

**ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA**

**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'ENERGIA ELETTRICA E
DELL'INFORMAZIONE "GUGLIELMO MARCONI"**

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**Caratterizzazione morfologica, meccanica e cellulare
di scaffolds gerarchici elettrofilati biorassorbibili
per la rigenerazione
del tessuto tendineo e legamentoso**

Tesi di laurea in MECCANICA DEI TESSUTI BIOLOGICI

**Relatore
Prof. LUCA CRISTOFOLINI**

**Presentata da
MARTINA FICHERA**

**Correlatore
Ing. ALBERTO SENSINI**

Anno Accademico 2017/2018

Indice

Riassunto	5
<hr/>	
Abstract	6
<hr/>	
1. Introduzione	7
<hr/>	
1.1 Proprietà di tendini e legamenti	7
1.2 Scaffolds per tendini e legamenti	15
1.3 Elettrofilatura	18
1.4 Impianto dello scaffold	23
1.5 Polimeri naturali e sintetici	24
2. Scopo della tesi	27
<hr/>	
3. Materiali e metodi	28
<hr/>	
3.1 Materiali	28
3.2 Produzione degli scaffolds 3D	28
3.3 Reticolazione del collagene	32
3.4 Caratterizzazione morfologica	32
3.4.1 Microscopia ottica	32
3.4.2 MicroCT	32
3.4.3 Microscopia elettronica a scansione	33

3.4.4 Analisi direzionalità	33
3.5 Caratterizzazione cellulare	34
3.5.1 Coltura cellulare	34
3.5.2 Fissazione campioni per XCT e SEM	35
3.5.3 Istologia	36
3.6 Caratterizzazione meccanica	36
4. Risultati e discussione	41
<hr/>	
4.1 Caratterizzazione morfologica	41
4.1.1 Microscopia ottica	41
4.1.2 Microscopia elettronica a scansione	41
4.1.3 Analisi direzionalità	42
4.2 Caratterizzazione meccanica	43
4.2 Caratterizzazione cellulare	47
4.3.1 Morfologia cellulare (tramite microCT)	47
4.3.2 Morfologia cellulare (tramite SEM)	49
4.3.3 Morfologia cellulare (tramite istologie)	50
5. Conclusioni	53
<hr/>	
Ringraziamenti	54
<hr/>	
Bibliografia	56
<hr/>	

Riassunto

Tendini e legamenti sono fondamentali per la corretta esecuzione di ogni movimento e sono quindi spesso soggetti a traumi e rotture. Ad oggi, non esistono tecniche standard in grado di rigenerare e sostituire efficacemente questi tessuti. Tra le varie tecniche proposte in letteratura per la produzione di scaffolds, l'elettrofilatura è sicuramente la più promettente. Grazie alla sua capacità di produrre fibre di diametro nanometrico, l'elettrofilatura ha dimostrato di poter riprodurre struttura e organizzazione delle fibre di collagene che compongono la matrice extracellulare di tendini e legamenti. Lo scopo di questo lavoro di tesi è duplice. In primo luogo, sono state caratterizzate le proprietà meccaniche di scaffold gerarchici elettrofilati biorassorbibili, sottoposti a carichi ciclici. In secondo luogo, sono state determinate le modifiche indotte dagli scaffold alla morfologia di fibroblasti umani coltivati sia in condizioni statiche che dinamiche. Per riprodurre la morfologia e le proprietà meccaniche di fibrille e fascicoli di tendini e legamenti sono stati prodotti bundles elettrofilati, composti da nanofibre allineate. Tali bundles sono poi stati rivestiti con una membrana di nanofibre, simile alle guaine che rivestono il tessuto tendineo/legamentoso, ottenendo scaffolds gerarchici simili a tendini e legamenti completi. Successivamente è stato messo a punto un protocollo di caratterizzazione meccanica ciclica per gli scaffolds, in modo da valutarne le prestazioni meccaniche quando sottoposti a stimolazioni meccaniche cicliche fino a rottura. Allo stesso tempo sono state confrontate le modifiche morfologiche dei fibroblasti umani provenienti dalle colture statiche e dinamiche, attraverso l'analisi di scansioni tomografiche a raggi-x ad alta risoluzione (microCT), di immagini a microscopia elettronica a scansione (SEM) e di vetrini istologici. I test meccanici ciclici hanno dimostrato che gli scaffolds sono in grado di resistere in media per più di 4000 cicli di carico e scarico. L'analisi delle immagini SEM, MicroCT e delle istologie ha mostrato che i fibroblasti sulla camicia dei campioni statici tendono a disporsi in direzione circonferenziale rispetto all'asse dello scaffold, mentre i fibroblasti sulla camicia dei campioni dinamici tendono ad orientarsi in direzione longitudinale. All'interno dei campioni i fibroblasti di entrambe le colture hanno assunto una morfologia allungata, similmente a quanto avviene all'interno dei tendini e legamenti umani. I campioni proposti in questa tesi risultano quindi promettenti per futuri test in vivo di rigenerazione del tessuto tendineo e legamentoso.

Abstract (in Inglese)

Tendons and ligaments are fundamental elements in the human movements. Due to their fundamental role, the risk of damage and rupture is high. Strategies to replace and regenerate tendons and ligaments are still not effective. Among the different techniques proposed in literature, electrospinning is the most promising one for scaffolds productions, due to its ability to produce fibers with nanometric diameters. For this reason, electrospinning allows to mimic the extracellular matrix and hierarchical structure of tendinous and ligamentous tissue. The aim of this study was to provide a mechanical characterization of electrospun hierarchical bioresorbable scaffolds, and to determine their role in the human fibroblasts deformation, during static and dynamic conditions. In order to mimic the structure and mechanical properties of tendons/ligaments fascicles and fibrils, bundles of axially aligned nanofibers were produced. The bundles were then coated with a nanofiber sheath to reproduce the epitenon/epiligament sheath, mimicking the whole structure of a natural tendon or ligament. In order to test the hierarchical scaffolds properties during dynamic conditions of displacement, a cyclic mechanical characterization protocol was developed. Parallely, in order to access the morphological differences in the human fibroblasts morphology in static and dynamic conditions of culture, images taken by means high resolution x-ray tomography (microCT), scanning electron microscopy (SEM) and histological investigations, were compared. The cyclic mechanical tests have demonstrated that scaffolds resisted more than 4000 cycles before rupture. The image investigation showed that fibroblasts, cultured in static conditions, elongated their body circumferentially to the scaffolds, while in dynamic conditions, tended to align their bodies to the scaffold longitudinal axis. Inside the hierarchical scaffold, cells grew along the axially aligned nanofibers direction, similarly in the natural tendons/ligaments. Moreover, fibroblasts from dynamic cultures were more elongated then fibroblasts from static cultures. The specimens proposed in this study showed promising properties for future in-vivo tests for tendons/ligaments regeneration.

1. Introduzione

1.1 Proprietà di tendini e legamenti

Tendini e legamenti sono strutture composte di tessuto connettivo fibroso.

Il tendine collega un muscolo ad un osso e la sua funzione principale è trasmettere le sollecitazioni del muscolo allo scheletro per consentire il movimento (Figura 1A) [1]. Il tendine infatti non si comporta come un materiale inestensibile, ma come una molla biologica capace di immagazzinare e rilasciare energia rendendo più efficiente il movimento [2]. La presenza del tendine fra muscolo e osso comporta inoltre numerosi vantaggi. Primo fra tutti, il tendine assorbe i traumi da impatto e riduce l'assorbimento di forze impulsive nei muscoli, riducendo la probabilità di subire danni durante il movimento. Permette inoltre di evitare una eccessiva lunghezza del muscolo e di localizzarlo in zone di minor ingombro in modo da non ostacolare il movimento [1]. I muscoli estensori e flessori delle dita, per esempio, sono posti nell'avanbraccio, lontano dalla mano, e la loro azione viene trasmessa alle dita tramite lunghi tendini [1]. La forma dei tendini dipende strettamente dalla funzione del muscolo a cui sono connessi [1].

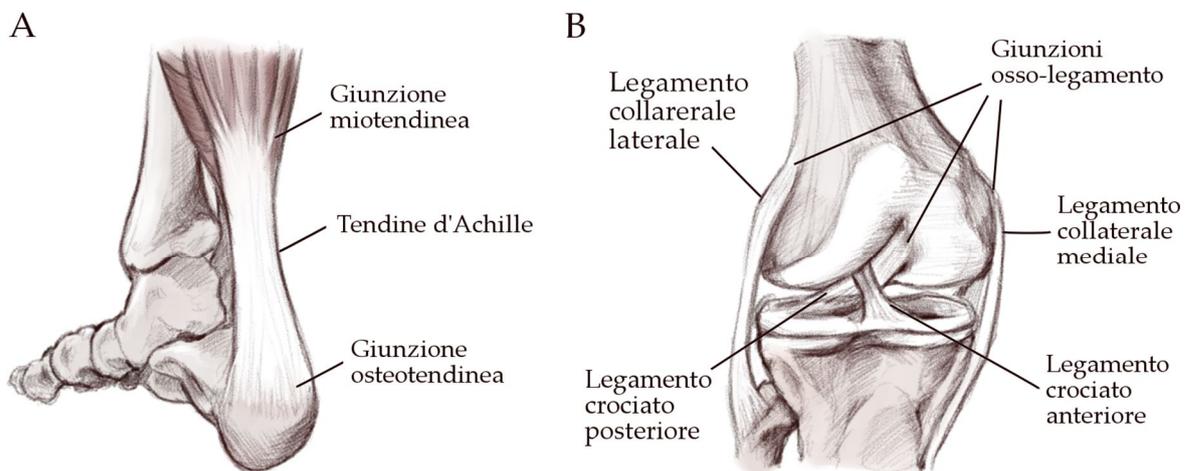


Figura 1 (A) Tendine d'Achille, collega il muscolo gastrocnemio al calcagno. Si inserisce nel muscolo tramite la giunzione miotendinea e nell'osso tramite la giunzione osteotendinea. **(B)** Legamenti del ginocchio: collaterale mediale e crociati collegano femore e tibia; il collaterale laterale collega femore e perone.

Muscoli deputati a produrre movimenti fini e precisi (come per esempio gli estensori e i flessori delle dita appena citati) hanno tendini lunghi e sottili. Al contrario muscoli che esercitano forti sollecitazioni (come il quadricipite femorale) hanno tendini corti e spessi [3]. Infine, i tendini sono innervati e contribuiscono alla propriocezione restituendo informazioni sulla forza applicata dal muscolo [1].

Il legamento invece collega sempre un osso ad un altro osso e si trova in generale in prossimità di una articolazione (Figura 1B). Al contrario del tendine non viene sollecitato ogni volta che il muscolo si contrae, ma solo nel caso in cui si cerchi di compiere un movimento non consentito all'articolazione [1]. La loro funzione principale è quindi impedire movimenti eccessivi o anormali dell'articolazione, stabilizzandola e contribuendo inoltre alla propriocezione [1].

Nonostante le funzioni diverse, tendini e legamenti hanno strutture molto simili, composte per l'80% da matrice extracellulare e per il 20% da cellule [4]. La matrice è fatta di collagene (prevalentemente di tipo I) ed elastina inseriti all'interno di una matrice di proteoglicani. Il collagene è l'elemento prevalente e costituisce il 65%-80% della massa secca del tendine, mentre l'elastina contribuisce per 1-2%. Questi elementi sono prodotti da tenoblasti e tenociti nei tendini e da fibroblasti e fibrociti nei legamenti, ovvero cellule dalla forma allungata situate fra le fibre di collagene [3, 4]. In generale, sia tendini che legamenti sono formati da fibre allineate e raggruppate gerarchicamente, in modo a formare strutture sempre più complesse (Figura 2).

L'elemento più piccolo identificabile è il tropocollagene, una proteina composta da tre catene polipeptidiche intrecciate a formare una tripla elica insolubile in ambiente fisiologico. Il tropocollagene è prodotto dentro le cellule (i fibroblasti) e secreto nella matrice extracellulare come procollagene [5]. Le molecole di tropocollagene si aggregano a formare una fibrilla di collagene (10-500 nm), l'unità strutturale più piccola identificabile in tendini e legamenti [5]. Un insieme di fibrille assialmente allineate fra loro, forma una fibra di collagene (1-50 μm). A loro volta le fibre, sempre allineate, si aggregano a formare una struttura più grande detta fascio primario o subfascicolo (15-400 μm) avvolto nell'endotenon (per i tendini) o nell'endoligament (per i legamenti). Si ha poi il fascio secondario o fascicolo (150-1000 μm), composto da fasci primari allineati, e il fascio terziario (1-3 mm), composto da gruppi di fasci secondari. Sia fascio secondario che terziario sono ancora interni al tendine/legamento e perciò sono avvolti nell'endotenon/endoligament [3].

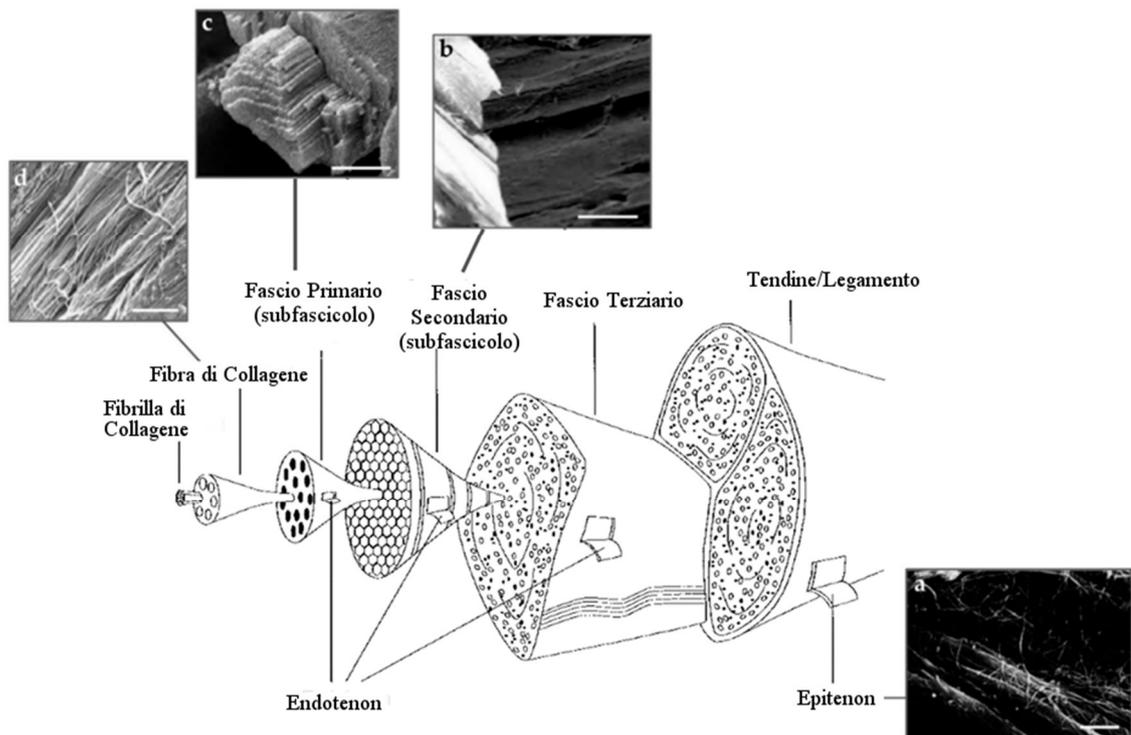


Figura 2. Struttura gerarchica di tendini e legamenti (adattata da Kannus, 2000 [3]) con relative immagini SEM di **(a)** epitenon (scale bar $2\ \mu\text{m}$) [3], **(b)** fascio secondario (scale bar $100\ \mu\text{m}$), **(c)** fascio primario (scale bar $45\ \mu\text{m}$) e **(d)** fibrille di collagene (scale bar $1.8\ \mu\text{m}$) (Moshiri et al. 2013 [6]).

Il tendine e il legamento completi sono composti generalmente da fasci terziari e sono avvolti nell'epitenon/epiligamento, una sottile fascia di fibre di collagene disposte in maniera casuale che contiene vasi sanguigni, vasi linfatici e nervi [3, 5, 7]. A seconda delle dimensioni e della funzione del tendine/legamento, e della variabilità, è possibile che alcuni degli elementi sopra citati non siano presenti. In ogni caso, non esiste una nomenclatura univoca delle sottostrutture di questi tessuti [3].

L'inserzione del tendine nel muscolo prende il nome di giunzione miotendinea (Figura 1A). In questa zona le fibre di collagene si inseriscono nel tessuto muscolare, aumentando la superficie di ancoraggio e riducendo quindi i fenomeni di concentrazione delle tensioni [1]. L'inserzione nell'osso invece è detta giunzione osteotendinea ed è caratterizzata da una progressiva mineralizzazione delle fibre di collagene (Figura 1A). Il gradiente di mineralizzazione serve ad aumentare gradualmente la rigidità del tendine in corrispondenza

dell'interfaccia con l'osso, in modo da evitare che le tensioni si concentrino nel punto di contatto fra i due tessuti [1].

Il legamento si inserisce sempre in un segmento osseo, ma ha due tipi di inserzioni diverse: diretta e indiretta. L'inserzione indiretta è la più comune. Le fibre superficiali del legamento si inseriscono nel periosteo, mentre quelle profonde si inseriscono direttamente nell'osso tramite fibre di collagene che penetrano il tessuto. Nell'inserzione diretta invece sia le fibre superficiali che quelle profonde penetrano nel tessuto osseo, in particolare le fibre profonde mostrano il gradiente di mineralizzazione già citato [8].

La struttura interna di tendini e legamenti, per quanto simile è organizzata in modo diverso poiché riflette le loro diverse funzioni. Ci si concentri per ora sul caso specifico del tendine e della sua funzione di trasmissione dei carichi. Studi condotti tramite TEM (microscopio elettronico a trasmissione) e SEM (microscopio elettronico a scansione) provano che le fibrille si intrecciano fra loro in modi diversi (Figura 3), e che, pur essendo disposte prevalentemente in direzione longitudinale, sono presenti anche fibrille orientate orizzontalmente e trasversalmente (Figura 4A) [3, 9–12]. Il motivo di questa complessa struttura tridimensionale è da ricercare nelle forze a cui sono sottoposti i tendini. Durante il movimento infatti, il tendine viene per lo più sollecitato in direzione longitudinale, ovvero messo in trazione dal muscolo, ma è soggetto anche a componenti secondarie di taglio e a momenti torcenti. Il complesso intreccio di fibre permette di smorzare forze dirette in più direzioni (non solo longitudinalmente), la struttura è quindi in grado di prevenire danni al tessuto e impedire la disconnessione delle fibre [9].

