



Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente

Corso di Laurea in: Biologia Molecolare e Applicata

VALUTAZIONE ISTOLOGICA DEI TESSUTI DI
BANCA: IMPLEMENTAZIONE DELL'ATTIVITÀ
CLINICA DELLA BANCA CUTE REGIONE EMILIA
ROMAGNA

HISTOLOGICAL EVALUATION OF BANK TISSUES:
IMPLEMENTATION OF THE ACTIVITY OF EMILIA
ROMAGNA REGIONAL SKIN BANK

TESI SPERIMENTALE

Studentessa:
AGNESE GIACOMETTI

Relatore:
CHIAR.MA PROF.SSA ADRIANA
CANAPA

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

“Soli soli soli”

INDICE

INDICE.....	1
INTRODUZIONE	3
BANCHE DEI TESSUTI	5
BANCA CUTE REGIONE EMILIA ROMAGNA	10
Ambienti della Banca cute RER	11
Tessuti distribuiti dalla banca cute RER	17
Percorso dei tessuti.....	27
Prelievo	27
Accettazione	30
Processazione, conservazione e stoccaggio.....	31
Validazione	33
Distribuzione e uso clinico	33
SCOPO DELLA TESI.....	35
MATERIALI E METODI	37
Procurement e processazione dei tessuti	37
Analisi istologica.....	41
Preparazione del campione	41
Colorazioni istochimiche	43
Colorazioni immunoistochimiche	45
RISULTATI.....	47
Risultati del Progetto 1	47
Risultati del Progetto 2	50
Risultati del Progetto 3	54

DISCUSSIONE	58
CONCLUSIONE	66
BIBLIOGRAFIA	67

INTRODUZIONE

Il trapianto di tessuto cutaneo è utilizzato ampiamente nella pratica clinica per il trattamento di varie condizioni patologiche come ferite profonde, ustioni profonde o traumi.

I tessuti destinati al trapianto devono essere processati e validati presso una Banca dei tessuti autorizzata e preposta a tale attività prima di essere utilizzati a scopo clinico-trapiantologico, seguendo una stringente legislazione durante tutte le fasi del processo.

Tra queste, la Banca Cute della regione Emilia Romagna (RER) è una delle 5 banche del tessuto cutaneo presente su territorio nazionale che, oltre a garantire un ampio approvvigionamento di diversi bioprodotto di derivazione cutanea mantenendo elevati standard di qualità, è proiettata all'implementazione dell'attività clinica mediante lo sviluppo di nuovi protocolli sperimentali che possano migliorare le caratteristiche del bioprodotto distribuito e, di conseguenza, l'efficacia clinica del trapianto.

Recentemente, la Banca Cute RER ha inoltre sviluppato dei percorsi specifici relativi a due differenti tipologie di tessuto, ovvero la membrana amniotica ed il tessuto adiposo. In particolare, la lavorazione del tessuto

adiposo è stata concretizzata grazie alla partnership pubblico-privata con l'azienda Lipobank.

Il lavoro di tesi, svolto in stretta collaborazione con il Prof. Davide Melandri, Direttore della Banca Cute RER e la Dott.ssa Valeria Purpura, Responsabile della ricerca clinica, tratta tre differenti progetti di implementazione dell'attività clinica sviluppati presso la Banca Cute RER, focalizzandosi sull'importante contributo fornito dalla cooperazione con la U.O. Anatomia Patologica nella valutazione dei risultati.

In particolare, i progetti descritti in questa tesi sono:

Progetto 1: Miglioramento delle proprietà antiossidanti della membrana amniotica umana congelata mediante l'utilizzo della quercitina;

Progetto 2: Sviluppo di una nuova metodica di conservazione del derma decellularizzato;

Progetto 3: Sviluppo di una nuova metodica di decellularizzazione della membrana amniotica umana.

BANCHE DEI TESSUTI

In generale, viene definita Banca dei Tessuti ogni unità di ospedale pubblico o struttura sanitaria senza fini di lucro, in cui si effettuano attività di lavorazione, conservazione, stoccaggio e distribuzione di tessuti umani, certificandone l' idoneità e la sicurezza per un uso a scopo clinico-trapiantologico (*Linee Guida CNT, 2016*).

Per lo svolgimento di tale attività, le Banche dei Tessuti italiane vengono coordinate sia a livello regionale, dal Centro Regionale Trapianti (CRT) di riferimento, sia a livello nazionale, dall' autorità competente, ovvero il Centro Nazionale Trapianti (CNT). Il CNT effettua periodicamente un programma ispettivo per ogni tipologia di tessuto processato, conservato e distribuito dalla Banca dei Tessuti, in modo tale da garantire lo svolgimento di un' attività conforme ai criteri di qualità e sicurezza previsti dalle direttive europee e dai loro recepimenti nazionali. Solo le Banche dei Tessuti italiane autorizzate dal CNT sono quindi menzionate in un apposito elenco.

Inoltre, il CNT effettua un controllo sull' andamento trimestrale delle donazioni di ogni tessuto mediante una relazione sulle attività svolte, che la Banca deve presentare trimestralmente specificando la quantità di tessuto

(espressa in cm²) processato e distribuito su scala nazionale.

I tessuti che attualmente vengono prelevati da donatori viventi o deceduti per essere successivamente processati, conservati e distribuiti dalle Banche dei Tessuti italiane sono:

- tessuto muscolo-scheletrico (cartilagini, tendini, elementi ossei);
- tessuto cardiovascolare (arterie, vasi, valvole cardiache);
- tessuto oculare (cornea);
- tessuto cutaneo;
- tessuto placentare (membrana amniotica);
- tessuto adiposo.

Riguardo il tessuto cutaneo, sono presenti in Italia 5 Banche dei Tessuti autorizzate¹ dal CNT per la processazione, conservazione e distribuzione di tale tessuto a scopo clinico-trapiantologico, ovvero:

- Banca della Cute regione Emilia-Romagna, Ospedale M. Bufalini (Cesena);
- Banca Regionale Cute, Lombardia, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda (Milano);
- Banca Regionale della cute, Piemonte, A. Ospedaliera Universitaria

¹ (Dati forniti dal Centro Nazionale Trapianti, 5 dicembre 2018, ultimo aggiornamento 19 aprile 2021).

Città della Salute e della Scienza di Torino (Torino);

- Banca Regionale Tessuti e cellule, Toscana, Policlinico S. Maria alle Scotte (Siena);
- Banca dei Tessuti della Regione Veneto, A.O.U. Verona (Verona)

Riguardo le cornee e la membrana amniotica, sono presenti in Italia 7 Banche dei Tessuti autorizzate dal CNT² per la processazione, conservazione e distribuzione di tali tessuti a scopo clinico-trapiantologico, principalmente in ambito oftalmologico, ovvero:

- Banca degli Occhi di L'Aquila, Abruzzo, Ospedale S. Salvatore (L'Aquila);
- Centro di riferimento regionale innesti corneali "L. Barca", Calabria, Azienda Ospedaliera di Cosenza (Cosenza);
- Banca delle Cornee, Emilia Romagna, Ospedale Maggiore (Bologna-Imola);
- Banca degli occhi, Lazio, Azienda Ospedaliera San Giovanni (Roma);
- Banca degli Occhi, Marche, Ospedale E. Profili (Fabriano);
- Centro di Conservazione Cornee Piero Perelli, Toscana, AUSL Toscana Nordovest - Ospedale San Luca (Lucca);

² (Dati forniti dal Centro Nazionale Trapianti, 5 dicembre 2018, ultimo aggiornamento 19 aprile 2021).

- Fondazione Banca dei Tessuti di Treviso Onlus, Veneto (Treviso).

La Banca della Cute RER ha inoltre recentemente richiesto l'autorizzazione del CNT per la processazione, conservazione e distribuzione sia della membrana amniotica umana da utilizzare in ambito dermatologico/chirurgico, sia del tessuto adiposo per un uso autologo.

In seguito al prelievo del tessuto, eseguito con procedure asettiche in modo da salvaguardarne le proprietà e ridurre il rischio di contaminazione batterica, il tessuto viene trasportato presso la Banca dei Tessuti di riferimento. In particolare, il prelievo viene effettuato da professionisti che hanno completato un programma di addestramento predisposto da una équipe medica specializzata o dalla Banca dei Tessuti. In seguito all'arrivo presso la Banca di riferimento, il tessuto viene accettato e processato all'interno di specifici ambienti a contaminazione particellare e microbiologica controllata, definiti *clean rooms*.

Ogni banca può sviluppare il proprio percorso relativo all'attività di approvvigionamento, lavorazione, conservazione e distribuzione di tessuti trapiantabili, purché sia conforme a quanto richiesto dalle linee guida redatte dal CNT. È comunque necessario che lo scopo sia chiaramente stabilito e documentato: ogni Banca dei Tessuti deve infatti mantenere un registro delle

proprie attività, specificando il tipo, la quantità e la qualità di tessuti ricevuti, controllati, lavorati, stoccati e distribuiti, tenendo traccia dell'origine e della destinazione dei tessuti trapiantati. È inoltre necessario che la Banca rilasci al Centro di Trapianto la documentazione relativa al tessuto fornito, senza la quale non è consentito il trapianto del tessuto, in quanto ne certifica la sicurezza e qualità e ne garantisce la rintracciabilità (*DIRETTIVA 2004/23/CE; DIRETTIVA 2006/17/CE; D.Lgs. 6/11/07 n. 191; D.Lgs. 25/01/10 n.16; D.Lgs. 30/05/12 n.85; Linee Guida CNT, 2016*).

BANCA CUTE REGIONE EMILIA ROMAGNA

La Banca Cute RER è stata istituita dal Ministero della Salute con *Decreto del 16 dicembre 1998* ed è una delle cinque Banche del tessuto cutaneo italiane autorizzate dal Centro Nazionale Trapianti (CNT) e dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) per svolgere l'attività di processazione, conservazione e distribuzione di tessuto cutaneo da donatore per un suo utilizzo a scopo clinico-trapiantologico. In particolare, la Banca Cute RER afferisce alla U.O. Centro Grandi Ustionati dell'Ospedale "M. Bufalini" di Cesena – Azienda USL della Romagna – ed è il centro di riferimento della regione in Emilia-Romagna (RER) per il reperimento e la distribuzione di tale tessuto. Attualmente la Banca Cute RER serve un bacino di utenza di circa cinque milioni di abitanti e ha recentemente implementato la sua attività con nuovi percorsi relativi a due differenti tipologie di tessuto, ovvero la membrana amniotica e il tessuto adiposo. È inoltre attiva dal 2006 una sezione dedicata all'implementazione di attività clinica nell'ambito della Medicina rigenerativa e della Bioingegneria tissutale.

Ambienti della Banca cute RER

Lo svolgimento dell'attività della Banca Cute RER viene effettuata all'interno della Cell Factory, una piattaforma biotecnologica realizzata secondo le *norme europee di "Good Manufacturing Practises" (GMP)* in cui vengono effettuate tutte le attività di manipolazione, conservazione, validazione e distribuzione di cellule e tessuti destinati al trapianto.

All'interno della Cell Factory si eseguono:

- Attività di lavorazione, conservazione, validazione e distribuzione a fine di trapianto di cellule staminali per autotrapianto in pazienti oncoematologici;
- Attività di lavorazione, conservazione, validazione e distribuzione, a fine di trapianto di Tessuto Cutaneo di donatore e Attività di Bioingegneria Tessutale;
- Attività di implementazione clinica per la produzione di innovativi tessuti da utilizzare nell'ambito della Medicina rigenerativa e della Bioingegneria tissutale.

Dal punto di vista strutturale la Cell Factory è composta da otto laboratori certificati secondo normativa (*ISO 9001:2000*), Nazionale Europea e GMP di classe D e B con all'interno cappe di grado A, adibiti alla manipolazione minima di cellule e tessuti (*Figura 1*).



Figura 1 Ambiente clean room con cappa di grado A

Si riportano di seguito i parametri particellari utilizzati per la classificazione delle *clean rooms*:

CLASSE A:

	numero massimo di particelle da 5.0 $\mu\text{m}/\text{m}^3$ permesse	
	a riposo (b)	in attività
CLASSE A	0	0
CLASSE B (a)	0	2000
CLASSE C (a)	2000	20.000
CLASSE D (a)	20.000	da definire (c)

	numero massimo di particelle da 0.5 µm/m³ permesse	
	a riposo (b)	in attività
CLASSE A	3.500	3.500
CLASSE B (a)	3.500	350.000
CLASSE C (a)	350.000	3.500.000
CLASSE D (a)	3500000	da definire (c)

Note Tabelle:

(a): per il rispetto delle specifiche, nelle Classi B, C, e D il ricambio di aria deve essere correlato alla dimensione dell'ambiente e ai macchinari e al personale presente.

(b): I valori indicati sul massimo numero di microparticelle ammesso nella condizione "a riposo" corrispondono approssimativamente a quelli dati dallo *FS 209* e dallo *ISO 14644-1*: le classi A e B corrispondono alla classe 100 o M1.5 dello *FS209E* e alla *ISO5* dello *ISO 14644-1*, così come la classe C corrisponde alla classe 10000 o M5.5 e alla *ISO7* e la classe D corrisponde alla classe 100000 o M6.5 e alla *ISO8*.

(c): I requisiti e i limiti per questo ambiente dipenderanno dalla natura delle operazioni effettuate.

