

# POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale  
in Ingegneria Biomedica, Bionanotecnologie

Tesi di Laurea Magistrale

## CARATTERIZZAZIONE DI SUPPORTI TRIDIMENSIONALI DERIVATI DALLA DECELLULARIZZAZIONE DELLE PIANTE PER APPLICAZIONI BIOMEDICHE

*Characterization of decellularized plants as a 3D support for  
tissue regeneration.*



**Politecnico  
di Torino**

Relatori  
Prof. Chiara Tonda-Turo  
Prof. Gianluca Ciardelli

Candidato  
Elena De Donno

Anno Accademico 2020/2021

# INDICE

ABSTRACT ( versione italiana) .....	2
ABSTRACT (english version) .....	4
INTRODUZIONE.....	5
INGEGNERIA DEI TESSUTI .....	5
DECELLULARIZZAZIONE .....	8
<i>Decellularizzazione animale</i> .....	12
<i>Decellularizzazione vegetale</i> .....	13
RAZIONALE .....	26
SPERIMENTAZIONE .....	28
MATERIALI e METODI .....	28
RISULTATI .....	32
<i>Decellularizzazione</i> .....	32
<i>Caratterizzazione meccanica</i> .....	35
<i>Ricellularizzazione</i> .....	44
DISCUSSIONE.....	46
CONCLUSIONE.....	57
APPENDICE I .....	60
INDICE DELLE FIGURE.....	62
BIBLIOGRAFIA .....	64

## **ABSTRACT ( versione italiana)**

L'ingegneria dei tessuti (TE) è un campo di ricerca interdisciplinare il cui scopo è lo sviluppo di tessuti biologici che riparino, migliorino o mantengano le funzioni di un tessuto umano danneggiato. Si basa su tre componenti principali: le cellule, i fattori di crescita e lo scaffold. Lo scaffold è una matrice porosa tridimensionale che funge da supporto per la coltura cellulare: deve essere biocompatibile, una porosità adatta ad ospitare l'adesione e la proliferazione cellulare e deve avere proprietà meccaniche e strutturali simili a quelle del tessuto da rigenerare. Negli ultimi anni, vista la complessità nel costruire uno scaffold adeguato allo sviluppo dei diversi tipi di tessuto umano, la ricerca si è focalizzata sullo studio di strutture già esistenti in natura che fossero modificabili per ospitare cellule umane. Dapprima si sono analizzati organi animali (xenograft) o prelevati da donatori umani (allograft) decellularizzati caratterizzati da una struttura e una composizione della matrice extracellulare (ECM) ottimale. La decellularizzazione è una tecnica il cui scopo è quello di togliere la componente cellulare di un tessuto mantenendone il più possibile inalterata la matrice extracellulare e l'architettura. Successivamente, vista la scarsa disponibilità di organi animali, i problemi etici e l'attenzione verso tecnologie più ecologiche, la ricerca si è spostata sulla decellularizzazione di organismi vegetali: essi sono ampiamente presenti in natura, coprono un ampio range di caratteristiche meccaniche, strutturali e morfologiche e sono composti principalmente da cellulosa, polimero già utilizzato per la realizzazione di scaffold. Diversi studi dal 2014 ad oggi confermano le potenzialità della decellularizzazione vegetale nel TE in quanto tecnica poco costosa, semplice e adatta alla realizzazione di scaffold tridimensionali complessi, vascolarizzabili e adeguati per la ricellularizzazione. Il presente lavoro si pone come obiettivo l'identificazione di un protocollo di decellularizzazione semplice ed efficace applicato a strutture vegetali, nel dettaglio mela, kiwi e melanzana. Per la decellularizzazione, i campioni vengono immersi in una soluzione acquosa di sodio dodecil solfato (SDS) con concentrazioni diverse a seconda della densità del tessuto vegetale in analisi: il processo termina quando il vegetale assume una colorazione bianca e traslucida. I campioni decellularizzati vengono successivamente sottoposti ad un processo di liofilizzazione per mantenere intatte le caratteristiche strutturali. Le matrici decellularizzate ottenute sono state caratterizzate tramite test meccanici in compressione sul vegetale non trattato, decellularizzato e liofilizzato,

analisi FTIR e studi sull'angolo di contatto. Nell'ultima fase del lavoro sono stati seminati fibroblasti sui tre diversi vegetali decellularizzati e liofilizzati per verificare l'adesione cellulare ad un substrato vegetale in tre diverse condizioni: non trattato, trattato con gelatina e immerso nel mezzo di coltura overnight. Sviluppi futuri vedono l'analisi meccanica di nuove strutture vegetali e il loro utilizzo come scaffold per la rigenerazione di tessuti mai trattati precedentemente, quali il pancreas esocrino o il polmone.

## **ABSTRACT (english version)**

*Tissue engineering (TE) is a multidisciplinary field which aims to develop biological tissues capable of maintaining, improving or repairing human injured tissues. TE has three main components: cells, grow factors (GFs) and the scaffold. The scaffold is a porous tridimensional support for cell growth: it must be biocompatible, its porosity should allow cell adhesion and proliferation and its mechanical and structural properties should reproduce the human tissue ones. Lately, due to the complexity of scaffold realization, research has analysed existing natural structures which can be adapted to host mammalian cells. At first, decellularized animal organs (xenograft) or human-donated organs (allograft) were studied, due to their optimal structure and extracellular matrix (ECM) composition. Decellularization is a technique whose goal is removing the whole cellular component of a tissue while maintaining its ECM and morphology unchanged. Then, the lack of animal organs, the ethical issues and the attention on more ecological techniques have moved the focus on vegetal decellularization: plants are abundant in nature, cover a wide range of mechanical, morphological and structural properties and are composed mainly of cellulose, a polymer already used in TE. Several studies from 2014 till now have assessed the vegetal decellularization potential as a cheap, easy technique to generate tridimensional, vascularized scaffold suitable for recellularization. The present work aims to identify a simple, efficient decellularization protocol for different vegetables: kiwi, apple and eggplant. Samples were immersed in a water solution of sodium dodecil sulfate (SDS) in different concentrations, depending on the vegetal tissue density: the process ends when the vegetable has turned white and translucent. Decellularized samples are then lyophilized to maintain their structural properties. The resulting matrices were characterized through mechanical compression tests, FTIR analysis and contact angle studies: untreated, decellularized and lyophilized vegetal scaffold were compared. Finally, fibroblasts were cultured on the three vegetal matrices to assess the cellular adhesion to a plant-derived scaffold in three different conditions: untreated scaffold, gelatine-coated one and immersed in culture medium overnight. Future developments consist in mechanical analysis of new vegetal structures and in their use as scaffold for the regeneration of never analysed tissues, as pancreas or lung.*

# INTRODUZIONE

## INGEGNERIA DEI TESSUTI

L'ingegneria dei tessuti (*tissue engineering*, TE) è un campo di ricerca che coinvolge diverse discipline con l'obiettivo di riparare e rigenerare tessuti umani danneggiati a causa di patologie, traumi o disabilità congenite. Langer et al. definiscono il TE come "un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze biologiche per lo sviluppo di sostituti biologici che riparino, mantengano o migliorino le funzioni del tessuto" <sup>[1]</sup>. In occidente, la percentuale di persone affette da deficit nel funzionamento di un organo o da danni ingenti a tessuti è elevata e i disagi conseguenti a tali patologie limitano notevolmente la qualità di vita. I principali metodi di intervento su queste malattie sono rappresentati da trapianti, impianto di dispositivi medici sostitutivi e ricostruzioni chirurgiche. Tuttavia, ognuna di queste tecniche presenta svantaggi rilevanti. I trapianti, siano essi da donatore esterno (allograpianti), di diversa specie (xenotrapianti) o autologo (autotrapianti), sono caratterizzati innanzitutto da una scarsa disponibilità di materiale da impiantare; nei primi due casi, inoltre, vi possono essere problemi di rigetto dovuti all'incompatibilità tra l'organo o la porzione di tessuto impiantata e il corpo del paziente. L'impianto di dispositivi medici (protesi, reni artificiali) può favorire infezioni e i dispositivi spesso non ottemperano tutte le funzioni originali dell'organo sostituito. Le ricostruzioni chirurgiche, infine, possono provocare tempi di ripresa lunghi e danni a lungo termine. Pertanto, il TE si ripropone di creare artificialmente parti di tessuto o interi organi che possano essere impiantati per rigenerare o riparare il tessuto stesso. La realizzazione di tessuti simil fisiologici *in vitro*, inoltre, ha il vantaggio di consentire una riduzione dell'utilizzo di animali come cavie di laboratorio per il test di farmaci, sebbene essi siano comunque necessari per fasi successive della sperimentazione.

A livello ideale, l'ingegneria dei tessuti prevede la realizzazione di un tessuto o di un organo a partire da cellule autologhe del paziente: in tal modo, il costrutto che si ottiene può essere reimpiantato nel paziente stesso senza indurre problemi di rigetto e compatibilità. Inoltre, la realizzazione di tessuti simil fisiologici *in vitro* consente una riduzione dell'utilizzo di animali come cavie di laboratorio per il test di farmaci, sebbene essi siano comunque necessari per fasi successive della sperimentazione.

La procedura base del TE è quella rappresentata nella Figura 1 e qui schematizzata. Si prelevano dal paziente alcune cellule, che vengono poste in coltura e fatte proliferare *in vitro*; successivamente, le cellule vengono seminate su uno scaffold opportunamente costruito in

presenza di stimoli adeguati e coltivate per un periodo di tempo sufficiente alla formazione di tessuto maturo. Il costrutto ingegnerizzato può quindi essere impiantato in vivo all'interno del paziente [2].

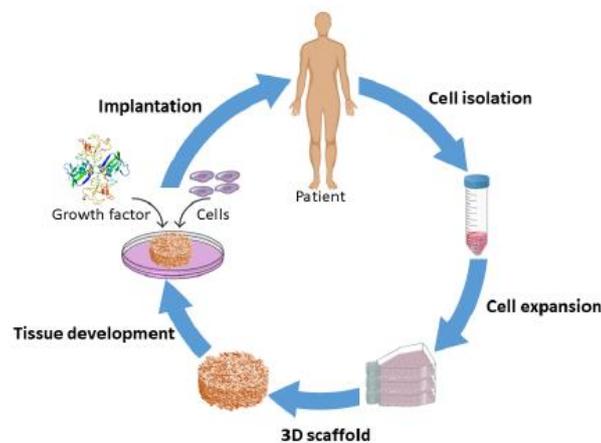


Figura 1: schema dell'approccio del TE basato sugli scaffold [2]

Il TE si fonda sull'utilizzo di tre diverse componenti che formano la "triade del *tissue engineering*": le cellule, le molecole bioattive (o fattori di crescita, GFs) e gli scaffold [3]. Le cellule sono la parte attiva della triade, che genera il nuovo tessuto sotto l'influenza dei fattori di crescita e dell'ambiente circostante. Lo scaffold è il supporto su cui vengono fatte aderire le cellule: è poroso così da garantire il passaggio di nutrienti e di ossigeno e può fornire stimoli meccanici e biochimici alle cellule stesse. I GFs, infine, sono biomolecole che interagiscono con le cellule inducendo effetti a cascata finalizzati alla generazione di tessuto maturo. Per poter ottenere un tessuto fisiologico e funzionale, è opportuno selezionare con cura ognuno dei tre elementi sopra descritti.

L'ingegneria tissutale si concentra sulla costruzione dello scaffold, una matrice porosa tridimensionale con caratteristiche meccaniche, biochimiche e strutturali adeguate alla coltura di cellule umane. Queste ultime nel corpo umano sono circondate da un ambiente ricco di stimoli biochimici, fisici e meccanici: la rete proteica e glicolipidica che avvolge le cellule e ne consente l'attività è chiamata matrice extracellulare (ECM). L'obiettivo principe nella realizzazione dello scaffold è proprio quello di mimare l'ECM così da garantire un ambiente di crescita cellulare ideale che fornisca i corretti stimoli non solo per la proliferazione cellulare ma anche per un eventuale differenziamento [4].

La coltura tridimensionale ha notevoli vantaggi rispetto a quella bidimensionale, poiché consente l'analisi e lo studio di processi complessi fisiologici o patologici (infiammazione, angiogenesi, infiltrazione di metastasi nel sistema linfatico) simulando con miglior accuratezza

le interazioni tra cellule autologhe, eterologhe e tra cellula e substrato. In aggiunta, tramite la coltura tridimensionale, la diffusione di nutrienti e quella di ossigeno risultano più simili alle condizioni fisiologiche<sup>[5], [6]</sup>.

Poiché i tessuti umani sono molto differenti tra loro relativamente a densità, componente cellulare, spessore, vascolarizzazione e caratteristiche meccaniche, la realizzazione dello scaffold deve essere progettata specificatamente per il tessuto in esame. Tutti gli scaffold, innanzitutto, devono essere biocompatibili e citocompatibili: la citocompatibilità attesta la capacità dello scaffold di ospitare cellule umane e favorire la crescita di nuovo tessuto, mentre la biocompatibilità garantisce che la sua presenza all'interno del corpo umano non provochi tossicità né reazioni immunitarie eccessive<sup>[7]</sup>. Nel caso in cui il materiale costituente lo scaffold sia biodegradabile, occorre tenere in conto che anche i prodotti della degradazione siano biocompatibili.

I materiali prescelti per la costruzione di scaffold possono essere metallici, ceramici o polimerici: i polimeri si dividono in due grandi famiglie, i polimeri sintetici (PLGA, PCL)<sup>[8], [9]</sup> e quelli naturali (cellulosa, chitosano o collagene). I primi sono preferibili per la loro versatilità, ricoprendo un ampio range di caratteristiche; i secondi presentano migliori biocompatibilità e adesività per le cellule<sup>[10]</sup>. Viste le proprietà complementari, spesso polimeri appartenenti a famiglie diverse vengono fusi in un unico materiale, un co-polimero, nel quale convogliano proprietà appartenenti all'uno e all'altro gruppo<sup>[11]</sup>.

Per garantire una corretta cellularizzazione dello scaffold, è necessario che esso abbia caratteristiche meccaniche e strutturali opportune: diverse tecniche sono state sviluppate per realizzare architetture, dimensioni e forme adeguate alla crescita di tipi diversi di tessuti. Tali tecniche sono catalogate in due sottogruppi: tecniche convenzionali e tecniche di prototipazione rapida. Un elenco delle principali tecniche utilizzate, con i rispettivi vantaggi e svantaggi, è riportato nell'Appendice I<sup>[7]</sup>.

In conclusione, la sintesi di uno scaffold adatto alla coltura cellulare risulta un processo complesso, in quanto bisogna tener conto di diversi aspetti: il materiale di composizione della matrice dev'essere biocompatibile, adesivo per le cellule, meccanicamente e strutturalmente adeguato al tessuto da rigenerare e, a seconda del tipo di applicazione, biodegradabile o biostabile. Parametri importanti per quantificare le caratteristiche meccaniche della matrice sono la rigidità dello scaffold, l'elasticità e il modulo di Young, mentre la grandezza e

l'orientamento dei pori riflettono l'architettura dello scaffold: questi dati devono essere in linea con le caratteristiche morfologiche e meccaniche del tessuto da rigenerare.

Ad oggi, uno dei limiti principali legati alla realizzazione di scaffold è la vascolarizzazione *in vivo* dello stesso: nonostante siano state testate procedure di pre-impianto dello scaffold o di immersione in soluzioni contenenti fattori di crescita, infatti, la vascolarizzazione rimane spesso insufficiente <sup>[12],[13]</sup>. Un secondo limite, legato alla sintesi di polimeri artificiali, è il forte impatto ambientale, che ha indotto gli studiosi a focalizzarsi sull'analisi di polimeri già presenti in natura, tra cui la cellulosa, il polisaccaride più abbondante sul pianeta.

Per risolvere i limiti relativi alla difficoltà di generare artificialmente uno scaffold per coltura cellulare che sia meccanicamente e strutturalmente adatto alla rigenerazione dei tessuti umani, la ricerca scientifica si è concentrata sullo studio di sistemi naturali già esistenti adattabili alla coltura cellulare. L'identificazione di tali strutture è stata accompagnata dalla messa a punto di nuove tecnologie che le rendessero adeguate alla coltura cellulare: tra queste spicca la decellularizzazione, tecnica che prevede di utilizzare strutture vegetali o animali già preformate, rimuovendo le parti cellulari esistenti per favorire semina, adesione e proliferazione di cellule umane.

## **DECELLULARIZZAZIONE**

La decellularizzazione consiste nella rimozione della parte cellulare di un tessuto mantenendo inalterata la matrice extracellulare dello stesso da un punto di vista morfologico, compositivo e meccanico. Esistono diversi protocolli di decellularizzazione che variano a seconda delle caratteristiche del tessuto da trattare <sup>[14]</sup>: ad esempio, il derma risulta più spesso del pericardio e più denso del tessuto adiposo, dunque necessita di tempi più lunghi o trattamenti più aggressivi. Ogni trattamento è studiato per alterare il meno possibile la struttura e le proprietà della ECM, sebbene non si possa evitare un certo grado di distruzione meccanica, chimica e morfologica della matrice.

Esistono tre tipi di decellularizzazione:

1. Decellularizzazione fisica: vengono utilizzati metodi fisici per indurre la morte cellulare. Si può sfruttare una variazione termica (cicli di congelamento successivi), l'applicazione di una forza abrasiva o di una pressione oppure l'elettroporazione irreversibile indotta termicamente.

Tali metodi, in particolare l'applicazione di forze abrasive, provocano una parziale distruzione della ECM. Tuttavia si è notato che i cicli di congelamento sono molto funzionali per la rimozione di gran parte della componente cellulare. Spesso questa tecnica viene inserita nel protocollo di decellularizzazione in fase precoce, per poi procedere al raffinamento con trattamenti meno distruttivi.

2. Decellularizzazione chimica: si induce morte cellulare tramite l'utilizzo di sostanze chimiche quali acidi/basi, soluzioni ipotoniche o ipertoniche, detergenti o alcool. Di particolare interesse in questa categoria è il sodio dodecil solfato (SDS), un composto che rimuove con efficacia i nuclei cellulari: paragonato ad altri detergenti e tensioattivi, il SDS è più performante, sebbene danneggi in parte la matrice extracellulare. L'SDS interagisce sia con la membrana cellulare sia con le proteine, distruggendo la prima e denaturizzando le seconde: una volta danneggiata la membrana cellulare, le componenti subcellulari si disperdono nell'ambiente circostante e la cellula muore. Il SDS, tuttavia, è citotossico: avvenuta la decellularizzazione il campione dev'essere accuratamente lavato in modo da rimuovere eventuali residui. Il meccanismo di funzionamento dell'SDS è schematizzato in Figura 2 <sup>[15]</sup>.
3. Decellularizzazione tramite agenti biologici: la morte cellulare si ottiene sfruttando l'azione di composti biologici di natura enzimatica o non enzimatica. Il vantaggio è che il danneggiamento dell'ECM è minimo. Tuttavia spesso questi agenti non garantiscono la completa rimozione della componente cellulare del tessuto.

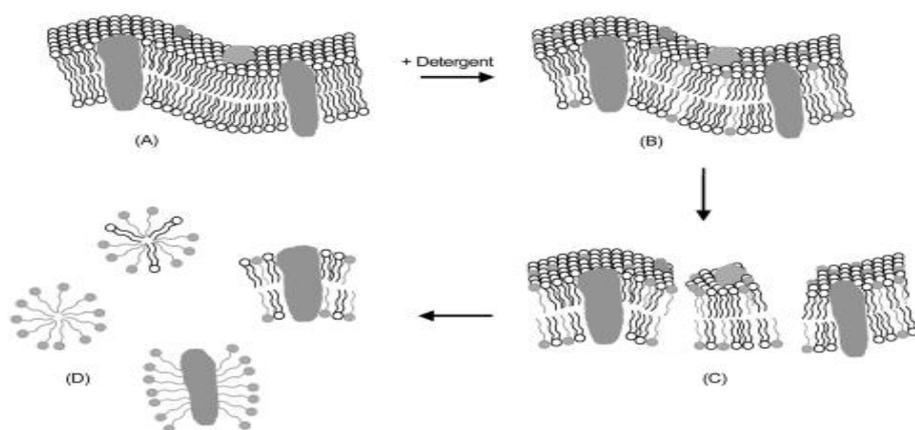


Figura 2: meccanismo di interazione tra membrana cellulare e SDS. a) membrana cellulare; b) una bassa concentrazione di SDS viene introdotta, i monomeri (coda grigia) si legano alla membrana perturbandola minimamente; c) la concentrazione di SDS aumenta, inducendo l'apertura della membrana in diversi punti; d) incrementando ancora la concentrazione di SDS si formano dei complessi

Visti i limiti di ognuna delle tecniche sopra descritte, per ottimizzare il processo di decellularizzazione vengono adottati protocolli misti che prevedono l'utilizzo in sequenza di metodi diversi <sup>[14], [16]</sup>. Alcuni esempi di protocolli misti sono raccolti nella Figura 3.

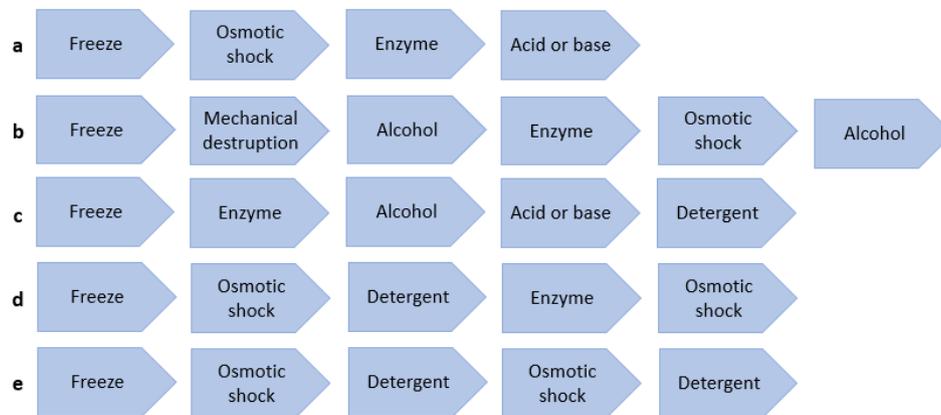


Figura 3: possibili protocolli di decellularizzazione per i diversi tessuti. a) tessuti sottili (pericardio); b) tessuti più spessi (derma); c) tessuti grassi e amorfi (adiposo); d) tessuti composti o organi semplici (trachea); e) organi vitali (fegato) <sup>[14]</sup>

Una volta identificato l'agente di decellularizzazione, questo deve essere applicato al tessuto da decellularizzare tenendo in considerazione le caratteristiche del tessuto stesso: le tecniche più adottate sono la perfusione, l'uso di un gradiente di pressione, l'uso di un fluido super critico, l'immersione e agitazione.

Per decellularizzare interi organi altamente vascolarizzati si utilizza la perfusione: l'agente selezionato viene iniettato all'interno della rete vascolare per favorire il contatto con tutta la componente cellulare del tessuto. La perfusione è una tecnica molto efficace che preserva la struttura dell'organo e dei suoi vasi sanguigni. In letteratura sono documentati casi di decellularizzazione e ricellularizzazione di cuori di ratto <sup>[17]</sup>, polmoni <sup>[18], [19]</sup>, reni <sup>[20], [21]</sup> e fegato <sup>[22], [23]</sup>.

Qualora i tessuti siano particolarmente densi si sfrutta un gradiente di pressione per forzare la decellularizzazione: per esempio, la perfusione luminale di tessuti cavi è più efficace se coadiuvata da un gradiente di pressione transmurale che spinge l'agente di decellularizzazione attraverso il tessuto <sup>[24]</sup>.

L'uso di un fluido super critico, invece, prevede la presenza di una sostanza inerte ( per esempio, diossido di carbonio) che rimuove la componente cellulare del tessuto attraversandolo in maniera controllata. L'utilizzo di una sostanza inerte favorisce la

salvaguardia della matrice extracellulare; inoltre, la tecnica in sé consente di evitare la fase di liofilizzazione che solitamente segue la decellularizzazione<sup>[14]</sup>.

In ultimo, la tecnica più semplice ma meno raffinata è l'immersione e agitazione: il tessuto viene immerso in una soluzione contenente l'agente decellularizzante e posto in agitazione. L'agitazione provoca stress meccanici sulla matrice extracellulare, danneggiandola, ma per i tessuti scarsamente vascolarizzati e difficili da perfondere questa rimane la tecnica d'elezione. In letteratura è documentata l'efficacia di questo trattamento per un ampio range di tessuti e organi, quali il tendine<sup>[25]</sup>, le valvole cardiache<sup>[26], [27]</sup> la trachea<sup>[28]</sup> o l'esofago<sup>[29]</sup>.

L'avvenuta decellularizzazione può essere valutata qualitativamente dalla semplice osservazione del tessuto trattato: la colorazione di quest'ultimo, infatti, vira verso un bianco traslucido, indice della perdita della parte cellulare del tessuto. Un esempio è mostrato nella Figura 4, dove sono messi a confronto un rene<sup>[30]</sup>, un cuore<sup>[31]</sup> e una trachea<sup>[32]</sup> prima e dopo la decellularizzazione. Per quantificare in maniera oggettiva il processo, tuttavia, sono stati definiti tre criteri che certificano la perdita di materiale nucleico<sup>[14]</sup>:

- La quantità di DNA a doppio filamento deve essere inferiore ai 50 ng per mg di ECM (secca).
- Il numero massimo di basi di un frammento di DNA dev'essere inferiore a 200.
- Il materiale nucleico non dev'essere visibile al termine dello staining con 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) o ematossilina e eosina (H&E).