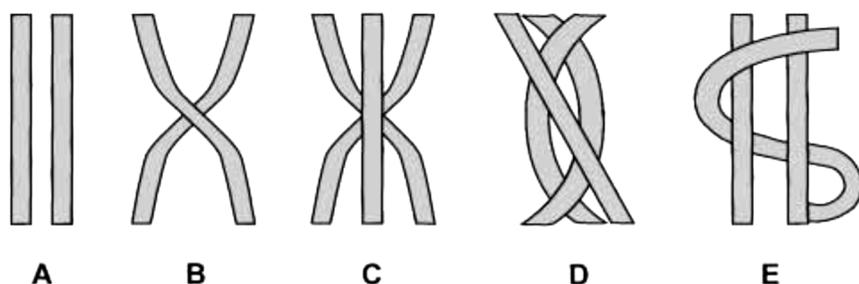


Figura 3. Rappresentazione schematica di fibre: **(A)** parallele; **(B)** incrociate; **(C)** incrociate con fibra lineare centrale; **(D)** intrecciate in conformazione piana; **(E)** parallele intersecate da una terza fibra (Kannus et al. 2000 [3]).

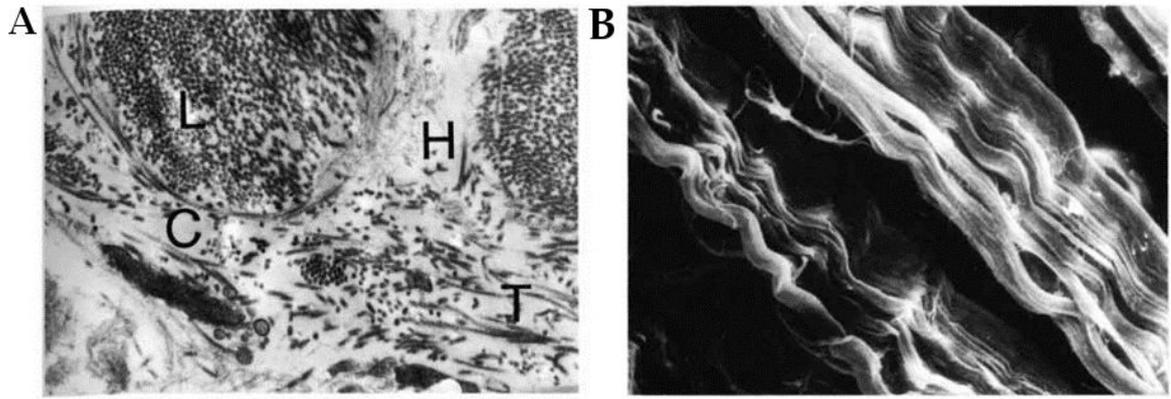


Figura 4. (A) I fasci di fibre longitudinali (L) sono circondati da fibre circolari (C), trasversali (T), e orizzontali (H). (B) Arricciatura delle fibre longitudinali (Jozsa et al. 1991 [9]).

Occorre inoltre sottolineare che le fibre di collagene osservate tramite microscopio a luce polarizzata mostrano un grado di arricciamento. Questa conformazione è conosciuta con il nome di *crimping* (Figura 4B) [9, 13, 14]. Molti studi hanno dimostrato che l'arricciamento scompare quando il tendine viene messo in trazione e subisce una deformazione superiore al 2% [13–17]. Durante l'allungamento infatti, le fibre vengono reclutate e stirate una ad una (non in blocco), determinando un graduale irrigidimento del tessuto, e quindi un aumento della pendenza della retta carico-deformazione (Figura 5) [18].

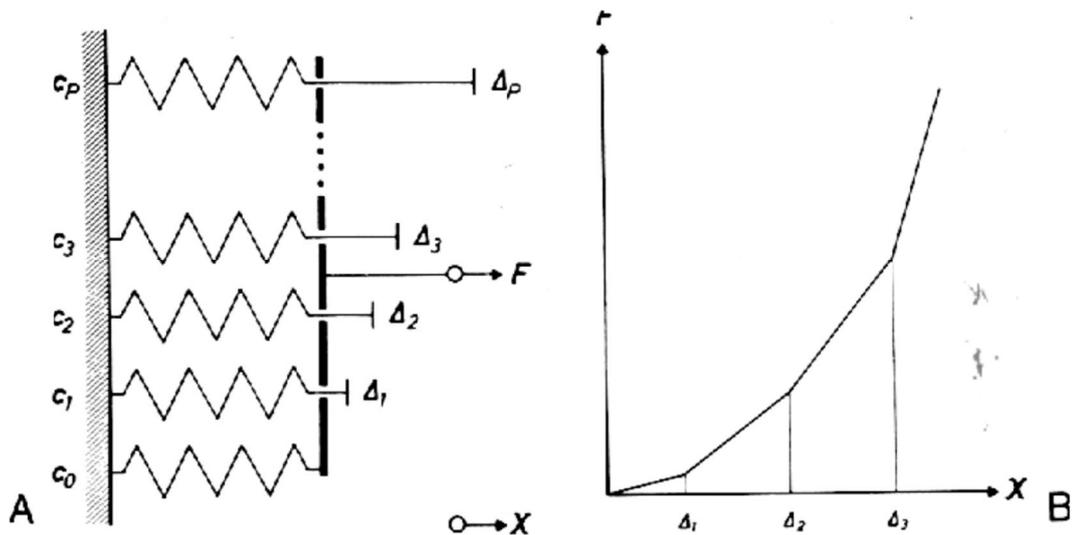


Figura 5. (A) Modello elastico non lineare che dimostra il progressivo reclutamento delle componenti lineari individuali. (B) Risultante, curva carico-deformazione non lineare (Frisén et al. 1969 [18]).

La struttura arricciata delle fibre di collagene è quindi alla base del comportamento non lineare sia del tendine (Figura 6) che del legamento (Figura 7). Quando il tessuto viene stirato, l'energia è inizialmente utilizzata per diminuire l'entropia del sistema e non si traduce perciò in una risposta in tensione da parte del tessuto [19]. Questo comportamento è visibile nel grafico tensione-deformazione sotto riportato (Figura 6), in cui la curva inizialmente ha una pendenza bassa che cresce fino all'inizio della zona lineare (piede della curva). Per deformazioni comprese fra 2% e 4% le fibre di collagene sono tutte state reclutate e il tendine risponde ai carichi applicati in modo lineare (regione lineare). In questa regione il modulo elastico è compreso mediamente nel range 0.5-2 GPa [20, 21]. La deformazione risulta inoltre reversibile, perciò quando il carico viene rimosso il tendine torna alla sua lunghezza originale. Oltre il 4%, le fibre cominciano scorrere fra loro, a causa della rottura dei cross-link che normalmente le tengono unite, e il tessuto subisce una deformazione plastica (rottura microscopica) [20]. La pendenza della curva cala di nuovo a causa del danneggiamento del tessuto (rottura macroscopica), fino ad arrivare alla completa rottura per deformazioni superiori all'8%. La tensione di rottura varia nei tendini da 24-69 MPa del tendine patellare fino 112 MPa del gracile [22, 23].

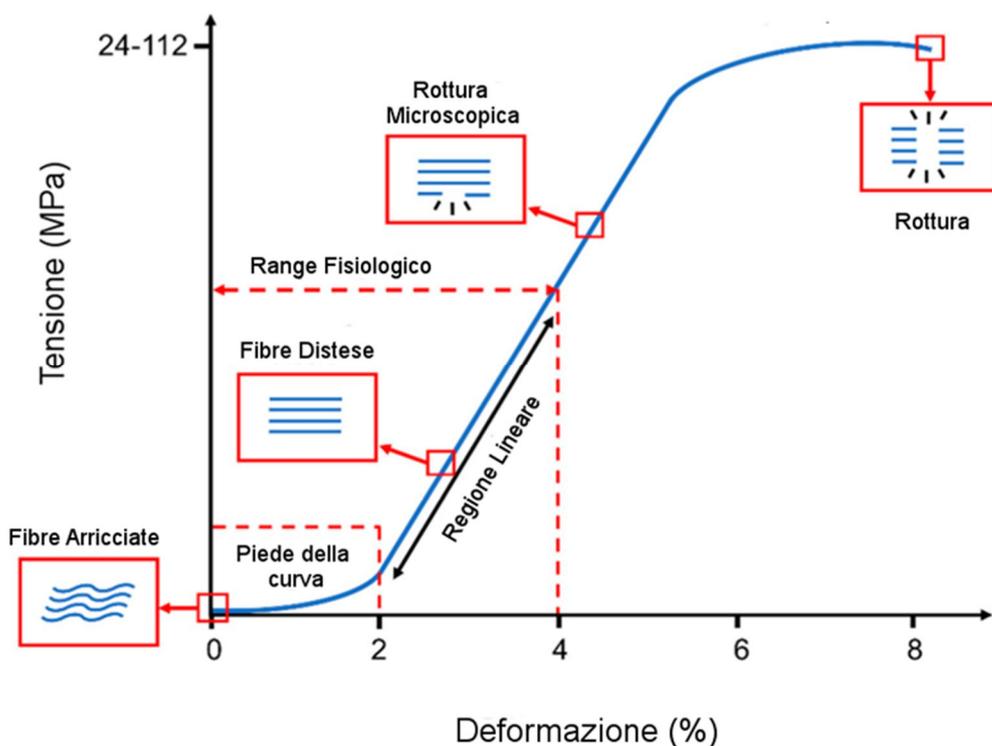


Figura 6. Curva tensione-deformazione del tendine. I range di valori tipici, della zona lineare, e della rottura sono indicati sugli assi (adattata da Sensini et al. 2018 [23]).

Quanto appena detto riguardo all'arricciatura delle fibre e al comportamento meccanico del tendine vale anche per il legamento ma con una sostanziale differenza: nel legamento le fibre sono meno allineate e presentano un crimping maggiore (Figura 8) [24].

La configurazione particolare delle fibre nel legamento serve a fare in modo che il tessuto si irrigidisca per deformazioni maggiori rispetto al tendine. In natura infatti il legamento ha la funzione di vincolo e non deve entrare in funzione ad ogni movimento, ma solo quando necessario ad impedire una dislocazione dei segmenti ossei interessati [1, 24]. Questo comportamento si evidenzia mettendo a confronto le curve tensione-deformazione di tendini e legamenti. Si nota infatti che il legamento ha un piede della curva più esteso, ovvero che le fibre di collagene vengono reclutate per deformazioni maggiori rispetto al tendine (Figura 7). La deformazione a cui il legamento comincia ad irrigidirsi dipende dal sito anatomico e varia dal 4% al 40% contro il 2% in media del tendine che invece deve essere reclutato appena il muscolo si contrae [23]. La regione lineare si estende fino a deformazioni comprese fra 6%-46%. Dopo di che, come nel tendine, le fibre cominciano a scorrere e a rompersi (rottura microscopica) fino alla rottura completa per deformazioni comprese fra 8%-70% con carichi di rottura nel range 1-46 MPa [22, 23].

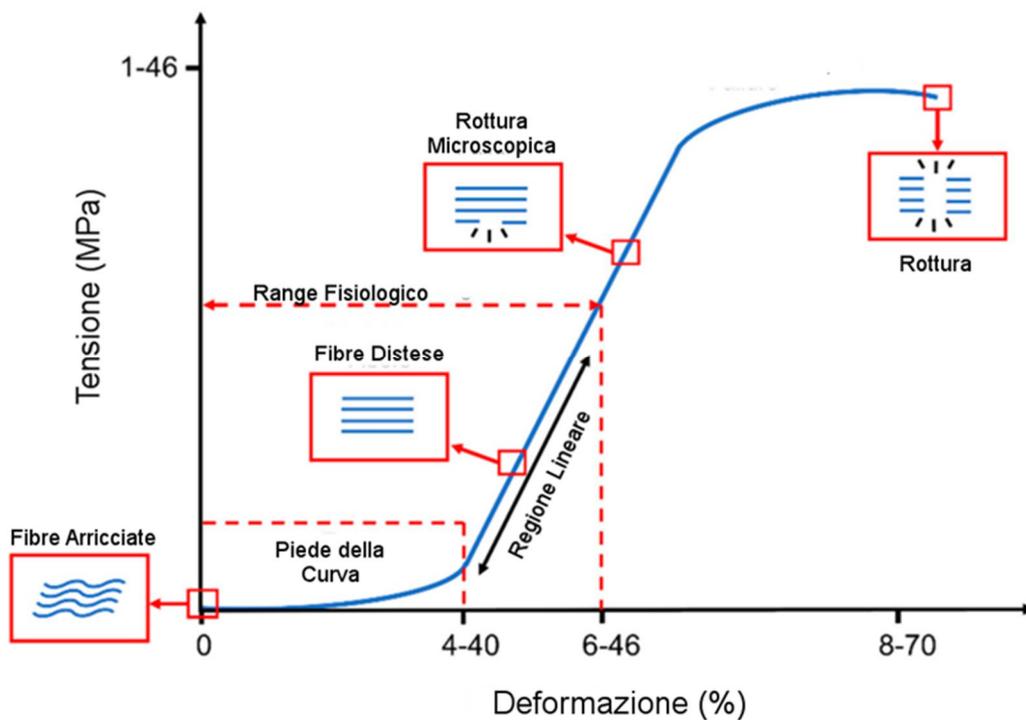


Figura 7. Curva tensione-deformazione del legamento. I range tipici dei valori della zona lineare e della rottura sono indicati sugli assi (adattata da Sensini et al. 2018 [23]).

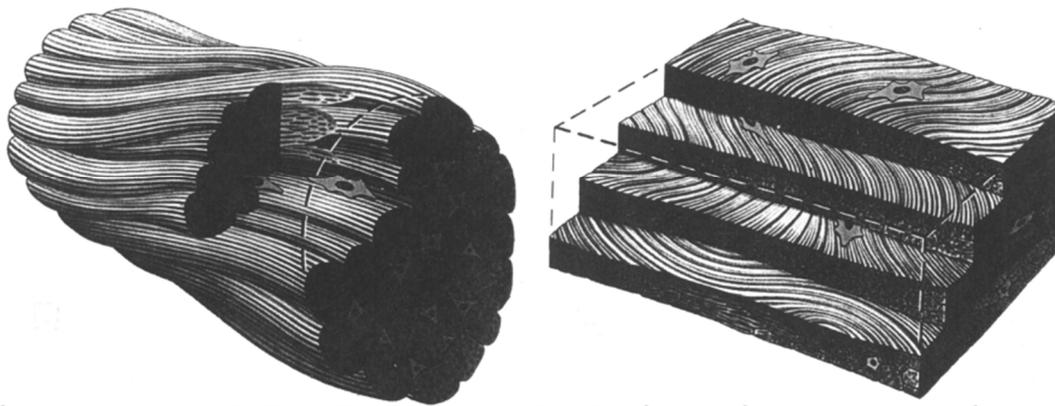


Figura 8. Esempio di organizzazione delle fibre di collagene nel tendine (sinistra) e nel legamento (destra) [25].

La relazione tensione-deformazione tuttavia non è costante, poiché i legami deboli del collagene e l'acqua contenuti nel tessuto lo rendono viscoelastico. Per caratterizzarne le proprietà meccaniche occorre tenere conto delle caratteristiche principali dei materiali viscoelastici: [20]

- **Creep:** il tessuto continua a deformarsi quando sottoposto a carico costante (Figura 9A).
- **Rilassamento:** se il tessuto viene mantenuto ad una deformazione costante, la sua risposta (in termini di tensione) cala nel tempo (Figura 9B).
- **Isteresi:** la curva di carico e di scarico del tessuto non coincidono. Durante il carico, parte dell'energia viene dissipata e non viene perciò restituita nella fase di scarico. L'area compresa fra le due curve indica la quantità di energia dissipata (Figura 9C).
- **Condizionamento:** se il tessuto viene caricato e scaricato ciclicamente si ottengono curve differenti (non sovrapposte). All'aumentare dei cicli tuttavia la risposta varia sempre meno e dopo circa 10 cicli le curve di carico e scarico diventano sovrapponibili. L'isteresi si riduce all'aumentare dei cicli (Figura 9D).

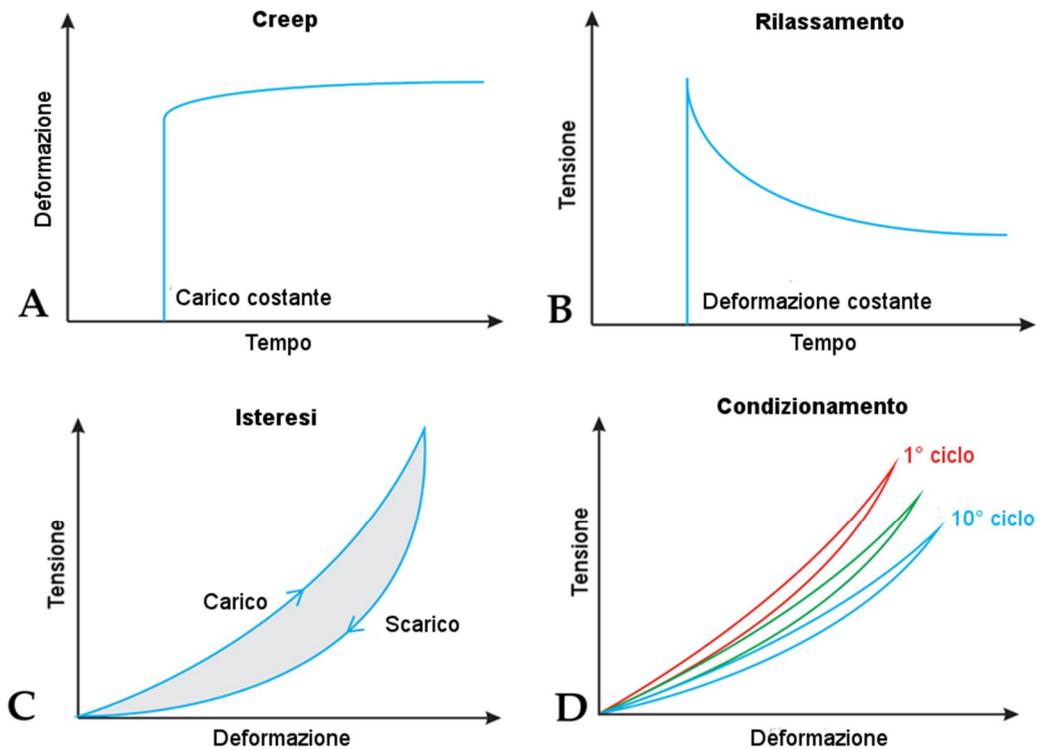


Figura 9. (A) Creep: crescita della deformazione nel tempo a carico costante. (B) Rilassamento: calo della tensione nel tempo a deformazione costante. (C) Isteresi: la curva di scarico non segue quella di carico poiché viene dissipata energia. (D) Condizionamento: la curva si sposta verso destra per carichi ciclici, dopo 10 cicli la curva diventa riproducibile (Robi et al. 2013 [20]).

