

**ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSIT`A DI BOLOGNA  
CAMPUS DI CESENA  
SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA**

**CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

TITOLO DELL'ELABORATO:

**SCAFFOLD DECELLULARIZZATI PER LA TERAPIA  
SOSTITUTIVA RENALE**

Elaborato in:  
Biochimica

*Relatore:*  
Prof. EMANUELE DOMENICO GIORDANO

*Presentata da:*  
FRANCESCO MAROTTA

---

ANNO ACCADEMICO 2012–2013  
SESSIONE III



---

# Abstract

Nell'area dell'ingegneria tissutale si sta affermando una nuova tecnica che consiste nell'utilizzo di scaffold per la rigenerazione dell'apparato renale. Nella presente tesi, dopo un'introduzione fatta sulle terapie per la sostituzione renale, sono state analizzate le tecniche, le caratteristiche e presentati i risultati finora raggiunti nella decellularizzazione e ricellularizzazione di scaffold renali.

---

# Indice

<b>Prefazione</b> .....	V
<b>1. Apparato Renale: Anatomia e Fisiologia</b> .....	1
1.1 Vascolarizzazione.....	3
1.2 Visione d'insieme della funzione renale.....	5
1.3 L'Unità funzionale del rene: il nefrone.....	6
<b>2. Terapie sostitutive per malattie renali allo stato terminale</b> .....	12
2.1 Malattie renali.....	12
2.2 Terapie sostitutive odierne.....	14
2.3 Trapianto d'organo.....	22
<b>3. Terapie avanzate per la sostituzione renale</b> .....	27
3.1 Ruolo della matrice extracellulare.....	30
3.2 La decellularizzazione del rene.....	31
3.3 Protocollo di sterilizzazione e lavaggio del patibolo renale.....	31
3.4 Origine delle cellule.....	39
3.5 Il bioreattore.....	40
3.6 La ricellularizzazione dello scaffold.....	42
<b>4. Conclusioni</b> .....	46
<b>5. Bibliografia e sitografia</b> .....	48

## Prefazione

L'insufficienza renale allo stadio terminale (ESRD) sta rapidamente diventando un problema globale. La maggior parte dei malati affetti da ESRD deve ricorrere ai trattamenti sostitutivi, quali l'emodialisi o la dialisi peritoneale. Tali terapie sono però in grado di ripristinare solo parzialmente la funzione renale trattandosi di cure intermittenti e incapaci di riprodurre le funzioni metaboliche ed endocrine.

Una soluzione possibile potrebbe essere rappresentata dal trapianto renale; purtroppo però esso risulta limitato a causa della disponibilità limitata di donatori, al punto che meno del 20 % dei pazienti riesce a ricevere un intervento.

Un'altra possibile soluzione potrebbe essere rappresentata dall'utilizzo di reni bioartificiali ma l'uso di organi artificiali o di dispositivi meccanici risulta limitato per la durata e per l'insorgere di eventuali infezioni.

In questa prospettiva, l'utilizzo di scaffold renali fatti da matrice extracellulare allogenica o xenogenica potrebbe costituire la soluzione più promettente per la rigenerazione di questo organo. Questi scaffold, dopo un'accurata ricellularizzazione rappresentano modelli ottimali per la ricostruzione di tessuti o organi.



# CAPITOLO 1

## APPARATO RENALE: ANATOMIA E FISIOLOGIA

I reni sono due organi retroperitoneali situati a destra e a sinistra della colonna vertebrale. Insieme alle vie urinarie costituiscono l'apparato urinario, che filtra dal sangue i prodotti di scarto del metabolismo e li espelle tramite l'urina. Hanno una forma definibile come quella di due "fagioli" di colore bruno-rossastro. Ogni rene misura 12 cm di lunghezza, 6 cm di larghezza e 3 cm antero-posteriormente, con il rene sinistro tendenzialmente più lungo del destro di 1-1,5 cm. Il loro peso è variabile, 150 g negli uomini e 135 g nelle donne [2]. Il rene destro dunque risulta essere di conseguenza più corto e tozzo ed è generalmente situato in posizione inferiore a causa della presenza del fegato che lo spinge verso la fossa iliaca.

Nel rene si distinguono una faccia anteriore convessa, una faccia posteriore, un polo superiore arrotondato, un polo inferiore più appuntito, un margine laterale convesso e uno mediale. Quest'ultimo è incavato nella sua parte di mezzo dove esiste una fessura verticale, l'ilo renale attraverso cui passano i vasi sanguigni e linfatici, i nervi e la pelvi renale. L'ilo immette in una cavità schiacciata il seno renale in cui sono accolti i calici minori e maggiori e parte della pelvi, i vasi linfatici, i nervi, le diramazioni dell'arteria renale e le radici della vena renale. Tutte queste formazioni sono immerse in un tessuto adiposo che, attraverso l'ilo, continua con il grasso perineale e prende il nome di Capsula adiposa. Essa è presente anche in individui molto magri e in media è spessa 3 cm, anche se lo spessore varia da soggetto a soggetto.

Ciascun rene, avvolto dalla capsula adiposa, è contenuto in una loggia fibrosa renale. Quest'ultima rappresenta una differenziazione del tessuto connettivo retroperitoneale che, in vicinanza del rene, si ispessisce costituendo la *fascia renale*. In corrispondenza del margine laterale del rene, la fascia renale si sdoppia in due foglietti, il foglietto anteriore o prerenale e il foglietto posteriore o retrorenale. Oltre che dalla fascia renale, i reni



sono mantenuti nella loro sede dal *peduncolo vascolare*, che li ancora ai grossi vasi (aorta e vena cava inferiore), e dalla positività della pressione addominale. Tuttavia essi sono dotati di una certa mobilità.

I reni hanno diverse funzioni:

- Produzione di urina.
- Regolazione dell'osmolalità e del volume dei liquidi corporei.
- Regolazione dell'equilibrio elettrolitico.
- Regolazione dell'equilibrio acido-base.
- Escrezione dei prodotti terminali del metabolismo e delle sostanze estranee.
- Produzione e secrezione di ormoni.

Grazie a tutte queste funzioni i reni sono organi essenziali per la sopravvivenza dell'individuo. Molte persone d'altro canto vivono normalmente con un unico rene, infatti la perdita funzionale di uno dei due reni è compatibile con la vita; il rene residuo subisce un processo di ipertrofia compensatoria.

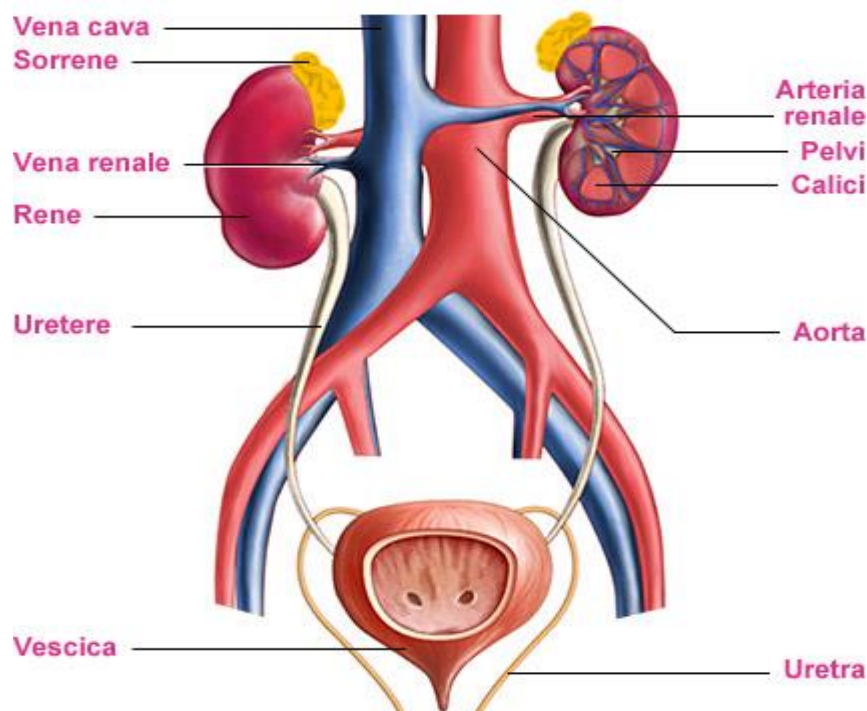


Figura 1.1: Anatomia dell'apparato renale

## 1.1 VASCOLARIZZAZIONE

Per svolgere la loro azione di filtrazione del sangue, i reni necessitano di un abbondante apporto ematico, tanto che ogni minuto circolano nel rene circa 1.1 litri di sangue, circa il 20-25% della gittata cardiaca nonostante essi costituiscano solo lo 0,4% del peso corporeo totale, pesando circa 150 grammi ognuno. Ciascun rene riceve una grossa arteria, l'arteria renale, che ha un calibro di 6-7 mm; essa invia qualche ramo anche alla capsula adiposa. L'arteria renale per entrare nel rene devia lateralmente in maniera quasi orizzontale; dopo un decorso di 5 cm (arteria destra) e circa 7 cm (arteria sinistra), dato che l'aorta si trova leggermente più in alto e più a sinistra rispetto alla linea mediana, l'arteria renale entra nell'ilo, dividendosi in 3 o 4 rami che occupano la porzione media del peduncolo. Nel seno renale i rami si dividono nelle arterie interlobari, che penetrano ognuna in una colonna renale; risalendo verso la base delle piramidi renali dove si biforcano decorrendo parallelamente alla base della piramide stessa, senza anastomizzarsi tra di loro, divenendo arterie arcuate. Dalla convessità delle arterie arcuate si dipartono le arterie interlobulari che si addentrano nella parte convoluta della corticale segnando il limite tra i lobuli e risolvendosi, a livello della cortex corticis, nelle arterie perforanti per la tonaca fibrosa. Dalle arterie interlobulari si distaccano a loro volta le arteriole afferenti che costituiscono i glomeruli dei corpuscoli renali circostanti da cui emergono le arteriole efferenti che si vanno a risolvere in una rete capillare peritubulare o nel caso dei corpuscoli più vicini alla midollare, alla midollare stessa, col nome di arterie rette spurie. L'ultimo tipo di vaso arterioso sono le arterie rette vere che si distaccano dalla concavità delle arterie arcuate portandosi fino all'apice delle piramidi renali.

Le vene renali decorrono all'incirca nella stessa disposizione delle arterie, e, si formano dai vasi arteriosi a livello della papilla renale e unendosi vanno a formare le venule rette ascendenti, che risalgono lungo i raggi midollari seguendo le arteriole a cui sono accoppiate fino a drenare a livello della base delle piramidi renali nelle vene arcuate o nelle vene interlobulari. Le arteriole discendenti e le venule ascendenti sono perciò

molto vicine tra loro e questo facilita fenomeni di scambio. Le vene interlobulari decorrono verso la corticale interna dove drenano nelle vene arcuate; le vene arcuate procedono trasversalmente e drenano nelle vene interlobari, che discendono lungo le colonne renali per formare infine le due vene renali che escono dall'ilo del rene. Le vene renali sono anteriori alle arterie renali, e dopo un decorso trasversale di circa 3-4 cm (vena destra) e 8-9 cm (vena sinistra) si inseriscono nella vena cava inferiore. Le vene renali ricevono anche parte delle vene provenienti dalla capsula adiposa. Reni e capsula adiposa sono percorsi da una fitta rete di vasi linfatici, che si radunano poi in una serie di linfonodi adiacenti ai grossi vasi. È importante sottolineare che la circolazione sanguigna renale non rappresenta un circolo "classico", perché il sangue attraversa due arteriole e due trame capillari prima di confluire nel sistema venoso.

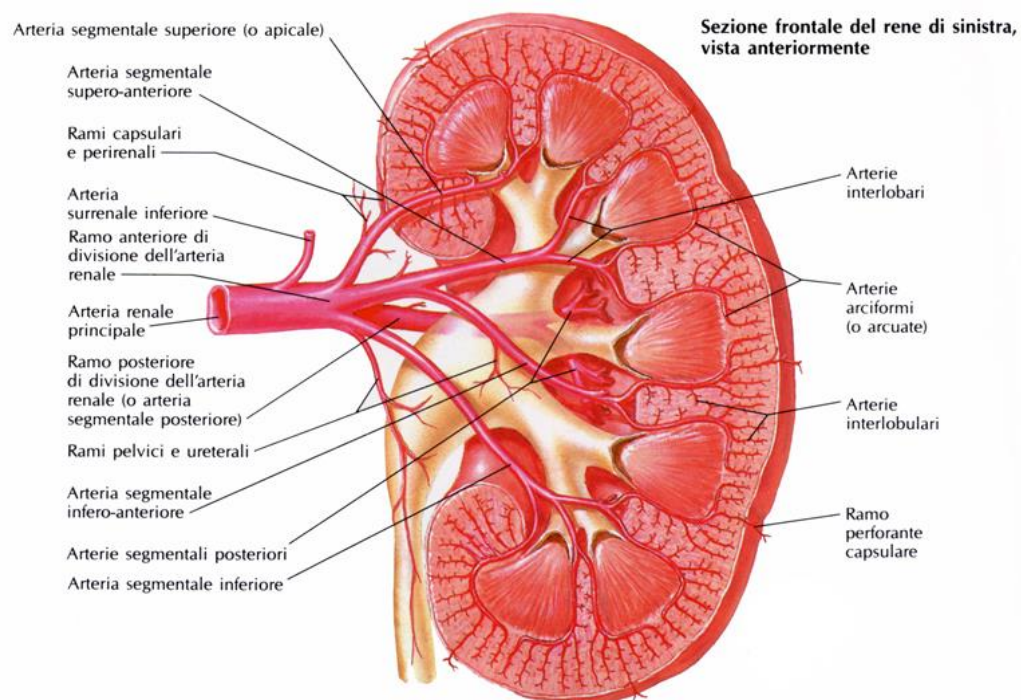


Figura 1.2: Sistema di vascolarizzazione del rene.