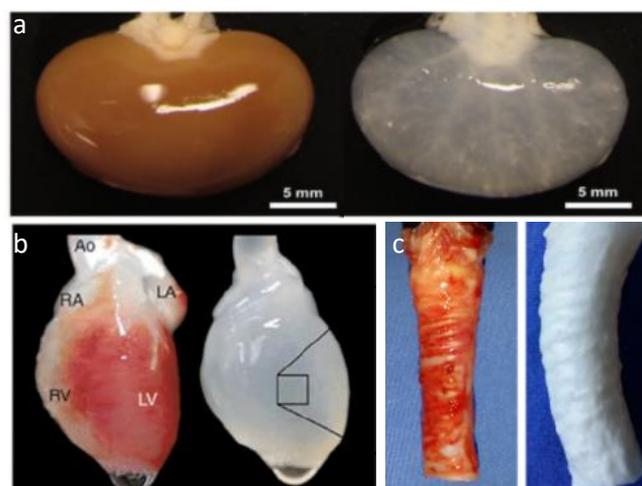


Figura 4: esempi di organi prima e dopo la decellularizzazione. a) rene<sup>[30]</sup>; b) cuore<sup>[31]</sup>; c) trachea<sup>[32]</sup>

### ***Decellularizzazione animale***

La ricerca di strutture simil-fisiologiche dal punto di vista strutturale e biochimico ha generato un interesse sempre maggiore nei confronti della decellularizzazione di organi animali: in letteratura sono riportati esempi efficaci di decellularizzazione di cuore, reni, polmoni, pelle e molti altri tessuti [30], [31], [33], [34]. Uno dei primi ambiti di studio e applicazione della decellularizzazione è stato quello legato alla rigenerazione ossea: già nel 1951 sono stati eseguiti i primi impianti permanenti di matrici decellularizzate allogeniche negli animali [35]. La risposta immunologica dell'organismo a questi scaffold viene confermata essere molto bassa, mentre il microambiente risulta favorevole alla formazione di nuovo osso e al rimodellamento. Successivamente sono stati effettuati studi sulla cura di danni estesi all'epidermide dovuti ad ustioni o a ferite croniche: il trattamento con porzioni di tessuto cellularizzato, infatti, risultava a lungo termine dannoso a causa del rigetto. La rimozione della componente cellulare, invece, elimina il problema della risposta immunologica mantenendo le condizioni favorevoli per l'infiltrazione dei fibroblasti, la neovascolarizzazione e l'epitelializzazione [36].

Per ottimizzare la decellularizzazione di interi organi sono stati testati diversi protocolli.

La perfusione consente il mantenimento dell'architettura tridimensionale dell'organo ed è ottimale per gli organi altamente vascolarizzati, dunque viene utilizzata con efficacia per la decellularizzazione di cuori, polmoni, fegato e reni.

L'immersione e agitazione, invece, è usata per la decellularizzazione di parti di tessuto cardiaco, polmonare o muscolare, perché, sebbene non permetta il mantenimento dell'architettura dell'organo nella sua completezza, risulta molto più semplice da effettuare [33].

Il detergente comunemente usato per la decellularizzazione è l'SDS, in quanto più efficace rispetto ad altri agenti chimici o enzimatici [37].

Le tempistiche variano considerevolmente in rapporto al tipo di tessuto trattato: per il fegato si arriva a trattamenti di 7h [38], il cuore umano deve essere perfuso per 96h [39] e l'aorta suina per 48h [40]. La semplice perfusione può essere integrata dall'utilizzo di un bioreattore che fornisce input meccanici al tessuto in fase di ricellularizzazione [34].

Ad oggi, sono stati decellularizzati organi di tanti tipi, tra cui cuore, fegato, aorta, reni, polmoni, trachea e tessuto muscolare [33].

La decellularizzazione di organi umani o animali consente di ricreare organi artificiali *in vivo*, ma ha due grossi limiti: la bassa disponibilità di organi da decellularizzare e la carenza di studi *in vivo* che indaghino il comportamento del costruito in ambiente fisiologico [41].

### ***Decellularizzazione vegetale***

Lo scopo della decellularizzazione vegetale è la realizzazione di scaffold per coltura cellulare ottenuti a partire da organismi vegetali con una precisa e complessa struttura. L'abbondanza di piante sul pianeta e la grande diversità di strutture vegetali, infatti, risolve i problemi legati alla disponibilità di organi da decellularizzare e alla realizzazione artificiale di strutture complesse a livello meccanico e architettonico. Un esempio di scaffold ottenuti dalla decellularizzazione di vegetali è mostrato nella Figura 5, tratta dall'articolo di Lee et al [42].

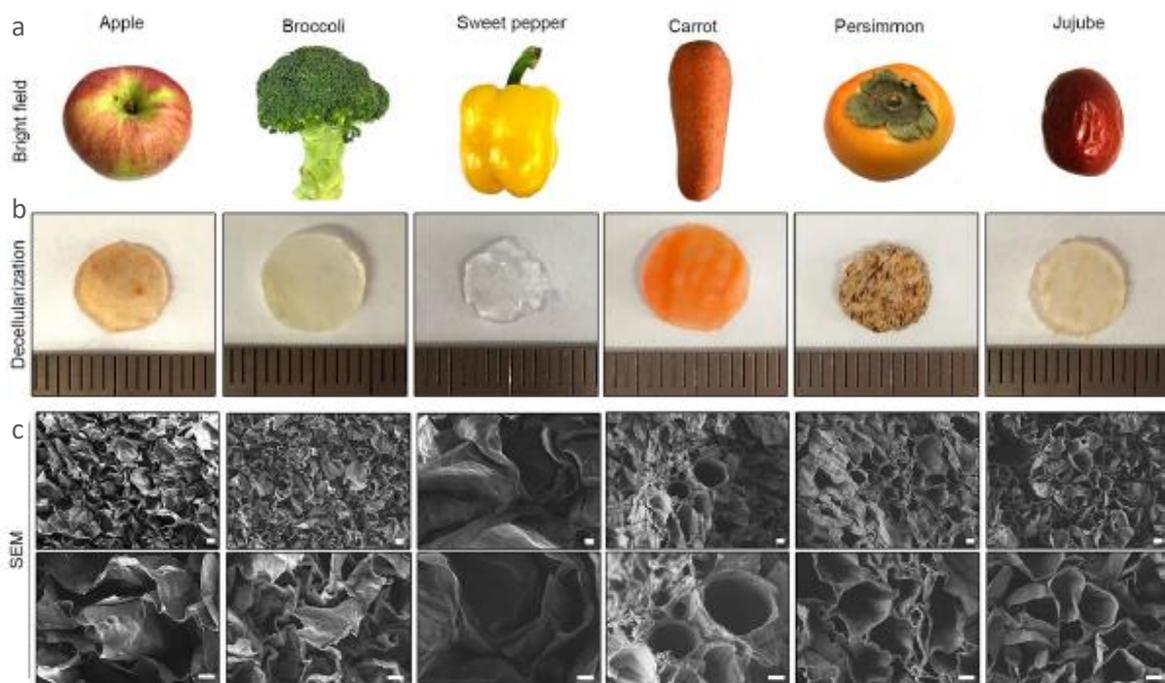


Figura 5: esempio di diversi vegetali decellularizzati. a) vegetali di origine; b) vegetali decellularizzati; c) immagini al SEM dei vegetali decellularizzati (200x e 500x) [42]

In generale, i tessuti vegetali sono costituiti dalle cellule e dalla matrice extracellulare i cui componenti principali sono cellulosa, pectina, emicellulosa e, nel caso di strutture molto dure e resistenti, lignina. Le cellule vegetali, mostrate nella Figura 6 [43], sono le unità strutturali della pianta e sono costituite dal protoplasto e dalla parete cellulare: il primo comprende tutto ciò che è dentro la cellula, organelli, nucleo, citoplasma e membrana plasmatica, mentre la

seconda, detta anche matrice extracellulare della pianta, conferisce la forma al tessuto e riveste un ruolo fondamentale nelle interazioni intercellulari e negli scambi pianta-microbi<sup>[44]</sup>.

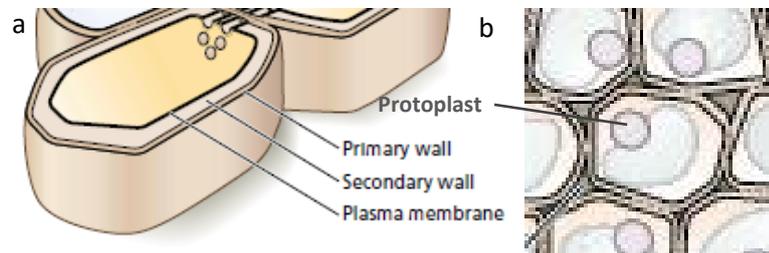


Figura 6: cellula vegetale. a) dettaglio della parete vegetale; b) parete e protoplasto<sup>[43]</sup>

La parete cellulare è composta da polisaccaridi, per lo più cellulosa, che si organizzano in fibre originando strutture porose di diversa forma e dimensione all'interno delle quali dimorano le cellule.

La cellulosa è un polisaccaride la cui struttura molecolare è caratterizzata dalla ripetizione di molecole di  $\beta$ -d-glucopiranosio legate covalentemente tra loro: il risultato è un polimero lineare con un elevato numero di gruppi idrossido, come mostrato nella Figura 7<sup>[45]</sup>.

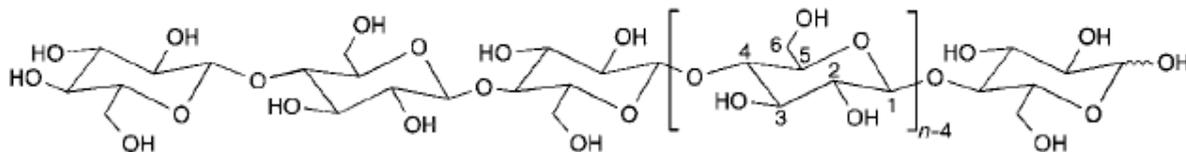


Figura 7: struttura molecolare della cellulosa.  $n$ =grado di polimerizzazione<sup>[45]</sup>

La struttura della cellulosa ne definisce le principali proprietà: idrofilicità, degradabilità, chiralità e elevata reattività dovuta alla presenza di numerosi gruppi idrossili (-OH) nella catena, i quali sono anche responsabili della creazione di network interni alla cellulosa stessa che danno origine a strutture parzialmente cristalline. Ad oggi, la cellulosa può essere ottenuta in quattro modi diversi: si può prelevare dalle piante, previo isolamento da altri componenti quali pectina e lignina, o da batteri alghe o funghi, oppure si può sintetizzare *in vitro* a partire dalla cellulasi catalizzata o sfruttando la polimerizzazione ad anello aperto di frazioni di pivalato di D-glucosio.

Allo stato solido, la cellulosa presenta aree altamente ordinate, dette cristalline, e aree amorfe: la struttura cristallina è descritta da celle monocline e tricline ed è differente a seconda del tipo di cellulosa considerato (tipi I, II, III, IV). Dal punto di vista morfologico, questo polisaccaride presenta fibre organizzate gerarchicamente: le unità strutturali più piccole sono dette fibrille elementari, ad esse seguono per spessore le microfibrille e infine le bande microfibrillari. Le microfibrille sono caratterizzate da zone cristalline e amorfe e descritte da un modello a frange, come mostrato nella Figura 8: il grado di cristallinità varia a seconda della modalità di produzione della cellulosa, così come la dimensione dei cristalli (compresa tra 5

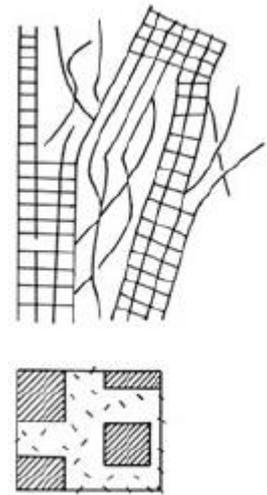


Figura 8: modello fibrillare a frange della struttura sovramolecolare delle microfibrille [45]

nm e 30 nm). La morfologia descritta impone la presenza di pori di grandezza variabile tra le fibre, fondamentali sia per la reattività chimica e la degradazione del polisaccaride sia perché consentono l'utilizzo della cellulosa per un ampio range di applicazioni: in campo biomedico, essa viene sfruttata per la realizzazione di membrane per la dialisi o per biosensori, per l'espansione cellulare oppure per la realizzazione di sistemi di perfusione *in vitro* [46]. La coltura di cellule cardiache su scaffold di acetato di cellulosa oppure cellulosa rigenerata, per esempio, promuove la formazione di un tessuto maturo, provvisto di *gap junctions* e funzionale [46]. La cellulosa di derivazione batterica, invece, presenta alte potenzialità sia nel campo della rigenerazione guidata dei tessuti, sia in quello della guarigione delle ferite (wound healing) [47], sebbene col passare del tempo il materiale tenda ad una progressiva calcificazione, con una conseguente limitazione dell'integrazione del costrutto in ambiente fisiologico [48].

Negli ultimi anni, infine, sono stati approfonditi i possibili utilizzi della nanocellulosa: tale composto si presenta come un idrogel di elevata purezza, caratterizzato da buona resistenza meccanica e da una rete interconnessa di pori, particolarmente adatto per applicazioni di chirurgia cardiovascolare e viscerale o per il trasporto di farmaci. La realizzazione di rivestimenti (coating) o di film compositi in nanocellulosa, tuttavia, trova applicazioni anche nel settore elettronico, in quello cartiero e nel confezionamento degli alimenti [49].

La cellulosa, dunque, è un materiale con grandi potenzialità nell'ambito del *tissue engineering*: è citocompatibile, resistente e facilmente reperibile in natura. Tuttavia, non risolve due dei principali problemi comuni agli scaffold per coltura cellulare: la scarsa vascolarizzazione del

costruito e la realizzazione di strutture molto elaborate a livello microscopico ma sufficientemente resistenti a livello meccanico.

La decellularizzazione vegetale si propone come soluzione a questi problemi, in quanto la rimozione della componente cellulare delle piante tramite l'uso di detergenti, miscele, enzimi o fluidi supercritici consente la salvaguardia sia della matrice in cellulosa che della sua struttura tridimensionale complessa: il risultato è uno scaffold di origine vegetale dotato di un'architettura elaborata, poroso e con caratteristiche meccaniche in linea con quelle di numerosi tessuti umani<sup>[44], [50]</sup>.

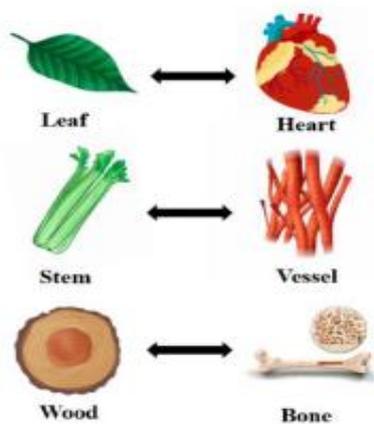


Figura 9: esempi di utilizzo delle diverse parti della pianta come scaffold per la ricellularizzazione di diversi tessuti<sup>[44]</sup>

I tessuti vegetali sono molto diversi tra loro: la grande varietà di piante e di organi diversi della stessa pianta consente di disporre di un ampio range di proprietà strutturali e meccaniche per la realizzazione di scaffold adatti a tessuti umani differenti, come raffigurato nella Figura 9<sup>[44]</sup>. Per esempio, le foglie sono caratterizzate da un sistema di venature molto simile alla rete vascolare umana, dunque possono essere usate per la realizzazione di tessuti molto vascolarizzati, quali il cuore. Per ottenere un modello di vaso, arterioso o venoso, sono particolarmente indicati gli

steli, a causa della disposizione delle fibre ordinata e allineata lungo l'asse longitudinale del tessuto. Infine, le parti vegetali più dure, come il tronco legnoso, possono essere sfruttate per la rigenerazione ossea, purché opportunamente trattate.

Il primo tentativo riuscito di decellularizzazione e successiva ricellularizzazione di un vegetale è stato effettuato nel 2014: è stato decellularizzato l'ipanzio della mela, ovvero la parte centrale della polpa, poi ricellularizzato con fibroblasti, cellule epiteliali e mioblasti. Il protocollo di decellularizzazione consiste nell'immersione di sottili fette di mela dello spessore di circa 1 mm in una soluzione acquosa di SDS allo 0.5% w/v per 12h; a questo segue un trattamento con collagene, glutaraldeide oppure PBS per migliorare la capacità adesiva del substrato per le cellule<sup>[51]</sup>. Gli esiti positivi della fase di decellularizzazione, ma soprattutto di ricellularizzazione, evidenziati nella Figura 10, hanno aperto il campo alla ricerca di strutture vegetali adeguate alla generazione di tipi di tessuti differenti, allo studio di protocolli poco invasivi ma efficaci per la rimozione della componente cellulare e alla verifica della risposta immunologica conseguente l'impianto *in vivo* dei costrutti ottenuti.

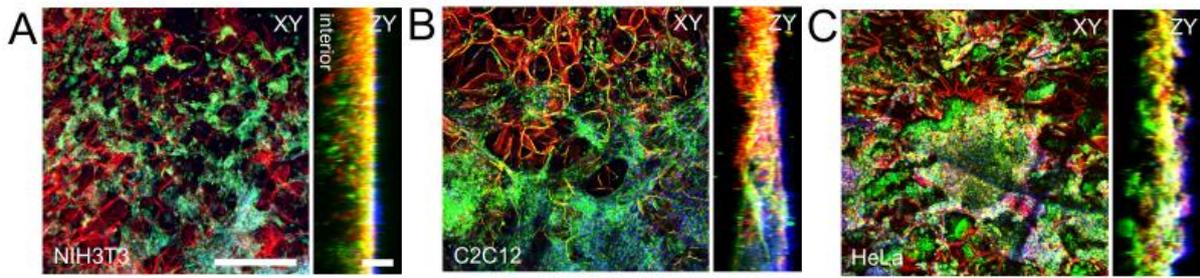


Figura 10: immagini a fluorescenza di A) fibroblasti, B) mioblasti, C) cellule epiteliali HeLa. In rosso è marcata la cellulosa, in verde la membrana cellulare e in blu i nuclei. <sup>[49]</sup>

L'ipanzio della mela è un tessuto ricco di cellulosa e con una densità cellulare bassa: una volta rimossa la parte cellulare, si ottiene uno scaffold in cellulosa caratterizzato da una struttura porosa random, la quale permette la diffusione e il passaggio di nutrienti e di ossigeno. La conformazione random e la dimensione dei pori risultano adeguati per la generazione di tessuti quali quello osseo <sup>[42]</sup> e quello adiposo <sup>[52]</sup>. Il buon livello di rigidità del tessuto e la sua bassa densità cellulare rendono l'ipanzio della mela un tessuto ottimale per la decellularizzazione, e di conseguenza uno dei più studiati per applicazioni nell'ambito dell'ingegneria tissutale. Tuttavia, la sua architettura si adatta poco a tessuti caratterizzati da cellule allineate e ordinate, come il tessuto tendineo o muscolare: per questa ragione sono stati condotti numerosi studi su altri tipi di vegetali al fine di valutarne la potenzialità nell'ambito dell'ingegneria tissutale.

Inizialmente, la ricerca scientifica si è focalizzata sull'analisi di strutture vegetali da utilizzare

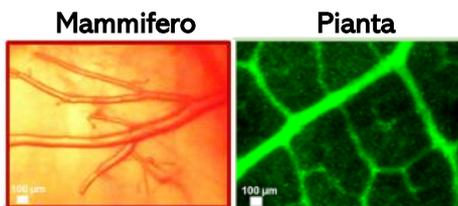


Figura 11: paragone tra rete vascolare animale e sistema di venature nelle piante <sup>[53]</sup>

come supporto per la generazione di una rete vascolare ingegnerizzata: l'opportuna diffusione di nutrienti e di ossigeno al tessuto, infatti, rimane un obiettivo principe dell'ingegneria tissutale e rappresenta una sfida ancora oggi. Sfruttando la

somiglianza tra le venature delle foglie e la rete vascolare umana a livello capillare, evidenziata nella Figura 11, Gershlak et al. <sup>[53]</sup> hanno realizzato un costrutto adatto alla generazione di tessuto cardiaco a partire da foglie di spinacio. Innanzitutto, ogni foglia è stata decellularizzata tramite perfusione, così da non alterare le strutture tubulari delle venature: per verificare che non vi siano danni alle strutture tubulari e che esse rimangano pervie, un colorante rosso viene iniettato all'interno della rete di venature. La Figura 12a mostra la diffusione di tale colorante in tutti i rami, anche quelli più piccoli, della rete, conferma della pervietà delle venature. Successivamente viene effettuata la ricellularizzazione: la parte interna dei tubicini viene

seminata con cellule endoteliali (Figura 12b) mentre quella esterna con cellule mesenchimali e cardiomiociti: dopo 21 giorni i cardiomiociti dimostrano capacità di contrazione e di gestione dei livelli di calcio, prove del fatto che il tessuto stia maturando nel modo corretto. Questo lavoro certifica le elevate potenzialità della decellularizzazione vegetale come tecnica di sviluppo di costrutti vascolarizzati adeguati per la rigenerazione tissutale.

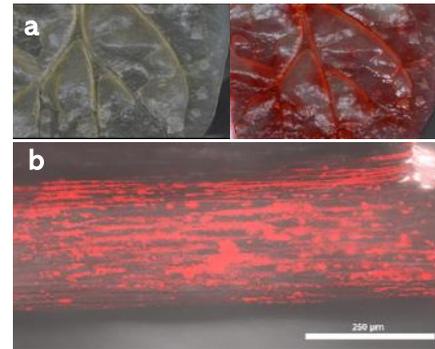


Figura 12: a) iniezione di un colorante rosso nelle venature dello spinacio. b) cellule endoteliali seminate sulla parte interna di una venatura [53].

Studi successivi sulla vascolarizzazione hanno nuovamente sfruttato come scaffold la foglia di spinacio decellularizzato: Dikici et al. [54] hanno esaminato la capacità pro-angiogenica di cellule endoteliali seminate su foglie di baby spinacio rivestite di un coating di gelatina. La decellularizzazione della foglia di baby spinacio è seguita dalla verifica della pervietà delle venature: in seguito, le foglie sono state colonizzate con cellule endoteliali (ECs) e fibroblasti (HDFs), oppure solo con fibroblasti. Per verificare la capacità delle cellule endoteliali di favorire l'angiogenesi è stato effettuato un CAM (chorioallantoic membrane) test, il quale ha dimostrato che il numero di vasi che si generano in seguito all'impianto di uno scaffold vegetale seminato con ECs e HDFs è maggiore rispetto a quello dovuto all'impianto di un costrutto con soli HDFs. La presenza dei fibroblasti, dunque, è cruciale per una migliore vascolarizzazione in quanto queste cellule sono responsabili della generazione di molecole fondamentali della matrice extracellulare, quali collagene e fibronectina, ma anche di fattori pro-angiogenici e fattori di crescita. In seguito è stata valutata la capacità delle cellule endoteliali di migrare al di fuori dei canali da loro colonizzati, ma i risultati sono stati poco soddisfacenti, in quanto solo nel 5% dei test si è osservata migrazione. Ulteriori studi saranno necessari per migliorare la riproducibilità di tali test. Un altro limite di questo studio riguarda l'omogeneità della distribuzione dei vasi nella foglia di spinacio decellularizzata: le cellule endoteliali tendono a disporsi solamente lungo le venature più grosse, non colonizzando i rami più piccoli. Questo può causare difficoltà nell'integrazione del costrutto *in vivo* e nella connessione con le cellule endoteliali indigene.

Nonostante i promettenti risultati sull'utilizzo di foglie decellularizzate come scaffold, sono necessari studi aggiuntivi per comprendere i limiti del processo e le modalità di adattamento della procedura ai diversi tipi di tessuto umano: sebbene gli spinaci risultino adatti per la

generazione di una rete vascolare, uno studio condotto da Jensen et al. [55] ha dimostrato come essi non costituiscano scaffold idonei alla formazione di tubuli renali funzionali. In questo articolo si paragona la funzionalità di tubuli renali generati su scaffold animali (un rene di topo decellularizzato) e su scaffold vegetali (spinacio e erba cipollina decellularizzati). La prima osservazione è che i tempi di decellularizzazione degli scaffold vegetali sono molto più lunghi di quelli animali, presumibilmente a causa della miglior diffusione del solvente attraverso la rete vascolare animale rispetto alla rete di venature vegetali. In secondo luogo, le cellule renali non si distribuiscono in modo uniforme lungo la foglia, ma colonizzano principalmente le venature vicine al petiolo (punto di iniezione delle cellule). Il motivo alla base di queste osservazioni risiede nell'anatomia vegetale della foglia: il petiolo non è direttamente collegato alle venature della foglia, ma separato da loro attraverso una membrana impermeabile che limita la dispersione di acqua. Probabilmente, dunque, in fase di decellularizzazione il solvente non fluisce attraverso le venature, ma piuttosto diffonde in maniera uniforme nel tessuto vegetale. In fase di ricellularizzazione, invece, i problemi si generano perché lo xilema e il floema (organi di trasporto di acqua e nutrienti) sono interconnessi tramite perforazioni, ossia aree in cui si ha carenza di cellule: le cellule epiteliali umane, dunque, tendono ad accumularsi in queste zone senza colonizzare le venature in modo uniforme. Ulteriori problemi sono rappresentati dalla disintegrazione progressiva dei tessuti vegetali e dalla loro scarsa permeabilità, requisito fondamentale per un corretto scambio del soluto renale tra l'interno e l'esterno del tubulo. Da questo articolo emerge l'importanza di condurre studi specifici per ogni singolo tessuto umano e per ogni struttura vegetale decellularizzata, volti a valutare non solo le caratteristiche meccaniche ma anche quelle anatomiche dei tessuti in esame.

Inoltre, sono stati condotti studi di confronto tra diverse strutture vegetali per comprendere quali fossero più adatte alla coltura cellulare, verificandone le proprietà meccaniche e di

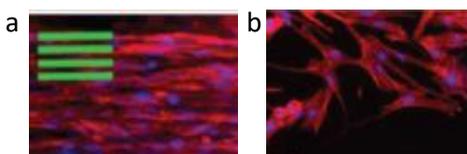


Figura 13: fibroblasti adesi lungo la struttura in cellulosa di diversi scaffold. a) solenostemon, b) prezzemolo [56]

biocompatibilità. Fontana et al. [56] hanno paragonato i gambi di diversi tipi di piante, tra cui bamboo, solenostemon, prezzemolo e vaniglia, focalizzandosi sulla dimensione dei pori prima e dopo la decellularizzazione, sulla capacità di trattenere acqua al

loro interno, sulla degradazione della struttura dovuta alla decellularizzazione, sulla quantità di cellule adese in fase di ricellularizzazione e sul loro allineamento. In questo articolo si

dimostra la tendenza delle cellule a seguire la topografia del tessuto vegetale di supporto, come mostrato nella Figura 13.