1.2 Scaffolds per tendini e legamenti

Tendini e legamenti sono costantemente sollecitati durante il movimento e perciò sono spesso soggetti a traumi e rotture (solo per i tendini si registrano circa 30 milioni di operazioni chirurgiche all'anno nel mondo) [26]. Le lesioni più comuni variano in base all'età e all'attività dei pazienti [27]. Nei bambini e negli adolescenti la maggior parte delle lesioni sono dovute a traumi o ad usura [27]. Esse avvengono principalmente all'interfaccia fra tendine e osso (o legamento e osso), piuttosto che nella massa del tendine (o del legamento) [28]. Ciò è causato dalla scarsa ottimizzazione del sito di inserzione nell'osso che determina una concentrazione delle tensioni maggiore all'interfaccia fra i due tessuti [29, 30]. Negli atleti adulti si verificano più spesso traumi da usura, dovuti alla regolare attività fisica e a processi infiammatori (come le tendiniti), o lesioni da trauma [27, 28]. In entrambi i casi la lesione è più frequentemente

localizzata nella massa del tendine (o legamento), e non più in prossimità dell'inserzione ossea. Nei pazienti anziani invece le lesioni sono spesso causate da una degenerazione del tessuto tendineo e legamentoso (per esempio le tendinosi), dovuta all'età, a microtraumi ripetuti nel tempo, o ad una minore vascolarizzazione del tessuto [27, 31]. Le tendinosi modificano la struttura interna del tendine causando disallineamento e separazione delle fibre di collagene, proliferazione delle cellule, e aumento degli spazi vascolari [31]. Queste modifiche portano ad un deterioramento delle caratteristiche meccaniche del tessuto, facilitandone la rottura.

L'efficace rigenerazione e ricostruzione di tendini e legamenti, per quanto fondamentale, rimane un problema irrisolto a causa della complessità della loro struttura, della scarsa vascolarizzazione, del basso contenuto di cellule e delle proprietà meccaniche non lineari [26, 32, 33]. Nella chirurgia tradizionale il tendine o il legamento lesionati vengono sostituiti con grafts che si differenziano in base alla loro natura:

- **Dispositivi protesici:** sono composti da polimeri sintetici non riassorbibili, per esempio Gore-tex, Dacron, poliestere (Leeds-Keio ligament) o polietilentereftalato (LARS ligament) [34].
- **Xenografts:** sono composti di tessuto tendineo o legamentoso di provenienza animale, principalmente bovina e porcina [35].
- **Allografts:** sono composti di tessuto tendineo o legamentoso proveniente da donatore umano (cadavere) [34].
- **Autografts:** sono composti da tessuto tendineo proveniente dal paziente stesso. Gli autograft più utilizzati vengono prelevati dal tendine patellare, dal tendine gracile o dal semitendinoso [36].

La tipologia dei grafts utilizzati varia in base all'età del paziente e alla sua attività. In generale per i pazienti giovani vengono utilizzati autografts, poiché sono più attivi e necessitano grafts più robusti. Gli allografts hanno proprietà meccaniche più scarse degli autografts, sono quindi indicati per pazienti che non svolgono un'intensa attività fisica, inoltre possono provocare reazioni infiammatorie dovute alla presenza di cellule del donatore. Tuttavia, l'impianto di un allograft non richiede il prelievo di tessuto dal paziente, quindi sono necessarie meno incisioni, un minor tempo per l'operazione chirurgica e, di conseguenza, un minor dolore post-operatorio [36]. Sia gli autografts che gli allografts sono disponibili in quantità limitata, per questo motivo si è pensato di utilizzare graft di provenienza animale. Gli xenografts tuttavia necessitano di una accurata decellularizzazione poiché possono causare reazioni infiammatorie acute e rigetto dell'impianto. I metodi attualmente utilizzati per sterilizzare i tessuti di

provenienza animale ne abbassano però le proprietà meccaniche [35]. I grafts sintetici sono realizzati in materiali biocompatibili e hanno meno probabilità di causare processi infiammatori rispetto ad allografts e xenografts, tuttavia, hanno proprietà meccaniche diverse dal tessuto sostituito che portano frequentemente al fallimento dell'impianto [34, 37]. Gli unici grafts di origine sintetica con risultati clinici simili agli autografts sono i dispositivi LARS [34].

Occorre tuttavia specificare che tutte le soluzioni sopra elencate presentano come ulteriore svantaggio la formazione di tessuto cicatriziale che causa discontinuità morfologiche nel tessuto. Queste discontinuità ne impediscono il corretto funzionamento e ne deteriorano le caratteristiche meccaniche nel tempo [38]. Una alternativa ai metodi tradizionali sopra elencati consiste nell'uso di uno scaffold, ovvero di una impalcatura tridimensionale che imita la matrice extracellulare permettendo al tessuto di rigenerarsi invece di sostituirlo [39]. Per promuovere la rigenerazione, tuttavia, lo scaffold deve tenere conto delle proprietà biomeccaniche e morfologiche di tendini e legamenti precedentemente descritte. In generale uno scaffold deve essere biocompatibile, biodegradabile, poroso, e deve avere proprietà meccaniche e morfologia idonee a sostituire il tessuto nativo [23, 40, 41].

I materiali (naturali o sintetici) di cui è composto lo scaffold devono essere biocompatibili. Questo previene i processi infiammatori e permette alle cellule di proliferare sopra e all'interno della struttura [6, 23, 40–42]. Allo stesso modo, lo scaffold deve essere biodegradabile, cioè deve poter essere progressivamente riassorbito e sostituito dal tessuto rigenerato. La velocità di degradazione deve però essere ingegnerizzata in modo da supportare le cellule per tutto il tempo necessario a rigenerare il tessuto. Se lo scaffold venisse riassorbito troppo velocemente, le proprietà meccaniche dell'impianto diminuirebbero fino a portarlo a rottura [6, 23, 40–42]. La porosità è invece essenziale per consentire alle cellule di nutrirsi, proliferare e migrare, inoltre permette la vascolarizzazione del tessuto. Alcuni materiali possono essere funzionalizzati, permettendo, ad esempio, il rilascio di proteine e geni che fungono da substrato per lo scambio di nutrienti fra le cellule [23, 43]. Lo scaffold deve poi essere progettato in modo da avere proprietà meccaniche simili al tendine o al legamento naturali, questo incentiva le cellule a produrre collagene e a proliferare [6, 42, 44]. Per prevenire il danneggiamento dei tessuti circostanti lo scaffold deve però essere meno rigido se paragonato al tendine/legamento [23]. Altrettanto essenziale è la morfologia dello scaffold, che deve essere composto da fibre allineate e di dimensioni comparabili ai fascicoli di tendini/legamenti. Le cellule seminate su tali strutture producono infatti collagene seguendo la direzione delle nanofibre su cui vengono seminate. I nuovi filamenti di collagene prodotti, allineati alle fibre della struttura,

contribuiscono a conferire al tessuto rigenerato proprietà molto simili a quelle originarie [23]. Inoltre, è stato dimostrato che uno scaffold costituito di nanofibre allineate può sia indurre le cellule ad adottare una forma allungata, sia dirigere le cellule staminali mesenchimali o progenitrici del tendine a differenziarsi in tenociti e tenoblasti [45].

1.3 Elettrofilatura

Tra le varie tecniche per produrre scaffolds proposte in letteratura, la più promettente risulta essere l'elettrofilatura [23, 46–49]. Questo metodo consente di produrre fibre di diametro nanometrico o micrometrico e di imitare la matrice extracellulare a partire da una soluzione polimerica viscoelastica [23, 50–54]. Il processo richiede quattro elementi principali: soluzione polimerica, ago metallico, alimentazione elettrica e un collettore di forma variabile su cui le fibre devono depositarsi (Figura 10). Il processo di filatura comincia quando la soluzione polimerica viene spinta attraverso l'ago metallico e forma una goccia alla sua estremità.

L'ago si trova immerso in un campo elettrico che ha la stessa carica del polimero, mentre il collettore si trova collegato a potenziale di terra. Le cariche sulla superficie della goccia hanno la stessa polarità e si respingono fra loro deformando la goccia, che da sferica assume una forma conica a causa del campo esterno. Continuando ad aumentare la tensione fra ago e collettore, l'attrazione fra le cariche nella goccia e il collettore supera la tensione superficiale.

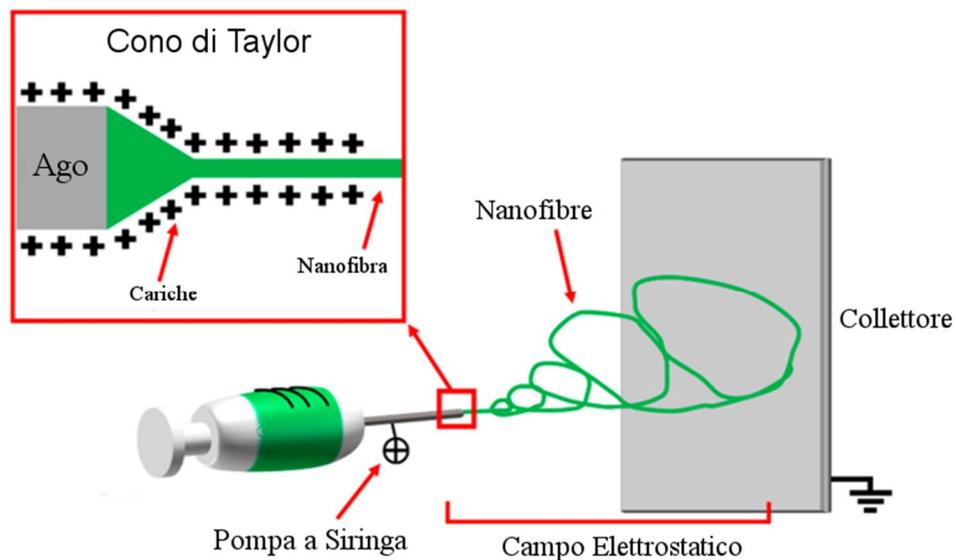


Figura 10. Principio di funzionamento dell'elettrofilatura (Sensini et al. 2018 [23])

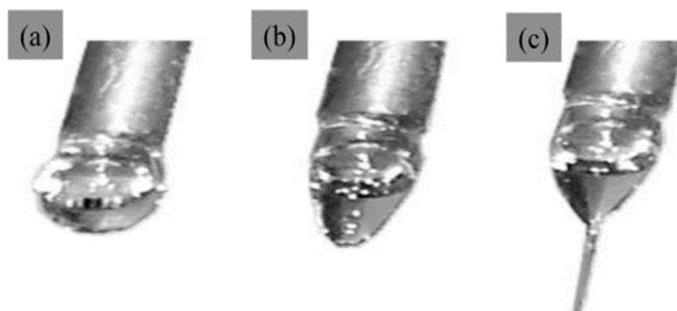


Figura 11. (a-c) Immagini digitali che mostrano le tre fasi della formazione della goccia all'aumentare della tensione fra ago e collettore (Laudenslager e Sigmund, 2012 [55]).

La goccia degenera quindi in un cono di Taylor da cui si forma la nanofibra (Figura 11) [56]. Durante il processo le forze interne ed esterne impongono un moto vorticoso alla nanofibra, che “stira” le catene polimeriche e forza la riduzione del diametro complessivo della fibra [56–58].

La dimensione, la forma, e la porosità delle nanofibre prodotte tramite elettrofilatura dipende da tre famiglie di parametri: [56]

- **Parametri della soluzione:** includono i tipi di polimero e di solventi utilizzati, la viscosità, la concentrazione e la conduttività della soluzione.
- **Parametri dell'elettrofilatura:** flow rate (quantità di soluzione espulsa dall'ago nell'unità di tempo), diametro e forma dell'ago, tensione applicata, distanza fra ago e collettore, forma e movimento del collettore.
- **Parametri ambientali:** temperatura e umidità relativa dell'ambiente.

Per ognuno di questi parametri esiste un valore ottimale al fine di ottenere la nanofibra con le proprietà volute. Usare valori sopra o sotto quelli ottimali porta alla formazione di beads (sfere o ellissoidi disposti lungo il filamento) o a fibre di diametro variabile [56]. Se il polimero è poco concentrato, per esempio, lo stretching delle fibre causato dal moto vorticoso durante l'elettrofilatura può rompere le catene e generare difetti, portando alla formazione di beads dalla forma sferica (Figura 12 a) [58]. Se la concentrazione è ottimale le catene polimeriche si trovano legate fra loro più saldamente e vincono la tensione superficiale generando fibre lisce e uniformi. Oltre il valore critico l'alta concentrazione del polimero determina una viscosità troppo alta, la soluzione non esce dall'ago e la goccia si asciuga senza filare, oppure fila ma la nanofibra ottenuta contiene beads dalla forma allungata (Figura 12 b-c) [58].

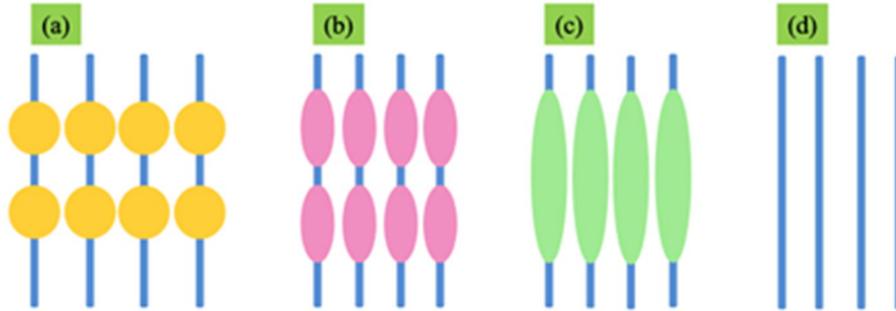


Figura 12. (a) Beads dalla forma sferica dovute a soluzioni polimeriche con viscosità troppo bassa. (b, c) beads dalla forma allungata dovute a soluzioni polimeriche troppo viscosi. (d) viscosità ottimale (adattata da Haider et al. 2015 [56]).

La conduttività rende possibile l'elettrofilatura. Se la soluzione non contiene abbastanza cariche il cono di Taylor non si forma e il processo non può avvenire. Un aumento della conduttività determina inoltre un aumento del diametro della fibra [52, 56]. La scelta del solvente è quindi fondamentale per avere fibre ben definite e prive di difetti. Il solvente deve avere un punto di ebollizione basso ma non troppo. Solventi troppo volatili inducono la soluzione a seccare attaccata all'ago, mentre quelli poco volatili impiegano troppo tempo ad evaporare impedendo al filamento di seccare prima di arrivare al collettore (con conseguente formazione di beads) [56, 59, 60].

La tensione applicata deforma la goccia fino a farla diventare un cono di Taylor. Il valore di tensione ottimale varia in base al polimero e al diametro da ottenere. Aumentando il voltaggio, il cono di Taylor si accorcia mentre lo stretching delle fibre e la repulsione fra cariche del polimero e campo elettrico aumentano, inducendo due effetti contrastanti [56]. In alcuni casi aumentando la tensione diminuisce il diametro, perché prevalgono gli effetti del maggiore stretching e del maggiore effetto repulsivo del campo esterno [60]. Oltrepassando la soglia critica del voltaggio lo stretching diventa eccessivo e le catene si rompono dando origine ad una fibra irregolare (che contiene beads) [56]. In altri casi l'accorciamento del cono di Taylor fa sì che il diametro aumenti invece di diminuire. Il prevalere dell'uno o dell'altro effetto dipende dalle proprietà del polimero [56, 61].

Il flow rate determina la geometria della fibra. Aumentando il flow rate si generano fibre con diametro sempre maggiore, fino alla formazione di pori e di beads se viene superato il valore critico [56, 62]. Diminuendo la quantità di polimero espulsa nel tempo si ottengono fibre

di diametro inferiore, ma sotto la soglia critica il cono di Taylor diventa instabile e si producono nanofibre con diametri molto variabili [63].

La distanza fra ago e collettore gioca un ruolo fondamentale nel determinare la morfologia della fibra. Maggiore è il salto più tempo ha la fibra per asciugarsi e per essere stirata. Modificare la distanza ha ripercussioni su più parametri e perciò occorre mantenere una distanza critica per ottenere fibre senza beads con diametro uniforme. In generale il diametro aumenta al diminuire della distanza [49, 56, 61, 64].

Anche i parametri ambientali sono in grado di modificare la morfologia della fibra. L'umidità influisce sulla velocità di essiccazione del polimero. Valori troppo alti impediscono al polimero di seccare in tempo utile portando alla formazione di beads. L'aumento della temperatura al contrario fa evaporare il solvente più velocemente ma rende anche la soluzione meno viscosa, questi cambiamenti inducono effetti opposti che si bilanciano ma entrambi determinano una riduzione del diametro [56].

Come già anticipato lo scaffold deve rispettare anche la macrostruttura del tessuto da replicare, non solo la dimensione naturale dei fascicoli. In questo caso, il processo di elettrofilatura deve depositare le nanofibre in modo allineato. Per ottenere geometrie diverse si agisce sia sul setup complessivo che sulla forma del collettore utilizzato. Un modo per produrre nanofibre allineate è utilizzare come collettore un rullo rotante. Quando questo collettore ruota con una velocità tangenziale superiore a 10 m/s, le fibre cominciano ad allinearsi lungo la sua circonferenza (Figura 13a) [23, 65]. È possibile ottenere fibre allineate anche utilizzando due lastre piane distanziate e collegate a potenziale di terra (gap collector) (Figura 13b). I due metodi sopra indicati permettono di produrre solo configurazioni planari, ovvero fogli di nanofibre. Queste strutture non sono particolarmente resistenti e hanno proprietà meccaniche non idonee per essere usate come scaffold per tendini o legamenti. Per risolvere il problema sono stati ideati setup che permettono di ottenere geometrie 3D più resistenti e più simili alla forma reale di tendini e legamenti, ovvero *bundles* e *yarns* [23]. Un bundle è un filamento composto di nanofibre allineate, mentre con yarn si intende un filamento composto di nanofibre attorcigliate [47, 65–67].

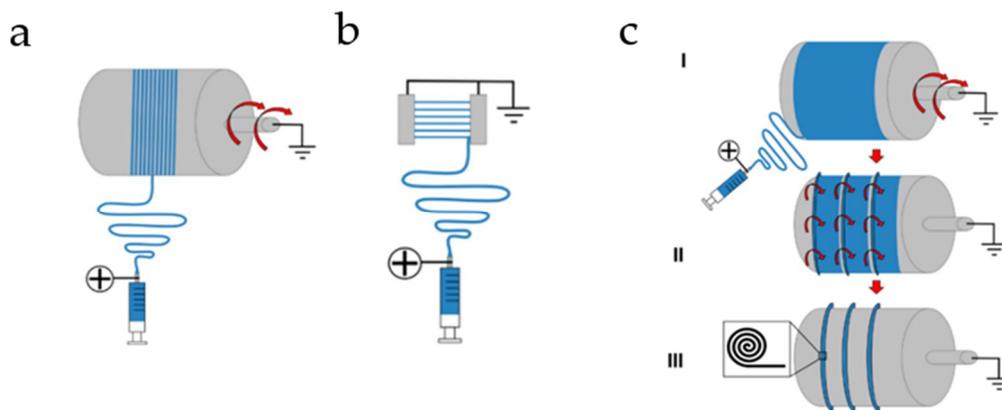


Figura 13. (a) Rullo rotante ad alta velocità, produce fibre allineate; (b) gap collector, produce fibre allineate. (c) produzione di bundles con rullo rotante: (I) lo strato di nanofibre allineate si deposita sul collettore cilindrico; (II) lo strato viene tagliato in strisce che vengono poi arrotolate sul tamburo; (III) il bundle viene tagliato e rimosso [32] (adattata da Sensini et al. 2018 [23]).

