



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Medicina Molecolare

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN: BIOMEDICINA

CURRICOLO: MEDICINA RIGENERATIVA

CICLO : XXIX

TITOLO TESI

APPLICAZIONE SPERIMENTALE DI VASI UMANI DECELLULARIZZATI
DI PICCOLO CALIBRO

Coordinatore: Ch.mo Prof. Stefano Piccolo

Supervisore: Ch.mo Prof. Franco Bassetto

Dottorando : Alex Pontini

INDICE

Riassunto	2
Abstract	4
1. Introduzione.....	6
2. Anatomia dei vasi	9
3. Sostituti vascolari.....	14
4. Razionale della decellularizzazione della ECM.....	18
5.5. Metodiche di decellularizzazione tissutale.....	19
6. Innesti decellularizzati con e senza aggiunta di cellule.....	26
7. Utilizzo clinico dei sostituti vascolari.....	26
8. Materiali e metodi.....	30
9. Risultati.....	36
10. Discussione	50
11. Conclusioni.....	54
12. Bibliografia.....	56

Ingegneria tissutale è il termine generico con cui si individua un vasto campo di studio e di applicazioni sperimentali ed industriali volti a ricreare in laboratorio tessuti biointegrabili nell'uomo allo scopo di sostituirne o riprodurne le funzioni in ambito di chirurgia rigenerativa. Una delle vie maggiormente utilizzate a tale fine è la realizzazione di un supporto ottenuto secondo diversi metodi e definito scaffold in grado di mimare perfettamente le caratteristiche sia strutturali che funzionali di tessuti od organi danneggiati, favorendo al contempo l'invasione cellulare e la sua integrazione nell'organismo ricevente. Nel campo dei tessuti vascolari, numerosi studi sono stati condotti al fine di produrre dei validi sostituti capaci in futuro di soppiantare l'utilizzo di bypass autologhi, non sempre disponibili e che comportano un danno secondario a volte non trascurabile. Ancora maggiore è l'esigenza nelle procedure microvascolari con vasi di piccole dimensioni. Negli anni, sono stati ideati e realizzati condotti vascolari di materiale sintetico, riassorbibili o non riassorbibili, associati o meno a cellule staminali e fattori di crescita, scaffold ricavati da processi di decellularizzazione di vasi di piccolo calibro di origine animale e condotti vascolari realizzati con metodi *scaffold free*. Il presente studio ha prodotto dei modelli sperimentali animali in cui tratti di vasi femorali di coniglio sono stati sostituiti, in vivo, con scaffold ricavati da un processo di decellularizzazione di vasi umani di piccolo calibro (diametro interno < 6mm).

Materiali e metodi

Sono state prelevate due arterie e due vene umane di piccolo calibro (DI < 6 mm) ottenute da tessuti umani vivi di arto superiore, previo consenso informato, ove non era possibile procedere a loro reimpianto e sottoposte ad un processo di decellularizzazione secondo un adattamento del protocollo di Sheridan. L'efficacia del processo è stata dimostrata, in vitro, con analisi istologiche, immunoistochimiche, ultrastrutturali, e analisi qualitative e quantitative del DNA. Abbiamo altresì condotto analisi meccaniche e valutazioni ecocolorDoppler in vivo della funzionalità. I vasi decellularizzati sono stati impiantati, in vasi femorali di conigli adulti realizzando un'anastomosi termino-terminale. La pervietà è stata verificata, in vivo, al tempo 0, dopo 10 e dopo 20 minuti. Le cavie sono state sacrificate a 30 giorni (impianti venosi) e 10 e 40 giorni (impianti arteriosi), è stata verificata la pervietà degli innesti prelevati e sono state eseguite analisi istologiche e immunofenotipiche per rilevare il processo infiammatorio e di ricellularizzazione. Un controllo è stato rappresentato dall'impianto di sostituti vascolari sintetici pro arteria con sacrificio a 2 settimane.

Risultati

Le varie analisi in vitro dei vasi decellularizzati hanno dimostrato la totale riuscita del processo. La componente cellulare è stata eliminata senza alterare la composizione e la struttura tridimensionale della matrice extra cellulare, come dimostrato anche da test meccanici. Gli scaffold sono stati impiantati con successo e in tutti i modelli la pervietà è stata mantenuta fino al sacrificio degli animali. L'analisi Doppler ha ulteriormente confermato la sovrapposibilità con i tessuti originali ed il mantenimento del flusso senza evidenza di trombosi. Le analisi istologiche e immunofenotipiche degli scaffold prelevati hanno evidenziato un minimo processo infiammatorio, il mantenimento della struttura della matrice extracellulare e la ricellularizzazione sia della parete che della superficie luminale vascolare. Gli impianti sintetici hanno dimostrato invece una completa trombizzazione.

Conclusioni

Gli adattamenti apportati al protocollo di decellularizzazione proposto da Sheridan su animale si sono dimostrati parimenti efficaci sul tessuto umano, procedendo , anzi, ad una migliore qualità nella decellularizzazione che ha favorito l'integrazione in vivo. Grazie al mancato utilizzo di cellule staminali endoteliali i costi del processo risultano estremamente ridotti, seppure l'efficacia sia dimostrata per brevi tratti e ,per favorire l'integrazione di vasi di maggiore lunghezza (come nei peduncoli microvascolari dei lembi) il ricorso al potenziamento cellulare rimane una strada necessaria. Le analisi istologiche sui prelievi degli innesti hanno dimostrato una minima presenza di processi infiammatori, una completa pervietà sino a 6 settimane con un processo di neoendotelizzazione arteriosa.

Tissue engineering mean a wide field of science application in searching the substitution by different process of damaged human tissue. The main intent is to obtain scaffold that can perfectly mimic the structural and functional characteristics of damaged tissues or organs. In the field of vascular graft numerous studies were conducted to obtain suitable tissue that could supplant the use of autologous bypassor even the smallest vessel employed in microsurgery. Over the years, various solutions have been proposed. The use of resorbable or non-resorbable vascular synthetic conduits, associated or not to stem cells and growth factors, small-caliber decellularized vessels and scaffold-free methods have been described in the literature. First, our study has produced experimental animal models in which a section of the rabbit femoral vessels was replaced by small caliber (inner diameter < 6 mm) human decellularized vessel.

Materials and methods

Two arteries and two human veins of small caliber (< 6 mm) obtained by upper arm lesions not suitable for surgical procedure were withdrawn and subjected to a process of decellularization according to a modified Sheridan's protocol. The effectiveness of the process was shown in vitro with histological, immunohistochemical, ultrastructural, and qualitative and quantitative analysis of DNA. Mechanical testing and functional ecodoppler in vivo were also performed. Decellularized vessels were implanted in vivo in rabbit femoral vessels. The patency was verified, in vivo, at time 0, 10 and 20 minutes later. After 30 days for vein implants and 10 and 40 days for artery implants, the rabbits were sacrificed. The patency of grafts, the inflammatory process and re-endothelialization was tested with histological and immunophenotypical analysis. At the same time we analyzed also synthetic vessel as control , after two weeks of implantation.

Results

The various assays of decellularized vessels, in vitro, demonstrated the success of the process. The cellular component was eliminated without altering the composition and three-dimensional structure of extra cellular matrix. It was also confirmed by mechanical testing. The scaffolds were implanted successfully in all models and the patency was maintained until animals' sacrifice, as also documented by ecocolor Doppler evaluation. The histological and immunophenotypical analysis of taken scaffolds showed a minimal inflammatory process, the maintenance of the extracellular matrix structure and the wall and luminal surface re-cellularization. The synthetic vessel demonstrate complete thrombosis.

Conclusions

The adjustments made to the decellularization protocol proposed by Sheridan helped to keep acceptable length of the process maintaining the same effectiveness. Non-use of endothelial stem cells reduced costs even if, for longer grafts the use of cells to improve biocompatibility seems to be necessary.

The histological studies on withdrawn grafts have demonstrated a minimal presence of inflammatory processes, a complete patent in two weeks till eight weeks and the presence of a process of re-cellularization. The excellent biocompatibility of implanted scaffolds suggest the possibility of a subsequent application in clinical microvascular field and, in the future, for the establishment of a tissue bank to find substitutes with suitable caliber and length. Additional animal testing, with long time survival, mechanical and histological analysis are definitely essential to determine the effectiveness of these implants and think of a possible clinical trials.

1. Ingegneria tissutale

L'ingegneria tissutale rappresenta una nuova frontiera in ambito biomedico. Questa nuova scienza ad elevato contenuto tecnologico si pone lo scopo di riparare i tessuti e gli organi danneggiati da malattie, traumi o semplice invecchiamento e quindi recuperarne le funzioni perse. È una scienza multidisciplinare in cui si uniscono conoscenze di ingegneria, biologia cellulare/molecolare, matematica, scienze dei materiali, chimica e altre ancora, allo scopo di sviluppare, produrre e commercializzare sostituti biologici che consentano di migliorare il funzionamento, curare o riparare tessuti biologici o addirittura sostituire tessuti distrutti (ad esempio muscoli, ossa, cartilagini, vasi sanguigni, etc.). L'obiettivo a lungo termine è quello di riuscire a coltivare tessuti complessi o addirittura organi interi [1].

Questo settore si inserisce nell'ambito delle biotecnologie aprendo la strada a nuove possibilità di cura e a una migliore qualità della vita dei pazienti. I risultati sperimentali ottenuti nell'ultimo decennio si stanno ora rivelando anche in ambito clinico, a tal punto così rilevanti da avere introdotto una nuova disciplina : la medicina rigenerativa. In questo ambito , infatti, si inserisce la discussione, la ricerca e le scoperte inerenti alla rigenerazione biologica da parte del corpo del paziente del tessuto/organo deteriorato, sia mediante una rigenerazione *ex corpore* in laboratorio che in vivo , anziché la sua sostituzione con una protesi o un trapianto. Lo scenario e l'obiettivo futuro è rivolto all'organogenesi [2].

Ogni malattia che dia luogo a una degenerazione dei tessuti è una potenziale candidata al trattamento rigenerativo. La grande sfida è oggi rappresentata dalla terapia delle malattie cardiache, di quelle neurodegenerative (Alzheimer e Parkinson), delle ustioni, dei traumi, della distrofia muscolare, del diabete, etc., per le quali gli approcci tradizionali sono risultati insufficienti [3]. Alcune applicazioni terapeutiche sono già realtà, come ad esempio nel caso degli epitelii, della cornea e della pelle [4, 5]. Sono in arrivo nuovi prodotti le cui applicazioni possono consentire il trattamento di patologie finora non curabili in maniera soddisfacente, come le malattie cardiovascolari (realizzazione di valvole cardiache e di vasi sanguigni con tecniche di ingegneria tissutale e rigenerazione del tessuto muscolare cardiaco), le malattie neurodegenerative (e.g. il morbo di Alzheimer e il morbo di Parkinson), le lesioni delle fibre nervose e del midollo spinale [6, 7]. Protagoniste di questa nuova rivoluzione scientifica sono le cellule staminali, progenitrici di tutti gli organi e tessuti degli esseri viventi.

Sono cellule indifferenziate che non hanno ancora raggiunto una morfologia e una funzione specifiche, ma che, in determinate condizioni, possono specializzarsi e svilupparsi in tessuti ed organi. Le cellule staminali stanno già approdando nella sperimentazione clinica, nonostante la conoscenza dei programmi di controllo che ne guidano il destino sia ancora incompleta [8]. È necessario, quindi, prima dell'ingresso nella pratica clinica delle terapie basate sulle cellule staminali, che siano ulteriormente indagati alcuni aspetti critici, come la sicurezza a lungo termine, la tollerabilità, l'efficacia ed il potenziale cancerogeno [9].

Se, da una parte, l'ingegneria tissutale si avvale di cellule staminali o progenitori cellulari che vengono espansi e differenziati secondo il fenotipo desiderato, dall'altra, si avvale di scaffold (supporti) di materiale, forma e architettura ad hoc che forniscono il supporto in grado di ospitare e promuovere l'accrescimento e il differenziamento delle cellule staminali [10]. Lo scaffold dovrebbe possedere le caratteristiche meccaniche del tessuto che si vuole rigenerare, essere in grado di riorganizzarsi e promuovere la rigenerazione ed essere riassorbito e sostituito dai nuovi tessuti [11, 12].

La sfida dell'ingegneria tissutale è quindi duplice: da un lato si prefigge di individuare un supporto adatto in grado di contenere le cellule e di permettere il loro orientamento per formare strutture stratificate e, dall'altro lato, di studiare e di riprodurre le condizioni che consentano alle cellule di crescere, moltiplicarsi e differenziarsi nei diversi tipi di tessuti. Il materiale bioartificiale dello scaffold rappresenta quindi una struttura temporanea che fa da *homing* alle cellule, ne promuove la rigenerazione, la giusta direzione e l'orientamento. I requisiti richiesti per un scaffold sono numerosi, come la bio-compatibilità e la citocompatibilità, delle adeguate proprietà meccaniche e un adeguato tempo di degradazione. Viste le grandi difficoltà tecniche, il fabbisogno di ricerca nel settore dell'ingegneria tissutale rimane notevole. Molte conoscenze non sono ancora disponibili e molte discipline biomediche e non sono attivamente coinvolte in questa ricerca: l'ingegneria cellulare relativa al fenomeno rigenerativo di cellule staminali, cellule precursori e cellule differenziate; la biochimica, in relazione a fattori organici quali le proteine ed i geni che agiscono sull'induzione della differenziazione e sulla crescita di queste cellule; l'ingegneria di materiali per uso medico, che progetta e sintetizza il materiale per gli scaffold o il sistema per il rilascio controllato del fattore di crescita. Quindi, con un approccio interdisciplinare, la ricerca si propone di perfezionare questa nuova tecnologia ad elevato contenuto innovativo fino a farne un metodo terapeutico riconosciuto [13]. È quindi evidente che, al di là dei notevoli progressi e del grande impatto che la medicina rigenerativa avrà nella terapia di malattie gravi, questa nuova frontiera rappresenterà anche un notevole business [14]. Per ora è ancora un settore giovane ma in piena espansione, caratterizzato dalla presenza di imprese nuove e di piccole dimensioni, specializzate nella ricerca ad alto contenuto tecnologico [15].

L'ingegneria tissutale è un vasto campo di ricerca e uno dei suoi obiettivi è quello di ottenere, in vitro, scaffold vascolari in grado di sostituire i condotti sanguigni nativi danneggiati. Un importante sviluppo si è visto in ambito cardiovascolare ma il campo di applicazione potenziale potrebbe facilmente essere espanso [16]. Nell'ingegneria tissutale i sostituti di tessuti danneggiati vengono sviluppati secondo i principi dell'ingegneria, della biologia e di altre scienze rendendo questo un campo interdisciplinare. Tre componenti sono alla base di questa disciplina. In primo luogo, le cellule utilizzate dovrebbero preservare la funzione specifica del tessuto; in secondo luogo, gli agenti o segnali bio-attivi dovrebbero indurre le cellule in base alla funzione specifica; in terzo luogo, lo scaffold dovrebbe accogliere le cellule e agire come sostituto del tessuto danneggiato. Gli scaffold possono essere categorizzati come sintetici, biologici o composti e i segnali cellulari comprendono fattori di crescita, citochine, fattori di adesione e bioreattori [17]. In letteratura, i progressi riguardanti l'approccio dell'ingegneria tissutale nella sostituzione di vasi sanguigni danneggiati sono riportati in continua crescita. Sono state ottenute strutture simili a vasi nativi con simili proprietà elastiche della parete necessarie a sostenere il flusso sanguigno ciclico. Inoltre, la produzione di scaffold con un diametro simile a quello dei vasi nativi ha permesso di realizzare un perfetto match con i vasi del ricevente. Il sostituto vascolare bioingegnerizzato ideale, soprattutto se necessari innesti lunghi e di piccolo calibro, dovrebbe essere non trombogenico.

Nelle ricerche degli ultimi anni, fondamentali sono stati i risultati ottenuti in termini di proprietà antitrombotiche del lume [18]. Il meccanismo trombotico che colpisce i sostituti vascolari, specialmente quelli artificiali, è il maggior responsabile dei fenomeni di obliterazione e conseguente fallimento delle protesi microvascolari.

I vasi nativi autologhi sono i sostituti vascolari maggiormente utilizzati per le arterie di piccolo diametro. Il maggior vantaggio offerto da questi innesti è l'assenza di risposta immunitaria, ma il tempo impiegato per la dissezione, il prelievo e la preparazione del vaso è un limite per il loro utilizzo nella chirurgia microvascolare di emergenza [19].

In ambito microchirurgico, l'utilizzo di protesi sintetiche offre una possibile soluzione alla necessità di vasi di piccolo calibro pronti all'uso e semplici da maneggiare. Gli svantaggi di questi sostituti vascolari consistono in una intrinseca trombogenicità e nella differenza di compliance con il vaso nativo. L'obiettivo della ricerca è quello di ottenere una protesi ideale che possieda la maggior biocompatibilità possibile e un soddisfacente tasso di pervietà nel lungo periodo.

2. Anatomia dei vasi

L'apparato circolatorio sanguigno è costituito da un insieme di condotti variamente ramificati, vasi, che si distribuiscono a tutto l'organismo e nei quali scorre il sangue. I vasi sanguigni sono suddivisibili in arterie, capillari e vene (Fig. 1). Nell'ambito dell'organismo l'apparato circolatorio sanguigno svolge numerose funzioni:

- Trasporto di sostanze nutritive e di ossigeno e loro distribuzione a tutte le parti dell'organismo;
- Allontanamento dei prodotti del catabolismo cellulare, in particolare anidride carbonica, dalla loro sede di produzione;
- Contributo al mantenimento di una temperatura corporea costante (termoregolazione);
- Regolazione dell'omeostasi dei fluidi corporei;
- Impegno nei processi immunitari mediante il trasporto di cellule dotate di attività fagocitaria, di cellule immunocompetenti e di anticorpi.

Le arterie, allontanandosi dal cuore, si ramificano progressivamente aumentando il numero e riducendo il proprio diametro. Si passa dalle arterie di grosso calibro a quelle di medio e piccolo calibro e, infine, alle arteriole. Dal segmento terminale delle arteriole (metarteriole) traggono origine i capillari (diametro medio di 10 μm), i quali, per la sottigliezza della loro parete costituita quasi esclusivamente da endotelio (spessore medio di 0.5 μm) sono permeabili permettendo il passaggio di acqua e sostanze in essa disciolte dal sangue ai tessuti circostanti e viceversa. Per confluenza dei capillari stessi hanno origine le venule, le quali, riunendosi tra loro, costituiscono vene di piccolo e medio calibro e, infine, di grosso calibro che ritornano al cuore. Nelle arterie il sangue circola in direzione centrifuga, cioè dal cuore verso la periferia, e nelle vene in direzione centripeta, cioè verso il cuore e ciò indipendentemente dal tipo di sangue contenuto [20].

2.1 Arterie

Le arterie sono condotti muscolomembranosi che trasportano e distribuiscono il sangue agli organi. Il sangue transita in arterie di calibro progressivamente decrescente, fino all'interno degli organi, dove le arteriole immettono il sangue nelle reti capillari di scambio. Le caratteristiche strutturali della parete delle arterie risponde all'elevato regime pressorio all'interno delle stesse.

Le arterie possono essere classificate in base al loro calibro e alle caratteristiche strutturali in:

- Arterie di grosso calibro (diametro da 3 cm a 0.7 cm) o elastiche o di conduzione;
- Arterie di medio e piccolo calibro (diametro da 7 mm a 0.1 mm) o muscolari o di distribuzione;
- Arteriole (diametro da 100 μm a valori inferiori).

Struttura

Le pareti delle arterie sono organizzate in tre tonache concentriche che, dalla superficie intraluminale alla superficie esterna, sono la tonaca intima, media e avventizia. Tra la tonaca intima e la media e tra quest'ultima e la tonaca avventizia si trovano le lamine elastiche interna ed esterna. In relazione al diametro e alle caratteristiche della parete vascolare le arterie si suddividono in arterie elastiche, arterie muscolari e arteriole (Fig. 2).

Arterie elastiche

Le arterie elastiche corrispondono alle arterie di grosso calibro (7-30 mm di diametro).