Alcuni gruppi di ricerca hanno misurato la rigidità di diversi tipi di strutture vegetali paragonandola a quella di alcuni tessuti umani<sup>[50]</sup>, altri hanno effettuato test di compressione e trazione per valutare il modulo elastico, la rigidità, lo sforzo massimo a rottura e la deformazione residua di alcuni vegetali<sup>[52]</sup>.

Negrini et al.<sup>[52]</sup> hanno studiato in particolare tre vegetali con struttura diversa così da poterli adattare a tessuti umani differenti: la mela, la carota e il sedano. La mela, caratterizzata da pori grandi e distribuiti in modo omogeneo, è stata usata per supportare la crescita di cellule del tessuto adiposo che richiede un efficiente scambio di nutrienti e ossigeno; il modulo elastico dello scaffold vegetale somiglia a quello del tessuto adiposo (4 kPa e 2-3 kPa rispettivamente) ma anche a quello di altri scaffold utilizzati per lo stesso tessuto, come un mix di acido ialuronico e collagene (5-6 kPa) o il tessuto adiposo decellularizzato (2.4 kPa). Effettivamente, la ricellularizzazione di questo scaffold vegetale con cellule precursori del tessuto adiposo ha dato ottimi risultati: l'attività metabolica è aumentata progressivamente nei 14 giorni di coltura, e dal giorno 7 si è verificato il differenziamento. Il secondo vegetale, la carota, è stato usato come supporto per il tessuto osseo: i pori sono orientati radialmente nella zona centrale, mentre assumono forma arrotondata e dimensioni maggiori nelle zone periferiche. Questa struttura eterogenea è risultata particolarmente adatta per la semina e la coltura di pre-osteoblasti, sebbene le proprietà meccaniche dello scaffold vegetale siano molto inferiori rispetto a quelle dell'osso: il modulo a compressione, infatti, risulta essere pari a circa 43 kPa per la carota decellularizzata, mentre si aggira intorno a qualche GPa per l'osso. Tuttavia, scaffold con proprietà simili sono stati usati per la ricrescita di tessuto osseo non sottoposto a carico, dunque questa è la possibile applicazione della matrice vegetale in esame. Anche in questo caso la semina e il differenziamento hanno prodotto ottimi risultati, evidenziati dalla produzione di matrice extracellulare ad opera delle cellule differenziate. In ultimo, il sedano è stato sfruttato per la generazione di tessuto tendineo: i pori di tale vegetale, infatti, sono caratterizzati da una forma allungata e orientati lungo l'asse longitudinale del sedano stesso, formando canali paralleli tra loro. Anche in questo caso le proprietà meccaniche dello scaffold vegetale sono molto inferiori rispetto a quelle del tessuto umano, ma paragonabili a quelle di altre matrici utilizzate come supporto per lo stesso tipo di coltura cellulare, quali idrogeli in GelMA-alginato oppure scaffold in fibroina della seta. I fibroblasti

seminati, dopo 14 giorni presentano un aumento dell'attività metabolica e un allineamento variabile in base alla zona in cui sono state seminate le cellule.

Grazie alla sua struttura allineata, il sedano è stato utilizzato come supporto per la crescita di tessuto muscolare: Campuzano et al. <sup>[57]</sup> hanno dimostrato che il sedano guida l'allineamento dei mioblasti pre-differenziati ma anche differenziati, permettendo la generazione di un tessuto muscolare più simile a quello presente *in vivo*. In questo campo, anche il cipollotto si è dimostrato un buon supporto, come confermato dai lavori di Cheng et al <sup>[58]</sup>.

In ambito osseo, invece, oltre alla mela e alla carota risulta di interesse il cavolo: Salehi et al. <sup>[59]</sup> hanno ottenuto risultati interessanti colonizzando una foglia di cavolo con cellule mesenchimali derivate dal midollo osseo poi indotte a differenziare.

Nell'ultimo decennio diverse strutture vegetali sono state studiate *in vitro* per comprendere la loro adeguatezza nel supportare la coltura cellulare, il differenziamento e la vascolarizzazione del tessuto neoformato: architetture più random sono risultate adatte per la rigenerazione di tessuto osseo o adiposo, strutture allineate sono state colonizzate con cellule di tessuto muscolare o tendineo, organi tubulari con cellule endoteliali per la formazione di vasi. Nonostante i risultati promettenti, tuttavia, per l'utilizzo di scaffold vegetali decellularizzati in ingegneria tissutale è necessario uno studio accurato dei tessuti vegetali per verificare che abbiano le caratteristiche adeguate alla rigenerazione del tessuto umano d'interesse, e in secondo luogo è indispensabile valutare la risposta dell'organismo quando tali scaffold vengono impiantati *in vivo*.

Già nel 2016 Modulevski et al. <sup>[60]</sup> hanno condotto uno studio *in vivo* nei topi per verificare la risposta dell'organismo ad uno scaffold di ipanzio di mela decellularizzato e ricellularizzato: le analisi istologiche hanno rivelato una classica reazione da corpo estraneo dopo una settimana, che però si attenuava gradualmente nelle settimane successive. Inoltre, le immagini ottenute evidenziavano la presenza di una rete vascolare nascente, con una lenta e contenuta deformazione del costruito lungo le 8 settimane di osservazione. Tali risultati dimostrano che gli scaffold in cellulosa derivati dalla mela sono biocompatibili, favoriscono la vascolarizzazione e si integrano con l'ambiente fisiologico, rimanendo pressoché inalterati per qualche mese.

La grande varietà di specie vegetali, tessuti e architetture rende tuttavia obbligatorio uno studio molto più approfondito del comportamento dell'organismo umano in risposta all'impianto di scaffold di origine vegetali ricellularizzati. Lee et al. [42] hanno dimostrato che uno scaffold vegetale ottenuto a partire dalla mela decellularizzata e colonizzato con cellule

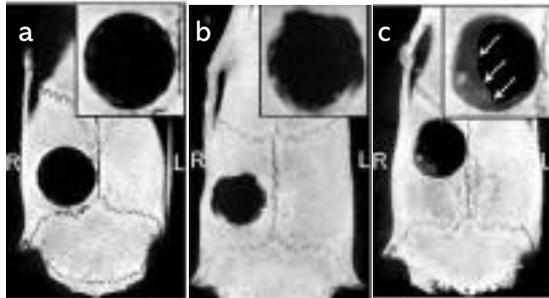


Figura 14: microCT 8 settimane dopo l'impianto dello scaffold nel difetto osseo. a) solo difetto, b) scaffold, c) scaffold+osteoblasti [42]

staminali pluripotenti indotte differenziate in osteoblasti risulta impiantabile ed efficace nella cura di un difetto osseo: l'impianto è stato effettuato in un difetto delle ossa craniche di un ratto, ottenendo un progressivo restringimento dello stesso, come rappresentato nella Figura 14, nell'arco di 8 settimane.

Ad oggi, tuttavia, i dati riguardanti la risposta dell'organismo ad un impianto *in vivo* di uno scaffold vegetale ricellularizzato rimangono insufficienti: è necessario incrementare le analisi di risposta dovuta a diversi vegetali in tessuti differenti e per tempi più lunghi, così da poter comprendere il comportamento a lungo termine dell'organismo e la durata effettiva della singola tipologia di scaffold.

La carenza di dati si riscontra anche nell'ambito della caratterizzazione meccanica dei vegetali decellularizzati, per lo più a causa dell'ampia varietà di strutture vegetali utilizzabili: una sola pianta, infatti, ha caratteristiche molto diverse a seconda che si utilizzi una foglia, il gambo, il frutto o il seme. Per questo, studi sulle proprietà meccaniche dei vegetali utilizzati come supporto sono estremamente utili per predire il successo della ricellularizzazione, per paragonare le diverse strutture tra loro e per confrontarle con i tessuti umani.

Un ulteriore punto di interesse è l'evoluzione dei protocolli utilizzati per la decellularizzazione: come descritto in precedenza, i protocolli più comunemente usati si basano sulla decellularizzazione chimica del tessuto vegetale ad opera del sodio dodecil solfato (SDS) [51], [53], [57], che risulta più efficace rispetto ad altri composti quali TritonX e PEG nel decellularizzare completamente un tessuto [17], pur mantenendo la matrice extracellulare dello stesso intatta sia morfologicamente sia a livello compositivo. Poiché i tessuti vegetali sono molto diversi tra loro, per decellularizzarli si usano tecniche diverse: se sono presenti venature o strutture tubulari, come nel caso delle foglie, si adotta la perfusione, altrimenti si immerge il tessuto nella soluzione di SDS e lo si pone in agitazione per alcuni giorni. Nel caso in cui si usi la

perfusione, il protocollo base è quello pubblicato su Nature da Guyette et al. nel 2014 <sup>[37]</sup>, ottimale per organi animali e adattato alle strutture vegetali <sup>[53], [54]</sup>.

Tuttavia, il sodio dodecil solfato ha il difetto di essere citotossico, dunque è necessario un'accurata rimozione dei residui dopo l'avvenuta decellularizzazione: mentre inizialmente ci si limitava a lavare il tessuto vegetale con numerosi passaggi in PBS, nel 2018 Hickey et al. <sup>[61]</sup> hanno introdotto uno step di lavaggio con una soluzione di CaCl<sub>2</sub> al fine di rimuovere in modo più efficace i residui di SDS. La presenza di questo sale, infatti, altera la concentrazione critica delle micelle di SDS: superata la concentrazione limite, le micelle diventano insolubili e sono molto più semplici da rimuovere dal tessuto decellularizzato. Questo passaggio aggiuntivo è stato riproposto anche in altri protocolli, vista la sua efficacia <sup>[62]</sup>.

Nonostante la comprovata efficacia dell' SDS, in letteratura sono presenti diversi protocolli alternativi che preferiscono evitare l'uso di un agente chimico così aggressivo: vengono proposti metodi di decellularizzazione senza detergente, sfruttando solamente candeggina e bicarbonato <sup>[61]</sup> oppure metodi enzimatici <sup>[63]</sup>. Anche se i risultati sono positivi, la semplicità di utilizzo e l'efficacia dell' SDS rendono questo agente chimico il più comunemente usato, ad oggi, per la decellularizzazione di tessuti.

In conclusione, la decellularizzazione di strutture vegetali è un ambito di ricerca in espansione i cui risultati nel campo dell'ingegneria dei tessuti sono altamente promettenti. La biocompatibilità e citocompatibilità degli scaffold vegetali è stata provata in diversi studi, così come la loro adeguatezza nel supportare la proliferazione e il differenziamento di vari tipi cellulari. Tali matrici risultano particolarmente promettenti per una miglior vascolarizzazione del costrutto cellularizzato *in vivo* e dunque per un'integrazione ottimale dello stesso in ambiente fisiologico. La grande varietà di organi vegetali disponibili in natura, inoltre, consente di realizzare scaffold con proprietà meccaniche e strutturali molto diverse tra loro e adattabili alla generazione di tessuti umani differenti. In ultimo, poiché la cellulosa è uno dei polisaccaridi più abbondanti in natura, la decellularizzazione vegetale minimizza, per quanto possibile, l'utilizzo di composti sintetici e dunque l'impatto ambientale della ricerca in questo ambito.

Visti i promettenti risultati dell'utilizzo di strutture vegetali come supporto, diverse tecnologie già comprovate, come la stampa 3D e gli organ-on-a-chip, hanno attinto da questa nuova procedura per migliorare alcuni aspetti del loro funzionamento <sup>[64], [65], [66]</sup>. Nel dettaglio, Mao et al. <sup>[66]</sup> hanno mimato la rete di venature tipica delle foglie per realizzare una rete vascolare

che collegasse i diversi organi tra loro: la struttura della foglia è stata acquisita da un CAD, modificata con l'introduzione di alcune camere (seminate con cellule di diversi organi) e poi stampata in PDMS. Il chip risultante è quello mostrato in Figura 15.

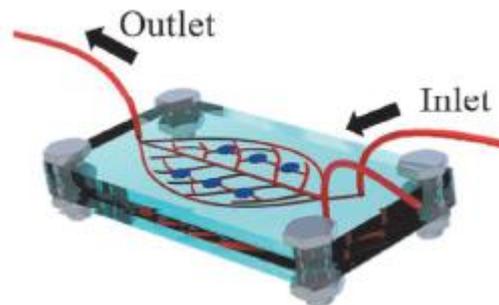


Figura 15: schema del sistema vascolare biomimetico<sup>[66]</sup>

Un altro gruppo di ricerca, invece, si è focalizzato sull'automatizzazione del processo di decellularizzazione vegetale: una volta decellularizzato un cavolfiore, la sua architettura viene acquisita da un CAD, così da poter essere stampata in diverse dimensioni, usando polimeri sintetici quali il PLA<sup>[65]</sup>. Sviluppi futuri potrebbero riguardare l'utilizzo di un bioink per stampare il costrutto, o la realizzazione di un human-on-a-leaf. Inoltre, tecniche legate all'ambito agrario sono state sfruttate per migliorare gli scaffold vegetali: per esempio, per generare una rete vascolare completa di un input, corrispondente alla parte arteriosa, e un output, corrispondente alla parte venosa, è stato fatto il grafting di due foglie di *Aptenia cordifolia*<sup>[67]</sup>. Il grafting è una procedura che consiste nel far aderire orizzontalmente due foglie di dimensioni simili, rimuovendo una parte dell'epidermide da ognuna e forzandole ad unirsi tramite due reti di plastica poste in corrispondenza delle estremità. In questo studio, il grafting viene effettuato in maniera tale che i due petioli delle foglie risultino alle estremità opposte: inserendo una canula in ogni petiolo, si ottiene un sistema di input-output assimilabile ad una rete vascolare completa. Inoltre, la presenza di due foglie permette di rendere più tridimensionale il costrutto. Il risultato è mostrato nella Figura 16.

I limiti legati all'utilizzo di matrici di origine vegetale, tuttavia, sono ancora molti e di difficile risoluzione. Innanzitutto, la cellulosa non è degradabile da enzimi presenti nel corpo umano: gli scaffold rimangono integri per oltre 8 settimane<sup>[42]</sup>, mantenendo le loro proprietà strutturali e meccaniche. Sono state proposte diverse soluzioni: nel 2012 è stato scoperto un gruppo di enzimi in grado di degradare la cellulosa, ma i cui

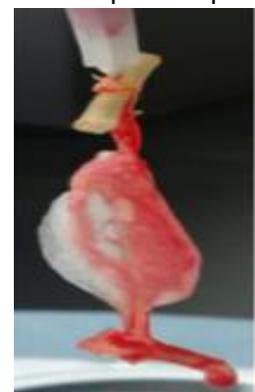


Figura 16: perfusione di cellule sanguigne di un grafting due foglie di *Aptenia cordifolia*<sup>[67]</sup>

effetti sull'adesione cellulare erano fortemente negativi <sup>[46]</sup>; nei primi anni 2000 si è studiata una forma di cellulosa ossidata, degradabile per idrolisi, ottenuta tramite l'inserimento di agenti ossidanti nella catena polisaccaridica (NaClO<sub>2</sub>). Tuttavia, per gli scaffold ottenuti da piante il problema non è ancora stato risolto, a causa della presenza di altri componenti oltre alla cellulosa, quali lignina e pectina. Inoltre, si hanno ancora dati insufficienti sulla risposta del corpo umano all'impianto di uno scaffold vegetale ricellularizzato: la presenza di residui del detergente di decellularizzazione, di residui cellulari, di proteine vegetali non riconosciute dall'organismo umano sono fattori che causano immunogenicità e che possono essere critici per l'integrazione del costrutto *in vivo*. La carenza di studi al riguardo limita la comprensione degli effetti di uno scaffold vegetale impiantato *in vivo*, sebbene i pochi risultati presenti in letteratura siano promettenti: l'iniziale reazione da corpo estraneo si attenua nel tempo <sup>[60]</sup> e i costrutti vascolarizzati *in vitro* stimolano l'angiogenesi anche *in vivo* <sup>[54]</sup>. Ulteriori problemi sono la parziale distruzione meccanica della struttura vegetale ad opera degli agenti di decellularizzazione e la scarsa attività biologica degli scaffold, che ad oggi fungono solamente da supporto per la crescita cellulare.

## RAZIONALE

Il presente lavoro ha come obiettivo l'identificazione di un protocollo di decellularizzazione semplice, efficace e versatile per strutture vegetali e la caratterizzazione meccanica, morfologica e composizionale di tali strutture. In questo lavoro scaffold di origine vegetale realizzati a partire da piante anche mai analizzate finora, sono stati studiati per verificare le loro potenzialità nell'ambito della rigenerazione dei tessuti.

Nel mondo vegetale è presente una moltitudine di strutture molto diverse tra loro, non solo variabili da pianta a pianta ma anche a seconda del tessuto vegetale che viene preso in esame. Ad oggi gli che paragonano le proprietà meccaniche e strutturali di organismi vegetali con quelle dei tessuti umani sono limitati: i risultati di tali studi, però, sono indispensabili per discriminare quanto uno scaffold di origine vegetale potrà essere adatto alla coltura di determinati tipi cellulari.

In questo lavoro sono proposte tre caratterizzazioni: test meccanici a compressione, analisi FTIR in trasmittanza e studi sull'angolo di contatto.

I test a compressione analizzano le proprietà elastiche, plastiche e di resistenza a rottura del materiale: dai dati si possono calcolare il modulo elastico a compressione, la resistenza a rottura e la massima deformazione del materiale in esame.

L'analisi a spettroscopia FTIR, invece, studia l'assorbimento della luce nello spettro infrarosso da parte del campione: ogni materiale ha un proprio spettro specifico, per cui questa tecnica è molto usata per riconoscere chimicamente il materiale di composizione del campione.

Infine, l'angolo di contatto misura l'idrofilicità del materiale. Le tre caratterizzazioni, dunque, permettono di descrivere in maniera sufficientemente accurata dal punto di vista meccanico e chimico i campioni in analisi. Da un punto di vista morfologico, invece, le strutture vengono caratterizzate tramite immagini a fluorescenza: il colorante utilizzato è il Calcofluor White, il quale si lega alla cellulosa delineando la morfologia del campione in esame.

In questo lavoro vengono studiati, nel dettaglio, la mela, il kiwi e la melanzana: per ogni frutto vengono paragonati campioni non trattati, campioni decellularizzati e campioni liofilizzati, così da comprendere come variano le proprietà nelle diverse condizioni. In seguito, i valori ottenuti vengono paragonati con quelli di alcuni tessuti umani.

Per verificare che il protocollo di decellularizzazione sia efficace e versatile sono stati testati, oltre ai tre frutti sopra citati, il broccolo e il sedano. Le immagini ottenute tramite microscopio elettronico a scansione (SEM) sono usate come conferma dell'avvenuta decellularizzazione,

già valutata qualitativamente attraverso il cambiamento della pigmentazione del tessuto vegetale, che assume una colorazione bianca e traslucida.

In ultimo, per studiare la capacità da parte degli scaffold ottenuti di ospitare cellule umane, sulle matrici decellularizzate e liofilizzate sono stati seminati dei fibroblasti.

# SPERIMENTAZIONE

## MATERIALI e METODI

**Decellularizzazione:** i vegetali in analisi sono stati tagliati in fettine sottili (1 mm), servendosi di una mandolina, per raggiungere una buona precisione del taglio. Successivamente è stata preparata la soluzione acquosa di sodio dodecil solfato (SDS): si è usata una concentrazione pari allo 0.1% w/v di SDS per il kiwi, il sedano e il pomodoro, una pari allo 0.5% w/v per la melanzana, la mela e il broccolo.

I vegetali sono stati lasciati in immersione nell' SDS per circa 72h in agitazione utilizzando uno stirrer (velocità di rotazione pari a 70 rpm) o in alternativa una piastra basculante, per minimizzare gli stress meccanici. L'apparato tecnico utilizzato è mostrato nella Figura 17.

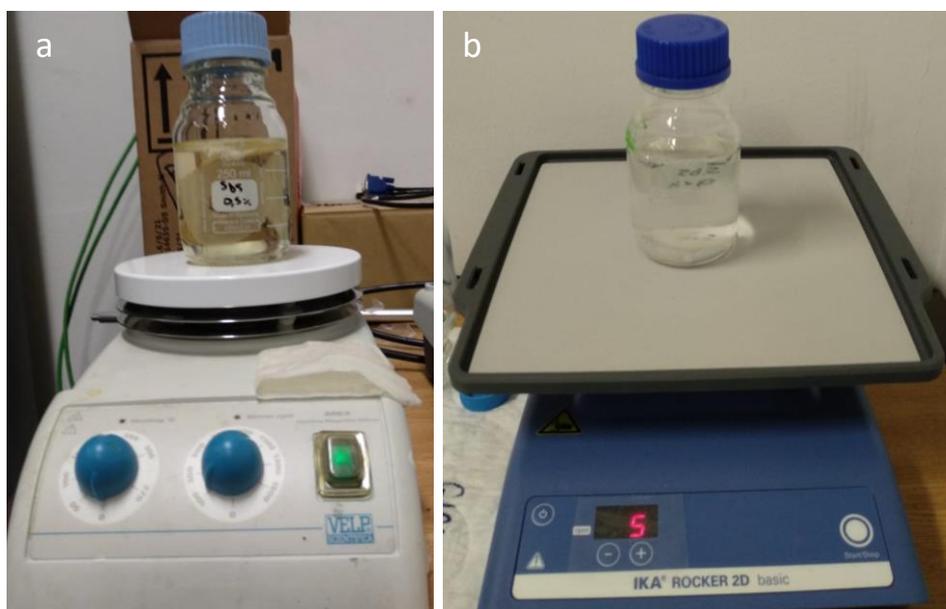


Figura 17: apparato utilizzato per la decellularizzazione: a) stirrer; b) piastra basculante

Dopo 72h le fette sono state tolte dalla soluzione e, dopo due lavaggi in soluzione salina a pH 7.4 (PBS), immerse in una soluzione acquosa di  $\text{CaCl}_2$  0.1 M per 6h in modo da rimuovere i residui di SDS, tossici per le cellule. Sono seguiti altri due lavaggi in PBS e la sterilizzazione tramite immersione in una soluzione di etanolo al 70% per 30min. Dopo due lavaggi in PBS, i campioni sono stati liofilizzati e poi conservati in frigorifero.

Il processo qui descritto è stato effettuato sia per decellularizzare fette dello spessore pari a 1 mm, sia per cubi di dimensioni pari a  $1 \text{ cm}^3$ : in questo caso i campioni sono rimasti in immersione per un tempo pari a 7g, cambiando la soluzione dopo 3g.

I vegetali utilizzati per le analisi meccaniche sono: mela, kiwi e melanzana.

**Funzionalizzazione superficiale:** i campioni decellularizzati e liofilizzati sono stati situati in una piastra multiwell da 24 pozzetti e ulteriormente sterilizzati tramite raggi UV per 30min su ciascun lato. Successivamente, sono stati trattati in tre diversi modi: 1) sospensione cellulare di gelatina; 2) immersi nel terreno di coltura overnight; 3) non trattati.

**Semina cellulare:** fibroblasti umani (HFF-1, ATCC) sono stati coltivati in una capsula petri in mezzo di coltura (DMEM + streptomina e penicillina + SBF). Le cellule adese alla superficie della capsula petri sono poi state staccate e diluite per raggiungere una concentrazione pari a 20.000 cellule / 10  $\mu$ L. Sono state seminate 3 gocce di tale soluzione cellulare su ogni campione ed il costrutto è stato posto in incubatore (37°C, 5% di CO<sub>2</sub> e 95% di umidità) per 30min per favorire l'adesione cellulare. Successivamente, i campioni cellularizzati sono stati immersi nel mezzo di coltura e tenuti in incubatore fino a 7 giorni per valutare la proliferazione cellulare. Per la sospensione cellulare in gelatina sono state sospese  $5 \cdot 10^4$  cellule in una soluzione al 10% w/v di gelatina porcina di tipo A (precedentemente sterilizzata tramite UV) disciolta nel mezzo di coltura.

**Staining a fluorescenza:** i campioni sono stati fissati con la paraformaldeide PAF (4%) per 40-60min e successivamente lavati in PBS per 5min.

1. DAPI: per lo staining dei nuclei cellulari è stato usato il DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindolo), in concentrazione 1:1000 diluito in PBS. I campioni sono stati trattati per 10min in Triton-X (0.5%), sottoposti a 2 lavaggi in PBS e successivamente immersi nella soluzione di DAPI per 10min su piastra basculante. I campioni sono stati quindi lavati in PBS due volte, montati su un vetrino e visualizzati al microscopio a fluorescenza.
2. CALCOFLUOR WHITE (CFW): i campioni fissati sono stati immersi in una soluzione ClearSee (xilitolo 10% w/v, urea 25% w/v e sodio desossicolato 15% w/v in acqua) per una settimana. Successivamente, i campioni sono stati immersi per 60min in una soluzione di Calcofluor White (Sigma-Aldrich) allo 0,1% v/v diluito in ClearSee. I campioni sono stati quindi lavati in acqua o ClearSee per 30min e visualizzati al microscopio a fluorescenza. In esperimenti successivi si è provato ad immergere direttamente i campioni da analizzare in una soluzione acquosa di Calcofluor White allo 0,1% v/v. I risultati sono comunque soddisfacenti.

Sono state effettuate procedure di staining per verificare l'adesione e la proliferazione cellulare fissando i campioni dopo 24h, 72h e 7g di coltura.

**SEM:** i campioni sono stati incollati su appositi sostegni e quindi ricoperti con un sottile strato metallico per essere così analizzati al microscopio a scansione elettronica. I campioni analizzati sono: mela, melanzana e kiwi decellularizzati e successivamente liofilizzati.

**TEST A COMPRESSIONE MECCANICA:** sono stati compressi campioni sottoforma di cubetti del volume pari a  $1 \text{ cm}^3$  circa utilizzando la macchina Qtest10, MTS.