I bundles possono essere prodotti a partire da strati di nanofibre allineate, per esempio utilizzando un collettore a rullo rotante ad alta velocità. Lo strato di nanofibre depositatesi sul rullo viene tagliato in strisce di larghezza predefinita (in base al diametro finale prefissato del bundle). Si arrotolano poi le strisce direttamente sul collettore ottenendo anelli di nanofibre (Figura 13c) [32][68].

Sebbene sia possibile riprodurre i fascicoli tramite elettrofilatura, la struttura tridimensionale multiscala di tendini e legamenti rimane difficile da imitare. Si ricordi inoltre che sia la l'organizzazione interna che la forma complessiva di questi tessuti connettivi varia in funzione del sito anatomico in cui si trovano. Per ottenere risultati ottimali dall'impianto di uno scaffold e per migliorarne le proprietà meccaniche, questo deve imitare il più fedelmente possibile le caratteristiche del tessuto nativo sostituito. Per questo motivo i ricercatori hanno cercato di riprodurre l'intera morfologia gerarchica di tendini e legamenti in diversi modi [23]. Alcuni studi costruiscono scaffolds dotati di una struttura gerarchica unendo insieme fogli di nanofibre, yarns e bundles, attorcigliandoli o intrecciandoli [23, 69–72]. Un altro approccio comune consiste nel costruire bundles e yarns ispirati ai fascicoli. In questo caso i fasci di nanofibre vengono considerati come “mattoni” di base per riprodurre i fascicoli e assemblati insieme in modo da imitare tendini e legamenti completi [23, 32, 68].

1.4 Impianto dello scaffold

Dopo essere stato progettato e realizzato rispettando tutti i requisiti precedentemente definiti, lo scaffold necessita infine di essere impiantato. Questa fase presenta ancora ad oggi problemi e limita di fatto la diffusione degli scaffolds in clinica. Si ricordi che tendini e legamenti hanno inserzioni particolari nel tessuto osseo e muscolare, sviluppate apposta per evitare gli accumuli di tensione e il danneggiamento dei tessuti all'interfaccia. Sostituendo il tessuto nativo, questo ancoraggio naturale altamente ottimizzato viene perso. La nuova inserzione dello scaffold non deve quindi limitarsi solamente a resistere ai carichi applicati, ma anche distribuirli in modo da evitare concentrazioni di tensione e, allo stesso tempo, promuovere la rigenerazione e l'integrazione del tessuto rigenerato su quello esistente [23]. Ad oggi, le tecniche utilizzate per impiantare protesi e grafts consistono fondamentalmente in viti e punti di sutura. Per l'inserzione ossea si utilizzano viti ad interferenza (metalliche o riassorbibili), oppure dispositivi di sospensione che ancorano il dispositivo alla superficie esterna dei tunnel ossei, come bottoni da sutura e post (Figura 14). Per le inserzioni nel muscolo vengono invece utilizzati punti sutura, cucendo insieme graft e tessuto muscolare [45].

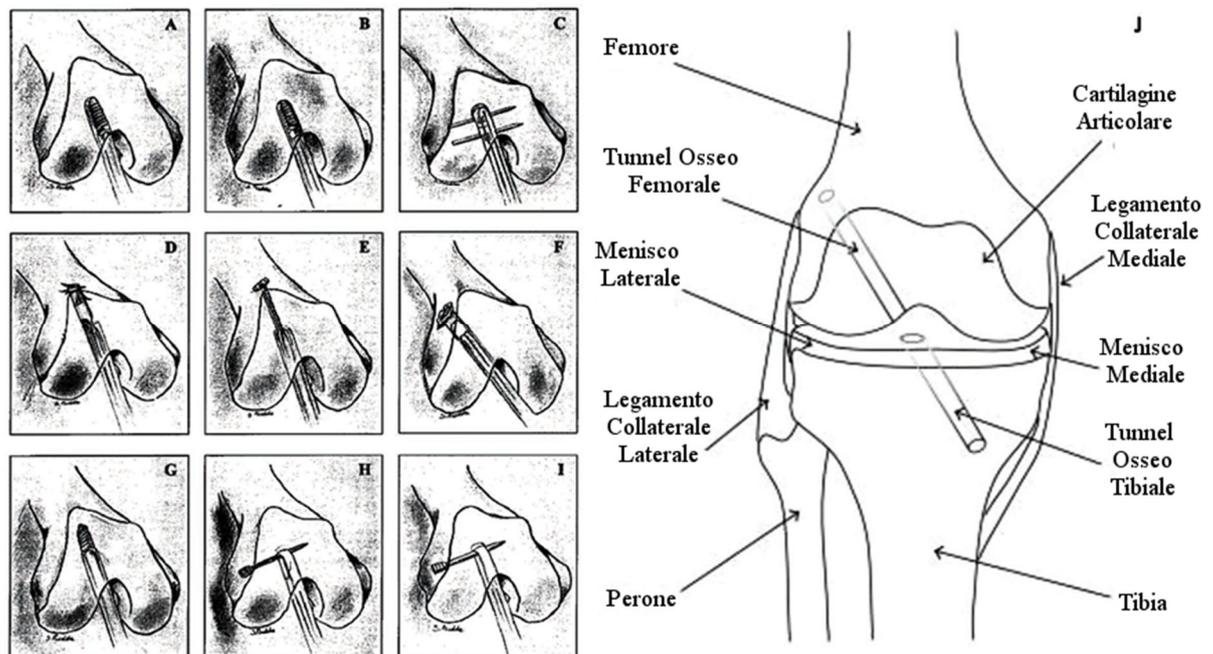


Figura 14. Esempi di ancoraggio osseo per graft commerciali utilizzati nella ricostruzione del crociato anteriore (A) Bioscrew; (B) RCI screw; (C) Rigidfix; (D) Ligament anchor; (E) EndoButton-CL; (F) Swing bridge; (G) Linx-HT; (H) Transfix; (I) Bio-Transfix (Milano et al. 2006 [73]). (J) Schema del ginocchio raffigurante tunnel ossei per l'inserimento del graft (Baxter et al, 2010 [74]).

Nessuna di queste due inserzioni è simile a quella naturale. Il problema dell'accumulo di tensione generato da questi ancoraggi si evidenzia nei grafts tendinei, dove nella maggior parte dei casi le rotture avvengono all'interfaccia fra impianto e tessuto muscolare, dove i punti di sutura si inseriscono nel muscolo [45, 75].

1.5 Polimeri naturali e sintetici

Gli scaffolds elettrofilati utilizzati nella rigenerazione di tendini e legamenti vengono realizzati con polimeri naturali e sintetici [51]. I polimeri sintetici sono relativamente meno costosi rispetto ai naturali e in generale conferiscono allo scaffold caratteristiche meccaniche migliori [51, 76]. Pur essendo biocompatibili e biodegradabili, i polimeri sintetici possono tuttavia causare infiammazioni e rigetti quando impiantati [77]. I polimeri naturali causano meno reazioni infiammatorie poiché sono naturalmente presenti nel tessuto da sostituire (per esempio il collagene di tipo I e III), inoltre promuovono l'integrazione dello scaffold e la rigenerazione del tessuto [51]. Tuttavia, i polimeri naturali hanno caratteristiche meccaniche inferiori rispetto ai sintetici [78]. Le due tipologie di polimeri possono essere elettrofilate insieme per ottenere scaffolds più resistenti ed aumentarne la biocompatibilità [51, 79]. Un polimero sintetico comunemente utilizzato è l'acido polilattico (PLA), un poliesteri alifatico biodegradabile e termoplastico che esiste in due forme enantiomeriche (L-D) [80] (Figura 15). L'isomero più utilizzato è l'acido poli-L-lattico (PLLA), poiché ha buone proprietà meccaniche e presenta una migliore biocompatibilità rispetto ad altri polimeri sintetici [80].

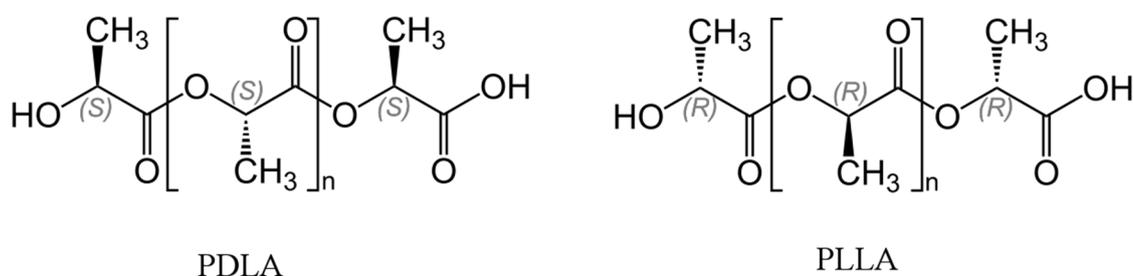


Figura 15. Forme enantiomeriche del poli (acido lattico): acido poli-D-lattide (PDLA) e acido poli-L-lattico (PLLA) (adattata da Wikipedia [81]).

Tuttavia, a causa della sua natura idrofoba, le cellule hanno difficoltà ad aderire alla superficie degli scaffolds realizzati in PLLA (limitazione che può essere superata trattando la superficie con agenti adesivi, come la fibronectina) [82]. Inoltre, i prodotti della degradazione del PLLA sono metaboliti acidi che, in alte concentrazioni, possono dar luogo a reazioni infiammatorie locali o sistemiche [83, 84].

Per quanto riguarda i polimeri naturali invece, si è sviluppato un interesse crescente nell'uso del collagene e dei suoi derivati [85]. Il collagene garantisce una migliore adesione delle cellule alla superficie dello scaffold rispetto ai poliesteri di origine sintetica. Tuttavia, la resistenza meccanica degli scaffolds costituiti solamente da derivati del collagene è inferiore rispetto a quella degli scaffolds realizzati con poliesteri [78]. Il collagene utilizzato per l'elettrofilatura viene necessariamente denaturato per essere estratto dal tessuto. Inoltre, durante l'elettrofilatura, il sistema solvente interagisce con il collagene causando la perdita della conformazione a tripla elica e rendendo il collagene solubile in ambiente acquoso. Le nanofibre elettrofilate vengono quindi degradate velocemente in ambiente fisiologico. Per rendere le nanofibre più resistenti e per rallentarne la degradazione, gli scaffolds vengono sottoposti ad un processo di reticolazione [32, 86]. Un esempio di trattamento reticolante consiste nell'utilizzo di 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimmide (EDC) ed N-idrossisuccinimide (NHS) (Figura 16). L'EDC attiva gli acidi carbossilici dei residui di acido aspartico (Asp) o glutammico (Glu) presenti lungo la catena di collagene, che in seguito reagiscono con i gruppi amminici dei gruppi di (idrossi)lisina (Lys) presenti su altre catene di collagene. L'NHS funge da catalizzatore della reazione, agisce infatti convertendo i gruppi O-acilisourea del primo intermedio di reazione in gruppi NHS attivati, che risultano più reattivi nei confronti dei gruppi amminici della (idrossi)lisina. Al termine della reazione si ottengono catene di collagene legate dal nuovo cross-link e due sottoprodotti: l'1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)-urea, derivante dall'EDC, e l'NHS. [87]

Occorre tuttavia sottolineare che gli scaffolds composti di materiali riassorbibili sono indicati per pazienti giovani o atleti che hanno metabolismo e attività cellulare veloci [88]. I materiali non riassorbibili (per esempio il nylon) sono invece preferibili per pazienti più anziani con una minore attività cellulare e metabolica [44].

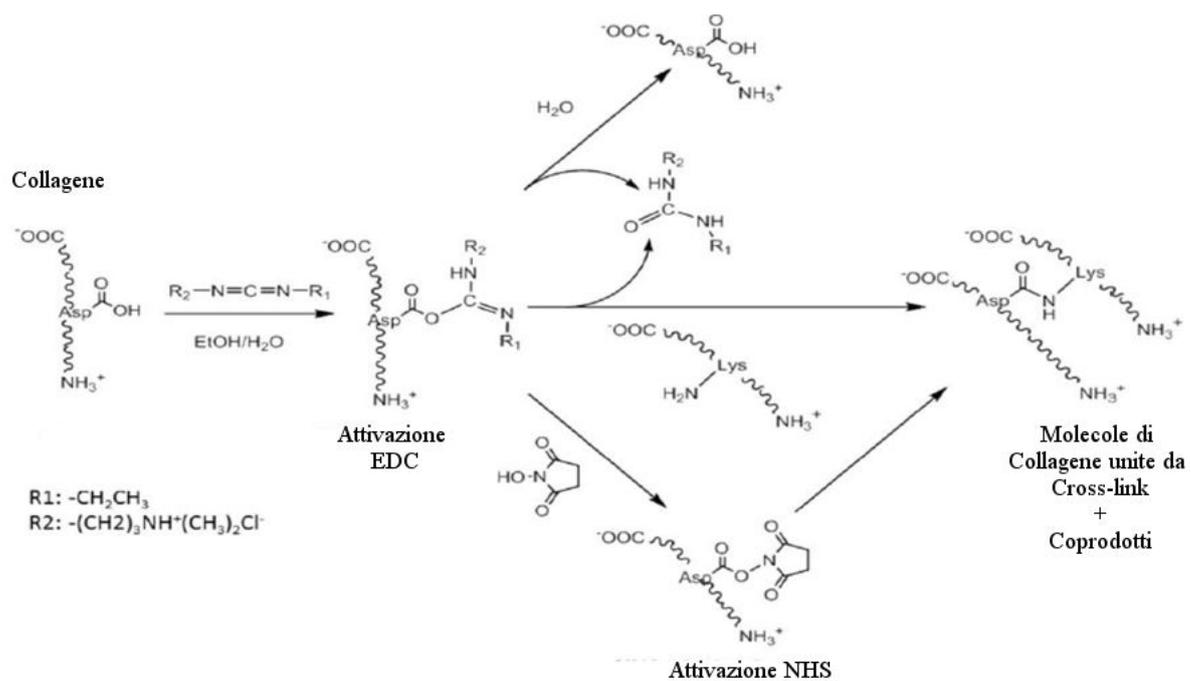


Figura 16. Meccanismo di reticolazione del collagene mediante EDC/NHS.

2. Scopo della tesi

Questo studio si inserisce in un progetto volto alla realizzazione di un innovativo scaffold riassorbibile, prodotto tramite elettrofilatura, per la rigenerazione del tessuto tendineo e legamentoso [32, 68].

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di caratterizzare le prestazioni meccaniche di scaffolds gerarchici elettrofilati, composti da una miscela di PLLA/Collagene, a seguito dell'applicazione di carichi meccanici ciclici. Inoltre, sono state valutate quali modifiche gli scaffolds potessero indurre nella morfologia di fibroblasti umani coltivati sia in condizioni di statiche che dinamiche.

Durante la prima fase del progetto sono stati prodotti bundles, tramite elettrofilatura, composti da nanofibre allineate che riproducessero la morfologia e le proprietà meccaniche dei fascicoli di tendini e legamenti. Tali bundles sono poi stati rivestiti con una camicia di nanofibre simile alle guaine che rivestono il tessuto tendineo/legamentoso, ottenendo scaffolds gerarchici simili a tendini e legamenti completi.

Successivamente è stato messo a punto un protocollo per caratterizzare meccanicamente gli scaffolds sottoponendoli a carichi ciclici fino a rottura.

Infine, è stata svolta una caratterizzazione morfologica degli scaffolds gerarchici, precedentemente sottoposti a cultura cellulare statica e dinamica presso l'Università di Portsmouth, al fine di valutare come le diverse condizioni di cultura potessero influire sulla morfologia dei fibroblasti. A tal proposito sono state acquisite ed analizzate immagini tramite microscopio elettronico a scansione (SEM), in seguito confrontate con scansioni tomografiche a raggi-x (microCT) eseguite precedentemente sui medesimi campioni. Tale caratterizzazione è stata infine completata confrontando i risultati con l'analisi delle sezioni istologiche degli scaffolds.

3. Materiali e metodi

3.1 Materiali

Per la produzione dei bundles sono stati utilizzati acido Poli-L-lattico (PLLA, Lacea H.100-E, $M_w = 8.4 \times 10^4$ g/mol, PDI = 1.7) acquistata da Mitsui Fine Chemicals (Dusseldorf, Germania) e collagene di tipo I (Coll) estratto da pelle di bovino da Kensey Nash Corporation (Exton, USA). Sono inoltre stati utilizzati i seguenti solventi di Sigma Aldrich (Saint Louis, USA): 1,1,1,3,3,3-Esafluoro-2-propanolo (HFIP); 2,2,2-Trifluoroetano (TFE); Etanolo (EtOH); acetone; acqua distillata.

Per il processo di reticolazione sono stati utilizzati N-(3-dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimmide (EDC) e N-idrossisuccinimide (NHS) entrambi di Sigma Aldrich.

Per il tampone fosfato sono stati utilizzati HK_2PO_4 e Sodio Azide (Sigma Aldrich).

Per le colture cellulari sono stati impiegati i seguenti prodotti di Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA): Dulbecco's modified eagle medium (DMEM); siero fetale bovino; soluzione di penicillina e streptomina; tampone fosfato (PBS). Sono inoltre stati utilizzati Trypan blue e Resazurin di Sigma Aldrich.

Per i vetrini istologici sono stati utilizzati paraffina (Histosec, Darmstadt, Germania) e i seguenti materiali di Sigma Aldrich: ematossilina, eosina, lisina, xilene e acido alcol.

Per i test a fatica è stata utilizzata una soluzione salina (NaCl) 0.9% fornita da S.A.L.F. S.p.A. Laboratorio Farmacologico (Cenate Sotto BG, Italia).

3.2 Produzione degli scaffolds 3D

Per l'elettrofilatura degli scaffolds gerarchici è stata preparata una soluzione polimerica 15% di PLLA/Collagene 75/25 in TFE/HFIP 50/50. Il primo termine è espresso in percentuale peso/volume e indica la concentrazione del polimero nella soluzione. Il contenuto relativo di PLLA e Collagene è espresso in rapporto peso/peso. Il contenuto dei solventi nelle soluzioni è espresso come rapporto volume/volume.

I bundles sono stati prodotti utilizzando una macchina da elettrofilatura (Spinbow Lab Unit, Spinbow S.r.l., Italia) con collettore in alluminio a rullo (diametro 150 mm) collegato a massa, tensione ago-collettore 22 kV e temperatura e umidità ambientali (Figura 17 A).

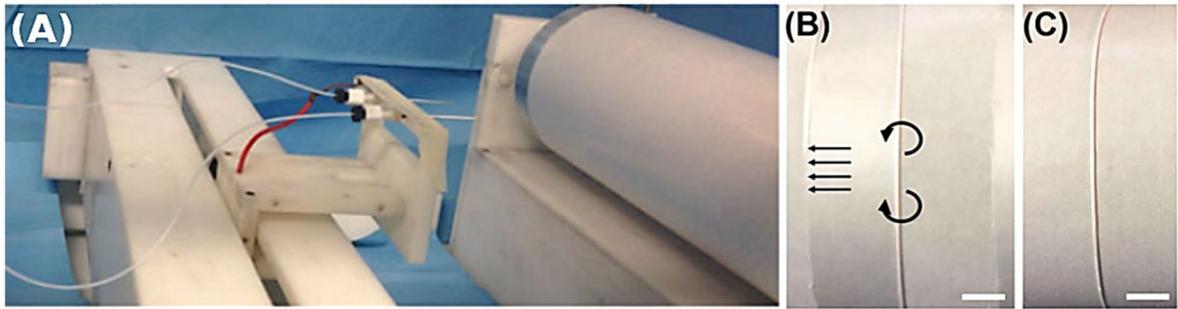


Figura 17. (A) *setup per l'elettrofilatura.* (B) *Lo strato di nanofibre è stato arrotolato sul rullo creando il bundle (scale bar 20 mm).* (C) *Bundle arrotolato sul rullo (scale bar 20mm)* (Immagini da Sensini et al. 2018 [68]).