In ottemperanza alle norme GMP è inoltre richiesto un monitoraggio microbiologico degli ambienti, dopo la validazione dei sistemi, della pulizia e della sanificazione; nelle tabelle sottostanti sono riportati tutti gli indici di limite di contaminazione microbiologica raccomandati, sottolineando che si tratta di valori medi di analisi:

	Limiti di contaminazione microbiologica raccomandati a riposo (a)	
	Campione di aria cfu/m ³	Superfici (Ø 90mm) cfu/4 ore
CLASSE A	<1	<1
CLASSE B	10	5
CLASSE C	100	50
CLASSE D	200	100

Nota Tabella:

(a): le superfici possono essere esposte per meno di 4 ore.

	Limiti di contaminazione microbiologica raccomandati in attività	
	Superfici di contatto (Ø 55mm) cfu/superficie	Impronta di guanto cfu/guanto
CLASSE A	<1	<1
CLASSE B	5	5
CLASSE C	25	-
CLASSE D	50	-

La Banca Cute RER svolge quindi la sua attività di processazione dei tessuti all'interno della Cell Factory, in locali dedicati GMP B con all'interno cappe di grado A (*Figura 1*) adibiti alla manipolazione di cellule e tessuti, certificati secondo le Norme di Buona Pratica di Fabbricazione (*Manufacturing Practice: GMP*) e le norme ISO 14644-1 (*Regolamento e Normativa per le camere bianche*), denominati “*clean rooms*”. In particolare, gli ambienti “*clean rooms*” sono caratterizzati da filtri HEPA ad alta performance, presenti nel controsoffitto, che garantiscono la sterilità dell'aria circolante. Per garantire tali condizioni, l'ingresso ai locali di produzione è limitato alle sole persone autorizzate che partecipano direttamente alla lavorazione e prevede una vestizione specifica composta da: camice, guanti, cuffia, mascherina e copri-scarpe ai sensi del *D. Lgs 81 del 2008*.

Al fine di conservare i tessuti fino al momento della loro distribuzione per uso clinico, la Banca Cute RER comprende anche locali dedicati al congelamento e allo stoccaggio dei tessuti. Adiacente alla Cell Factory si trova infatti il settore di Criobiologia, un laboratorio dotato di sistemi tecnologici validati per il criocongelamento a discesa programmata di ogni singolo prodotto confezionato e sigillato in camera bianca (*Figura 2*). Tutti i tessuti crioconservati in questo locale, dopo opportuno screening e analisi

sul prodotto, vengono infine conservati e stoccati nel rispetto della normativa vigente presso la Sala Criogenica di stoccaggio, dotata di criocontenitori ad azoto liquido, programmati per il mantenimento a $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ del tessuto cutaneo precedentemente manipolato e criocongelato.



Figura 2 Sala di criocongelamento

Tessuti distribuiti dalla banca cute RER

Il principale tessuto attualmente distribuito dalla Banca Cute RER è il tessuto cutaneo. La cute è formata da una porzione superficiale chiamata epidermide, da un tessuto connettivo chiamato derma e da un tessuto adiposo che prende il nome di sottocutaneo (*Figura 3*).

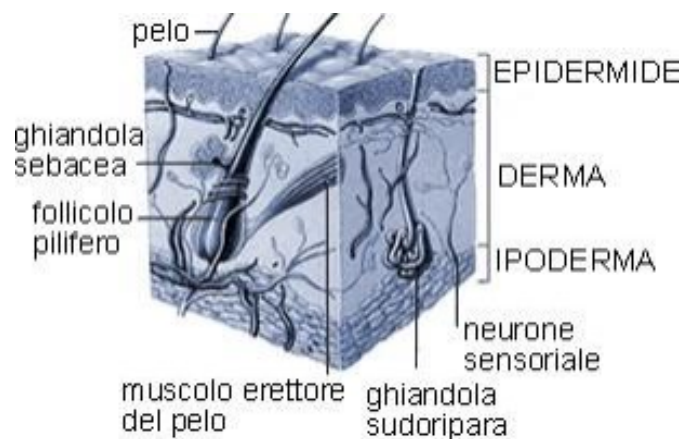


Figura 3 Divisione strati cutanei (“Anatomia della cute”, Mondadori Spa 2023)

L'epidermide è divisa in strati (*Figura 4*) che dipendono dallo stato di maturazione dei cheratinociti, ovvero cellule epiteliali la cui stratificazione origina la stessa epidermide e che migrano progressivamente da una sede basale (o strato basale) verso la superficie cutanea subendo un processo di differenziazione definito cheratinizzazione. Durante il suo transito intraepidermico, il cheratinocita acquisisce delle caratteristiche

modificazioni della sua morfologia che permettono di suddividere istologicamente l'epidermide in cinque strati: basale, spinoso, granuloso, lucido (solo in alcuni distretti cutanei) e corneo.

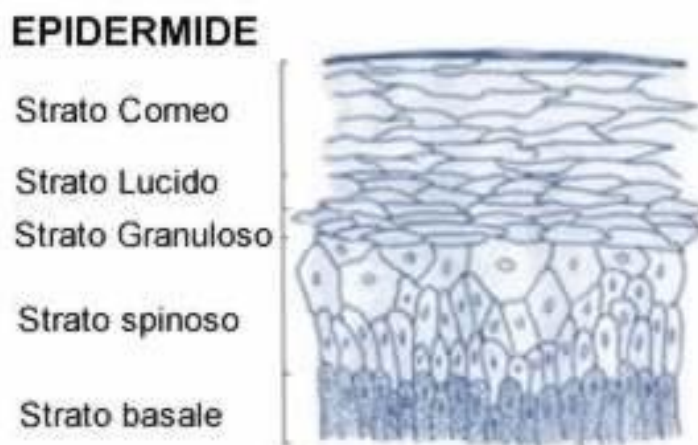


Figura 4 Dettaglio degli strati dell'epidermide (“Anatomia della cute”, Mondadori Spa 2023)

Il derma è tessuto connettivo composto da due strati: il papillare, situato al di sotto dell'epidermide, ed il reticolare, situato tra papillare e ipoderma. Esso contiene collagene (che gli consente una notevole resistenza alla trazione), fibre elastiche (che gli donano un'estensibilità reversibile), glicosamminoglicani (che gli conferiscono idratazione e pienezza) e gli annessi cutanei, cioè i follicoli piliferi e le strutture ad esso associate (ghiandole sebacee e muscoli erettori del pelo).

In particolare, la Banca Cute RER processa e distribuisce tre diversi bioprodotto di derivazione cutanea, ovvero la Cute omologa, il derma de-epidermizzato (Ded) ed il derma decellularizzato (Derma Dec).

- CUTE OMOLOGA

La cute omologa (*Figura 5*) è prelevata da donatore cadavere ed è costituita dallo strato epidermico ed un sottile strato di derma sottostante. In particolare, i lotti di cute distribuiti dalla Banca Cute RER hanno uno spessore compreso tra 0.6 a 0.8 mm, una lunghezza che varia da 12 fino a 80 cm e una larghezza compresa tra 3 e 7 cm. La cute omologa, considerata il salvavita nelle ustioni estese, è una valida soluzione terapeutica per il trattamento di ustioni profonde, ulcere croniche, vascolari, traumatiche, ferite difficili, perdite di sostanza a tutto spessore, lesioni tendinee osteo-articolari. Il tessuto cutaneo è anche particolarmente indicato per la terapia chirurgica ricostruttiva di tumori cutanei (melanoma, carcinoma spinocellulare ed epitelioma basocellulare) (*Linee guida CNT, 2016*). Il tessuto cutaneo è inoltre capace di diminuire la soglia del dolore e la contaminazione batterica, favorendo la formazione del tessuto di granulazione con conseguente riepitelizzazione spontanea in una elevata percentuale di casi (*Melandri et. al., 2020*).



Figura 5 Cute omologa

- DERMA DE-EPIDERMIZZATO (DED)

Il Derma de-epidermizzato (Ded) (*Figura 6*) è un bioprodotto di derivazione cutanea ottenuto da donatore cadavere e costituito da derma vitale privo dello strato epidermico sovrastante, con spessore compreso tra 0.6 e 1mm.

I lotti di Ded distribuiti dalla Banca Cute RER presentano diverse dimensioni: la lunghezza varia da 3 fino a 23 cm e la larghezza è compresa tra 2 e 7 cm. Il Ded trova ampia applicazione come sostituto dermico e nelle tecniche dei graft compositi (*Cho et.al., 2000*).

L'impiego del Ded crio-preservedo risulta particolarmente efficace nel trattamento delle ulcere croniche recidivanti, in quelle con perdita di sostanza a tutto spessore e nelle ulcere traumatiche che non rispondono al trattamento medico standard, ma anche nelle ulcere vascolari, diabetiche a

varia eziologia (*Linee guida CNT, 2016*).



Figura 6 *Derma de-epidermizzato*

- **DERMA DECELLULARIZZATO (DEC)**

Il Derma Decellularizzato (Derma Dec) (*Figura 7*) è un bioprodotto di derivazione cutanea ottenuto da donatore cadavere e costituito da derma sottoposto ad un processo di decellularizzazione (manipolazione minima) capace di rimuovere le componenti cellulari responsabili del rigetto sul ricevente, mantenendo, al tempo stesso, inalterata la struttura architettonica collagenica e fibrosa caratterizzante il tessuto. Lo spessore del Derma decellularizzato prelevato e processato presso la Banca Cute RER è compreso tra 0.8-2 mm. I lotti di Derma Decellularizzato distribuiti dalla Banca Cute RER presentano diverse dimensioni: la lunghezza varia da 4 fino

a 12 cm e la larghezza è compresa tra 3 e 7 cm. Il Derma decellularizzato trova applicazione come scaffold biologico in ambito dermatologico per quanto concerne la copertura di ulcere cutanee croniche; in ambito ortopedico per la riparazione di tessuti lesi come tendini, cuffia dei rotatori e cartilagine (*Aurora et al., 2007*) in chirurgia ricostruttiva per quanto concerne la ricostruzione della parete addominale (*Ghetti et al., 2017*) e nell'ambito della Chirurgia Senologica per la ricostruzione mammaria (*Folli et al., 2018*). Altri ambiti di applicazione clinica sono l'urologico in interventi di corporoplastica e oculistico per l'allungamento palpebrale inferiore. Il derma Decellularizzato è uno scaffold privo di cellule che fornisce supporto strutturale e un ambiente biologico adatto alla crescita e migrazione cellulare nell'area della lesione migliorandone e accelerandone la guarigione (*Bondioli et. al., 2014*).



Figura 1 Derma decellularizzato

Recentemente la Banca Cute RER ha inoltre implementato la sua attività con nuovi percorsi relativi a due differenti tipologie di tessuto, ovvero la membrana amniotica ed il tessuto adiposo autologo:

- MEMBRANA AMNIOTICA

La membrana amniotica è lo strato più interno delle membrane fetali (*Figura 8*) e nella vita intrauterina circonda e protegge il feto. È costituita da un singolo strato di cellule epiteliali adese ad una membrana basale che poggia su uno stroma avascolare. Macroscopicamente si presenta come un tessuto semitrasparente ed è ottenuta da donatrici sottoposte a parto cesareo in elezione (*Linee guida CNT, 2016*).

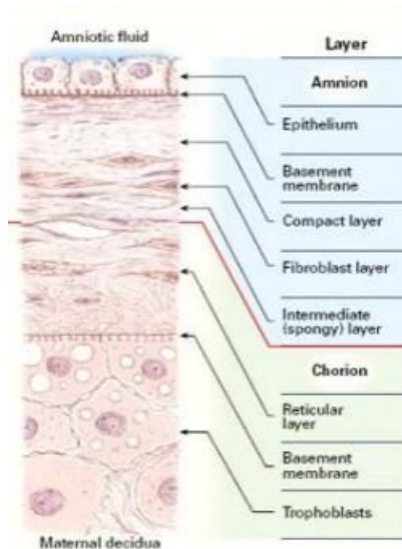


Figura 2 Stratificazione della membrana amniotica (Corneli et. al., 2012, SI.TRA.C)

La membrana amniotica umana (hAM) è utilizzata per il trattamento delle ferite dal 1910 (*Kar et al., 2014; Werber et al., 2013*). La bassa immunogenicità dell' hAM (*Castelnuovo et al., 2011, Duan-Arnold et al., 2015*) ne consente l'impiego allogenico. Agisce come una barriera fisica contro la contaminazione batterica e crea anche un ambiente umido necessario per la guarigione. Inoltre, riduce il dolore e ha attività antinfiammatorie, antifibrotiche e antimicrobiche benefiche per la guarigione delle ferite (*Fernandes et al., 2005; Niknejad et al., 2008; Sangwang et al., 2007; Azuara-Blanco et al., 1999*). Viene utilizzata in ambito oftalmologico sotto forma di patch crioconservato o come una polvere liofilizzata che, dopo la preparazione in condizioni sterili, può essere usata come collirio (*Linee guida CNT, 2016*). La membrana amniotica viene distribuita dalla Banca Cute RER (*Figura 9*) in ambito dermatologico-chirurgico plastico per il trattamento di ustioni e/o ferite di difficile guarigione grazie alle sue proprietà rigenerative. Può inoltre essere utilizzata come tessuto di partenza per la produzione di tessuti ingegnerizzati (*Niknejad et al., 2008*).

In particolare, i lotti di Membrana Amniotica distribuiti dalla Banca Cute RER presentano lunghezza variabile da 4 cm fino a 12 cm e la larghezza

compresa tra 3 cm e 8 cm.

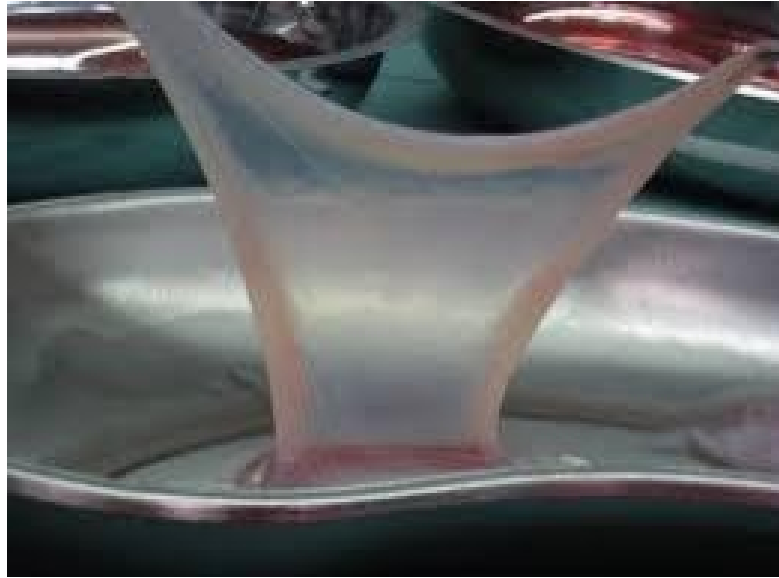


Figura 9 Prelievo di membrana amniotica

- TESSUTO ADIPOSO

Il tessuto adiposo (*Figura 10*) è un tessuto ampiamente utilizzato in ambito clinico-trapiantologico in quanto rappresenta una sorgente di cellule staminali con proprietà rigenerative. La quantità di tessuto adiposo stoccato presso la Banca Cute RER va dalle 5 alle 8 sacche da 5-7 ml ciascuna per ogni paziente. L'utilizzo del tessuto adiposo distribuito dalla Banca Cute RER è ad esclusivo uso autologo. Per le sue proprietà rigenerative, il tessuto adiposo trova ampia applicazione clinica nell'ambito della medicina rigenerativa e ricostruttiva quali ortopedia, chirurgia senologica, chirurgia plastica, dermatologia, chirurgia generale, vulnologia e otorinolaringoiatria

((Linee guida CNT, 2016; Battaglini et al., 2019; Combi et. al., 2011, Mingazzini et. al., 2010; Moffa et. al. 2018)). La Banca Cute RER processa, criocongela ed effettua attività di bancaggio del tessuto adiposo ad uso autologo con tecnologia brevettata Lipobank®.



Figura 10 Sacca di tessuto adiposo

Percorso dei tessuti

La Banca Cute RER ha sviluppato per ogni tipologia di tessuto procedure specifiche e convalidate relative al percorso di prelievo, processazione, conservazione, stoccaggio e distribuzione del tessuto a scopo clinico-trapiantologico (**DIRETTIVA 2004/23/CE, DIRETTIVA 2006/17/CE, D.Lgs. 6/11/07 n. 191, D.Lgs. 25/01/10 n.16, D.Lgs. 30/05/12 n.85**).

In particolare, verrà di seguito descritto il percorso relativo al tessuto cutaneo e alla membrana amniotica.

Prelievo

Il prelievo di tessuto cutaneo per uso omologo viene effettuato su donatori idonei in seguito ad accertamento di morte cerebrale (donatore multiorgano, MO) o morte cardiaca (donatore multi-tessuto, MT) (*Legge 01/04/99 n.91*). L'idoneità per la donazione di tessuto cutaneo si basa sulla storia medica e sociale, sullo stato clinico, sull'esame fisico, sui risultati degli esami sierologici e, se effettuata, sull'autopsia (*D.Lgs. 6/11/07 n. 191*). Il prelievo di tessuto cutaneo omologo viene effettuato mediante strumenti regolabili denominati dermatomi, che consentono di prelevare innesti dello spessore desiderato. Tali strumenti devono essere sterili, qualificati e certificati secondo normativa europea CE. Prima di effettuare il prelievo di tessuto

cutaneo viene eseguita la depilazione delle sedi di prelievo e successivamente viene effettuata un'adeguata detersione e disinfezione della superficie cutanea. Il prelievo, al fine di evitare deturpazioni, viene effettuato in aree non visibili di arti inferiori, arti superiori e dorso. In particolare, viene effettuato un primo prelievo di cute omologa a livello di arti inferiori, arti superiori e dorso e successivamente un secondo prelievo di derma de-epidermizzato, ovvero privo dello strato epidermico. Di questo, solo il derma de-epidermizzato prelevato a livello del dorso verrà sottoposto, una volta accettato in Banca Cute RER, alla metodica di decellularizzazione per la rimozione della componente cellulare e, di conseguenza, per la produzione del Derma decellularizzato.

Il tessuto membrana amniotica viene prelevato in sala operatoria durante il taglio cesareo programmato in elezione, rispettando le manovre asettiche e scollando la membrana gradualmente e nel modo più completo possibile. Nel dettaglio, la placenta viene posizionata su un campo sterile in seguito al parto e alla recisione del funicolo. Il medico prelevatore, precedentemente formato dal personale della Banca Cute RER, separa la membrana amniotica dalla placenta in modo graduale, mantenendone il corretto orientamento mediante l'uso di un filtro posto a contatto con lo strato connettivale della membrana amniotica, ovvero lo strato a contatto con il corion sottostante.

Una volta prelevati, i tessuti vengono inseriti all'interno di un contenitore sterile e immersi in soluzione fisiologica. Il contenitore viene quindi chiuso ermeticamente e identificato da un'etichetta che riporta: identificazione del donatore (nome, cognome, data di nascita), sequenza identificativa della donazione, tipologia di tessuto, data e ora di prelievo. Tutti i tessuti sono inoltre accompagnati dalla documentazione relativa alla tracciabilità del prelievo e dell'idoneità del donatore. Nel dettaglio, viene inviata alla Banca Cute, insieme al tessuto, la seguente documentazione:

Verbale di prelievo con:

- i dati identificativi del donatore e l'indicazione di chi ha identificato il soggetto;
- identificazione dei tessuti prelevati inviati;
- lotto/identificazione soluzione di trasporto e contenitore dei tessuti;
- dichiarazione sottoscritta dal medico responsabile della valutazione dell'idoneità del donatore, secondo le *Linee Guida del CNT*, che indichi l'assenza di criteri di esclusione dalla donazione, sulla base dell'indagine anamnestica e dell'esame obiettivo;
- risultati dei test sierologici in caso di donatore deceduto;
- documentazione relativa al consenso alla donazione per i donatori viventi;

- denominazione e indirizzo della Banca cui sono destinati i tessuti o le cellule.

Si procede quindi all'invio del tessuto alla Banca Cute RER nel minor tempo possibile, assicurando l'integrità del contenitore e il mantenimento di una temperatura di +2 °C/+10 °C.

Accettazione

Il tessuto trasportato presso la Banca Cute RER deve essere accettato dal personale della Banca Cute RER prima di essere processato. L'accettazione consiste nella valutazione da parte del personale della Banca della conformità del trasporto, del tessuto e della documentazione di accompagnamento a quanto richiesto dalle Linee guida CNT. In particolare, viene valutato se:

- il contenitore esterno sia integro, correttamente etichettato e idoneo al trasporto;
- il trasporto sia refrigerato;
- i contenitori dei singoli tessuti siano integri e correttamente etichettati;
- i tessuti siano immersi nel liquido di trasporto;
- sia presente la documentazione di accompagnamento;
- i dati riportati nella documentazione di accompagnamento siano

complete.

In seguito all'accettazione viene assegnata una sigla ed un numero identificativo unico per quel tessuto, in modo tale da identificare il materiale dal prelievo fino alla distribuzione ed utilizzo clinico, garantendo la privacy del donatore (*D. Lgs 196/2003*). Tutta la documentazione pervenuta viene conservata presso la Banca Cute per 30 anni dopo l'utilizzo clinico confermato del rispettivo tessuto, o dalla sua eliminazione nel caso in cui non sia stato accettato. Durante la fase di accettazione, il campione viene conservato in frigo a una temperatura compresa fra +2 °C e +10 °C in attesa della processazione in *clean room*, per un periodo massimo di 72 ore per il tessuto cutaneo e 48 ore per la membrana amniotica.

Processazione, conservazione e stoccaggio

Eseguita la prima fase di consegna e accettazione, il tessuto cutaneo (Cute omologa, Ded e Derma Dec) e la membrana amniotica vengono processati all'interno della Cell Factory, in *clean rooms* dedicate alla lavorazione di ciascun tessuto. Nonostante ogni tessuto preveda un protocollo di processazione specifico e quindi diverso dagli altri tessuti, in tutti i casi viene effettuata una valutazione qualitativa iniziale relativa all'appropriatezza del tessuto prelevato per un suo uso in ambito clinico-trapiantologico. Se

appropriato, il tessuto viene processato e quindi sottoposto a dei lavaggi in soluzione salina e successivamente immerso in una soluzione di decontaminazione/conservazione, al fine di garantire la sterilità del tessuto processato e mantenere l'integrità strutturale durante le fasi di congelamento. Durante la processazione è inoltre necessario effettuare la suddivisione del tessuto in lotti di dimensioni compatibili con l'utilizzo clinico. Il derma sottoposto alla metodica di decellularizzazione viene inoltre sottoposto ad un passaggio di processazione aggiuntivo necessario per la rimozione della componente cellulare e, di conseguenza, per la produzione del Derma Dec. Al termine della processazione i tessuti vengono confezionati in sacche sterili, successivamente sigillate, e conservati. In particolare, il tessuto cutaneo viene attualmente crioconservato in vapori di azoto a $-145\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, mediante l'uso di un crioplaner, ossia un congelatore a discesa programmata associato ad un sistema di alimentazione a vapori di azoto liquido, la discesa della temperatura risulta essere graduale fino a $-145\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Il tessuto viene quindi trasportato nella sala criogenica dove viene stoccato in contenitori ad azoto liquido definiti di "quarantena" in quanto contenenti tessuto cutaneo (Cute omologa, Ded o derma Dec) da sottoporre a test di validazione prima di essere considerati idonei per l'uso clinico. La membrana amniotica viene invece direttamente congelata a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Validazione

Prima di poter definire un tessuto idoneo per l'uso a scopo clinico trapiantologico è necessario effettuare delle analisi che ne garantiscano la sterilità e l'integrità strutturale/cellulare, definite test di validazione. I tessuti prelevati, quindi, vengono sottoposti ad indagini microbiologiche per poterne garantire la sterilità, ad analisi istologiche per valutarne il mantenimento delle caratteristiche strutturali e al test MTT per valutarne il mantenimento della vitalità cellulare. Se tutte le condizioni di idoneità vengono confermate, il tessuto viene spostato nel contenitore criogenico contenente gli altri lotti dello stesso tessuto già definiti idonei e pronti ad essere distribuiti a scopo clinico-trapiantologico.

Distribuzione e uso clinico

La richiesta di tessuto alla Banca Cute RER viene inviata dal centro richiedente (Ospedale o struttura privata) presente in regione Emilia-Romagna. I centri richiedenti il tessuto possono comunque essere anche presenti su territorio nazionale nei casi in cui:

- il centro richiedente sia localizzato in una regione italiana che non ha una Banca di riferimento regionale per il tessuto richiesto. In tale

caso è comunque necessario che la struttura richiedente il tessuto abbia stipulato apposita convenzione con la Banca Cute RER;

- la Banca di riferimento regionale del centro richiedente non ha quantità di tessuto sufficiente a soddisfare le esigenze cliniche.

In seguito alla richiesta di tessuto da usare a scopo clinico-trapiantologico, il personale della Banca Cute RER effettua uno scongelamento del tessuto richiesto all'interno degli ambienti *clean rooms* dedicati a questa attività. Nel dettaglio, la sacca contenente il tessuto viene prelevata dal contenitore di stoccaggio e aperta sotto cappa in ambiente GMP A (cappa a flusso laminare). Il tessuto viene quindi prelevato dalla sacca, lavato in soluzione fisiologica e inserito all'interno di un contenitore sterile, immerso in una soluzione di arricchimento. Il contenitore viene quindi sigillato e identificato con un'etichetta contenente la denominazione della Banca, il codice identificativo, le dimensioni e la data di scadenza del tessuto. Anche l'imballaggio secondario esterno viene identificato con un'etichetta. Viene inoltre inviata insieme al tessuto la documentazione di accompagnamento che verrà inserita nella cartella clinica del paziente ricevente.

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi è evidenziare l'importante contributo dell'analisi istologica nel percorso di implementazione dell'attività clinica effettuato dalla Banca Cute RER. A tale scopo verranno presentati tre progetti in cui la valutazione istologica ha permesso di dimostrare l'efficacia di nuovi protocolli sperimentali volti a migliorare le caratteristiche del bioprodotto distribuito e, di conseguenza, l'efficacia clinica del trapianto.

Si riporta di seguito il contributo dell'analisi istologica al raggiungimento degli obiettivi proposti nei singoli progetti:

- Progetto 1: l'analisi istologica è stata utilizzata per valutare le caratteristiche strutturali e cellulari del tessuto membrana amniotica sottoposto ad un nuovo trattamento di processazione/conservazione che prevede l'utilizzo della sostanza antiossidante quercitina. Il progetto è finalizzato a ridurre la produzione cellulare di radicali liberi dell'ossigeno da parte del tessuto criopreservato a -145 °C o congelato a -80 °C in seguito al suo scongelamento, al fine di migliorarne l'efficacia clinica.

- Progetto 2: l'analisi istologica è stata utilizzata per dimostrare un buon mantenimento delle caratteristiche strutturali del tessuto cutaneo (Derma decellularizzato) sottoposto ad una nuova modalità di conservazione in soluzione a temperatura ambiente, al fine di permetterne un utilizzo clinico più agevole da parte dei medici richiedenti il tessuto per uso in ambito clinico-trapiantologico.
- Progetto 3: l'analisi istologica ha permesso di valutare le caratteristiche strutturali del tessuto membrana amniotica sottoposto ad una nuova metodica di decellularizzazione. Il progetto è finalizzato alla produzione di membrana amniotica decellularizzata, con lo scopo di permetterne un più ampio utilizzo clinico.

MATERIALI E METODI

Procurement e processazione dei tessuti

In base alla normativa vigente (*DIRETTIVA 2012/39/UE*), la ricerca sui tessuti di donatore non può essere effettuata. Per promuovere lo sviluppo scientifico e l'implementazione dell'attività di banca, tuttavia, è consentito l'utilizzo di quei tessuti prelevati da donatore deceduto risultati non idonei all'uso clinico per patologie del donatore identificate durante analisi post-prelievo, quale ad esempio l'esame autoptico, che rendono il tessuto incompatibile con l'utilizzo in ambito clinico-trapiantologico. Nel caso del tessuto membrana amniotica, prelevato quindi da donatore vivente, sono state invece utilizzate piccole quantità di tessuto per l'implementazione di due nuovi percorsi. Nel dettaglio, per il progetto 1 sono stati utilizzati campioni di tessuto membrana amniotica derivanti da cinque donatrici diverse. Da ognuno dei cinque campioni di HAM sono stati prelevati cinque frammenti di tessuto. Due dei frammenti ottenuti sono stati trattati con protocollo di criopreservazione a $-145\text{ }^{\circ}\text{C}$, uno con l'aggiunta di quercitina e uno senza; altri due frammenti sono stati trattati con protocollo di congelamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, anche in questo caso, solo alla soluzione di conservazione di un frammento è stata aggiunta la quercitina. L'ultimo

frammento, utilizzato come controllo dell'esperimento, non è stato né trattato né conservato.

Per il progetto 2 sono stati analizzati undici campioni di tessuto cutaneo (derma decellularizzato), ciascuno prelevato da un diverso donatore. Dieci campioni sono stati trattati con soluzione di decellularizzazione a temperature ambiente; cinque di questi sono stati esaminati dopo un anno dal trattamento e gli altri cinque dopo due anni. L'ultimo campione è stato trattato con protocollo standard di congelamento in vapori di azoto e utilizzato come controllo morfologico.

Nel il progetto 3 sono stati utilizzati dieci campioni di membrana amniotica derivanti da dieci donatrici diverse. Ciascun campione è stato suddiviso in tre frammenti di cui uno trattato con soluzione di decellularizzazione e congelamento immediato a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, uno trattato con soluzione di decellularizzazione e crioconservazione con vapori di azoto e discesa graduale e programmata della temperatura fino a $-145\text{ }^{\circ}\text{C}$ e l'ultimo frammento non trattato e non congelato, utilizzato come controllo dell'esperimento.

Tutti i prelievi di tessuto sono stati eseguiti seguendo il percorso definito dalla Banca Cute RER già descritto in "Percorso dei tessuti".

I diversi tessuti sono stati quindi sottoposti alla seguente processazione:

- Progetto 1: la membrana amniotica è stata tagliata in lotti da 4 × 4 cm, posta in fiasche di coltura T25 e immersa in 6 ml di terreno RPMI 1640 con addizione di antibiotici e 10% di dimetilsolfossido (DMSO Alchimia Srl, Italia) per 15 minuti in presenza o meno di quercitina (50 µM, Sigma, Aldrich, Milano, Italia). Quindi, gli innesti di membrana amniotica sono stati confezionati in sacche sterili e crio-congelati con un calo graduale e programmato della temperatura fino a -145 °C o congelati e conservati immediatamente a -80 °C. La sterilità dei tessuti è stata regolarmente garantita dai protocolli interni della Banca, che consistono in analisi microbiologiche sul tessuto prima e dopo la sua lavorazione/conservazione. In particolare, piccoli frammenti di membrana amniotica sono stati incubati su piastre selettive per la crescita di batteri (COS Columbia agar + 5% sangue di pecora, BioMerieux) o funghi (Sabouraud destrosio agar + CAF, Biolife) per 3 o 14 giorni, rispettivamente.
- Progetto 2: il derma è stato sottoposto in modo asettico alla metodica di decellularizzazione enzimatico-fisica in uso presso la Banca Cute RER (Bondioli *et al.*, 2014). Il tessuto è stato lavato due volte con soluzione sterile di NaCl allo 0,9% per rimuovere i residui

enzimatici; quindi immerso nella soluzione di decontaminazione/conservazione RPMI contenente 10.000 UI/ml di penicillina, 10 mg/ml di streptomina, 25 mg/ml di amfotericina B. Il Derma Dec ottenuto è stato quindi posizionato in sacche sterili e immerso nella soluzione di conservazione messa a punto presso la Banca Cute RER. Le sacche contenenti il tessuto sono state quindi sigillate e stoccate a temperatura ambiente per 1 e 2 anni.

- Progetto 3: la membrana amniotica è stata sottoposta in modo asettico alla nuova metodica di decellularizzazione messa a punto presso la Banca Cute RER specifica per tale tessuto, in modo tale da ottenere membrana amniotica decellularizzata. Il tessuto è stato sottoposto ad un trattamento enzimatico-fisico e posto in un incubatore overnight, alla temperatura di 37 °C e 5% CO₂. Il tessuto è stato successivamente lavato due volte con soluzione sterile di NaCl allo 0,9% per rimuovere i residui enzimatici; quindi immerso nella soluzione di decontaminazione/conservazione RPMI contenente 10.000 UI/ml di penicillina, 10 mg/ml di streptomina, 25 mg/ml di amfotericina B, in uso presso la Banca Cute RER, e crio-congelato con un calo graduale e programmato della temperatura fino

a -145 °C (Protocollo di Crioconservazione, CP-1, Metodo 1) o congelata e conservata immediatamente a -80 °C (Protocollo di Freezing, FP-2, Metodo 2).

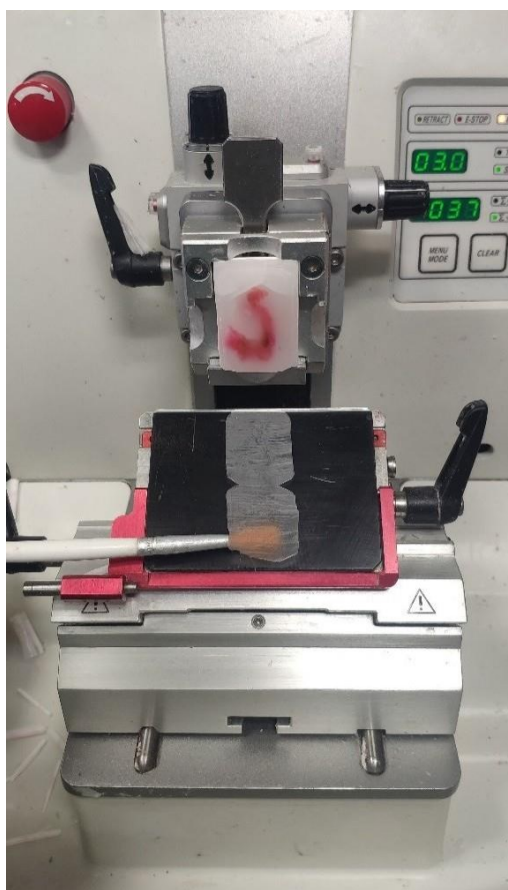
Analisi istologica

I lotti di tessuto membrana amniotica e derma decellularizzato utilizzati nel progetto 1, 2 e 3 e processati/stoccati presso la Banca Cute RER, sono stati scongelati (progetto 1 e progetto 3) o prelevati dalla soluzione di conservazione a temperatura ambiente (progetto 2) e sciacquati, per poi essere fissati in formalina in soluzione tamponata 4% che consente di regolare la penetrazione della formalina in tutto lo spessore tissutale; I tessuti fissati presso la Banca Cute RER sono stati quindi inviati presso la U.O. Anatomia Patologica dell'ospedale M. Bufalini di Cesena per l'analisi istologica.

Preparazione del campione

I tessuti sono stati fissati in formalina 4% per almeno 12 ore, valutando il tempo di fissazione in base al potere di penetrazione della formalina pari a 1mm/ora (*Thavarajah et al., 2012*); quindi sono stati lavati in acqua corrente per eliminare i residui di formalina e disidratati utilizzando concentrazioni

crescenti di alcool (alcool 70%, alcool 95%, alcool assoluto). Successivamente è stata effettuata la diafanizzazione con xilolo, in modo tale da eliminare i residui alcolici non miscibili in paraffina e la chiarificazione del pezzo; il tessuto è stato quindi impregnato in paraffina liquida (temperatura variabile tra i 54 °C ed i 60 °C) ed infine incluso in modo da ottenere un blocchetto istologico.



*Figura 11 Taglio del blocchetto istologico (membrana amniotica) al
microtomo*

Per l'allestimento del vetrino, i campioni di tessuto inclusi in paraffina sono

stati tagliati con il microtomo (*Figura 11*), in modo tale da ottenere sezioni spesse 3-3.5 μm . Le sezioni ottenute sono state poste in acqua calda per far dilatare la paraffina e rendere la loro apposizione al vetrino porta oggetto più agevole. Una volta completata la raccolta delle sezioni, i vetrini sono stati posti in stufa a 60 °C per il completo scioglimento della paraffina e l'adesione della sezione di tessuto al vetrino, in modo tale da evitarne il distacco durante la successiva colorazione. Per ogni tessuto esaminato sono state allestite tante sezioni quante le colorazioni istologiche e immunoistochimiche richieste. I preparati istologici destinati alla colorazione con Ematossilina-Eosina sono stati allestiti su vetrini portaoggetto standard (*Bio Microscope Slides, Bio-optica*), mentre per le altre colorazioni istochimiche e per le indagini immunoistochimiche sono stati utilizzati i vetrini TOMO® Adhesion Microscope Slides (*Avantor*), con superficie adesiva silanizzata per garantire una maggiore adesione delle sezioni.

Colorazioni istochimiche

Le colorazioni istochimiche effettuate sui tessuti utilizzati nei progetti 1, 2 e 3 sono: ematossilina-eosina, tricromica di Masson e Weigert Van Gieson.

La colorazione istochimica ematossilina-eosina è stata effettuata su tutti i tessuti dei progetti 1, 2 e 3 in quanto è una tra le principali colorazioni istomorfologiche di routine, utilizzata come prima indagine sulle sezioni istologiche. Viene definita colorazione segnaletica, cioè in grado di mettere in evidenza le componenti fisiche della cellula, rispettivamente nucleo (appare blu-violetto per effetto del colorante ematossilina) e citoplasma (viene colorato dall'eosina e appare rosso/rosa), e far riconoscere tutte le principali strutture istologiche. La colorazione è stata effettuata in un coloratore e montatore automatico Tissue-Tek Prisma® Plus e Tissue-Tek Film® (*Sakura*).

La colorazione istochimica tricromica di Masson è stata effettuata sui tessuti dei progetti 2 e 3 per valutare la presenza di collagene in quanto tale colorazione identifica il connettivo, il collagene e le strutture fortemente basiche in blu con il blu di anilina. La colorazione istochimica tricromica di Masson permette anche di riconoscere i vari tipi di cellule del connettivo. Colora i nuclei in viola con l'ematossilina ed il citoplasma in rosso più o meno vivo con la fucsina acida. La colorazione è stata effettuata automaticamente utilizzando lo strumento di colorazione BenchMark Special Stains system (*Roche Diagnostic*) e l'apposito kit di colorazione.

La colorazione istochimica Weigert Van Gieson è stata effettuata sui tessuti del progetto 2 per valutare la presenza di elastina in quanto tale colorazione permette di identificare le fibre elastiche su sezioni istologiche. Il metodo si basa sull'affinità per le fibre elastiche del colorante ottenuto facendo reagire resorcina e fucsina basica in presenza di ferro percloruro. L'elettività del metodo non è assoluta, altre strutture quali collagene e membrane basali possono colorarsi; è quindi importante una accurata differenziazione per ottenere una colorazione marcata e selettiva delle fibre elastiche. Anche questa colorazione è stata effettuata automaticamente utilizzando lo strumento di colorazione BenchMark Special Stains system (*Roche Diagnostic*) e l'apposito kit di colorazione.

Colorazioni immunoistochimiche

L'immunoistochimica è una tecnica di laboratorio “gold standard” permette di individuare, in situ, specifiche molecole o strutture del compartimento intra ed extra cellulare (antigeni tissutali). La tecnica si basa sul principio di coniugazione antigene-anticorpo, il cui legame è altamente specifico. I reagenti che vengono utilizzati comprendono:

- una sonda, rappresentata da un anticorpo monoclonale o policlonale, che si ottiene da animali da laboratorio che sono solitamente conigli,

capre o topi, opportunamente immunizzati. In particolare, gli anticorpi monoclonali sono immunoglobuline specifiche, dirette nei confronti di un singolo epitopo dell'antigene; invece, gli anticorpi policlonali sono immunoglobuline dirette nei confronti di diversi epitopi di uno stesso antigene.

- un sistema di rivelazione, che consiste in una sostanza legata all'anticorpo (un cromogeno fluorescente o un enzima in grado di modificare un cromogeno) che permetta di evidenziare al microscopio l'avvenuta reazione anticorpo-antigene nelle cellule o nel tessuto in esame.

Nel progetto 1 è stata eseguita la colorazione immunoistochimica specifica per la proliferazione cellulare utilizzando l'antigene Ki67, una proteina nucleare strettamente associata con la proliferazione cellulare che può essere riscontrato esclusivamente all'interno del nucleo durante tutte le fasi del ciclo cellulare (G1, S, G2, mitosi) ma non durante la fase G0. Per tale motivo il Ki-67 rappresenta un utile marker di proliferazione di una data popolazione cellulare. La positività della colorazione è evidenziata con una colorazione bruna del nucleo cellulare su sfondo azzurro.

RISULTATI

Risultati del Progetto 1

È stata dimostrata l'efficacia della quercitina dal punto di vista della conservazione del tessuto e del miglioramento delle sue proprietà rigenerative. Gli innesti di membrana amniotica sono stati conservati utilizzando un protocollo di criopreservazione o di congelamento in presenza o meno di quercitina, quindi è stata testata la loro integrità strutturale immediatamente dopo lo scongelamento.

Come mostrato nella *Figura 4*, la membrana amniotica trattata con quercitina (+Q) e conservata con protocollo di criopreservazione (CP-1) o congelamento (FP-2) presenta un'integrità paragonabile al tessuto conservato con gli stessi protocolli ma non trattato. Il risultato (*Figura 12*) dimostra quindi che la quercitina non influenza l'integrità strutturale del tessuto membrana amniotica durante la sua azione antiossidante e rigenerativa.

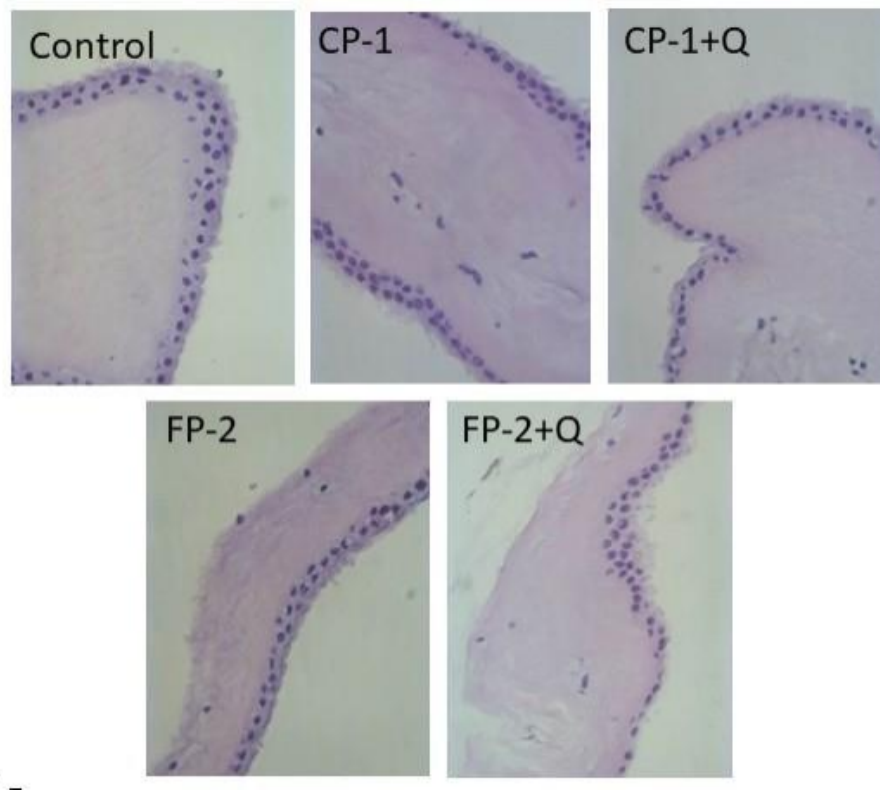


Figura 12 Valutazione istologica immediatamente dopo lo scongelamento di membrana amniotica conservata con protocollo di crioconservazione 1 (CP-1) (pannello superiore, centrale) o con CP-1 in presenza di quercitina (CP-1 + Q, pannello in alto a destra) e membrana amniotica conservata con protocollo di congelamento 2 (FP-2) (in basso, pannello sinistro) o con FP-2 in presenza di quercitina (FP-2 + Q, pannello in basso a destra). Come controllo è stata utilizzata membrana amniotica non trattata e non conservata (pannello superiore sinistro).

Considerando che la vitalità cellulare, valutata mediante test MTT (dati non mostrati) (Purpura et al. 2022), è risultata leggermente, ma significativamente aumentata dopo l'aggiunta di quercitina sui tessuti trattati con protocollo di congelamento CP-1 ed FP-2, abbiamo voluto valutare istologicamente se tale aumento fosse correlato ad una maggiore proliferazione cellulare. L'analisi della capacità proliferativa della

membrana amniotica è stata quindi valutata mediante l'espressione dell'antigene nucleare Ki67 in metodica immunohistochimica (*Figura 13*), evidenziando l'assenza di proliferazione cellulare, e quindi l'assenza di cellule nelle fasi G1, S, G2, mitosi, in tutti i campioni biologici analizzati.

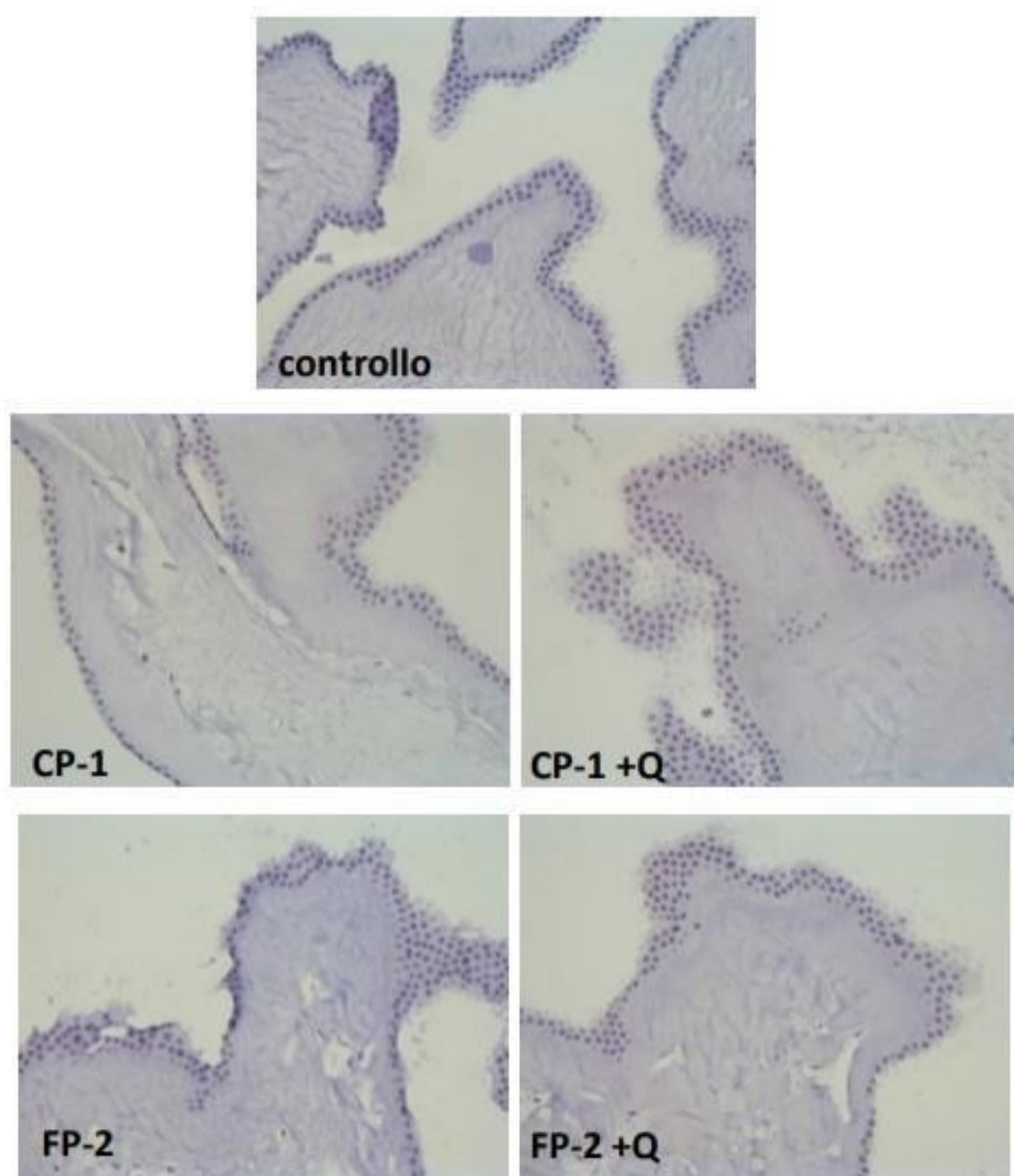


Figura 13 Valutazione immunoistochimica immediatamente dopo lo scongelamento di membrana amniotica conservata con protocollo di crioconservazione 1 o con CP-1 in presenza di quercitina (rispettivamente CP-1 e CP-1 + Q, pannello centrale) e membrana amniotica conservata con protocollo di congelamento 2 o con FP-2 in presenza di quercitina (rispettivamente FP-2 e FP-2 + Q, pannello in basso). Come controllo è stata utilizzata membrana amniotica non trattata e non conservata (pannello superiore).

Risultati del Progetto 2

Il derma decellularizzato sottoposto a soluzione di conservazione a temperatura ambiente presso la Banca Cute RER è stato confrontato dal punto di vista morfologico/strutturale con il Derma Decellularizzato conservato con protocollo standard di congelamento in vapori di azoto.

Dalla colorazione istologica con ematossilina eosina emerge che la struttura tissutale del Derma Dec si mantiene integra rispetto al controllo non trattato, sia dopo 1 anno, sia dopo 2 anni di conservazione in soluzione a temperatura ambiente (*Figura 14*).

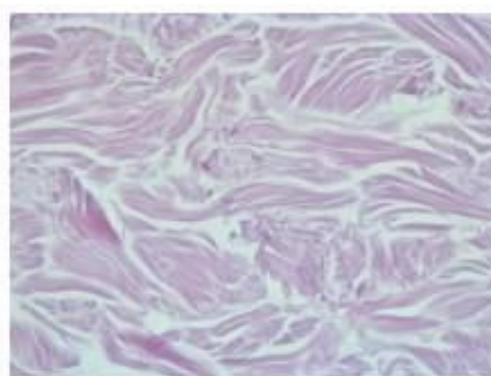
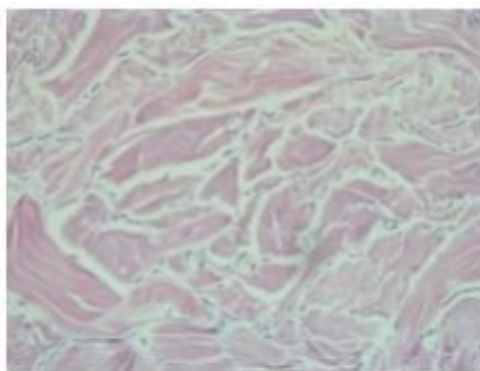


Figura 14 Valutazione istologica con colorazione Ematossilina-Eosina dei campioni di derma decellularizzato trattati con soluzione di conservazione a temperatura ambiente per 1 anno (foto in basso a sinistra) e 2 anni (foto in basso a destra). Come controllo è stato valutato un campione di derma decellularizzato conservato con protocollo standard di congelamento in vapori di azoto (in alto).

Dalla colorazione con la tricromica di Masson si valutano le fibre di collagene, anch'esse mantenute (*Figura 15*).

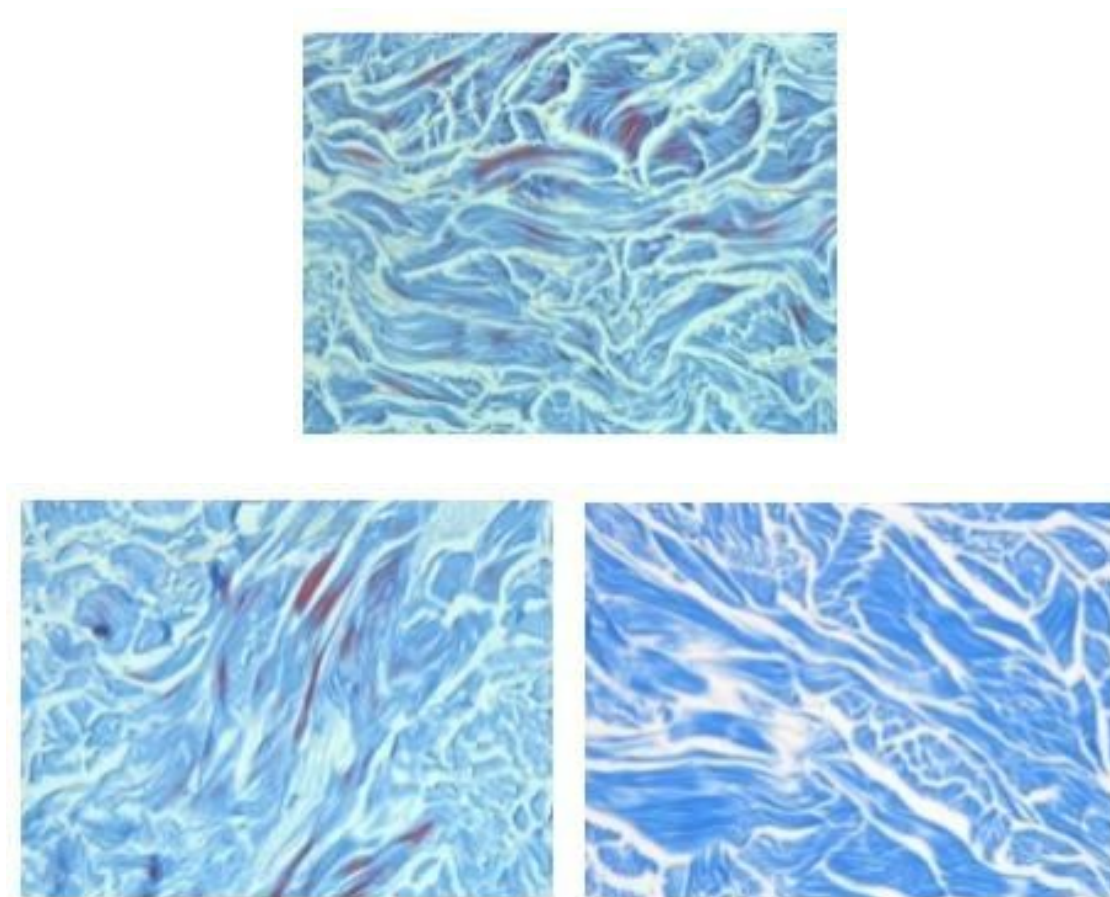


Figura 15 *Valutazione istologica con colorazione Tricromica di Masson dei campioni di derma decellularizzato trattati con soluzione di conservazione a temperatura ambiente per 1 anno (foto in basso a sinistra) e 2 anni (foto in basso a destra). Come controllo è stato valutato un campione di derma decellularizzato conservato con protocollo standard di congelamento in vapori di azoto (in alto).*

Le fibre elastiche, invece, già dopo un anno di conservazione del Derma Dec in soluzione a temperatura ambiente, sono totalmente perse dopo 1-2 anni di conservazione rispetto al tessuto criopreservato (*Figura 16*).

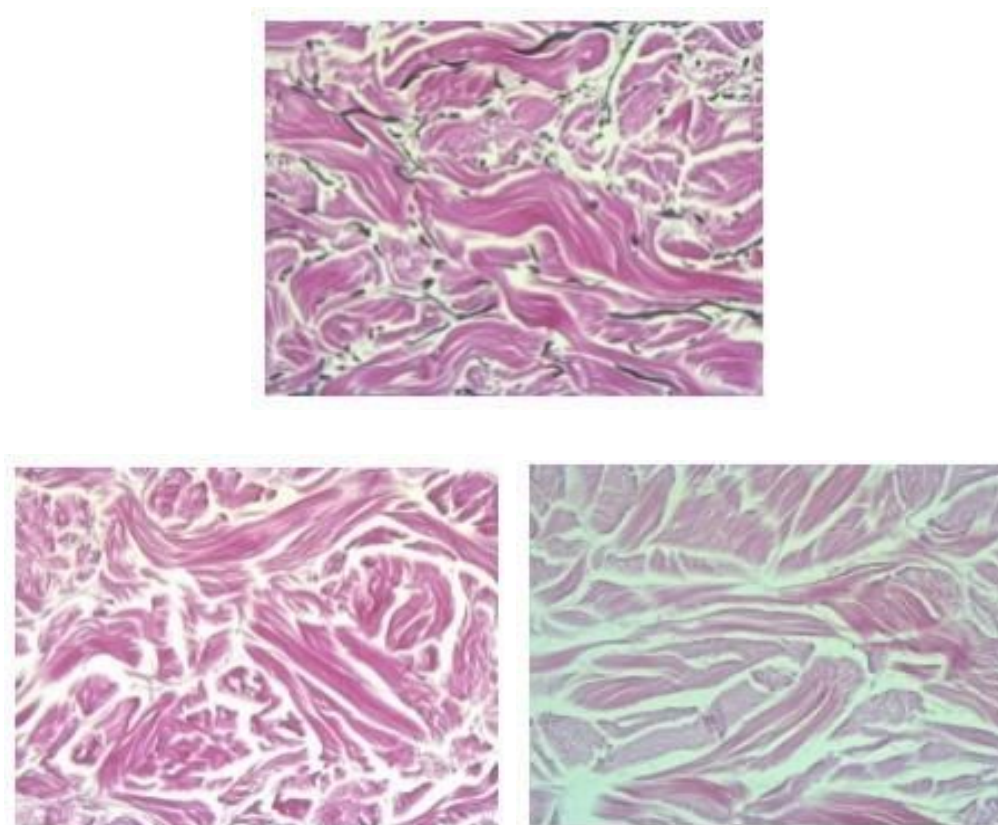


Figura 16 Valutazione istologica con colorazione Weigert Van Gieson dei campioni di derma decellularizzato trattati con soluzione di conservazione a temperatura ambiente per 1 anno (foto in basso a sinistra) e 2 anni (foto in basso a destra). Come controllo è stato valutato un campione di derma decellularizzato conservato con protocollo standard di congelamento in vapori di azoto (in alto).

Risultati del Progetto 3

La metodica di decellularizzazione sviluppata presso la Banca Cute RER è capace di rimuovere totalmente la componente cellulare dal tessuto membrana amniotica, mantenendo una buona integrità strutturale rispetto al tessuto di partenza (*Figura 17*) dopo la crioconservazione in vapori di azoto con un calo graduale e programmato della temperatura fino a -145 °C o il congelamento e la conservazione immediata a -80 °C).

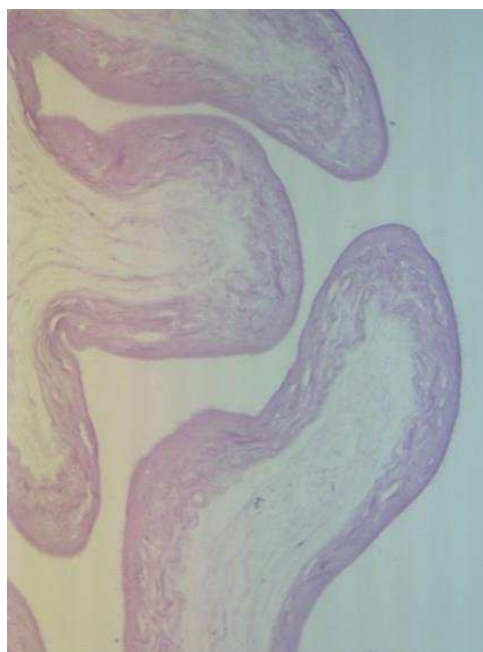
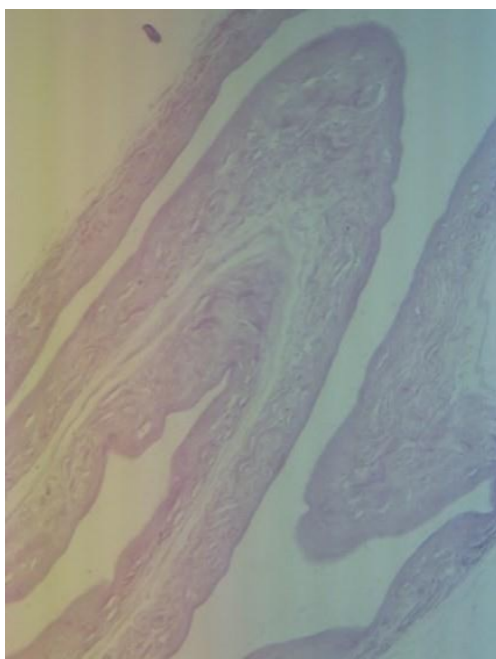
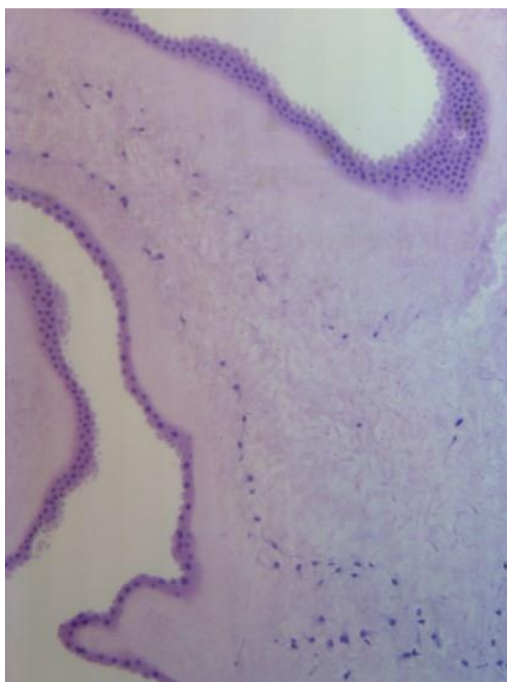


Figura 17. Valutazione istologica con colorazione Ematossilina-Eosina dei campioni di membrana amniotica decellularizzata e crioconservata in vapori di azoto con un calo graduale e programmato della temperatura fino a $-145\text{ }^{\circ}\text{C}$ (in basso a sinistra) o congelata e conservata immediatamente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (in basso a destra). Come controllo è stato valutato un campione di membrana amniotica non trattata e non congelata (in alto).

La membrana amniotica decellularizzata con la nuova metodica di decellularizzazione mantiene l'organizzazione in fasci delle fibre collagene paragonabile al campione non trattato (*Figura 18*), in accordo anche con i dati della letteratura sulla conservazione delle componenti della membrana basale, tra cui collagene IV e collagene VII dopo conservazione della membrana amniotica ma senza decellularizzazione. (*Thomasen, et al.2011*).

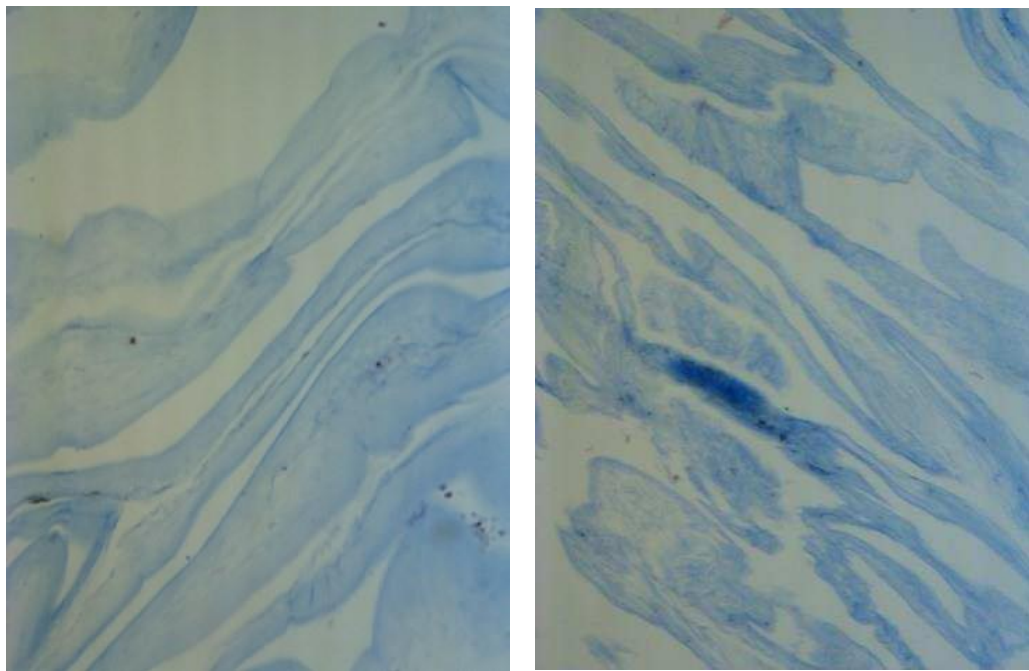
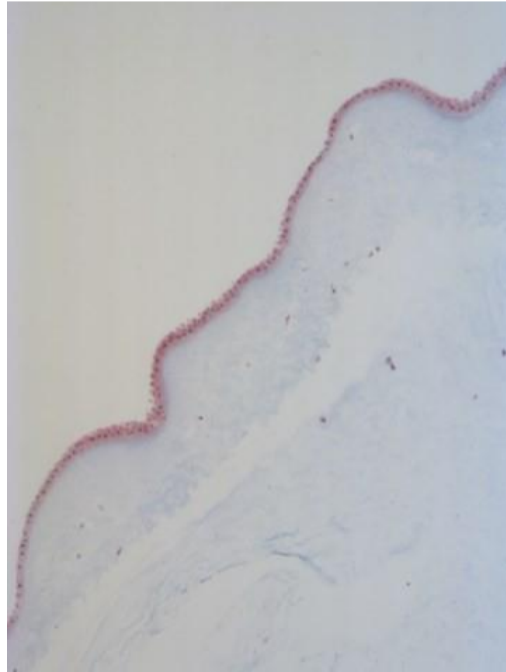


Figura 18. Valutazione istologica con colorazione istochimica tricromica di Masson dei campioni di membrana amniotica decellularizzati e criopreservati in vapori di azoto con un calo graduale e programmato della temperatura fino a $-145\text{ }^{\circ}\text{C}$ (foto in basso a sinistra) o congelati e conservati immediatamente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (foto in basso a destra). Come controllo è stato valutato un campione di membrana amniotica non trattata e non congelata (in alto).

DISCUSSIONE

PROGETTO 1:

L'utilizzo della membrana amniotica a scopo trapiantologico richiede un metodo di conservazione che preservi il più possibile le caratteristiche biologiche del tessuto. Crioconservazione e congelamento sono metodi già consolidati nell'ambito della conservazione dei tessuti ed evidenziano buone proprietà di mantenimento dei tessuti trapiantabili (*Gholipourmalekabadi et al., 2020; Hopkinson et al., 2006; Barrientos et al., 2008*). Tuttavia, in entrambi i metodi il passaggio di scongelamento del tessuto (da -145°C o -80°C a temperatura ambiente) prima dell'uso clinico porta a stress ossidativo all'interno delle cellule, come già identificato per diversi campioni biologici umani (*Len et al. 2019*). Per sfruttare le proprietà della membrana amniotica riducendo la produzione di ROS dopo la crioconservazione o il congelamento, abbiamo effettuato in studi precedenti un trattamento con quercitina sui campioni di membrana amniotica prima della loro crioconservazione o congelamento. La selezione della quercitina come antiossidante è stata effettuata sulla base di prove di efficacia a bassa concentrazione ($50\ \mu\text{M}$), come riportato in letteratura da studi su altri

campioni biologici (*Zribi et al., 2012; Cheraghi et al., 2021*), come gli spermatozoi umani (*Kumar et al., 2019; Gualtieri et al., 2021, Taylor et al., 2009*).

Sono state quindi scelte le basse concentrazioni, preferibili a scopo clinico per evitare i potenziali effetti tossici. Nonostante l'utilizzo della quercitina abbia dimostrato un miglioramento delle proprietà antiossidanti della membrana amniotica umana criopreservata e congelata, i risultati dell'analisi istologica descritti in questa tesi (*Figura 12*) forniscono l'importante evidenza che il trattamento con la quercitina non influisce sulle proprietà strutturali dei campioni di membrana amniotica, favorendone ulteriormente un potenziale utilizzo clinico. Inoltre, i risultati dell'analisi immunoistochimica (*Figura 13*) dimostrano come le cellule, nonostante mantengano in parte la loro vitalità anche dopo crioconservazione e congelamento, non risultino essere proliferanti, condizione vantaggiosa per un utilizzo in ambito clinico trapiantologico del tessuto.

PROGETTO 2:

Questo progetto ha preso spunto dall'interesse crescente per gli scaffold biologici utilizzati nell'ambito della Medicina Rigenerativa, costituiti da matrice dermica extracellulare (ECM) cell-free, ovvero priva di cellule,

ottenuti mediante l'applicazione di una metodica di decellularizzazione su derma di origine umana (Bondioli et al., 2014). Attualmente, la Banca Cute RER produce e distribuisce Derma decellularizzato, un bioprodotto di derivazione cutanea e di origine umana ottenuto mediante l'applicazione sul tessuto di una metodica di decellularizzazione sviluppata e brevettata presso la Banca stessa. A differenza dei polimeri sintetici, il Derma decellularizzato prodotto e distribuito dalla Banca Cute RER non è solo un supporto meccanico al sito di riparazione, ma anche uno stimolo biologico/rigenerativo per il processo di guarigione delle ferite, capace di favorire la rivascularizzazione e proliferazione cellulare nella regione lesa, grazie alla presenza di numerose molecole bioattive native della ECM (Aurora et al., 2007; Derwin et al., 2006; Reing et al., 2009; Song et al., 2010). Diverse molecole e fattori di crescita (GFs) modulano infatti la guarigione dei tessuti stimolando la migrazione, l'adesione, la proliferazione, l'angiogenesi ed il differenziamento cellulare (Aurora et al., 2007). Inoltre, le molecole prodotte dalla degradazione degli scaffold biologici, che si verifica durante il processo di rimodellamento tissutale, sembrano stimolare il reclutamento e la proliferazione di specifici tipi cellulari ed avere azione antimicrobica (Badylak, 2005; Beattie et al., 2009; Brennan et al., 2006). Un ulteriore vantaggio del derma decellularizzato è l'assenza di componente

cellulare che, di conseguenza, non determina il rigetto del tessuto una volta applicato sul paziente ricevente. Per questo motivo, le applicazioni cliniche di tale tessuto sono numerose e in quasi tutti gli ambiti clinici (*Brown et al., 2010; Soler et al., 2007*).

Per quanto riguarda l'ortopedia e la traumatologia, il derma decellularizzato è un'impalcatura tridimensionale ideale per la ricostruzione della cuffia dei rotatori della spalla e del tendine di Achille (*Aurora et al., 2007; Rotini et al., 2011*). È stato infatti dimostrato che il Derma Decellularizzato ha caratteristiche biomeccaniche superiori al tessuto di partenza (*Bondioli et al., 2014; Barber et al., 2006*). In dermatologia trova applicazione come scaffold biologico per la copertura di ulcere cutanee croniche o ferite difficili a pieno spessore (*Bondioli et al., 2019*). È utilizzato anche in vari ambiti della chirurgia: in chirurgia ricostruttiva attualmente viene sfruttato per ricostruire la parete addominale, in particolare per interventi di laparocoele (*Ghetti et al., 2017*) e in chirurgia senologica per la ricostruzione mammaria in seguito a mastectomia (*Folli et al., 2018*). Altri ambiti in cui il derma decellularizzato trova applicazione sono l'odontoiatria per la ricostruzione dei tessuti molli e l'oculistica, per l'allungamento palpebrale inferiore. Ad oggi, l'uso del Derma Decellularizzato non è stato mai associato ad effetti collaterali nei diversi ambiti di applicazione clinica (*Kokkalis et al., 2009; Lee, 2007; Liden*

e Simmons, 2009; Snyder et al., 2009; Walton et al., 2007; Wong et al., 2010). Il Derma Decellularizzato prodotto e distribuito dalla Banca Cute RER viene attualmente conservato alla temperatura criogenica di -145 °C (vapori di azoto); di conseguenza, il tessuto deve essere scongelato dal personale della Banca Cute RER prima della sua distribuzione. Nonostante la metodica di crioconservazione risulti ottimale per il mantenimento delle caratteristiche strutturali del tessuto, si è reso necessario lo sviluppo di una metodica di conservazione che ne permettesse una disponibilità *ready to use*, ovvero pronta all'uso clinico immediato. Il tessuto criopreservato, infatti, non è disponibile per interventi in condizioni di urgenza ed emergenza e per di più, nel caso in cui non ci sia più la necessità del trapianto tissutale (per impossibilità di effettuare l'intervento sia per condizioni logistiche, sia per patologie del paziente), il tessuto scongelato non può più essere ricongelato e deve essere inevitabilmente smaltito entro tre giorni dallo scongelamento. A tale scopo, la conservazione a temperatura ambiente risulta ottimale in quanto permette di conservare il tessuto presso la struttura richiedente anche qualche giorno prima dell'intervento chirurgico senza comprometterne le caratteristiche. Un ulteriore vantaggio di tale metodica è la possibilità di distribuire il tessuto ancora sigillato all'interno del suo contenitore, in modo tale che venga prelevato e utilizzato solo in seguito a evidenza clinica

evitando, di conseguenza, il suo smaltimento in tutti quei casi in cui il tessuto non risulti necessario all'ultimo momento. Inoltre, la struttura richiedente potrebbe facilmente mantenere uno stoccaggio del Derma decellularizzato, considerando che le sue condizioni di stoccaggio possono essere facilmente soddisfatte. Al contrario, lo stoccaggio del tessuto criopreservato è difficile da effettuare nei centri di trapianto, principalmente ospedali, in quanto prevede l'utilizzo di azoto liquido. La manipolazione di azoto liquido, infatti, comporta costi organizzativo/strutturali, la disponibilità di criocontenitori adatti e una specifica formazione del personale all'utilizzo di dispositivi di protezione individuale resistenti alle basse temperature, ai fini di evitare gravi ustioni da freddo. Per tutte queste motivazioni è nata l'esigenza di una conservazione del tessuto a temperatura ambiente, per renderlo "ready to use" nel caso di immediata necessità trapiantologica ed interventi in urgenza, non sottovalutando anche il vantaggio sotto il punto di vista economico.

I risultati delle analisi istologiche effettuate dopo 1 e 2 anni di conservazione in soluzione a temperatura ambiente forniscono l'importante evidenza che questa nuova modalità di conservazione permette di mantenere buone caratteristiche collageniche del tessuto. Dall'altro lato, le colorazioni specifiche per le fibre elastiche hanno identificato l'assenza di elastina dopo 1 e 2 anni di conservazione in soluzione, dando l'importante indicazione

clinica al non utilizzo di tale tessuto per applicazioni in ambiti, quale l'ortopedico, in cui le proprietà meccaniche devono essere garantite.

PROGETTO 3:

Le tecniche di decellularizzazione influenzano fortemente la biocompatibilità del tessuto trapiantabile. In letteratura sono descritte numerose tecniche di decellularizzazione (*Crapo et al., 2011*) che prevedono l'utilizzo di sostanze chimiche (acido peracetico, sodio dodecilsolfato, Triton X-100-200, alcoli, solventi), agenti biologici (cioè tripsina, collagenasi, nucleasi, lipasi, dispasi) e agenti fisici (gelo-disgelo, pressione idrostatica, elettroporazione), da soli o in combinazione (*Crapo et al., 2011; Gratzer et al., 2006; Lumpkins et al., 2008; Narita et al., 2008; Ota et al., 2007; Rosario et al., 2008; Stapleton and Ingram, 2008; Wilshaw et al., 2006*). Una tecnica di decellularizzazione ideale dovrebbe prevedere un equilibrio tra la rimozione cellulare e l'integrità strutturale/biologica del tessuto, tenendo in considerazione le caratteristiche del tessuto trattato e dando un prodotto atossico, biocompatibile e immunotollerato (*Crapo et al., 2011*). Partendo dalle competenze già consolidate della Banca Cute RER, ed in particolare dall'*expertise* della Dott.ssa Bondioli e del Prof. Melandri nello

sviluppo di una metodica di decellularizzazione del derma umano (*Bondioli et al., 2014*) già validate in ambito clinico, abbiamo sviluppato un protocollo di decellularizzazione che fosse specifico per la membrana amniotica. Anche in questo caso, l'analisi istologica ha fornito un importante contributo alla valutazione del tessuto decellularizzato, dimostrando la totale rimozione della componente cellulare ed il mantenimento della struttura architettonica e fibrocollagenica caratterizzante il tessuto.

CONCLUSIONE

L'analisi istologica effettuata nei tre progetti portati a termine in parallelo presso la Banca Cute RER è risultata di notevole rilevanza nella valutazione dei nuovi protocolli sperimentali finalizzati all'implementazione dell'attività clinica, permettendo di confermare le caratteristiche e gli eventuali ambiti di applicazione clinica dei tessuti testati, al fine di migliorare l'efficacia clinica del trapianto.

La morfologia tessutale, infatti, è una caratteristica fondamentale per valutare la qualità di un tessuto trapiantabile e, di conseguenza, la sua potenziale efficacia clinica.

La stretta collaborazione tra la Banca Cute RER e la U.O. di Anatomia Patologica dell'Ospedale "M. Bufalini" di Cesena è quindi da considerarsi un prezioso e fondamentale contributo per l'implementazione dell'attività clinica promossa dalla Banca Cute RER mediante lo sviluppo di protocolli sperimentali innovativi.

BIBLIOGRAFIA

- Aurora, A., McCarron, J., Iannotti, J. P., & Derwin, K. (2007). *Commercially available extracellular matrix materials for rotator cuff repairs: state of the art and future trends*. *Journal of shoulder and elbow surgery*, 16(5), S171-S178.
- Azuara-Blanco, A., Pillai, C. T., & Dua, H. S. (1999). *Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction*. *British Journal of Ophthalmology*, 83(4), 399-402.
- Badylak, S. F. (2005). *Regenerative medicine and developmental biology: the role of the extracellular matrix*. *The Anatomical Record Part B: The New Anatomist: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 287(1), 36-41.
- Barber, F. A., Herbert, M. A., & Coons, D. A. (2006). *Tendon augmentation grafts: biomechanical failure loads and failure patterns*. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 22(5), 534-538.
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., & Tomic-Canic, M. (2008). *Growth factors and cytokines in wound healing*. *Wound repair and regeneration*, 16(5), 585-601.
- Battaglini, G., Guadalascara, F., & Monteleone, G. (2019). *Il prelievo delle cellule staminali mesenchimali dal tessuto adiposo*. *LO SCALPELLO-OTODI Educational*, 33(3), 253-257.
- Beattie, A. J., Gilbert, T. W., Guyot, J. P., Yates, A. J., & Badylak, S. F. (2009). *Chemoattraction of progenitor cells by remodeling extracellular matrix scaffolds*. *Tissue Engineering Part A*, 15(5), 1119-1125.
- Bondioli, E., Purpura, V., Orlandi, C., Carboni, A., Minghetti, P., Cenacchi, G., ... & Melandri, D. (2019). *The use of an acellular matrix derived from human dermis for the treatment of full-thickness skin wounds*. *Cell and tissue banking*, 20, 183-192.

- Bondioli, E., Fini, M., Veronesi, F., Giavaresi, G., Tschon, M., Cenacchi, G., ... & Melandri, D. (2014). *Development and evaluation of a decellularized membrane from human dermis*. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 8(4), 325-336.
- Brennan, E. P., Reing, J., Chew, D., Myers-Irvin, J. M., Young, E. J., & Badylak, S. F. (2006). *Antibacterial activity within degradation products of biological scaffolds composed of extracellular matrix*. *Tissue engineering*, 12(10), 2949-2955.
- Brown, B. N., Barnes, C. A., Kasick, R. T., Michel, R., Gilbert, T. W., Beer-Stolz, D., ... & Badylak, S. F. (2010). *Surface characterization of extracellular matrix scaffolds*. *Biomaterials*, 31(3), 428-437.
- Castelnuovo, G., Menici, R., Fedi, M., Tanini, M., Bani, A., & Nuzzi, F. M. (2011). *Il prelievo degli annessi fetali a scopo di trapianto*. La donazione in Italia: Situazione e prospettive della donazione di sangue, organi, tessuti, cellule e midollo osseo, 107-113.
- Cheraghi, E., Sajadi, S. M. S., & Soleimani Mehranjani, M. (2021). *The effect of Quercetin on the quality of sperm parameters in frozen-thawed semen of patients with Asthenospermia*. *Andrologia*, 53(9), e14167.
- Cho, K. H., Ahn, H. T., Park, K. C., Chung, J. H., Kim, S. W., Sung, M. W., ... & Youn, J. I. (2000). *Reconstruction of human hard-palate mucosal epithelium on de-epidermized dermis*. *Journal of dermatological science*, 22(2), 117-124.
- Combi, A., Gastaldi, G., & Benazzo, F. (2011). *Cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo per la medicina rigenerativa in campo ortopedico*. *Bollettino della Società Medico Chirurgica di Pavia*, 124(2), 293-306.
- Crapo, P. M., Gilbert, T. W., & Badylak, S. F. (2011). *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*. *Biomaterials*, 32(12), 3233-3243.
- Derwin, K. A., Baker, A. R., Spragg, R. K., Leigh, D. R., & Iannotti, J. P. (2006). *Commercial extracellular matrix scaffolds for rotator cuff tendon repair: biomechanical, biochemical, and cellular properties*. *JBJS*, 88(12), 2665-2672.

- Duan-Arnold, Y., Gyurdieva, A., Johnson, A., Uveges, T. E., Jacobstein, D. A., & Danilkovitch, A. (2015). Retention of endogenous viable cells enhances the anti-inflammatory activity of cryopreserved amnion. *Advances in wound care*, 4(9), 523-533.
- Fernandes, M., Sridhar, M. S., Sangwan, V. S., & Rao, G. N. (2005). *Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction*. *Cornea*, 24(6), 643-653.
- Folli, S., Curcio, A., Melandri, D., Bondioli, E., Rocco, N., Catanuto, G., ... & Marongiu, F. (2018). *A new human-derived acellular dermal matrix for breast reconstruction available for the European market: preliminary results*. *Aesthetic Plastic Surgery*, 42, 434-441.
- Ghetti M., Bondioli E., Purpura V., Cenacchi G., Ruscelli P. & Melandri D. (2017) *Decellularized human dermal matrix produced by a skin bank: a new treatment for abdominal wall defects*. *Annal Ital Chir*, 5: 443-448
- Gholipourmalekabadi, M., Farhadhosseinabadi, B., Faraji, M., & Nourani, M. R. (2020). *How preparation and preservation procedures affect the properties of amniotic membrane? How safe are the procedures?.* *Burns*, 46(6), 1254-1271
- Gratzer, P. F., Harrison, R. D., & Woods, T. (2006). *Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix*. *Tissue engineering*, 12(10), 2975-2983.
- Gualtieri, R., Kalthur, G., Barbato, V., Di Nardo, M., Adiga, S. K., & Talevi, R. (2021). *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress caused by cryopreservation in reproductive cells*. *Antioxidants*, 10(3), 337.
- Hopkinson, A., McIntosh, R. S., Shanmuganathan, V., Tighe, P. J., & Dua, H. S. (2006). *Proteomic analysis of amniotic membrane prepared for human transplantation: characterization of proteins and clinical implications*. *Journal of proteome research*, 5(9), 2226-2235.
- Kar, I. B., Singh, A. K., Mohapatra, P. C., Mohanty, P. K., & Misra, S. (2014). *Repair of oral mucosal defects with cryopreserved human amniotic membrane grafts: prospective clinical study*. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 43(11), 1339-1344.

- Kumar, A., Prasad, J. K., Srivastava, N., & Ghosh, S. K. (2019). *Strategies to minimize various stress-related freeze–thaw damages during conventional cryopreservation of mammalian spermatozoa*. *Biopreservation and Biobanking*, 17(6), 603-612
- Lee, D. K. (2007). *Achilles tendon repair with acellular tissue graft augmentation in neglected ruptures*. *The Journal of foot and ankle surgery*, 46(6), 451-455.
- Liden, B. A., & Simmons, M. (2009). *Histologic evaluation of a 6-month GraftJacket matrix biopsy used for Achilles tendon augmentation*. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, 99(2), 104-107.
- Lumpkins, S. B., Pierre, N., & McFetridge, P. S. (2008). *A mechanical evaluation of three decellularization methods in the design of a xenogeneic scaffold for tissue engineering the temporomandibular joint disc*. *Acta biomaterialia*, 4(4), 808-816.
- Len, J. S., Koh, W. S. D., & Tan, S. X. (2019). *The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation*. *Bioscience reports*, 39(8).
- Melandri D, Purpura V, Orlandi C, Minghetti P, Bondioli E. “*Skin Regeneration*” Società Editrice Esculapio (2020) Libro: “Stem Cells, Capitolo 11
- Mingazzini, P., Del Bene, M., & Rovati, L. (2010). *Autotrapianto di Cellule Staminali da Tessuto Adiposo per il trattamento dell’Ulcera Diabetica–Comunicazione Preliminare*. *Il Bassini*, 30(2), 21-23.
- Moffa, F., da Colcavagno, A. B., & Ricci, E. (2018). *Utilizzo di staminali da tessuto adiposo nelle lesioni cutanee croniche: esperienza clinica/Use of adipose tissue stem cells in chronic skin lesions: clinical experience*. *Italian Journal of Wound Care*, 2(2).
- Narita, Y., Kagami, H., Matsunuma, H., Murase, Y., Ueda, M., & Ueda, Y. (2008). *Decellularized ureter for tissue-engineered small-caliber vascular graft*. *Journal of Artificial Organs*, 11, 91-99.
- Niknejad, H., Peirovi, H., Jorjani, M., Ahmadiani, A., Ghanavi, J., & Seifalian, A. M. (2008). *Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering*. *Eur Cells Mater*, 15, 88-99.

- Ota, T., Taketani, S., Iwai, S., Miyagawa, S., Furuta, M., Hara, M., ... & Sawa, Y. (2007). *Novel method of decellularization of porcine valves using polyethylene glycol and gamma irradiation*. *The Annals of thoracic surgery*, 83(4), 1501-1507.
- Purpura, V., Benedetti, S., Bondioli, E., Scarpellini, F., Giacometti, A., Albertini, M. C., & Melandri, D. (2022). *The Use of Quercetin to Improve the Antioxidant and Regenerative Properties of Frozen or Cryopreserved Human Amniotic Membrane*. *Antioxidants*, 11(7), 1250.
- Reing, J. E., Zhang, L., Myers-Irvin, J., Cordero, K. E., Freytes, D. O., Heber-Katz, E., ... & Badylak, S. F. (2009). *Degradation products of extracellular matrix affect cell migration and proliferation*. *Tissue Engineering Part A*, 15(3), 605-614.
- Rosario, D. J., Reilly, G. C., Ali Salah, E., Glover, M., Bullock, A. J., & MacNeil, S. (2008). *Decellularization and sterilization of porcine urinary bladder matrix for tissue engineering in the lower urinary tract.*, *regenerative medicine VOL. 3, NO. 2 Future Medicine*
- Rotini, R., Marinelli, A., Guerra, E., Bettelli, G., Castagna, A., Fini, M., ... & Busacca, M. (2011). *Human dermal matrix scaffold augmentation for large and massive rotator cuff repairs: preliminary clinical and MRI results at 1-year follow-up*. *Musculoskeletal surgery*, 95, 13-23.
- Sangwan, V. S., Burman, S., Tejwani, S., Mahesh, S. P., & Murthy, R. (2007). *Amniotic membrane transplantation: a review of current indications in the management of ophthalmic disorders*. *Indian journal of ophthalmology*, 55(4), 251-260.
- Snyder, S. J., Arnoczky, S. P., Bond, J. L., & Dopirak, R. (2009). *Histologic evaluation of a biopsy specimen obtained 3 months after rotator cuff augmentation with GraftJacket Matrix*. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 25(3), 329-333.
- Soler, J. A., Gidwani, S., & Curtis, M. J. (2007). *Early complications from the use of porcine dermal collagen implants (Permacol™) as bridging constructs in the repair of massive rotator cuff tears. A report of 4 cases*. *Acta Orthopaedica Belgica*, 73(4), 432.

- Song, L., Olsen, R. E., Spalazzi, J. P., & Davisson, T. (2010). *Biomechanical evaluation of acellular collagen matrix augmented Achilles tendon repair in sheep*. *The Journal of foot and ankle surgery*, 49(5), 438-441
- Stapleton, T. W., Ingram, J., Katta, J., Knight, R., Korossis, S., Fisher, J., & Ingham, E. (2008). *Development and characterization of an acellular porcine medial meniscus for use in tissue engineering*. *Tissue Engineering Part A*, 14(4), 505-518.
- Taylor, K., Roberts, P., Sanders, K., & Burton, P. (2009). Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. *Reproductive biomedicine online*, 18(2), 184-189.
- Thavarajah, R., Mudimbaimannar, V. K., Elizabeth, J., Rao, U. K., & Ranganathan, K. (2012). *Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation*. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*, 16(3), 400.
- Thomasen, H., Pauklin, M., Noelle, B., Geerling, G., Vetter, J., Steven, P., Steuhl, K. P., & Meller, D. (2011). *The effect of long-term storage on the biological and histological properties of cryopreserved amniotic membrane*. *Current eye research*, 36(3), 247–255.
- Walton, J. R., Bowman, N. K., Khatib, Y., Linklater, J., & Murrell, G. A. (2007). *Restore orthobiologic implant: not recommended for augmentation of rotator cuff repairs*. *JBJS*, 89(4), 786-791.
- Werber, B., & Martin, E. (2013). *A prospective study of 20 foot and ankle wounds treated with cryopreserved amniotic membrane and fluid allograft*. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*, 52(5), 615-621.
- Wilshaw, S. P., Kearney, J. N., Fisher, J., & Ingham, E. (2006). *Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering*. *Tissue engineering*, 12(8), 2117-2129.
- Wong, I., Burns, J., & Snyder, S. (2010). *Arthroscopic GraftJacket repair of rotator cuff tears*. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, 19(2), 104-109.
- Zribi, N., Chakroun, N. F., Abdallah, F. B., Elleuch, H., Sellami, A., Gargouri, J., ... & Keskes, L. A. (2012). *Effect of freezing–thawing process*

and quercetin on human sperm survival and DNA integrity. Cryobiology,
65(3), 326-331.

RIFERIMENTI LEGISLATIVI

D. Lgs 30/06/03, n. 196 Codice in materia di protezione dei dati personali ((, recante disposizioni per l'adeguamento dell'ordinamento nazionale al regolamento (UE) n. 2016/679 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 27 aprile 2016, relativo alla protezione delle persone fisiche con riguardo al trattamento dei dati personali, nonché alla libera circolazione di tali dati e che abroga la direttiva 95/46/CE)).

D.Lgs. 25/01/10 n.16 Attuazione delle direttive 2006/17/CE e 2006/86/CE, che attuano la direttiva 2004/23/CE

D.Lgs. 30/05/12 n.85 Modifiche ed integrazioni al decreto legislativo 25 gennaio 2010, n.16, recante attuazione delle direttive 2006/17/CE e 2006/86/CE, che attuano la direttiva 2004/23/CE

D.Lgs. 6/11/07 n. 191 Attuazione della direttiva 2004/23/CE

DECRETO 16 dicembre 1998 “Determinazione delle modalità di versamento in tesoreria provinciale dello Stato delle somme riscosse dagli uffici periferici del Dipartimento del territorio e di approvazione delle convenzioni con gli intermediari bancari.”

D.Lgs 9 aprile 2008, n. 81 Attuazione dell'articolo 1 della legge 3 agosto 2007, n. 123, in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro.

DIRETTIVA 2004/23/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 31 marzo 2004

DIRETTIVA 2006/17/CE DELLA COMMISSIONE dell'8 febbraio 2006 che attua la direttiva 2004/23/CE del Parlamento europeo e del Consiglio

DIRETTIVA 2012/39/UE DELLA COMMISSIONE del 26 novembre 2012 che modifica la direttiva 2006/17/CE

Norma ISO 9001:2000

LEGGE 01/04/99 n.91 “Disposizioni in materia di prelievo e trapianto di organi e tessuti”

LINEE GUIDA PER IL PRELIEVO, LA PROCESSAZIONE E LA DISTRIBUZIONE DI TESSUTI A SCOPO DI TRAPIANTO 9/2016 Approvate dal Centro Nazionale Trapianti, 14 settembre 2016

Norme europeee GMP (“Good Manufacturing Practises”)