Sono stati testati:

- mela fresca (m\_f), mela liofilizzata con cellule (m\_l), mela decellularizzata (m\_d) e mela decellularizzata liofilizzata (m\_dl);
- melanzana fresca (mz\_f), melanzana liofilizzata con cellule (mz\_l), melanzana decellularizzata (mz\_d) e melanzana decellularizzata liofilizzata (mz\_dl);
- kiwi fresco (k\_f), kiwi liofilizzato con cellule (k\_l), kiwi decellularizzato (k\_d) e kiwi decellularizzato liofilizzato (k\_dl).

I vegetali liofilizzati sono stati testati a secco, gli altri esemplari in umido. Per la mela fresca e la melanzana fresca si è usata una cella di carico di 50N, per gli altri campioni, invece, una cella di carico di 10N. Tutti i campioni sono stati compressi con una velocità pari a  $1 \text{ mm/min}$ . Per ogni tipologia di campione sono stati compressi 4 o 5 esemplari: i valori di modulo di Young e di massimo allungamento percentuale sotto sforzo sono stati ottenuti tramite Excel e rappresentati sotto forma di grafico. Per poter paragonare i diversi vegetali tra loro si sono calcolati media e deviazione standard per ogni gruppo di campioni e si sono rappresentati i valori sotto forma di istogramma.

**ANALISI FT-IR:** i campioni tagliati in fettine dello spessore pari a  $1 \text{ mm}$  sono stati sottoposti a spettroscopia ad infrarosso tramite la macchina Nicolet iS 50 spectrometer. L'analisi è stata condotta per verificare che la componente principale degli scaffold in esame fosse la cellulosa, come da ipotesi: è stato fatto uno studio in trasmittanza, con range di numero d'onda compreso tra  $600 \text{ cm}^{-1}$  e  $4000 \text{ cm}^{-1}$ . I campioni testati sono:

- m\_f, m\_d, m\_dl;
- mz\_f, mz\_d, mz\_dl;

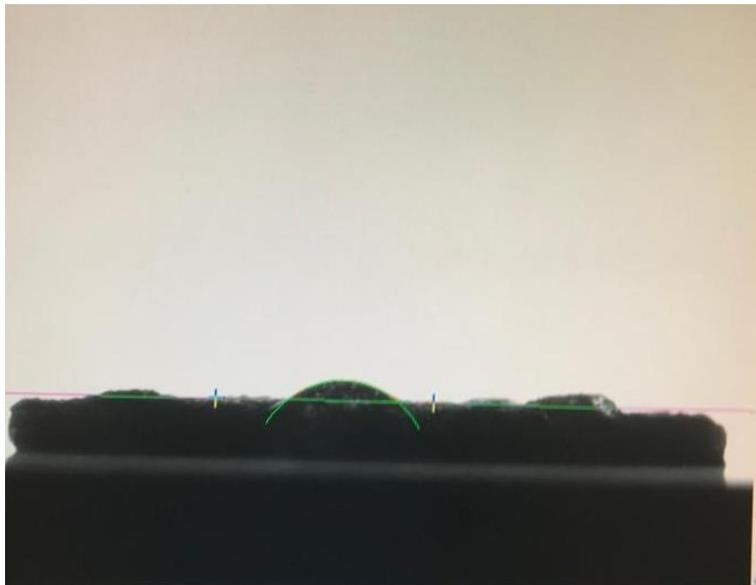
- $k_f, k_d, k_{dl}$ ;

Gli spettrogrammi sono stati confrontati tra loro per controllare se ci fossero picchi non presenti in ogni grafico, e poi confrontati con lo spettro della cellulosa per verificare che ci fossero i picchi caratteristici.

**ANGOLO DI CONTATTO:** i campioni tagliati in fettine sottili da 1 mm sono stati sottoposti a misurazione tramite la macchina Kruss DSA 10 equipped with a videocamera. Su ogni campione è stata depositata una singola goccia, e sono stati testati due campioni per ognuno dei tipi sotto elencati:

- $m_f, m_d, m_{dl}$ ;
- $mz_f, mz_d, mz_{dl}$ ;
- $k_f, k_d, k_{dl}$ .

Nella Figura 18 è mostrato un esempio della misurazione dell'angolo di contatto di una goccia di acqua depositata sulla superficie in analisi, a partire dalla foto scattata dall'operatore.



*Figura 18: esempio della misurazione dell'angolo di contatto a partire da una foto scattata dall'operatore della goccia d'acqua deposta sulla superficie in analisi*

## RISULTATI

### *Decellularizzazione*

Il primo obiettivo del presente lavoro è l'identificazione di un protocollo di decellularizzazione semplice, efficace e versatile, adatto per diversi tessuti vegetali.

L'avvenuta decellularizzazione viene valutata a livello qualitativo tramite analisi visiva della colorazione dei campioni, e successivamente tramite immagini al SEM per verificare il mantenimento della struttura del vegetale in esame e per controllare che non vi siano residui cellulari. Inoltre, è stato fatto un staining per confrontare la struttura in cellulosa nei vegetali decellularizzati e cellularizzati: per la rete di cellulosa si è usato un colorante blu (Calcofluor White, Sigma-Aldrich).

Come si può vedere dalla Figura 19, il protocollo di decellularizzazione è efficace per vari tipi di vegetali testati, nell'ordine: broccolo, kiwi, melanzana e mela. L'immagine mette a confronto una fetta di ciascun vegetale prima e dopo la decellularizzazione: è evidente che la colorazione dei campioni trattati varia considerevolmente virando verso un bianco traslucido, come atteso. A livello qualitativo, dunque, si osserva una buona decellularizzazione in tutti i vegetali testati.

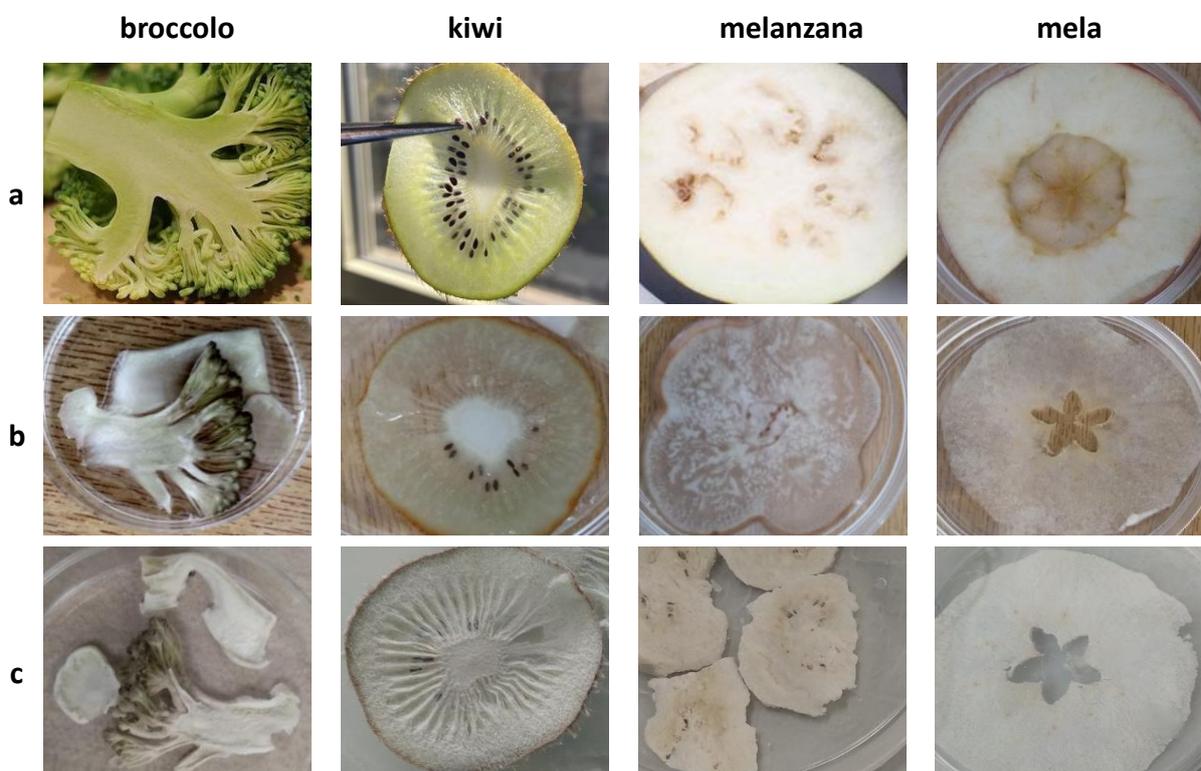


Figura 19: confronto tra vegetali a) freschi: nell'ordine, b\_f, k\_f, mz\_f, m\_f; b) decellularizzati: nell'ordine b\_d, k\_d, mz\_d, m\_d; c) liofilizzati: nell'ordine b\_dl, k\_dl, mz\_dl, m\_dl. b=broccolo

Una volta verificata la versatilità del protocollo ci si è concentrati sull'analisi dei tre frutti utilizzati per la caratterizzazione meccanica: nella Figura 20 sono mostrate le strutture ottenute tramite analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM) di mela, melanzana e kiwi. La mela e la melanzana hanno una struttura porosa randomica e interconnessa. I pori della melanzana hanno dimensione abbastanza variabile e le fibre di cellulosa sono sottili e molto ramificate, come è evidente dall'ingrandimento nella Figura 20d; nel caso della mela, invece, la cellulosa forma celle di dimensione abbastanza regolare con pareti compatte: i diversi strati sono connessi tramite dei piccoli pori distribuiti randomicamente tra le celle (Figura 20a,b). Il kiwi differisce rispetto agli altri due vegetali in quanto ha una struttura molto variabile a seconda del punto di osservazione: nell'immagine vengono rappresentati uno dei canalini centrali che collega la parte dura al centro con la polpa nella zona periferica (Figura 20e) e un ingrandimento dello stesso (Figura 20f). All'interno del canale, la cellulosa si dispone in modo differente a seconda che sia verso il centro o verso la periferia. Analizzando la struttura dall'esterno verso l'interno si identificano tre zone: la prima è caratterizzata da pori di dimensione regolare che tendono ad allinearsi lungo l'asse longitudinale del canale, nella seconda le fibre di cellulosa sono allineate trasversalmente e molto compatte, mentre nell'ultima zona le fibre hanno un'orientazione variabile, sono molto dense ma tendono a formare dei pori molto grossi e poco regolari. Nell'ingrandimento si apprezza con maggior dettaglio l'allineamento longitudinale dei pori nella prima zona del canale.

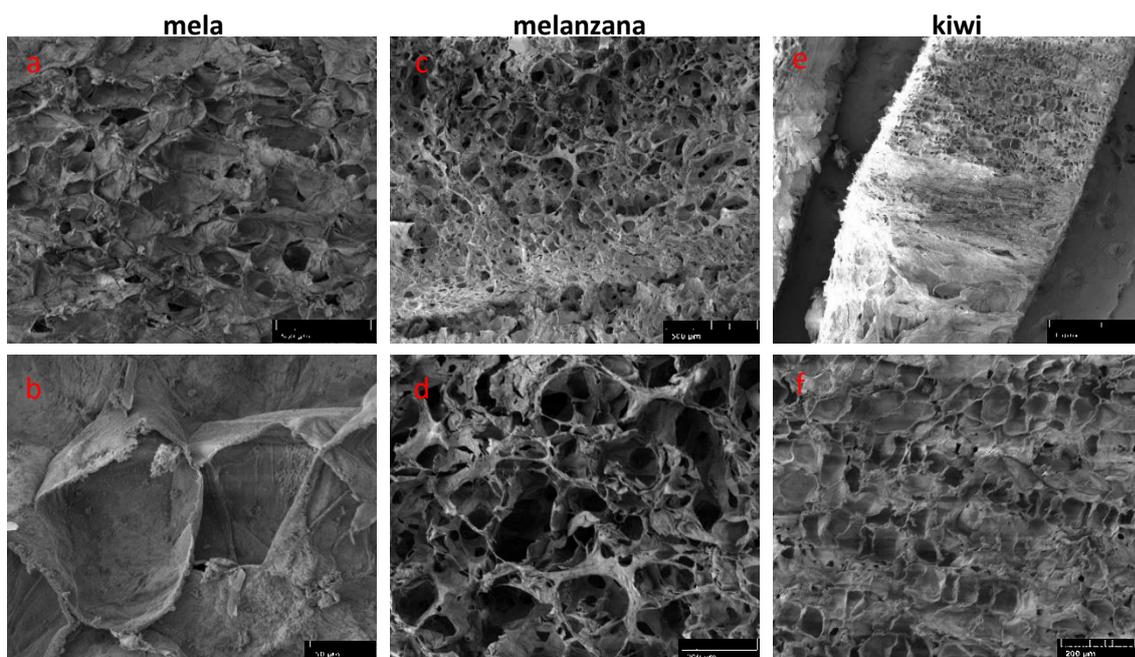


Figura 20: immagini al microscopio a scansione elettronica (SEM) di mela, melanzana e kiwi. a), c) ingrandimento 100x, scale bar 500 $\mu$ m b) ingrandimento 700x, scale bar 50 $\mu$ m d) ingrandimento 200x, scale bar 1mm e) ingrandimento 50x, scale bar 200  $\mu$ m f) ingrandimento 500x, scale bar 200  $\mu$ m

Infine, nella Figura 21a sono visualizzate le fibre in cellulosa dei tre vegetali decellularizzati, liofilizzati, oppure non trattati: è evidente dalle immagini che la struttura non viene alterata durante il processo di decellularizzazione. La cellulosa, marcata in blu tramite l'uso del Calcofluor White (Sigma-Aldrich), è ben evidente in entrambe le condizioni e forma una rete interconnessa che rimane pressoché inalterata prima e dopo il trattamento. Le immagini confermano quanto evinto dal SEM: mentre la mela e la melanzana hanno una struttura più randomica, con pori di dimensione regolare la mela e più variabile la melanzana, il kiwi mostra una struttura allineata lungo il canale. Inoltre, in Figura 21b è rappresentata la zona centrale del kiwi, molto diversa dal canale perché caratterizzata da pori di dimensione piccola e organizzati in maniera randomica.

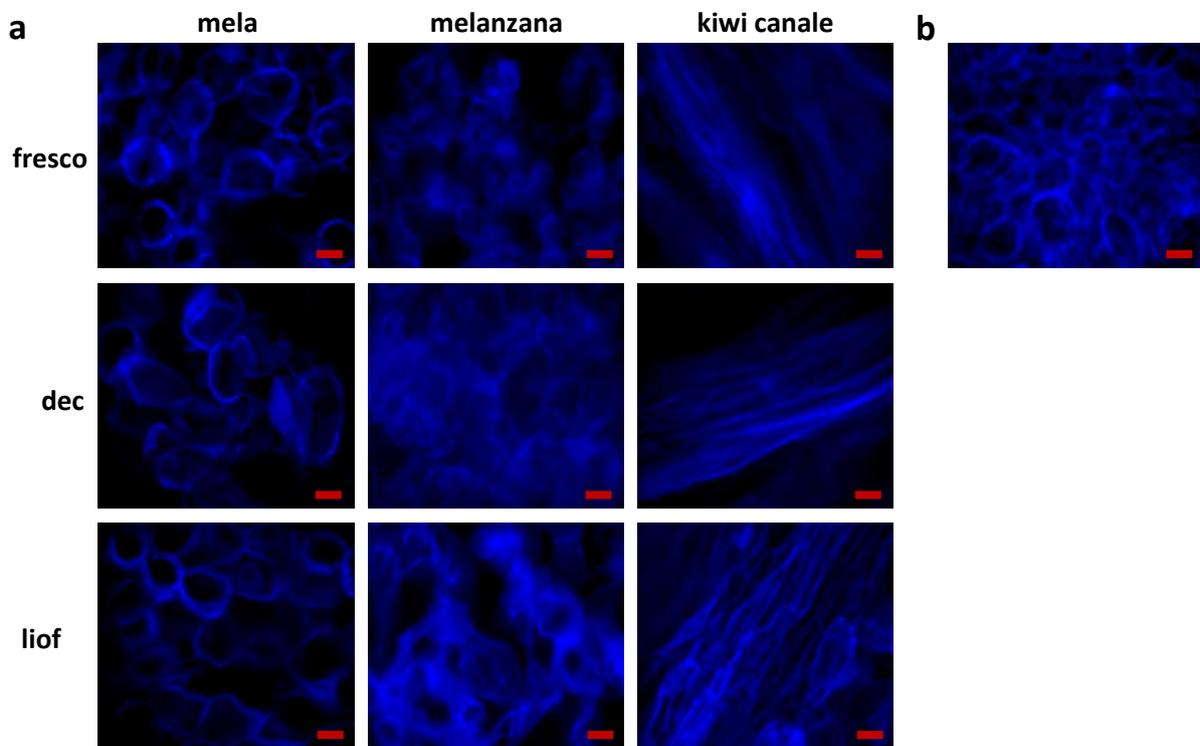


Figura 21: a) staining della cellulosa fatto con CFW per i tre diversi vegetali nelle diverse condizioni; b) dettaglio della struttura della parte centrale del kiwi fresco. dec=decellularizzato, liof\_liofilizzato. scale bar 100µm

## Caratterizzazione meccanica

Le analisi proposte nel presente lavoro per ottenere una caratterizzazione meccanica dei materiali sono la prova meccanica a compressione, l'analisi FTIR e lo studio dell'angolo di contatto.

Dalla prova meccanica a compressione, condotta su 5 provini per ogni gruppo di campioni, sono stati dedotti il modulo di Young e il massimo allungamento percentuale medi: poiché la maggior parte dei provini non si rompe, ma si schiaccia diventando molto sottile, il secondo valore è stato calcolato prendendo a riferimento l'ultimo punto rappresentato sul grafico sforzo-deformazione ottenuto in seguito alla prova meccanica.

Per ogni provino è stata misurata l'area della base così da poter calcolare, a partire dalla forza misurata dalla macchina, il modulo di Young ( $E$ ): esso si ottiene dalla formula  $E = F/A$  indicando con  $F$  la forza di compressione e con  $A$  la sezione del provino compresso. Quest'ultima viene considerata costante nel tempo, sebbene in realtà essa aumenti man mano che il provino viene schiacciato.

L'allungamento percentuale del provino, invece, si calcola misurando l'avanzamento massimo della traversa in rapporto alla lunghezza iniziale del provino.

I valori medi relativi al modulo di Young e all'allungamento massimo percentuale dei campioni di mela, melanzana e kiwi sono riportati rispettivamente nella Figura 22, nella Figura 23 e nella Figura 24: il modulo elastico è misurato in kPa, l'allungamento percentuale è adimensionale. In ogni grafico viene rappresentato un singolo vegetale nelle quattro condizioni precedentemente descritte: fresco, liofilizzato, decellularizzato e decellularizzato liofilizzato.

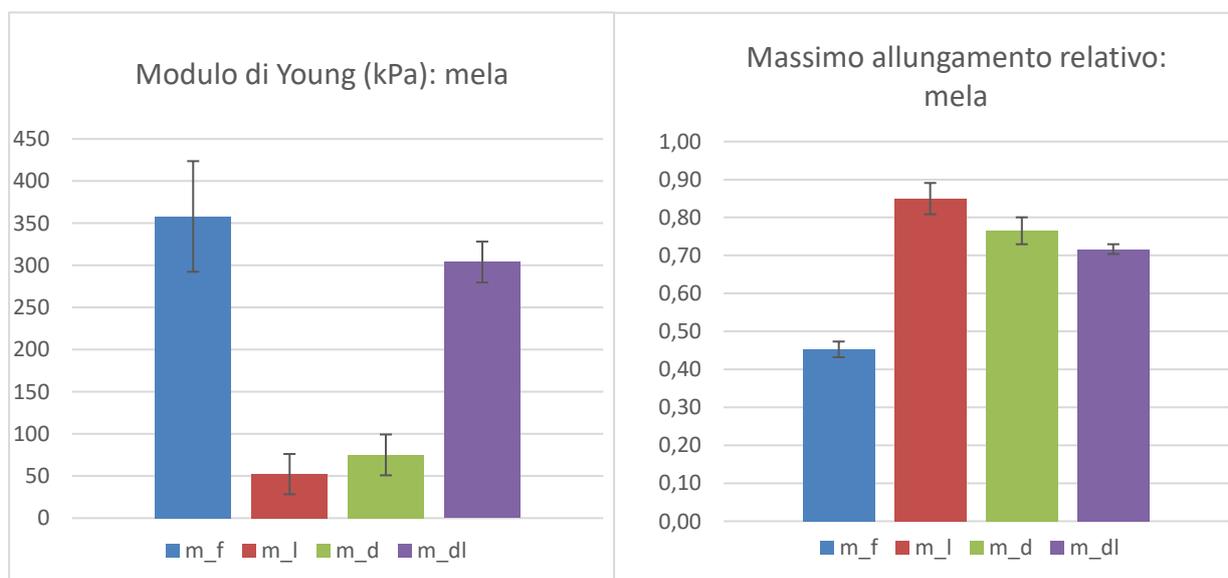


Figura 22: modulo di Young e allungamento massimo relativo della mela nelle 4 condizioni

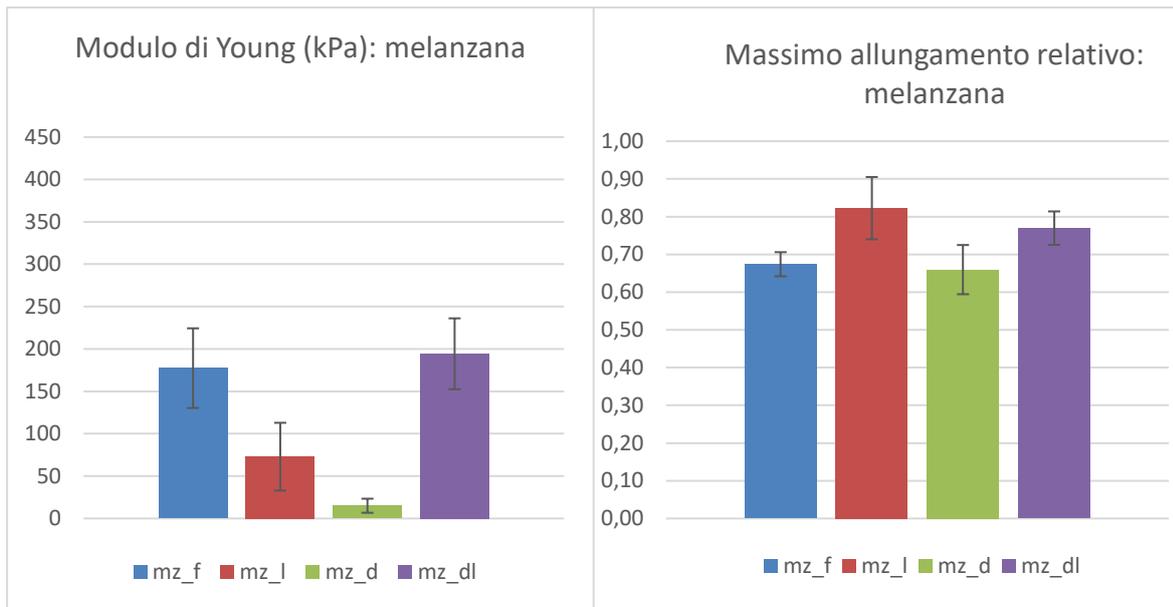


Figura 23: modulo di Young e allungamento massimo relativo della melanzana nelle 4 condizioni

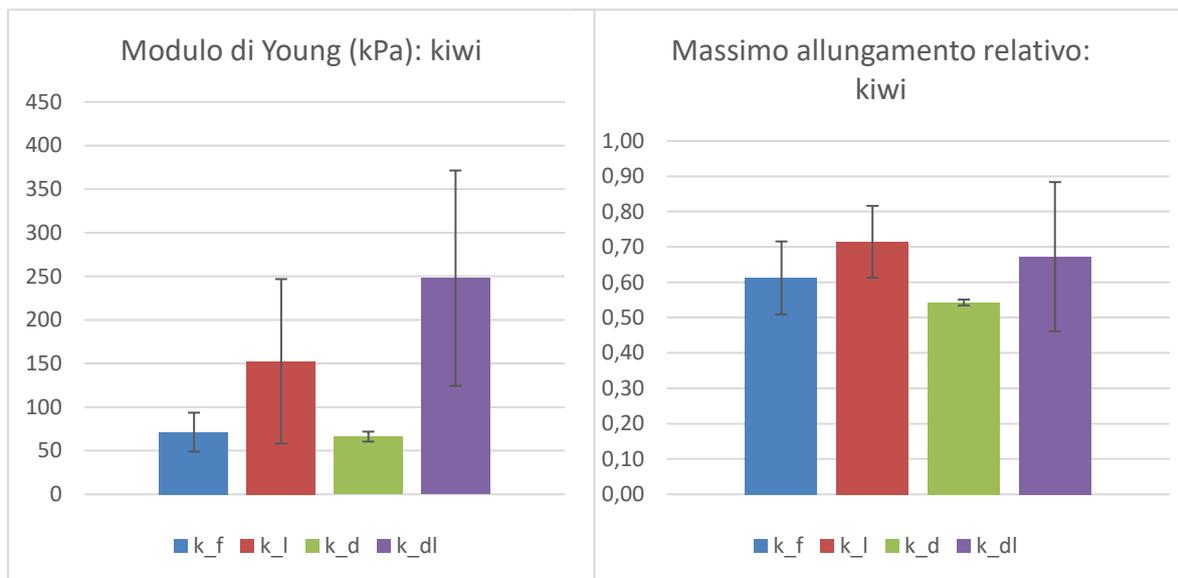


Figura 24: modulo di Young e allungamento massimo relativo del kiwi nelle 4 condizioni

La mela e la melanzana, entrambe caratterizzate da un tessuto denso la cui porosità è randomica, presentano un andamento simile: in entrambi i casi il modulo elastico del frutto fresco è molto più alto rispetto a quelli del frutto liofilizzato e decellularizzato, mentre ha valori paragonabili a quelli dei campioni decellularizzati e liofilizzati. Anche l'allungamento massimo percentuale mostra andamenti simili: mela e melanzana fresche sono meno comprimibili rispetto alle condizioni successive, ad eccezione della melanzana decellularizzata i cui valori sono paragonabili a quelli della melanzana fresca. Il kiwi, invece, ha un

comportamento differente: i campioni liofilizzati hanno un modulo elastico più elevato rispetto a quelli freschi o decellularizzati, ma il modulo di Young più elevato si ha nel caso di campione decellularizzato e successivamente liofilizzato. Per quanto riguarda l'allungamento percentuale, anch'esso è maggiore nel caso di kiwi liofilizzato, previa decellularizzazione o meno.