Il rullo è stato posto a 200 mm di distanza dagli aghi imponendo una velocità di rotazione di 2900 giri/min. Per facilitare le operazioni di arrotolamento e rimozione del bundle il rullo è stato ricoperto con un foglio di polietilene fissato con nastro biadesivo.

La soluzione polimerica è stata inserita all'interno di due siringhe di vetro da 5 ml (Sigma Aldrich), azionate da una pompa (KDSscientific 200 series; Holliston, USA). La soluzione polimerica è stata spinta verso i due aghi (Hamilton; Reno, USA) da 0.51 mm collegati alle siringhe tramite tubi di Teflon, imponendo un flow rate di 0.5 ml/h. Gli aghi sono stati montati su una struttura in grado di muoverli parallelamente alla superficie del rullo, con velocità media 1500 mm/min (Figura 17A). Questa configurazione permette di ottenere uno strato di nanofibre dallo spessore più regolare.

Dopo 120 minuti di elettrofilatura è stato misurato lo spessore dello strato ottenuto, in modo da calcolare la larghezza necessaria per ottenere un bundle di diametro prefissato. Lo strato è stato quindi tagliato, ricavando una striscia di larghezza L che è stata a sua volta arrotolata sul rullo (Figura 17 B-C), ottenendo un bundle ad anello (Figura 18 A) con sezione di raggio r prefissato, noto lo spessore δ del tappetino di nanofibre. Per calcolare la larghezza della striscia è stata utilizzata la seguente formula:

$$L = \pi \cdot \frac{r^2}{\delta}$$

La formula è stata ottenuta eguagliando l'area della sezione del bundle (considerata come un disco di raggio r) all'area della sezione dello strato di nanofibre (considerato come un rettangolo di base L e altezza δ). La semplificazione è valida poiché il passo fra un

avvolgimento e il successivo risulta trascurabile rispetto allo spessore dello strato, perciò la sezione del tappetino e del bundle hanno aree circa equivalenti.

Il campione così ottenuto è stato rimosso dal rullo, attorcigliato una volta per ottenere una forma a 8, e infine ripiegato ottenendo due anelli sovrapposti (Figura 18 B). I capi della nuova struttura sono stati ricoperti da uno strato di Parafilm e da un ulteriore strato di nastro di carta, ottenendo una struttura formata da quattro bundle e due cappi ad ogni estremità. Tale struttura è stata poi fissata ad una macchina da elettrofilatura sviluppata dall'Università di Bologna, in grado di far ruotare lo scaffold durante l'elettrofilatura della camicia esterna (Figura 19). In seguito all'operazione di fissaggio dei cappi, ogni struttura è stata posta a 5 mm dal collettore piano e avvolta con una camicia in nanofibre, realizzata con la medesima soluzione di PLLA/Collagene 75/25 impiegata per produrre i bundles ad anello.

Per la filatura della camicia sono stati utilizzati una siringa di vetro da 5ml (Sigma Aldrich) azionata da una pompa a siringa (New Era Pump System NE-300; Farmingdale, USA) con flow rate 0.5, e un ago in acciaio da 0.51 mm (Hamilton; Reno, USA). Le nanofibre elettrofilate si sono depositate sul collettore piano (posto a 200mm di distanza) e di conseguenza anche sulla superficie del bundle, aderendovi elettrostaticamente. Ogni 5 minuti di elettrofilatura è stato azionato l'albero collegato ai due capi del bundle ad anello, imponendo una velocità di rotazione di 15 giri/min.

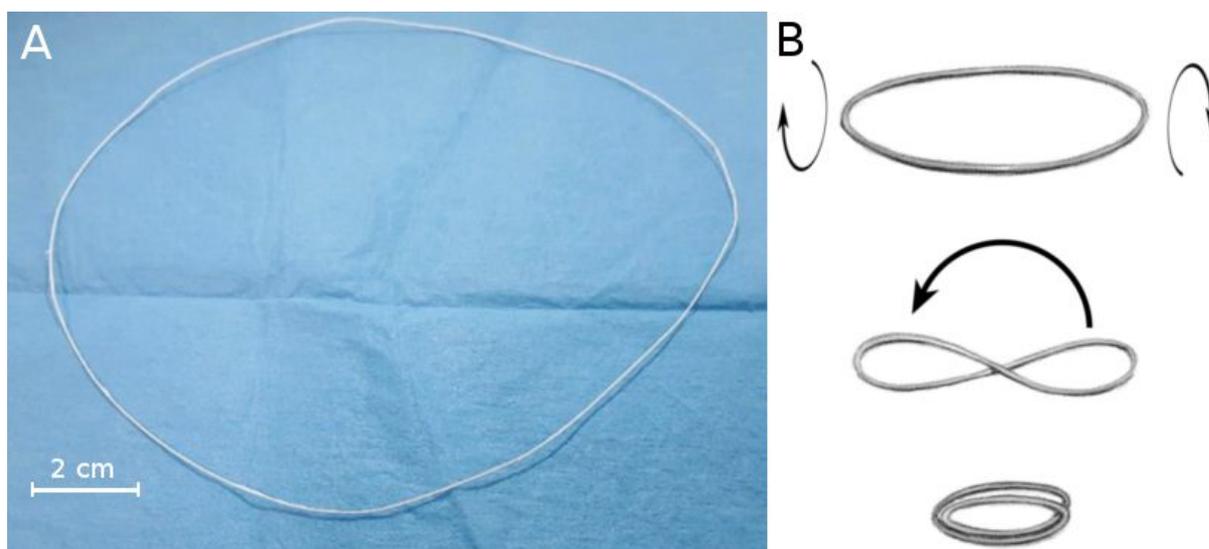


Figura 18. (A) *Bundle ad anello rimosso dal collettore.* (B) *Creazione dello scaffold gerarchico composto da quattro bundles: l'anello viene attorcigliato una volta per ottenere una forma ad 8, poi viene ripiegato su sé stesso per ottenere due anelli concentrici.*



Figura 19. Custom-made setup per l'elettrofilatura della camicia di nanofibre.

Ruotando lo scaffold, le nanofibre della camicia vengono tese e avvolte intorno alla sua superficie, mantenendo un pretensionamento. Il processo viene ripetuto finché la camicia non raggiunge lo spessore voluto, per una durata totale di circa 10 ore. Al termine dell'elettrofilatura è stato ottenuto uno scaffold gerarchico composto da quattro bundles stretti all'interno della camicia di nanofibre e munito di quattro cappi (due per ogni estremità) che rendono più agevoli i test meccanici (Figura 20).

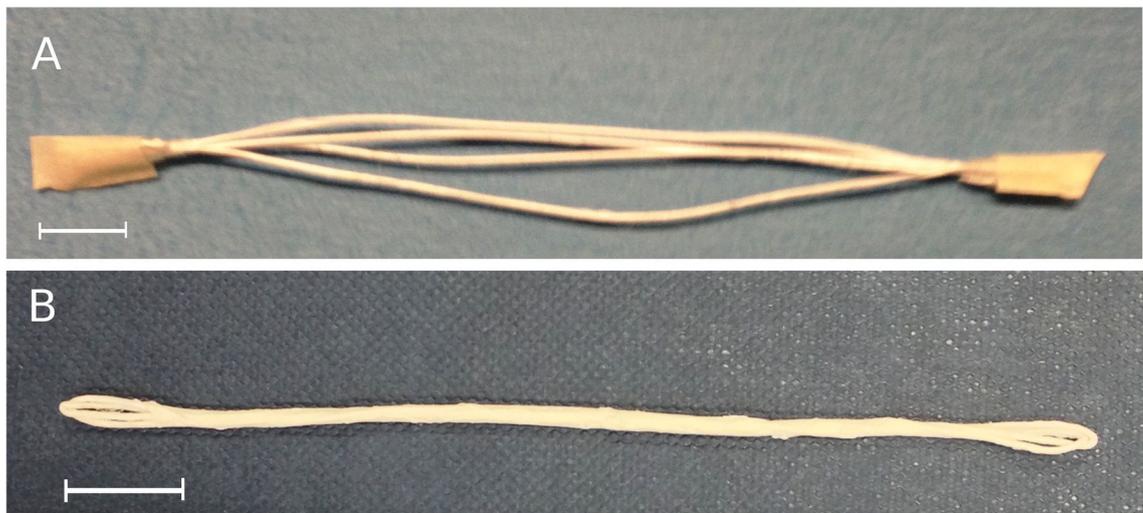


Figura 20. (A) Scaffold prima dell'elettrofilatura della camicia esterna (scale bar= 1 cm). (B) Scaffold composto da quattro bundle e avvolto nella camicia di nanofibre random (scale bar = 1 cm).

3.3 Reticolazione del collagene

I campioni sono stati sottoposti a processo di reticolazione con EDC e NHS 0.02 M in miscela di etanolo/acqua distillata 95/5 (volume/volume). La procedura è stata ottimizzata in base agli studi precedenti [89].

Dopo 24 ore, gli scaffolds sono stati prelevati dalla soluzione reticolante e lavati immergendoli in tampone fosfato (PBS) per 30 minuti, poi in acqua distillata per 2 ore (cambiata ogni 15 minuti). I campioni sono infine stati lasciati ad asciugare per 48 ore.

3.4 Caratterizzazione morfologica

3.4.1 Microscopia ottica

Ogni scaffold gerarchico destinato ai test meccanici è stato analizzato al microscopio per determinarne il diametro medio. Per ogni campione sono state acquisite tre immagini: due ai capi del bundle e una nel tratto centrale. Le immagini, con relativa scale bar, sono state processate con ImageJ al fine di ricavare 10 diversi diametri in ogni sezione fotografata, per un totale di 30 diametri per campione. I dati ottenuti sono infine stati processati in Excel per calcolare il diametro medio di ogni campione e la relativa deviazione standard.

3.4.2 MicroCT

Le scansioni microCT in alta definizione di scaffolds gerarchici completi e dei singoli bundles sono state acquisite con un tomografo (Versa 510 ZEISS, Pleasanton, CA, USA). Per eliminare gli artefatti causati dai micromovimenti, i campioni sono stati montati all'interno di una maschera in PET (di dimensioni 40 mm × 8 mm × 0.5 mm) con una finestra vuota centrale (20 mm × 5 mm). Dopo essere stati fissati (si veda il capitolo 3.5.2 *Fissaggio campioni per XCT e SEM*), gli scaffolds provenienti dalle colture cellulari statiche e dinamiche sono stati tagliati per ottenere campioni di lunghezza 36 mm e montati al centro della finestra. Per acquisire la struttura 3D di bundle e scaffolds completi sono stati utilizzati i seguenti parametri:

- **Bundle:** dimensione del voxel 0.4 μm , voltaggio 40kV, potenza 3W, corrente del tubo 75.5 μA , tempo di esposizione 14s.
- **Scaffolds gerarchici:** dimensione del voxel 1.6 μm , voltaggio 40 kV, potenza 3 W, corrente del tubo 49 μA , tempo di esposizione 10 s.

Le immagini sono state ricostruite utilizzando il software Scout-and-Scan Reconstructor (ZEISS) e visualizzate con XM 3DViewer (ZEISS).

Tramite MicroCT sono stati acquisiti dati sulla struttura 3D sia del bundle singolo reticolato che degli scaffolds interi (composti da quattro bundles avvolti nella camicia di nanofibre e reticolati). Le immagini sono inoltre state utilizzate per confermare la presenza di cellule sulla camicia esterna dei tendini.

3.4.3 Microscopia elettronica a scansione

Per l'analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM) sono stati utilizzati campioni precedentemente sottoposti all'analisi microCT: uno proveniente da coltura statica e uno da coltura dinamica. Ogni campione è stato diviso in due parti e fissato con nastro biadesivo su due differenti stub. Una metà di ogni scaffold è stata mantenuta integra al fine di analizzare la disposizione delle nanofibre appartenenti alla camicia esterna e la morfologia delle eventuali cellule presenti. La restante metà è stata aperta per consentire l'analisi morfologica dei bundles e delle cellule filtrate all'interno della camicia. Gli stub sono stati metallizzati con oro al fine di aumentarne l'assorbimento di elettroni e quindi migliorare l'immagine acquisita.

Per l'analisi è stato utilizzato un microscopio elettronico a scansione (Philips 515, Amsterdam, Paesi Bassi), con tensione di accelerazione di 15 kV.

Il diametro medio delle nanofibre è stato stimato utilizzando cinque immagini della camicia di nanofibre random. Utilizzando ImageJ, sono stati misurati 50 diametri utilizzando le nanofibre in primo piano. La procedura è stata ripetuta per ogni foto, per un totale di 250 misure. Il diametro medio e la relativa deviazione standard sono stati calcolati utilizzando Excel.

3.4.4 Analisi di direzionalità

Per analizzare la direzionalità delle nanofibre interne alla camicia, ai bundles, e allo scaffold gerarchico sono state utilizzate le immagini acquisite tramite SEM e MicroCT. In tutti i casi, le immagini sono state elaborate in ImageJ utilizzando l'apposito tool "Directionality" che stima l'orientamento delle nanofibre sfruttando la direzione del gradiente locale, secondo una procedura validata in letteratura [68].

I dati sulla direzionalità delle nanofibre sulla superficie della camicia sono stati ricavati analizzando una sequenza di 5 immagini SEM (ingrandimento 8000x) relative alla superficie esterna degli scaffolds gerarchici. Per analizzare la direzionalità delle nanofibre del singolo bundle e dei bundles interni allo scaffold invece sono stati utilizzati interi stack microCT, dopo averne eseguito il reslicing. Prima dell'analisi di direzionalità i modelli 3D sono stati riprocessati in ImageJ con il comando "Reslice", per analizzare le sezioni parallele all'asse longitudinale del campione (invece delle sezioni trasversali ottenute dalla microCT).

È stata dunque calcolata la percentuale di orientamento (media e deviazione standard) su ognuna delle 30 discretizzazioni dell'intervallo fra 0° e 90° (dove con 0° si è considerato un orientamento corrispondente all'asse verticale del campione, mentre con 90° un orientamento circolare o trasversale all'asse).

3.5 Caratterizzazione cellulare

3.5.1 Coltura cellulare

Prima dell'operazione di seeding, gli scaffolds sono stati sterilizzati immergendoli in etanolo 70% per un'ora sotto cappa, quindi lavati con tampone fosfato (PBS) per tre volte al fine di rimuovere i residui di etanolo. Infine, sono stati immersi per un'ora in ambiente di coltura liquido.

Ognuno dei 4 scaffolds gerarchici utilizzati per il test è stato seminato con 200.000 fibroblasti umani (Hs27) (tra il passaggio 4-6), seminati sulla superficie mediante una siringa contenente le cellule sospese in 350 μ L di terreno di coltura. Le cellule sono state incubate a 37°C in ambiente umido, con CO₂ 5% e coltivate per 7 giorni cambiando il terreno di coltura 2 volte durante il test. La soluzione contenente le cellule è stata seminata sugli scaffolds all'interno di una piastra di Petri sterile, seminando metà della soluzione su un lato, e metà sul lato opposto dello scaffold stesso. Dopo 45 minuti all'interno dell'incubatore a 37°C e 5% CO₂ gli scaffolds sono stati trasferiti in contenitori T25 contenenti 5 mL di terreno di coltura. Il terreno di coltura è composto da DMEM (glucosio ad alta concentrazione, GlutaMAX e acido piruvico) con 10% (v/v) di siero fetale bovino e 1% (v/v) di penicillina/streptomina.

Due scaffolds sono stati coltivati in ambiente statico, mentre gli altri due sono stati inseriti all'interno di un bioreattore commerciale MCB1 CellScale (Waterloo, ON, Canada), all'interno di 150 ml di terreno di coltura.

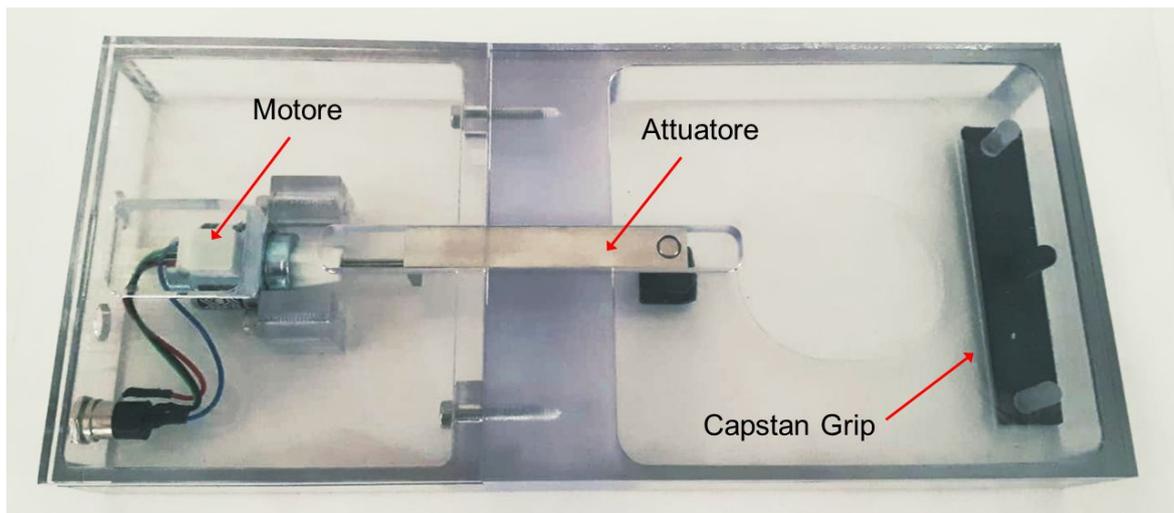


Figura 21. Bioreattore MCB1CellScale utilizzato per le culture cellulari dinamiche. Dimensioni reali 22x10x4 cm. Il bioreattore è stato riadattato per ospitare i tendini sostituendo la maschera originale con capstan grip stampate in 3D.

Il bioreattore è stato modificato per ospitare i campioni, sostituendo la maschera originale con capstan grip stampate in 3D a cui agganciare i capi dello scaffold (Figura 21). I campioni sono stati sottoposti a cicli di sollecitazione ciclica imponendo uno spostamento dell'attuatore di 4 mm (circa 5% di deformazione), con una frequenza di 1 Hz per un'ora, per un totale di 2 sessioni di stimolazione nel corso dei 7 giorni (7200 cicli di carico e scarico in totale). Con il termine "campione statico" si farà riferimento alle colture cresciute all'interno di una peltri senza sollecitazioni esterne, con "campione dinamico" ci si riferirà invece alle colture sottoposte a cicli di trazione nel bioreattore. Dopo sette giorni di seeding, i campioni da analizzare sono stati fissati per 48 ore in PBS con 4% PFA a 4°C, prima di essere preparati per le analisi.

3.5.2 Fissazione campioni per XCT e SEM

Per l'analisi microCT e SEM ogni campione è stato lavato tre volte con PBS e fissato nuovamente con tetrossido di osmio per 60 minuti. I campioni per l'analisi istologica sono stati immersi due volte in EtOH 70% (per 60 minuti ogni volta), quindi trasferiti in cassette e disidratati in etanolo 80%, 85%, 90%, 95% e 100% (v/v) (60 minuti per ogni fase, con un doppio passaggio finale in 100%). I campioni sono poi stati disidratati in acetone per 20 minuti. Gli scaffolds gerarchici sono poi stati asciugati chimicamente con due passaggi consecutivi in

esametildisilazano (HMDS) ed etanolo in differenti percentuali (v/v): (i) HMDS:EtOH = 1:2 (v/v) and (ii) HMDS:EtOH= 2:1 (v/v) per 20 minuti ciascuno. In fine si è provveduto ad un ultimo passaggio in HMDS 100% fino a completa evaporazione.

3.5.3 Istologia

I campioni sono stati poi sottoposti a procedura di clearing (per 90 minuti) due volte e immersi in cera di paraffina (per 120 minuti), infine immersi in paraffina riscaldata a 60°C. Dopo la solidificazione della paraffina, i campioni sono stati sezionati in strati spessi 5 µm, parallelamente all'asse longitudinale dello scaffold. Gli strati sono stati posizionati su vetrini ricoperti di lisina e lasciati asciugare su una piastra riscaldata (a 42°C) per una notte, in seguito sono stati sottoposti a colorazione con ematossilina/eosina. Per il processo di colorazione le sezioni sono state reidratate con xilene (v/v) 100% (1 minuto), 95% (30 secondi), 70% (30 secondi), 50% (30 secondi) e infine in acqua distillata (30 secondi). Su ogni vetrino è stata aggiunta una goccia di ematossilina per 10 minuti e lavati con acqua deionizzata. Sono stati poi differenziati in alcol acido (v/v) 1% (5 secondi) e risciacquati con acqua deionizzata. Quindi, i campioni sono stati colorati con eosina (5 minuti) e lavati nuovamente. Infine, i campioni sono stati disidratati e ritrattati con xilene come precedentemente riportato.

I vetrini sono stati osservati in microscopia ottica a luce riflessa per confermare la presenza di cellule negli scaffolds. Per l'acquisizione delle immagini è stato utilizzato un microscopio ottico a luce riflessa (Diaplan Leica, Wetzlar, Germania) munito di telecamera e collegato a computer (Figura 22)

3.6 Caratterizzazione meccanica

Per i test meccanici ciclici sono stati utilizzati quattro scaffolds gerarchici.

Ciascun campione è stato pesato con una bilancia da laboratorio con gabbietta antivento (risoluzione 0.01 mg). Ogni misura è stata ripetuta tre volte per minimizzare l'errore. Il peso medio e la deviazione standard di ogni campione sono stati calcolati con Excel.

La lunghezza dei campioni è stata misurata utilizzando ImageJ, fotografando il campione insieme ad una misura di riferimento (da utilizzare come scale bar). Non è stato possibile misurare lo scaffold in modo tradizionale con righello o con calibro a causa della curvatura e della fragilità del campione non idratato.

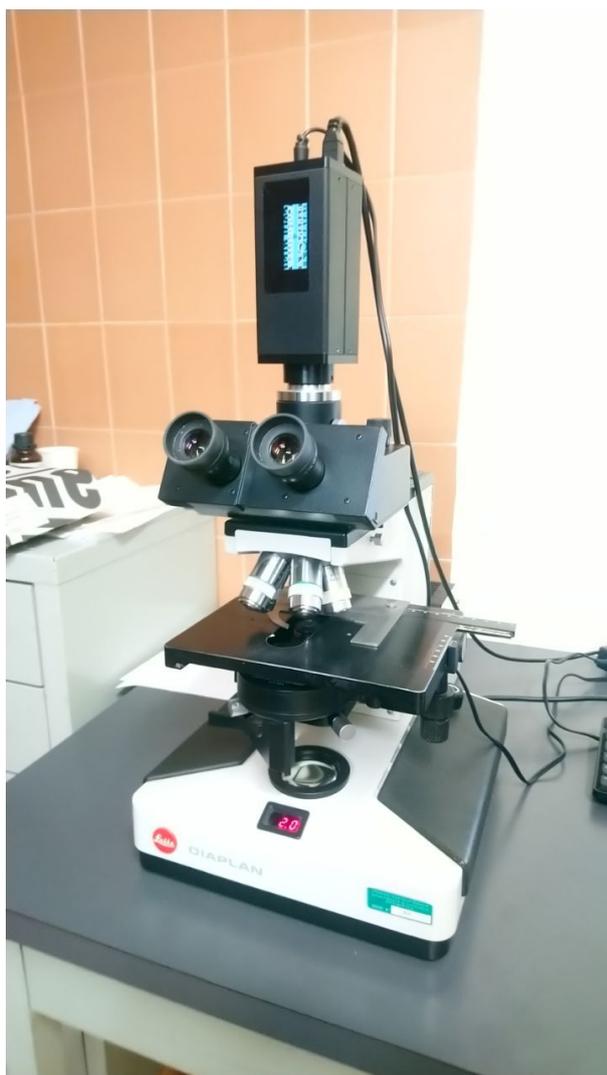


Figura 22. Microscopio ottico a luce riflessa Leica Diaplan, utilizzato per lo studio istologico degli scaffold seminati di cellule (statici e dinamici).

Il diametro medio è stato stimato come precedentemente indicato (calcolando il valor medio di 30 diametri differenti per campione).

La densità di ogni campione (composto di una miscela di PLLA e Collagene reticolata) è stata calcolata dividendone la massa per il relativo volume. Il volume è stato stimato immergendo il campione in un cilindro graduato. Al termine della procedura la densità della miscela è stata stimata come media delle densità dei 4 campioni. Non è stato possibile determinare la densità analiticamente a partire dalle densità nominali di PLLA e collagene poiché non si conosce l'effetto della reticolazione sulla densità della miscela finale.

Per i test meccanici è stata utilizzata una macchina per prove (8032 Instron, Norwood, Massachusetts, Stati Uniti) con cella di carico da 1kN in classe 0.5. Prima della prova ogni campione è stato idratato in soluzione salina 0.9% (Eurospital, Trieste, Italia) per 2 minuti. Al termine della procedura lo scaffold è stato inserito in una vasca riempita di soluzione salina e munita di un apposito gancio (diametro = 4 mm) a cui assicurare l'estremità inferiore del campione. La vasca serve a mantenere il campione idratato durante tutta la durata del test e ad evitare che le sue proprietà meccaniche cambino a causa della disidratazione. L'estremità superiore è stata invece assicurata ad un secondo gancio (diametro = 4 mm) collegato alla cella di carico (Figura 23).



Figura 23. Setup sperimentale per le prove meccaniche. L'attuatore sottostante muove vasca e ancoraggio inferiore mettendo in trazione il campione, collegato alla cella di carico posta nella parte superiore (scale bar 10 cm).

Ogni scaffold è stato preconditionato sottoponendolo manualmente a due cicli di carico e scarico, imponendo uno spostamento di 4 mm dell'attuatore e scaricando in seguito il campione fino a riportarlo ad un precarico di 0.5 N.

Al termine del preconditionamento sono state eseguite le prove cicliche. Ogni provino è stato sottoposto a trazione ciclica in controllo di spostamento, sollecitandolo con una forma d'onda sinusoidale di ampiezza 4 mm (che corrisponde circa ad una deformazione del 5%) e frequenza 1 Hz. Durante le prove cicliche, lo scaffold gerarchico si deforma permanentemente a causa della sua natura viscoelastica. Il campione, a causa del creep, subisce un allungamento e rimane scarico per parte della corsa. Per rimediare a ciò, ogni mille cicli di carico e scarico, la prova è stata interrotta per riportare il campione fino a una tensione di precarico di 0.5 N, imponendo quindi un ulteriore allungamento al provino. Il progressivo allungamento serve a:

- Rimediare al creep subito dal provino e ripristinare il carico minimo, simulando quindi il controllo fisiologico del muscolo.
- Portare il campione a rottura, ricavando informazioni sulla deformazione massima dello scaffold e sulle modalità di rottura.
- Valutare la risposta massima in tensione del provino a diverse deformazioni, sia in termini apparenti che in termini netti.

Con il software di acquisizione sono stati registrati i picchi e i minimi del segnale di carico e la relativa posizione dell'attuatore. I dati acquisiti sono stati elaborati in Excel per determinare tensioni nette, tensioni apparenti, deformazione massima e minima del provino e inviluppo dei picchi di tensione. La tensione apparenti (o apparente) viene calcolata scalando le tensioni sull'area della sezione trasversale del provino. Tuttavia, essendo il campione composto da nanofibre fra le quali sono presenti spazi vuoti, l'area reale su cui agisce la forza applicata è minore di quella della sua sezione. La tensione apparente risulta perciò sottostimata rispetto alla tensione effettiva agente sulle nanofibre, per questo motivo è stata calcolata anche la tensione netta, riferita alla frazione di volume degli scaffolds.

Per i calcoli sono state utilizzate le seguenti formule:

Tensione apparente (o lorda): $\sigma_{apparente} = \frac{F}{A}$

Tensione netta:
$$\sigma_{\text{apparente}} = \frac{\sigma_{\text{apparente}}}{\frac{m}{A \cdot L_0 \cdot \rho}}$$

Deformazione:
$$\epsilon = \frac{P_{x,n} - P_{0,1}}{L_0}$$

Dove F è il carico registrato dalla macchina, A è l'area della sezione del provino, L_0 è la lunghezza iniziale, ρ è la densità, m è la massa, $P_{0,1}$ è la posizione dell'attuatore corrispondente al primo minimo registrato per il carico, $P_{x,n}$ è la posizione dell'attuatore al ciclo x del pacchetto n -esimo.

La tensione a regime è stata calcolata dividendo il valor medio degli ultimi 10 valori (per ogni pacchetto di cicli) per il valore di tensione iniziale (ovvero il valore massimo del pacchetto).

4. Risultati e discussione

4.1 Caratterizzazione morfologica

4.1.1 Microscopia ottica

Le misure effettuate tramite microscopio ottico hanno confermato che il metodo utilizzato per la produzione degli scaffolds gerarchici consente di realizzare campioni di simile diametro. Gli scaffolds analizzati risultavano avere diametro medio 1.36 ± 0.09 mm. La camicia esterna inoltre risultava essere omogenea.

4.1.2 Microscopia elettronica a scansione

Il diametro medio delle nanofibre era 360 ± 60 nm, mentre il diametro medio dei bundles era 550-650 μ m. Dalle immagini ottenute tramite SEM si è notato inoltre che le nanofibre di camicia e bundles risultavano omogenee ed esenti da difetti morfologici quali beads (Figura 24 A).

Le dimensioni delle nanofibre e dei bundles erano dello stesso ordine di grandezza di fibrille e fascicoli di collagene presenti in tendini e legamenti [3].

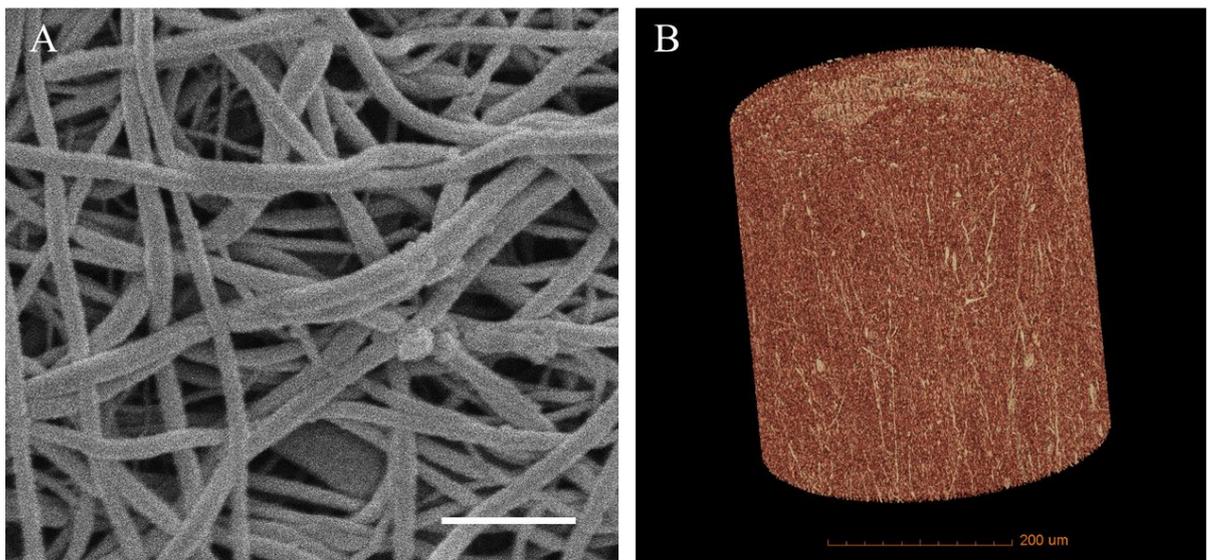


Figura 24. (A) Immagine SEM della camicia di nanofibre esterna (8000x, scale bar 2 μ m)
(B) Scansione del bundle singolo ottenuto tramite microCT.

4.1.3 Analisi di direzionalità

L'analisi di direzionalità ha messo in evidenza che le nanofibre della camicia esterna risultavano uniformemente orientate nel range tra 0° - 90° , con una leggera direzionalità circonferenziale. Infatti, il 51% di nanofibre risultavano orientate in un intervallo di angoli compreso fra 51° e 90° rispetto all'asse longitudinale del bundle. L'analisi condotta sulle immagini acquisite tramite microCT (Figura 24 B) ha invece evidenziato che le nanofibre all'interno del bundle singolo erano prevalentemente orientate assialmente, con più del 50% delle fibre orientate entro un intervallo di 0° - 12° dall'asse longitudinale del campione e con una dispersione simil-Gaussiana. Per quanto riguarda lo scaffold gerarchico i bundles interni erano prevalentemente orientati assialmente con più del 60% delle fibre orientate fra 0° - 3° e una progressiva dispersione simil-Gaussiana (Figura 25).

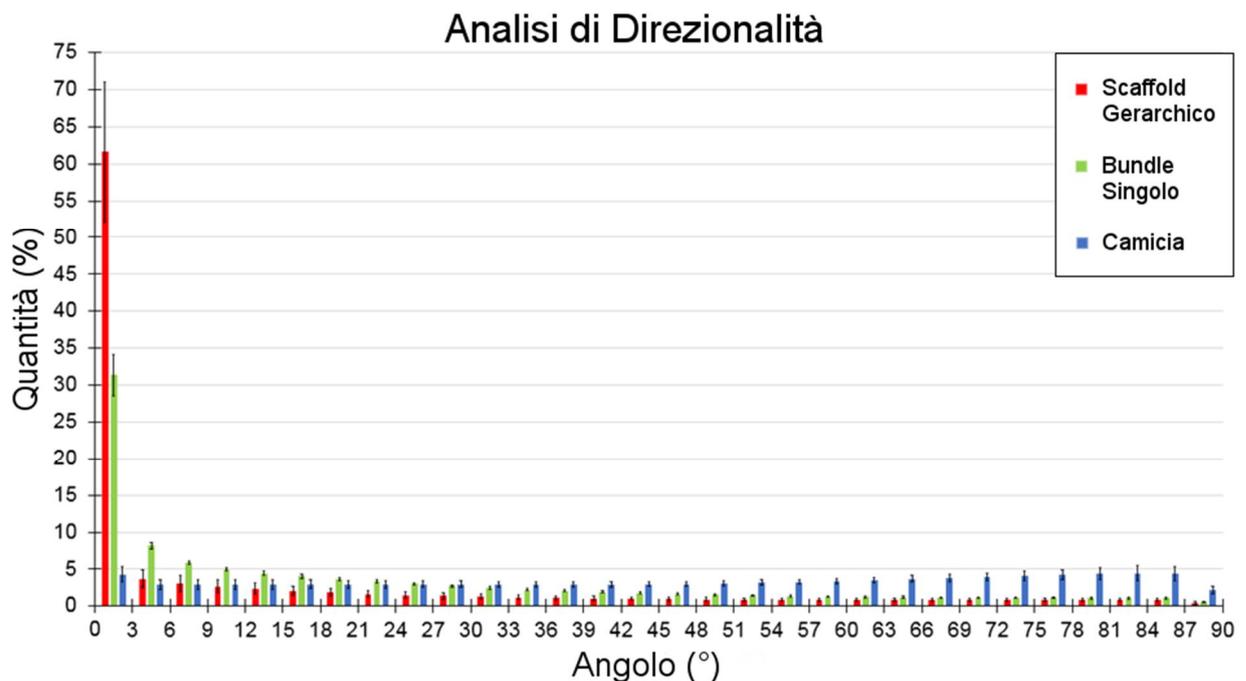


Figura 25. Risultati dell'analisi di direzionalità. In ascissa sono riportati gli angoli rispetto alla verticale, in ordinata è riportata la percentuale di fibre orientate secondo ogni range di angoli. 0° indica che le nanofibre sono parallele all'asse longitudinale del bundle, 90° che sono trasversali. I dati in rosso sono relativi all'allineamento dei bundles all'interno dello scaffold gerarchico. I dati in verde sono relativi alle nanofibre interne al singolo bundle. I dati in blu sono relativi alle nanofibre della camicia esterna.

L'orientamento delle nanofibre all'interno del bundle e dello scaffold gerarchico è risultato essere in accordo con il fisiologico orientamento delle fibrille e dei fascicoli in tendini e legamenti [7, 9].

La leggera direzionalità circonferenziale riscontrata sulle nanofibre della camicia è dovuta al processo di elettrofilatura della camicia stessa (brevetto [90]). Modulando i tempi di stasi, rotazione, e velocità di rotazione dello scaffold durante il processo di filatura della camicia, è stato possibile modificare l'orientamento delle nanofibre della camicia stessa.

L'analisi di direzionalità dello scaffold gerarchico ha messo in evidenza che i bundles e la maggior parte delle nanofibre, ad eccezione di quelle della camicia, sono orientati parallelamente al suo asse longitudinale.

Occorre sottolineare che in questa analisi sono stati confrontati dati estratti da immagini SEM (camicia) e da microCT (bundle e camicia), poiché è difficile ottenere dati riguardo alla direzionalità della sola camicia esterna a partire dal modello 3D della microCT. Nel confrontare le tre serie di dati è stato tenuto conto delle differenze tra le due modalità di acquisizione. L'analisi SEM è stata svolta infatti su una porzione ridotta dello scaffold, in cui le nanofibre sono però ben visibili, ciò minimizza la sottostima della direzionalità delle nanofibre. L'analisi microCT invece fornisce dati sull'intero volume del campione, considerando perciò anche eventuali artefatti locali dovuti a difetti introdotti durante l'arrotolamento della camicia o a grumi prodotti durante la fase di elettrofilatura (gocce di materiale non elettrofilato).

4.2 Caratterizzazione meccanica

Gli scaffolds avevano un peso medio di 42.90 ± 0.71 mg e lunghezza media 90.32 ± 3.83 mm.

Durante i cicli di carico e scarico, i campioni hanno raggiunto un picco di tensione apparente di 7.11 ± 1.01 MPa, con corrispondente deformazione $8.64 \pm 2.11\%$. In termini netti, ovvero normalizzando le tensioni apparenti per la frazione di volume del campione, il picco massimo medio era 14.9 ± 1.5 MPa. I picchi registrati nel carico sono diminuiti in modo logaritmico all'aumentare del numero dei cicli, fino ad arrivare ad una tensione a regime che ammontava al $60.8 \pm 3.8\%$ della tensione massima iniziale (Figura 26).

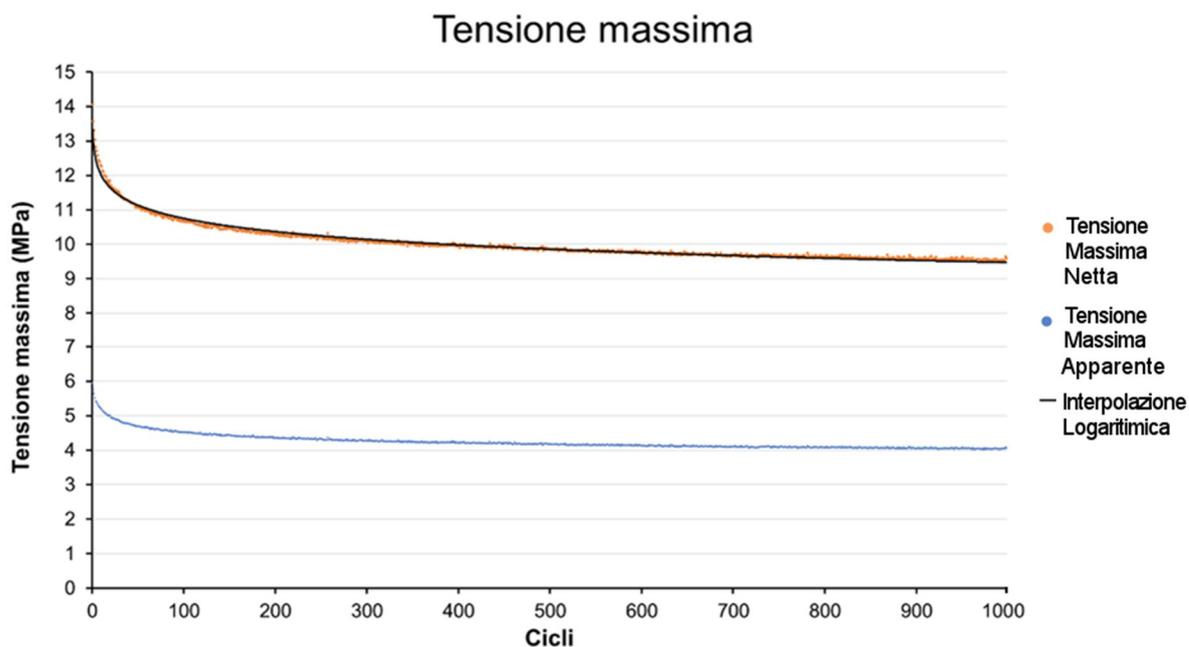


Figura 26. Tensioni massime apparenti (blu) e nette (arancio) registrate all'aumentare dei cicli di carico e scarico, tutti i punti corrispondono a deformazione 12.3%. La curva in nero è una funzione logaritmica fittata sulle tensioni massime nette, che dimostra che i picchi massimi di tensione decrescono in modo logaritmico.

Tutti i campioni testati si sono rotti in corrispondenza di uno dei cappi per concentrazione di tensione. La rottura di uno dei cappi tuttavia non ha determinato il cedimento improvviso dell'intero campione (Figura 27). Gli scaffolds hanno mostrato il primo cedimento a 2243 ± 1769 cicli, continuando a sopportare da un minimo di 1200 ad un massimo di 2800 cicli di carico e scarico prima di raggiungere la completa rottura (mediamente avvenuta a 4213 ± 2377 cicli complessivi). Tale comportamento potrebbe essere spiegato dal fenomeno di mutua reticolazione tra le nanofibre all'interfaccia tra camicia e bundles, e fra le interfacce dei bundles stessi. Questo fenomeno, riducendo gli scorrimenti tra gli elementi interni allo scaffold, ha permesso al bundle (che si ricorda essere un unico anello circolare piegato su sé stesso), di comportarsi effettivamente come due bundles distinti, evitando l'immediata rottura del campione in seguito al danneggiamento di uno dei cappi. Inoltre, un secondo contributo al verificarsi di questo effetto è dovuto al pretensionamento della camicia esterna che raggruppa e compatta ulteriormente il bundle all'interno dello scaffold, limitando lo scivolamento.

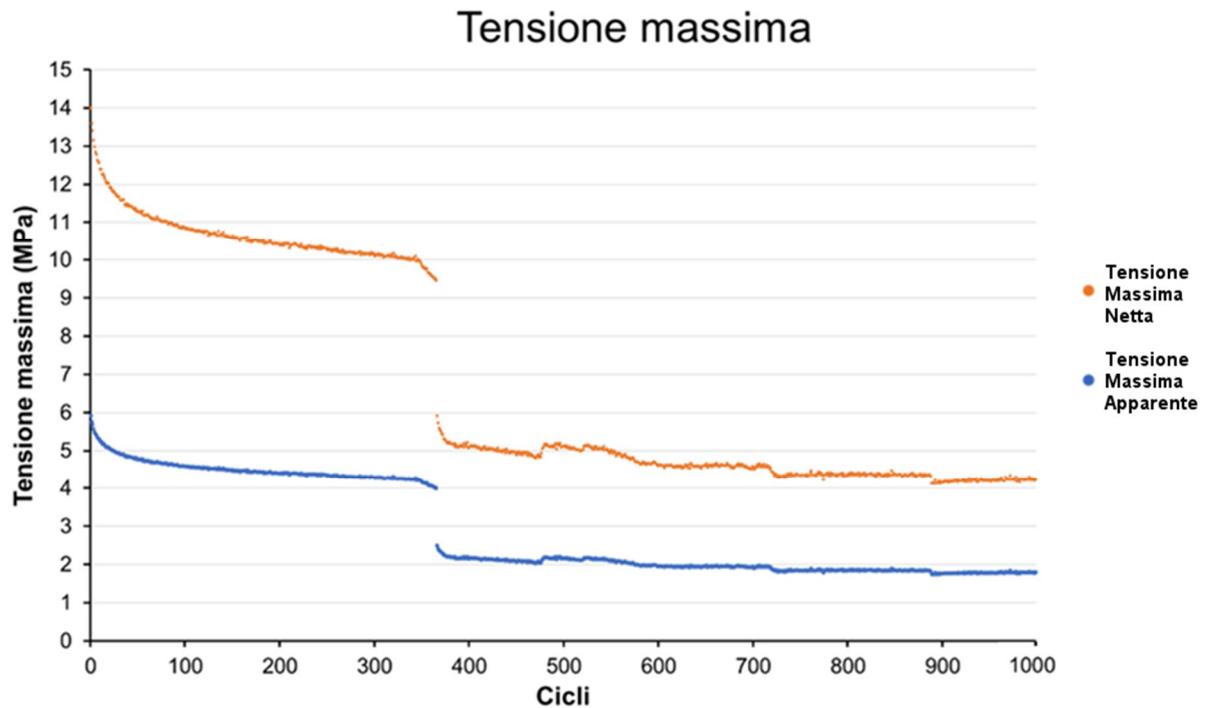


Figura 27. Esempio di rottura iniziale del campione. Tutti i punti corrispondono a deformazione 14.3%. In seguito alla rottura di uno dei capi la tensione massima è calata a circa il 50% del valore prima della rottura.

La tensione apparente di rottura iniziale era 5.13 ± 2.12 MPa con deformazione 10.9 ± 3.5 %. La rottura completa è avvenuta ad una tensione apparente di 3.06 ± 1.43 MPa a deformazione 16.81 ± 6.10 % (Figura 28). In termini di tensioni nette, la rottura iniziale è avvenuta a 10.8 ± 3.7 MPa mentre quella completa a 6.45 ± 2.52 MPa.

In *Tabella 1* sono riassunti i dati meccanici ricavati dai test ciclici.



Figura 28. Esempio di rottura completa del campione. La rottura è avvenuta in tutti i casi in corrispondenza dei capi, per concentrazione di tensioni.

	<i>Numero Cicli</i>	<i>Tensione Apparente (MPa)</i>	<i>Tensione Netta (MPa)</i>	<i>Deformazione (%)</i>
<i>Primo cedimento</i>	2243 ± 1769	5.13 ± 2.12	10.8 ± 3.7	10.9 ± 3.5
<i>Rottura completa</i>	4213 ± 2377	3.06 ± 1.43	6.45 ± 2.52	16.8 ± 6.1
<i>Massimi di prova</i>	-	7.11 ± 1.01	14.9 ± 1.5	8.64 ± 2.11

Tabella 1. Tabella riassuntiva dei dati ricavati dai test meccanici ciclici, riportati come valore medio ± deviazione standard. I dati relativi a “Primo cedimento” sono riferiti alla rottura di uno dei capi. Nella riga “Massimi di prova” è riportato il valore massimo di tensione (netta e apparente) registrato fra tutti i cicli di carico e scarico di ogni provino, con relativa deformazione.

Gli scaffolds analizzati in questo studio sono composti da nanofibre circondate da aria, considerarli una struttura piena (come si fa con i tendini e i legamenti veri) costituisce quindi una approssimazione non veritiera. L’area reale su cui agiscono le forze applicate allo scaffold è infatti inferiore all’area della sua sezione trasversale. Per questo motivo sono state calcolate sia le tensioni nette (riferite alla frazione di volume del campione) che le tensioni apparenti (calcolate sull’area lorda della sezione del campione). La stima della densità dello scaffold utilizzata per il calcolo della frazione di volume tuttavia non era precisa. Dalle misurazioni di massa e volume la densità media della miscela di collagene e PLLA reticolati era 0.67 ± 0.14 mg/mm³, quindi è stata probabilmente stimata per difetto. Le tensioni reali sviluppate dal materiale potrebbero essere maggiori delle tensioni nette stimate in questo studio.

Ogni punto riportato sul grafico corrisponde alla tensione sviluppata dallo scaffold alla stessa deformazione, ovvero quella massima imposta dall’attuatore. Il materiale ha evidenziato quindi una natura viscoelastica poiché, a parità di deformazione, le tensioni sono diminuite con andamento logaritmico all’aumentare dei cicli.

Lo scaffold ha supportato picchi di tensione massima maggiori della tensione di rottura iniziale, quindi si può dire che la struttura ha ceduto prevalentemente a causa della

deformazione eccessiva, e non del carico massimo. Comparando le caratteristiche meccaniche dello scaffold gerarchico con quelle dei tendini veri si è notato inoltre che lo scaffold è più deformabile del tessuto tendineo. Il campione ha resistito mediamente fino ad una deformazione del $16.81 \pm 6.10\%$ prima di arrivare a rottura completa, mentre il tendine si rompe in media per deformazioni dell'8% [22, 23]. La deformabilità dello scaffold era in linea con le proprietà meccaniche dei legamenti che hanno deformazioni massime comprese fra 8-70% [22, 23]. L'andamento logaritmico dei massimi di tensione era in linea con i dati ricavati per il semitendinoso umano, la cui risposta in tensione tende a diminuire fino al $64.89 \pm 12.56\%$ del carico iniziale quando sottoposto a 900 cicli di carico e scarico [91]. Non è invece possibile comparare i carichi di rottura poiché sono stati eseguiti solo test ciclici, e non rampe monotone crescenti fino a rottura.

4.3 Caratterizzazione cellulare

4.3.1 Morfologia cellulare (tramite microCT)

Nelle immagini microCT la struttura dello scaffold era simile a quella dei tendini in vivo, grazie all'organizzazione gerarchica e all'orientamento delle nanofibre [1]. Nelle acquisizioni di entrambi i campioni statici e dinamici è stata evidenziata la presenza di numerose cellule sulla camicia esterna dei campioni (Figura 29). Le cellule sono state riconosciute grazie alla colorazione più chiara, dovuta al maggior assorbimento dei raggi-x a seguito del processo di disidratazione. Nelle immagini microCT del campione statico (Figura 29 A) si è notato che le cellule sulla camicia sono particolarmente allungate in direzione circonferenziale, nonostante lo scaffold non sia stato sottoposto a nessuna sollecitazione meccanica. Ciò può essere dovuto tensioni circonferenziale che agiscono sulle nanofibre della camicia. Tali tensioni possono essere dovute ad un pretensionamento in parte indotto dal processo produttivo (in cui la camicia viene fisicamente stirata per avvolgere i bundles), e in parte dall'aumento di volume dei bundles interni agli scaffolds in fase di reidratazione (in ambiente di coltura). Tale aumento di volume mette inevitabilmente in trazione le nanofibre della camicia, inducendo i fibroblasti ad allungarsi circonferenzialmente allo scaffold.

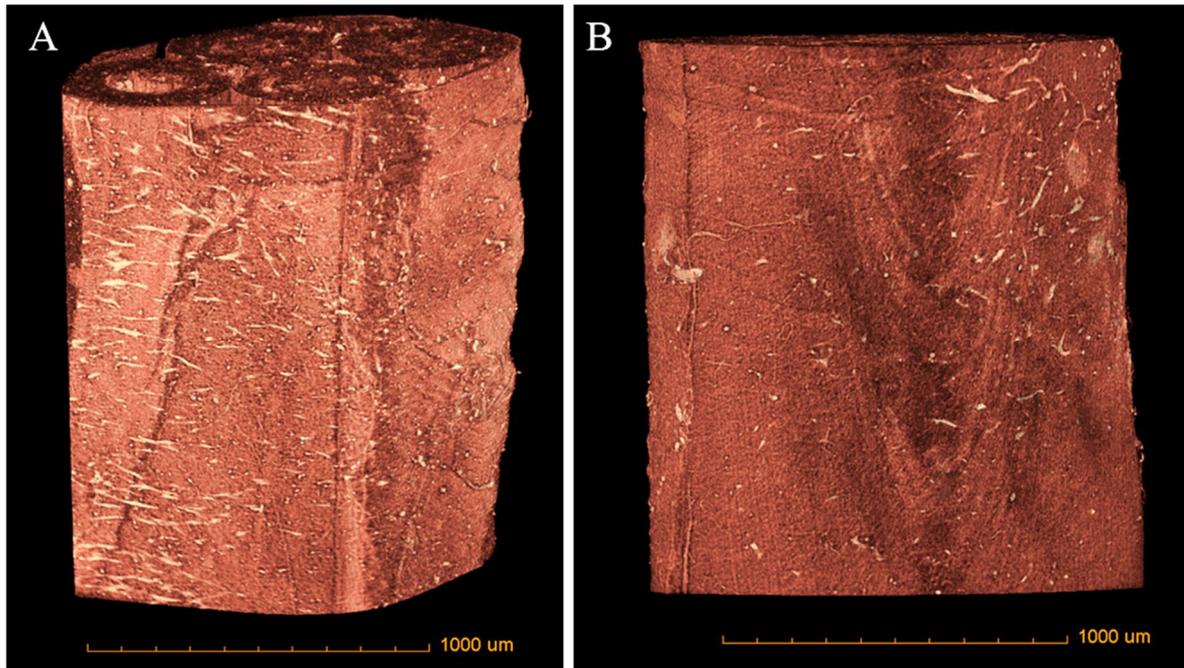


Figura 29. Modello 3D ottenuto tramite microCT di: (A) campione statico; (B) campione dinamico. Nelle immagini sono visibili le cellule cresciute sulla superficie esterna dello scaffold, ricavate tramite apposita operazione di soglia e evidenziate in chiaro per distinguerle dalle nanofibre.

Nei campioni dinamici, invece, le cellule hanno assunto una morfologia filiforme con la tendenza ad allinearsi nella direzione dell'asse longitudinale degli scaffolds, nonostante la camicia sia formata da nanofibre con una leggera direzionalità circonferenziale (Figura 29 B). Tale fenomeno potrebbe essere stato causato da uno stiramento della camicia, indotto dalla sollecitazione assiale del bioreattore e massimizzato dalla reticolazione del collagene. Infatti, durante il processo di reticolazione le nanofibre all'interfaccia tra bundles e camicia potrebbero essersi reticolate tra loro, minimizzando lo scorrimento tra camicia e bundles interni e favorendo il trasferimento dei carichi assiali (in direzione longitudinale) del bioreattore verso la camicia.

Non è stato invece possibile individuare cellule fra i bundles interni, data la difficoltà nel distinguere eventuali fibroblasti dalle nanofibre circostanti. Ciò è principalmente dovuto alla morfologia fusiforme dei fibroblasti e alla loro direzione prevalentemente assiale, solidale all'orientamento delle nanofibre.

Questi effetti nella distribuzione delle cellule non sono stati documentati precedentemente in letteratura [23]. Ad oggi, solo lo studio di Bradley et al. è riuscito a visualizzare tramite

microCT fibroblasti coltivati su materiali elettrofilati [92]. Tuttavia, per tale studio, al fine di facilitare l'individuazione delle cellule, sono stati utilizzati campioni di microfibre disposte in maniera casuale di acido Polilattico-co-glicolico (PLGA) (di diametro medio 4 μm), scansionati con un voxel size di 150 nm. Ciò ha permesso di massimizzare l'individuazione di fibroblasti e fibre. Inoltre, il PLGA presenta un livello di attenuazione dei raggi-x più elevato rispetto alla componente cellulare.

Nel caso del presente studio, la presenza del collagene all'interno delle fibre ha conferito allo scaffold livelli di attenuazione simili a quelli della componente cellulare. Ciò ha reso più difficile l'individuazione dei fibroblasti all'interno della struttura fortemente anisotropa formata dalle nanofibre interne ai bundles. Inoltre, il diametro medio delle nanofibre era un ordine di grandezza inferiore rispetto al diametro delle microfibre dello studio di Bradley, ciò ha reso più complessa la procedura di soglia per la distinzione di fibre e cellule.

4.3.2 Morfologia cellulare (tramite SEM)

Le immagini ricavate tramite SEM hanno confermato i risultati ottenuti dalle scansioni microCT, evidenziando la presenza di cellule dalla superficie rugosa sulla camicia di entrambi i campioni statici e dinamici. Inoltre, è stata verificata la presenza di fibroblasti anche sulla superficie dei bundles interni agli scaffolds gerarchici.

L'analisi SEM ha evidenziato che i fibroblasti sulla superficie dei campioni statici (Figura 30 A) avevano citoplasma piatto e allungato circonferenzialmente rispetto agli scaffolds. I fibroblasti sulla superficie dei campioni dinamici erano invece più fusiformi (non piatti) e tendevano ad allinearsi in direzione longitudinale (Figura 30 B).

Le cellule filtrate all'interno dello scaffold avevano conformazione simile in entrambe le culture, ovvero allungata nella stessa direzione dell'asse del bundle e delle nanofibre. Le immagini SEM hanno infine evidenziato che, sui bundles dei campioni dinamici, i fibroblasti sembravano assumere una morfologia più filiforme e allungata rispetto a quella degli statici. La rugosità delle cellule era compatibile con la procedura di fissazione che prevedeva la disidratazione dei fibroblasti per consentirne l'osservazione tramite SEM e microCT.

La presenza di fibroblasti all'interno dei bundles ha suggerito che le cellule siano riuscite a migrare dall'esterno della struttura (dove sono state seminate) fino al suo interno, conservando quindi la loro motilità.

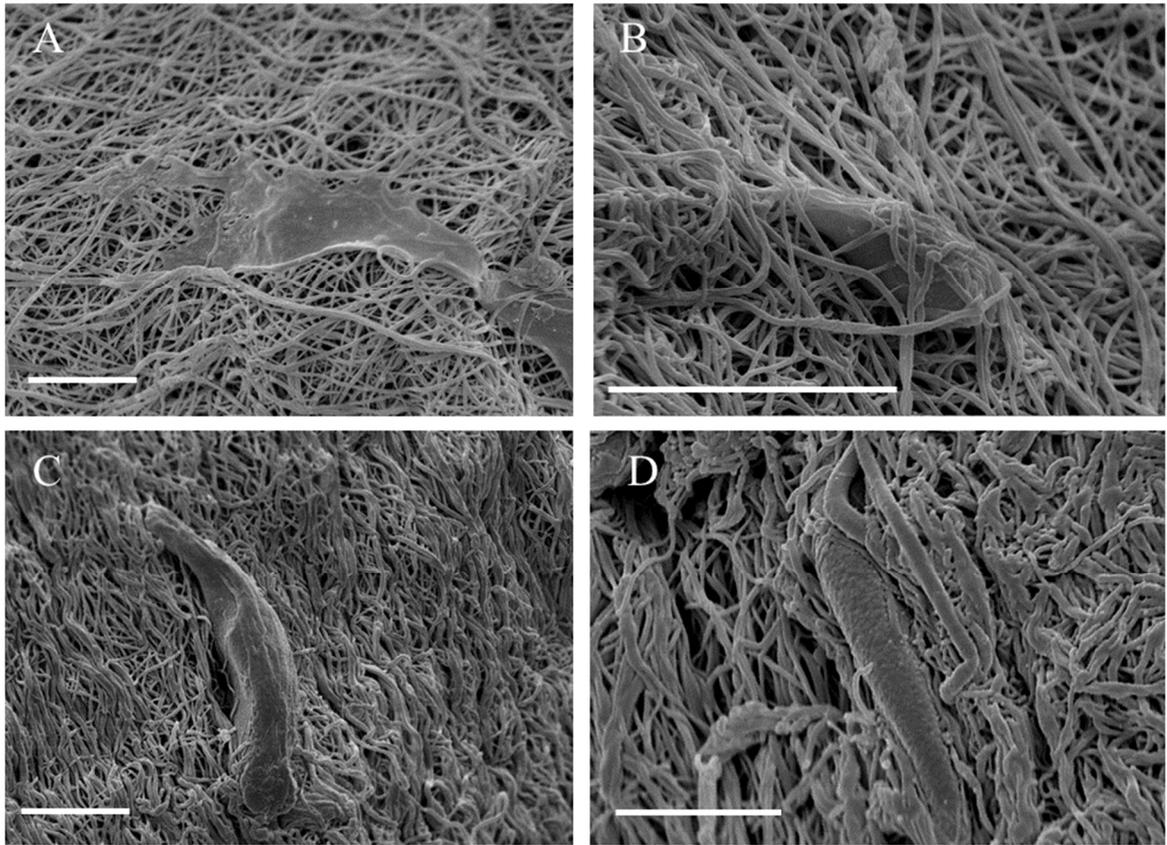


Figura 30. Immagini SEM di: **(A)** cellula sulla camicia del campione statico (2000x, scale bar 10 μ m); **(B)** cellula sulla camicia del campione dinamico (3000 x, scale bar 20 μ m); **(C)** cellula su bundles all'interno del campione statico (2000x, scale bar 10 μ m); **(D)** cellula su bundles all'interno del campione dinamico (4000x, scale bar 8 μ m).

4.3.3 Morfologia cellulare (tramite istologie)

I vetrini istologici hanno confermato i risultati ottenuti dalle immagini microCT e SEM, indicando la presenza di cellule sia sulla camicia esterna che all'interno dello scaffold gerarchico (Figura 31).

La sezione delle cellule sulla camicia degli scaffolds statici e dinamici era più corta della sezione delle cellule interne ai bundles. Nei campioni statici (Figura 31 A) le cellule avevano un citoplasma maggiormente espanso in direzione assiale rispetto a quelle nei campioni dinamici (Figura 31 B). Questa morfologia ha suggerito che i fibroblasti cresciuti in coltura dinamica si siano allungati in direzione circonferenziale maggiormente rispetto a quelli cresciuti in ambiente statico, che in alcuni punti si allineano longitudinalmente al campione.

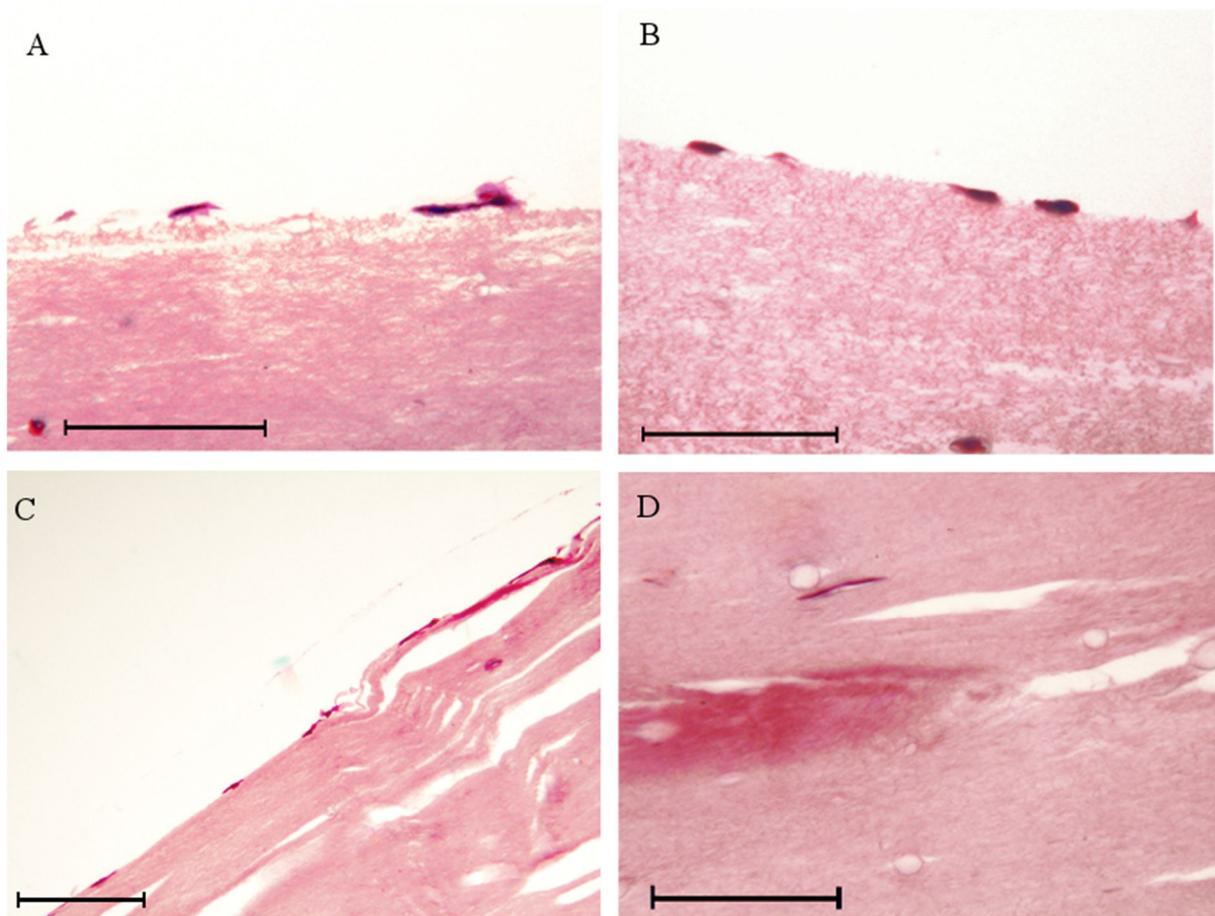


Figura 31. Foto istologiche al microscopio ottico di fibroblasti posizionati su: **(A)** camicia del campione statico (40x, scale bar 50 μm); **(B)** camicia del campione dinamico (40x, scale bar 50 μm); **(C)** bundles all'interno del campione statico (20x, scale bar 50 μm); **(D)** bundles all'interno del campione dinamico (40x, scale bar 50 μm).

All'interno degli scaffolds le cellule avevano una morfologia più fusiforme ed orientata nella stessa direzione dell'asse longitudinale dello scaffold. All'interno dei campioni statici (Figura 31 C), le cellule erano allineate assialmente ma con citoplasma leggermente più allargato circonferenzialmente rispetto ai campioni dinamici (Figura 31 D). In questi ultimi, i fibroblasti avevano una morfologia filiforme senza l'apparente presenza di nucleo (Figura 32 B). Tali strutture corrispondevano probabilmente a parti terminali di fibroblasti che si sono allungati fino ad occupare più piani di taglio. Il loro nucleo potrebbe quindi non essere visibile poiché non presente nel vetrino in esame. In alternativa potrebbe trattarsi di nuclei particolarmente allungati, tale ipotesi è supportata da istologie di tendini in cui sono visibili cellule con nuclei filiformi simili per aspetto e dimensioni alle strutture nei vetrini in esame (Figura 32 A). La forma delle cellule nei campioni dinamici è apparsa più allungata, compatibilmente con le

tensioni a cui sono stati sottoposti durante i cicli nel bioreattore. Ciò risulta essere in accordo con gli studi dinamici su materiali elettrofilati svolti in letteratura [23]. Si è inoltre notato che, in generale, la morfologia dei fibroblasti sugli scaffolds era simile a quella dei fibroblasti del tessuto tendineo e legamentoso fisiologico.

Le istologie degli scaffolds hanno mostrato una densità cellulare inferiore a quella del tendine in vivo, ciò è compatibile con il breve lasso di tempo lasciato alle cellule per proliferare e filtrare all'interno della struttura ed alle elevate dimensioni del campione (circa 900 mm). Inoltre, come già anticipato, le culture dinamiche sono state effettuate in elevati volumi di terreno di cultura (150 ml) a causa delle dimensioni della camera di test del bioreattore. Ciò può avere favorito il distacco dei fibroblasti durante la fase di attecchimento alla struttura.

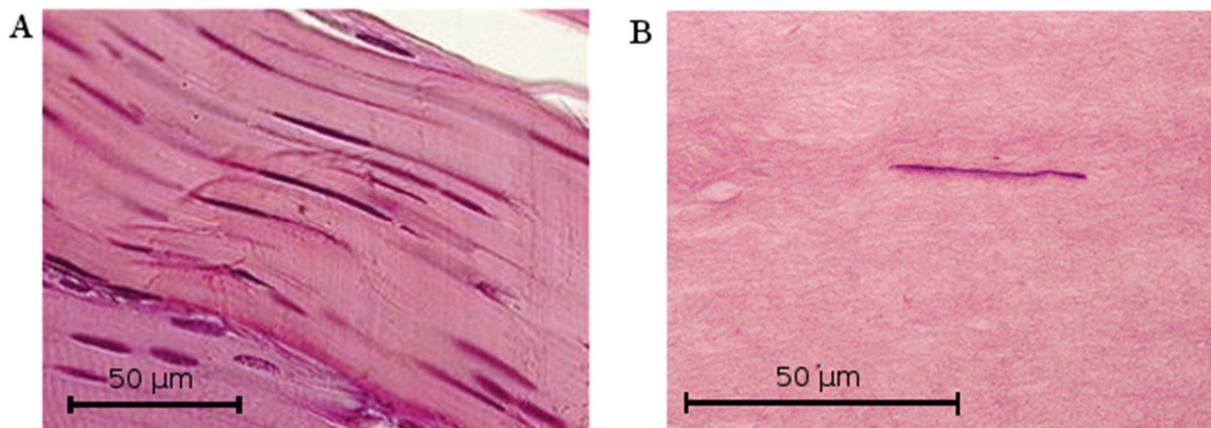


Figura 32. (A) Istologia di tendine in cui si evidenzia la presenza di fibroblasti allungati (Washington State University, 2015 [93]). (B) Esempio di fibroblasto nastriforme individuato nelle istologie dei campioni dinamici (ingrandimento 40x).

5. Conclusioni

In questo studio sono stati presentati e analizzati scaffolds gerarchici elettrofilati riassorbibili, ispirati all'architettura di tendini e legamenti, e realizzati tramite elettrofilatura con una miscela di PLLA/Collagene 75/25.

L'analisi di direzionalità, condotta tramite SEM e microCT, ha confermato che le fibre dello scaffold sono allineate prevalentemente in direzione longitudinale con una leggera dispersione gaussiana. Direzionalità e dispersione simili sono state riscontrate anche nella struttura del tessuto tendineo e legamentoso. Queste similarità contribuiscono a replicare il comportamento non lineare della matrice extracellulare nativa dei tessuti tendineo e legamentoso.

I test meccanici ciclici hanno confermato che gli scaffolds possiedono proprietà meccaniche simili a quelle di tendini e legamenti. In particolare, i campioni analizzati hanno sopportato in media più di 4000 cicli di carico e scarico prima di arrivare a rottura completa. Inoltre, la camicia esterna è stata in grado di mantenere uniti gli scaffolds interni anche in caso di rottura parziale del campione. In caso di lesione di uno dei quattro capi alle sue estremità, lo scaffold non ha ceduto improvvisamente ma ha continuato a sopportare carichi fino al cedimento del cappio adiacente a quello rotto.

Gli studi istologici condotti tramite SEM, microCT e vetrini istologici hanno confermato che i fibroblasti seminati sugli scaffolds conservano una buona attività cellulare. Sia le culture statiche che quelle dinamiche (condotte all'interno di un bioreattore) hanno mostrato che le cellule sono riuscite ad aderire alla struttura e a filtrare attraverso le nanofibre. I fibroblasti sulla camicia dei campioni statici si sono disposti in direzione circonferenziale rispetto all'asse dello scaffold, mentre i fibroblasti sulla camicia dei campioni dinamici hanno mostrato una tendenza ad allungarsi longitudinalmente. All'interno dei campioni i fibroblasti di entrambe le culture hanno assunto una morfologia allungata, similmente a quanto avviene all'interno dei tendini e legamenti umani, confermando che gli scaffolds gerarchici di questo studio possono favorire la rigenerazione del tessuto tendineo e legamentoso.

In conclusione, considerando i risultati ottenuti, gli scaffolds gerarchici analizzati in questa tesi risultano promettenti per futuri test in vivo di rigenerazione del tessuto tendineo e legamentoso.

Ringraziamenti

Giunta alla fine di questo incredibile percorso di studio, fra mille avventure e altrettante seccature, e conscia che sia una fine assolutamente relativa, devo ringraziare gli altri protagonisti di questo capitolo della mia storia, sperando di poterli inserire in molti altri ringraziamenti ancora.

Il primo ringraziamento spetta di diritto a mia madre, alla sua inesauribile pazienza e al cospicuo supporto. Grazie per essere un punto fisso di riferimento in questo universo ballerino che ogni giorno cambia posa. Ringrazio anche mio padre e mia nonna, perché alla fine con loro, nel bene e nel male, non ci si annoia mai, e la noia è la mia peggior nemica.

Grazie a Stefano, fido compagno di bevute, mangiate, e avventure. Lo studio e il lavoro sono importanti perché portano conoscenza, e ciò che conosciamo è tutto ciò che ci definisce come persone, tuttavia arriva il momento in cui diventa necessario distrarsi e godersi un meritato momento di svago. Ecco, in quel momento ti chiamerò e mi aspetto di veder arrivare la piadinomobile, sgommando. Che la forza del D20 sia con te.

Grazie a Leonardo, la musa che ogni giorno mi ricorda cosa sto facendo e, soprattutto, perché lo sto facendo. Grazie per avermi fatto notare il sottile filo rosso che collega ogni cosa.

Grazie ad Alberto Sensini per tutto il supporto durante la stesura della tesi, e per aver avviato questo rivoluzionario progetto. Grazie al professor Cristofolini per il corso di meccanica dei tessuti biologici che, senza alcun dubbio, è il più entusiasmante e illuminante di tutto il piano di studi.

Thanks Marcélo for remembering me how lucky I am, and for the awesome serie of videos you sent me at the end of the bad days. Vielen Dank für die Geduld, mit der du all meine Ausbrüche erträgst.

Grazie alle Wonder Woman delle 8:00 (Gloria inclusa ovviamente), le donne più toste e simpatiche con cui ci si possa allenare. Se non sono impazzita del tutto durante la sessione estiva di esami è anche merito vostro.

Grazie a tutti gli amici che mi hanno regalato almeno un sorriso, restituendomi la voglia di fare tutto al meglio delle mie possibilità.

Infine, grazie ai miei ammiratori sparsi per il mondo, che non hanno niente a che fare con l'università e che probabilmente non leggeranno mai questa tesi né questi ringraziamenti. Tuttavia, sapere che qualcuno che mi apprezza come artista mi spinge a migliorare anche come ingegnere.

E grazie anche alla Michiletta, alla Sangiovesa e a Zavalloni.

Bibliografia

- [1] Benjamin, M.; Ralphs, J. R. (1997). Tendons and ligaments - An overview, *Histology and Histopathology*. doi:10.1016/B978-0-323-09138-1.00007-3
- [2] Maganaris, C. N.; Paul, J. P. (1999). In vivo human tendon mechanical properties., *J Physiol*. doi:10.1111/j.1469-7793.1999.00307.x
- [3] Kannus, P. (2000). Structure of the tendon connective tissue, *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, Vol. 10, No. 6, 312–320. doi:10.1034/j.1600-0838.2000.010006312.x
- [4] Oliveira, J. M.; Reis, R. L. (2017). *Regenerative Strategies for the Treatment of Knee Joint Disabilities, Strategies in Regenerative Medicine*. doi:10.1007/978-3-319-44785-8
- [5] Wang, J. H. C. (2006). Mechanobiology of tendon, *Journal of Biomechanics*. doi:10.1016/j.jbiomech.2005.05.011
- [6] Moshiri, A.; Oryan, A. (2013). Tendon and Ligament Tissue Engineering, Healing and Regenerative Medicine, *J. Sports Med. Doping Stud.*, Vol. 3, 1–18
- [7] Kastelic, J.; Galeski, A.; Baer, E. (1978). The multicomposite structure of tendon, *Connective Tissue Research*. doi:10.3109/03008207809152283
- [8] Woon, C.; Moore, D. (n.d.). Ligaments, from <https://www.orthobullets.com/basic-science/9016/ligaments>
- [9] Jozsa, L.; