando il successivo residuo non è la prolina; ovviamente, l'esposizione a tripsina/EDTA non deve essere troppo prolungata, al fine di evitare una riduzione eccessiva delle fibre di laminina, di fibronectina e di elastina (Gilbert et al., 2006).

Tuttavia, è stato riportato in letteratura che protocolli di decellularizzazione che implicano l'utilizzo di tripsina/EDTA potrebbero favorire la crescita di cellule endoteliali *in vitro* (Schenke-Layland et al., 2003; Grauss et al., 2005).

Gli enzimi ribonucleasi e deossiribonucleasi sono necessari per degradare rispettivamente RNA e DNA, la cui presenza nei preparati biologici può direttamente causare reazioni avverse nell'ospite (Zheng et al., 2005; Nagata et al., 2010).

L'assenza di materiale nucleico è stata qualitativamente verificata nelle sezioni di omento decellularizzato mediante colorazione con H&E e DAPI.

Un'ulteriore valutazione quantitativa della presenza di DNA allo spettrofotometro ha, inoltre, dimostrato una quantità di acido nucleico inferiore a 50 ng per mg di peso secco in tutte le prove, in accordo con uno tra i criteri necessari e sufficienti per ottenere un'efficiente decellularizzazione (Zheng et al., 2005; Nagata et al., 2010).

In riferimento alla decellularizzazione dell'omento, i principali componenti da rimuovere sono lipidi.

Nel nostro protocollo, la lipoproteinlipasi è stato il principale agente usato per delipidizzazione. Tuttavia, in alcuni protocolli riportati in letteratura è stato sottolineato che tale enzima, se utilizzato da solo, non è sufficiente per rimuovere tutti i lipidi e pertanto è necessario anche l'uso di alcol (Flynn et al., 2010; Brown et al., 2011)

Il protocollo utilizzato in questo studio ha dimostrato una rimozione soddisfacente della componente lipidica, come dimostrato nelle sezioni colorate con il Sudan e Oil Red.

Vale la pena notare, inoltre, il ruolo svolto dagli inibitori della proteasi e dagli antibiotici, i quali hanno assicurato una decellularizzazione ottimale priva di agenti contaminanti. A causa della lisi cellulare l'ultrastruttura della matrice extracellulare può essere alterata a causa della liberazione di enzimi litici insiti nella cellula: l'utilizzo di PMSF ha permesso l'inibizione dell'azione di tali enzimi favorendo la preservazione della struttura nativa della matrice (Gilbert et al., 2006).

Un ulteriore passo del presente lavoro è la ricellularizzazione dello scaffold con cellule staminali autologhe prima dell'impianto. Nel brevetto Yang (2012), l'omento decellularizzato era stato posto in co-coltura con cellule derivanti da rene umano, le cellule uroteliali, o con cellule endoteliali. Inoltre, il tessuto adiposo risulta essere anche una ricca fonte di cellule staminali, le cosiddette *adipose derived stem cells*, ADSC, che hanno la capacità di differenziare nella linea adipogenica (Gronthos et al., 2001), condrogenica (Nathan et al., 2003), miogenica (Guilak et al., 2006), osteogenica



(Peterson et al., 2005), neurogenica (Zuck et al., 2002), endoteliale (Planat-Benard et al., 2004; Miranville et al., 2004; Cao et al., 2005; DiMuzio et al., 2007) e muscolare liscia (Rodriguez et al., 2006).

A nostro parere, questo tipo di cellule potrebbero essere ottime candidate per il processo di ricellularizzazione del tessuto.

Le cellule staminali possono essere facilmente ricavate dal grasso che deriva dalla liposuzione e sembra che la loro quantità in questo distretto sia maggiore rispetto a quella ricavata dal midollo osseo (De Ugarte et al., 2003).

Dal punto di vista chirurgico l'omento è stato frequentemente utilizzato nella pratica clinica grazie alla sua peculiare ed elevata vascolarizzazione. Il protocollo di decellularizzazione utilizzato nel presente lavoro ha permesso di osservare che, a seguito del trattamento, sia il lume che la pervietà dei canali vascolari sono stati mantenuti nonostante la rimozione delle cellule endoteliali e muscolari lisce, suggerendo la possibilità di ricellularizzazione con cellule staminali autologhe derivate da tessuto adiposo oppure direttamente con le cellule endoteliali progenitrici. Il complesso microvascolarizzato dell'omento può aumentare il potenziale di questo tessuto in chirurgia ricostruttiva, favorendo neoangiogenesi. Gli adipociti dell'omento si contraddistinguono per la loro capacità di secernere fattori di crescita e angiogenici (Zhang et al., 1997) che possono anche essere conservati (almeno in parte) nello scaffold, favorendo la proliferazione e la differenziazione delle cellule staminali introdotte. Dopo la decellularizzazione, la stessa matrice extracellulare può conservare i componenti essenziali per l'adesione cellulare, la migrazione, proliferazione e differenziazione delle cellule (Yow et al., 2006).

In conclusione, in questa prima parte dello studio abbiamo presentato un protocollo di decellularizzazione la cui applicazione ha positivamente permesso la rimozione dei

componenti cellulari mantenendo l'integrità strutturale della matrice extracellulare dell'omento e implementando le potenzialità di questo tessuto per lo sviluppo di un nuovo scaffold biologico che può essere ricellularizzato con cellule staminali autologhe. In questa maniera, tale tipo di scaffold innovativo può essere un approccio alternativo nel campo della medicina rigenerativa e nella chirurgia ricostruttiva.

## 5.2 SCAFFOLD DA MUSCOLO SCHELETRICO

Questa seconda parte del lavoro di tesi si è articolata nella realizzazione di un altro tessuto decellularizzato, derivante dal muscolo scheletrico.

La matrice extracellulare del muscolo scheletrico non svolge soltanto una funzione di supporto meccanico del tessuto stesso ma è coinvolta in numerosi processi cellulari, quali la migrazione, i processi di sviluppo e di rigenerazione del muscolo grazie alla produzione e alla secrezione di importanti fattori di crescita come TGF-beta e FGF (Schonherr et al., 1998; Matsuo et al., 2014).

Pertanto, è risultato necessario da parte dei ricercatori sviluppare una matrice acellulare muscolo-scheletrica nella quale sia preservata la struttura e la composizione per favorire il processo rigenerativo del tessuto.

In letteratura sono stati riportati alcuni esempi riguardo la realizzazione di questo tipo di scaffold, in relazione alla tipologia di tessuto muscolare utilizzato. Esistono, infatti, scaffolds che derivano dalla decellularizzazione del tessuto muscolare cardiaco, muscolare liscio e muscolare scheletrico.

Il primo protocollo di decellularizzazione, messo a punto da Carlson, consisteva nel trattamento del campione muscolare scheletrico con EDTA e Triton X-100, la cui azione è quella di rompere e solubilizzare le membrane cellulari, impedendo l'adesione delle cellule alla matrice extracellulare (Carlson et al., 1991). L'enzima deossiribonucleasi è

stato utilizzato per la degradazione del DNA, la cui presenza, può causare reazioni avverse nell'ospite (Zheng et al., 2005). Il trattamento finale del campione con sodio deossicolato ha favorito la rimozione dei detriti cellulari al termine della decellularizzazione.

I metodi di decellularizzazione successivi si avvalgono dell'introduzione di una fase iniziale di congelamento/scongelamento che favorirebbe una rottura delle membrane più efficiente.

È stato, altresì, dimostrato che anche nella decellularizzazione muscolare è preferibile utilizzare una combinazione di reazioni chimiche ed enzimatiche per favorire una decellularizzazione più completa possibile. Infatti, rientra in questi procedimenti l'utilizzo di SDS e della tripsina (Merritt et al., 2010; Perniconi et al., 2011; Woolf et al., 2012).

Nel nostro protocollo di decellularizzazione muscolare è prevista una fase preliminare di distruzione delle membrane cellulare mediante congelamento e scongelamento dei campioni. Per favorire la solubilizzazione di tali strutture e la rottura dei legami intra ed intercellulari è stata utilizzata una combinazione di sostanze chimiche, ovvero EDTA e Triton X-100, in accordo con la metodica descritta da Carlson, ed enzimi, cioè la tripsina e la DNasi.

Lo scaffold muscolare decellularizzato da noi ottenuto ha dimostrato caratteristiche morfologiche simili a quanto riportato in letteratura (Gamba et al., 2002). È stato dimostrato, quindi, che il protocollo di decellularizzazione applicato ha favorito la preservazione della disposizione ordinata delle fibre collageniche ed elastiche presenti nella struttura nativa e la rimozione della componente cellulare, confermando i criteri fondamentali per la buona resa di uno scaffold biologico.

Dopo aver valutato l'efficacia della decellularizzazione del muscolo scheletrico mediante le stesse analisi condotte per lo scaffold di omento, si è proceduto con l'impianto della

matrice acellulare nella parete addominale di un coniglio, precedentemente danneggiata chirurgicamente, per valutarne la capacità riparativa e rigenerativa.

Un aspetto innovativo introdotto in questo lavoro di tesi è stato l'utilizzo di un ecografo portatile per valutare in vivo i rapporti dello scaffold impiantato con i tessuti adiacenti. Come si è potuto osservare dalle immagini registrate, l'impianto si presenta come una massa opaca, inserito nei ventri muscolari dei retti dell'addome. In modo particolare, non è stata osservata alcun tipo di erniazione a seguito dell'impianto della matrice e ciò indica che lo scaffold ha svolto un'azione riparatrice del difetto della parete addominale del coniglio.

L'esame ecografico ha, inoltre, messo in evidenza che l'impianto si è fuso esclusivamente con i lembi muscolari adiacenti senza presentare aderenze con le anse intestinali. A sostegno di ciò, è stato osservato che mediante l'applicazione di una pressione con la sonda sulla parete addominale, le anse intestinali si muovono e si spostano in maniera indipendente.

Dopo il sacrificio dell'animale lo scaffold impiantato è stato studiato mediante le colorazioni istologiche per analizzare il suo comportamento nel processo riparativo del difetto di parete addominale.

Lo scaffold ha favorito lo sviluppo di un processo di riparazione piuttosto che di rigenerazione. Infatti non sono state evidenziate nuove miofibrille nel sito di danno, bensì la presenza di tessuto fibroso di riparazione, in analogia a studi precedenti (Merritt et al., 2010a).

Per favorire un processo rigenerativo, invece, la letteratura suggerisce la colonizzazione dello scaffold con le cellule progenitrici muscolari in vitro, prima dell'impianto. Solo in questa maniera è stato osservato che a seguito dell'impianto di uno scaffold muscolare ricellularizzato vi è lo sviluppo di un vero e proprio processo rigenerativo con la genesi

di nuove fibre muscolari (Conconi et al., 2005).

Tra gli obiettivi futuri ci sarà, quindi, la capacità di ricellularizzare lo scaffold in maniera efficiente mediante la semina di cellule progenitrici muscolari e l'implementazione di fattori di crescita.



## 6. PROSPETTIVE FUTURE

Con questo lavoro di tesi sono state poste le basi per migliorare e completare le ricerche svolte nel campo della realizzazione degli scaffold biologici decellularizzati.

Nuovi e continui esperimenti verteranno nel raggiungimento di diverse finalità e nel miglioramento delle tecniche utilizzate.

In modo particolare, gli scopi da raggiungere saranno:

- Ricellularizzazione dello scaffold di omento con cellule staminali pluripotenti e il loro condizionamento tessuto-specifico con fattori di crescita. Impianto in vivo dello scaffold ricellularizzato e valutazione delle capacità riparative e/o rigenerative.
  
- Nuovi esperimenti di decellularizzazione del muscolo scheletrico, incrementati dall'utilizzo di progenitori di staminalità per la ricostituzione in vitro di un tessuto muscolare funzionale e vitale, atto alla rigenerazione in ambito di difetti muscolari.





## BIBLIOGRAFIA

- Akhyari P, Kamiya H, Haverich A, Karck M, Lichtenberg A. *Myocardial tissue engineering: the extracellular matrix*. Eur J Cardiothorac Surg. 2008;34:229–241.
- Anderson JM. *Inflammatory response to implants*. ASAIO Trans. 1988;34:101-107.
- Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. *Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty*. Lancet. 2006;367:1241-1246.
- Bader A, Schilling T, Teebken OE, Brandes G, Herden T, Steinhoff G, Haverich A. *Tissue engineering of heart valves--human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves*. Eur J Cardiothorac Surg. 1998;14:279-284.
- Badylak S, Liang A, Record R, Tullius R, Hodde J. *Endothelial cell adherence to small intestinal submucosa: an acellular bioscaffold*. Biomaterials. 1999;20:2257-2263.
- Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. *Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function*. Acta Biomater. 2009;5:1-13.
- Badylak SF, Kochupura PV, Cohen IS, Doronin SV, Saltman AE, Gilbert TW, et al. *The use of extracellular matrix as an inductive scaffold for the partial replacement of functional myocardium*. Cell Transplant. 2006;15(Suppl. 1):S29–40.
- Badylak SF, Vorp DA, Spievack AR, Simmons-Byrd A, Hanke J, Freytes DO, et al. *Esophageal reconstruction with ECM and muscle tissue in a dog model*. J Surg Res. 2005;128:87–97.
- Bhat MA, Dar MA, Lone GN, Dar AM. *Use of pedicled omentum in esophagogastric anastomosis for prevention of anastomotic leak*. Ann Thorac Surg. 2006;82:1857–1862.

- Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M. *Probing heterotypic cell interactions: hepatocyte function in microfabricated co-cultures*. J Biomater Sci Polym Ed. 1998;9:1137-1160.
- Bianchi F, Rosi M, Vozzi G, Emanuelli C, Madeddu P, Ahluwalia A. *Microfabrication of fractal polymeric structures for capillary morphogenesis: applications in therapeutic angiogenesis and in the engineering of vascularized tissue*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2007;81:462-468.
- Borschel GH, Dennis RG, Kuzon WM Jr. *Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an acellular scaffold*. Plast Reconstr Surg. 2004;113:595-602.
- Brown BN, Freund JM, Han L, Rubin JP, Reing JE, Jeffries EM, et al. *Comparison of three methods for the derivation of a biologic scaffold composed of adipose tissue extracellular matrix*. Tissue Eng Part C Methods. 2011;17:411–421.
- Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. *Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow*. Blood. 2001;98:2396-2402.
- Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC. *Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo*. Biochem Biophys Res Commun. 2005;332:370–379.
- Carlson EC, Carlson BM. *A method for preparing skeletal muscle fiber basal laminae*. Anat Rec. 1991;230:325–331.
- Chang KP, Lai CH, Chang CH, Lin CL, Lai CS, Lin SD. *Free flap options for reconstruction of complicated scalp and calvarial defects: report of a series of cases and literature review*. Microsurgery. 2010;30:13-18.
- Chen RN, Ho HO, Tsai YT, Sheu MT. *Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications*. Biomaterials. 2004;25:2679-2686.

- Cheng W, Solorio L, Alsberg E. *Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffolds for orthopedic tissue engineering*. Biotech Advanc. 2013. In press.
- Collins D, Hogan AM, O'Shea D, Winter DC. *The omentum: anatomical, metabolic, and surgical aspects*. J Gastrointest Surg. 2009;13:1138–1146.
- Conconi MT, De Coppi P, Bellini S, Zara G, Sabatti M, Marzaro M, et al. Homologous muscle acellular matrix seeded with autologous myoblasts as a tissue-engineering approach to abdominal wall-defect repair. Biomaterials. 2005;26:2567–2574.
- Conconi MT, De Coppi P, Bellini S., Zara G., Sabatti M., Marzaro M., Zanon G, Gamba PG, Parnigotto P, Nussdorfer G, *Homologous muscle acellular matrix seeded with autologous myoblasts as a tissue-engineering approach to abdominal wall-defect repair*. Biomaterials. 2005;26:2567–2574.
- Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*. Biomaterials. 2011;32:3233–3243.
- Crenshaw SA, Roller MD, Chapman JK. *Immediate breast reconstruction with a saline implant and AlloDerm, following removal of a Phyllodes tumor*. World J Surg Oncol. 2011;21:34.
- Damien E, Hing K, Saeed S, Revell PA. *A preliminary study on the enhancement of the osteointegration of a novel synthetic hydroxyapatite scaffold in vivo*. J Biomed Mater Res A. 2003;66:241-246.
- Darzi A, Cheshire NJ, Somers SS, Super PA, Guillou PJ, Monson JR. *Laparoscopic omental patch repair of perforated duodenal ulcer with an automated stapler*. Br J Surg. 1993;80:1552–1552.
- De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al.

*Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow.* Cells Tissues Organs. 2003;174:101–109.

- Deeken CR, White AK, Bachman SL, Ramshaw BJ, Cleveland DS, Loy TS, Grant SA. *Method of preparing a decellularized porcine tendon using tributyl phosphate.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2011;96:199-206.
- Derda R, Li L, Orner BP, Lewis RL, Thomson JA, Kiessling LL. *Defined substrates for human embryonic stem cell growth identified from surface arrays.* ACS Chem Biol. 2007;2:347-355.
- DiMuzio P, Tulenko T. *Tissue engineering applications to vascular bypass graft development: the use of adipose-derived stem cells.* J Vasc Surg. 2007;45:A99–103.
- Flynn L, Semple JL, Woodhouse KA. *Decellularized placental matrices for adipose tissue engineering.* J Biomed Mater Res A. 2006;79:359-369.
- Flynn LE. *The use of decellularized adipose tissue to provide an inductive microenvironment for the adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells.* Biomaterials. 2010;31:4715–4724.
- Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. *Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology.* Trends Biotechnol. 2006;24:150-154.
- Freytes DO, Badylak SF, Webster TJ, Geddes LA, Rundell AE. *Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds.* Biomaterials. 2004;25:2353-2361.
- Fukuda J, Khademhosseini A, Yeh J, Eng G, Cheng J, Farokhzad OC, Langer R. *Micropatterned cell co-cultures using layer-by-layer deposition of extracellular matrix components.* Biomaterials. 2006;27:1479-1486.
- Gailit J, Ruoslahti E. *Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cations.* J Biol Chem. 1988;263:12927-12932.

- Gamba PG, Conconi MT, Lo Piccolo R, Zara G, Spinazzi R, Parnigotto PP. *Experimental abdominal wall defect repaired with acellular matrix*. *Pediatr Surg Int*. 2002;18:327–331.
- Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. *Decellularization of tissues and organs*. *Biomaterials*. 2006;27:3675-3683.
- Gillies AR, Smith LR, Lieber RL, Varghese S. *Method for decellularizing skeletal muscle without detergents or proteolytic enzymes*. *Tissue Eng Part C Methods*. 2011;17:383–389.
- Glowacki J, Mizuno S. *Collagen scaffolds for tissue engineering*. *Biopolymers*. 2008;89:338-344.
- Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. *Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods*. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005;27:566-571.
- Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. *Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells*. *J Cell Physiol*. 2001;189:54–63.
- Guilak F, Lott KE, Awad HA, Cao Q, Hicok KC, Fermor B, et al. *Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells*. *J Cell Physiol*. 2006;206:229–237.
- Gulati AK. *Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve*. *J Neurosurg*. 1988;68:117-123.
- Howard MA, Polo K, Pusic AL, Cordeiro PG, Hidalgo DA, Mehrara B, Disa JJ. *Breast cancer local recurrence after mastectomy and TRAM flap reconstruction: incidence and treatment options*. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117:1381-1386.

- Huston TL, Taback B, Rohde CH. *Chest wall reconstruction with porcine acellular dermal matrix (strattice) and a latissimus myocutaneous flap*. Am Surg. 2011;77:115-126.
- Ide C. *Nerve regeneration through the basal lamina scaffold of the skeletal muscle*. Neurosci Res. 1984;1:379–391.
- Jung SN, Chung JW, Yim YM, Kwon H. *One-stage skin grafting of the exposed skull with acellular human dermis (AlloDerm)*. J Craniofac Surg. 2008;19:1660-1662.
- Kaji H, Camci-Unal G, Langer R, Khademhosseini A. *Engineering systems for the generation of patterned co-cultures for controlling cell-cell interactions*. Biochim Biophys Acta. 2011;1810:239-250.
- Kamei Y, Aoyama H, Yokoo K, Fujii K, Kondo C, Sato T, et al. *Composite gastric seromuscular and omental pedicle flap for urethral and scrotal reconstruction after Fournier's gangrene*. Ann Plast Surg. 1994;33:565–568.
- Kapila YL, Wang S, Johnson PW. *Mutations in the heparin binding domain of fibronectin in cooperation with the V region induce decreases in pp125(FAK) levels plus proteoglycan-mediated apoptosis via caspases*. J Biol Chem. 1999;274:30906-30913.
- Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, Silberhumer G, Wolner E, Weigel G, Simon P. *Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves*. Int J Artif Organs. 2003;26:421-427.
- Katerinaki E, Zanetto U, Sterne GD. *Histological appearance of Strattice tissue matrix used in breast reconstruction*. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2010;63:840-851.
- Kaufman CL, Breidenbach W. *World experience after more than a decade of*



*clinical hand transplantation: update from the Louisville hand transplant program.* Hand Clin. 2011;27:417-421.

- Keck M, Haluza D, Lumenta DB, Burjak S, Eisenbock B, Kamolz LP, Frey M. *Construction of a multi-layer skin substitute: Simultaneous cultivation of keratinocytes and preadipocytes on a dermal template.* Burns. 2011;37:626-630.
- Kim TH, Kim DY, Jung KH, Hong YS, Kim SY, Park JW, et al. *The role of omental flap transposition in patients with locoregional recurrent rectal cancer treated with reirradiation.* J Surg Oncol. 2010;102:789–795.
- Lee SJ, Lee IW, Lee YM, Lee HB, Khang G. *Macroporous biodegradable natural/synthetic hybrid scaffolds as small intestine submucosa impregnated poly(D,L-lactide-co-glycolide) for tissue-engineered bone.* J Biomater Sci Polym Ed. 2004;15:1003-1017.
- Leeb C, Jurga M, McGuckin C, Moriggl R, Kenner L. *Promising new sources for pluripotent stem cells.* Stem Cell Rev. 2010;6:15-26.
- Li JP, de Wijn JR, Van Blitterswijk CA, de Groot K. *Porous Ti6Al4V scaffold directly fabricating by rapid prototyping: preparation and in vitro experiment.* Biomaterials. 2006;27:1223-1235.
- Lin P, Chan WC, Badylak SF, Bhatia SN. *Assessing porcine liver-derived biomatrix for hepatic tissue engineering.* Tissue Eng. 2004;10:1046-1053.
- Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, Cogan TA, Dodson A, Martorell J, Bellini S, Parnigotto PP, Dickinson SC, Hollander AP, Mantero S, Conconi MT, Birchall MA. *Clinical transplantation of a tissue-engineered airway.* Lancet. 2008;372:2023-2030.
- Maeda A, Ebata T, Kanemoto H, Matsunaga K, Bando E, Yamaguchi S, et al. *Omental flap in pancreaticoduodenectomy for protection of splanchnic vessels.*

World J Surg. 2005;29:1122–1126.

- Mano JF, Silva GA, Azevedo HS, Malafaya PB, Sousa RA, Silva SS, Boesel LF, Oliveira JM, Santos TC, Marques AP, Neves NM, Reis RL. *Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends*. J R Soc Interface. 2007;4:999-1030.
- Matsuo I, Kimura-Yoshida C. *Extracellular modulation of fibroblast growth factor signaling through heparan sulfate proteoglycans in mammalian development*. Curr Opin Genet Dev. 2014. [in press].
- McLean DH, Buncke HJ. *Autotransplant of omentum to a large scalp defect, with microsurgical revascularization*. Plast Reconstr Surg. 1972;49:268–274.
- Merad F, Hay JM, Fingerhut A, Flamant Y, Molkhov JM, Laborde Y. *Omentoplasty in the prevention of anastomotic leakage after colonic or rectal resection: a prospective randomized study in 712 patients*. French Associations for Surgical Research. Ann Surg. 1998;227:179–186.
- Mercurius KO, Morla AO. *Cell adhesion and signaling on the fibronectin 1st type III repeat; requisite roles for cell surface proteoglycans and integrins*. BMC Cell Biol. 2001;2:18.
- Merritt EK, Hammers DW, Tierney M, Suggs LJ, Walters TJ, Farrar RP. *Functional assessment of skeletal muscle regeneration utilizing homologous extracellular matrix as scaffolding*. Tissue Eng Part A. 2010;16:1395–1405.
- Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumié A. *Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells*. Circulation. 2004;110:349–355.
- Moghal N, Neel BG. *Integration of growth factor, extracellular matrix, and retinoid signals during bronchial epithelial cell differentiation*. Mol Cell Biol.

1998;18:6666-6678.

- Moon JJ, Saik JE, Poché RA, Leslie-Barbick JE, Lee SH, Smith AA, Dickinson ME, West JL. *Biomimetic hydrogels with pro-angiogenic properties*. *Biomaterials*. 2010;31:3840-3847.
- Moore R, Madara JL, MacLeod RJ. *Enterocytes adhere preferentially to collagen IV in a differentially regulated divalent cation-dependent manner*. *Am J Physiol*. 1994;266:1099-1107.
- Müller LC, Abendstein B, Salzer GM. *Use of the greater omentum for treatment and prophylaxis of anastomotic and stump dehiscence in major airway surgery*. *Thorac Cardiovasc Surg*. 1992;40:323–325.
- Musahl V, Abramowitch SD, Gilbert TW, Tsuda E, Wang JH, Badylak SF, Woo SL. *The use of porcine small intestinal submucosa to enhance the healing of the medial collateral ligament-a functional tissue engineering study in rabbits*. *J Orthop Res*. 2004;22:214-220.
- Nagata S, Hanayama R, Kawane K. *Autoimmunity and the clearance of dead cells*. *Cell*. 2010;140:619–630.
- Nathan S, Das De S, Thambyah A, Fen C, Goh J, Lee EH. *Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue*. *Tissue Eng*. 2003;9:733–44.
- Orlando G, Baptista P, Birchall M, De Coppi P, Farney A, Guimaraes-Souza NK, Opara E, Rogers J, Seliktar D, Shapira-Schweitzer K, Stratta RJ, Atala A, Wood KJ, Soker S. *Regenerative medicine as applied to solid organ transplantation: current status and future challenges*. *Transpl Int*. 2011;24:223-232.
- Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, et al. *Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart*.

Nature. 2008;14:213–221.

- Perniconi B, Costa A, Aulino P, Teodori L, Adamo S, Coletti D. *The pro-myogenic environment provided by whole organ scale acellular scaffolds from skeletal muscle*. Biomaterials. 2011;32:7870–7882.
- Petersen TH, Calle EA, Colehour MB, Niklason LE. *Matrix Composition and Mechanics of Decellularized Lung Scaffolds*. Cells Tissues Organs. 2011.
- Peterson B, Zhang J, Iglesias R, Kabo M, Hedrick M, Benhaim P, et al. *Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue*. Tissue Eng. 2005;11:120–129.
- Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, et al. *Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives*. Circulation. 2004;109:656–663.
- Porzionato A, Sfriso MM, Macchi V, Rambaldo A, Lago G, Lancerotto L, Vindigni V, De Caro R. *Decellularized omentum as novel biologic scaffold for reconstructive surgery and regenerative medicine*. Eur J Histochem. 2013;57:24-29.
- Pruss A, Kao M, Kiesewetter H, von Versen R, Pauli G. *Virus safety of avital bone tissue transplants: evaluation of sterilization steps of spongiosa cuboids using a peracetic acid-methanol mixture*. Biologicals. 1999;27:195-201.
- Puglisi MA, Saulnier N, Piscaglia AC, Tondi P, Agnes S, Gasbarrini A. *Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and hepatic differentiation: old concepts and future perspectives*. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2011;15:355-364.
- Qin T, Qing Q. *Optimal method for rat skeletal muscle decellularization*. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. 2009;23:836–839.
- Radisic M, Deen W, Langer R, Vunjak-Novakovic G. *Mathematical model of oxygen distribution in engineered cardiac tissue with parallel channel array*

- perfused with culture medium containing oxygen carriers. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005;288:1278-1289.*
- Record RD, Hillemonds D, Simmons C, Tullius R, Rickey FA, Elmore D, Badylak SF. *In vivo degradation of 14C-labeled small intestinal submucosa (SIS) when used for urinary bladder repair. Biomaterials. 2001;22:2653-2659.*
  - Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ. *Polymeric system for dual growth factor delivery. Nat Biotechnol. 2001;19:1029-1034.*
  - Rizzi R, Bearzi C, Mauretti A, Bernardini S, Cannata S, Gargioli C. *Tissue engineering for skeletal muscle regeneration. Muscles Ligaments Tendons J. 2012;2:230-234.*
  - Rodriguez LV, Alfonso Z., Zhang R., Leung J., Wu B., Ignarro LJ. *Clonogenic multipotent stem cells in human adipose tissue differentiate into functional smooth muscle cells. PNAS. 2006;103:12167–12172.*
  - Rosso F, Marino G, Giordano A, Barbarisi M, Parmeggiani D, Barbarisi A. *Smart materials as scaffolds for tissue engineering. J Cell Physiol. 2005;203:465-470.*
  - Russ JE, Smoron GL, Gagnon JD. *Omental transposition flap in colorectal carcinoma: adjunctive use in prevention and treatment of radiation complications. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1984;10:55–62.*
  - Sbarbati A, Accorsi D, Benati D, Marchetti L, Orsini G, Rigotti G, et al. *Subcutaneous adipose tissue classification. Eur J Histochem. 2010;54:e48–e48.*
  - Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, König K, Riemann I, Halbhuber KJ, et al. *Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. J Struct Biol. 2003;143:201–208.*
  - Schonherr E, Broszat M, Brandan E, Bruckner P, Kresse H. *Decorin core protein fragment Leu155-Val260 interacts with TGF-beta but does not compete for*

- decorin binding to type I collagen*. Arch Biochem Biophys. 1998;355:241–248.
- Seddon AM, Curnow P, Booth PJ. *Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera*. Biochim Biophys Acta. 2004;1666:105-117.
  - Sellaro TL, Ranade A, Faulk DM, McCabe GP, Dorko K, Badylak SF, et al. *Maintenance of human hepatocyte function in vitro by liver-derived extracellular matrix gels*. Tissue Eng Part A. 2010;16:1075–82.
  - Siemionow M, Ozturk C. *An update on facial transplantation cases performed between 2005 and 2010*. Plast Reconstr Surg. 2011;128:707-720.
  - Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, Rieder E, Wolner E. *Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients*. Eur J Cardiothorac Surg. 2003;23:1002-1006.
  - Solanki NS, Nowak KM, Mackie IP, Greenwood JE. *Using biobrane: techniques to make life easier*. Eplasty. 2010;10:70.
  - Song SY, Chung HM, Sung JH. *The pivotal role of VEGF in adipose-derived-stem-cell-mediated regeneration*. Expert Opin Biol Ther. 2010;10:1529-1537.
  - Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. *Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells*. Science. 1988;241:58-62.
  - Stern MM, Myers RL, Hammam N, Stern KA, Eberli D, Kritchevsky SB, et al. *The influence of extracellular matrix derived from skeletal muscle tissue on the proliferation and differentiation of myogenic progenitor cells ex vivo*. Biomaterials. 2009;30:2393–2399.
  - Tan W, Desai TA. *Layer-by-layer microfluidics for biomimetic three-dimensional structures*. Biomaterials. 2004;25:1355-1364.
  - Teebken OE, Bader A, Steinhoff G, Haverich A. *Tissue engineering of vascular*

- grafts: human cell seeding of decellularised porcine matrix. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2000;19:381-386.*
- Tiengo C, Amabile A, Azzena B *The contribution of a dermal substitute in the three-layers reconstruction of a nose tip avulsion. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2012;65:114-117.*
  - Tiengo C., Pontini A., Azzena B., *Combined use of homologous fascia lata graft and acellular dermal substitute for the repair of a complex abdominal wound. European Journal of Plastic Surgery. 2013;36:125-129.*
  - Tottey S, Johnson SA, Crapo PM, Reing JE, Zhang L, Jiang H, Medberry CJ, Reines B, Badylak SF. *The effect of source animal age upon extracellular matrix scaffold properties. Biomaterials. 2011;32:128-136.*
  - Tran KT, Griffith L, Wells A. *Extracellular matrix signaling through growth factor receptors during wound healing. Wound Repair Regen. 2004;12:262-268.*
  - Valentin JE, Turner NJ, Gilbert TW, Badylak SF. *Functional skeletal muscle formation with a biologic scaffold. Biomaterials. 2010;31:7475–7484.*
  - van Wingerden JJ, Coret ME, van Nieuwenhoven CA, Totté ER. *The laparoscopically harvested omental flap for deep sternal wound infection. Eur J Cardio-thorac Surg. 2010;37:87–92.*
  - Villegas SN, Canham M, Brickman JM. *FGF signalling as a mediator of lineage transitions--evidence from embryonic stem cell differentiation. J Cell Biochem. 2010;110:10-20.*
  - Vorotnikova E, McIntosh D, Dewilde A, Zhang J, Reing JE, Zhang L, et al. *Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo. Matrix Biol. 2010;29:690–700.*

- Webster J, Scuffham P, Sherriff KL, Stankiewicz M, Chaboyer WP. *Negative pressure wound therapy for skin grafts and surgical wounds healing by primary intention*. Cochrane Database Syst Rev. 2012;4:009261.
- Weiss ML, Troyer DL. *Stem cells in the umbilical cord*. Stem Cell Rev. 2006;2:155-162.
- Wilshaw SP, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. *Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering*. Tissue Eng. 2006;12:2117-2129.
- Wilson A, Butler PE, Seifalian AM. *Adipose-derived stem cells for clinical applications: a review*. Cell Prolif. 2011;44:86-98.
- Woolf AD, Pflieger B. *Burden of major musculoskeletal conditions*. Bull World Health Organ. 2003;81:646–656.
- Yang C, John TM, Gosiewska A, Buensuceso CS, Colter DC, Seyda A, et al. European Patent Specification (2012), EP 2 229 191B1. United States Patent Application Publication (2009), Pub. No. US 2009/0163990 A1; Decellularized omentum matrix and uses thereof.
- Yim EK, Leong KW. *Proliferation and differentiation of human embryonic germ cell derivatives in bioactive polymeric fibrous scaffold*. J Biomater Sci Polym Ed. 2005;16:1193-1217.
- Yow K-H, Ingram J, Korossis SA, Ingham E, Homer-Vanniasinkam S. *Tissue engineering of vascular conduits*. Br J Surg. 2006;93:652–61.
- Zang M, Zhang Q, Chang EI, Mathur AB, Yu P. *Decellularized tracheal matrix scaffold for tissue engineering*. Plast Reconstr Surg. 2012 Sep;130(3):532-540.
- Zhang QX, Magovern CJ, Mack CA, Budenbender KT, Ko W, Rosengart TK. *Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum mediated angiogenesis*. J Surg Res. 1997;67:147–54.



- Zheng MH, Chen J, Kirilak Y, Willers C, Xu J, Wood D. *Porcine small intestine submucosa (SIS) is not an acellular collagenous matrix and contains porcine DNA: possible implications in human implantation.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2005;73:61–67.
- Zhou J, Fritze O, Schleicher M, Wendel HP, Schenke-Layland K, Harasztosi C, Hu S, Stock UA. *Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity.* Biomaterials. 2010;31:2549-2554.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.* Mol Biol Cell. 2002;13:4279–4295.