Paragonando tra loro i vari vegetali freschi, si nota che il modulo elastico maggiore appartiene alla mela, così come il minor allungamento percentuale. Il kiwi fresco ha il più piccolo modulo di Young, ma una volta decellularizzato e liofilizzato i valori di questo parametro si avvicinano considerevolmente a quelli degli altri due vegetali. Per quanto riguarda le altre condizioni, i valori sono simili tra i vari frutti ad eccezione del kiwi liofilizzato, il cui modulo elastico è considerevolmente maggiore rispetto a quello di mela e melanzana nella stessa condizione. Relativamente all'allungamento percentuale, invece, i frutti analizzati presentano valori simili. Il gruppo di campioni che più si distingue rispetto agli altri è la mela fresca, il cui massimo allungamento percentuale è pari al 45%. In tutte le altre condizioni, invece, questo parametro assume valori superiori al 50% e spesso maggiori del 65%.

Nei grafici di Figura 25, Figura 26 e Figura 27 e sono mostrate le curve sforzo-deformazione rappresentative per ogni gruppo di campioni: in questi grafici è riportato lo sforzo in MPa sulle ordinate e la deformazione relativa sulle ascisse. Per ogni gruppo di campioni è stata scelta una sola curva, quella i cui valori di allungamento massimo percentuale e modulo di Young si avvicinano maggiormente ai valori medi sopra riportati.

Dai grafici sforzo-deformazione si nota come il comportamento del materiale vari molto a seconda del frutto considerato e del modo in cui viene trattato: la melanzana ha delle curve molto simili in tutte le quattro diverse condizioni, mentre la mela e il kiwi presentano dei comportamenti molto diversi a seconda che il frutto sia fresco o trattato.

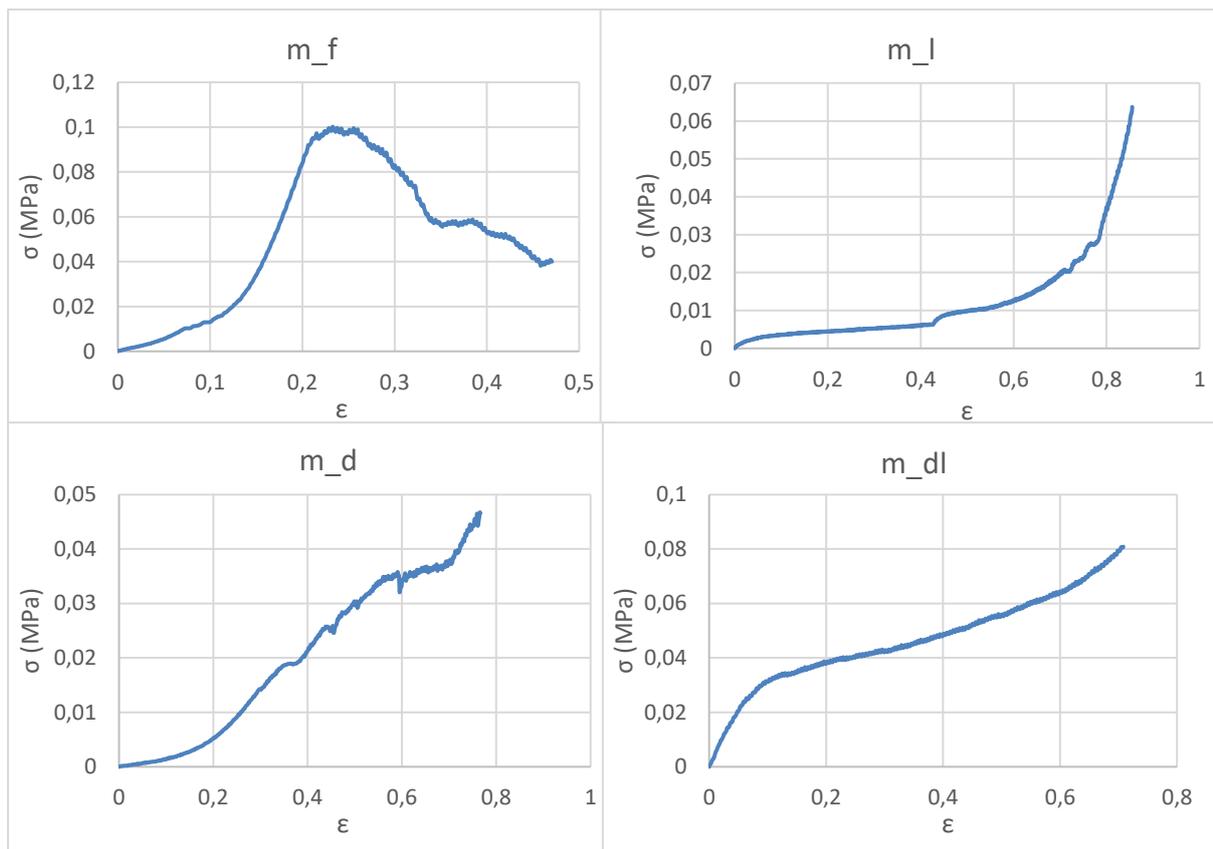


Figura 26: curve sforzo-deformazione rappresentative della mela nelle 4 condizioni

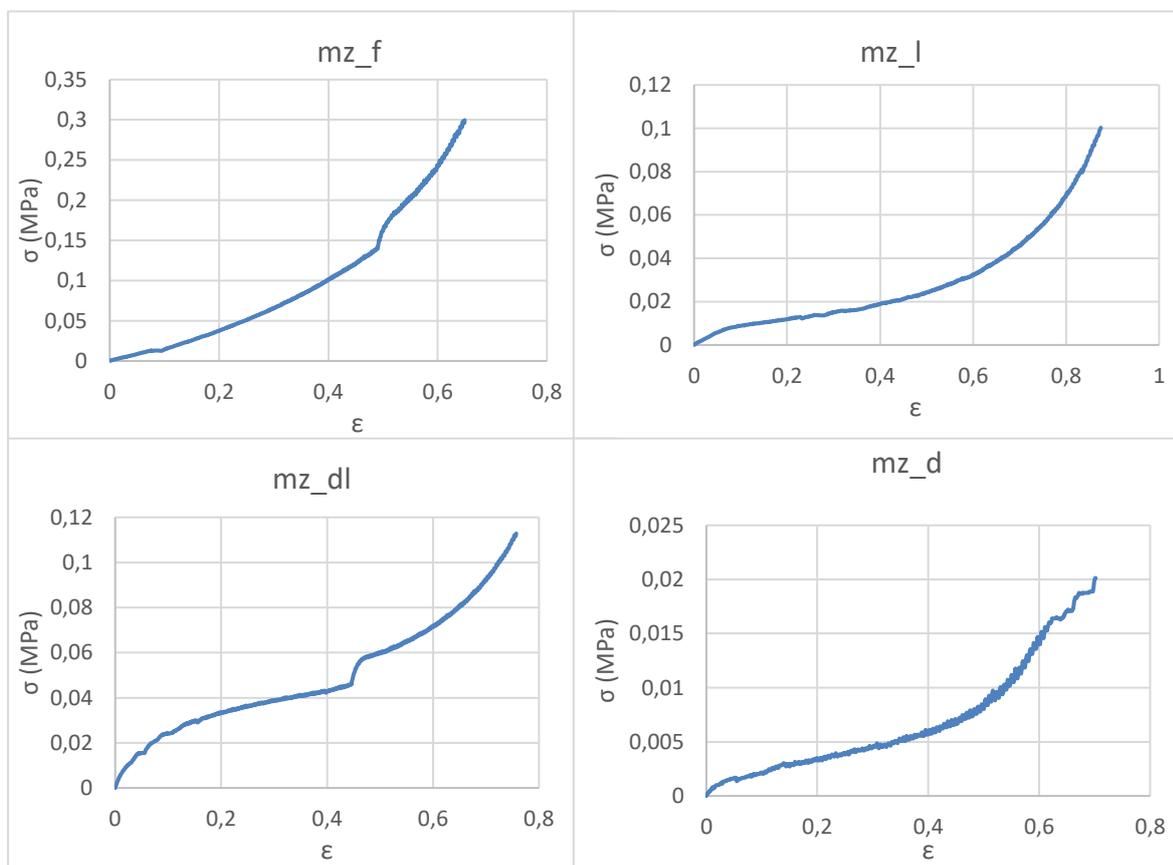


Figura 25: curve sforzo-deformazione rappresentative della melanzana nelle 4 condizioni

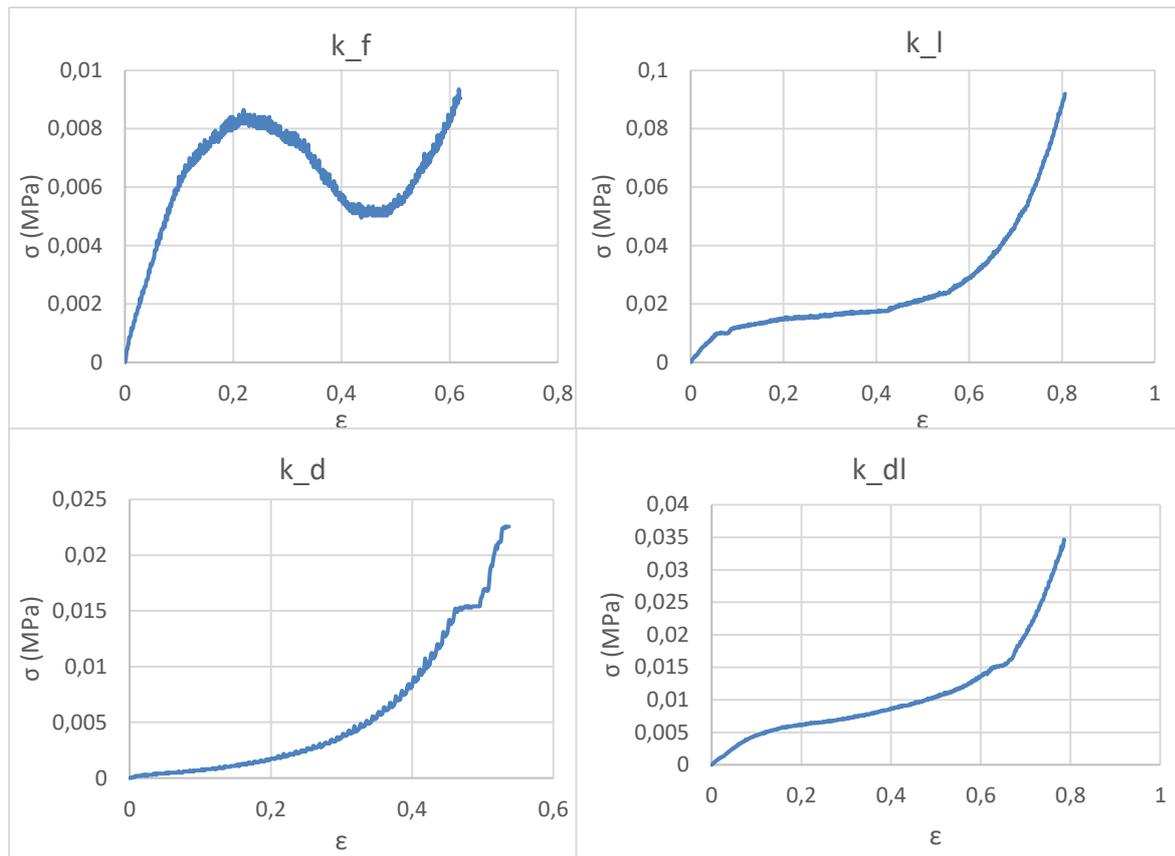


Figura 27: curve sforzo-deformazione rappresentative del kiwi nelle 4 condizioni

La seconda analisi condotta è la spettroscopia ad infrarosso, utile per comprendere la composizione chimica dei campioni. Nella Figura 29, nella Figura 30 e nella Figura 31 sono rappresentati i confronti tra gli spettri dei tre vegetali nelle tre diverse condizioni (fresco, decellularizzato e decellularizzato liofilizzato). Dalle immagini si può notare che i tre frutti hanno, in tutte le condizioni, degli spettri simili tra loro: inoltre, paragonando gli spettri con quello della cellulosa, raffigurato nella Figura 28, si vede che molti dei picchi caratteristici della cellulosa si ritrovano negli spettri di kiwi, mela e melanzana.

Basandosi sulla letteratura, in particolare sull'articolo di Benarbia et al. <sup>[68]</sup>, sono stati identificati i picchi principali della cellulosa, evidenziati da dei cerchi rossi nella Figura 28: in accordo con altri studi <sup>[69], [70], [71], [72]</sup>, questi picchi sono dovuti alla presenza di gruppi e legami caratteristici della cellulosa. Di seguito sono elencate le bande di assorbimento più rilevanti e da cosa sono provocate:

- 3390  $\text{cm}^{-1}$ : stretch dei gruppi -OH
- 2910-2920  $\text{cm}^{-1}$  e 1730  $\text{cm}^{-1}$ : stretch e deformazione dei gruppi -CH nelle unità di glucosio

- 1060  $\text{cm}^{-1}$ : vibrazione dei gruppi C-O-C degli anelli di piranosio
- 898  $\text{cm}^{-1}$ : legami beta-glicosidici

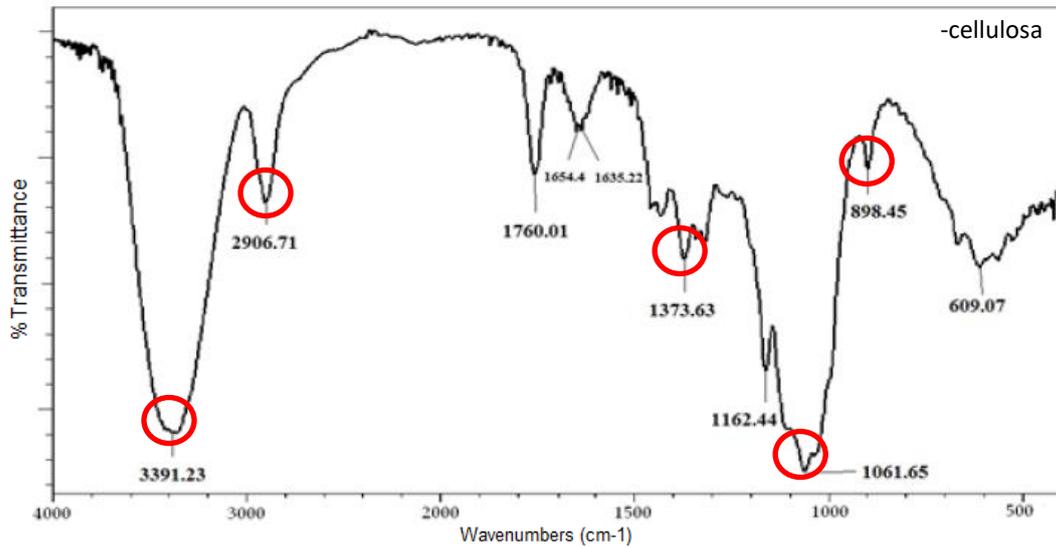


Figura 28: spettro della cellulosa [68]

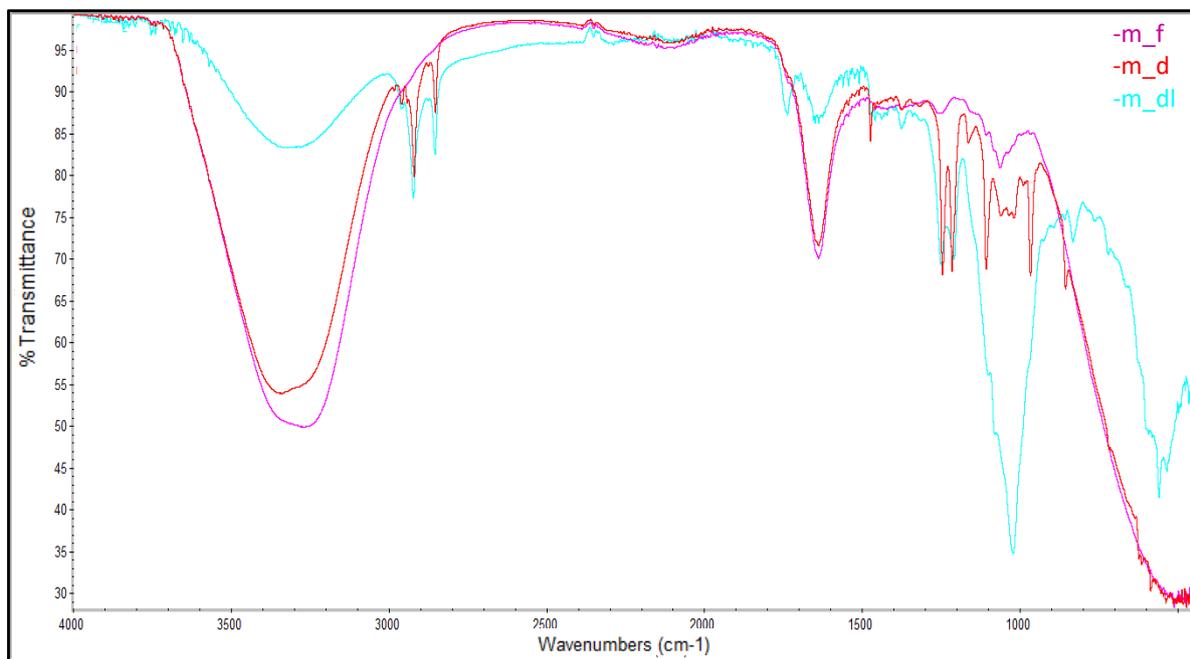


Figura 29: confronto tra gli spettri della mela nelle 3 condizioni

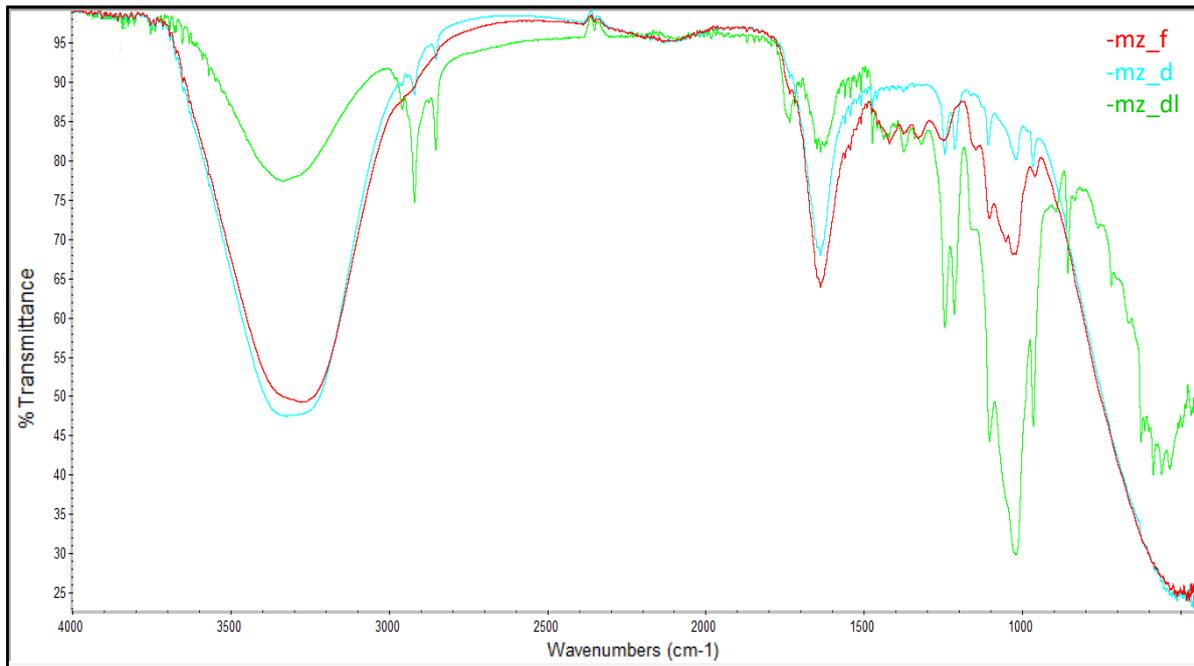


Figura 30: confronto tra gli spettri della melanzana nelle 3 condizioni

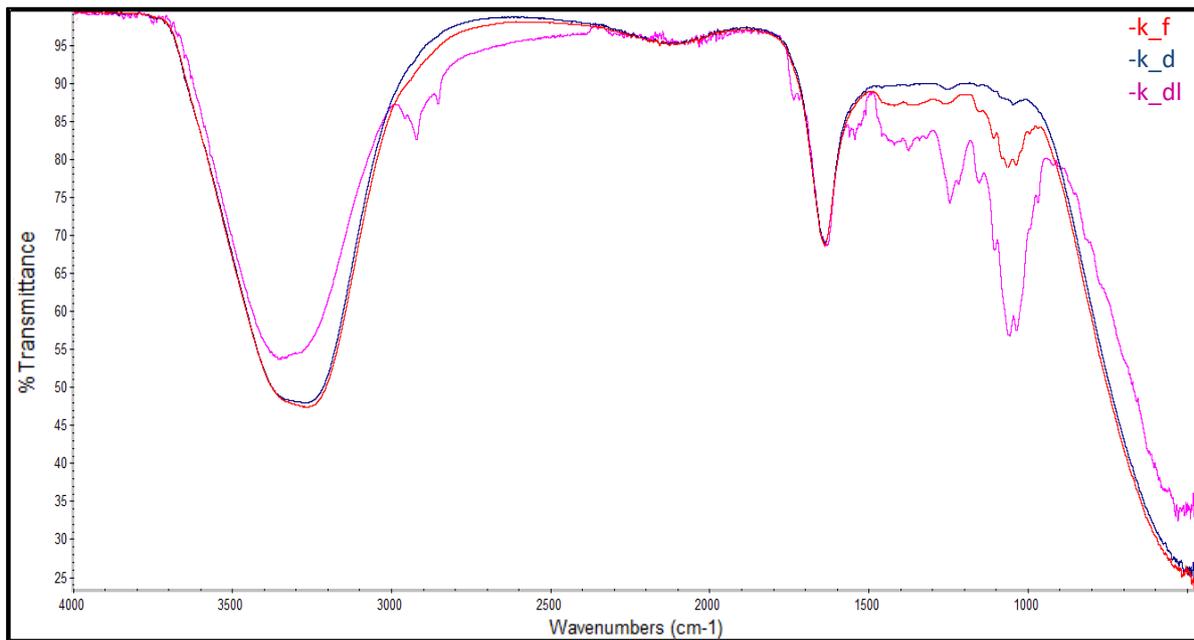


Figura 31: confronto tra gli spettri del kiwi nelle 3 condizioni

Studiando gli spettri dei tre vegetali in esame, si nota che il picco a  $898\text{ cm}^{-1}$  è assente nei vegetali freschi o decellularizzati ed è appena distinguibile anche in quelli liofilizzati; gli altri tre picchi, invece, si possono vedere chiaramente in tutti gli esemplari liofilizzati, e talvolta negli esemplari decellularizzati o freschi.

Risulta interessante notare che alcuni picchi, non caratteristici per la cellulosa, sono presenti negli spettri di tutti e tre i vegetali, principalmente se liofilizzati: tra questi spiccano i picchi a  $2860\text{ cm}^{-1}$ , il picco a  $1640\text{ cm}^{-1}$  e il picco a  $1240\text{ cm}^{-1}$ . Essi sono indice, rispettivamente, dello stretch simmetrico dei legami -CH, della vibrazione dei legami -C=C e della presenza di gruppi =CH<sub>2</sub> [70], [71]. Un ultimo picco importante è quello presente a  $1020\text{ cm}^{-1}$ , dovuto alla vibrazione dei gruppi CH e in particolare a quella del carbonio 6 della cellulosa [71]. Inoltre, non ci sono picchi negli spettri dei campioni freschi che non sono visibili negli esemplari decellularizzati o liofilizzati.

Analizzando la presenza delle bande di assorbimento sopra citate nei diversi tipi di campione, si nota che molti dei picchi presenti negli esemplari decellularizzati sono presenti anche in quelli liofilizzati e viceversa, mentre sono assenti negli spettri dei campioni freschi.

La Figura 29 mostra lo spettro della mela nelle tre condizioni: i picchi più evidenti sono sicuramente quello a  $3300\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ , quelli intorno a  $2900\text{ cm}^{-1}$ , quello a  $1640\text{ cm}^{-1}$ , quelli intorno a  $1200\text{ cm}^{-1}$  e quello sui  $1000\text{ cm}^{-1}$ . Mentre il primo e il terzo sono particolarmente accentuati nel caso di mela decellularizzata o fresca, l'ultimo risulta più profondo per i campioni liofilizzati; per questo gruppo di campioni, inoltre, si evidenziano due picchi caratteristici della cellulosa ( $1730\text{ cm}^{-1}$  e  $898\text{ cm}^{-1}$ ) che non sono presenti nelle altre due tipologie. I picchi rimanenti sono interessanti in quanto assenti nel vegetale fresco ma presenti in quello decellularizzato, indipendentemente dal fatto che sia poi stato liofilizzato.

Lo stesso discorso si può riproporre per l'analisi dello spettro della melanzana (Figura 30), che ha un andamento molto simile a quello della mela: i picchi caratteristici sono gli stessi, e si mostrano negli stessi esemplari descritti per la mela. Ciò che varia è principalmente la profondità del picco, ma non la banda di assorbimento.

Il kiwi, invece, rappresentato nella Figura 31, si discosta leggermente dai comportamenti sopra descritti: l'osservazione principale è che gli spettri del frutto fresco e di quello decellularizzato sono molto più simili tra loro rispetto a quello liofilizzato, che presenta un numero di picchi notevolmente maggiore. Nel dettaglio, i picchi a  $2800\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$  e quelli intorno a  $1200\text{ cm}^{-1}$  sono visibili solo nei campioni liofilizzati, mentre assenti nei decellularizzati. Anche per il kiwi, però, le tre bande di assorbimento più rilevanti, presenti in tutti e tre i gruppi di campioni, sono quella a  $3300\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ , quella a  $1640\text{ cm}^{-1}$  e quella intorno a  $1000\text{ cm}^{-1}$  e i picchi caratteristici della cellulosa, in particolare quello a  $1730\text{ cm}^{-1}$  e quello a  $898\text{ cm}^{-1}$ , sono visibili solamente nel vegetale liofilizzato.

L'ultima analisi condotta è la misurazione dell'angolo di contatto, eseguita per studiare l'interazione della superficie in esame con l'acqua. La seguente misura è stata presa su due campioni per ogni tipologia, e i valori medi, provvisti di deviazione standard, sono riportati nella Tabella 1.

	Fresco	decellularizzato	decellularizzato liofilizzato
MELA	26,6° ± 20,36	15,3° ± 1,83	0°
MELANZANA	24,25° ± 18,74	0°	0°
KIWI	10,15° ± 3,89	2,4° ± 3,40	6,5° ± 9,19

*Tabella 1: valori medi e deviazioni standard degli angoli di contatto dei tre vegetali nelle tre condizioni*

I valori sono stati confrontati con quelli della cellulosa presenti in letteratura: l'angolo di contatto della cellulosa varia considerevolmente a seconda del tipo di cellulosa considerata. Prendendo a riferimento la cellulosa microcristallina commerciale, in letteratura sono riportati valori variabili tra 0° (misura non ricavabile) e 28° [73], [74]: all'interno dello stesso range si trovano esemplari di microcellulosa estratta dal cotone [73]. Tuttavia, studi effettuati sulla foglia di mela hanno riportato valori di angolo di contatto molto maggiori, intorno ai 50° [75], compatibili con quelli di esemplari di cellulosa modificati tramite acetilazione [76].

La prima osservazione è che tutti i campioni analizzati hanno superfici altamente idrofiliche, con angoli di contatto molto inferiori a 90°. Inoltre, in alcuni casi la superficie è tanto bagnabile che la goccia non riesce nemmeno a formarsi, ma si adagia molto velocemente sulla superficie perdendo la sua forma tondeggiante: in questi casi l'angolo di contatto non è misurabile, dunque è stato posto pari a 0°. Dalla tabella si evince che i campioni freschi sono, in media, quelli con la superficie meno idrofilica: i vegetali liofilizzati, invece, presentano angoli di contatto nulli o molto piccoli, così come quelli decellularizzati. Si distingue la mela decellularizzata, che ha un angolo di contatto superiore ai 10°, sebbene inferiore rispetto allo stesso esemplare fresco. I valori misurati, tuttavia, sono in linea con quelli di alcuni esemplari di cellulosa, tra cui la cellulosa microcristallina commerciale o la cellulosa estratta dal cotone.

## **Ricellularizzazione**

L'ultima fase della parte sperimentale di questo lavoro consiste nella ricellularizzazione degli scaffold ottenuti in precedenza: l'obiettivo è la realizzazione di un tessuto *in vitro*.

Sono state fatte diverse prove per ottenere l'adesione e la proliferazione di fibroblasti umani (HFF-1, ATCC) sulla struttura vegetale che funge da scaffold, ma l'esito è risultato negativo indipendentemente dai tentativi fatti.

Inizialmente lo scaffold vegetale ottenuto dalla decellularizzazione, non liofilizzato, è stato seminato con fibroblasti senza effettuare alcun tipo di trattamento: per questa prova sono stati utilizzati il broccolo, il kiwi e la melanzana, ma senza risultati.

Successivamente, si è deciso di liofilizzare il materiale e di funzionalizzare il substrato per ottemperare alla mancata adesione delle cellule sul substrato: gli scaffold, melanzana, kiwi e mela, sono stati immersi per una notte nel mezzo di coltura e poi seminati, oppure sono stati trattati con una sospensione cellulare in gelatina. Uno schema della multiwell utilizzata è raffigurato nella Figura 32, completo di materiale non trattato e controlli: questi ultimi sono stati realizzati il primo seminando le cellule sul fondo del pozzetto e il secondo mettendo una goccia di sospensione cellulare in gelatina nel pozzetto.

mela liof	mela liof	melanzana liof	melanzana liof	kiwi liof	kiwi liof
mela liof immersa nel mezzo	mela liof immersa nel mezzo	melanzana liof immersa nel mezzo	melanzana liof immersa nel mezzo	kiwi liof immerso nel mezzo	kiwi liof immerso nel mezzo
mela liof con sospensione cellulare in gelatina	mela liof con sospensione cellulare in gelatina	melanzana liof con sospensione cellulare in gelatina	melanzana liof con sospensione cellulare in gelatina	kiwi liof con sospensione cellulare in gelatina	kiwi liof con sospensione cellulare in gelatina
ctrl	ctrl in gelatina				

Figura 32: schema della multiwell usata per l'esperimento di ricellularizzazione

Anche in questo caso, purtroppo, l'esperimento non ha dato risultati soddisfacenti, poiché in nessuna delle tre condizioni i vegetali sono stati colonizzati da cellule probabilmente a causa dell'elevata idrofilicità degli scaffold decellularizzati. In Figura 33 sono rappresentate le immagini al DAPI dei controlli e della coltura cellulare sui diversi vegetali a 72h dalla semina: come si può notare, nelle immagini relative ai tre vegetali il contrasto è molto basso e non sono visibili dei nuclei cellulari, mentre nei controlli sono chiaramente identificabili i nuclei dei fibroblasti seminati.

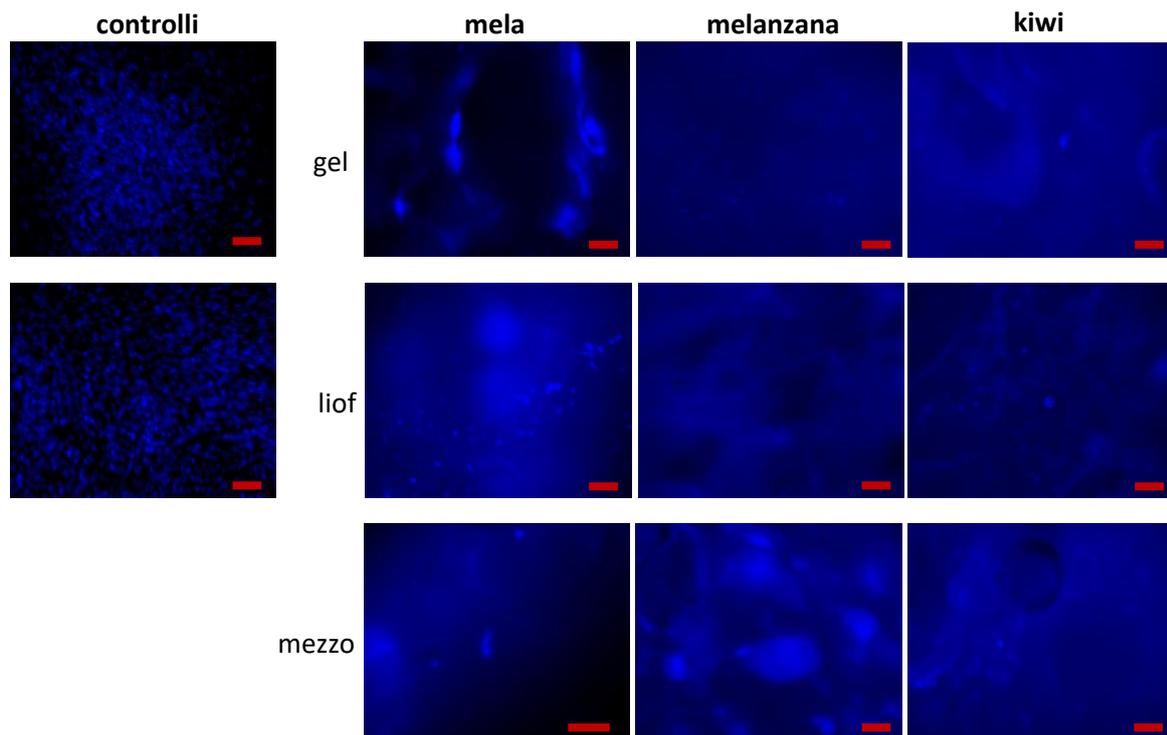


Figura 33: staining col DAPI dei fibroblasti seminati su controlli e su mela, melanzana e kiwi con le 3 diverse funzionalizzazioni. bar scale 100  $\mu$ m. gel=gelatina, liof=liofilizzato.

## DISCUSSIONE

Relativamente ai primi due obiettivi del presente lavoro, i risultati ottenuti sono molto positivi: il protocollo di decellularizzazione, infatti, si conferma versatile, semplice ed efficace, e la caratterizzazione meccanica evidenzia caratteristiche di grande interesse relative ai vegetali trattati. Tali risultati sono rilevanti in quanto aggiungono elementi informativi su vegetali non ancora utilizzati negli studi disponibili in letteratura.

Le immagini dei paragrafi precedenti dimostrano che la decellularizzazione, evidente già a livello qualitativo, è completa anche a livello microscopico: nelle immagini ottenute tramite SEM, infatti, non sono visibili residui cellulari, ma solamente la struttura fibrosa del frutto decellularizzato. La caratteristica più interessante di questo protocollo è la sua versatilità, poiché si è rivelato efficace per il trattamento di vegetali molto diversi tra loro in quanto a struttura, densità e spessore del tessuto: possono essere decellularizzati tessuti compatti come mela e melanzana, tessuti più meno densi come kiwi e sedano, vegetali tagliati in fettine sottili (circa 1 mm) oppure vegetali tagliati in cubetti di 1 cm<sup>3</sup> circa. Agendo sulla concentrazione di SDS nella soluzione e sui tempi, il protocollo può essere adattato a molti tipi di piante e tessuti vegetali differenti, il che lo rende facilmente utilizzabile in qualunque esperimento di decellularizzazione vegetale in cui si scelga di decellularizzare tramite agenti chimici usando la tecnica di immersione e agitazione.

Tuttavia, durante la definizione del protocollo sono stati identificati diversi problemi. Innanzitutto, ottenere fettine molto sottili (circa 1 mm) e tagliate in modo netto è complicato: con un coltello, infatti, il taglio non è mai uniforme e si ottengono fettine con cellule su piani diversi. Questo inconveniente genera problemi principalmente legati alla visualizzazione, poiché il microscopio utilizzato per osservare la struttura vegetale mette a fuoco un singolo piano alla volta. Un esempio della difficoltà di ottenere immagini a fuoco è riportato nella Figura 34. Nel cerchio rosso è evidenziata la parte sfocata, mentre in quello verde è contenuta la parte a fuoco.

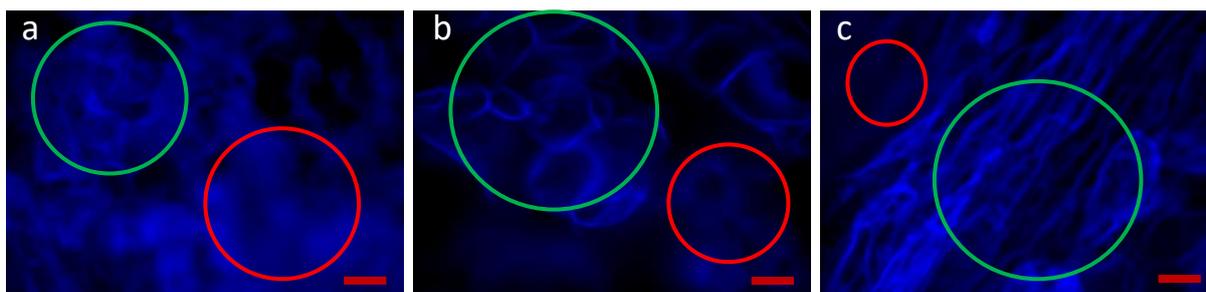


Figura 34: staining della cellulosa di a) mela, b) melanzana e c) kiwi: all'interno dei cerchi verdi sono evidenziate le zone a fuoco, nei cerchi rossi le zone fuori fuoco. bar scale 100  $\mu$ m

Dunque, per migliorare questo aspetto, si è deciso di utilizzare una mandolina adatta a tagliare fette di spessore pari a 1 mm: i risultati sono leggermente migliori, ma comunque la messa a fuoco rimane complesso. L'utilizzo della mandolina, tuttavia, può dare origine ad un diverso problema: per ottenere delle fette sufficientemente resistenti a livello meccanico bisogna utilizzare dei frutti non troppo maturi, diversamente la fetta perde consistenza e si ottiene con estrema difficoltà. Nel caso del kiwi, inoltre, essendo il frutto molto acquoso, occorre prestare molta attenzione oltre che allo stato di maturazione anche alla pressione da adottare durante l'affettamento.

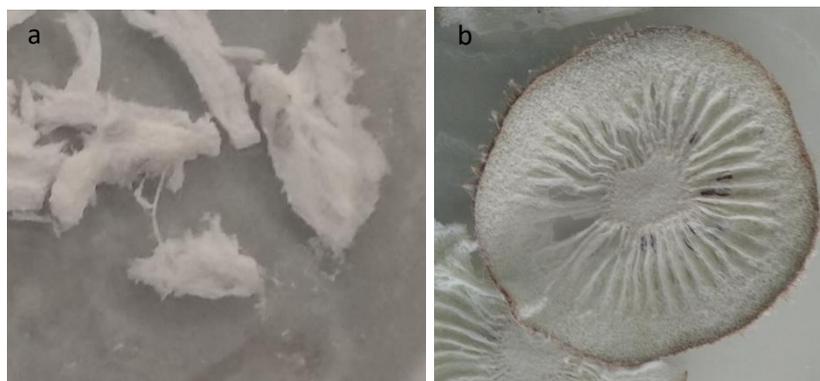
Successivamente, sono state effettuate alcune prove per identificare il tempo opportuno per ottenere la decellularizzazione senza alterare la struttura del vegetale: a seconda dello spessore della fetta sono necessarie 72h (spessore pari a 1 mm), o più. Nel caso l'immersione e agitazione duri più di 72h occorre cambiare la soluzione dopo 3 giorni per ottenere una decellularizzazione efficace. L'agitazione viene ottenuta ponendo il campione in soluzione su uno stirrer, sfruttando la presenza di una barretta magnetica interna alla soluzione che, ruotando, provoca il movimento continuo della soluzione. In questa fase sono stati rilevati alcuni problemi dovuti agli stress meccanici causati dalla barretta magnetica: essa ruotando sbatte contro le fettine di campione, rischiando di provocarne la rottura. Per alcuni vegetali, quali mela e melanzana, questo problema non sussiste poiché tali frutti tendono a galleggiare, quindi non si trovano mai in contatto con la barretta magnetica. Per altri vegetali che non galleggiano, quali kiwi e pomodoro, gli stress meccanici possono invece essere fatali: il pomodoro non è decellularizzabile con il protocollo qui presentato perché si disgrega completamente dopo solo 48h di trattamento. Il kiwi, invece, se immerso per non più di 72h resiste agli stress meccanici, altrimenti viene danneggiato irreparabilmente,



Figura 35: confronto tra tempistiche di immersione del kiwi in SDS a) kiwi integro dopo 72h; b) kiwi disciolto dopo 7g di immersione

come mostrato nella Figura 35. Per evitare che la struttura di tale frutto sia alterata in modo irreparabile, si è provato ad usare una piastra basculante: i risultati sono buoni e non ci sono problemi di impatto tra il campione e la barretta magnetica, tuttavia il processo è più lento e rischia di essere meno efficace.

Un ulteriore problema conseguente all'immersione troppo prolungata dei vegetali è legato all'estrazione del frutto decellularizzato dalla bottiglia contenente la soluzione di SDS: in questa fase, infatti, è necessario essere molto delicati in maniera tale da non lacerare il vegetale compromettendo l'esperimento. Il rischio è quello di ottenere dei frammenti molto piccoli invece che una fetta estesa di frutta decellularizzata: nella Figura 36 vengono paragonati una fetta di kiwi liofilizzata ottenuta da una decellularizzazione di 72h con dei frammenti di kiwi liofilizzati ottenuti da una decellularizzazione di 7g.



*Figura 36: confronto tra kiwi decellularizzati liofilizzati a) lasciati in immersione per 7 giorni, b) lasciati in immersione per 3 giorni*

Osservando il processo di decellularizzazione si nota che diversi vegetali rispondono con velocità differenti all'azione dell'SDS: ad esempio, il kiwi e il pomodoro rilasciano parte del materiale già dopo qualche decina di minuti, mentre poi il processo prosegue più lentamente fino alla completa decellularizzazione. Altri vegetali quali il broccolo, la mela e la melanzana, invece, rilasciano materiale più lentamente. Questa considerazione si basa sul fatto che nel caso di kiwi e pomodoro la soluzione diventa subito torbida, mentre per il broccolo, la mela e la melanzana la soluzione rimane limpida fino alla fine, assumendo un colore più giallastro (verdastro nel caso del broccolo) negli ultimi stadi del processo. Nella Figura 37 sono mostrati, nell'ordine, kiwi, pomodoro, broccolo e melanzana immersi da appena 15 minuti in una soluzione di SDS e posti in agitazione.



*Figura 37: fette di kiwi, pomodoro, broccolo e melanzana immerse in una soluzione di SDS e poste in agitazione da 15 minuti*

Prove successive hanno portato all'inserimento nel protocollo dello step relativo all'immersione dei campioni decellularizzati in una soluzione di  $\text{CaCl}_2$ : questo passaggio non viene sempre svolto nei protocolli presenti in letteratura <sup>[42], [58]</sup>, sebbene sia dimostrata la sua importanza nel migliorare la rimozione dei residui tossici dell'SDS, favorendo la successiva ricellularizzazione dello scaffold vegetale <sup>[52], [57], [61]</sup>.

Anche il passaggio relativo alla liofilizzazione è stato aggiunto dopo aver effettuato prove in successione, perché si è notato che i vegetali decellularizzati, se umidi, non erano adatti per la coltura cellulare.

Per la sterilizzazione dei campioni, in questo lavoro si è usata una soluzione di etanolo al 70% seguita, in fase di ricellularizzazione, dalla sottomissione di ogni scaffold ai raggi UV (30 minuti per lato).

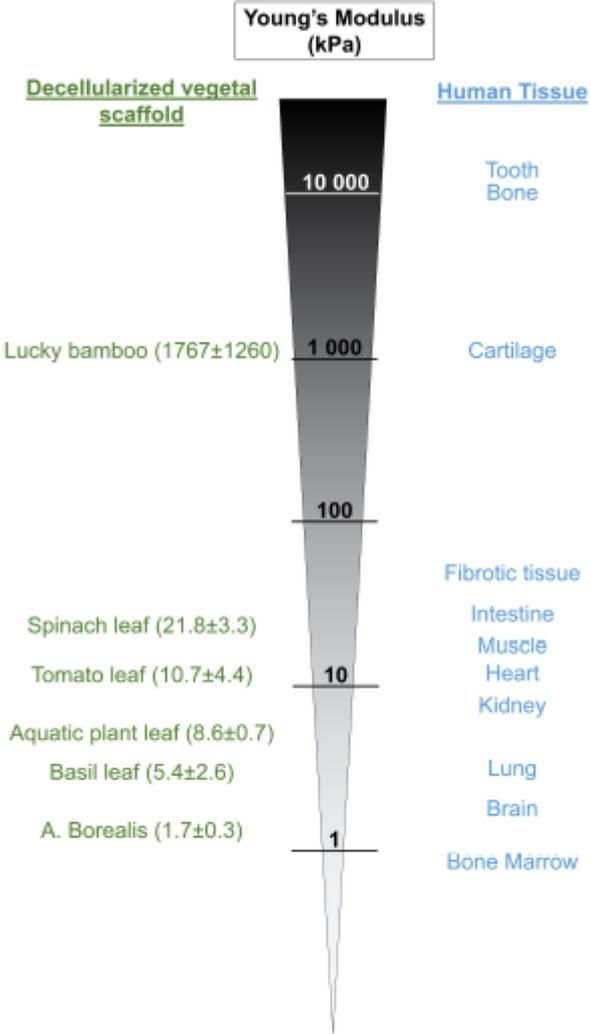
Relativamente allo staining della cellulosa, sono state testate due procedure differenti per cercare di ottenere risultati il più soddisfacenti possibile: la prima prevede l'immersione dei campioni in una soluzione acquosa allo 0,1% di CFW, la seconda l'utilizzo di una soluzione che migliori l'efficacia dello staining. Questa soluzione è chiamata ClearSee e diminuisce la fluorescenza dei cloroplasti, presenti all'interno della cellula vegetale <sup>[77], [78]</sup>: in questo modo nei frutti freschi, non decellularizzati, la cellulosa viene marcata in modo più evidente. In questa sperimentazione, entrambe le procedure hanno dato risultati soddisfacenti sui vegetali freschi, oltre che sui vegetali decellularizzati e liofilizzati.

I principali limiti del processo di decellularizzazione descritto sono dovuti agli stress meccanici inferti dalla barretta meccanica sul materiale da decellularizzare: la soluzione proposta, come precedentemente spiegato, è la piastra basculante, che tuttavia non è ottimale per la circolazione della soluzione. Inoltre, l'identificazione della concentrazione di SDS e delle tempistiche adatte per ottenere una decellularizzazione completa senza causare la distruzione del materiale è difficoltosa.

Dalla caratterizzazione meccanica si sono dedotte informazioni di interesse sui diversi vegetali analizzati, sia dal punto di vista meccanico sia da quello chimico e strutturale.

Dalle analisi a compressione si ricava il modulo elastico del campione, un valore rilevante per la caratterizzazione del vegetale e per il confronto con altri tipi di materiali, in particolare con i tessuti umani: affinché il tessuto realizzato *in vitro* sia compatibile con quello fisiologico, infatti, è necessario che le caratteristiche meccaniche siano simili.

In letteratura sono già presenti studi che analizzano e confrontano i moduli elastici di diversi



scaffold ottenuti per decellularizzazione vegetale e di tessuti umani: nella Figura 38 sono rappresentati alcuni moduli elastici di tessuti umani e di diversi vegetali in accordo con le analisi di Lacombe et al. [50], i quali hanno definito che le piante presentano un modulo di Young variabile tra 1 kPa e 2000 kPa. Inoltre, Negrini et al. [52] attraverso prove a compressione meccanica sugli scaffold vegetali da loro testati (mela, carota e sedano) hanno ottenuto moduli di Young nell'ordine di qualche kPa per tutti e tre gli esemplari trattati, sia freschi sia decellularizzati.

Nel presente lavoro, dalle analisi meccaniche relative alla mela si sono ottenuti dei moduli di Young maggiori di uno o due ordini di grandezza

Figura 38: modul elastici di tessuti umani e vegetali a confronto [50]

(rispettivamente per il frutto decellularizzato e quello fresco) rispetto ai valori ottenuti da Negrini et al. Verosimilmente, alla base di questa discrepanza c'è il fatto che nell'articolo di riferimento i provini vengono testati in umido, dopo essere stati immersi per una settimana in PBS. In questo lavoro, invece, i campioni vengono conservati in frigo in delle capsule petri in assenza di acqua o PBS: pertanto, il contenuto d'acqua e la consistenza dei provini è differente. In generale, per tutti e tre gli esemplari di frutta analizzati il provino decellularizzato e poi liofilizzato assume valori dell'ordine di qualche centinaio di kPa: esso è stato testato a secco, dunque è coerente che il suo valore sia alto rispetto a quanto atteso. Relativamente a mela e melanzana, il frutto fresco ha anch'esso valori di modulo di Young alti, probabilmente sempre a causa della poca quantità di acqua presente all'interno dei provini. Per il kiwi il discorso è differente, a causa del tipo di tessuto e della quantità di acqua immagazzinata nel frutto in esame: il kiwi, infatti, è ricco di acqua e questo provoca un calo nei valori dei moduli elastici rispetto agli esemplari compressi a secco. I campioni solo decellularizzati, invece, hanno valori molto simili per i tre frutti e inferiori di circa un ordine di grandezza rispetto a quelli successivamente liofilizzati: anche in questo caso l'acqua gioca un ruolo importante nella misura delle proprietà meccaniche del provino.

Da queste riflessioni si deduce uno dei problemi relativi alle misurazioni effettuate, ossia la grande variabilità inter-campione e tra gruppi diversi di campioni. La presenza di acqua è dirimente nelle misurazioni effettuate, al punto da far variare di qualche ordine di grandezza il modulo elastico. Tuttavia, poiché il modulo di Young di un campione bagnato si abbassa rispetto a quello di un campione secco, le misure ottenute in questo lavoro possono essere considerate un tetto massimo del valore di modulo elastico assumibile dal vegetale in esame nella condizione analizzata.

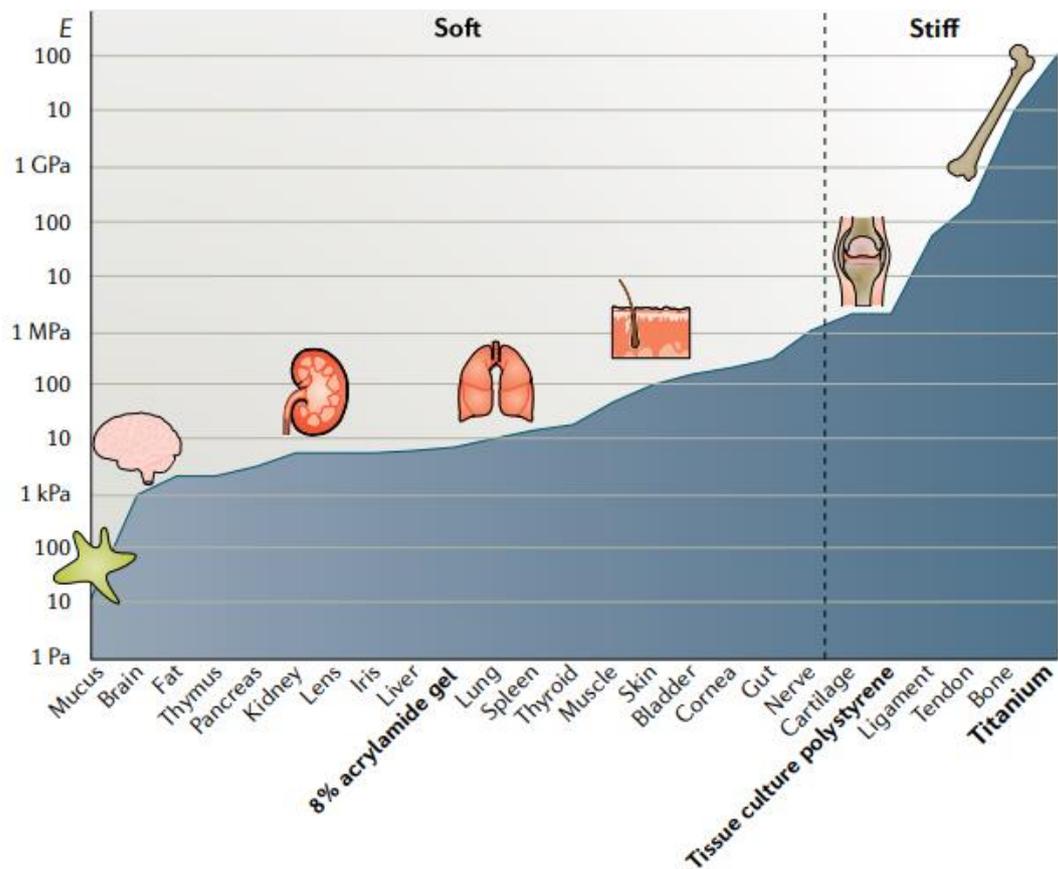


Figura 39: moduli elastici dei tessuti umani, dal meno rigido al più rigido [79]

Nella Figura 39 sono rappresentati i moduli elastici dei diversi tessuti umani, dal più rigido al meno rigido [79]: considerando i valori medi dei campioni di mela, melanzana e kiwi nelle quattro condizioni sopra descritte a secco, si evince che:

1. I moduli di Young di  $m_f$ ,  $m_{dl}$ ,  $mz_f$ ,  $mz_{dl}$ ,  $k_l$  e  $k_{dl}$  sono assimilabili a quelli di vescica e pelle, aggirandosi intorno alle centinaia di kPa.
2. I moduli di Young di  $m_l$ ,  $m_d$ ,  $mz_l$ ,  $k_f$  e  $k_d$  sono assimilabili con quelli di milza, tiroide e muscolo, poiché si aggirano intorno ai 50-70 kPa;
3. Il modulo di Young di  $mz_d$ , pari a circa 15 kPa, è assimilabile con quello del polmone.

Questi dati confermano che il kiwi, la melanzana e la mela, decellularizzati o liofilizzati, sono compatibili a livello meccanico con diversi tessuti molli umani: per il kiwi e la melanzana, mai trattati prima in letteratura, tale risultato è molto promettente nell'ottica dell'utilizzo degli scaffold vegetali ottenuti in medicina rigenerativa. Per quanto riguarda la mela, invece, questi risultati confermano la sua adeguatezza a fungere da scaffold per colture cellulari, ipotesi già ampiamente validata in letteratura [42], [51], [52], [60].

L'analisi dei dati relativi all'allungamento massimo relativo dei provini rivela comportamenti abbastanza simili tra i vari gruppi di campioni: il provino compresso si deforma oltre il 50% della sua lunghezza iniziale senza rompersi, ad eccezione della mela fresca. Mediamente i provini liofilizzati cellularizzati sono quelli che si deformano maggiormente, raggiungendo valori pari al 70-80%, mentre i campioni decellularizzati tendono a smembrarsi e a perdere la propria forma e struttura per deformazioni pari al 60-70%. Come anticipato, la mela fresca fa eccezione poiché si rompe quando il provino viene schiacciato appena del 45%, probabilmente a causa della maggior compattezza e rigidità del tessuto.

Dall'osservazione degli istogrammi mostrati nella Figura 22, nella Figura 23 e nella Figura 24, si può notare che le barre di errore sono molto elevate, in particolare per quanto riguarda i valori medi del modulo elastico: questo è sintomo dell'elevata variabilità presente tra i diversi campioni, all'interno dello stesso campione o tra i diversi gruppi. Per ridurre la variabilità i campioni di ogni frutto sono stati prelevati dallo stesso esemplare in zone limitrofe, ma questo non annulla la grande diversità presente tra campioni anche se appartenenti alla stessa classe. I provini, infatti, sono considerati dei cubetti di dimensioni pari a circa 1cm x 1cm x 1cm, ma, non essendo la procedura di taglio automatizzata, spesso le misure non sono esatte e i campioni risultano più o meno alti, lunghi o spessi. Inoltre, a seconda che il campione sia stato ottenuto da una zona o da un'altra del frutto, le sue caratteristiche possono variare considerevolmente: questo è particolarmente evidente nel kiwi, caratterizzato da una zona centrale molto densa e dura, una periferica più molle e una intermedia ricca di canali, ma è vero anche per la mela e la melanzana. In ultimo, l'orientamento del provino può influire sulla sua resistenza a compressione, in particolar modo nel caso in cui siano presenti fibre allineate in una stessa direzione o macropori: le fibre generano comportamenti diversi a seconda che siano orientate lungo l'asse di compressione o perpendicolarmente ad esso, mentre i macropori, se presenti, alterano la distribuzione degli sforzi nel provino.

Un ulteriore problema si è riscontrato nella definizione del modulo elastico a partire dalle curve sforzo-deformazione ottenute dai dati: queste curve, infatti, spesso sono affette da rumore e hanno andamenti molto differenti tra loro. Per alcuni gruppi di campioni il modulo elastico è stato ottenuto calcolando la pendenza del grafico nel tratto corrispondente ad una deformazione variabile dallo 0% fino al 20%, in altri si è considerato quello corrispondente ad una deformazione tra il 50% e il 70%. Infine, la statistica presentata si basa su una popolazione di 4 o 5 campioni, numero insufficiente per poter avere misure statisticamente significative.

Per quanto riguarda la struttura chimica degli scaffold vegetali, invece, l'analisi FTIR conferma che la cellulosa è ampiamente presente in tutti e tre gli esemplari considerati. Molti dei picchi caratteristici della cellulosa, infatti, sono visibili in tutti i provini analizzati, che siano essi freschi, decellularizzati o decellularizzati liofilizzati: un dettaglio molto interessante riguarda il picco a  $898\text{ cm}^{-1}$ , il quale è poco accentuato e dunque non compare negli spettri dei vegetali freschi o decellularizzati, ma solo in quelli dei vegetali liofilizzati. Questo, probabilmente, è dovuto al quantitativo di acqua presente nei campioni: esso è più elevato nei campioni decellularizzati e freschi e causa l'oscuramento della banda di assorbimento presente a  $898\text{ cm}^{-1}$ .

È interessante notare che, in particolare per la mela e la melanzana, gli spettri del vegetale decellularizzato o decellularizzato liofilizzato sono molto simili: questo è in linea con le attese, poiché a livello chimico l'unico componente che distingue i due gruppi di campioni è l'acqua. Invece, non vengono identificati picchi negli spettri dei vegetali freschi che siano assenti nelle altre condizioni: non vi sono, dunque, bande di assorbimenti indici della presenza delle cellule, mentre mancano molti dei picchi presenti nei frutti decellularizzati o liofilizzati.

I picchi più rilevanti nei vegetali decellularizzati e liofilizzati sono quello a  $1730\text{ cm}^{-1}$  e quello a  $898\text{ cm}^{-1}$ : Questi due picchi sono poco accentuati ma molto importanti, perché appartengono allo spettro caratteristico della cellulosa e sono dovuti, rispettivamente, allo stretch dei legami  $\text{-C=O}$  e alla presenza di legami  $\beta$ -glicosidici. Tra questi due picchi, il primo può essere ricollegato anche alla presenza di lignina <sup>[71]</sup>, mentre il secondo è caratteristico della sola cellulosa. Questi due picchi sono poco evidenti, se non addirittura assenti, negli esemplari freschi, nei quali i picchi predominanti sono quelli relativi allo stretching, alla vibrazione oppure al bending dei legami  $\text{-OH}$ . Un altro picco d'interesse è quello presente a  $1020\text{ cm}^{-1}$ , anch'esso visibile nei vegetali liofilizzati ma non in quelli freschi: questo picco è dovuto alla vibrazione dei gruppi  $\text{-CH}$ , e in particolare è legato alla vibrazione del carbonio 6 della cellulosa <sup>[71]</sup>, dunque anch'esso è rilevante per confermare la presenza di cellulosa negli scaffold vegetali ottenuti.

Chimicamente, inoltre, si nota che gli scaffold decellularizzati ottenuti dai tre diversi vegetali sono molto simili tra loro: i picchi sono gli stessi, a meno di qualche sporadica eccezione, se si paragonano kiwi, mela e melanzana liofilizzati oppure mela e melanzana decellularizzati. Il kiwi decellularizzato, invece, si discosta rispetto agli altri due vegetali dello stesso tipo: pur essendo presenti i picchi principali, infatti, non sono visibili alcuni dei picchi minori, dunque

l'andamento dello spettro è assimilabile più a quello del kiwi fresco che a quello del kiwi liofilizzato.

In ultimo, lo studio dell'angolo di contatto ha fornito informazioni sull'idrofilicità dei campioni: è evidente dalle misure ottenute che i campioni sono tutti estremamente idrofilici e assorbono molto velocemente l'acqua, a tal punto che in alcuni casi è risultato impossibile fermare la misura prima che la goccia fosse completamente adesa al substrato. In questi casi, l'angolo di contatto viene posto pari a  $0^\circ$ , ma la misura non è attendibile: essa, infatti, è dovuta all'impossibilità dell'operatore di fotografare la goccia nell'attimo in cui si poggia sul substrato senza aderirvi completamente. La misura, tuttavia, è indicativa dell'alto livello di assorbimento dell'acqua che hanno questi campioni. I provini più idrofilici sono quelli liofilizzati, spesso talmente assorbenti da risultare non misurabili; ad essi seguono i provini decellularizzati ed infine i freschi, che risultano essere i meno idrofilici. Questa caratterizzazione è importante perché espone un problema relativo all'utilizzo di scaffold vegetali per coltura cellulare, ossia la loro eccessiva idrofilicità: questo può ostacolare l'adesione cellulare, poiché le cellule non sono portate ad aderire al materiale ma gli scivolano attraverso venendo poi lavate via nei lavaggi successivi. I valori degli angoli di contatto sono in linea con quelli della cellulosa microcristallina commerciale e con quelli della cellulosa estratta dal cotone <sup>[73]</sup>, <sup>[74]</sup>.

La caratterizzazione meccanica e chimica degli scaffold vegetali è utile per comprendere se essi siano utilizzabili o meno come supporti per la coltura cellulare: poiché il materiale ottenuto è composto prevalentemente in cellulosa, con proprietà meccaniche coerenti con quelle dei tessuti umani, il responso è positivo. Tuttavia, l'elevata idrofilicità del materiale potrebbe essere di ostacolo all'adesione: potrebbero dunque essere necessarie funzionalizzazioni superficiali degli scaffold.

Nonostante i risultati promettenti derivanti da queste caratterizzazioni, obiettivo del lavoro svolto, l'ultima fase del progetto non ha dato esiti positivi: la ricellularizzazione, infatti, è stata molto complessa e non si sono ottenuti i risultati sperati.

Basandosi sui molti articoli presenti in letteratura che accertano la compatibilità tra cellule e scaffold vegetali, sono stati effettuati diversi tentativi di ricellularizzazione con fibroblasti delle matrici ottenute da kiwi, mela e melanzana. In seguito ad esiti insoddisfacenti, si è cercato di modificare la superficie degli scaffold tramite immersione nel mezzo di coltura oppure sfruttando una sospensione in gelatina. Il primo metodo ha lo scopo di rendere più adesivo il substrato per le cellule, inducendole dunque ad aderire alla matrice per poi proliferare; il

secondo, invece, oltre a rendere adesivo il substrato, ha lo scopo di fissare temporaneamente le cellule. La gelatina in soluzione, infatti, gelifica a basse temperature (al di sotto dei 22°C<sup>[80]</sup>) mentre torna liquida ad alte temperature: una goccia di soluzione, arricchita delle cellule, viene posta sullo scaffold vegetale e il costrutto viene mantenuto a basse temperature per qualche decina di minuti, così che le cellule (fisse nel gel) abbiano il tempo di aderire alla superficie della matrice. Una volta incubato il costrutto a 37°C, la gelatina si scioglie e le cellule sono libere di muoversi lungo tutta la superficie e di colonizzare interamente lo scaffold. Anche questo tentativo, però, non è andato a buon fine: l'ipotesi è che le cellule abbiano avuto troppo poco tempo per aderire al substrato, oppure che le fette tagliate fossero troppo spesse e dunque non consentissero l'adesione cellulare. Sebbene le fasi di predisposizione dello scaffold su base vegetale con mela kiwi e melanzana siano promettenti al loro utilizzo per la rigenerazione tissutale, le fasi preliminari alla ricellularizzazione necessitano di ulteriori studi e approfondimenti sperimentali per consentire la definizione di un protocollo che assicuri il successo nella ricellularizzazione.

## CONCLUSIONE

La decellularizzazione vegetale è una procedura che negli ultimi anni ha riscontrato molto successo nel campo della medicina rigenerativa, in quanto favorisce la realizzazione di scaffold tridimensionali, vascolarizzabili, adatti per la coltura cellulare e che coprono un ampio range di proprietà meccaniche e strutturali. Negli ultimi dieci anni sono state testate diverse piante e diversi tipi di strutture vegetali per ottenere dei supporti tridimensionali adatti alla generazione di diversi tipi di tessuti umani: per esempio, le venature della foglia sono state sfruttate per generare dei vasi sanguigni, la parte centrale della mela per la coltura di cellule cardiache, il sedano per la generazione di tessuto tendineo e la carota per la semina di cellule ossee. I risultati ottenuti sono molto soddisfacenti, in particolare per quanto riguarda la vascolarizzazione dei costrutti e la versatilità della procedura: grazie alla grande varietà di strutture vegetali presenti in natura, infatti, è possibile coprire un ampio range di proprietà meccaniche. Inoltre, vista l'abbondanza di piante, non ci sono limiti legati alla disponibilità di materiale, criticità rilevante nella decellularizzazione di organi animali.

Poiché per la realizzazione di scaffold vegetali sono fondamentali la conoscenza della struttura chimica e del comportamento meccanico del materiale, oltre alla definizione di un protocollo di decellularizzazione efficace, il presente lavoro si è posto come obiettivi l'identificazione di tale protocollo e la caratterizzazione meccanica di tre diversi tipi di vegetali. Come vegetali sono stati scelti la mela, frutto notoriamente idoneo per la coltura cellulare <sup>[42], [51], [60], [52]</sup>, la melanzana e il kiwi, due frutti che invece non sono mai stati considerati per applicazioni biomedicali.

Il protocollo di decellularizzazione delineato risulta efficace, versatile e molto semplice, oltre ad essere economico. Il processo prevede l'utilizzo di un agente chimico di decellularizzazione, l'SDS, diluito in acqua in concentrazioni differenti a seconda del tipo di vegetale da decellularizzare. Tessuti più densi necessitano di soluzioni più concentrate affinché il trattamento, più aggressivo, sia efficace. I campioni vengono immersi nella soluzione e posti in agitazione per un tempo variabile tra 3 e 7 giorni: la durata ideale del trattamento è pari a 3 giorni, ma in alcuni casi, se i campioni sono tanti o particolarmente spessi, può essere necessario più tempo per permettere all'agente decellularizzante di entrare in contatto con tutte le parti del tessuto vegetale. La decellularizzazione è verificata visivamente, osservando il cambiamento di colore del campione immerso, che assume un aspetto biancastro e traslucido. Avvenuta la decellularizzazione, i campioni vengono trattati con una soluzione di

CaCl<sub>2</sub> per rimuovere i residui, tossici, di SDS e infine sterilizzati in etanolo. L'ultimo step è la liofilizzazione, dopo la quale i campioni possono essere conservati in frigo. Questo protocollo è versatile, ma deve essere ottimizzato per ogni tipo di struttura vegetale, poiché ogni tessuto ha caratteristiche e comportamenti differenti: una volta definiti i parametri principali, cioè durata del trattamento e concentrazione della soluzione di SDS, si potrebbe pensare di automatizzare il processo, rendendolo più veloce e permettendo all'operatore di concentrarsi su altre attività. Studi futuri potrebbero essere condotti per migliorare questo aspetto, per ora non ancora tenuto in considerazione.

Le strutture vegetali fresche, decellularizzate e liofilizzate vengono quindi analizzate da un punto di vista morfologico, meccanico, chimico e strutturale. Per studiare la morfologia, e allo stesso tempo confermare l'avvenuta decellularizzazione, vengono utilizzati il microscopio a scansione elettronica e immagini a fluorescenza: queste ultime evidenziano le fibre di cellulosa nei campioni trattati grazie ad un colorante blu che si lega ai polisaccaridi, il Calcofluor White. Per migliorare la visibilità delle fibre nei frutti cellularizzati viene utilizzata una soluzione chiamata ClearSee il cui scopo è quello di minimizzare l'autofluorescenza dei cloroplasti, organelli interni alle cellule vegetali. Un possibile sviluppo sarebbe utilizzare in contemporanea più marcatori che mostrino la presenza non solo delle fibre di cellulosa ma anche di altri elementi presenti in tutti i vegetali o solo in alcuni esemplari, quali le cellule, determinate proteine o residui di sali <sup>[78]</sup>. Inoltre, per validare l'avvenuta decellularizzazione del materiale sarebbe indicato svolgere altri tipi di analisi che quantifichino l'effettiva rimozione della componente cellulare, tra cui analisi istologiche o test di quantificazione del DNA.

La caratterizzazione meccanica, invece, è interessante per confrontare il comportamento a compressione dei tessuti vegetali con quello dei tessuti umani: il modulo di Young di kiwi, mela e melanzana, in ogni condizione trattata, varia in un range tra i 10 e i 300 kPa, intervallo nel quale si trovano i moduli elastici di diversi tessuti molli umani, come la pelle o il polmone. I valori ottenuti, tuttavia, sono riconducibili a vegetali a secco, mentre sarebbe interessante ripetere le misurazioni ad umido, così da studiare il comportamento meccanico dei vegetali in un ambiente simile a quello fisiologico.

Dal punto di vista chimico, le analisi FTIR confermano l'ipotesi che il principale componente di tutti e tre i vegetali analizzati sia la cellulosa: i picchi più rilevanti sono gli stessi, a cui si aggiungono qualche picco legato alla presenza di lignina e molti dovuti alla presenza di acqua

nella struttura. Questi ultimi sono meno evidenti nei vegetali liofilizzati, dove quindi risaltano alcuni picchi invisibili negli spettri dei vegetali decellularizzati o freschi, tra cui quello presente a  $898\text{ cm}^{-1}$ . Infine, l'angolo di contatto permette di conoscere l'idrofilicità del materiale trattato, che si rivela estremamente alta, al punto da non riuscire a misurare l'angolo tra la goccia e la superficie in esame per alcuni campioni.

Le tre analisi descritte, pur dando risultati in linea con quanto atteso, sono affette da un problema legato alla grande variabilità dei campioni e allo scarso numero di provini presenti per ogni classe di campioni: per avere dati più affidabili sarebbe opportuno estendere lo studio ad un numero di campioni più elevato, così da diminuire la variabilità e ottenere misure statisticamente significative. Inoltre, sarebbe interessante testare i campioni non solo a compressione, ma anche a trazione: la difficoltà di questa misurazione risiede principalmente nell'identificazione di afferraggi opportuni, che riescano a trattenere il materiale senza danneggiarlo.

Il lavoro svolto ha il grande vantaggio di poter essere esteso a qualsiasi tipo di struttura vegetale presente: in questo modo si potrebbe generare un database contenente le principali caratteristiche morfologiche, meccaniche, chimiche e strutturali dei tessuti vegetali, così da poter essere avvantaggiati nella scelta del materiale di composizione dello scaffold per coltura cellulare desiderato.

Nonostante i risultati positivi presentati in questo lavoro, ottenuti con vegetali non utilizzati in precedenza, l'ultima fase del progetto, la ricellularizzazione dello scaffold vegetale, necessita di approfondimenti ulteriori per la messa a punto del protocollo. Sebbene siano stati fatti tentativi successivi di ricellularizzazione, infatti, le cellule umane non sono rimaste adese alla superficie delle matrici vegetali, indipendentemente dal tipo di trattamento effettuato: anche l'utilizzo di gelatina o l'immersione nel terreno di coltura non hanno migliorato efficacemente l'adesione delle cellule al substrato. Sarà necessario sperimentare protocolli differenti che contemplino la realizzazione di un coating in fibronectina <sup>[58]</sup>, o in polilisina <sup>[52]</sup>, o in RGDOPA <sup>[56]</sup> oppure il crosslinking della cellulosa <sup>[51]</sup> o ancora la biomineralizzazione <sup>[56]</sup> per identificare la funzionalizzazione più efficace.

Una volta superati i problemi relativi all'adesione cellulare, sarà d'interesse testare i vegetali qui trattati per la generazione *in vitro* di tessuti di organi ancora mai trattati con supporti tridimensionali di origine vegetale, primi tra tutti il pancreas esocrino e il polmone.

## APPENDICE I

Classificazione delle tecnologie di fabbricazione degli scaffold <sup>[7]</sup>

TECNICHE DI FABBRICAZIONE		VANTAGGI	SVANTAGGI
TECNICHE CONVENZIONALI	1. Freeze-drying	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Versatile</li> <li>• Evita l'utilizzo di alte temperature</li> <li>• Dimensione dei porifacilmente controllabile</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto consumo energetico</li> <li>• Tempi lunghi</li> <li>• Solventi tossici</li> <li>• Pori irregolari e disomogenei</li> </ul>
	2. Solvent casting and practical leaching	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adatta per pareti sottili di campioni tridimensionali</li> <li>• Basso costo</li> <li>• Elevata porosità (50-90%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tempi lunghi</li> <li>• Solventi tossici</li> </ul>
	3. Gas foaming	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Porosità fino all'85%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presenza di pori chiusi o strato polimerico solido superficiale</li> </ul>
	4. Electrospinning	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Produzione di nanofibre</li> <li>• Composto di fibre omogeneo con alta resistenza a tensione</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solvente tossico</li> <li>• Complesso ottenere strutture 3D</li> <li>• Processo dipendente da tante variabili</li> </ul>
	5. Thermal-induced phase separation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Si ottengono scaffold polimerici cristallini termoplastici</li> <li>• Possibile integrazione di molecole bioattive</li> <li>• Alta porosità delle fibre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solo per materiali termoplastici</li> </ul>
TECNICHE DI PROTOTIPAZIONE RAPIDA	1. Stereolithography (SLA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta risoluzione</li> <li>• Pori uniformi e interconnessi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limiti nel processo di fotopolimerizzazione</li> <li>• Richiede grandi quantità di monomero e trattamenti postpolimerizzazione</li> </ul>
	2. Selective laser sintering (SLS)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eccellente controllo delle microstrutture</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Postprocessing necessario</li> </ul>

TECNICHE DI PROTOTIPAZIONE RAPIDA	2. Selective laser sintering (SLS)		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alte temperature</li> </ul>
	3. Solvent-based extrusion freeforming (SEF)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Integrabili parti metalliche, ceramiche o composite</li> <li>• Utilizzabile per realizzare uno stampo o l'oggetto finale</li> <li>• Controllo preciso della struttura dello scaffold</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Complesso settaggio dei parametri, che variano nel processo</li> </ul>
	4. Bioprinting	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Basso costo</li> <li>• Alta accuratezza e complessità di forme</li> <li>• Presenza delle cellule</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Necessarie le cellule</li> </ul>
	5. Fused deposition modeling (FDM)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bassa temperatura</li> <li>• Facile regolazione di diversi aspetti del design dello scaffold</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Non applicabile a tutti i tipi di polimero</li> </ul>

## INDICE DELLE FIGURE

<i>Figura 1: schema dell'approccio del TE basato sugli scaffold</i> <sup>[2]</sup> .....	6
<i>Figura 2: meccanismo di interazione tra membrana cellulare e SDS. a) membrana cellulare; b) una bassa concentrazione di SDS viene introdotta, i monomeri (coda grigia) si legano alla membrana perturbandola minimamente; c) la concentrazione di SDS aumenta, inducendo l'apertura della membrana in diversi punti; d) incrementando ancora la concentrazione di SDS si formano dei complessi di lipidi e SDS, oppure proteine e SDS sottoforma di micelle.</i> <sup>[15]</sup> .....	9
<i>Figura 3: possibili protocolli di decellularizzazione per i diversi tessuti. a) tessuti sottili (pericardio); b) tessuti più spessi (derma); c) tessuti grassi e amorfi (adiposo); d) tessuti compositi o organi semplici (trachea); e) organi vitali (fegato)</i> <sup>[14]</sup> .....	10
<i>Figura 4: esempi di organi prima e dopo la decellularizzazione. a) rene</i> <sup>[30]</sup> ; <i>b) cuore</i> <sup>[31]</sup> ; <i>c) trachea</i> <sup>[32]</sup> .....	11
<i>Figura 5: esempio di diversi vegetali decellularizzati. a) vegetali di origine; b) vegetali decellularizzati; c) immagini al SEM dei vegetali decellularizzati (200x e 500x)</i> <sup>[42]</sup> .....	13
<i>Figura 6: cellula vegetale. a) dettaglio della parete vegetale; b) parete e protoplasto</i> <sup>[43]</sup> .....	14
<i>Figura 7: struttura molecolare della cellulosa. n=grado di polimerizzazione</i> <sup>[45]</sup> .....	14
<i>Figura 8: modello fibrillare a frange della struttura sovramolecolare delle microfibrille</i> <sup>[45]</sup> .....	15
<i>Figura 9: esempi di utilizzo delle diverse parti della pianta come scaffold per la ricellularizzazione di diversi tessuti</i> <sup>[44]</sup> .....	16
<i>Figura 10: immagini a fluorescenza di A) fibroblasti, B) mioblasti, C) cellule epiteliali HeLa. In rosso è marcata la cellulosa, in verde la membrana cellulare e in blu i nuclei.</i> <sup>[49]</sup> .....	17
<i>Figura 11: paragone tra rete vascolare animale e sistema di venature nelle piante</i> <sup>[53]</sup> .....	17
<i>Figura 12: a) iniezione di un colorante rosso nelle venature dello spinacio. b) cellule endoteliali seminate sulla parte interna di una venatura</i> <sup>[53]</sup> .....	18
<i>Figura 13: fibroblasti adesi lungo la struttura in cellulosa di diversi scaffold.</i> .....	19
<i>Figura 14: microCT 8 settimane dopo l'impianto dello scaffold nel difetto osseo. a) solo difetto, b) scaffold,.....</i>	22
<i>Figura 15: schema del sistema vascolare biomimetico</i> <sup>[66]</sup> .....	24
<i>Figura 16: perfusione di cellule sanguigne di un grafting due foglie di Aptenia cordifolia</i> <sup>[67]</sup> .....	24
<i>Figura 17: apparato utilizzato per la decellularizzazione: a) stirrer; b) piastra basculante</i> .....	28
<i>Figura 18: esempio della misurazione dell'angolo di contatto a partire da una foto scattata dall'operatore della goccia d'acqua deposta sulla superficie in analisi</i> .....	31
<i>Figura 19: confronto tra vegetali a) freschi: nell'ordine, b_f, k_f, mz_f, m_f; b) decellularizzati: nell'ordine b_d, k_d, mz_d, m_d; c) liofilizzati: nell'ordine b_dl, k_dl, mz_dl, m_dl. b=broccolo</i> .....	32
<i>Figura 20: immagini al microscopio a scansione elettronica (SEM) di mela, melanzana e kiwi. a), c) ingrandimento 100x, scale bar 500µm b) ingrandimento 700x, scale bar 50µm d) ingrandimento 200x, scale bar 1mm e) ingrandimento 50x, scale bar 200 µm f) ingrandimento 500x, scale bar 200 µm</i> .....	33
<i>Figura 21: a) staining della cellulosa fatto con CFW per i tre diversi vegetali nelle diverse condizioni; b) dettaglio della struttura della parte centrale del kiwi fresco. dec=decellularizzato, liof_liofilizzato. scale bar 100µm</i> .....	34
<i>Figura 22: modulo di Young e allungamento massimo relativo della mela nelle 4 condizioni</i> .....	35
<i>Figura 23: modulo di Young e allungamento massimo relativo della melanzana nelle 4 condizioni</i> .....	36
<i>Figura 24: modulo di Young e allungamento massimo relativo del kiwi nelle 4 condizioni</i> .....	36
<i>Figura 25: curve sforzo-deformazione rappresentative della melanzana nelle 4 condizioni</i> .....	38
<i>Figura 26: curve sforzo-deformazione rappresentative della mela nelle 4 condizioni</i> .....	38
<i>Figura 27: curve sforzo-deformazione rappresentative del kiwi nelle 4 condizioni</i> .....	39
<i>Figura 28: spettro della cellulosa</i> <sup>[68]</sup> .....	40
<i>Figura 29: confronto tra gli spettri della mela nelle 3 condizioni</i> .....	40
<i>Figura 30: confronto tra gli spettri della melanzana nelle 3 condizioni</i> .....	41
<i>Figura 31: confronto tra gli spettri del kiwi nelle 3 condizioni</i> .....	41
<i>Figura 32: schema della multiwell usata per l'esperimento di ricellularizzazione</i> .....	44

<i>Figura 33: staining col DAPI dei fibroblasti seminati su controlli e su mela, melanzana e kiwi con le 3 diverse funzionalizzazioni. bar scale 100 <math>\mu</math>m. gel=gelatina, liof=liofilizzato. ....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 34: staining della cellulosa di a) mela, b) melanzana e c) kiwi: all'interno dei cerchi verdi sono evidenziate le zone a fuoco, nei cerchi rossi le zone fuori fuoco. bar scale 100 <math>\mu</math>m .....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 35: confronto tra tempistiche di immersione del kiwi in SDS a) kiwi integro dopo 72h; b) kiwi disciolto dopo 7g di immersione.....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 36: confronto tra kiwi decellularizzati liofilizzati a) lasciati in immersione per 7 giorni, b) lasciati in immersione per 3 giorni .....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 37: fette di kiwi, pomodoro, broccolo e melanzana immerse in una soluzione di SDS e poste in agitazione da 15 minuti .....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 38: modul elastici di tessuti umani e vegetali a confronto <sup>[50]</sup>.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 39: moduli elastici dei tessuti umani, dal meno rigido al più rigido <sup>[79]</sup> .....</i>	<i>52</i>

## BIBLIOGRAFIA

- [1] R. Langer e J. P. Vacanti, «Tissue engineering,» *Science*, vol. 260, n. 5110, pp. 920-926, 1993.
- [2] M. Asadian, K. V. Chan, M. Norouzi, S. Grande, P. Cools, R. Morent e N. De Geyter, « Fabrication and plasma modification of nanofibrous tissue engineering scaffolds.,» *Nanomaterials*, vol. 10, n. 1, p. 119, 2020.
- [3] F. Akter, «Principles of tissue engineering.,» *Tissue engineering made easy.*, pp. 3-16, 2016.
- [4] P. D. Benya e J. D. Shaffer, «Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels.,» *Cells*, vol. 30, n. 1, pp. 215-224, 1982.
- [5] C. P. Soares, V. Midlej, M. E. W. D. Oliveira, M. Benchimol, M. L. Costa e C. Mermelstein, «2D and 3D-organized cardiac cells shows differences in cellular morphology, adhesion junctions, presence of myofibrils and protein expression,» *PLoS one*, vol. 7, n. 5, 2012.
- [6] B. M. Baker e C. S. Chen, «Deconstructing the third dimension—how 3D culture microenvironments alter cellular cues.,» *Journal of cell science*, vol. 125, n. 13, pp. 3015-3024, 2012.
- [7] A. Eltom, G. Zhong e A. Muhammad, «Scaffold techniques and designs in tissue engineering functions and purposes: a review,» *Advances in Materials Science and Engineering*, n. 2019, 2019.
- [8] S. Yi, L. Xu e X. Gu, «Scaffolds for peripheral nerve repair and reconstruction.,» *Experimental neurology*, n. 319, 2019.
- [9] J. P. Temple, D. L. Hutton, B. P. Hung, P. Y. Huri, C. A. Cook, R. Kondragunta, X. Jia e W. L. Grayson, «Engineering anatomically shaped vascularized bone grafts with hASCs and 3D-printed PCL scaffolds,» *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 102, n. 12, pp. 4317-4325, 2014.
- [10] L. Zhang, G. Yang, B. N. Johnson e X. Jia, «Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair,» *Acta biomaterialia*, n. 84, pp. 16-33, 2019.
- [11] E. Malikmammadov, T. E. Tanir, A. Kiziltay, V. Hasirci e N. Hasirci, «PCL and PCL-based materials in biomedical applications.,» *Journal of Biomaterials science, Polymer edition*, vol. 29, n. 7-9, pp. 863-893, 2018.
- [12] J. Rouwkema, N. C. Rivron e C. A. van Blitterswijk, «Vascularization in tissue engineering.,» *Trends in biotechnology*, vol. 26, n. 8, pp. 434-441, 2008.

- [13] A. Schmitt, R. Csiki, A. Tron, B. Saldamli, J. Tubel, K. Florian, S. Siebenlist, E. Balmayor e R. Burgkart, «Optimized protocol for whole organ decellularization,» *European journal of medical research*, vol. 22, n. 1, pp. 1-9, 2017.
- [14] P. M. Crapo, T. W. Gilbert e S. F. Badylak, «An overview of tissue and whole organ decellularization processes,» *Biomaterials*, vol. 32, n. 12, pp. 3233-3243, 2011.
- [15] S. Kalipatnapu e A. Chattopadhyay, «Membrane protein solubilization: recent advances and challenges in solubilization of serotonin1A receptors,» *IUBMB life*, vol. 57, n. 7, pp. 505-512, 2005.
- [16] A. Gilpin e Y. Yang, «Decellularization strategies for regenerative medicine: from processing techniques to applications,» *BioMed research international*, n. 2017, 2017.
- [17] H. C. Ott, T. S. Matthiesen, S. K. Gosh, L. D. Black, S. M. Kren, T. I. Nrtoff e D. A. Taylor, «Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart,» *National Library of Medicine*, vol. 14, n. 2, pp. 213-221, 2008.
- [18] T. H. Petersen, E. A. Calle, L. Zhao, E. J. Lee, L. Gui, M. B. Raredon, K. Gavrilov, T. Yi, Z. W. Zhuang, C. Breuer, E. Herzog e L. E. Niklason, «Tissue-engineered lungs for in vivo implantation,» *Science*, vol. 329, n. 5991, pp. 538-541, 2010.
- [19] J. Cortiella, J. Niles, A. Cantu, A. Brettler, A. Pham, G. Vargas, S. Winston, J. Wang, S. Walls e J. E. Nichols, «Influence of Acellular Natural Lung Matrix on Murine Embryonic Stem Cell Differentiation and Tissue Formation,» *Tissue Engineering Part A*, vol. 16, n. 8, pp. 2565-2580, 2010.
- [20] E. A. Ross, M. J. Williams, T. Hamazaki, N. Terada, W. L. Clapp, C. Adin, G. W. Ellison, M. Jorgensen e C. D. Batich, «Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds,» *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 20, n. 11, pp. 2338-2347, 2009.
- [21] P. M. Baptista, G. Orlando, S. H. Mirmalek-Sani, M. Siddiqui, A. Atala e S. Soker, «Whole organ decellularization - a tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering,» *Conference proceedings: IEEE Engineering in Medicine and Biology Society.*, n. 2009, pp. 6526-6529, 2009.
- [22] T. Shupe, M. Williams, A. Brown, B. Willenberg e B. E. Petersen, «Method for the decellularization of intact rat liver,» *Organogenesis*, vol. 6, n. 2, pp. 134-136, 2010.
- [23] B. E. Uygun, A. Soto-Gutierrez, H. Yagi, M. L. Izamis, M. A. Guzzardi, C. Shulman, J. Milwid, N. Kobayashi, A. Tilles, F. Berthiaume, M. Hertl, Y. Nahmias, M. L. Yarmush e K. Uygun, «Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix,» *National Library of Medicine*, vol. 16, n. 7, pp. 814-820, 2020.
- [24] C. V. Montoya e P. S. McFetridge, «Preparation of ex vivo-based biomaterials using convective flow decellularization,» *Tissue Engineering Part C Methods*, vol. 15, n. 2, pp. 191-200, 2009.

- [25] J. S. Cartmell e M. G. Dunn, «Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties,» *Journal of biomedical materials research*, vol. 49, n. 1, pp. 134-140, 2000.
- [26] S. R. Meyer, B. Chiu, T. A. Churchill, L. Zhu, J. R. Lakey e D. B. Ross, «Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat.,» *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 79, n. 2, pp. 254-262, 2006.
- [27] J. Zhou, O. Fritze, M. Schleicher, H. P. Wendel, K. Schenke-Layland, C. Harasztosi, S. Hu e U. A. Stock, «Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity.,» *Biomaterials.*, vol. 31, n. 9, pp. 2549-2554, 2010.
- [28] S. Baiguera, P. Jungebluth, A. Burns, C. Mavilia, J. Haag, P. De Coppi e P. Macchiarini, «Tissue engineered human tracheas for in vivo implantation,» *Biomaterials*, vol. 31, n. 34, pp. 8931-8938, 2010.
- [29] M. Ozeki, Y. Narita, H. Kagami, N. Ohmiya, A. Itoh, Y. Hirooka, Y. Niwa, M. Ueda e H. Goto, «Evaluation of decellularized esophagus as a scaffold for cultured esophageal epithelial cells,» *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 79, n. 4, pp. 771-778, 2006.
- [30] J. S. Uzarski, J. Su, Y. Xie, Z. J. Zhang, H. H. Ward, A. Wandinger-Ness, W. M. Miller e J. A. Wertheim, «Epithelial cell repopulation and preparation of rodent extracellular matrix scaffolds for renal tissue development.,» *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, vol. 102, 2015.
- [31] S. Zia, M. Mozafari, G. Natasha, A. Tan, Z. Cui e A. M. Seifalian, «Hearts beating through decellularized scaffolds: whole-organ engineering for cardiac regeneration and transplantation.,» *Critical reviews in biotechnology*, vol. 36, n. 4, pp. 705-715, 2016.
- [32] D. M. Giraldo-Gomez, S. J. García-López, L. Tamay-de-Dios, R. Sanchez-Sanchez, J. Villalba-Caloca, A. Sotres-Vega, M. L. Del Prado-Audelo, K. K. Gómez-Lizàrraga, D. Garciadiego-Càzares e M. C. Piña-Barba, «Fast cyclical-decellularized trachea as a natural 3D scaffold for organ engineering,» *Materials Science and Engineering: C*, vol. 105, n. 110142, 2019.
- [33] D. Choudhury, M. Yee, Z. L. J. Sheng, A. Amirul e M. W. Ning, «Decellularization Systems and Devices: State-of-the-art Review.,» *Acta Biomaterialia*, 2020.
- [34] R. W. Bonvillain, M. E. Scarritt, N. C. Pashos, J. P. Mayeux, C. L. Meshberger, A. M. Betancourt, D. E. Sullivan e B. A. Bunnell, «Nonhuman primate lung decellularization and recellularization using a specialized large-organ bioreactor.,» *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, vol. 82, 2013.
- [35] F. P. Kreutz, G. W. Hyatt, T. C. Turner e A. L. Bassett, «The preservation and clinical use of freeze-dried bone.,» *The Journal of Bone and Joint Surgery*, vol. 33, n. 4, pp. 863-888, 1951.
- [36] D. J. Wainwright, «Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns.,» *Burns*, vol. 21, n. 4, pp. 243-248, 1995.

- [37] J. P. Guyette, S. E. Gilpin, J. M. Charest, L. F. Tapias, X. Ren e H. C. Ott, «Perfusion decellularization of whole organs,» *Nature protocols*, vol. 9, n. 6, pp. 1451-1468, 2014.
- [38] B. Struecker, K. H. Hillebrandt, R. Voitl, A. Butter, R. B. Schmuck, A. Reutzel-Selke, D. Geisel, K. Joehrens, P. A. Pickerodt, N. Raschok, G. Puhl, P. Neuhaus, J. Pratschke e I. M. Sauer, «Porcine liver decellularization under oscillating pressure conditions: a technical refinement to improve the homogeneity of the decellularization process,» *Tissue Engineering Part C Methods*, vol. 21, n. 3, p. 303–313, 2015.
- [39] P. L. Sánchez, M. E. Fernández-Santos, S. Costanza, A. M. Climent, I. Moscoso, M. A. Gonzalez-Nicolas, R. Sanz-Ruiz, H. Rodriguez, S. M. Kren, G. Garrido, J. L. Escalante, J. Bermejo, J. Elizaga, J. Menarguez, R. Yotti, C. Perez del Villar, M. A. Espinosa, M. S. Guillem, J. T. Willerson, A. Bernad, R. Matesanz, D. A. Taylor e F. Fernandez-Avilés, «Acellular human heart matrix: a critical step toward whole heart grafts,» *Biomaterials*, n. 61, pp. 279-289, 2015.
- [40] D. M. Casali, R. M. Handleton, T. Shazly e M. A. Matthews, «A novel supercritical CO<sub>2</sub> -based decellularization method for maintaining scaffold hydration and mechanical properties,» *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 131, pp. 72-81, 2018.
- [41] A. Porzionato, E. Stocco, S. Barbon, F. Grandi, V. Macchi e R. De Caro, «Tissue-engineered grafts from human decellularized extracellular matrices: a systematic review and future perspectives.,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, n. 12, 2018.
- [42] J. Lee, H. Jung, N. Park, S. Park e J. H. Ju, «Induced osteogenesis in plants decellularized scaffolds,» *Scientific Reports*, vol. 9, n. 1, pp. 1-10, 2019.
- [43] Z. E. Taiz L., *Plant Physiology*, 3rd a cura di, Sunderland: Sinauer Associates, 2002, p. 690.
- [44] Y. Zhu, Q. Zhang, S. Wang, J. Zhang, S. Fan e X. Lin, «Current Advances in the Development of Decellularized Plant Extracellular Matrix,» *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, n. 650, 2021.
- [45] D. Klemm, B. Heublein, H. P. Fink e A. Bohn, «Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material.,» *Angewandte chemie international edition*, vol. 44, n. 22, pp. 3358-3393, 2005.
- [46] E. Entcheva, H. Bien, L. Yin, C. Y. Chung, M. Farrell e Y. Kostov, «Functional cardiac cell constructs on cellulose-based scaffolding,» *Biomaterials*, vol. 25, n. 26, pp. 5753-5762, 2004.
- [47] W. K. Czaja, D. J. Young, M. Kawecki e R. M. Brown, «The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications,» *Biomacromolecules*, vol. 8, n. 1, pp. 1-12, 2007.
- [48] R. A. Pértile, S. Moreira, R. M. Gil da Costa, A. Correia, L. Guardão, F. Gartner, M. Villanova e M. Gama, «Bacterial cellulose: long-term biocompatibility studies.,» *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 23, n. 10, pp. 1339-1354, 2012.

- [49] D. Klemm, K. Petzold-Welcke, F. Kramer, T. Richter, V. Raddatz, W. Fried e D. Fischer, «Biotech nanocellulose: A review on progress in product design and today's state of technical and medical applications.,» *Carbohydrate Polymers*, n. 254, 2021.
- [50] J. Lacombe, A. F. Harris, R. Zenhausern e S. Karsunsky, «Plant-Based Scaffolds Modify Cellular Response to Drug and Radiation Exposure Compared to Standard Cell Culture Models,» *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 8, n. 932, 2020.
- [51] D. J. Modulevsky, C. Lefebvre, K. Haase, Z. Al-Rekabi e A. E. Pelling, «Apple Derived Cellulose Scaffolds for 3D Mammalian Cell Culture,» *PLoS one*, vol. 9, n. 5, 2014.
- [52] N. Contessi Negrini, N. Toffoletto, S. Farè e L. Altomare, «Plant Tissues as 3D Natural Scaffolds for Adipose, Bone and Tendon Tissue Regeneration,» *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 8, n. 723, 2020.
- [53] J. R. Gershlak, S. Hernandez, G. Fontana, L. R. Perreault, K. J. Hansen, S. A. Larson, B. Y. K. Binder, D. M. Dolivo, T. Yang, T. Dominko, M. W. Rolle, P. J. Weathers, F. Medina-Bolivar, C. L. Cramer, W. L. Murphy e G. R. Gaudette, «Crossing kingdoms: Using decellularized plants as perfusable tissue engineering scaffolds,» *Biomaterials*, n. 125, pp. 13-22, 2017.
- [54] S. Dikici, F. Claeysens e S. MacNeil, «Decellularised baby spinach leaves and their potential use in tissue engineering applications: Studying and promoting neovascularisation,» *Journal of Biomaterials Applications*, vol. 34, n. 4, pp. 546-559, 2019.
- [55] K. Jansen, M. Evangelopoulou, C. P. Casellas, S. Abrishamcar, J. Jansen, T. Vermonden e R. Maereeuw, «Spinach and Chive for Kidney Tubule Engineering: the Limitations of Decellularized Plant Scaffolds and Vasculature,» *The AAPS Journal*, vol. 23, n. 1, pp. 1-7, 2021.
- [56] G. Fontana, J. R. Gershlak, M. Adamski, J. S. Lee, S. Matsumoto, H. D. Le, B. Binder, J. Wirth, G. R. Gaudette e W. L. Murphy, «Biofunctionalized plants as diverse biomaterials for human cell culture,» *Advanced Healthcare Materials*, vol. 6, n. 8, 2017.
- [57] S. Campuzano, N. B. Mogilever e A. E. Pelling, «Decellularized Plant-Based Scaffolds for Guided Alignment of Myoblast Cells,» *bioRxiv*, 2020.
- [58] Y.-W. Cheng, D. J. Shiwarski, R. L. Ball, K. A. Whitehead e A. W. Feinberg, «Engineering Aligned Skeletal Muscle Tissue Using Decellularized Plant-Derived Scaffolds,» *ACS Biomaterials Science & Engineering*, vol. 6, n. 5, pp. 3046-3054, 2020.
- [59] A. Salehi, M. A. Mobarhan, J. Mohammadi, H. Shahsavarani, M. A. Shokrgozar e A. Alipour, «Cabbage-derived three-dimensional cellulose scaffold-induced osteogenic differentiation of stem cells,» *Journal of Cellular Physiology*, vol. 236, n. 7, pp. 5306-5316, 2021.
- [60] D. J. Modulevsky, C. M. Cuerrier e A. E. Pelling, «Biocompatibility of Subcutaneously Implanted Plant-Derived Cellulose Biomaterials,» *PLoS one*, vol. 11, n. 6, 2016.

- [61] R. J. Hickey, D. J. Modulevsky, C. M. Cuerrier e A. E. Pelling, «Customizing the Shape and Microenvironment Biochemistry of Biocompatible Macroscopic Plant-Derived Cellulose Scaffolds,» *ACS Biomaterials, Science & Engineering*, vol. 4, n. 11, pp. 3726-3736, 2018.
- [62] M. Adamski, G. Fontana, J. R. Gershlak, G. R. Gaudette, H. D. Le e W. L. Murphy, «Two methods for decellularization of plant tissues for tissue engineering applications,» *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n. 135, 2018.
- [63] N. V. Phan, T. Wright, M. M. Rahman, J. Xu e J. M. Coburn, «In Vitro Biocompatibility of Decellularized Cultured Plant Cell-Derived Matrices,» *ACS Biomaterials Science & Engineering*, vol. 6, n. 2, pp. 822-832, 2020.
- [64] M. E. Gomes, M. T. Rodrigues, R. M. Domingues e R. L. Reis, «Tissue engineering and regenerative medicine: new trends and directions—a year in review.,» *Tissue Engineering Part B: Reviews*, vol. 23, n. 3, pp. 211-224, 2017.
- [65] M. Imran, S. Khan e F. F. Khan, «From Decellurization to Imaging to 3-D Printing: low-cost plant-derived 3D-printed tissue scaffolds for tissue engineering,» *bioRxiv*, n. 2020-12, 2021.
- [66] M. Mao, H. P. Bei, C. H. Lam, P. Chen, S. Wang, Y. Chen, J. He e X. Zhao, «Human-on-Leaf-Chip: A Biomimetic Vascular System Integrated with Chamber-Specific Organs,» *Small*, vol. 16, n. 22, 2020.
- [67] Y. Wang, T. Dominko e J. P. Weathers, «Using decellularized grafted leaves as tissue engineering scaffolds for mammalian cells,» *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, vol. 56, n. 6, pp. 765-774, 2020.
- [68] E. A. A. M. T. F. T. A. O. K. Benarbia A., «Kinetic Thermal Degradation of Cellulose, Polybutylene Succinate and a Green Composite: Comparative Study,» *World Journal of Environmental Engineering*, pp. 95-110, 2015.
- [69] S. M. Doncea, R. M. Ion, R. C. Fierascui, E. Bacalum, A. A. Bunaciu e H. Y. Aboul-Enein, «Spectral methods for historical paper analysis: composition and age approximation,» *Instrumentation Science & Technology*, vol. 38, n. 1, pp. 96-106, 2009.
- [70] W. T. Wulandari, A. Rochliadi e I. M. Arcana, «Nanocellulose prepared by acid hydrolysis of isolated cellulose from sugarcane bagasse,» *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*, vol. 107, n. 1 IOP Publishing, p. 012045, 2016.
- [71] A. C. Gowman, M. C. Picard, A. Rodriguez-Urbe, M. Misra, H. Khalil, M. Thimmanagari e A. K. Mohanty, «Physicochemical Analysis of Apple and Grape Pomaces,» *BioResources*, vol. 14, n. 2, pp. 3210-3230, 2019.
- [72] W. Chen, H. He, H. Zhu, M. Cheng, Y. Li e S. Wang, «Thermo-Responsive Cellulose-Based Material with Switchable Wettability for Controllable Oil/Water Separation,» *Polymers*, vol. 10, n. 6, p. 592, 2018.

- [73] R. D. Kale, P. S. Bansal e V. G. Gorade, «Extraction of Microcrystalline Cellulose from Cotton Sliver and Its Comparison with Commercial Microcrystalline Cellulose,» *Journal of Polymers and the Environments*, vol. 26, pp. 355-364, 2018.
- [74] M. Andresen, P. Stenius, B. S. Tanem e L. S. Johansson , «Properties and characterization of hydrophobized microfibrillated cellulose.,» *Cellulose*, vol. 13, pp. 665-677, 2006.
- [75] M. A. Delete, D. Nuyettens, A. T. Duga, A. Ambaw, F. Lebeau, B. M. Nicolai e P. Verboven, «Predicting the dynamic impact behaviour of spray droplets on flat plant surfaces,» *Soft Matter*, vol. 12, pp. 7195-7211, 2016.
- [76] S. Rbihi, A. Aboulouard, L. Laallam e A. Jouaiti, «Contact Angle Measurements of Cellulose based Thin Film composites: wettability, surface free energy and surface hardness,,» *Surfaces and Interfaces*, vol. 21, n. 100708, 2020.
- [77] D. Kurihara, Y. Mizuta, Y. Sato e T. Higashiyama, «ClearSee: a rapid optical clearing reagent for whole-plant fluorescence imaging,» *The Company of Biologists*, vol. 14, n. 23, pp. 4168-4179, 2015.
- [78] R. Ursache, T. G. Andersen, P. Marhavy e N. Geldner, «A protocol for combining fluorescent proteins with histological stains for diverse cell wall components,» *The Plant Journal*, vol. 93, n. 2, pp. 399-412, 2018.
- [79] C. F. Guimarães, L. Gasperini, A. P. Marques e R. L. Reis, «The stiffness of living tissues and its implications for tissue engineering,» *Nature Reviews Materials*, vol. 5, n. 5, pp. 351-370, 2020.
- [80] O. Miyawaki, C. Omote e K. Matsuhira, «Thermodynamic Analysis of Sol–Gel Transition of Gelatin in Terms of Water Activity in Various Solutions,» *Biopolymers*, vol. 103, n. 12, pp. 685-691, 2015.