## 1.2 VISIONE D'INSIEME DELLA FUNZIONE RENALE

La principale funzione renale è la regolazione omeostatica del contenuto di acqua e di ioni nel sangue, definita come bilancio “idrosalino” o “idroelettrolitico”. I reni mantengono le normali concentrazioni di acqua e ioni bilanciando l’apporto di tali sostanze con la loro escrezione nelle urine. Le funzioni renali possono essere classificate in categorie generali:

### a) Omeostasi dell’ambiente extra-cellulare

#### 1. Bilancio idrico:

- Controllo dell’osmolarità dei liquidi corporei mediante la regolazione della concentrazione di NaCl, al fine di mantenere il normale volume cellulare in tutti i tessuti;
- Controllo della pressione del sistema cardiovascolare;

#### 2. Regolazione ionica:

- Controllo delle concentrazioni di ioni inorganici ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ) ed organici (escrezione di intermedi del ciclo di Krebs: succinato e citrato);
- Bilanciamento degli elettroliti assicurato da una precisa corrispondenza tra escrezione renale ed assunzione dietetica;

#### 3. Regolazione acido-base:

- Escrezione di  $\text{H}^+$ ;
- Riassorbimento o produzione di  $\text{HCO}_3^-$ ;
- Regolazione di  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ;

### b) Eliminazione dei prodotti di rifiuto

1. Prodotti del catabolismo delle proteine (urea);
2. Acido urico (dagli acidi nucleici);
3. Creatinina (dalla creatina muscolare);
4. Prodotti di degradazione dell’emoglobina (urobilinogeno);

5. Prodotti di degradazione degli ormoni;
  6. Sostanze chimiche estranee (farmaci, saccarina, anione benzoato, etc);
- c) Funzione endocrina: nonostante i reni, di solito, non siano considerati ghiandole endocrine, essi svolgono un ruolo importante in diverse funzioni ormonali, producendo:
1. renina, che attiva il sistema renina- angiotensina-aldosterone, che svolge un ruolo importante nella regolazione della pressione arteriosa ed dell'equilibrio del  $\text{Na}^+$  e del  $\text{K}^+$ ;
  2. prostaglandine e chinine (bradichinina), che sono sostanze vasoattive e modulano il flusso ematico renale ed insieme ad angiotensina II la pressione sanguigna sistemica;
  3. 1,25-diideossivitamina  $\text{D}_3$ , che è necessaria per il normale riassorbimento di  $\text{Ca}^{2+}$  da parte del tratto gastro-intestinale e della sua deposizione nel tessuto osseo;
  4. Eritropoietina, che stimola la formazione di globuli rossi nel midollo osseo;

### 1.3 L'UNITÀ FUNZIONALE DEL RENE: IL NEFRONE

Il nefrone è l'unità funzionale del rene, cioè la più piccola struttura in grado di svolgere tutte le funzioni dell'organo.

I reni possiedono tipicamente da un milione ad un milione e mezzo a di nefroni ciascuno, grazie ai quali sono in grado di filtrare complessivamente 180 litri di plasma al giorno.

La conoscenza dei nefroni dal punto di vista anatomico è indispensabile per analizzare le funzioni cui sono preposti. Il nefrone è suddivisibile in due parti, il corpuscolo renale, che filtra il sangue dell'arteriola glomerulare afferente e lo convoglia nell'arteriola glomerulare efferente e il tubulo renale, deputato al riassorbimento selettivo del filtrato.

Il corpuscolo renale ha la funzione di filtrazione; è una struttura tondeggiante con un diametro di circa 0,2 mm, visibile anche ad occhio nudo, ed è presente solo nella corticale. Il corpuscolo consta di un glomerulo vascolare centrale ricoperto da una capsula glomerulare (o capsula di Bowman), ed è in continuità con un tubulo contorto prossimale. In ogni rene ci sono almeno un milione di corpuscoli renali, ma il loro numero diminuisce con l'età diminuendo parallelamente l'efficienza del rene nel filtrare il sangue. Il glomerulo è una struttura convoluta formata da capillari sanguigni fenestrati derivanti dall'arteriola glomerulare afferente che penetra nella capsula di Bowman a livello del polo vascolare del corpuscolo renale; i capillari sono in continuità con un'arteriola glomerulare efferente che esce dal corpuscolo renale accanto al punto di entrata dell'afferente, dunque sempre dal polo vascolare. Nel punto opposto al polo vascolare origina il tubulo contorto prossimale tale zona è detta polo urinifero.

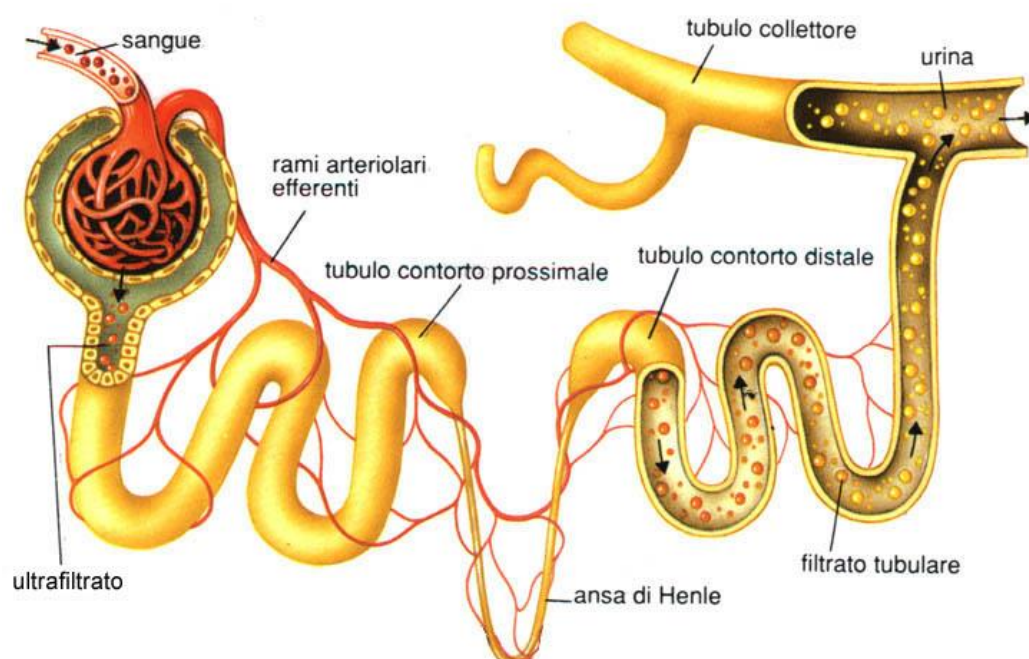


Figura 1.3: Struttura del nefrone.

La capsula di Bowman è un calice a doppia parete; essa funge da rivestimento del plesso glomerulare e da estremità espansa e a fondo cieco di un tubulo renale; vi si trovano un polo vascolare a ridosso del

glomerulo e un polo urinario, che è in continuità con il sistema tubulare. I capillari del glomerulo vascolare sono rivestiti da podociti, delle caratteristiche cellule dendritiche con un corpo centrale da cui si dipartono prolungamenti (processi primari) che vanno ad avvolgere l'endotelio. I pedicelli (processi secondari) di ciascun podocita formano una vera e propria guaina perivascolare adesa alla membrana basale; ciascun processo secondario si divide poi in processi terziari e processi terminali, sempre più piccoli. Il rivestimento podocitico costituisce il foglietto viscerale della capsula di Bowman. Il foglietto esterno della capsula è costituito da un epitelio pavimentoso semplice. Lo spazio tra i due foglietti della capsula è detto spazio urinario (di Bowman). Il filtrato del sangue deve oltrepassare la lamina basale glomerulare e quella podocitica (insieme vengono definite membrana basale glomerulare) per entrare nello spazio urinario; tale membrana ha uno spessore di soli 330 nm, per cui è una barriera contro le proteine più grandi (ma l'emoglobina può penetrarvi) e generalmente fa passare solo le molecole piccole e gli ioni. È composta da proteoglicani ricchi di eparan-solfato, laminina, collagene di tipo IV. Il glomerulo renale ricoperto dai podociti è immerso in una matrice composta da cellule mesangiali. Esse hanno forma irregolare, capacità fagocitarie e nel contempo contrattili, secernono inoltre la matrice del mesangio e la membrana basale glomerulare. Sono più propriamente definite cellule mesangiali intraglomerulari, dato che esiste una popolazione di cellule mesangiali extraglomerulari presso il polo vascolare del corpuscolo renale. Tali cellule mesangiali funzionano anche da sostegno per le anse glomerulari. Il tubulo renale veicola il filtrato dallo spazio urinario sino al dotto collettore. Origina dal polo urinario della capsula di Bowman tramite il tubulo contorto prossimale. Nel suo percorso si distinguono un tubulo contorto collocato nella corticale esterna o intermedia che prosegue in un tubulo retto prossimale, il quale scende inferiormente sino alla corticale interna per poi penetrare nelle piramidi midollari con la porzione tubulare chiamata ansa di Henle (tratto discendente). Quest'ultima forma una curva a U con la concavità rivolta verso la corticale per poi risalire (tratto ascendente) e proseguire nel tubulo retto distale che risale nella corticale

interna fino a costituire il tubulo contorto distale che si immette nel dotto collettore. Il dotto collettore è una struttura tubulare che accoglie l'urina da più tubuli renali, quindi non è parte del nefrone; esso discende di nuovo in un raggio midollare sino a sboccare in un dotto di calibro maggiore detto dotto papillare. La capsula è un'espansione del tubulo contorto prossimale e è in collegamento con esso mediante una breve zona che forma un colletto.

Il tubulo contorto prossimale ha la funzione di riassorbimento di circa 80% dell'ultrafiltrato glomerulare. È rivestito da un epitelio cubico o cilindrico basso per permettere gli scambi, le cui cellule presentano dei microvilli nel polo luminale che aumentano la superficie di assorbimento della membrana plasmatica.

L'ansa di Henle è un segmento sottile del tubulo renale, appena 30  $\mu\text{m}$  di diametro nella sua parte sottile, che ne forma la maggior parte e tutta la porzione a U e 60  $\mu\text{m}$  nel segmento spesso ascendente. La sua porzione sottile è costituita da cellule epiteliali piatte con nucleo tondeggiate centrale ma scarsi organelli, mentre la porzione spessa è rivestita da cellule epiteliali cubiche con nucleo tondeggiate centrale, numerosi mitocondri nella zona basale, profonde introflessioni nella membrana plasmatica basale e microvilli nella sua porzione luminale, anche se più corti rispetto a quelli del tubulo contorto prossimale. Nell'ansa di Henle si ha la concentrazione dell'urina.

Il tubulo contorto distale ha la funzione di riassorbimento e secrezione ed è rivestito da cellule cubiche con nucleo centrale tondeggiate, introflessioni basolaterali della membrana plasmatica, scarsi mitocondri, corti microvilli sul lato luminale. Quando il tubulo contorto distale si avvicina al tubulo reuniente (il rettilineo distale), cioè presso l'incrocio dell'arteriola glomerulare afferente con quella efferente, la parete del tubulo è formata da cellule tubulari che formano una struttura chiamata macula densa. Essa è coinvolta nella regolazione di flusso sanguigno e nella velocità di filtrazione del tubulo renale.

Il dotto collettore è un tubulo in cui sboccano numerosi tubuli reunienti da vari nefroni, ha un calibro decisamente maggiore di questi ed è rivestito da un epitelio cubico o cilindrico semplice. Generalmente l'epitelio,



inizialmente cubico, si fa sempre più alto procedendo dalla corticale in profondità verso la midollare. Le cellule della parete hanno un nucleo centrale ovalare, un citoplasma acidofilo, pochi organuli, numerose interdigitazioni laterali con le cellule adiacenti, corti microvilli nella porzione corticale e rari e corti microvilli nella maggior parte della sua estensione nella midollare. Vi è un secondo tipo di cellule che forma la parete del dotto collettore, dette cellule intercalari, che possiedono microvilli più lunghi e secernono protoni nel filtrato equilibrando il pH. Tra i dotti collettori è presente una popolazione di cellule interstiziali midollari, generalmente fibroblasti modificati, che si inseriscono tra due dotti tangenzialmente come se fossero i pioli di una scala, la loro funzione, oltre che strutturale, è quella di secernere prostaglandine ed eritropoietina.

I processi fondamentali che avvengono nel nefrone sono quattro:

1. **FILTRAZIONE.** Avviene tra capillari glomerulari e capsula di Bowman. Questo processo coinvolge circa 180 litri di plasma al giorno e permette di riassorbire selettivamente le sostanze che non devono essere eliminate. Nel filtrato non passano le cellule a causa delle loro dimensioni, quindi non sono presenti, globuli rossi, globuli bianchi e piastrine; viene inoltre impedito il passaggio delle proteine più grandi. Il filtrato assume così la stessa composizione del plasma privato delle proteine di peso molecolare maggiore, dal momento che solo le proteine più piccole come l'albumina riescono a passare nel filtrato. Quando la preurina, cioè il filtrato glomerulare renale prima che, a seguito del processo di riassorbimento selettivo, diventi urina, abbandona la capsula di Bowman va incontro a modificazioni tramite processi di riassorbimento e secrezione.
2. **RIASSORBIMENTO.** Consiste nel recupero di acqua e soluti filtrati, che passano dai tubuli ai capillari sanguigni. La quantità riassorbita è quindi data dall'acqua più le sostanze che lasciano la preurina e tornano nel circolo sanguigno. Tra queste rientrano tutti i prodotti utili per l'organismo, come il glucosio, le proteine più

piccole che sono riuscite a passare nel filtrato, gli amminoacidi, le vitamine, una grandissima quantità di acqua e vari sali.

3. **SECREZIONE.** Consiste nel processo, inverso al riassorbimento, per cui alcune sostanze passano dal sangue contenuto nei capillari ai tubuli renali, aggiungendosi a quelle filtrate. Tra le sostanze secrete rientrano tutte quelle che necessitano di una rapida eliminazione, come i farmaci, gli ioni  $H^+$  e le molecole presenti in eccesso.
4. **ESCREZIONE.** Consiste nell'eliminazione dell'urina nella pelvi renale. Il volume escreto equivale al volume filtrato meno quello riassorbito più quello secreto. Nel caso del glucosio, essendo il riassorbimento pari al 100% e la secrezione nulla, l'escreto è pari a zero. L'acqua e i sali minerali sono in parte riassorbiti ed in parte escreti, grazie ad un fine meccanismo regolatorio. Il nostro organismo compie tutto questo lavoro, apparentemente inutile, per poter eliminare in fretta eventuali eccessi o sostanze nocive.

# CAPITOLO 2

## TERAPIE SOSTITUTIVE PER MALATTIE RENALI ALLO STATO TERMINALE

### 2.1 MALATTIE RENALI

Negli ultimi due decenni in Italia, come nel resto dell'Europa e negli Stati Uniti, il numero dei pazienti avviati alla dialisi è più che raddoppiato, e continua ad aumentare, interessando soprattutto le persone con oltre 65 anni. Il fenomeno ha radici lontane. In USA si calcola che una persona su nove abbia problemi ai reni. In Australia, dove esiste un sistema di monitoraggio molto efficiente, un abitante su sette presenterebbe una compromissione della funzione renale almeno iniziale, e uno su 1400 sarebbe affetto da una forma grave di insufficienza renale.

L'allungamento della vita e la riduzione della cosiddetta mortalità competitiva, hanno consentito alle malattie renali di svilupparsi negli anni. Le malattie del rene possono essere ereditarie, congenite o più spesso acquisite; tra le malattie renali più diffuse abbiamo: coliche renali, carcinoma, stenosi dell'arteria renale, insufficienza renale acuta, insufficienza renale cronica, malattia renale cronica, etc.

La malattia renale cronica per esempio (MRC) è una condizione patologica che interessa il rene e che può provocare perdita progressiva e completa della funzione renale o complicanze derivanti dalla ridotta funzione renale. La malattia renale cronica si definisce anche come presenza di danno renale. La naturale conseguenza della MRC è rappresentata dall'insufficienza renale cronica (IRC), ossia dalla perdita progressiva e irreversibile della funzione renale. Nei suoi stadi più avanzati essa porta ad una preoccupante riduzione della funzione di filtrazione dei reni, nonostante i reni posseggano un'enorme riserva

funzionale. Infatti è stato stimato che sia possibile perdere fino a  $\frac{3}{4}$  della funzionalità renale prima che in un soggetto, che non si sottoponga a carichi dietetici eccessivi, sia compromessa l'omeostasi del mezzo interno [10]. L'insufficienza renale cronica deve essere ovunque considerata come malattia in crescita e di grande impatto sociale. La perdita completa della funzione renale rende necessario un trattamento sostitutivo, rappresentato dalla dialisi o dal trapianto.

I registri di dialisi indicano che l'insufficienza renale terminale può essere determinata da molte e differenti cause come per esempio l'ipertensione arteriosa, l'arteriosclerosi e il diabete. Seguono anche per frequenza le glomerulonefriti, le cosiddette nefropatie interstiziali, talora infettive o secondarie ad un'ostruzione delle vie urinarie, o più spesso legate a un uso inappropriato di farmaci, le malattie renali ereditarie, tra le quali i reni policistici e le lesioni renali secondarie a malattie delle vie urinarie, frequentemente ostruttive, non raramente congenite.

Tutte le età possono essere interessate dalle malattie renali, ma in modo diverso. Nei giovani predominano le glomerulonefriti, le malattie ereditarie e quelle congenite. Negli anziani, predominano le lesioni su base vascolare e dismetabolica. Sempre negli anziani, la nefropatia più diffusa è la cosiddetta nefroangiosclerosi, malattia dei piccoli vasi arteriosi del rene, in genere collegata all'ipertensione arteriosa. Con l'aumento dei casi di diabete dell'adulto stanno diventando comuni le lesioni renali secondarie a questa malattia dismetabolica.

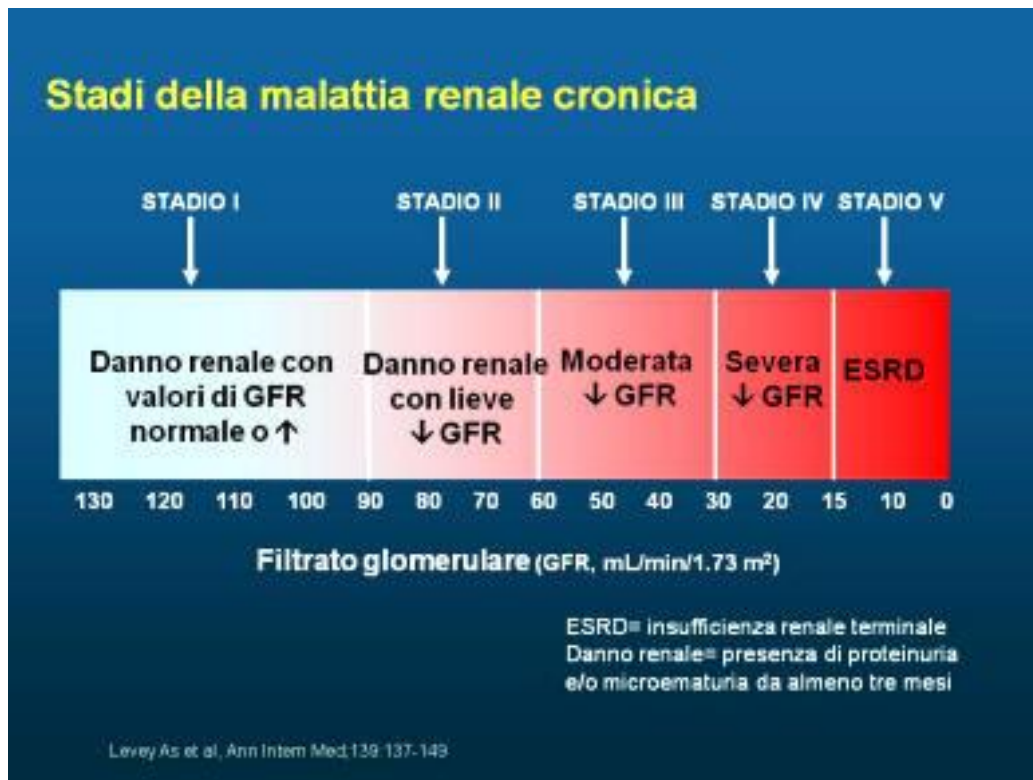


Figura 2.1: Schema rappresentativo degli stadi della malattia renale cronica.

## 2.2 TERAPIE SOSTITUTIVE ODIERNE

La dialisi è un procedimento chimico-fisico con cui si separano una o più sostanze disciolte in un liquido, utilizzando una membrana semipermeabile che permette il passaggio di tali sostanze in una sola direzione. Il moto delle sostanze è di tipo diffusivo, ovvero è dovuto essenzialmente alla differenza di concentrazione dei soluti tra i solventi nei due compartimenti e cessa una volta giunti all'equilibrio. Tra i fattori che influenzano il processo è importante il contributo dato dalla pressione osmotica, cioè la pressione necessaria per impedire la diffusione dei soluti dal compartimento a minor concentrazione a quello a maggior concentrazione. Un altro fattore in grado di influenzare il moto delle sostanze è dato dal gradiente di pressione tra i due compartimenti, cioè quando vogliamo che una percentuale di solvente passi da un compartimento a pressione maggiore a uno a pressione minore (convezione) [12]. La dialisi, conosciuta meglio come emodialisi (dialisi del sangue) è una terapia che sostituisce la funzionalità fisica renale, che

viene effettuata a soggetti con ridotta o assente (insufficienza renale) funzionalità renale, condizione che rappresenta lo stadio terminale di molte malattie che colpiscono il rene.

Le apparecchiature impiegate per questa terapia prendono il nome di rene artificiale e permettono la depurazione del sangue da sostanze tossiche che non vengono più eliminate normalmente dalla filtrazione del rene. Questo procedimento si basa sull'impiego di una membrana semipermeabile che permette il passaggio delle sostanze tossiche solo in una direzione. Facendo scorrere il sangue del soggetto da un lato della membrana e una soluzione di dialisi dall'altro, si ottiene così la rimozione delle sostanze tossiche contenute nel sangue. La dialisi oltre a permettere la rimozione dal sangue di composti tossici (urea, acido urico, creatinina), favorisce il ripristino dell'equilibrio idro-elettrolitico tramite l'eliminazione della quantità di acqua in eccesso, ristabilendo dunque il normale volume cellulare.

La prima applicazione clinica dell'emodialisi risale al 1943, quando fu eseguita da Johan Willem Kolff. Il suo utilizzo è entrato però nella normale routine del trattamento dell'insufficienza renale terminale solo grazie a Quinton e Scribner che, per primi nel 1960, misero a punto un accesso vascolare permanente che potesse essere utilizzato più volte [13].

Da allora sono stati compiuti numerosi progressi relativi all'intero apparato per emodialisi, cosicché non è raro oggi incontrare nei centri dialisi pazienti con un'anzianità dialitica di 20 anni.

I processi tecnologici riguardanti l'unità fondamentale della macchina per emodialisi, il filtro, hanno permesso lo sviluppo di diverse procedure di dialisi extracorporea.

Il compartimento ematico del filtro oggi non è più unico, ma è formato da diverse migliaia di tubicini del diametro di poco superiore ad un capello (da seimila a dodicimila, detti appunto capillari) all'interno dei quali scorre il sangue; la soluzione dializzante fluisce tutto intorno ai capillari; quindi, all'interno del filtro il sangue e il liquido di dialisi restano sempre separati dalla membrana (costituita dalla parete dei capillari). Lo scambio può avvenire in entrambe le direzioni: le scorie passano ovviamente dal

sangue al liquido di dialisi, mentre alcune sostanze, come il calcio e il bicarbonato passano dal liquido di dialisi al sangue. Durante la seduta di dialisi il sangue viene prelevato dal corpo e viene restituito depurato con continuità; inoltre per evitare che il sangue coaguli all'interno della macchina, viene infuso un anti-coagulante, l'eparina, prima che il sangue entri nel dializzatore.



Figura 2.3: Filtro per emodialisi.

Esistono due tecniche emodialitiche di base:

- La Dialisi Peritoneale
- La Dialisi extra-corporea

Nell'emodialisi standard (HD) la rimozione dei soluti avviene quasi totalmente per un processo di diffusione e solo in minima parte per convezione in seguito all'ultrafiltrazione determinata dalla pressione idrostatica esercitata sul compartimento sangue.

La diffusione è estremamente efficace per l'estrazione di soluti a basso peso molecolare, mentre sostanze come la  $\beta$ 2-microglobulina e le tossine non vengono sottratte a causa del loro elevato peso molecolare. L'emodialisi bicarbonato (HDB) è una emodialisi standard dove si usa un dialisato a concentrazioni stabili di bicarbonato che porta ad una migliore stabilità cardiovascolare e ad una riduzione dei sintomi intradialitici. Questo tipo di dialisato insieme allo sviluppo di membrane biocompatibili e al controllo volumetrico dell'ultrafiltrazione, ha migliorato notevolmente la tolleranza dei pazienti alla terapia dialitica. Infatti, inizialmente, veniva

usato come unico tampone nel bagno di dialisi l'acetato, che però comportava squilibri metabolici nei pazienti. Per ovviare a questi inconvenienti si è pensato di introdurre il bicarbonato di sodio che però aveva lo svantaggio di non poter essere contenuto all'interno della sacca in cui erano presenti le altre sostanze per la presenza dello ione calcio, utilizzando quindi apposite cartucce. Questa tecnica depurativa è la più usata, e da questa derivano tutte le metodiche miste convettive-diffusive. In base a queste metodiche si distinguono diverse metodologie di funzionamento delle apparecchiature per la purificazione del sangue:

- Emofiltrazione in pre-post diluizione (HF): è una metodica che prevede la reinfusione di grandi quantità di liquidi (anche di 40 l); utilizza filtri ad alta permeabilità ed è destinata soprattutto a pazienti che necessitano di un'alta depurazione. In seguito all'introduzione di tecniche miste, è ormai raramente utilizzata poiché la depurazione avviene solo attraverso uno scambio convettivo. Nell' HF in post-diluizione, siccome la reinfusione avviene subito dopo l'emofiltro, il maggior limite di questa modalità è la difficoltà a ottenere elevati flussi convettivi. Questo è dovuto principalmente all'aumento eccessivo della concentrazione dei globuli rossi e delle proteine all'interno delle fibre capillari che riduce il flusso di acqua plasmatica ultrafiltrabile, limitando di conseguenza la rimozione dei soluti. Il rischio di questo tipo di tecnica è la coagulazione dell'emofiltro in toto [14].
- Emodiafiltrazione (HDF); è un metodo più efficiente della dialisi convenzionale indicato per la rimozione delle tossine di peso medio/alto. Durante l'HDF le tossine più piccole vengono rimosse per via diffusiva mentre quelle più pesanti per via convettiva: risulta quindi importante trovare il giusto rapporto convezione-diffusione. La reinfusione può essere eseguita sia pre- che post-filtro. Nel caso della reinfusione pre-filtro è possibile reinfondere un maggior quantitativo di liquidi, diluendo maggiormente il sangue prima della filtrazione: in questo modo è favorita la rimozione delle



macromolecole per convezione. Sono necessari filtri ad alta permeabilità.

- Emodiafiltrazione on-line (HDF On-Line): è una metodica che differisce dalla HDF in quanto la reinfusione non avviene utilizzando delle sacche, ma direttamente dall'impianto idrico del centro dialisi. L'acqua dopo essere stata deionizzata, è resa sterile e apirogena per mezzo di ultrafiltri posti sul retro della macchina. L'utilizzo dell'acqua di rete opportunamente trattata nonostante imponga maggiore attenzione e controllo alla qualità dell'acqua utilizzata dal sistema, permette flussi di reinfusioni maggiori rispetto all'HDF, con risvolti positivi sul paziente, come la riduzione dello stato infiammatorio e quindi una riduzione degli indici di morbilità e mortalità, una minore incidenza della Sindrome del tunnel carpale ed un minor consumo di eparina. È inoltre possibile controllare la composizione e la temperatura del fluido durante il trattamento. Per essere realmente efficace, l'HDF deve essere condotta con il maggior scambio possibile. L'HDF può essere eseguita in pre o in post-diluizione. Nel secondo caso si hanno i maggiori vantaggi depurativi in quanto si ha il massimo gradiente diffusivo fra il sangue ed il bagno di dialisi, mentre in pre-diluizione la quota di fluido infusa prima del filtro determina una diluizione del sangue, che verrà quindi depurato in modo meno efficace dalle tossine uremiche. Questo aspetto può essere compensato da un maggior flusso di infusione al fine di eliminare meglio le molecole di peso medio-alto; la depurazione delle piccole molecole sarà comunque più limitata a causa del ridotto gradiente di concentrazione. A partire dall'HDF on-line si sono sviluppate altre due metodiche: la paired filtration dialysis (PFD) e l'emofiltrazione on-line con reinfusione endogena (HFR). Nella prima, il fenomeno della convezione e della diffusione avvengono grazie ad un filtro composto da due camere separate, dove, l'ultrafiltrazione avviene nella prima camera e il sangue successivamente passa nella seconda camera in cui avviene la diffusione. Fra i due settori

avviene la reinfusione del liquido di dialisi. Questa metodica permette alcune operazioni particolari quali il monitoraggio costante dell'urea o del sodio con dei sensori speciali posti all'uscita dell'ultrafiltrato. La seconda tecnica, è invece composta da tre fasi. Nella prima camera del filtro viene prodotto l'ultrafiltrato che passa all'interno di un filtro con resine assorbenti dove vengono rimosse le particolari sostanze tossiche e medie molecole. L'ultrafiltrato così rigenerato viene reinfuso al paziente prima di entrare nella camera diffusiva del filtro.

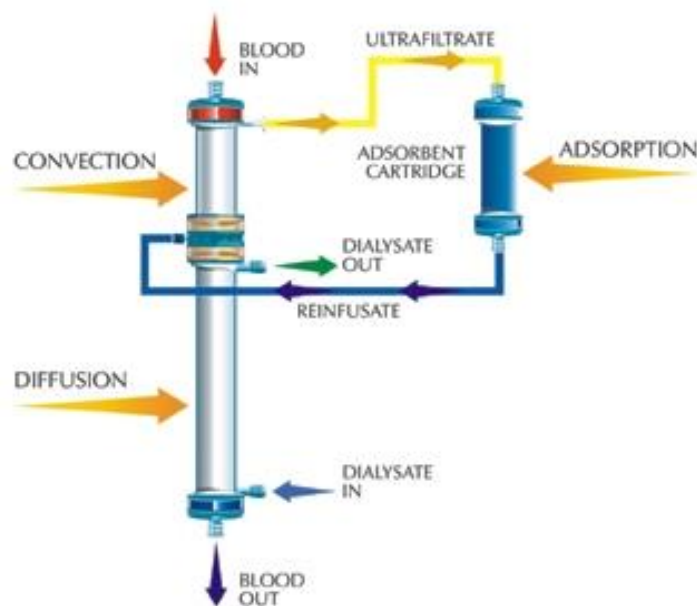


Figura 2.2: Filtro di un HFR

- Acetate free biofiltration (AFB): Consiste in un'emodiafiltrazione con carichi di infusione molto bassi dell'ordine di circa 2,5 l/h. In questa tecnica manca completamente il tampone nel bagno dialisi (anche l'acetato); si diffonde in post-filtro bicarbonato ad alte concentrazioni, personalizzate in base all'esigenza del paziente. In particolare, per quanto riguarda l'instabilità cardiovascolare, diversi studi hanno dimostrato che la logica alla base per una migliore stabilità emodinamica è l'assenza complessiva di acetato normalmente presente nel bagno di dialisi, che spesso porta ad un tono vascolare alterato e una contrattilità cardiaca ridotta [15]. In queste macchine i filtri utilizzati sono ad elevata ultrafiltrazione.

Con questa tecnica si ottiene una buona l'efficacia depurativa e un ottimo controllo dell'equilibrio acido-base.

- Acetate free biofiltration con profilo di potassio (AFB-K): Consiste in un'emodiafiltrazione di tipo AFB ma rispetto alla precedente differisce nell'assenza di potassio nella sacca di concentrato. Il potassio viene fornito da una seconda sacca collegata con un connettore apposito. In questo modo oltre a personalizzare l'infusione di bicarbonato è possibile personalizzare un profilo di calo del potassio.

Particolare importanza va data alla metodica usata nell'unità di terapia intensiva (ICU), infatti qui, la terapia usata, è una terapia sostitutiva continua (Continuous Artero-Venous Haemofiltration o CAVH e la Continuous Venovenous Haemofiltration o CVVH, a seconda di dove il sangue viene prelevato e poi reinserito). La terapia continua viene usata per forme di intossificazione acuta e per l'IRA (insufficienza renale acuta).

Nella dialisi peritoneale, invece, la funzione di filtro viene svolta da una sottile membrana chiamata membrana peritoneale o peritoneo, una sacca che avvolge la parete addominale, intestino e altri grandi organi.

Per eseguire la dialisi, la cavità peritoneale viene riempita con una soluzione dializzante (simile a quella dell'emodialisi) che bagna tutta la membrana. Quando la soluzione è carica di soluti (dopo un periodo di contatto di quattro, sei ore) essa viene rimossa; il processo di rinnovo della soluzione dializzante, che prende il nome di scambio, viene ripetuto dalle quattro alle sei volte nell'arco delle 24 ore. La soluzione contiene uno zucchero, il glucosio, che viene aggiunto per attirare osmoticamente l'acqua dai capillari del peritoneo; il glucosio può essere presente in diverse concentrazioni (0.5, 1.5 e 2.5 g per 100 ml); più elevate sono le concentrazioni, tanto maggiore è la quantità di acqua sottratta. Attualmente sono disponibili nuove soluzioni dialitiche prive di glucosio, che sono state studiate per evitare le controindicazioni per il paziente associate all'eccessivo assorbimento di calorie e all'infiammazione

indotta sul peritoneo. Queste nuove soluzioni, contenenti miscele di aminoacidi, vengono utilizzate (eventualmente alternate alle soluzioni con glucosio) anche per rimuovere l'acqua quando la capacità del glucosio di sottrarre acqua è inadeguata.

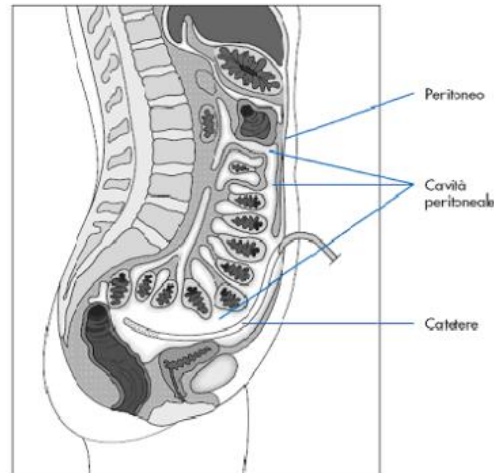


Figura 2.4: Cavità peritoneale e catetere

Entrambe le tecniche dialitiche presentano punti di forza ma anche complicanze di vario genere. L'emodialisi è più rapida ed efficace e attenua i sintomi dell'uremia, tuttavia è associata a complicazioni, quali ipotensione, ipokaliemia, aritmie cardiache, ipossia, emolisi, embolia gassosa, febbre, crampi muscolari ed emorragie. Inoltre la qualità della vita del paziente è significativamente compromessa: il paziente infatti deve continuamente assumere farmaci e limitare l'assunzione di liquidi ed è costretto a sedute dialitiche della durata di 4 ore con frequenza di due o tre sedute alla settimana.

La dialisi peritoneale, invece, consente una maggiore flessibilità di trattamento in quanto le sacche di soluzione possono essere anche facilmente trasportate. Ha ripercussioni meno stressanti sull'organismo perché la dialisi viene eseguita di continuo (o giornalmente) e non tre volte la settimana in maniera molto aggressiva come l'emodialisi liberando il paziente dalla necessità di andare in ospedale e permette di seguire una dieta meno rigida. Anche tale trattamento presenta tuttavia complicanze. La più importante è rappresentata dalla peritonite.

Anche se la terapia renale a lungo termine (RRT Renal Replacement Therapy) sia con l'HD che con PD ha cambiato la prognosi delle malattie renali, queste svolgono soltanto la funzione di filtrazione e non riescono a sostituire le funzioni di regolazioni metaboliche, omeostatiche ed endocrine del rene. La dialisi sostituisce solo parzialmente le funzioni di un rene sano, di conseguenza i pazienti con ESRD continuano ad avere grandi problemi medici, sociali ed economici. La dialisi deve essere quindi considerata una sostituzione parziale piuttosto che una terapia sostitutiva delle funzioni renali. L'ingegnerizzazione di un tessuto artificiale che costituisca un Bio-Artificial Kidney (BAK) composto da componenti sintetici e biologici, potrebbe comportare notevoli benefici per i pazienti, sia aumentandone le aspettative di vita che la qualità, andando a ridurre lo stato patologico, riducendo i rischi di infezioni e limitando quindi anche i costi. Un approccio di questo tipo potrebbe essere considerato una cura piuttosto che un trattamento. Purtroppo lo sviluppo tecnologico di un approccio di questo tipo è ancora allo stadio preliminare per poter essere applicato sui pazienti. L'alternativa alla dialisi praticabile rimane il trapianto d'organo.

## 2.3 TRAPIANTO D'ORGANO

Il trapianto renale è un intervento chirurgico che consiste nel prelevare un rene sano da un donatore cadavere o un donatore vivente e impiantarli nella parte anteriore dell'addome del paziente ricevente in sede extraperitoneale. Attualmente rappresenta il trattamento preferenziale per pazienti affetti da insufficienza renale cronica, in quanto è capace di restituire una normale funzionalità renale e permettere alla maggior parte dei pazienti il ritorno a una qualità della vita normale. Il primo trapianto di rene sperimentale venne eseguito nel 1902 dal chirurgo austriaco Ullmann su un cane. L'organo venne alloggiato nel collo dell'animale, e l'arteria e la vena renali furono anastomizzate rispettivamente con l'arteria carotide e la vena giugulare. I progressi effettuati negli anni nel campo della terapia immunosoppressiva, uniti al progresso della tecnica

chirurgica, hanno fatto sì che le indicazioni sul trapianto si potessero estendere a un numero di patologie sempre maggiore, come la nefropatia diabetica, le glomerulonefriti croniche, la pielonefrite cronica e il rene policistico, che rappresentano le patologie renali maggiormente responsabili di insufficienza renale cronica. I candidati al trapianto devono sottoporsi a una serie di esami, per escludere l'eventuale presenza di malattie che controindichino l'intervento e la successiva terapia immunosoppressiva antirigetto. Ugualmente anche il rene prelevato viene esaminato al fine di escludere patologie trasmissibili, con esami effettuati su campioni ematici del donatore, e valutazioni sulla sua funzionalità. Per stimarne la funzionalità viene effettuata una biopsia renale sul donatore cadavere, e valutata tramite scintigrafia renale e ecografia color-doppler nel caso di donatore vivente. Le controindicazioni più comuni al trapianto sono: età avanzata, insufficienza cardiaca, insufficienza respiratoria, neoplasie, infezioni in atto, sieropositività a HIV, HBV, HCV, scarsa adesione alla terapia immunosoppressiva.

Il successo di un trapianto renale è anche legato alla similarità genetica tra donatore e ricevente.

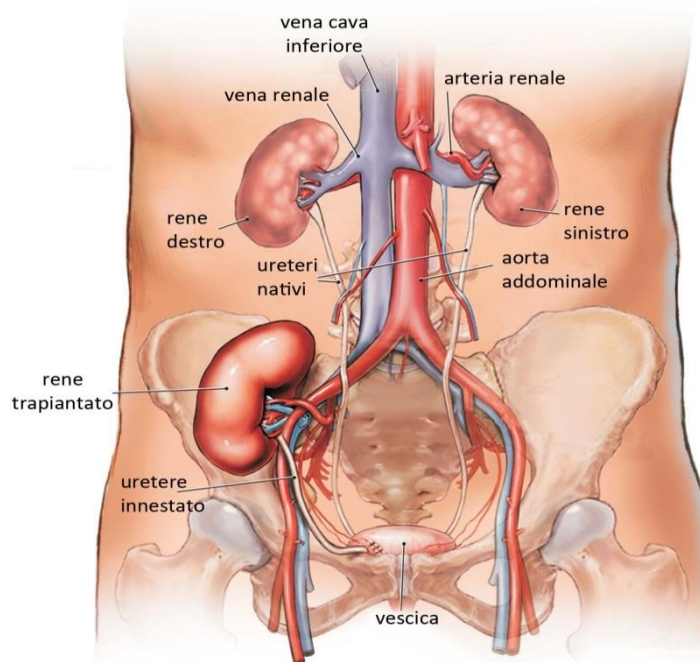


Figura 2.5: Rene trapiantato.

Generalmente, l'intervento di trapianto dura dalle 2 alle 4 ore e può essere eseguito su pazienti di età compresa tra pochi mesi di vita fino a oltre 75 anni di età. Il rene trapiantato è posizionato in una area diversa da quella del rene nativo e precisamente in una delle due fosse iliache, senza ledere il peritoneo. L'arteria renale è anastomizzata all'arteria iliaca, mentre la vena renale alla vena iliaca esterna del ricevente. Infine, l'uretere viene impiantato nella vescica, in modo da fare fluire liberamente l'urina in quest'ultima. Nella maggior parte dei casi, i reni nativi non vengono rimossi, a meno che non si ritenga che possano essere causa di complicazioni cliniche successive. L'assegnazione dei reni resi disponibili è effettuata dal Centro Regionale di Riferimento per i Trapianti secondo regole definite e condivise da tutti i centri di trapianto regionali. I criteri da considerare per evitare rigetto del rene e dunque assicurare che non ci siano effetti negativi sono:

- la compatibilità HLA (Human Leucocyte Antigen) fra donatore e ricevente;
- la differenza di età e corporatura fra donatore e ricevente;
- il tempo di attesa in lista;
- l'anzianità di dialisi;
- eventuali motivi di urgenza.

La percentuale di sopravvivenza ad un anno dall'intervento nei pazienti trapiantati con rene prelevato da cadavere si avvicina al 95% e la funzionalità dell'organo è del 91% negli adulti e del 100% nei bambini. Grazie ai recenti farmaci immunosoppressivi, la qualità di vita dei pazienti trapiantati di rene è nettamente migliorata e l'aspettativa di vita è certamente superiore rispetto a quella dei pazienti in dialisi cronica. La terapia antirigetto (o terapia immunosoppressiva) inizia durante l'intervento di trapianto e prosegue per tutta la vita del paziente trapiantato e prevede l'assunzione di alcuni farmaci combinati e somministrati in dosaggi appropriati in modo che siano inibite alcune funzioni del sistema immunitario, che altrimenti riconoscerebbero il nuovo organo come estraneo determinandone il rigetto. La continua ricerca scientifica in questo campo ha inoltre lo scopo di sperimentare terapie

sempre più efficaci, con minori effetti collaterali e meglio tollerate dal paziente. L'obiettivo futuro della terapia farmacologica associata al trapianto è quello di raggiungere la "tolleranza immunologica", rendere cioè l'organo trapiantato non riconoscibile dall'organismo che lo ospita. In questo modo la qualità di vita del paziente trapiantato migliorerebbe ulteriormente evitando i pericoli associati al rigetto.

Il trapianto di rene, sia da donatore cadavere che da donatore vivente, è il trapianto d'organo più comune al mondo.

Per l'attività di trapianto è necessaria l'interazione di diverse professionalità: chirurghi, anestesisti, immunologi, nefrologi e il coordinamento generale della direzione sanitaria. Il paziente viene preso in carico dal momento dell'immissione in lista d'attesa, fino al trapianto e ai controlli ambulatoriali successivi, da personale medico e paramedico dedicato nefrologico e urologico e con la collaborazione di altri specialisti (cardiologi, dermatologi, ginecologi e altri). Il trapianto da donatore vivente è una pratica clinica integrativa e non sostitutiva dell'attività di trapianto da donatore cadavere.

Con tale attività si possono raggiungere i seguenti obiettivi:

1. Incrementare il numero di trapianti.
2. Garantire il diritto dell'individuo di disporre di parti del proprio corpo a fini solidaristici.
3. Programmare il trapianto e lo studio del donatore e del ricevente in modo ottimale.
4. Evitare, quando possibile, la necessità di dialisi.
5. Ridurre i rischi di ritardata ripresa della funzione renale.
6. Ottenere una migliore sopravvivenza del trapianto e del paziente nel medio e nel lungo termine.

Esistono però anche complicanze associate al trapianto; esse possono essere legate al gesto chirurgico stesso (infezione di ferita, ascesso) oppure legate alla terapia immunosoppressiva che il paziente deve continuare a vita; tra queste ultime, due particolarmente gravi sono il rischio infettivo legato all'immunosoppressione e il rischio di sviluppo di



neoplasie quali carcinoma del polmone e carcinoma a cellule renali e linfomi [17], per i quali la prevalenza è attualmente in calo in seguito all'utilizzo di nuovi farmaci immunosoppressori. Anche il rigetto è un rischio sempre presente nella storia di un trapianto, anche a distanza di anni, o anche su reni perfettamente compatibili.

In relazione al momento in cui si verifica, è possibile distinguere 4 tipi di rigetto:

1. Rigetto Iperacuto, nel corso delle prime 24 ore post-trapianto
2. Rigetto acuto accelerato, durante le prime 24-72 ore post-trapianto;
3. Rigetto acuto, tra il decimo giorno e la fine del terzo mese
4. Rigetto cronico, che si verifica a distanza di anni dal trapianto, come esito finale di una serie di sollecitazioni continue ricevute dall'organo trapiantato, come ripetuti episodi di rigetto acuto e nefrotossicità indotta dai farmaci antirigetto.

# **CAPITOLO 3**

## **TERAPIE AVANZATE PER LA SOSTITUZIONE RENALE**

La malattia renale cronica (CRD Chronic Renal Disease) è una delle principali cause di mortalità che colpisce oggi circa il 13% della popolazione mondiale. Diverse malattie, come l'obesità, hanno sempre generato gravi disturbi cardiaci, ma, recenti progressi scientifici, hanno ovviato in parte a questo tipo di problematiche portando, però, sempre più persone a sviluppare una grave insufficienza renale. È stato stimato che questo numero è destinato a raddoppiare nei prossimi 10 anni, infatti solo negli Stati Uniti oltre 500000 persone progrediscono nelle malattie renali allo stadio terminale (ESRD End Stage Renal Disease), andando a gravare sulla spesa sanitaria che supererà i 30 miliardi di dollari l'anno. Al momento non vi è una vera cura complementare per l'ESRD, e anche se queste condizioni vengono attualmente gestite con trattamenti di dialisi, che sostituiscono parzialmente alcune funzioni del rene come la filtrazione, non riescono a soddisfare le funzioni omeostatiche ed endocrine fondamentali per il corretto funzionamento dell'organo e quindi per la vita del paziente. L'unica altra alternativa per questi pazienti è il trapianto di rene che può ripristinare totalmente la funzione renale. Nonostante gli eccellenti risultati concernenti il trapianto d'organo raggiunti in medicina fino ad oggi, la domanda di organi trapiantabili si sta aggravando, considerando che la disponibilità di reni da parte di donatori soddisfa meno del 50% della domanda. Di conseguenza, i tempi di attesa e la mortalità dei pazienti stanno aumentando drasticamente, tanto che l'identificazione di nuove fonti potenzialmente inesauribili di organi è

diventata un'estrema urgenza. Le tecnologie usate in ingegneria tissutale per la rigenerazione di reni danneggiati vuole ovviare in contemporanea sia a ridurre il numero di pazienti costretti a sottoporsi a trattamenti di dialisi, sia ad evitare ai pazienti che hanno subito un trapianto di rene di dover prendere farmaci immunosoppressori a vita. Cresce di conseguenza l'interesse scientifico verso la rigenerazione totale di un organo utilizzando cellule autologhe espanse in matrici di dimensioni clinicamente rilevanti derivate da animali, come ad esempio i maiali.

Queste tecnologie hanno permesso ai ricercatori fino ad oggi di fabbricare strutture relativamente semplici come vasi, vesciche, ureteri, che sono stati poi impiantati in pazienti, ottenendo buoni risultati sia a breve che a medio termine. Ma per quanto riguarda strutture più complesse, come il rene, le cose si complicano in quanto questi grandi organi necessitano della riconnessione al sistema vascolare del paziente, sia per mantenere la vitalità cellulare sia per esercitare le proprie funzioni d'organo. A tal proposito, diverse ricerche hanno permesso con successo il ripopolamento di compartimenti endoteliali ed epiteliali di scaffold renali di ratto, ma a causa del divario evolutivo tra esseri umani e roditori, non è stata possibile l'applicazione diretta in esseri umani [2]. Molti studi hanno però, descritto metodi che hanno permesso di decellularizzare reni porcini con successo [18]. Questi risultati promettenti hanno fatto pensare che la stessa tecnologia potesse essere utilizzata in reni umani scartati per il trapianto, al fine di valutare la loro applicabilità per la bioingegneria renale e per indagini di rigenerazione. Infatti, solo negli Stati Uniti, annualmente vengono scartati più di 2600 reni prelevati da donatori defunti, che rappresentano circa il 20% di tutta la riserva renale ai fini del trapianto, a causa di gravi anomalie anatomiche come glomerulosclerosi, atrofia tubulare, fibrosi interstiziale, infiammazioni, necrosi corticale, e alterazioni vascolari.

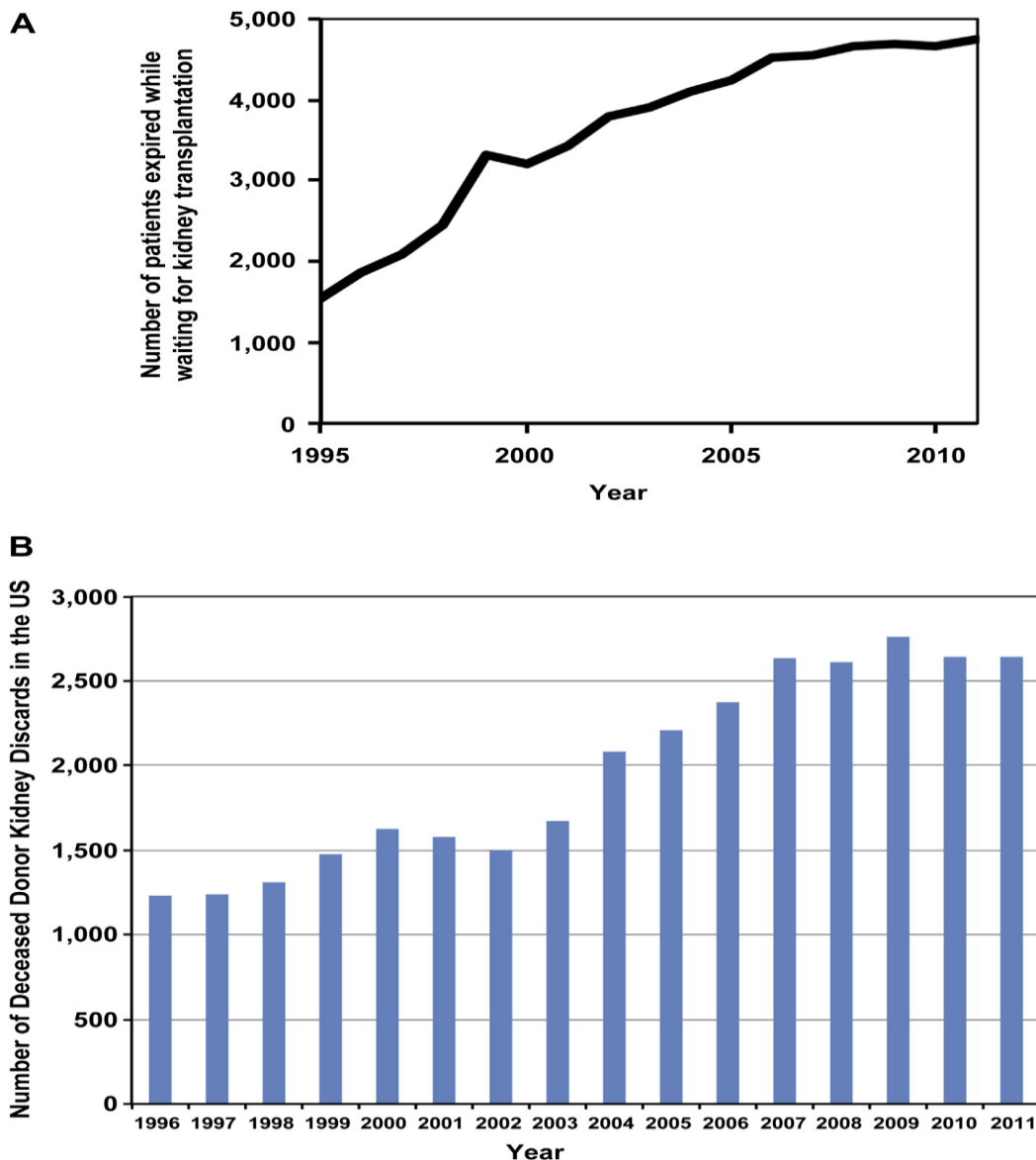


Figura 3.1: Dati statistici sul trapianto di rene. A. Numero di pazienti deceduti nell'attesa di un trapianto di rene. B. Numero di reni umani scartati per il trapianto [2].

Nel tentativo di bioingegnerizzare il rene, l'interesse della ricerca scientifica è concentrata sull'utilizzo di scaffold intatti prodotti dalla matrice extracellulare (ECM) di animali o di reni umani. Il vantaggio nell'utilizzare queste impalcature naturali risiede nella conservazione della loro composizione biochimica e dell'architettura dell'organo incluso il sistema di vascolarizzazione. Inoltre questi scaffold naturali consentono, dopo opportuni trattamenti, di guidare il differenziamento di

cellule staminali progenitrici verso lo specifico fenotipo di tessuto richiesto.

### 3.1 RUOLO DELLA MATRICE EXTRACELLULARE

La matrice extracellulare (extra-cellular matrix, ECM) è costituita da un insieme di diverse macromolecole come elastina, collagene e glicoproteine strutturali alle quali si legano le cellule per organizzarsi in tessuti. Le caratteristiche di composizione e la microarchitettura della ECM variano in dipendenza dei diversi tessuti ed organi. Si è scoperto che la struttura e le proteine della matrice extracellulare svolgono un ruolo fondamentale nel determinare la differenziazione, la proliferazione, la sopravvivenza, la polarità e la migrazione delle cellule. Tutte le componenti della matrice hanno un ruolo specifico, per esempio la laminina partecipa all'adesione cellulare, la fibronectina, il collagene IV e i glicosamminoglicani (GAG) svolgono un ruolo nella fase di sviluppo; strutture come le membrane basali sono necessarie per la formazione di tessuti specializzati come l'epitelio. Oltre a questi aspetti molecolari, anche fattori esterni come stress e tensione indotti alla matrice, regolano la proliferazione cellulare e il fenotipo durante i processi di riparazione e rigenerazione tissutale.

Nella guarigione delle ferite, un'assenza di matrice porta alla perdita di supporto meccanico a livello cellulare. Nell'insufficienza renale acuta, per esempio, le cellule tubulari necrotiche si staccano dalla membrana basale, mentre le cellule epiteliali tubulari sopravvissute si differenziano e proliferano, ripristinando l'integrità tubulare. Questo fenomeno non si verifica in aree prive di membrane basali intatte. Al contrario, i processi riparativi iperattivi sono caratterizzati da una sovrapproduzione di proteine di matrice extracellulare, che in molti casi conduce ad una distorsione nell'architettura del tessuto, un ostacolo alla riparazione compromettendo la funzionalità dell'organo.

### 3.2 LA DECELLULARIZZAZIONE DEL RENE

La decellularizzazione è una tecnica che consiste nell'eliminare tutte le cellule dal tessuto che si vuole utilizzare come scaffold senza andare ad alterare la struttura biologica e meccanica della matrice extracellulare, attraverso delle manipolazioni che sfruttano processi fisici, chimici o enzimatici.

Obiettivo della decellularizzazione è quello di mantenere l'architettura del tessuto nativo preservando la matrice extracellulare e tutte le componenti biologiche. Inoltre è di fondamentale importanza mantenere nella sua integrità la rete vascolare dell'organo, in quanto, durante il processo di decellularizzazione, l'inserimento delle soluzioni di lavaggio avviene sfruttando proprio la rete sanguigna, in modo tale da permettere al detergente di svolgere il proprio compito, raggiungendo tutti i punti dell'organo. Il grosso vantaggio sta nell'ottenimento di scaffold con proteine specifiche che hanno già le "impronte" lasciate dal tessuto prima dei trattamenti. Infatti le proteine della matrice extracellulare sono tra le più conservative, e quindi la rimozione del contenuto cellulare tramite decellularizzazione dovrebbe, almeno teoricamente, fornire scaffold con ECM conservata, ma non-immunogenici, in quanto la rimozione delle cellule previene l'attivazione della risposta immunitaria causa di rigetto.

### 3.3 PROTOCOLLO DI STERILIZZAZIONE E LAVAGGIO DEL PATIBOLO RENALE

La scelta del protocollo di decellularizzazione dipende dall'uso che si intende fare della matrice extracellulare. È noto che, durante la decellularizzazione, i detergenti agiscono in modo differente sui diversi tessuti. A seconda che vengano utilizzati detergenti non ionici (scarichi) o detergenti ionici (carichi), più aggressivi, è indispensabile una valutazione dei protocolli di sterilizzazione scelti per ogni applicazione. Nel ramo della decellularizzazione i ricercatori utilizzano più comunemente due detergenti ottenendo ottimi risultati. Il Triton X-100, un detergente non

ionico, utilizzato alla concentrazione dell' 1% trova applicazione nella decellularizzazione dei tessuti molli, mentre il sodio dodecil solfato (SDS), un detergente ionico, viene utilizzato in concentrazioni variabili dallo 0,1% al 5% a seconda del tipo di organo da trattare. Diversi studi sono stati condotti allo scopo di determinare il miglior detergente, e la concentrazione ottima, da utilizzare per ottenere bioscaffold privi di componenti cellulari e quindi completamente sterili, senza andare ad incidere sulla struttura tridimensionale della ECM [1].

Lo studio *“Decellularization methods of porcine Kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system”* condotto da D.C. Sullivan et al. nel 2012 riporta la procedura di decellularizzazione di reni suini. Sono stati asportati reni suini integri, in seguito ad eutanasia, conservando l'aorta per poter mantenere intatta l'intera lunghezza dell'arteria renale per l'incannulamento. Sono stati poi perfusi con 10 unità USP/ml di eparina sodica in una soluzione tampone fosfato (PBS) per 15 minuti a 0,75 L/h. Dopo eparinizzazione, sono stati perfusi per 36 h con diverse soluzioni detergenti , il SDS 0,25% in 1 x PBS , il SDS 0,5% in 1 x PBS e 1% di Triton X-100/ 0,1% di idrossido di ammonio in 1 x PBS. In seguito, i reni sono stati sottoposti a lavaggio per eliminare ogni residuo di detergente attraverso perfusione con 1 x PBS per 48h. Dopo il lavaggio, 500 ml di soluzione di DNasi e 10 mM di cloruro di magnesio sono stati fatti circolare per circa 10 ore attraverso i reni per degradare il DNA. Infine i reni sono stati sottoposti a un risciacquo finale con PBS per 1h per eliminare gli ultimi residui di magnesio e di DNasi. Confrontando la quantità di DNA residua (ng/mg di tessuto secco) relativa a reni sottoposti a trattamento di decellularizzazione, con la quantità di DNA relativa a reni allo stato nativo, è stata verificata l'efficacia del processo di decellularizzazione, che quindi non ci fossero residui cellulari nella corteccia renale pur preservando la struttura glomerulare [1].

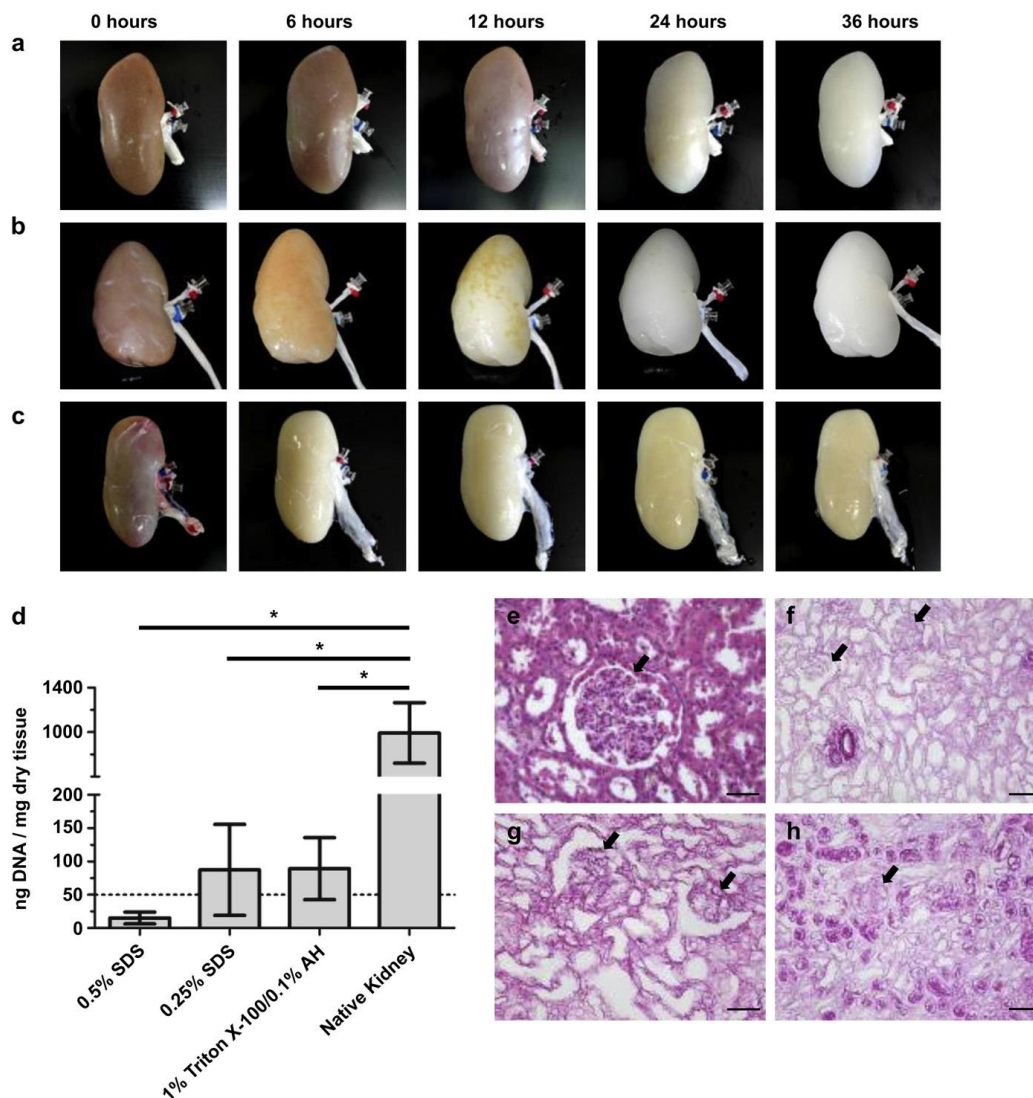


Figura 3.2: Confronto tra metodi di detersione. (a-c) Mostra un confronto tra i trattamenti di lavaggio rispettivamente di 0,5% SDS, 0,25% SDS, e 1% Triton X-100/0,1% di idrossido di ammonio, evidenziando il tempo necessario per la rimozione cellulare. (d) Quantitativo di DNA residuo nei gruppi decellularizzati confrontati con un rene nativo. Colorazioni con H&E di (e) rene nativo, (f) 0,5% SDS, (g) 0,25% SDS, (h) 1% Triton x-100 [1].

I test effettuati hanno mostrato che tutti i reni trattati con SDS 0,25 o 0,5% hanno mostrato segni limitati di decellularizzazione durante le prime 12 ore di perfusione, evidenziato da una colorazione meno traslucida, ma una rimozione completa di tutto il materiale cellulare è evidente dalla 36 ora (Figura 3.2). I reni perfusi invece con Triton X-100, hanno mostrato una rapida decellularizzazione già dopo 6 ore di trattamento, che però non si incrementa nelle ore successive. Questo studio è in linea con altri studi, condotti su roditori, che utilizzavano però diverse concentrazioni di



detergente e variavano i metodi di perfusione, che hanno mostrato bioscaffold di reni murini completamente decellularizzati già dopo solo 17 ore di trattamento [7].

I reni suini trattati con Triton X-100 hanno una colorazione diversa, di un bianco più perlaceo rispetto al trattamento con SDS. Anche se la perfusione con SDS ha causato una distensione dei reni, il volume risultante dell'organo decellularizzato è rimasto invariato, mantenendo quindi l'architettura del rene nativo, comprese le strutture glomerulari e tubulari viste nella regione della corteccia midollare dello scaffold acellulare.

La quantità di DNA residua è significativamente ridotta nei tre gruppi di reni trattati rispetto ai reni nativi di circa il 90%: non sono state osservate differenze significative tra i tre gruppi trattati, anche se il trattamento con SDS 0,5% era l'unico che determinava una quantità di DNA inferiore a 50 ng/ mg di tessuto secco.

Detergenti aggressivi quali SDS 0,5% determinano una buona decellularizzazione. Possono tuttavia provocare danni al sistema vascolare, che andrebbe invece mantenuto integro. Per poter verificare l'integrità della rete vascolare sono state acquisite immagini da tomografia computerizzata (TC) dei reni nativi decellularizzati (Fig 3.3).

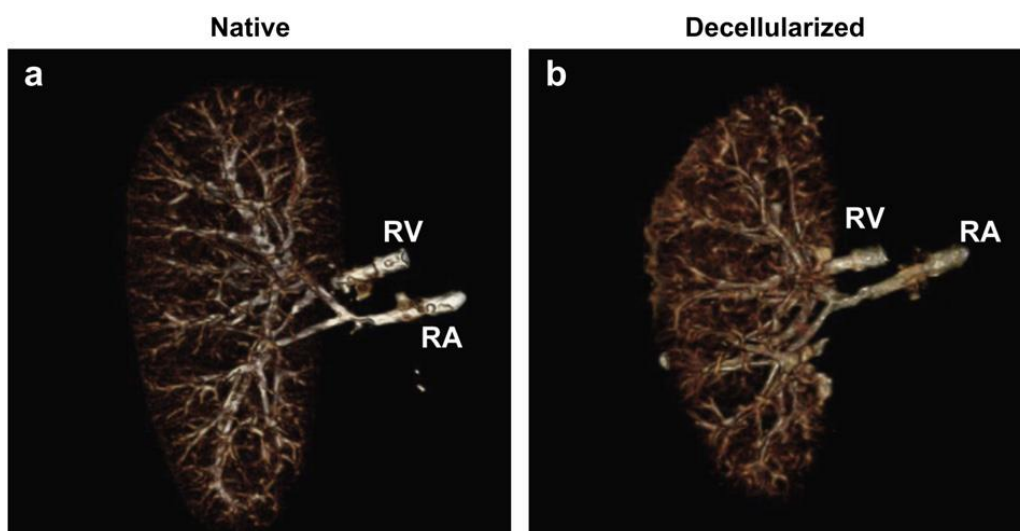


Figura 3.3: Confronto della rete vascolare tra un rene nativo (a) e uno decellularizzato (b) [1].

Per confermare l'integrità della rete vascolare è stato inoltre verificato che il fluido iniettato nel sistema vascolare potesse fluire attraverso lo stesso senza riversarsi in tutto l'organo. Gli autori hanno così dimostrato il mantenimento di tutto il sistema artero-venoso renale attraverso la regolare connessione dall'arteria renale alla vena renale. È importante notare che l'assenza della soluzione detergente all'interno dell'uretere e del sistema di raccolta del filtrato nel rene decellularizzato, conferma la separazione tra il sistema vascolare e il sistema di raccolta del filtrato.

È stato dimostrato, inoltre, che questi trattamenti non vanno a degradare le proteine e le componenti della matrice extracellulare. Infatti i test effettuati con i coloranti Alcian blue e Sirius red, utilizzati rispettivamente per marcare glicosaminoglicani (GAG) e collagene, hanno evidenziato la conservazione di due delle molecole importanti della ECM (Fig. 3.4). Morfologicamente, tutti gli scaffold hanno mostrato il mantenimento dei GAG anche all'interno della struttura glomerulare e una diffusa colorazione rosso sirius indice del mantenimento del collagene strutturale. La colorazione effettuata con il Masson's Trichrome, che identifica in blu il tessuto connettivo, in rosso scuro/viola i nuclei cellulari e in rosso/rosa il citoplasma, ha mostrato che il collagene si conserva in tutti e tre i gruppi decellularizzati, anche se la colorazione per i componenti residui citoplasmatici cellulari era più evidente nel tessuto renale sottoposto a Triton X-100 (Fig. 3.4). Non c'è differenza significativa tra i tre gruppi decellularizzati di GAG solfati e di collagene residuo (Figura 3.4).

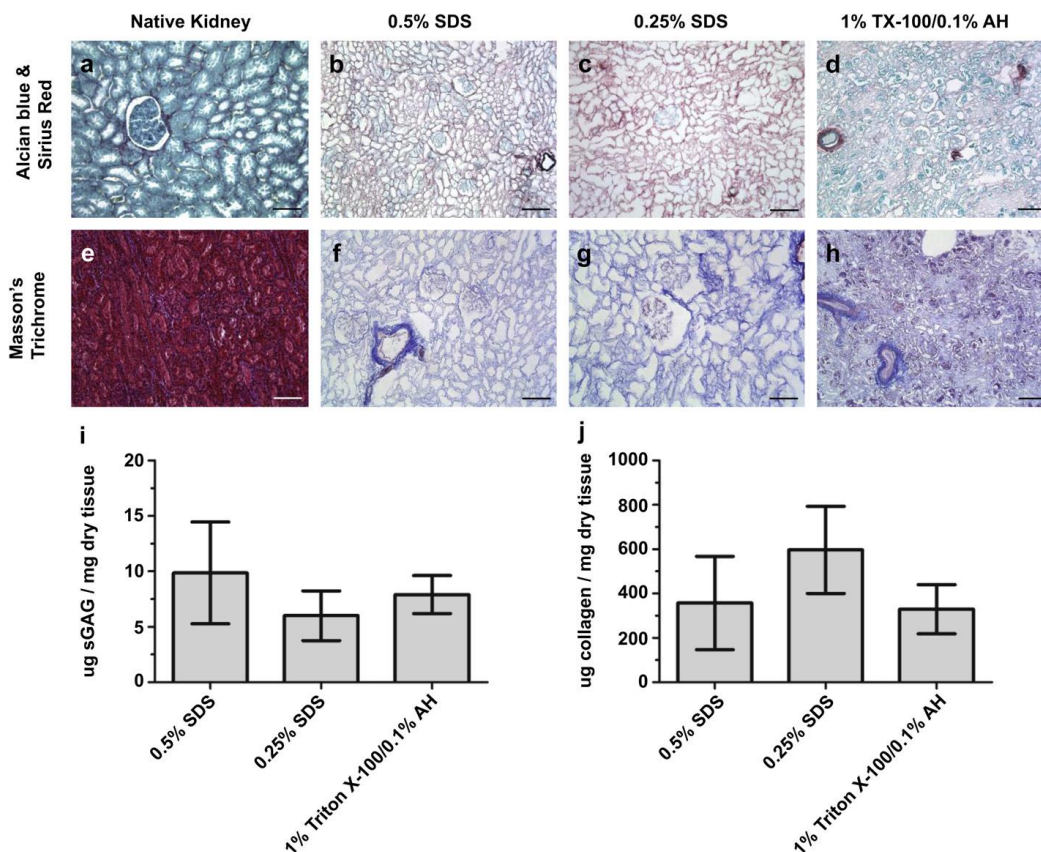


Figura 3.4: Saggio istochimico effettuato con alcian blu/ sirius red e Masson's Trichrome per verificare la conservazione delle componenti della matrice extracellulare [1].

Gli studi condotti sul modello porcino hanno dimostrato che il compartimento cellulare dei reni suini può essere completamente decellularizzato con l'utilizzo di soluzioni a base di SDS, per ottenere matrici extracellulari che mantengono la loro complessa struttura tridimensionale e le loro componenti molecolari di base.

Questi dati forniscono una piattaforma solida per l'applicazione del medesimo protocollo di decellularizzazione al rene umano che sia ugualmente in grado di conservare la matrice extracellulare, la struttura vascolare nativa e l'ultrastruttura dell'organo. Infatti gli esami istologici di un rene umano decellularizzato hanno mostrato risultati simili a quelli ottenuti su reni animali [2]. Nonostante fossero stati utilizzati reni scartati per il trapianto affetti da vari tipi di patologie, i test istologici hanno confermato l'efficacia della decellularizzazione e la totale assenza di materiale nucleare e citoplasmatico pur evidenziando la conservazione

della matrice di collagene e della membrana basale glomerulare (GMB) [2].