- La tonaca intima delle arterie elastiche ha uno spessore di circa 100 μm ed è formata da uno strato endoteliale, pavimentoso semplice, che poggia su un esile strato di tessuto connettivo lasso, costituito da collagene, fibre elastiche e rari fibroblasti, macrofagi e cellule muscolari lisce.
- La lamina elastica interna è formata da una o più lamine elastiche con fenestrazioni, attraversate da processi endoteliali che si pongono in rapporto con le cellule muscolari lisce della tonaca media.
- La tonaca media delle arterie elastiche ha uno spessore di circa 500 μm ed è formata da molteplici lamine elastiche fenestrate, tra loro connesse da sottili fascetti elastici. Tra le lamine elastiche si trovano cellule muscolari lisce, disposte circolarmente, e fibre di collagene ed elastina in matrice proteoglicanica. La componente muscolare aumenta procedendo verso le arterie di calibro minore.
- La tonaca avventizia è abbastanza sottile ed è formata da tessuto connettivo. Fasci longitudinali di fibre collagene e un reticolo di sottili fibre elastiche contribuiscono alla sua formazione.

Arterie muscolari

Rappresentano la maggior parte delle arterie dell'apparato circolatorio e presentano un diametro di 0.1-7 mm.

- La tonaca intima è simile a quella delle arterie elastiche, ma è più sottile. Le cellule endoteliali sono disposte prevalentemente in direzione longitudinale e poggiano su un sottile strato sottoendoteliale.

- La lamina elastica interna si presenta in sezione come uno strato ondulato ben evidente.
- La tonaca media è costituita prevalentemente da cellule muscolari ad andamento circolare o elicoidale. Le cellule muscolari sono separate tra di loro da una lamina basale che si interrompe nei punti in cui le cellule vengono in contatto tra di loro, permettendo la conduzione intercellulare.
- La lamina elastica esterna è più sottile di quella interna ed è costituita da fasci a decorso prevalentemente longitudinale.
- La tonaca avventizia è molto sviluppata, tanto che talora può essere più spessa della tonaca media. È costituita da fasci di fibre collagene.

Arteriole

Rappresentano la principale componente della resistenza periferica al flusso sanguigno. Esse hanno un diametro di 40-100 μm .

- La tonaca intima è formata da uno strato continuo di cellule endoteliali che poggia su uno strato sottoendoteliale molto sottile.
- La tonaca media è costituita da due o tre lamine di cellule muscolari lisce. La componente muscolare delle metarteriole costituisce un dispositivo di regolazione dell'afflusso sanguigno alla rete capillare (sfintere precapillare).
- la tonaca avventizia molto sottile è formata da fibre collagene e sporadici fibroblasti.

2.2 Capillari

Sono esili canali (diametro 5-8 μm) interposti tra le diramazioni delle arterie terminali e le radici delle venule, sono contenuti all'interno dei tessuti e la loro parete è in stretto rapporto con il tessuto stesso, permettendo gli scambi tra il sangue e i tessuti.

Classificazione

Al microscopio elettronico si distinguono due tipi di capillari:

- Capillari continui o muscolari, nei quali l'endotelio forma attorno al lume una lamina ininterrotta;
- Capillari fenestrati, nei quali le cellule endoteliali sono interrotte da fenestrature circolari di 50-100 nm di diametro.

Struttura

La parete è costituita da uno strato unico di cellule endoteliali che poggiano su una lamina basale. Sul versante esterno dei capillari si collocano i periciti provvisti di sottili prolungamenti e avvolti da una sottile lamina esterna in continuità con la lamina basale.

Le vene sono dei condotti membranosi che riconducono al cuore il sangue refluo dal distretto capillare. Possono essere classificate in base al loro diametro in vene di grosso calibro, vene di medio calibro e vene di piccolo calibro. Un'ulteriore classificazione si basa sulla loro posizione rispetto alla fascia distinguendo in vene superficiali e profonde.

La maggior parte delle vene, soprattutto quelle degli arti inferiori, presenta delle valvole per agevolare il flusso antigravitario e impedire fenomeni di stasi venosa distrettuale.

Classificazione

In base alla struttura si distinguono tre tipi di vene:

- Vene di piccolo calibro (diametro < 1 mm)
- Vene di tipo recettivo
- Vene di tipo propulsivo

Struttura

Le vene presentano notevoli differenze meccaniche e funzionali rispetto alle arterie. In particolare, le vene hanno una parete più sottile delle arterie, le tre tonache non sono nettamente distinguibili e presentano una minore componente elastica con una prevalenza di fibre collagene. La componente muscolare risulta meno compatta rispetto a quella delle arterie e i fascetti di miocellule sono separate da maglie grossolane di tessuto connettivo.

Vene di piccolo calibro

Tra queste, quelle di calibro minore presentano una parete strutturalmente analoga a quella dei capillari; quelle di calibro maggiore hanno una parete costituita da endotelio, tonaca media (prevalenza di tessuto collagene e rare cellule muscolari lisce) e avventizia in continuità con l'ambiente perivascolare.

Vene di tipo recettivo

Sono tipiche dei territori sopradiaframmatici, nei quali il sangue defluisce verso il cuore favorito dalla forza di gravità. Hanno una parete sottile di tipo fibroelastico con rarissime cellule muscolari, le tonache non sono nettamente distinguibili.

Vene di tipo propulsivo

Sono tipiche dei territori sottodiaframmatici, in particolare degli arti inferiori nei quali il flusso sanguigno è contrastato dalla forza di gravità. Hanno una parete spessa ricca di fibre muscolari ed elastiche. Si distinguono in tre tonache:

- Tonaca intima costituita dall'endotelio poggiante su una spessa lamina collagenica arricchita di fibre elastiche e fascetti di cellule muscolari lisce.
- Tonaca media (fino a 2/3 dello spessore della parete) costituita da cellule muscolari lisce a disposizione circolare.
- Tonaca avventizia ben sviluppata costituita da fibre collagene ed elastiche.

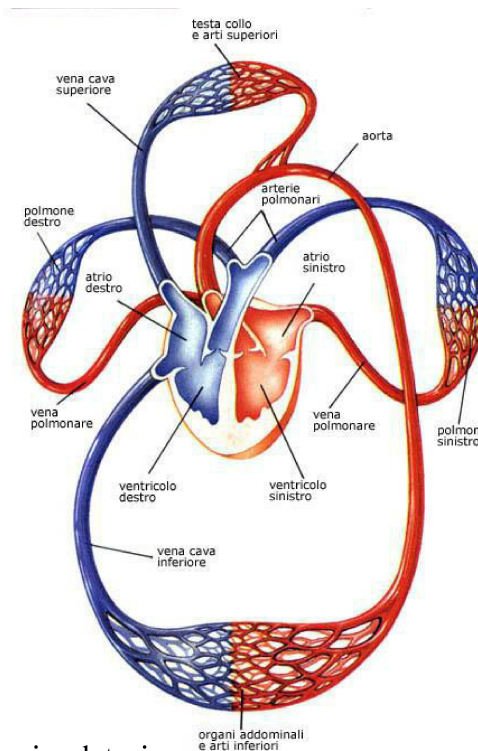


Fig. 1: Sistema cardio-circolatorio

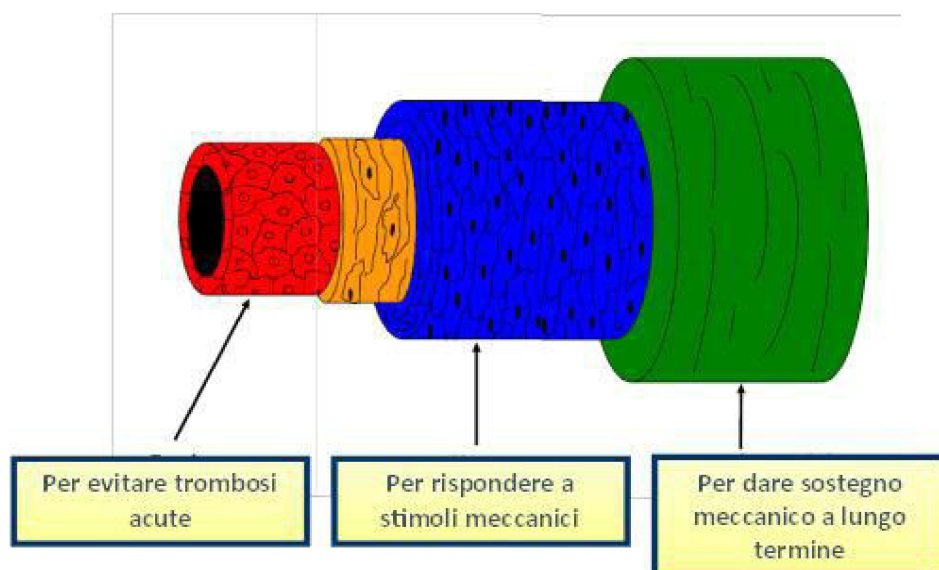


Fig. 2: Struttura della parete arteriosa

3. Sostituti vascolari

L'aterosclerosi causa una progressiva occlusione vascolare responsabile della riduzione del flusso sanguigno e dell'insufficienza d'organo. L'infarto miocardico acuto, la claudicatio o l'ulcera cronica e l'ictus sono le patologie più frequenti causate da un danno vascolare, rispettivamente, di una o più coronarie, di un'arteria periferica dell'arto inferiore e un'arteria carotide o cerebrale. La sostituzione arteriosa autologa è considerato il trattamento più efficace per le patologie vascolari ma, negli ultimi anni, in letteratura, molteplici strategie alternative sono state descritte.

3.1 By-pass autologhi

Le arterie e le vene autologhe sono i migliori sostituti dei vasi di piccolo calibro (diametro interno < 6mm). In caso di occlusione coronarica con successiva ischemia miocardica e infarto miocardico acuto, il "gold standard" terapeutico, al giorno d'oggi, risulta essere la sostituzione vascolare con le arterie mammarie interne o vene safene [21]. Negli Stati Uniti vengono eseguiti, annualmente, 1.4 milioni di interventi di bypass. Un terzo di questi pazienti, però, risulta privo di vene utilizzabili a causa di patologie vascolari croniche o precedenti interventi con prelievo dei vasi. Gli innesti autologhi venosi hanno dimostrato un basso tasso di pervietà nel lungo periodo, principalmente, a causa dell'iperplasia intimale [22]. La necessità di innesti vascolari è elevata nell'ambito della chirurgia ricostruttiva, in caso di traumi vascolari, nei trapianti d'organo come anche nella pratica clinica giornaliera. Altri fatti da considerare sono la significativa morbilità e gli elevati costi economici derivanti dalla preparazione dei vasi autologhi prelevati.

3.2 Vasi bioingegnerizzati (TEBV)

In letteratura sono descritti molti differenti approcci di bioingegneria vascolare con il comune scopo di ottenere dei sostituti vascolari che presentino la migliore biocompatibilità possibile e un maggior tasso di pervietà nel lungo periodo. La ricerca per sviluppare scaffold adeguati è partita dalla modifica di materiali sintetici fino ad arrivare all'ottenimento di materiali biologici. Ci sono stati molti tentativi volti a sviluppare un innesto vascolare di piccolo calibro costituito da polimeri sintetici o naturali.

Gli scaffold dovrebbero essere biocompatibili, non trombogenici, non immunogenici e resistenti alle infezioni: dovrebbero indurre una risposta riparativa accettabile che guidi l'integrazione dell'innesto nell'organismo e che non porti a infiammazione, iperplasia o formazione di una capsula fibrosa. Dovrebbero, inoltre, possedere delle adeguate proprietà meccaniche: compliance fisiologica, abilità di resistere a lungo termine agli stress emodinamici senza lacerarsi e non essere

suscettibili alla deformazione permanente responsabile della formazione di aneurismi. Gli scaffold dovrebbero avere un'adeguata permeabilità all'acqua, ai soluti e alle cellule ed esibire proprietà fisiologiche come le risposte di vasocostrizione e vasodilatazione. La maneggevolezza e la facile suturabilità sono proprietà cruciali per la loro applicazione in ambito chirurgico [23]. Le proprietà, precedentemente descritte, possono essere ottenute solo se presenti tre componenti: una struttura biocompatibile con elevata resistenza alla tensione (fibre collagene o analoghi), degli elementi elastici biocompatibili in grado di prevenire il restringimento e la formazione di aneurismi (fibre di elastina o analoghi) e, in fine, un endotelio confluyente e inattivo per prevenire eventi trombotici. Tutte le matrici extracellulari (ECM) sintetiche utilizzate nell'ingegneria tissutale hanno tre compiti principali: in primo luogo, favorire la localizzazione e la diffusione delle cellule in siti specifici dell'organismo, in secondo luogo, definire e conservare la loro struttura tridimensionale per favorire la formazione di un nuovo tessuto con una struttura appropriata e in terzo luogo, guidare lo sviluppo di un nuovo tessuto con una funzione appropriata [24]. Per ora, gli scaffold maggiormente utilizzati in campo sperimentale possono essere ricondotti a 3 categorie principali: protesi vascolari sintetiche permanenti, che comprendono quelle in poliuretano, protesi vascolari sintetiche riassorbibili e scaffold biologici di cui fanno parte innesti allogenici, xenogenici e prodotti derivati.

3.2.1 Protesi vascolari sintetiche permanenti

I materiali polimerici presi in considerazione possono essere naturali (biologici), sintetici o misti.

Inizialmente le protesi vascolari venivano realizzate con polimeri non degradabili quali politetrafluoroetilene espanso (ePTFE o Teflon) e Dacron (polietilene tereftalato, PET). In ambito clinico, questi prodotti hanno dominato il mercato dei sostituti vascolari di grande calibro, tuttavia hanno dimostrato importanti limiti come sostituti di vasi di piccolo calibro. Le caratteristiche principali dei vasi in Teflon sono la superficie luminale elettronegativa e la porosità. Quando sono stati utilizzati come sostituti arteriosi questi vasi artificiali hanno presentato una percentuale di pervietà a 5 anni tra il 91% e il 95%, senza nessun processo di endotelizzazione transanastomotica o transmurale. Una riduzione del tasso di pervietà (45% a 5 anni) si è osservata quando sono stati utilizzati in interventi di bypass femoro-popliteo [25]. Questo dato, di fatto, ha condotto alla limitazione dell'utilizzo del ePTFE come sostituto di vasi di piccolo calibro. I condotti vascolari in Dacron sono usati come sostituti per tratti di aorta ma, se applicati come sostituti di vasi di piccolo calibro, hanno dimostrato una riduzione del tasso di pervietà [26].

Ulteriori approcci sono stati tentati con lo scopo di aumentare il tasso di pervietà a lungo termine delle protesi sintetiche di vasi di piccolo calibro. Uno studio prevedeva la copertura della superficie intraluminale del vaso artificiale con materiale antitrombotico quale l'eparina [27]. Un altro studio descriveva l'applicazione di cellule endoteliali autologhe sulla superficie luminale del vaso artificiale prima dell'impianto [28, 29]. Tuttavia, nei vasi di piccolo calibro l'applicabilità di queste metodiche non è risultata convincente e la ricerca si è focalizzata sull'utilizzo di altri materiali.

3.2.2 Protesi vascolari sintetiche riassorbibili

Queste protesi possono essere costituite da materiale sintetico o biopolimeri contenuti nella matrice extracellulare. In ingegneria tissutale, le ECM esogene possono essere prodotte con due classi di biomateriali: materiali naturali o sintetici.

I materiali naturali, come il collagene, hanno il potenziale vantaggio di formare un'interazione con cellule specifiche. Questi, però, vengono isolati da tessuti umani o animali e quindi non sono disponibili in grandi quantità e presentano, inoltre, delle limitazioni nell'ottenimento di ECM con proprietà specifiche (e.g. resistenza meccanica).

I materiali sintetici, invece, possono essere prodotti in larga scala e permettono di ottenere ECM esogene con macrostruttura, proprietà meccaniche e tempo di degradazione controllabili e modificabili. Il maggior svantaggio dei materiali sintetici è la mancanza di segnali per il riconoscimento cellulare. I biomateriali riassorbibili più comuni sono i poliesteri; questa categoria comprende il poly(α -hydroxyester)-poly(L-lactic acid) (PLLA), il poly(-glycolic acid) (PGA), il Polyhydroxyalkanoate (PHA), il Poly(ϵ -caprolactone) (PCL), il Polydioxanone (PDS), il poliuretano (PU), il Poly(glycolide-co-dioxanone-co-trimethylene carbonate), il Poly(glycerol-sebacate) (PGS), il polylactone polyorthoesters (POE) e i policarbonati.

Il PGA è uno dei primi polimeri biodegradabili usati per la produzione di scaffold [30]. Le proprietà meccaniche e il profilo di degradazione ne fanno un valido candidato per l'ingegneria tissutale vascolare [31]. Per essere utilizzato, questo polimero necessita, però, di un trattamento specifico, poiché, gli scaffold formati esclusivamente da PGA presentano una struttura e delle caratteristiche chimiche inappropriate [32].

Il PLLA presenta una buona resistenza alla tensione e una bassa deformabilità. Il PHA mostra una buona biocompatibilità che lo rende adeguato per la formazione di condotti vascolari; esso sostiene l'adesione e la proliferazione cellulare ma è stato dimostrato essere in grado generare risposte infiammatorie acute prolungate [33].

Il PDS presenta un tasso di riassorbimento più basso, una ridotta risposta infiammatoria, elevate flessibilità e resistenza. Il PU possiede un'ottima resistenza alla tensione ed elevata elasticità [34]; attualmente il suo utilizzo come accesso all'emo-dialisi è stato approvato dalla Food and Drug Administration. È considerato materiale non degradabile ma può andare incontro a processi degradativi ossidativi, idrolitici ed enzimatici [35]. La sua resistenza alla tensione e le sue proprietà elastiche ne facilitano l'utilizzo come scaffold vascolare sebbene abbia anche dimostrato una ridotta compliance e una natura biologica instabile.

Altri polimeri sintetici biodegradabili utilizzabili per la produzione di ECM sintetiche con proprietà modificabili sono i poly(anhydrides) e i poly (orthoesters) [36]. Numerose tecniche sono state sperimentate per migliorare le proprietà di questi scaffold [37, 38].

Tutti questi materiali forniscono uno scaffold temporaneo. Esso, fornendo segnali specifici, induce l'espressione di geni in grado di guidare la crescita cellulare e l'organizzazione di un nuovo tessuto. Quando queste protesi vengono impiantate in vivo, la loro struttura polimerica è soggetta ad un processo di idrolisi ed i prodotti rimanenti (acido lattico, acido glicolico) vengono metabolizzati. È stato dimostrato, in letteratura, che i prodotti di degradazione di questi polimeri possono provocare una risposta infiammatoria [39].

3.2.3 Scaffold biologici

La sostituzione vascolare è considerato il trattamento migliore in numerose patologie. L'aterosclerosi e le arteriti furono descritte, rispettivamente, da Ross nel 1933 e Wilcox nel 1996 [40, 41] e l'insufficienza venosa cronica (CVI) fu descritta da Moriyama nel 2011. Molteplici differenti approcci sono stati studiati per ottenere dei sostituti vascolari maggiormente biocompatibili e duraturi. Lo sviluppo di un TEBV (Tissue-Engineered Blood Vessel) di piccolo calibro, con proprietà meccaniche equivalenti al vaso sostituito, potrebbe rappresentare una potenziale soluzione ai limiti emersi nell'uso innesti di vasi naturali o sintetici di piccolo calibro [42].

Gli scaffold biologici, composti da matrice extracellulare (ECM), derivano tipicamente da processi che includono la decellularizzazione di tessuti o di organi. È auspicabile il mantenimento della complessa composizione e struttura tridimensionale dell'ECM. Tuttavia, è riconosciuto che tutte le metodiche di decellularizzazione portano alla distruzione dell'architettura e alla modificazione della

superficie interna [43]. Una review sulle tecniche di decellularizzazione e i loro effetti sulle proprietà della ECM è stata pubblicata nel 2006 [44].

Questi scaffold possono potenzialmente promuovere e facilitare i processi di “rimodellamento costruttivo”. I meccanismi di cui si avvalgono questi eventi includono il reclutamento e la differenziazione di cellule staminali progenitrici e la modulazione della risposta immunitaria innata [45, 46].

4. Razionale della decellularizzazione della ECM

Gli antigeni cellulari xenogenici e allogenicici sono riconosciuti come estranei dall'ospite e inducono una risposta infiammatoria o un rigetto immuno-mediato del tessuto impiantato. Tuttavia, i componenti della ECM hanno generalmente una struttura conservata nelle varie specie e sono ben tollerati da riceventi xenogenici. L'obiettivo del protocollo di decellularizzazione è quello di rimuovere efficacemente tutto il materiale cellulare e nucleare e, allo stesso tempo, minimizzare gli effetti avversi a carico della composizione, dell'attività biologica e dell'integrità meccanica della ECM residua [44]. Ci sono delle evidenze, in vivo, riguardo la capacità del materiale cellulare residuo di attenuare o impedire del tutto il rimodellamento tessutale degli scaffold biologici. Oltretutto, le metodiche di processazione tissutale, inclusa la decellularizzazione, sono determinanti critiche per il successo clinico dell'innesto [43]. Teoricamente, l'assenza di materiale sintetico potrebbe favorire la completa integrazione dell'innesto nell'organismo e fornire un vaso sanguigno artificiale stabile nel lungo termine. L'innesto allogenicico di matrice acellulare si trasforma gradualmente in un condotto di tessuto autogeno, auto-rigenerante e vitale. Questo processo richiede, in vivo, dopo l'impianto, l'invasione e la crescita all'interno della matrice extracellulare di cellule muscolari lisce e fibroblasti provenienti dal tessuto adiacente. Le proteine strutturali della matrice forniscono uno scaffold acellulare che, prima dell'impianto, può essere ripopolato con successo, in vitro, da cellule autologhe. Questi scaffold hanno anche mostrato la capacità di ripopolarsi in vivo [47] (Fig. 3).



Fig. 3: (a) Visione microscopica di in innesto carotideo decellularizzato 6 settimane dopo l'impianto. Endotelizzazione peri-anastomotica (*) e trombi (freccce) nel tratto mediano. (b) Innesto decellularizzato con aggiunta di cellule endoteliali. (Colorazione del Fattore VIII ed ematosilina-eosina). Cellule endoteliali sulla superficie endoluminale e miofibroblasti nella parete vascolare (freccce). Magnification 1_150. [45]

5. Metodiche di decellularizzazione tissutale

Le metodiche di decellularizzazione descritte includono tecniche meccaniche, chimiche, detergenti ed enzimatiche o delle combinazioni di esse. Per il processo di decellularizzazione tissutale sono stati redatti moltissimi protocolli differenti che utilizzano vari detergenti e metodi. L'efficacia di questo processo dipende da molti fattori quali la cellularità, la densità, il contenuto lipidico e lo spessore del tessuto.

5.1.1 Cicli di congelamento

Questa tecnica prevede il congelamento rapido del tessuto che provoca la formazione intracellulare di cristalli di ghiaccio con conseguente distruzione della membrana cellulare e lisi delle cellule. Il tasso di variazione della temperatura deve essere controllato attentamente per prevenire la formazione di ghiaccio che potrebbe danneggiare la ECM. Il congelamento potrebbe essere adottato come processo per rimuovere il materiale cellulare dai tessuti. Un singolo ciclo di congelamento può ridurre la risposta immune avversa causata dall'infiltrazione leucocitaria degli scaffold vascolari e durante il processo di decellularizzazione possono essere effettuati molti cicli. Questo processo di congelamento produce una minor distruzione dell'ultrastruttura della ECM e può essere usato solo quando questi effetti nel prodotto finale possono essere accettabili [19]. Questa tecnica permette di ridurre al minimo l'ammontare degli agenti chimici richiesti per ottenere l'effettiva decellularizzazione. Suggestivo è l'utilizzo di un *cryoprotectant* quale trealosio al 5% [48].

5.1.2 Agitazione e immersione

Una delle più comuni tecniche usate per la decellularizzazione tissutale prevede l'immersione del tessuto in soluzioni chimiche detergenti e/o enzimatiche e la successiva agitazione meccanica del preparato. La durata di questo processo è dipendente da alcuni fattori quali il grado di agitazione e di distruzione meccanica, la concentrazione e il tipo di agenti chimici/detergenti/enzimi utilizzati e lo spessore e la densità del tessuto. Alcuni dei protocolli richiedono anche l'utilizzo di una endonucleasi (DNAsi e/o RNAsi) per rimuovere gli acidi nucleici residui [49]. Agitazione e perfusione agiscono entrambe facilitando il trasporto delle soluzioni di decellularizzazione alle cellule e rimuovendo i detriti cellulari dal tessuto. Per ottenere lo stesso risultato nei tessuti con geometrie più semplici, è possibile utilizzare metodiche simili, anche se più sofisticate: la pressione statica e il flusso convettivo [50].

5.1.3 Uso della pressione come tecnica di decellularizzazione

Per accelerare e aumentare l'efficacia della diffusione degli agenti di lisi cellulare nel tessuto e per far uscire i detriti dal tessuto stesso possono essere applicati durante il processo di decellularizzazione dei gradienti pressori. Montoya et al. [51], nel loro lavoro, compararono l'utilizzo della perfusione luminale con la sola agitazione meccanica nel processo di

decellularizzazione delle vene ombelicali. Lo studio dimostrò, tramite esame istologico, come il processo basato sull'utilizzo della pressione di un flusso di 50 mL/min applicato ad intervalli con una frequenza di 2 Hz avesse la capacità di rimuovere tutte le cellule dai tessuti. In contrapposizione a questo studio, la tradizionale agitazione rotatoria (100 rpm) dimostrò la presenza residua di intere cellule e componenti cellulari. Questo studio dimostrò inoltre che l'utilizzo di un gradiente pressorio, contrariamente a tecniche di diffusione passiva, aveva minori effetti sulle proprietà meccaniche e sui componenti molecolari dei costrutti di ECM ottenuti. L'utilizzo di un'elevata pressione idrostatica è stato riportato come una metodica in grado di eliminare o ridurre il tempo di esposizione ai detergenti nel processo di decellularizzazione [49]. Funamoto et al. [52] hanno decellularizzato dei vasi sanguigni porcini tramite un processo di immersione in una soluzione salina e una successiva esposizione ad una pressione crescente fino a 980 MPa; la pressione atmosferica naturale è stata poi ristabilita tramite step regolari di riduzione. Sasaki et al. [53], in modo simile, hanno decellularizzato la cornea porcina usando un'elevata pressione idrostatica fino a 1000 MPa. Entrambi gli studi hanno dimostrato che l'utilizzo di una pressione elevata determina una rimozione più efficace dei componenti cellulari rispetto alle metodiche basate sull'utilizzo di detergenti in condizioni atmosferiche normali. Altri studi hanno dimostrato che l'azione di depressurizzazione danneggia le fibre di collagene ed elastina alterando le loro proprietà meccaniche [54].

5.1.4 Utilizzo di fluidi supercritici per la decellularizzazione

Una metodica di decellularizzazione tissutale, descritta recentemente, si basa sull'unica proprietà dei fluidi supercritici. La loro ridotta viscosità e le elevate caratteristiche di trasporto permettono la realizzazione di protocolli semplici e veloci. Il vantaggio principale della decellularizzazione con fluidi supercritici è l'utilizzo di una sostanza inerte (e.g., diossido di carbonio) per la rimozione di cellule e per minimizzare l'alterazione delle proprietà meccaniche della ECM. Il diossido di carbonio forma ad un fluido critico se sottoposto a condizioni fisiche moderate (temperatura di 32°C e pressione di 7.4 MPa) ed è stato dimostrato essere in grado di rimuovere le cellule dal tessuto aortico dopo soli 15 minuti di esposizione quando aggiunto ad una soluzione di etanolo. La diffusione del campo di applicazione dei fluidi supercritici per la decellularizzazione di altri tessuti deve ancora essere determinata [49].

5.1.5 Elettroporazione irreversibile non termica (NTIRE)

La NTIRE è stata sperimentata come approccio per la decellularizzazione tissutale. Questa tecnica utilizza pulsazioni elettriche della durata di microsecondi, applicate attraverso il tessuto e le cellule

residenti, che inducono la formazione di micropori nella membrana cellulare destabilizzando il potenziale elettrico ai due lati della membrana.

La presenza dei micropori causa la perdita dell'omeostasi e porta alla morte cellulare. La NTIRE presenta alcuni limiti. Le sonde utilizzate sono relativamente piccole e questo riduce la dimensione del tessuto che può essere decellularizzato [43].

5.2 *Metodiche chimiche e biologiche*

Varie sostanze chimiche sono state testate per la loro abilità nella decellularizzazione tissutale. Queste, generalmente, sono selezionate in base alla loro capacità di rendere solubili le membrane cellulari e di ricavare i componenti cellulari dal tessuto attraverso l'agitazione e la perfusione. Le sostanze chimiche fanno parte di varie categorie: detergenti, soluzioni acide o alcaline, soluzioni ioniche [50].

5.2.1 *Trattamenti con acidi e alcali*

Questi trattamenti sono utilizzati in protocolli di decellularizzazione per solubilizzare il contenuto citoplasmatico delle cellule e permettere la rimozione di acidi nucleici quali RNA e DNA. Per esempio, l'acido acetico, l'acido peracetico (PAA), l'acido idroclorico, l'acido sulfurico e l'idrossido di ammonio (NH_4OH) possono distruggere efficacemente le membrane cellulari e gli organelli intracellulari [44]. Soluzioni con pH estremo possono incrementare l'efficacia della rimozione cellulare ma possono, anche, determinare alterazioni sostanziali dei costituenti della ECM. L'utilizzo di soluzioni acide o alcaline durante la decellularizzazione richiede un approccio bilanciato per ottenere una decellularizzazione efficace senza deterioramento dei componenti della ECM [50]. Gli agenti alcalini comunemente utilizzati includono idrossido di ammonio, solfito di sodio, idrossido di sodio e idrossido di calcio, essi sono in grado di denaturare il DNA cromosomale e plasmidico e i componenti strutturali della matrice comprendenti i vari tipi di collagene [55, 56]. Alcuni composti sono stati usati per la decellularizzazione di tessuti densi come il derma. L'utilizzo di basi nella procedura di decellularizzazione può eliminare i fattori di crescita dalla ECM ottenuta e ridurre le proprietà meccaniche degli scaffold di ECM dermica. Gli acidi sono utilizzati per rimuovere il DNA dalla ECM attraverso la solubilizzazione dei componenti citoplasmatici e la distruzione degli acidi nucleici. Gli acidi possono, inoltre, denaturare le proteine dell'ECM che includono GAG, collagene e fattori di crescita. È importante ottimizzare la dose e il tempo di esposizione agli acidi. Quelli più comunemente utilizzati per il processo di decellularizzazione sono l'acido desossicolico e l'acido acetico. Quest'ultimo, tuttavia, può causare danno e rimozione di collagene dalla ECM con una corrispettiva riduzione dello spessore del tessuto.

5.2.2 Detergenti non ionici

I detergenti non ionici sono stati estesamente utilizzati nei protocolli di decellularizzazione per i loro relativamente lievi effetti nei confronti della struttura tissutale. Essi rompono le interazioni lipide-lipide e lipide-proteina ma lasciano intatte quelle proteina-proteina, responsabili della conformazione funzionale proteica. Triton X-100 è il detergente non ionico più diffusamente utilizzato nei protocolli di decellularizzazione [44]. Le differenze nella densità e nella cellularità del tessuto richiedono processi di decellularizzazione specifici [57, 58].

5.2.3 Detergenti ionici

I detergenti ionici sono efficaci nel solubilizzare sia le membrane citoplasmatiche che quelle nucleari, ma tendono a denaturare le proteine rompendo le interazioni proteina-proteina. I detergenti ionici più comunemente utilizzati sono in sodio dodecil-solfato (SDS), il desossicolato di sodio e il Triton X-200.

L'SDS è molto efficace nel rimuovere la componente cellulare dal tessuto ed è comunemente utilizzato per denaturare e svelare le proteine per l'elettroforesi in gel di poliacrilamide (SDS-PAGE). Quando utilizzato nelle procedure di decellularizzazione potrebbe rompere i legami covalenti tra proteine. L'SDS tende a distruggere la struttura del tessuto nativo, causando la riduzione della concentrazione dei GAG e la perdita dell'integrità del collagene. Per minimizzare gli effetti avversi a carico dei costituenti della matrice residua, i protocolli che utilizzano l'SDS dovrebbero, idealmente, servirsi di multipli lavaggi a bassa concentrazione con ridotto tempo di esposizione all'agente o ridotta temperatura. L'SDS risulta difficile da rimuovere completamente dalla matrice residua e può compromettere la citocompatibilità.

Il desossicolato di sodio è molto efficace nel rimuovere le cellule rimanenti, ma tende a causare la distruzione dell'architettura del tessuto nativo in misura maggiore rispetto all'SDS. Esso è stato combinato con diversi detergenti zwitterionici o Triton X-200.

5.2.4 Detergenti zwitterionici

I detergenti switterionici esibiscono le proprietà sia dei detergenti non ionici che di quelli ionici. I detergenti switterionici hanno la tendenza a denaturare le proteine come quelli non ionici. Alcuni di questi sono il 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), che è stato studiato per la decellularizzazione dei vasi sanguigni e il sulfobetaine-10 (SB-10) e il -16 (SB-16), usati per la decellularizzazione dei nervi [44]. Il tessuto arterioso trattato con CHAPS mantiene, istologicamente, una normale morfologia del collagene e dell'elastina e anche il contenuto di collagene sembra rimanere simile a quello dell'arteria nativa.

Se le membrane cellulari sono permeabili, i gruppi idrossilici polari degli alcoli possono diffondere dentro le cellule dove sostituiscono l'acqua intracellulare e lisano la cellula tramite disidratazione. L'etanolo o il metanolo possono essere usati nel lavaggio finale per rimuovere gli acidi nucleici dal tessuto. Tuttavia, Levy et al. dimostrarono come il pretrattamento del tessuto con etanolo alterasse la struttura del collagene causando il crosslinking della ECM.

5.2.6 *Tri (n-butil) fosfato (TBP)*

Il TBP è un solvente organico usato per inattivare i virus nel sangue senza compromettere l'attività dei fattori della coagulazione. Esso rompe le interazioni proteina-proteina. Sembra essere un agente chemotropico promettente per il processo di decellularizzazione poiché possiede un effetto minimo sul comportamento meccanico dell'ECM ed è, quindi, degno di ulteriore studio.

5.2.7 *Trattamento con sostanze ipotoniche e ipertoniche*

Lo shock osmotico con una soluzione ipotonica o ipertonica quali l'acqua deionizzata o soluzioni a bassa concentrazione ionica è usato per lisare le cellule dei tessuti e degli organi. Il trattamento con una soluzione ipotonica seguito da uno con una soluzione ipertonica può causare la lisi cellulare, ma non permette la rimozione dei residui cellulari dal tessuto: sono quindi necessari Trattamenti enzimatici o chimici aggiuntivi per facilitare la rimozione dei detriti.

5.2.8 *Agenti chelanti*

L'acido etilendiaminotetracetico (EDTA) e l'acido etilenglicoltetracetico (EGTA) facilitano la rimozione del materiale cellulare dal tessuto attraverso il legame dei cationi bivalenti presenti nelle cellule adese alla ECM. L'EDTA è tipicamente usato in combinazione con la tripsina per assicurare la completa rimozione dei nuclei cellulari risparmiando i componenti più importanti della ECM.

5.3 *Metodiche enzimatiche*

Gli agenti enzimatici includono proteasi (e.g. tripsina, dispasi), esterasi (fosfolipasi A2) e nucleasi (e.g. DNAsi, RNAsi). Essi sono vantaggiosi per la loro specificità per i vari substrati biologici. La tripsina è l'enzima più specifico, essa spezza i legami peptidici nel lato carbossilico dell'arginina e della lisina a meno che l'aa successivo non sia una prolina. Le endonucleasi catalizzano l'idrolisi dei legami interni delle catene ribonucleiche o desossiribonucleiche, mentre le esonucleasi

catalizzano l'idrolisi dei legami terminali, guidando la degradazione finale dall'RNA e del DNA. Le metodiche enzimatiche non sono prive di effetti avversi sui componenti extracellulari di tessuti e organi [44].

5.4 *Inibitori di proteasi*

Durante l'applicazione di protocolli di decellularizzazione, dalle cellule distrutte possono essere rilasciate numerose proteasi. Per i trattamenti chimici di lunga durata, la presenza di proteasi può causare il danneggiamento dell'ultrastruttura della ECM nativa. Per questa ragione, potrebbe essere opportuno includere degli inibitori di proteasi quali il fenilmetilsulfonilfluoride (PMSF), l'aprotinina e la leupeptina alle soluzioni in cui il tessuto si trova immerso. L'utilizzo di una soluzione tampone a pH 7-8 aumenta l'effetto degli inibitori delle proteasi. Il controllo della temperatura e del tempo di esposizione alle soluzioni litiche può limitare l'attività delle proteasi [44].

5.5 *Antibiotici*

Una preoccupazione per le metodiche di decellularizzazione di lunga durata è la presenza di batteri che possono contaminare la ECM residua. Numerosi protocolli hanno incluso soluzioni di antibiotici quali penicillina, streptomina o anfotericina B.

6. Tessuti decellularizzati attualmente impiegati nella pratica clinica

Le tecniche descritte per ottenere la decellularizzazione di tessuti biointegrabili sono attualmente già impiegate nella pratica clinica per ottenere delle matrici impiantabili in alcuni campi ricostruttivi. In particolare i settori di impiego principale di questi tessuti sono : la chirurgia ricostruttiva mammaria e la chirurgia addominale. Attualmente, infatti, in commercio, sono distribuite diverse matrici che si differenziano sostanzialmente per : spessore, presenza di legami strutturali che ne aumentano la resistenza tensile (cross-link) e l'origine animale (bovina, suina, equina). Le procedure di decellularizzazione, coperte da specifici brevetti, rientrano principalmente nell'ambito delle procedure di tipo enzimatico o fisico-chimico, precedentemente descritte. Le matrici a spessore minore, facilmente integrabili e che necessitano di minore resistenza tensile sono impiegate nella ricostruzione mammaria in tempo unico , rivestendo le protesi o gli espansori, mentre le matrici a maggior resistenza sono impiegate in chirurgia addominale per la ricostruzione della parete muscolare (laparotomie con perdita di tessuto, eviscerazioni ecc.). I processi fisico-chimici determinano la presenza o meno di contaminanti che determina la qualità dell'integrazione e l'insorgenza di fenomeno reattivo-infiammatori o sieromi piu' o meno evidenti nel tessuto ricevente.

7. Innesti decellularizzati con o senza aggiunta cellulare

La matrice cellulare è un complesso aggregato di componenti glicoproteici formati da numerose e differenti macromolecole. La sua integrità strutturale e composizione funzionale è importante per conservare la normale architettura tissutale. Queste proteine della matrice strutturale formano uno scaffold acellulare il quale può essere ripopolato con successo in vitro, prima del suo impianto, con cellule autologhe del ricevente. Questi scaffold hanno, inoltre, dimostrato la capacità di ripopolarsi in vivo. La ricellularizzazione, in vitro, di innesti xenogenici con cellule umane autologhe rappresenta un campo di ricerca molto attivo [60, 61, 62, 63]. Goldstein e colleghi come anche Clarke e i suoi collaboratori presentarono i loro risultati sperimentali e clinici sugli innesti di piccolo calibro non precedentemente sottoposti a processi di ricellularizzazione in vitro [64]. L'Heureux e i suoi collaboratori descrissero un approccio innovativo per i vasi sanguigni bio-ingegnerizzati basato esclusivamente sull'utilizzo di cellule umane in coltura senza biomateriali sintetici o xenogenici [65]. L'utilizzo innovativo di cellule staminali ha spalancato nuove frontiere per gli innesti vascolari completamente ingegnerizzati [66]. Altri articoli descrivono l'utilizzo di innesti creati completamente da tessuto biologico ingegnerizzato [67, 68, 69, 70, 71, 72]. L'utilizzo di questo tipo di vasi ingegnerizzati risulta utile solo per pazienti sottoposti ad interventi programmati e non per i casi in cui si necessita di procedure di ricostruzione vascolare immediata, a causa dell'impossibilità di ottenere una ricellularizzazione in breve tempo.

Un campo di ricerca alternativo è la bio-ingegnerizzazione di innesti con la copertura della superficie interna dei vasi per mezzo di fattori di crescita angiogenetici, con lo scopo di promuovere i processi di migrazione e proliferazione delle EC determinando così una ricellularizzazione in vivo. Il possibile utilizzo dei fattori di crescita distribuiti sulla superficie interna degli innesti vascolari decellularizzati è stato recentemente descritto da Conklin et al. [73]. Molteplici fattori di crescita hanno la capacità di stimolare, dirigere o controllare il processo di angiogenesi. In particolare, è stato dimostrato in numerosi studi che l'infusione con il gene del VEGF o la proteina stessa determina un incremento della re-endotelizzazione [74].

8. Utilizzo clinico dei sostituti vascolari

Globalmente, le malattie cardiovascolari si classificano in testa per quanto riguarda le cause di morte. Nel caso di occlusioni prossimali delle arterie coronarie, attualmente, i by-pass autologhi arteriosi e venosi rappresentano l'unica efficace scelta terapeutica (Fig. 4). Nel caso di occlusioni più distali, dove il calibro vascolare si riduce, questa soluzione risulta di difficile realizzazione. Per le patologie vascolari che colpiscono vasi di medio e grande calibro esistono soluzioni terapeutiche sostitutive valide e correntemente utilizzate: oltre agli innesti vascolari autologhi, il più delle volte realizzati con l'utilizzo della vena grande safena, sono usate, ormai da molti anni nella pratica

clinica, protesi vascolari sintetiche in materiale non assorbibile (Fig. 5). In molti campi, quali la cardiocirurgia e la chirurgia vascolare, i sostituti vascolari protesici sono utilizzati quotidianamente. Le protesi di medio e grosso calibro vengono usate per sostituire l'aorta e le sue diramazioni, cioè le arterie che originano dall'arco aortico e dalle arterie iliache. La velocità del flusso ematico, nei vasi di medio e grosso calibro, è elevata e solo una piccola percentuale di sangue che fluisce attraverso il vaso viene a contatto con la parete, per cui i fenomeni trombotici sono meno drammatici di quelli riscontrabili in innesti di calibro minore. Anche nella chirurgia plastica, i sostituti vascolari sono fondamentali nella riuscita di interventi ricostruttivi complessi eseguiti in seguito a traumi o ad asportazioni radicali per motivi oncologici (Fig. 6). Se per i vasi di maggior calibro, quindi, esistono molteplici possibilità di sostituzione, per i vasi di piccolo calibro (DI < 6 mm) le scelte terapeutiche sono più limitate.

In caso di ricostruzioni che coinvolgono piccoli vasi, il primo approccio utilizzato è l'innesto autologo, realizzato con condotti venosi anche di piccolo calibro presenti nelle vicinanze del sito traumatizzato o prelevati da altre sedi (vena safena). Il ripristino dei condotti arteriosi con l'utilizzo di innesti venosi, però, espone questi ultimi ad un flusso e una pressione che porta a modifiche strutturali della parete fino allo sviluppo di una iperplasia intimale. L'ispessimento della parete con riduzione del lume, accoppiato ad alterazioni dell'endotelio, porta all'ischemia cronica del tessuto a valle dell'innesto e a possibili episodi di trombosi (Fig. 7). In letteratura sono stati descritti numerosi sostituti vascolari di piccolo calibro di vari materiali ma, attualmente, la sperimentazione è limitata esclusivamente a modelli animali. Notevole è il potenziale beneficio fornito dagli scaffold biologici nella sostituzione e nella ricostruzione dei tessuti e degli organi danneggiati o persi. Tuttavia, gli effetti di questi materiali sul reclutamento delle cellule staminali/progenitrici e sulla risposta immunitaria sono dipendenti dalla metodica utilizzata per la loro creazione. Un sogno nel campo dell'ingegneria tissutale vascolare sarebbe quello di ottenere un innesto vascolare che possa resistere alla trombosi formando un endotelio luminale confluyente, che possieda proprietà meccaniche adatte e che, in vivo, possa essere sostituito da neovasi. Ricerche pionieristiche in questo campo potranno definitivamente aiutare a chiarire le potenzialità degli innesti di vasi di piccolo calibro ottenuti tramite l'ingegneria tissutale e indirizzare questa tecnologia all'applicazione clinica.

Fig. 4: By-pass autologhi

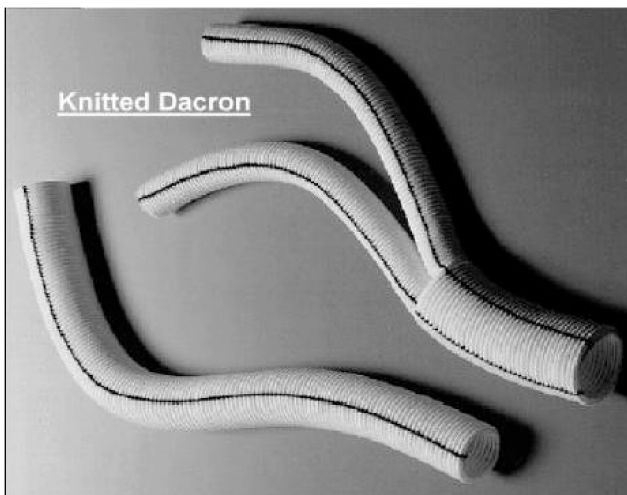
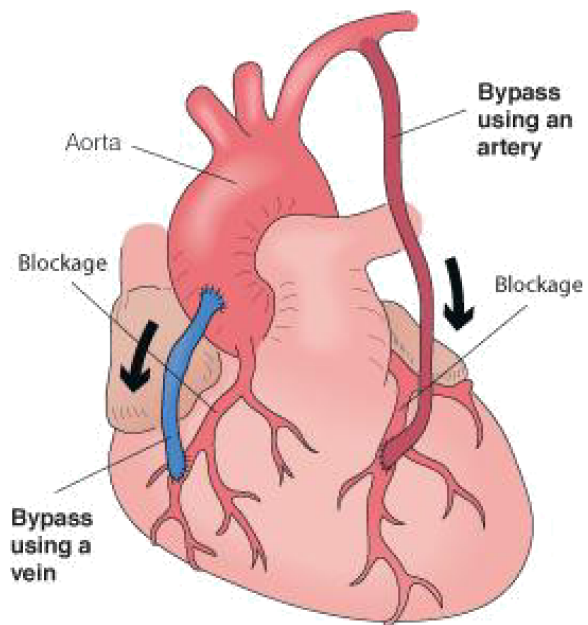


Fig. 5: Protesi vascolari sintetiche permanenti



Fig. 6: Mano traumatizzata con lesione vascolare a multipli livelli.



Fig. 7: Fallimento di reimpianto di pollice per trombosi dell'innesto venoso autologo .

I tessuti vascolari necessari alla sperimentazione sono stati ottenuti, previo consenso dei pazienti, mediante prelievo di tessuti da parte amputate non reimpiantabili o che i pazienti medesimi non volevano reimpiantare e destinate, altrimenti, allo smaltimento (Fig.8A). I tessuti venivano selezionati al microscopio per valutarne l'integrità e la candidabilità ad un processo di decellularizzazione efficace (Fig.8B). Complessivamente è stato possibile ottenere due arterie e due vene di piccolo calibro, divise in due metà ed inviate al processo di decellularizzazione. La prima metà veniva poi sottoposta a test in vitro e meccanici per saggiare la qualità e l'efficacia della decellularizzazione. La seconda metà era utilizzata per il test di impianto in vivo. Come controlli sono state utilizzate tre protesi vascolari in materiale sintetico riassorbibile (collagene) che a loro volta sono state impiantate in altre cavie animali (Fig.8C).



Fig 8: A) Trauma da schiacciamento privo di indicazioni per intervento microchirurgico. A bis: amputazione V dito con rifiuto al reimpianto B) Tratto di arteria digitale non danneggiata ricavata dalla parte avulsa e preparata per la decellularizzazione rimuovendo microchirurgicamente i tessuti non necessari perivasali. C) Scaffold vascolare bioingegnerizzato in collagene.

Parte 1 - sperimentazione in vitro

Ai fini della trasposizione clinica era necessario valutare a priori la qualità del processo di decellularizzazione condotto per accertarne l'assenza di immunogenicità e la conservazione della struttura ECM fondamentale alla ricellularizzazione in vivo, mantenendo al contempo intatte le proprietà fisiche ultrastrutturali. A tal fine si è modificato un protocollo presente in letteratura con tempi di processazione lievemente più lunghi al fine di una minore traumaticità sui vasi medesimi dato il piccolo calibro e si è provveduto ad una serie di test di tipo istologico, immunoistochimico, di quantizzazione del DNA residuo e test di resistenza meccanica.

Processo di decellularizzazione

Dopo l'isolamento, entrambe le arterie e le vene sono state sottoposte ad un adattamento del protocollo di decellularizzazione proposto da Sheridan nel 2012 con lo scopo di rimuovere tutti gli elementi cellulari, conservando la composizione e l'integrità strutturale della matrice extracellulare (ECM) [55] (Tab. 1). I vasi sono stati lavati con acqua ultra pura in un agitatore a 120 rpm per 2 giorni, sottoposti ad un ulteriore lavaggio con acqua ultra pura durante la notte, trattati con tripsina/EDTA allo 0.25% a 37°C per 2 ore, Triton X-100 per 5 giorni a temperatura ambiente, DNase per 3 ore a 37°C e successivamente lavati con acqua ultra pura per 2 giorni.

Analisi morfologiche, immunoistochimiche e ultrastrutturali

Sia sui vasi nativi che sui campioni di vasi decellularizzati sono state eseguite analisi morfologiche (colorazione con ematossilina-eosina, Azan Mallory, Van Gieson e DAPI), immunoistochimiche (Ab anti α -actina della cellula muscolare liscia), ultrastrutturali (Transmission Electron Microscopy, TEM) e analisi quantitative del DNA (spettrofotometria).

Decellularization Protocol

(Sheridan et al., 2012)

- wash with ultrapure water for 2 days with shaking at 120 rpm.
- wash with ultrapure water overnight
- 0.25% **Trypsin/EDTA**, at 37°C for 2 hours
- 1% **Triton X-100** for 5 days at room temperature
- DNase for 3 hours at 37°C
- washed with ultrapure water for 2 days

Tab. 1: adattamento del protocollo di decellularizzazione di Sheridan.

Parte 2 – Sperimentazione in vivo

In accordo con il protocollo di Helsinki per gli studi animali e dopo l'approvazione del Comitato Etico di Ateneo per la Sperimentazione Animale (CEASA), sette conigli maschi adulti di razza New Zealand con un peso tra 3.5 e 4.5 kg sono stati sottoposti ad anestesia generale gassosa con isofluorano per permettere la dissezione dei loro vasi femorali (diametro < 1 mm). Tutte le procedure sono state fatte in ambiente sterile e con ferri chirurgici sterili. Ciascun coniglio è stato sottoposto ad iniezione intramuscolare di Zoletil 40 mg/Kg e Altadol (tramadolo) come pre-anestesia, prima dell'intervento (Fig. 9). Tutte le procedure venivano condotte mediante magnificazione con microscopio operatorio ZEISS OPM1 4.5X in campo sterile (Fig.10)



Fig. 9: Coniglio New Zealand sottoposto ad anestesia generale e depilazione del sito chirurgico.



Fig.10 : Conduzione dell'impianto microchirurgico

Approccio chirurgico per l'innesto venoso

Dopo profonda sedazione con isofluorano e adeguata depilazione e disinfezione con betadine del sito chirurgico, è stata fatta un'incisione a livello prossimale della zampa del coniglio. Sono stati identificati i vasi e il nervo femorale ed è stata isolata la vena. Dopo l'isolamento, la vena femorale è stata clampata e sezionata a livello del punto medio. Sotto ingrandimento microscopico, la vena umana decellularizzata è stata impiantata coll doppia anastomosi termino-terminale tramite una sutura a punti staccati con prolene 10/0 (Fig. 11). Dopo la rimozione del clamp sono stati testati il flusso sanguigno e la pervietà dell'anastomosi con il Milking text al tempo 0 e dopo 10 e 20 minuti e quindi il sito chirurgico è stato suturato.

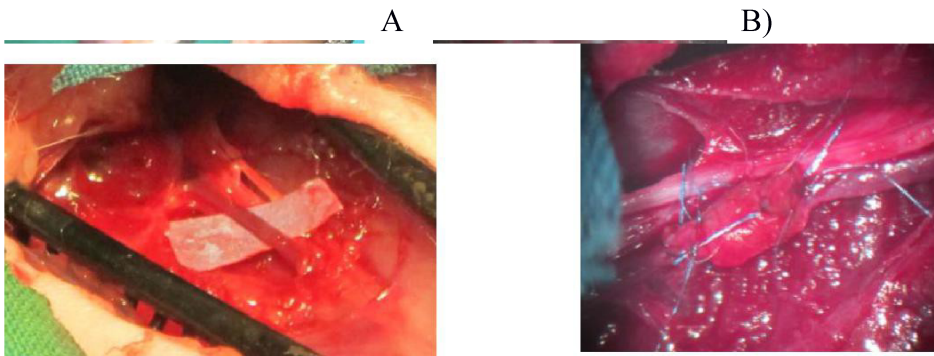


Fig 11: A) Sezione nel punto medio della vena femorale del coniglio. B) Impianto della vena umana decellularizzata sulla vena femorale del coniglio..

Approccio chirurgico per l'innesto arterioso

La medesima procedura chirurgica è stata effettuata per l'impianto dell'arteria umana decellularizzata dopo isolamento, clampaggio e sezione dell'arteria femorale del coniglio (Fig 12).

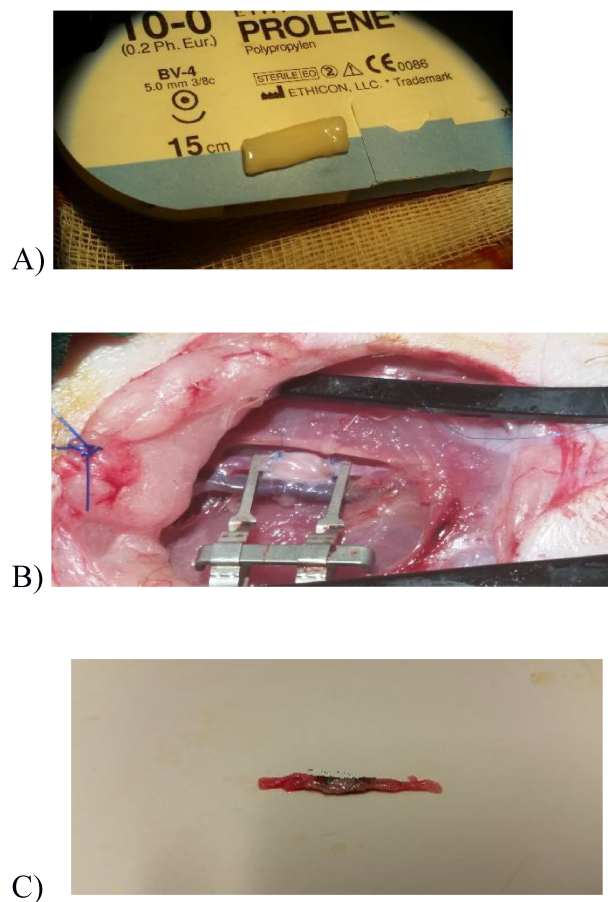


Fig 12: A) Arteria umana decellularizzata prima dell'impianto. B) Impianto microchirurgico nell'arteria femorale del coniglio. C) Sacrificio dopo due settimane. Biointegrazione dell'innesto arterioso.

Preparazione e impianto delle protesi vascolari sintetiche riassorbibili

Le protesi vascolari sintetiche riassorbibili con diametro di 2 mm, realizzate in collagene su nostra indicazione da parte di un'azienda tedesca (Viscofan Bioengineering), sono state sottoposte ad un processo di reidratazione e detossificazione in soluzione fisiologica e mantenute in soluzione di coltura per circa 3 ore prima del loro impianto nell'animale (Fig 13). Ognuno di questi vasi protesici è stato anastomizzato all'arteria femorale di un coniglio con lo stesso procedimento seguito per l'impianto degli scaffold arteriosi (Fig. 14).

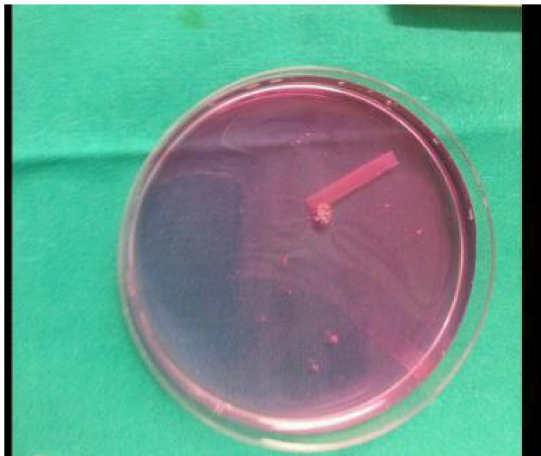


Fig 13: reidratazione e detossificazione della protesi.

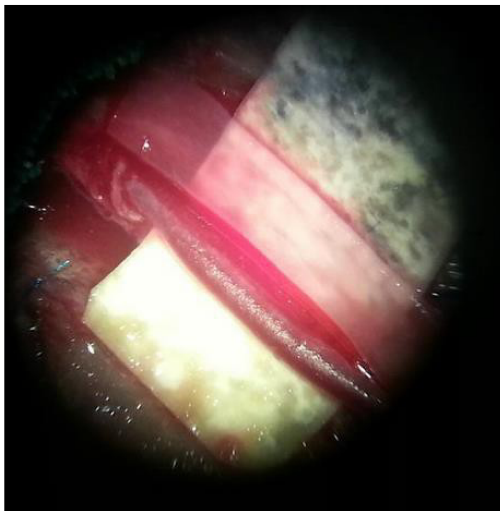


Fig 14: impianto microchirurgico della protesi vascolare

Procedura post-intervento chirurgico

I conigli, nel post-operatorio, sono stati costantemente seguiti e monitorati con la consulenza del Servizio Veterinario Centralizzato d'Ateneo e, se necessario, trattati con analgesico (Tramadolo, Contramal secondo i dosaggi riportati in base al peso dell'animale) con un'iniezione ogni 8 ore durante le 24 ore post-operatorie. Qualora le condizioni degli animali abbiano richiesto altro analgesico si è utilizzato il Rimadyl 5 mg/Kg (Caprofen-FANS). Gli animali con gli innesti decellularizzati sono stati sacrificati a tempi diversi: 10 e 40 giorni per le arterie, trenta giorni per le vene e gli impianti sintetici, tutti mediante eccesso di anestesia secondo l'American Veterinary Medical Association (AVMA PANEL). Gli animali sottoposti agli impianti decellularizzati venivano altresì testati con esame ecodoppler condotto sotto anestesia generale dopo 5, 15 e 30 giorni per le vene e dopo 5 e 10 giorni per l'arteria sacrificata a 10 giorni e 5, 15 e 40 giorni per l'arteria sacrificata a 40 giorni. Dopo il sacrificio degli animali, il sito di impianto è stato sottoposto ad esposizione chirurgica, prelievi biotici e raccolta di documentazione fotografica. I prelievi sono stati inviati al laboratorio per le indagini istologiche (colorazione con ematossilina-eosina, Azan Mallory e Van Gieson) ed immunoistochimiche (Ab anti-CD31, Ab anti-CD3). L'arteria a 40 giorni di impianto era sottoposta a studio specifico sulla neo endotelizzazione.

10. Risultati

Fase 1 – sperimentazione in vitro

Varie colorazioni istologiche sono state utilizzate nelle analisi morfologiche per verificare l'efficacia del processo di decellularizzazione e l'integrità della componente collagenica ed elastica della matrice extracellulare. Dimostrare una efficace rimozione cellulare con preservazione dell'ultrastruttura collagenica dei vasi è *conditio sine qua non* per due aspetti fondamentali del sostituto vascolare ovvero la capacità di integrazione in vivo e la resistenza meccanica al flusso, con

preservazione inoltre delle strutture di membrana della ECM necessarie alla endotelizzazione. La colorazione in Ematossilina-Eosina ha dimostrato la riuscita del processo di decellularizzazione. Comparando le analisi istologiche dei vasi nativi e dei vasi decellularizzati, si è visto che nei secondi, tutte le cellule endoteliali e muscolari lisce sono state rimosse. Le tonache intima, media ed avventizia sono rimaste riconoscibili dopo il processo di decellularizzazione (Fig.15). Le analisi morfologiche hanno mostrato la riduzione dello spessore della parete dei vasi decellularizzati rispetto a quello dei vasi nativi. Quest'ultimo aspetto è da considerarsi come positivo per una migliore ricellularizzazione in vivo (Fig. 16)

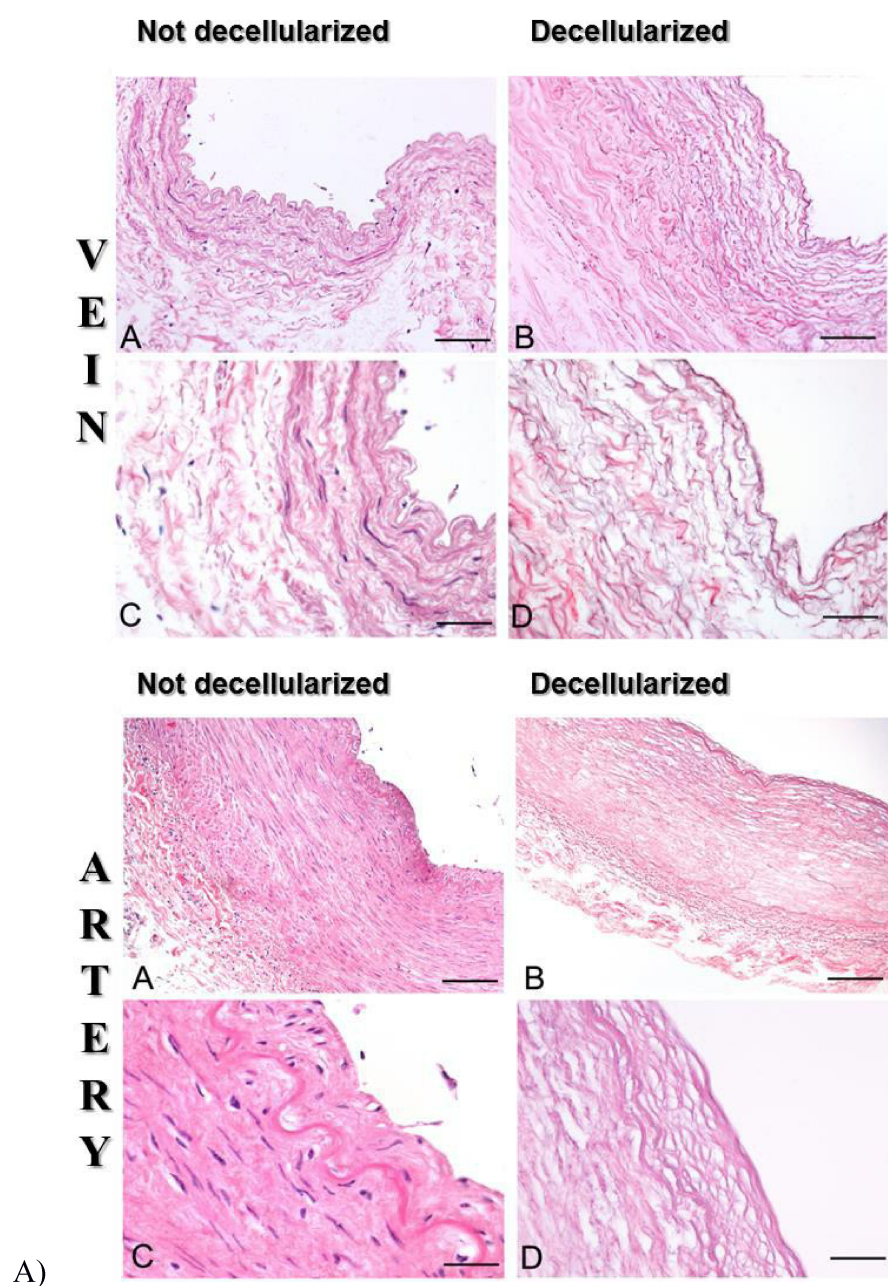


Fig. 15: A) Scomparsa degli elementi nucleari e citoplasmatici delle cellule endoteliali e muscolari lisce: conservazione dell'architettura 3D e mantenimento del lume e delle pareti vascolari (H&E).

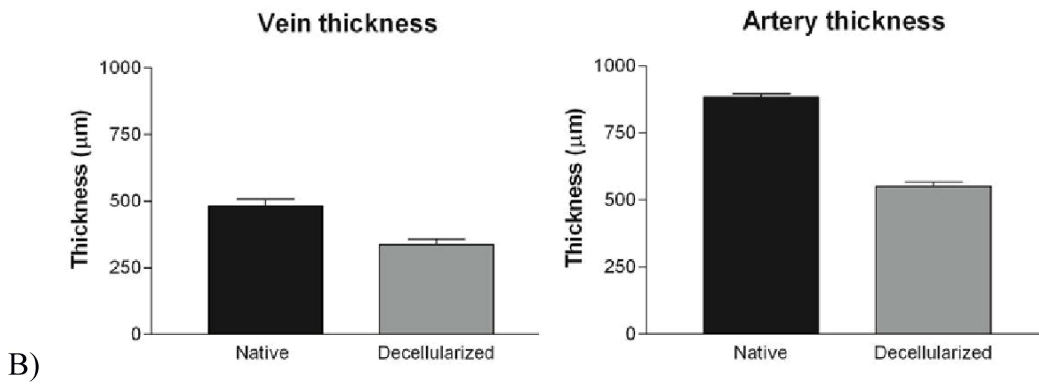
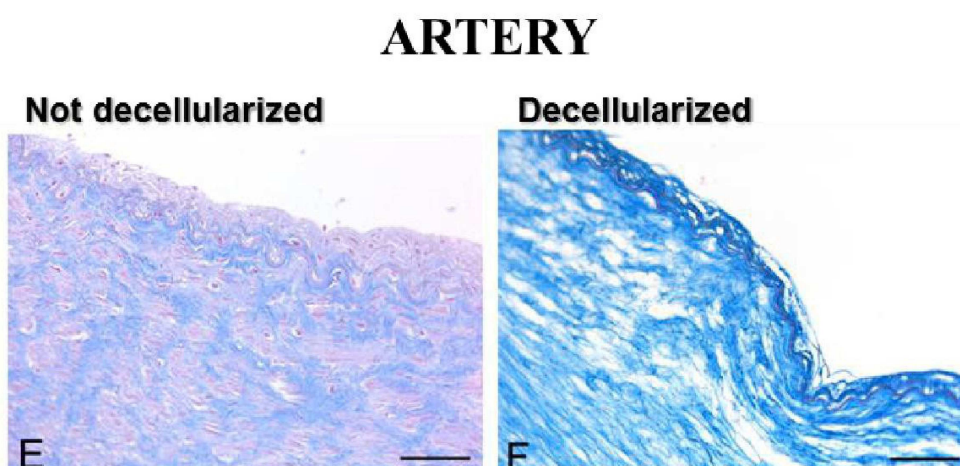
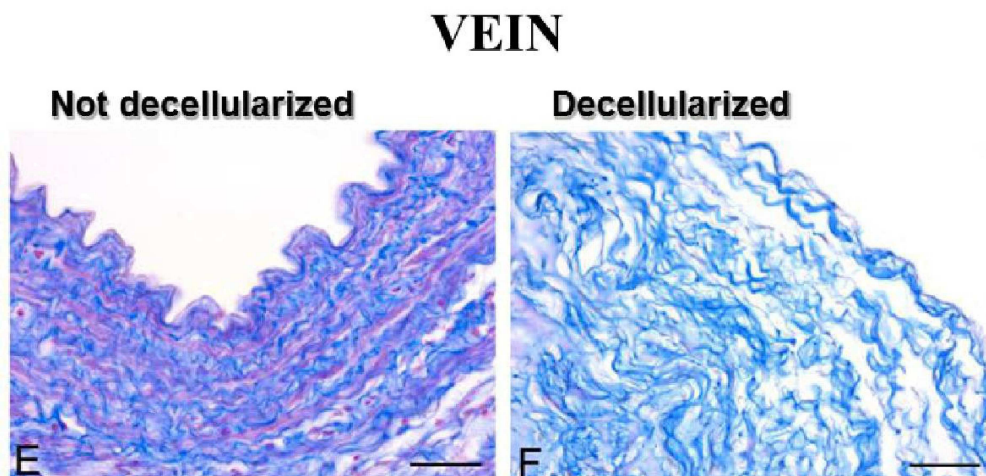


Fig. 16: B) Riduzione dello spessore della parete dei vasi decellularizzati rispetto a quello dei vasi nativi.

AZAN MALLORY :

La colorazione di Azan-Mallory , specifica per le fibre collagene,, ha evidenziato la persistenza dei componenti della matrice extracellulare sia nelle vene che nelle arterie decellularizzate. Le fibre collagene sono evidenti in tutti gli strati della parete vascolare con maggiore abbondanza nelle tonache media ed avventizia. (Fig. 17)



VEIN

Not decellularized

Decellularized

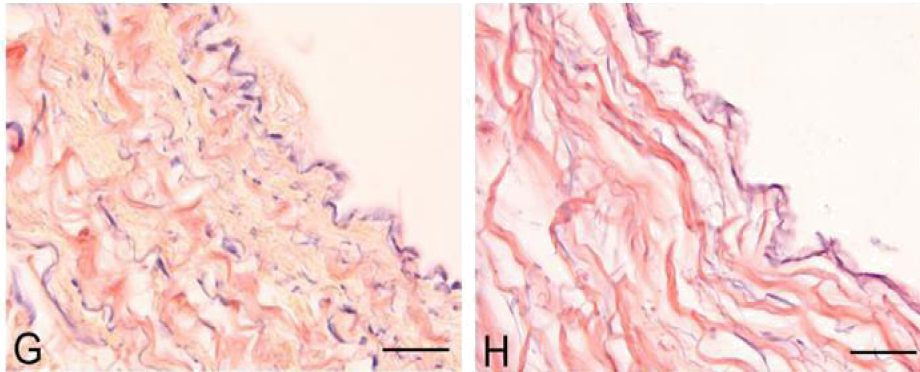


Fig. 17: Persistenza delle fibre collagene (in blu) e scomparsa delle cellule muscolari lisce (in rosso) nella rete della matrice extracellulare (Azan-Mallory).

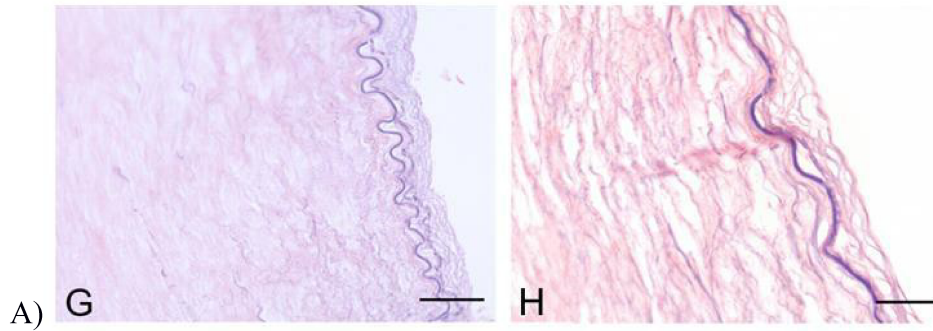
VAN GIESON :

Le analisi morfologiche con colorazione di Van Gieson, specifica per le fibre elastiche, hanno dimostrato, dopo il processo di decellularizzazione, la conservazione delle fibre elastiche dell'intima vascolare. Dato dimostrato attraverso analisi morfologiche (Fig. 18).

ARTERY

Not decellularized

Decellularized



39

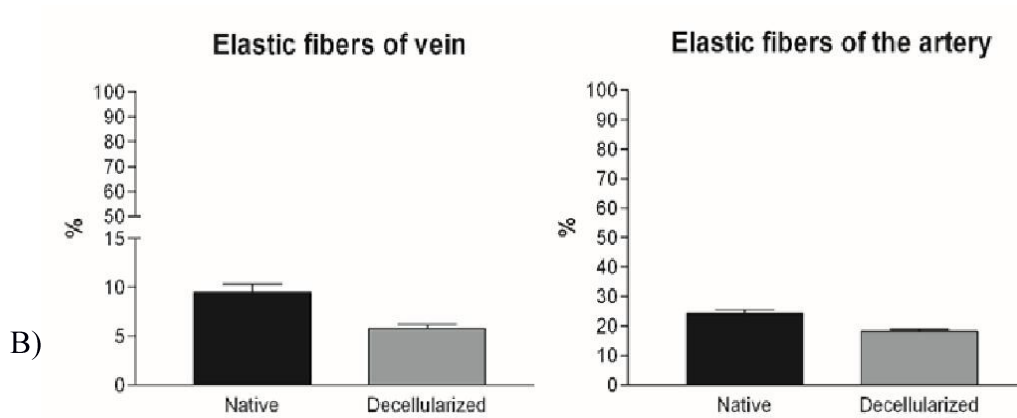


Fig. 18: A) Persistenza delle fibre elastiche (in violetto) dopo il processo di decellularizzazione (Van Gieson). B) Percentuale di fibre elastiche presenti rispettivamente nelle vene native e in quelle decellularizzate e nelle arterie native e in quelle decellularizzate.

ANALISI QUANTITATIVA DEL DNA :

Le analisi con la colorazione DAPI e la valutazione quantitativa del DNA con la spettrofotometria hanno confermato la rimozione completa dei componenti nucleari negli scaffold umani dopo il processo di decellularizzazione (Fig.19). Per considerare ottimo il processo di decellularizzazione è necessario ottenere alla spettrofotometria un valore di dsDNA inferiore a 50 ng per mg di tessuto secco , così come ottenuto nel processo da noi realizzato (Fig. 20).

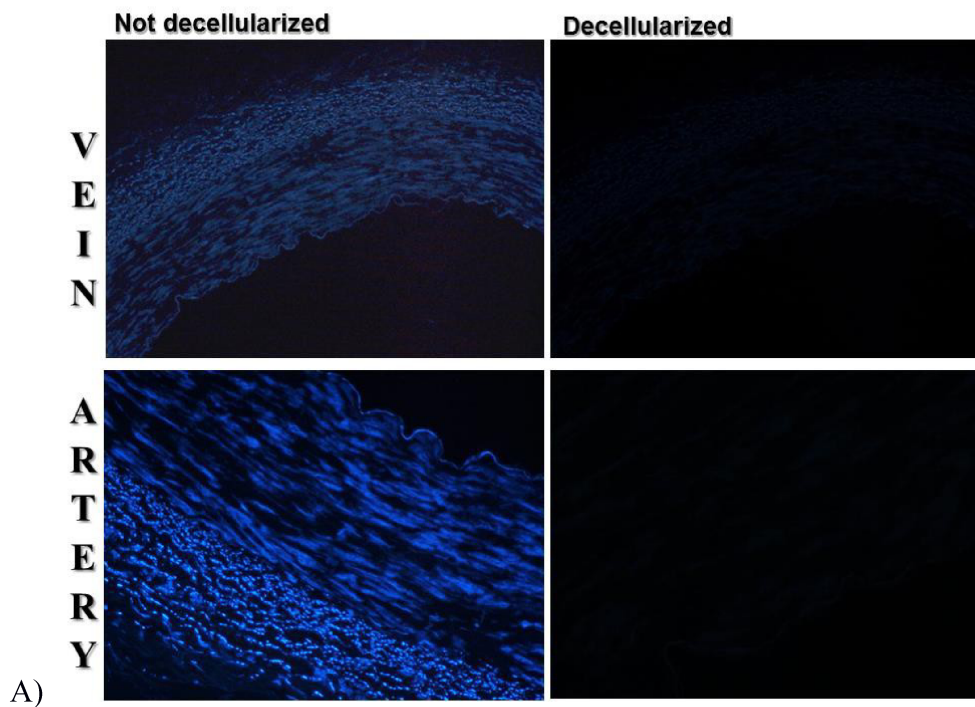


Fig. 19: A) Rimozione completa dei componenti nucleari dopo decellularizzazione (DAPI).

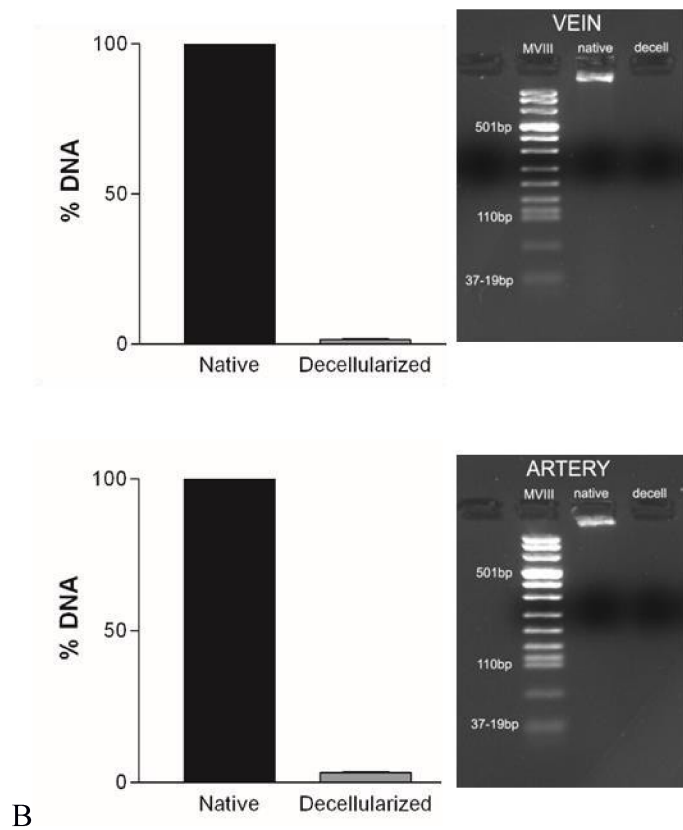


Fig. 20: B) Analisi quantitativa del DNA con spettrofotometria.

IMMUNOISTOCHEMICA :

Un'analisi immunohistochemica con anticorpi anti α -actina del muscolo liscio è stata effettuata per rilevare l'assenza delle cellule muscolari lisce sia nelle vene che nelle arterie sottoposte al processo di decellularizzazione (Fig. 21). le cellule muscolari sono infatti particolarmente immunogene e la loro rimozione è fondamentale per la riabilitazione dello scaffold, in vivo.

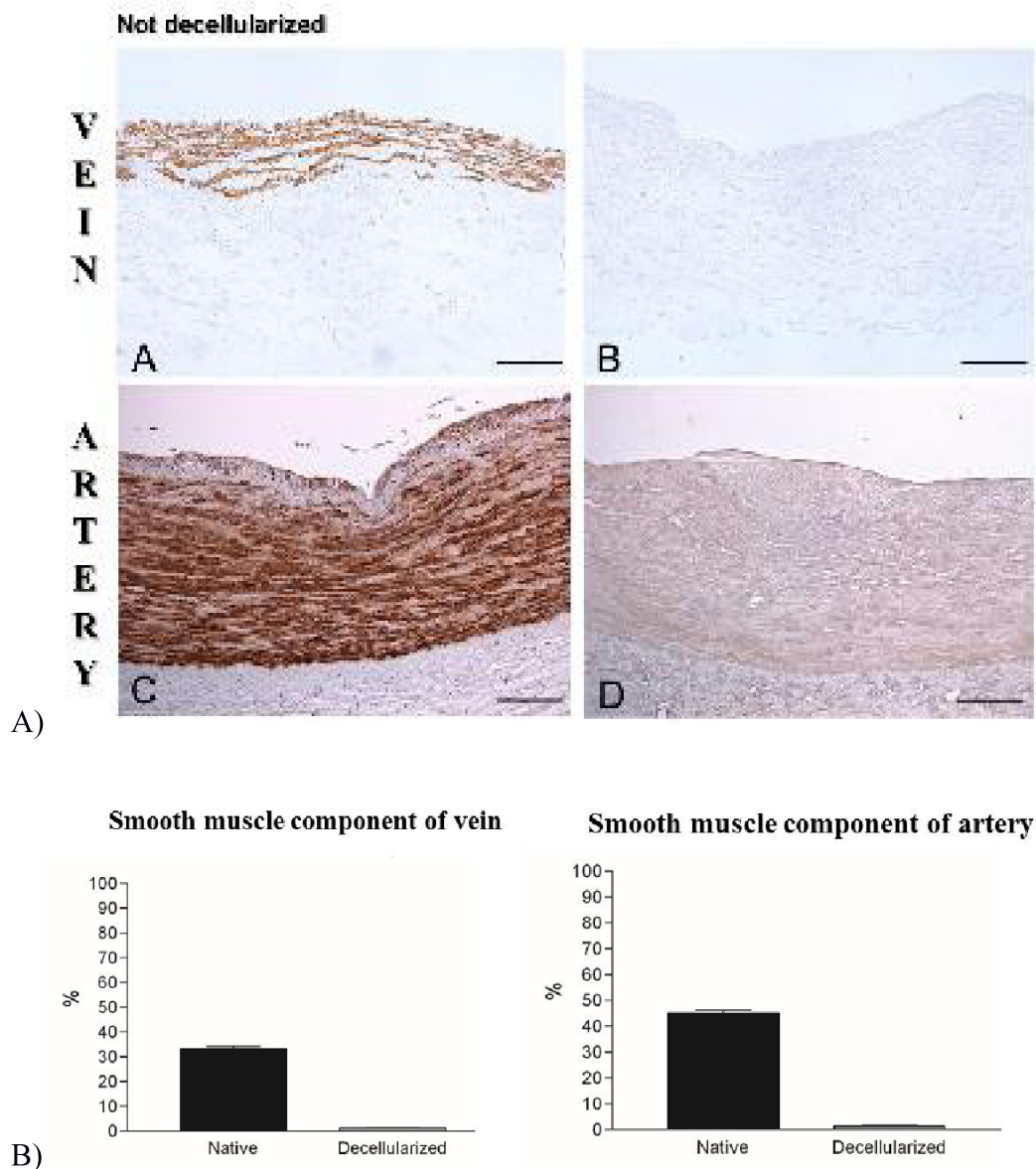


Fig. 21: A) Analisi immunoistochimica con Ab-anti- α -actina del muscolo liscio. B) Percentuale di cellule muscolari lisce nella parete delle vene e delle arterie native e decellularizzate.

MICROSCOPIA ELETTRONICA :

I risultati delle analisi ultrastrutturali effettuate mediante Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM) sono in linea a quelli ottenuti con le analisi precedentemente citate. Gli scaffold sia venosi che arteriosi mostrano una distribuzione ordinata delle fibre collagene con i caratteristici legami che si ritrovano nelle ECM dei vasi nativi. L'integrità delle fibre di elastina è ben preservata durante il processo di decellularizzazione e negli scaffold arteriosi risultano visibili anche le lamine elastiche interna ed esterna (Fig. 22).

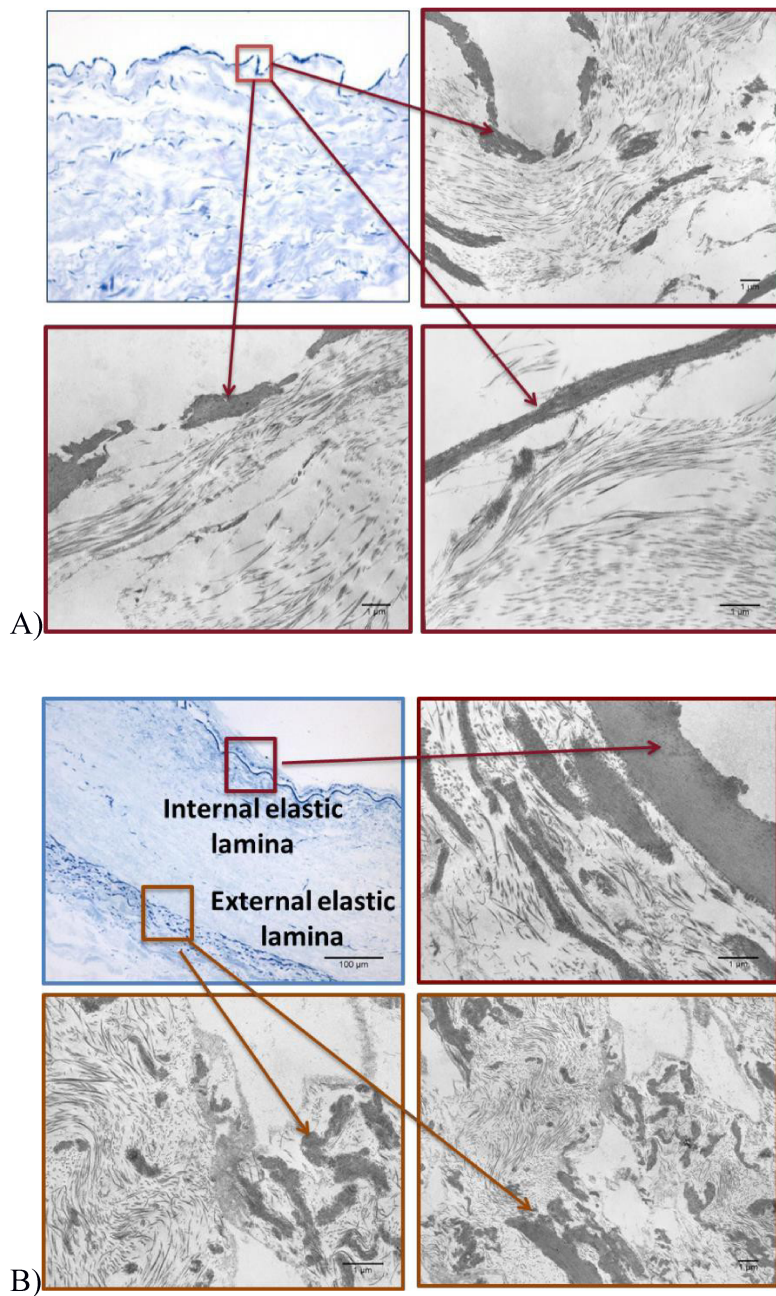


Fig. 22: A) Scaffold venoso (Azan-Mallory e TEM). B) Scaffold arterioso (Azan-Mallory e TEM).

I test meccanici mediante dinamometro ha permesso di misurare mediante cicli di carico e scarico della forza con deformazione del 15% un'area di dissipazione energetica maggiore nel tessuto decellularizzato, stante una perdita di capacità elastica che, tuttavia non è significativamente inferiore al valore soglia del tessuto originario, confermando una adeguata resistenza allo stress meccanico (Fig. 23)

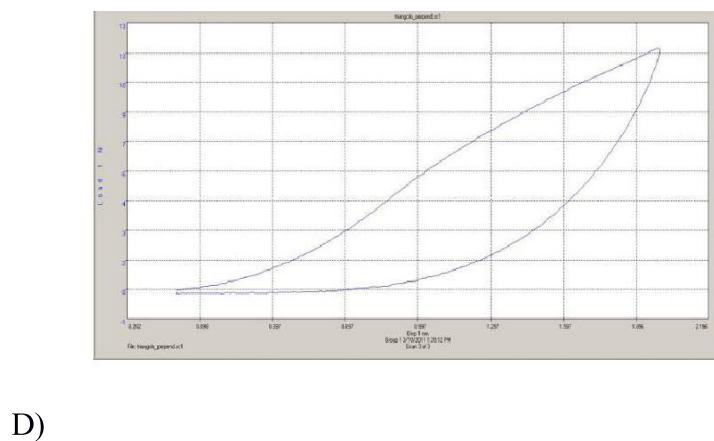
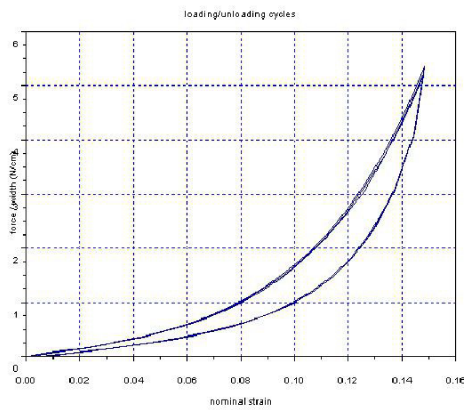
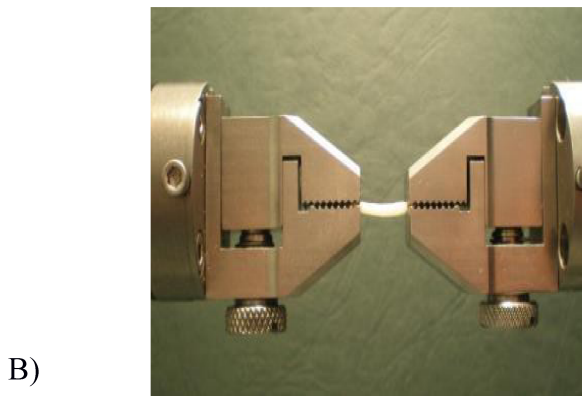
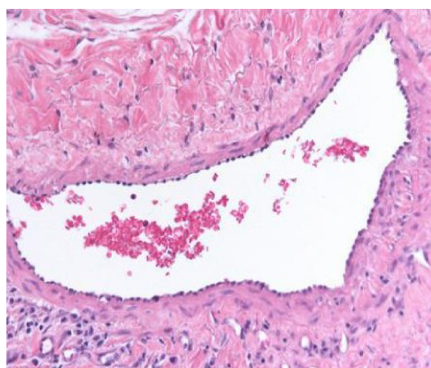


Fig.23 : A) Arteria decellularizzata pre test meccanico B) Test meccanico con dinamometro con cicli di estensione/rilascio a massimo carico del 15% C) Vaso nativo:l'area compresa è proporzionale al rilascio elastico D) Arteria decellularizzata. Minore elasticità rispetto al nativo ma senza rottura.

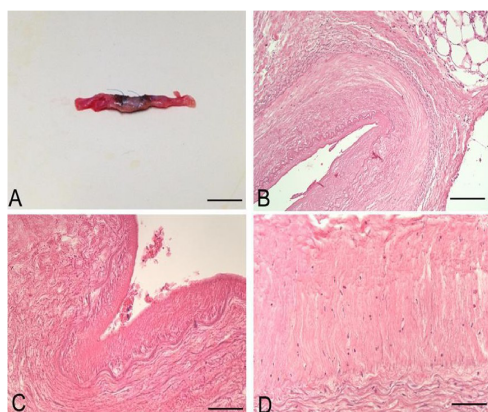
Tutti gli animali sono sopravvissuti alle procedure microchirurgiche, solamente in un caso si è verificata un'infezione superficiale senza coinvolgimento del sito di anastomosi. La pervietà degli innesti è stata dimostrata al tempo 0, dopo 10 minuti e dopo 20 minuti dall'intervento mediante Milking test. Il sacrificio degli animali è stato eseguito a tempi diversi, come precedentemente descritto, tramite eccesso di anestesia generale. Macroscopicamente è stata osservata la totale pervietà del lume e un'iniziale colonizzazione degli scaffold decellularizzati da parte di cellule endoteliali, mentre è stata osservata l'obliterazione trombotica della protesi vascolare sintetica in tutti e tre i casi eseguiti. Dal punto di vista microscopico, gli scaffold di vasi umani decellularizzati sono apparsi meno strutturalmente organizzati rispetto ai vasi nativi dell'animale. La colorazione con Ematossilina-Eosina ha rivelato la presenza di cellule endoteliali colonizzanti il lume delle vene. Da questa evidenza si può ipotizzare che gli scaffold siano in grado di promuovere la migrazione e la crescita delle cellule nel loro lume. A 10 giorni la ripopolazione dell'arteria appare assente mentre è evidente in periodo più lungo, ovvero 40 giorni (Fig. 24). Le colorazioni Azan-Mallory e Van Gienson hanno mostrato la persistenza delle fibre collagene ed elastiche oltre alla deposizione di nuova matrice extracellulare (Fig. 25). La capacità da parte degli scaffold di promuovere sia la migrazione che la crescita delle cellule all'interno del lume è stata confermata dall'analisi immunofenotipica con anticorpi anti-CD31 (Fig. 26). Inoltre, sono stati anche utilizzati anticorpi anti-CD3 per individuare la minima invasione dell'innesto da parte di cellule immunologiche (Fig. 27). Alla valutazione con TEM, gli scaffold delle arterie e delle vene sono risultati completamente biointegrati e ricellularizzati dalle cellule dell'ospite. Per quanto riguarda i controlli, dopo il prelievo biotico di un tratto di vaso protesico l'analisi istologica con Ematossilina-Eosina ha mostrato la presenza di coagulo trombotico oblitterante l'intero lume della protesi, un netto danneggiamento della parete collagenica scarsamente popolata dalle cellule autologhe e, infine, un'intensa reazione granulomatosa (Fig 28). Gli ulteriori test condotti hanno dimostrato la pervietà di tutti gli innesti in vivo mediante esame ecocolordoppler (Fig. 29) e l'immunoistochimica a fluorescenza ha dimostrato l'iniziale colonizzazione endoteliale a 40 giorni da parte del sostituto arterioso (Fig. 30). [Tab.1].

Tab. 1 : Riassunto delle procedure di impianto e loro risultato

TIPO DI IMPIANTO	TEMPO SACRIFICIO	RISULTATO
1- VENA	10 GIORNI	PERVIO/ RICELLULARIZZATO
2- VENA	30 GIORNI	PERVIO/RICELLULARIZZATO
3- ARTERIA	10 GIORNI	PERVIO/ PARZ.RICELL.
4- ARTERIA	40 GIORNI	PERVIO/ RICELLULARIZZATO
5- SINTETICI	15 GIORNI	TROMBOSI COMPLETA
6- SINTETICI	15 GIORNI	TROMBOSI COMPLETA



(A)



B)

Fig 24: A) Vena ricellularizzata; corretta ricellularizzazione del lume; assenza di cellule infiammatorie; assenza di fenomeni trombotici e lume ampio. B) Arteria ricellularizzata; Nessun segno di rigetto o rottura (Ematossilina-Eosina).

A)

B)

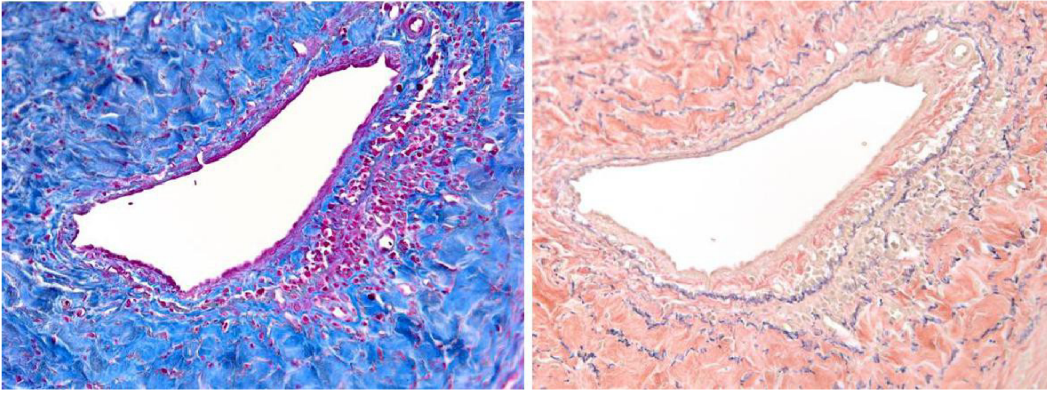


Fig. 25: A) Scaffold venoso con conservazione delle fibre collagene e deposizione di nuovo materiale collagenico (Azan-Mallory). B) Scaffold venoso con conservazione delle fibre elastiche e deposizione di nuovo materiale elastico (Van Gieson).

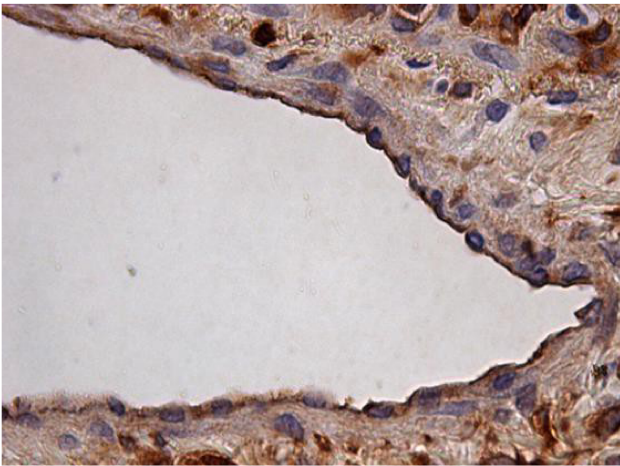


Fig. 26: Colorazione immunofenotipica con Ab anti-CD31.

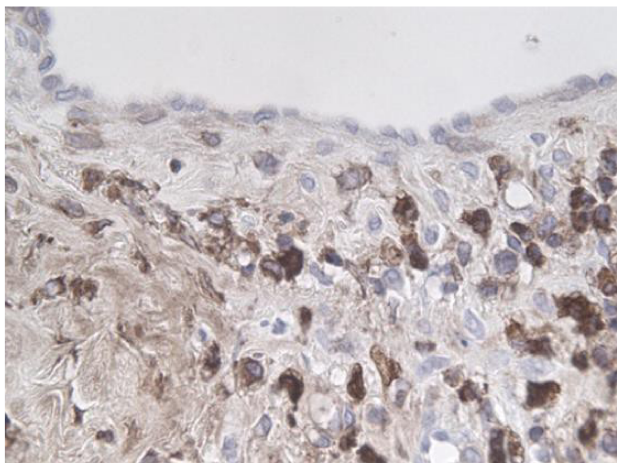


Fig. 27: Colorazione immunofenotipica con Ab anti-CD3.

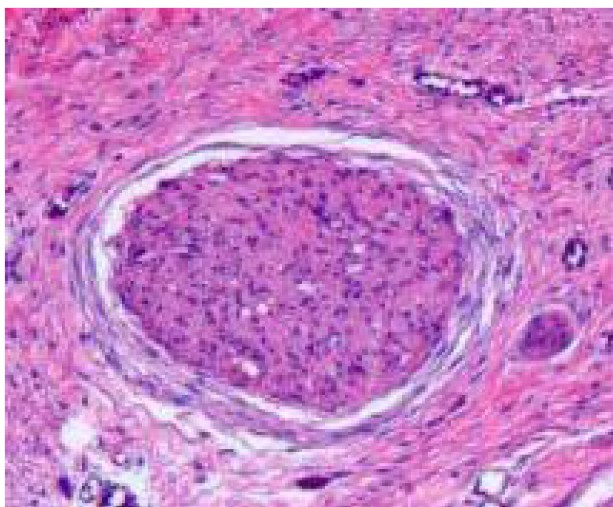


Fig. 28: Protesi vascolare sintetica colpita da un evidente processo trombotico con oblitterazione completa del lume, danno parietale e reazione granulomatosa.

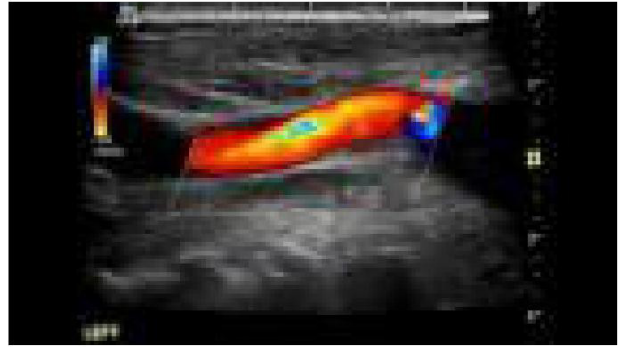
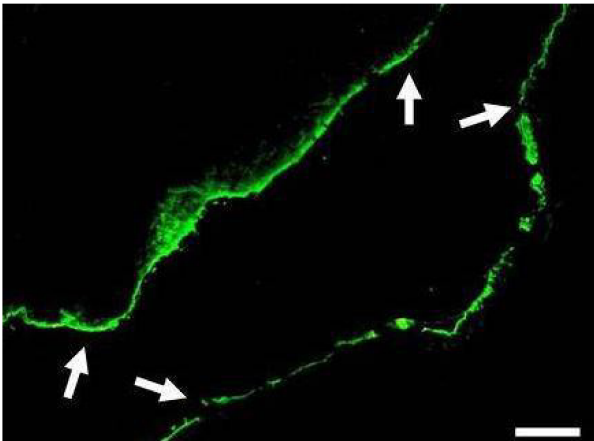
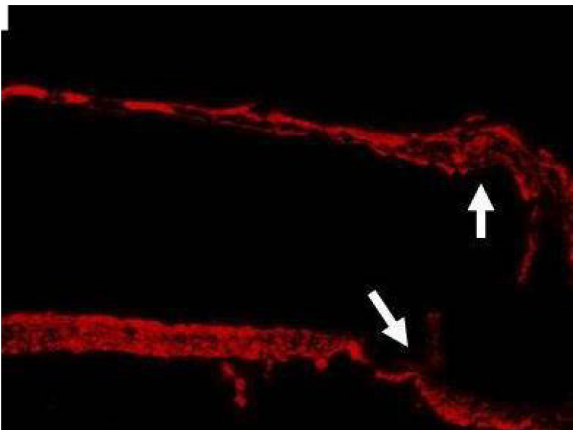


Fig. 29: Esame ecocolor doppler eseguito ad intervalli regolari (vedi testo) sia per arterie che per vene, in anestesia generale. Pervietà completa di tutti gli innesti vascolari.



A)



B)

Fig. 30 : A) Immunoistochimica a 40 giorni dell'arteria : neoendotelio per positività anticorpale verso il fattore di Von Willebrand (vWF). B) Positività anche per la catena leggera della miosin kinasi (MCLK), altro marcatore di neoendotelio. Le frecce rappresentano il sito di anastomosi da dove avviene la endotelizzazione (trans-endotelizzazione).

10. Discussione

La patologia vascolare rappresenta la causa principale di morbidità e mortalità nei Paesi occidentali [75]. Nello specifico, l'infarto miocardico acuto è la prima causa di morte e l'ictus cerebrale la prima causa di invalidità; d'altronde ulteriori innumerevoli patologie, anche traumatiche, possono colpire i vasi venosi e arteriosi di minor calibro [76]. La necessità di innesti vascolari è elevata nella chirurgia ricostruttiva, in caso di traumi vascolari e nei trapianti d'organo. Numerosi approcci sono stati tentati al fine di sopperire alla necessità, spesso volte urgente, di condotti vascolari in grado di ripristinare la continuità del flusso sanguigno ed impedire la sofferenza ischemica e, in alcuni casi, la necrosi di organi e tessuti non più irrorati. La prima soluzione alla quale si è pensato è stata l'utilizzo di vasi autologhi prelevati dal paziente stesso. A riprova di questo, i by-pass coronarici realizzati con l'arteria mammaria interna, l'arteria radiale e la vena safena rappresentano, ad oggi, il gold standard terapeutico della patologia ischemica cardiaca [77]. L'utilizzo di vasi autologhi presenta il vantaggio di annullare il rischio di rigetto proprio di qualsiasi altro tipo di trapianto d'organo o tessuto che non provenga da un gemello monozigote. I maggiori svantaggi osservabili nell'utilizzo di un innesto vascolare autologo sono la mancata disponibilità di vasi dovuta ad eventi patologici, traumatici oppure cause iatrogene, come il loro utilizzo in un intervento chirurgico precedente, e la morbidità derivante del processo di isolamento, prelievo e preparazione [78]. Per ovviare a questi limiti, un'altra soluzione è stata presa in considerazione: l'utilizzo di vasi artificiali costituiti da differenti materiali permanenti quali poliuretano, polietilene tereftalato e politetrafluoroetilene (ePTFE), come descritto da Teebken nel 2002, è stato il primo passo verso l'utilizzo di vasi non autologhi [61]. Tutti questi condotti vascolari in materiali sintetici sono risultati di efficacia inferiore rispetto a quelli autologhi, specialmente nella sostituzione di vasi di piccolo calibro (diametro interno < 6mm). Nonostante questi innesti vascolari polimerici siano stati efficacemente utilizzati per sostituire vasi sanguigni di diametro maggiore di 6 mm, essi non possono essere impiegati per il trattamento delle patologie che colpiscono i vasi di diametro minore come dimostrato da Veith nel 1986 [79] e da Chard nel 1987 [80]. Il ridotto tasso di pervietà associato all'elevato rischio di trombosi, ed infezione e alla ridotta funzionalità meccanica del vaso nel sito di anastomosi ha condotto al progressivo abbandono dei condotti artificiali [81].

Successivamente, varie modifiche sono state apportate a queste protesi. James nel 1997 e Devine nel 2001 sperimentarono, rispettivamente, dei rivestimenti intraluminali con cellule endoteliali e con materiali antitrombogenici, come l'eparina [82]. Sfortunatamente, a lungo termine, questi approcci, in vivo, sono stati considerati fallimentari. Un ulteriore passo in avanti è stato fatto grazie

all'utilizzo di materiali biologici promosso dall'ingegneria tissutale il quale ha garantito l'ottenimento, nel ricevente, di migliori performance, compatibilità e integrazione degli scaffold [83]. Gli scaffold dovrebbero essere biocompatibili, non trombogenici, non immunogenici e dovrebbero resistere alle infezioni, indurre una riparazione accettabile, priva di infiammazione, iperplasia o formazione di una capsula fibrosa. Dovrebbero possedere un endotelio confluyente, quiescente e inattivo. Idealmente, dovrebbero guidare l'integrazione dell'innesto nell'organismo diventando indistinguibili dai vasi nativi. Essi dovrebbero possedere delle proprietà meccaniche appropriate (compliance fisiologica) e la capacità di sopportare a lungo lo stress emodinamico senza rompersi e non essere suscettibili alla deformazione permanente responsabile della formazione di aneurismi. Gli scaffold dovrebbero possedere un'appropriata permeabilità all'acqua, ai soluti e alle cellule ed esibire alcune caratteristiche fisiologiche come le risposte di vasocostrizione/vasodilatazione. In conclusione, la maneggevolezza e la facilità di sutura dal punto di vista chirurgico dovrebbero essere caratteristiche fondamentali di questi vasi [23]. Raggiungere questi criteri risulta abbastanza impegnativo e diversi approcci sono stati utilizzati per cercare di soddisfarli.

È ampiamente condivisa la necessità di tre elementi: una componente biocompatibile, con elevata resistenza alla tensione, che provvede al supporto meccanico (fibre collagene o analoghi), una componente elastica biocompatibile per prevenire la retrazione e lo sviluppo di aneurismi (fibre di elastina o analoghi) ed un endotelio inattivato e confluyente per prevenire eventi trombotici. Prendendo in considerazione di questi criteri i TEBV (Tissue Engineered Blood Vessels) rappresentano l'alternativa più promettente a quelli autologhi. Sono state proposte molteplici proprietà per guidare la progettazione e lo sviluppo di scaffold vascolari come è possibile leggere nei lavori di Conte e al. nel 1998 [84]; Mitchell e al. nel 2003 [23] e Teebken e al. nel 2002 [47].

Il tessuto xenogenico decellularizzato potrebbe essere utilizzato come scaffold naturale. Alcuni esempi dell'uso di questi scaffold furono descritti da Lantz nel 1990 [85], che impiegò, come impianto vascolare, la sottomucosa dell'intestino tenue porcino (SIS). La SIS fu decellularizzata e impiantata nell'aorta, nella carotide e nelle arterie femorali dei cani. L'innesto risultò completamente riendotelizzato nel giro di 28 giorni dall'impianto. A 90 giorni, l'innesto era istologicamente simile alle arterie e alle vene normali e presentava una tonaca media con muscolo liscio e una tonaca avventizia costituita da tessuto connettivo fibroso denso. In un periodo di follow-up di 5 anni non ci fu evidenza di infezione, iperplasia intimale o dilatazione aneurismatica. Uno studio di infection-challenge suggerì la proprietà di resistenza all'infezione della SIS, dovuta, probabilmente, alla precoce invasione capillare (da 2 a 4 giorni dopo l'impianto) e al trasporto locale delle cellule immunitarie dell'organismo. Kaushal, nel 2001, impiegò delle arterie iliache porcine decellularizzate, a cui aggiunse delle cellule staminali endoteliali (EPCs) espanse in vitro ricavate dal sangue periferico di una pecora e impiantò il tutto in arterie carotidi ovine. Questi

TEVG rimasero pervi per 130 giorni e vennero rimodellati in neovasi, mentre nel gruppo di controlli, gli scaffold senza aggiunta di (EPCs) andarono incontro ad occlusione dopo 15 giorni. Questi risultati dimostrarono che gli scaffold ricavati da vasi decellularizzati erano suscettibili a precoce danneggiamento se non precedentemente sottoposti a riendotelizzazione o ad ulteriori trattamenti in vitro [86].

Nel 2011 Quint sviluppò una metodica unica basata sull'utilizzo di polimeri biodegradabili per ricavare del tessuto decellularizzato per innesti vascolari di piccolo calibro. Questa tecnica permise di ridurre sostanzialmente il tempo d'attesa per ottenere un innesto. Sulla superficie interna dell'innesto acellulare furono, poi, aggiunte cellule EPC o EC ricavate dal ricevente. Il TEBV fu successivamente impiantato come innesto end-to-side alla carotide porcina, ottimo banco di prova a causa dell'elevata tendenza all'occlusione. Dopo 3 giorni risultarono pervi tutti i TEBV seminati con EPC e EC, mentre solo 3 degli 8 innesti venosi controlaterali, usati come controlli. Proseguendo l'osservazione, i TEBV seminati con cellule dimostrarono una minor iperplasia intimale e una minor proliferazione cellulare rispetto agli innesti venosi. Si dimostrò che l'espressione delle proteine che costituiscono la via di segnale di mTOR (mammalian Target of Rapamycin) tendeva ad essere ridotta nei TEBV rispetto che negli innesti venosi, e per questa evidenza la pathway in questione fu considerata responsabile della resistenza dei TEBV all'occlusione prodotta dall'iperplasia intimale. Questi risultati hanno dimostrato che un TEBV può essere seminato con dei progenitori staminali di cellule endoteliali per ottenere un innesto vascolare biologico di pronto uso e resistente all'iperplasia intimale [87].

Anche gli innesti xenogenici decellularizzati sono stati indicati come potenziali scaffold per la sostituzione di vasi di piccolo calibro. Xiong, per esempio, nel 2013 pubblicò un lavoro nel quale sviluppava e testava un condotto acellulare biocompatibile e biomeccanicamente funzionale, ottenuto dalla decellularizzazione di arterie safene porcine (DPSAs), attraverso un processo che utilizzava una soluzione di Triton X-100 e siero. Le analisi istologiche e biochimiche mostrarono un elevato grado di rimozione cellulare e di conservazione dell'ECM. Il Bursting pressure test mostrò che le DPSAs potevano resistere ad una pressione di 1854 ± 164 mmHg. La valutazione in vitro dell'adesione cellulare e della biocompatibilità dimostrò che le cellule endoteliali di arteria polmonare porcina erano in grado di aderire e proliferare sulle DPSA in coltura. Dopo l'impianto nelle carotidi di coniglio, le DPSAs dimostrarono un tasso di pervietà del 60% a 1 mese e del 50% a 3 mesi. In nessuna delle DPSAs furono osservati aneurismi o iperplasia intimale [88]. Tutti gli innesti pervi presentavano degli elementi di rigenerazione vascolare e l'occlusione trombotica era la principale causa di danno dell'innesto, probabilmente dovuta alla permanenza di xeno-antigeni.

La trombosi è il meccanismo principale che porta all'occlusione e al fallimento della maggior parte delle anastomosi microvascolari che utilizzano condotti artificiali. Per far fronte a questo inconveniente sono stati elaborati vari metodi, tra cui il rivestimento con farmaci antitrombotici come eparina, irudina, aspirina o Tissue Factor Pathway Inhibitor [89]. Gli svantaggi dei materiali decellularizzati includono l'incapacità di modificazione del contenuto e della struttura dell'ECM, la variabilità delle caratteristiche del donatore e il rischio di una trasmissione virale dal tessuto animale. Infatti, Simon nel 2003, dimostrò come lo stress fisico e chimico durante il processo di decellularizzazione alterasse gli elementi e le proprietà biomeccaniche della ECM [90].

Nel nostro studio, per la prima volta, ci si è focalizzati sulla realizzazione di scaffold vascolari di piccolo diametro derivati da un processo di decellularizzazione di vasi umani. Questi poi sono stati innestati in un modello sperimentale animale creando quello che possiamo considerare uno "xenotrapianto inverso". In contrapposizione è stato realizzato un modello di controllo utilizzando una protesi vascolare sintetica riassorbibile. Questa, a differenza degli scaffold decellularizzati, è andata incontro ad un processo di trombosi dell'intero lume oltre che ad un danneggiamento della parete e ad un'intensa infiammazione granulomatosa che ne ha minato la biointegrazione.

Tutti gli studi di ingegneria tissutale, per la realizzazione di un innesto vascolare ideale, particolarmente nel campo della microchirurgia, evidenziano costi elevati e tempi lunghi.

Il nostro studio, in contrapposizione alla maggior parte dei lavori presenti in letteratura, propone l'applicazione del processo di decellularizzazione a vasi umani, prospettando di ridurre al minimo i problemi di biocompatibilità. Attraverso l'adattamento del protocollo di decellularizzazione proposto da Sheridan nel 2012, abbiamo dimostrato l'efficacia di una procedura che risulta semplice, veloce e di facile applicazione. Il risultato è l'ottenimento di uno scaffold molto maneggevole in ambito microchirurgico, resistente alla pressione, con un buon tasso di pervietà e capace di indurre un processo di ricellularizzazione. Abbiamo mantenuto accettabile la durata di tale procedimento, rendendolo più efficiente e garantendo un'eventuale futura applicazione nella microchirurgia d'urgenza. Le analisi istologiche, immunofenotipiche, ultrastrutturali e quantitative del DNA hanno confermato l'efficacia del processo di decellularizzazione. Il materiale cellulare è stato rimosso quasi completamente e sono state mantenute la composizione e la struttura della matrice extracellulare. Il mantenimento quanto più possibile simile alla struttura originaria è fondamentale per il processo di integrazione in quanto diviene la guida per l'endotelizzazione sia attraverso la periferia dell'innesto (sede dell'anastomosi) che mediante le cellule circolanti (homing). La formazione di un endotelio stabile è fondamentale per garantire il mantenimento della pervietà e l'assenza di trombosi a lungo termine, prevenendo il fenomeno dell'iperplasia intimale che rimane uno dei problemi fondamentali di qualsiasi innesto vascolare. Le analisi del prelievo, hanno evidenziato una minima presenza di infiammazione e un iniziale processo di

ricellularizzazione dello scaffold. Il mancato utilizzo in vitro di cellule staminali o endoteliali potrebbe ridurre notevolmente i costi di creazione di questi vasi bioingegnerizzati rendendo possibile una produzione in larga scala e la costituzione di banche tissutali specifiche in grado di fornire il sostituto vascolare più adatto per calibro e lunghezza, ottenendolo da bache dei tessuti o da residui traumatici destinati all'eliminazione. Grazie alla rapida disponibilità di innesti arteriosi con una resistenza maggiore rispetto agli innesti venosi e l'assenza del fenomeno di iperplasia intimale, questi costrutti potrebbero essere applicati in chirurgia della mano o in chirurgia ricostruttiva qualora si necessiti di lembi con peduncoli vascolari più lunghi (Fig.31)

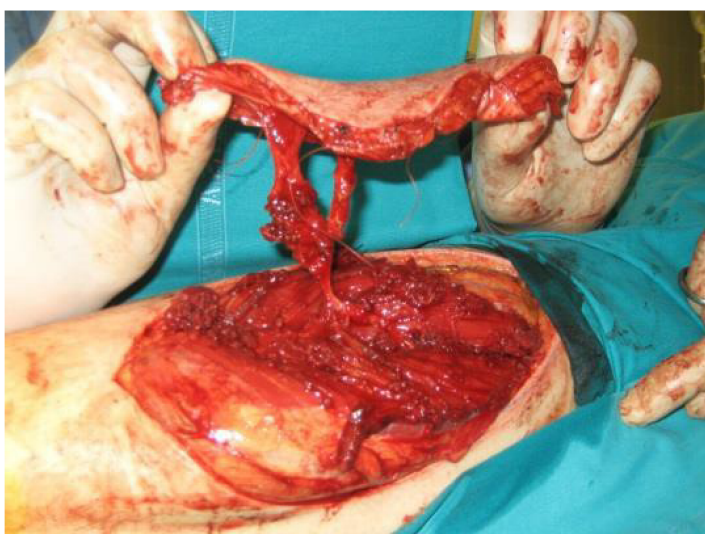


Fig. 31 : Lembo microchirurgico ALT : in evidenza il peduncolo vascolare (arteria e vena) che viene sottoposto ad anastomosi. La sua lunghezza può essere un limite nelle procedure ricostruttive, evitabile potendo avere a disposizione un innesto vascolare biocompatibile di pari efficacia (arteria e vene decellularizzate).

Conclusioni

La ricerca del sostituto vascolare ideale, utile nelle diverse situazioni cliniche, di calibro variabile, è in continua evoluzione ed ha suggerito nel tempo molteplici soluzioni, alcune passate anche alla pratica clinica, seppure con ancora molte limitazioni, come abbiamo avuto modo di descrivere in una recente revisione della letteratura (91). Il nostro studio si inserisce, pertanto, all'interno di questo vasto filone di ricerca, focalizzandosi su di un problema tutt'ora insoluto ovvero quello della sostituzione o impiego di vasi di piccolo calibro ovvero non solo inferiori ai canonici $>6\text{mm}$ (vasi coronarici) ma anche a valori prossimi ad essere inferiori ai 3mm come nei vasi dell'arto superiore o dei lembi microchirurgici, con notevoli risvolti nel campo della chirurgia ricostruttiva. Ottenere

gli scaffold biologici di condotti vascolari umani di così ridotto calibro mediante il noto processo della decellularizzazione ha comportato un necessario adattamento per preservare la struttura ECM senza danneggiarla, data la delicatezza crescente per sostituti vascolari di dimensioni più ridotte rispetto a quanto fin'ora testato in letteratura .I risultati preliminari sin qui da noi ottenuti hanno permesso di ritenere che essi possano essere utilizzati in modo promettente per un approccio riparativo in caso di patologie vascolari traumatiche o per implementare procedure tissutali microvascolari (92). Nondimeno questo processo potrebbe essere applicato, in futuro, ad altri tessuti od organi umani per l'ottenimento di ulteriori scaffold. Le analisi istologiche e ultrastrutturali accoppiate a tecniche di estrazione e quantificazione del DNA hanno dimostrato la possibilità di decellularizzare sia le vene che le arterie umane con la stessa efficacia che si ritrova quando tale processo è applicato ai vasi animali. Negli scaffold biologici ottenuti attraverso il processo di decellularizzazione è stata dimostrata la totale rimozione del materiale cellulare e la preservazione della rete tridimensionale della matrice extracellulare. I trial chirurgici di innesto degli scaffold nell'animale hanno dato buoni risultati per quanto riguarda le proprietà meccaniche e la biointegrazione. I vasi decellularizzati hanno mostrato il 100% di pervietà a 2 settimane dall'intervento e l'assenza di processi trombotici. La ricolonizzazione preliminare in vitro da parte di cellule autologhe deve, in futuro, essere testata per confermare la proprietà di rigenerazione endoteliale. L'esiguo numero di anastomosi che è stato possibile effettuare non permettono una più compiuta analisi statistica, tenuto conto altresì del esiguo periodo di sopravvivenza e , pertanto, i risultati presentati sono da considerarsi come valutazioni di carattere osservazionale di tipo preliminare le cui principali implicazioni riguardano l'ottimizzazione e la qualità del processo di decellularizzazione e la dimostrazione di applicabilità in campo microchirurgico. Ulteriori studi sono necessari per valutare l'endotelizzazione ed il tasso di pervietà nel lungo periodo (12 mesi),una maggiore numerosità campionaria per implicazioni statistiche, supponendo che per tratti di maggiore lunghezza e per ottimizzare la biocompatibilità si debba fare ricorso a cellule progenitrici applicate in vivo sullo scaffold .

Bibliografia

- [1] Naderi H, Matin MM, Bahrami AR, Critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems, *J Biomater Appl.* 2011 Sep 16.
- [2] F Causa, P A. Netti, L Ambrosio, A multi-functional scaffold for tissue regeneration: The need to engineer a tissue analogue, *Biomaterials* 28 (2007) 5093–5099.
- [3] Salvatori M, Peloso A, Katari R, Orlando G, Regeneration and bioengineering of the kidney: current status and future challenges, *Curr Urol Rep.* 2014 Jan;15(1):379.
- [4] Araujo AL, Gomes J, Corneal stem cells and tissue engineering: Current advances and future perspectives *World J Stem Cells.* 2015 Jun 26;7(5):806-14.
- [5] Varkey M, Ding J, Tredget EE, Advances in Skin Substitutes-Potential of Tissue Engineered Skin for Facilitating Anti-Fibrotic Healing, *J Funct Biomater.* 2015 Jul 9;6(3):547-63.
- [6] Segers VF, Lee RT, Biomaterials to enhance stem cell function in the heart, *Circ Res.* 2011 Sep 30;109(8):910-22.
- [7] Lis A, Szarek D, Laska J, Biomaterials engineering strategies for spinal cord regeneration: state of the art, *Polim Med.* 2013 Apr-Jun;43(2):59-80.

[8] Eberli D, Atala A, Tissue engineering using adult stem cells, *Methods Enzymol.* 2006;420:287-302.

[9] Hollister SJ, Murphy WL, Scaffold translation: barriers between concept and clinic, *Tissue Eng Part B Rev.* 2011 Dec;17(6):459-74.

[10] Langhans MT, Yu S, Tuan RS, Stem Cells in Skeletal Tissue Engineering: Technologies and Models, *Curr Stem Cell Res Ther.* 2015 Oct 1

[11] Glowacki J, Mizuno S, Collagen scaffolds for tissue engineering *Biopolymers*, 2008 May;89(5):338-44.

[12] Carletti E, Motta A, Migliaresi C, Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture, *Methods Mol Biol.* 2011;695:17-39.

[13] Little CJ, Bawolin NK, Chen X, Mechanical properties of natural cartilage and tissue-engineered constructs, *Tissue Eng Part B Rev.* 2011 Aug;17(4):213-27.

[14] Mansbridge J, Commercial considerations in tissue engineering, *J Anat.* 2006 Oct;209(4):527-32.

[15] Chapekar MS, Tissue engineering: challenges and opportunities, *J Biomed Mater Res.* 2000;53(6):617-20.

[16] C. Klopsch, G. Steinhoff, Tissue-Engineered Devices in Cardiovascular Surgery, *Eur Surg Res* 2012;49:44–52.

[17] Kim BS, Mooney DJ, Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering, *Trends Biotechnol.* 1998 May;16(5):224-30.

[18] Yao Yao, Jianing Wang, Yun Cui, Rong Xu, Zhihong Wang, Ju Zhang, Kai Wang, Yuejie Li, Qiang Zhao, Deling Kong, Effect of sustained heparin release from PCL/chitosan hybrid small-diameter vascular grafts on anti-thrombogenic property and endothelialization, *Acta Biomaterialia* 10 (2014) 2739–2749.

[19] Bellón JM, Buján J, Hernando A, Honduvilla NG, Jurado F, Arterial autografts and PTFE vascular microprostheses: similarities in the healing process, *Eur J Vasc Surg.* 1994 Nov;8(6):694-702.

[20] Anatomia Umana - Trattato - volumi 1-3, Quarta edizione, Autore/i: Giuseppe Anastasi, Silvano Capitani, Maria L. Carnazza, Saverio Cinti, Raffaele De Caro, Rosario F. Donato, Virgilio F. Ferrario, Luciano Fonzi, Adriano Tito Franzi, Eugenio Gaudio, Raffaele Geremia, Giovanni Giordano Lanza, Carlo E. Grossi, Massimo Gulisano, Francesco A. Manzoli, Giovanni Mazzotti, Fabrizio Michetti, Sebastiano Miscia, Vincenzo Mitolo, Andrea Montella, Giovanni Orlandini, Antonio Paparelli, Tindaro Renda, Domenico Ribatti, Alessandro Ruggeri, Paola Sirigu, Antonio Soscia, Giovanni Tredici, Marco Vitale, Damiano Zaccheo, Giorgio Zauli, Sandra Zecchi, ISBN 9788870514285

[21] G. J. Cooper, M. J. Underwood, P. B. Deverall, Arterial and venous conduits for coronary artery bypass, *Eur J Cardlo-thorac Surg* (1996) 10:129-140.

[22] Parang P, Arora R, Coronary vein graft disease: pathogenesis and prevention *Can J Cardiol.* 2009 Feb;25(2):e57-62.

[23] Mitchell SL, Niklason LE, Requirements for growing tissue-engineered vascular grafts, *Cardiovasc Pathol.* 2003 Mar-Apr;12(2):59-64.

[24] Byung-Soo Kim and David J. Mooney, Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering, *TIBTECH MAY 1998 (VOL 16)*

[25] Sayers RD, Raptis S, Berce M, Miller JH. Long-term results of femorotibial bypass with vein or polytetrafluoroethylene. *Br J Surg.* 1998;85(7):934–938.

[26] De Bakey ME, Jordan GL Jr, Abbott JP, Halpert B, O'neal RM. The fate of Dacron vascular grafts. *Arch Surg.* 1964;89(5):755–782.

[27] Ritter EF1, Kim YB, Reischl HP, Serafin D, Rudner AM, Klitzman B, Heparin coating of vascular prostheses reduces thromboemboli, *Surgery* 1997 Nov;122(5):888-92.

[28] Kobayashi H1, Kabuto M, Ide H, Hosotani K, Kubota T J, An artificial blood vessel with an endothelial-cell monolayer, *Neurosurg.* 1992 Sep;77(3):397-402.

[29] Williams SK1, Rose DG, Jarrell BE, Microvascular endothelial cell seeding of ePTFE vascular grafts: improved patency and stability of the cellular lining, *J Biomed Mater Res.* 1994 Feb;28(2):203-12.

[30] Gilding DK, Reed AM. Biodegradable polymers for use in surgery – polyglycolic/poly(lactic acid) homo- and copolymers: 1. *Polymer.* 1979;20(12):1459–1464.

[31] Dong Y, Yong T, Liao S, Chan CK, Stevens MM, Ramakrishna S. Distinctive Degradation Behaviors of Electrospun Polyglycolide, Poly(dl-Lactide-co-Glycolide), and Poly(l-Lactide-co-ε-Caprolactone) Nanofibers Cultured With/Without Porcine Smooth Muscle Cells. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(1):283–298.

[32] Hajiali H, Shahgasempour S, Naimi-Jamal MR, Peirovi H. Electrospun PGA/gelatin nanofibrous scaffolds and their potential application in vascular tissue engineering. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:2133–2141.

[33] Williams SF, Martin DP, Horowitz DM, Peoples OP. PHA applications: addressing the price performance issue: I. Tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 1999;25(1–3):111–121.

[34] Grasl C, Bergmeister H, Stoiber M, Schima H, Weigel G. Electrospun polyurethane vascular grafts: In vitro mechanical behavior and endothelial adhesion molecule expression. *J Biomed Mater Res A*. 2010;93(2):716–723.

[35] Huang C, Chen R, Ke Q, Morsi Y, Zhang K, Mo X. Electrospun collagen–chitosan–TPU nanofibrous scaffolds for tissue engineered tubular grafts. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011;82(2):307–315.

[36] Peppas, N. A. and Langer R., New challenges in biomaterials, (1994) *Science* 263, 1715–1720

[37] Heungsoo Shin, Seongbong Jo, Antonios G. Mikos, Biomimetic materials for tissue engineering, *Biomaterials* 24 (2003) 4353–4364

[38] Daping Yang, MD, Tiefang Guo, MD, Chunlei Nie, MD, and Steven F. Morris, MD, MSc, FRCS (C), Tissue-Engineered Blood Vessel Graft Produced by Self-Derived Cells and Allogenic

Acellular Matrix. A Functional Performance and Histologic Study, *Annals of Plastic Surgery* •

Volume 62, Number 3, March 2009

[39] Hubbell JA. Biomaterials in Tissue Engineering. *Nature Biotechnology*. 1995;13(6):565–576.

[40] Ross R, Glomset JA., Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973 Jun 29; 180(4093):1332-9.

[41] Wilcox JN1, Scott NA, Potential role of the adventitia in arteritis and atherosclerosis. *Int J Cardiol*. 1996 Aug; 54 Suppl:S21-35

[42] E.M. Campbell, P.A.Cahill, C.Lally, Investigation of a small-diameter decellularized artery as a potential scaffold for vascular tissue engineering; biomechanical evaluation and preliminary cell seeding, *journal of the mechanical behaviour of biomedical materials*, 14 (2012) 130–142

[43] Peter M. Crapo, Thomas W. Gilbert, Stephen F. Badylak, An overview of tissue and whole organ decellularization processes, *Biomaterials* 32 (2011) 3233e3243

[44] Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF, Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* 2006;27(19):3675e83.

[45] Crapo PM, Tottey S, Slivka PF, Badylak SF, Effects of biologic scaffolds on human stem cells and implications for CNS tissue engineering, *Tissue Eng Part A*. 2014 Jan;20(1-2):313-23.

[46] Boehler RM¹, Graham JG, Shea LD, Tissue engineering tools for modulation of the immune response, *Biotechniques*. 2011 Oct;51(4):239-40, 242, 244.

[47] Omke E. Teebken and Axel Haverich, Tissue Engineering of Small Diameter Vascular Grafts, *Eur J Vasc Endovasc Surg* 23, 475±485 (2002).

[48] Pulver, Shevtsov A, Leybovich B, Artyuhov I, Maleev Y, Peregudov A, Production of organ extracellular matrix using a freeze-thaw cycle employing extracellular cryoprotectants, *Cryo Letters*. 2014 Sep-Oct; 35(5):400-6.

[49] Timothy J. Keane, Ilea T. Swinehart, Stephen F. Badylak, Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance, *Methods* xxx (2015) xxx–xxx

[50] Thomas W. Gilbert, Strategies for Tissue and Organ Decellularization, *Journal of Cellular Biochemistry* 113:2217–2222 (2012)

[51] C.V. Montoya, P.S. McFetridge, *Tissue Eng. C Meth.* 15 (2) (2009) 191–200.

[52] S. Funamoto, K. Nam, T. Kimura, A. Murakoshi, Y. Hashimoto, K. Niwaya, et al., The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels, *Biomaterials* 31 (13) (2010) 3590–3595.

[53] S. Sasaki, S. Funamoto, Y. Hashimoto, T. Kimura, T. Honda, S. Hattori, et al., In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas, *Mol. Vis.* (2009) 152022–152028.

[54] S. Funamoto, K. Nam, T. Kimura, A. Murakoshi, Y. Hashimoto, K. Niwaya, et al., The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels, *Biomaterials* (2010) 3590–3595.

[55] W.S. Sheridan, G.P. Duffy, B.P. Murphy, J. Mech, Mechanical characterization of a customized decellularized scaffold for vascular tissue engineering, *Behav. Biomed. Mater.* (2012) 858–870.

[56] B. Mendoza-Novelo, E.E. Avila, J.V. Cauich-Rodriguez, E. Jorge-Herrero, F.J. Rojo, G.V. Guinea, et al., Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content, *Acta Biomater.* 7 (3) (2011) 1241–1248.

[57] R.W. Grauss, M.G. Hazekamp, S. van Vliet, A.C. Gittenberger-de Groot, M.C. DeRuiter, Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodelling, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 126 (6) (2003) 2003–2010.

- [58] J. Liao, E.M. Joyce, M.S. Sacks, Effects of decellularization on the mechanical and structural properties of the porcine aortic valve leaflet, *Biomaterials* 29 (8) (2008) 1065–1074.
- [59] R.J. Levy, N. Vyavahare, M. Ogle, P. Ashworth, R. Bianco, F.J. Schoen, J. Heart, Inhibition of cusp and aortic wall calcification in ethanol- and aluminum-treated bioprosthetic heart valves in sheep: background, mechanisms, and synergism, *Valve Dis.* 12 (2) (2003) 209–216 (discussion 16).
- [60] Deutsch M, Meinhart J, Fischlein T, Zilla P. Endothelial cell seeding of vascular grafts: experimental investigations and clinical update. *Cardiovasc Pathol* 1996; 5: 35±37.
- [61] Teebken OE, Bader A, Steinhoff G, Haverich A. Tissue engineering of vascular grafts: human cell seeding of decellularized porcine matrix. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000; 19: 381±386.
- [62] Fischlein T, Zilla P, Meinhart J et al. In vitro endothelialisation of a mesosystemic shunt: a clinical case report. *J Vasc Surg* 1994; 19: 549±554.
- [63] Schmidt CE, Baier JM. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials* 2000; 21: 2215±2231.
- [64] Clarke DR, Lust RM, Sun YS, Black KS, Ollerenshaw JD. Transformation of nonvascular acellular tissue matrices into durable vascular conduits. *Ann Thorac Surg* 2001; 71: S433±S436.

[65] L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L, Auger FA. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *Faseb J* 1998; 12: 47±56.

[66] Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, et al. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med* 2001;7:1035–40.

[67] Gui L, Boyle MJ, Kamin YM, Huang AH, Starcher BC, Miller CA, Vishnevetsky MJ, Niklason LE. Construction of tissue-engineered small-diameter vascular grafts in fibrin scaffolds in 30 days. *Tissue Eng Part A*. 2014 May;20(9-10):1499-507.

[68] Wystrychowski W, McAllister TN, Zagalski K, Dusserre N, Cierpka L, L'Heureux N. First human use of an allogeneic tissue-engineered vascular graft for hemodialysis access. *N. J Vasc Surg*. 2014 Nov;60(5):1353-7.

[69] Zhao J, Liu L, Wei J, Ma D, Geng W, Yan X, Zhu J, Du H, Liu Y, Li L, Chen F. A novel strategy to engineer small-diameter vascular grafts from marrow-derived mesenchymal stem cells. *Artif Organs*. 2012 Jan;36(1):93-101.

[70] McAllister TN, Maruszewski M, Garrido SA, Wystrychowski W, Dusserre N, Marini A, Zagalski K, Fiorillo A, Avila H, Manglano X, Antonelli J, Kocher A, Zembala M, Cierpka L, de la Fuente LM, L'heureux N. Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study. *Lancet*. 2009 Apr 25;373(9673):1440-6.

[71] Laflamme K, Roberge CJ, Pouliot S, D'Orléans-Juste P, Auger FA, Germain L. Tissue-engineered human vascular media produced in vitro by the self-assembly approach present functional properties similar to those of their native blood vessels. *Tissue Eng.* 2006 Aug;12(8):2275-81.

[72] Kerdjoudj H, Boura C, Marchal L, Dumas D, Schaff P, Voegel JC, Stoltz JF, Menu P. Decellularized umbilical artery treated with thin polyelectrolyte multilayer films: potential use in vascular engineering. *Biomed Mater Eng.* 2006;16(4 Suppl):S123-9.

[73] Conklin BS, Wu H, Lin PH, Lumsden AB, Chen C. Basic fibroblast growth factor coating and endothelial cell seeding of a decellularized heparin-coated vascular graft. *Artif Organs* 2004; 28:668–75.

[74] Hutter R, Carrick FE, Valdiviezo C, et al. Vascular endothelial growth factor regulates reendothelialization and neointimal formation in a mouse model of arterial injury. *Circulation* 2004;110:2430–5.

[75] Yeh RW, Sidney S, Chandra M, Sorel M, Selby JV, Go AS, Population trends in the incidence and outcomes of acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2010;362:2155–2165.

[76] Vernooij JW¹, van der Graaf Y, Visseren FL, Spiering W; SMART study group, The prevalence of obesity-related hypertension and risk for new vascular events in patients with vascular diseases, *Obesity (Silver Spring)*. 2012 Oct;20(10):2118-23.

[77] Piccolo R, Giustino G, Mehran R, Windecker S, Stable coronary artery disease: revascularisation and invasive strategies, *Lancet*. 2015 Aug 15;386(9994):702-13.

[78] Udelsman BV, Maxfield MW, Breuer CK, Heart. Tissue engineering of blood vessels in cardiovascular disease: moving towards clinical translation, 2013 Apr;99(7):454-60.

[79] Veith FJ, Gupta SK, Ascer E, White-Flores S, Samson RH, Scher LA, Towne JB, Bernhard VM, Bonier P, Flinn WR, et al, Six-year prospective multicenter randomized comparison of autologous saphenous vein and expanded polytetrafluoroethylene grafts in infrainguinal arterial reconstructions, *Vasc Surg*. 1986 Jan;3(1):104-14.

[80] Chard RB, Johnson DC, Nunn GR, Cartmill TB, Aorta-coronary bypass grafting with polytetrafluoroethylene conduits. Early and late outcome in eight patients, *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1987 Jul;94(1):132-4.

[81] Guidoin R, Chakfé N, Maurel S, How T, Batt M, Marois M, Gosselin C. Expanded polytetrafluoroethylene arterial prostheses in humans: histopathological study of 298 surgically excised grafts. 1993 *Biomaterials*;14(9):678-93.

[82] Devine C, Hons B, McCollum C, Heparin-bonded Dacron or polytetrafluoroethylene for femoropopliteal bypass grafting: a multicenter trial, *J Vasc Surg*. 2001 Mar;33(3):533-9.

[83] Bordenave L, Fernandez P, Rémy-Zolghadri M, Villars S et al. In vitro endothelialized ePTFE prostheses: clinical update 20 years after the first realization. *Clin Hemorheol Microcirc*; 2005 33(3):227-34.

[84] Conte MS, The ideal small arterial substitute: a search for the Holy Grail?, *FASEB J*. 1998 Jan;12(1):43-5.

[85] Lantz GC, Badylak SF, Coffey AC, Geddes LA, Blevins WE, Small intestinal submucosa as a small-diameter arterial graft in the dog, *J Invest Surg*. 1990;3(3):217-27.

[86] Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, Rabkin E, Moran AM, Schoen FJ, Atala A, Soker S, Bischoff J, Mayer JE Jr, Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo, *Nat Med*. 2001 Sep;7(9):1035-40.

[87] Quint C, Kondo Y, Manson RJ, Lawson JH, Dardik A, Niklason LE, Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 31;108(22):9214-9.

[88] Xiong Y1, Chan WY, Chua AW, Feng J, Gopal P, Ong YS, Song C, Decellularized porcine saphenous artery for small-diameter tissue-engineered conduit graft, *Artif Organs*. 2013 Jun;37(6):E74-87.

[89] Zhou M, Liu Z, Liu C, Jiang X, Wei Z, Qiao W, Ran F, Wang W, Qiao T, Liu C, Tissue engineering of small-diameter vascular grafts by endothelial progenitor cells seeding heparin-coated decellularized scaffolds, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012 Jan;100(1):111-20.

[90] Simon P1, 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 Jun;23(6):1002-6.

[91]. Pontini, M.M. Sfriso, M.I. Buompensiere, V. Vindigni and F. Bassetto Chapter 10 in :
“ Cells and Biomaterials in regenerative Medicine” - DOI: 10.5772/59148 . Edited by
Daniel Eberli-InTech

[92] Porzionato A, Sfriso MM, Pontini A, Macchi V, Petrelli L, Pavan PG, Natali AN
Bassetto F, Vindigni V, De Caro R Development of small diameter vascular grafts through
decellularization of
human blood vessel *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*- 2016