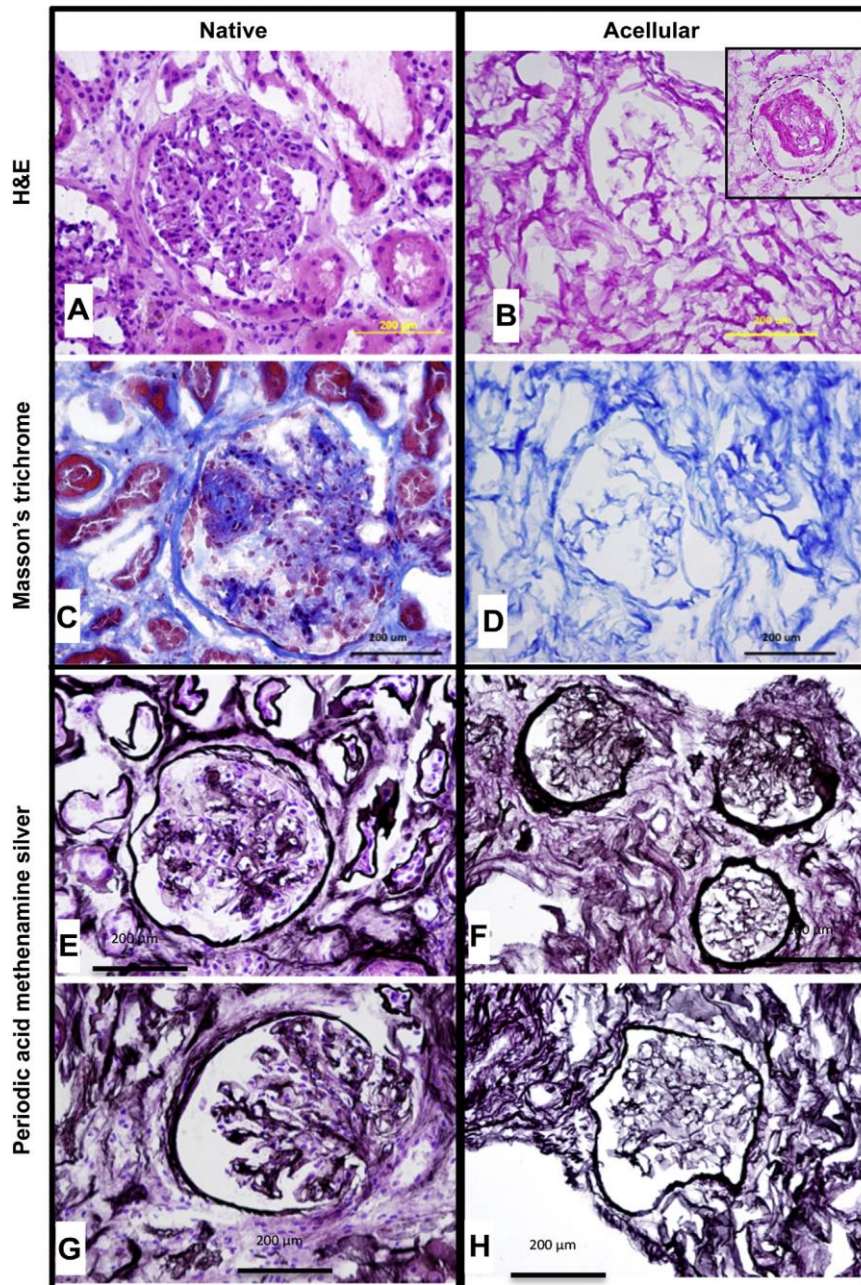


Figura 3.5: esame istologico di un rene umano decellularizzato [2].

Anche l'analisi ultrastrutturale effettuata con un microscopio elettronico a scansione (SEM) ha confermato l'assenza di cellule o nuclei, e al contempo la conservazione delle caratteristiche ultrastrutturali del tessuto

nativo nella restante ECM acellulare (Fig. 3.5). È stato inoltre osservato che l'architettura tridimensionale dei reni è stata ben conservata: i glomeruli, i tubuli e i vasi di qualsiasi livello gerarchico sono infatti ben rappresentate ed evidenti. Test effettuati aumentando linearmente i livelli pressori hanno mostrato un'evidente resistenza vascolare [2]. Inoltre la parete capillare è risultata intatta non presentando podociti sulla superficie esterna. Infine un'analisi infrastrutturale di una sezione trasversale del campione della ECM renale, ha mostrato un'immagine a nido d'ape della complessa rete di arteriole e tubuli ben conservata nel tessuto decellularizzato (Fig. 3.5).

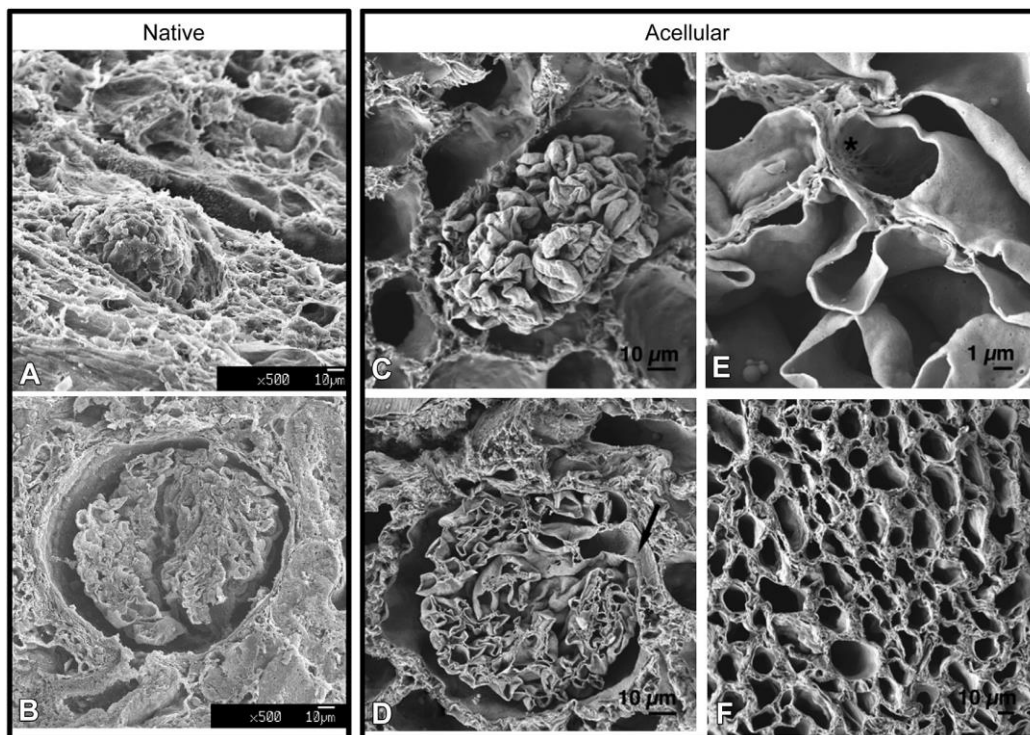


Figura 3.5: Analisi infrastrutturale. Immagini da SEM di un rene nativo umano (A-B) e di uno decellularizzato (C-D-E-F) [2].

Tuttavia, si può affermare che ogni metodo modifica in parte, le proprietà della matrice extracellulare e pertanto deve essere scelto il metodo più adatto a seconda dell'applicazione prevista.

### 3.4 ORIGINE DELLE CELLULE

Una grande promessa per la medicina rigenerativa è quella di utilizzare cellule staminali per riparare o ricostruire le funzioni d'organo. È stata proposta una notevole varietà di approcci differenti che vanno dalla riparazione dei tessuti alla crescita di un nuovo organo. Ci sono molti tipi di cellule progenitrici che potrebbero essere utilizzate a tale scopo; delle ottime candidate potrebbero essere le cellule staminali prelevate da individuo adulto o quelle contenute nel cordone ombelicale. Le cellule staminali hanno il vantaggio di autoreplicarsi e il potenziale di differenziarsi in diversi tipi di cellule somatiche. Isolare i segnali necessari a fornire una differenziazione organo specifica poiché è stato ostacolato dalla eterogeneità cellulare, dalla complessità dei tessuti bersaglio per la crescita, e dalla limitata, seppur in continua evoluzione, conoscenza della loro natura. Si pensa che un microambiente tissutale adeguato per sostenere la differenziazione delle cellule staminali e la formazione di tessuto sarebbe caratterizzato da una pluralità di segnali, comprese le proteine della matrice extracellulare, citochine, interazioni cellula-cellula e forze meccaniche. Infatti le cellule e la matrice extracellulare hanno un rapporto stretto e interdipendente. Pertanto, il tipo e la fonte delle cellule utilizzate per ripopolare uno scaffold tridimensionale sono determinanti per l'eventuale funzionalità ed il successo clinico dell'organo ingegnerizzato. L'ingegnerizzazione di tessuti e organi complessi richiede la ricostruzione del parenchima, della struttura vascolare e delle strutture di supporto. Questi requisiti sono molto diversi tra di loro perché i fattori elencati differiscono in base al numero e al tipo di cellule e in funzione dell'organo di interesse. Una cellula "ideale" dovrebbe quindi avere la capacità di proliferare o di auto-rinnovarsi. La scelta va dunque fatta tra cellule autologhe o cellule allogeniche, e tra cellule staminali embrionali (ES) o adulte. Le cellule autologhe sono auto-derivate e limitano quindi il rischio di esposizione ad agenti trasmissibili. Esse hanno poche probabilità di essere rigettate o di provocare una risposta immunitaria avversa e quindi abbassano o eliminano la necessità di trattamenti

immunosoppressivi. Questi vantaggi eliminano i rischi di infezione, di cancro e gli effetti tossici dell'immunosoppressione.

### 3.5 IL BIOREATTORE

L'evoluzione subita dai dispositivi che vanno sotto il nome di bioreattori, nel corso degli ultimi decenni, è stata notevole; inizialmente erano semplici camere chiuse realizzate con mezzi di fortuna riutilizzabili solo dopo diverse procedure di sterilizzazione. Oggi, l'industria biomedicale ha sviluppato, in risposta a un diffuso bisogno di modelli cellulari riproducibili, bioreattori sempre più sofisticati, scalabili in funzione delle necessità della produzione, spesso composti da moduli monouso chiusi e interdipendenti, prodotti per stampaggio ad iniezione, forniti sterili, dotati di sistemi per il monitoraggio dei parametri critici e, in alcuni casi, anche di sistemi di controllo in retroazione [19]. Sono quindi strumenti in grado di fornire le condizioni ambientali idonee per un ripopolamento fisiologico cellulare ottimale delle matrici di organi decellularizzati. Questi strumenti forniscono elementi nutritivi tramite la rete vascolare e sono anche in grado di stimolare le cellule della matrice, che riproduce così le condizioni necessarie all'organo in crescita. I bioreattori devono sostenere la coltura sterile di cellule parenchimali o stromali per diverse ore, giorni o addirittura mesi; qualche sistema è già disponibile in commercio. Se gli organi ricellularizzati sono destinati ad essere ampiamente utilizzati, allora saranno necessari bioreattori adeguatamente monitorati, mantenuti, e realizzati con materiali sterilizzabili e/o monouso e che sfruttino metodi diagnostici non invasivi, non distruttivi, rapidi ed accurati usando tecniche ottiche per l'osservazione real time come la risonanza magnetica nucleare (MRI, Magnetic Resonance Imaging) o la tomografia ad emissione di positroni (PET, Positron Emission Tomography), anche se lo spessore e le caratteristiche eterogenee dei costrutti rimangono ostacoli ancora da superare [19].



Figura 3.7: Bioreattore da laboratorio monouso per coltura cellulare.

Una sfida della ricerca potrebbe essere la realizzazione di sistemi ingegnerizzati che possano permettere la produzione in “serie” di organi decellularizzati grazie all’utilizzo di software e apparecchiature che possano autoregolare, in base alle dimensioni e in base al tipo di struttura da decellularizzare, le soluzioni detergenti coinvolte nel processo automatizzando e velocizzando la procedura.

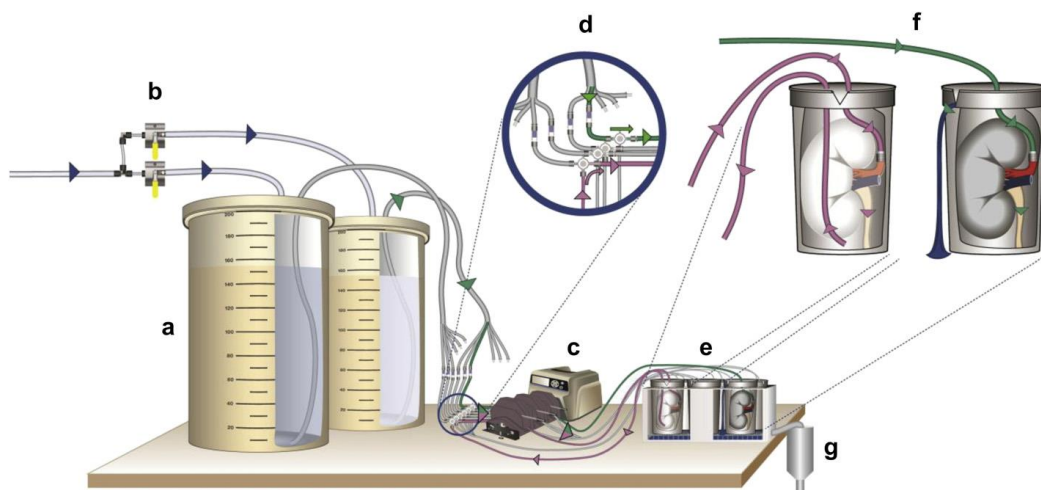


Figura 3.7: Esempio di un sistema ad alta velocità per la decellularizzazione composto da una pompa peristaltica (c) che pompa le soluzioni di detergente (a-b) all’interno delle camere contenenti gli scaffold (e).



### 3.6 LA RICELLULARIZZAZIONE DELLO SCAFFOLD

La proliferazione e il differenziamento delle cellule staminali progenitrici per la riparazione e la rigenerazione tissutale richiedono una appropriata interazione di queste con l'ECM. Vista l'eterogeneità di tipi cellulari presenti all'interno del rene (se ne contano oltre 30 tipi differenti) che uno scaffold ripopolato deve ricreare, l'utilizzo e il coordinamento dei vari tipi di cellule somatiche richieste sarebbe troppo laborioso, pertanto, si sceglie di utilizzare cellule staminali progenitrici pluripotenti che potrebbero derivare o dai normali percorsi riparativi, o da tessuti embrionali (embryonic stem cells, ESCs). Le cellule ESCs sono state selezionate come la fonte cellulare più adeguata perché hanno il potenziale di differenziarsi in qualsiasi tipo di cellula renale adulta anche se l'applicazione clinica è limitata da ostacoli etici e legali, così come dall'elevato potenziale di formazione di teratomi [5]. Le ESCs hanno la capacità di sviluppare diverse linee cellulari, hanno una elevata capacità di replicarsi e una potenzialità intrinseca di svilupparsi in qualsiasi organo embrionale in vivo. Anche se è ancora difficile generare strutture simili a tessuti da cellule ES esclusivamente in vitro, esse riescono a differenziarsi in ogni tipo di cellula necessarie all'organogenesi.

Infatti diversi studi condotti dai ricercatori del settore, hanno dimostrato che le ESCs possono differenziare verso la linea meso-endodermica [3]. Lo studio *"Embryonic Stem Cells Proliferate And Differentiate when Seeded into Kidney Scaffolds"* condotto da Edward A. Ross et al. nel 2009 ha evidenziato un' elevata capacità di attecchimento di ESCs allo scaffold sfruttando una loro perfusione dinamica a bassa pressione attraverso l'arteria renale. Si è visto che, tenendo sotto controllo la pressione, è favorito un miglior afflusso di ossigeno all'interno dello scaffold limitando l'insorgenza di processi apoptotici. Questo approccio ha permesso di ottenere una distribuzione uniforme delle cellule ESCs insediate all'interno di un rene murino, e più precisamente all'interno di tutto il sistema vascolare fino al glomerulo, come evidenziato dalla

colorazione istologica con ematossilina ed eosina (H&E) (Figura 3.8) delle cellule insediate all'interno dei singoli glomeruli.

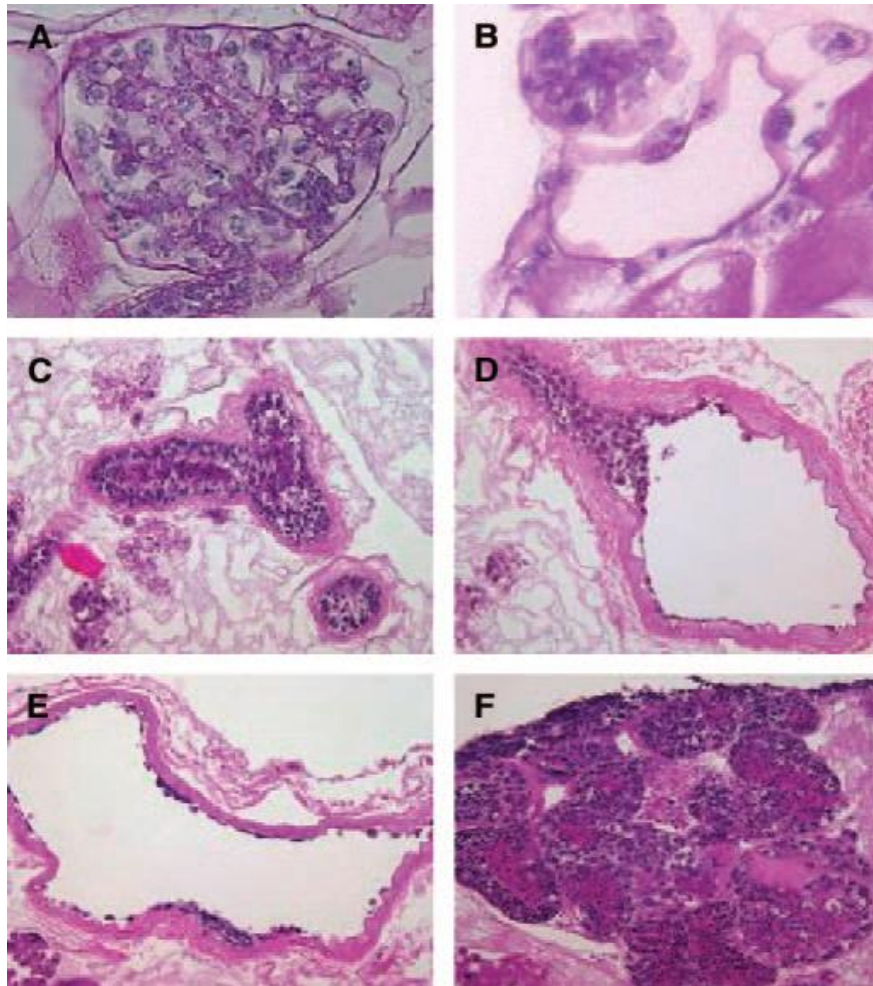


Figura 3.8: Morfologie distinte di ESCs coltivate in uno scaffold renale decellularizzato [3].

La perfusione controllata ha favorito l'intero ripopolamento dello scaffold cellulare renale. Lo studio "Recellularization of well preserved acellular kidney scaffold using Embryonic stem cells" condotto dall'ingegnere biomedico A. Remuzzi et al. nel 2013 ha evidenziato questi risultati dopo solo 72 ore [7]. Inoltre la presenza di cellule all'interno del compartimento tubulare dello scaffold, in particolare nel capillare peritubulare, indica che il potenziale ripopolamento del segmento tubulare può avvenire con la perfusione delle cellule attraverso l'arteria

renale [7]. È noto che le cellule rispondono ai cambiamenti meccanici e biochimici nell'ECM attraverso l'interazione tra le integrine e il citoscheletro, e che esiste la possibilità che il mantenimento di una pressione di perfusione controllata nei capillari peritubulari durante il processo di ricellularizzazione può promuovere l'interazione tra le cellule ESCs e l'ECM. L'ECM può infatti indurre cambiamenti nella morfologia e nella motilità cellulare, ed eventualmente favorire il ripopolamento del letto capillare peritubulare [6]. In più, è stato dimostrato che la cultura tridimensionale promuove sia la differenziazione delle ESCs attraverso interazioni cellula-cellula e cellula-matrice, sia una maggior differenziazione ematopoietica rispetto a quella che si può ottenere nelle tradizionali culture in 2D [20-21].

Lo studio *“Regeneration and Experimental orthotopic transplantation of a bioengineered Kidney”* condotto da Song et al. nel 2013 ha evidenziato risultati simili usando una perfusione dello scaffold renale non solo attraverso l'arteria renale ma anche attraverso l'uretere, mantenendo durante la perfusione cellulare, una pressione negativa all'esterno del rene [6] (Fig. 3.9).

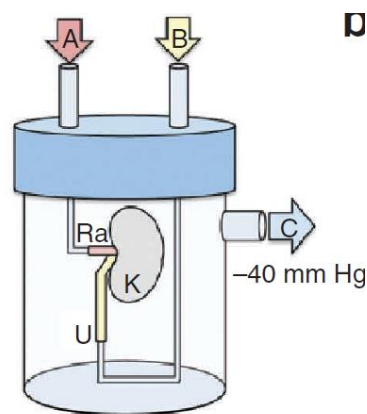


Figura 3.9: Doppia perfusione dello scaffold attraverso l'arteria renale e l'uretere.

Nonostante la doppia infusione, anche dopo diversi giorni di coltura, si sono riscontrate più cellule all'interno dei capillari glomerulari e meno cellule nel compartimento tubulare.

Tutti questi risultati suggeriscono che la completa ricellularizzazione dei bioscaffold renali con perfusione di cellule può essere considerato un approccio efficace per la bioingegnerizzazione di organi interi, anche se è

un processo ancora in via di sperimentazione. Un passo avanti verso questa direzione potrebbe ottenersi con l'uso combinato delle cellule ES pluripotenti con pressioni più favorevoli e flussi distribuiti lungo la complessa struttura della matrice renale.

In questo ambito nuove ricerche prodotte dalla collaborazione tra uno dei maggiori esponenti nel settore della ricellularizzazione di organi l'ingegnere biomedico Andrea Remuzzi del dipartimento di ingegneria industriale di Bergamo, e Cesare Galli del laboratorio di tecnologie avanzate per la riproduzione animale AVANTEA di Cremona, hanno dato risultati promettenti nella realizzazione di organoidi renali chimerici (maiale/uomo) in cui le staminali embrionali del maiale, dopo aver "guidato" la rigenerazione di quelle umane, saranno uccise inserendo nelle cellule staminali embrionali di maiale un gene suicida, lasciando in vita la parte umana, pronta per l'impianto.

# CONCLUSIONI

La medicina rigenerativa è nata come alternativa agli approcci terapeutici tradizionali come il trapianto d'organo con l'obiettivo di rigenerare tessuti del corpo umano tramite l'utilizzo di biomateriali e cellule. Rispetto alla rigenerazione degli altri organi, quella del rene è sicuramente la più complessa a causa della sua complessa architettura e della sua fisiologia e della mancanza di conoscenze approfondite sulle interazioni tra ECM, cellule e fattori di crescita. Le statistiche inoltre dimostrano che tra le principali cause di mortalità abbiamo malattie legate all'apparato renale. Tra queste l'insufficienza renale è una delle patologie croniche, sempre più diffusa, che spesso complica il discorso di altre malattie come il diabete e le malattie cardiovascolari.

In questo panorama, le terapie sostitutive odierne come la dialisi sono da considerarsi dei trattamenti momentanei piuttosto che una cura, e sono accompagnate da numerosi svantaggi.

La ricerca in continuo sviluppo, ha dimostrato che una tecnica emergente, consiste nella decellularizzazione e ricellularizzazione dello scaffold renale. Questa tecnica per lo sviluppo di organi bioingegnerizzati, è sicuramente ancora agli albori, ma i risultati preliminari ottenuti da studi effettuati su ratti, su maiali e su reni umani scartati per il trapianto provenienti da defunti, sono stati promettenti. Attualmente gli studi sono ancora lontani dall'ottimizzare tecniche in grado di ricreare in laboratorio organi complessi, però partendo dalle ricerche, possiamo studiare i meccanismi che regolano la biologia delle cellule staminali e di quelle differenziate nel processo di ripopolamento della matrice extracellulare.

Diventa sempre più importante quindi, la disponibilità di un sistema altamente avanzato in cui crescere e seguire popolazioni selezionate di

cellule per seguire in modo più efficiente le loro trasformazioni e la loro differenziazione.

# BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

[1] David C. Sullivan, Sayed-Hadi Mirmalek-Sani, Daniel B. Deegan, Pedro M. Baptista, Tamer Aboushwareb, Anthony Atala, James J. Yoo: *"Decellularization methods of porcine Kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system"*, Biomaterials 33 (2012); 7756-7764

[2] Giuseppe Orlando, Christopher Booth, Zhan Wang, Giorgia Totonelli, Christina L. Ross, Emma Moran, Marcus Salvatori, Panagiotis Maghsoudlou, Mark Turmaine, Ginger Delario, Yousef Al-Shraideh, Umar Farooq, Alan C. Farney, Jeffrey Rogers, Samy S. Iskandar, Alan Burns, Frank C. Marini, Paolo De Coppi, Robert J. Stratta, Shay Soker: *"Discarded human kidneys as a source of ECM scaffold for kidney regeneration technologies"*, Biomaterials 34 (2013); 5915-5925

[3] Edward A. Ross, Matthew J. Williams, Takashi Hamazaki, Naohiro Terada, William L. Clapp, Christopher Adin, Gary W. Ellison, Marda Jorgensen, Christopher D. Batich : *"Embryonic Stem Cells Proliferate And Differentiate when Seeded into Kidney Scaffolds"*, J am Soc Nephrol 20 (2009); 2338-2347

[4] Karina H. Nakayama, C. Chang I. Lee, Cynthia A. Batchelder, Alice F. Tarantal: *"Tissue Specificity of Decellularized Rhesus Monkey Kidney and Lung Scaffolds"*, PLOS ONE vol.8 issue 5 (2013)

[5] Marcus Salvatori, Andrea Peloso, Ravi Katari, Giuseppe Orlando: *"Regeneration and Bioengineering of the Kidney: Current Status and Future Challenges"*, Kidney Diseases (2014) 15:379

[6] Jeremy J Song, Jacques P Guyette, Sarah E Gilpin, Gabriel Gonzalez, Joseph P Vacanti, Harald C Ott: *" Regeneration and Experimental orthotopic transplantation of a bioengineered Kidney"*, Nature medicine volume 19| number 5| may 2013

[7] Barbara Bonandrini, Marina Figliuzzi, Evangelia Papadimou, Marina Morigi, Norberto Perico, Federica Casiraghi, Fabio Sangalli, Sara Conti, Ariela Benigni, Andrea Remuzzi, Giuseppe Remuzzi: *"Recellularization of well preserved acellular kidney scaffold using Embryonic stem cells"*, Tissue Engineering Part A (2013)

[8] Park, K.M., Woo, H.M: *"Porcine bioengineered scaffolds as new Frontiers in regenerative medicine"*, Transplant Proc 44, 1146, (2012)

[10] Dee U. Silverthorn: *Fisiologia umana. Un approccio integrato*, Sesta Edizione, 2013

- [11] <http://www.chups.jussieu.fr/polys/capacites/capagerontodocs/annefondamentale/VieillissementMEC1.pdf>
- [12] [http://it.wikipedia.org/wiki/Dialisi\\_\(fisica\)](http://it.wikipedia.org/wiki/Dialisi_(fisica))
- [13] [http://www.asnetsardegna.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=69&Itemid=75](http://www.asnetsardegna.com/index.php?option=com_content&view=article&id=69&Itemid=75)
- [14] Giovanna Sau: *“Emofiltrazione in pre e in post-diluizione”*, G Ital Nefrol 29, 31-36, (2012)
- [15] Santoro A., Guarnieri F., Ferramosca E., Grandi F., *“Acetate free Biofiltration”* Hemodiafiltration
- [16] H. David Humes, Deborah Buffington, Angela J. Westover, Shuvo Roy, William H. Fissell, *“The bioartificial kidney: current Status and future promise”*, Pediatr Nephrol 2013
- [17] [http://it.wikipedia.org/wiki/Trapianto\\_renale](http://it.wikipedia.org/wiki/Trapianto_renale)
- [18] Orlando G, Farney A, Sullivan DC, AbouShwareb T, Iskandar S, Wood KJ, et al. *“Production and implantation of renal extracellular matrix scaffolds from porcine kidneys as a platform for renal bioengineering investigations”*. Ann Surg 2012;256:363e70.
- [19] Maria C. Tanzi, Annamaria Bianchi, Silvia Farè, Sara Mantero, Manuela T. Raimondi, Luisa Visai, *“Approccio integrato per la medicina rigenerativa”* Pàtron editore 2013.
- [20] Levenberg, S., Huang, N.F., Lavik, E., Rogers, A.B., itskovitz-Eldor, J., and Langer, R., *“Differentiation of Human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds.”* Proc Natl Acad Sci USA 100,12741, 2003
- [21] Liu, H., and Roy, K., *“Biomimetic three-dimensional cultures significantly increase hematopoietic differentiation efficacy of embryonic stem cells.”* Tissue Eng 11, 319, 2005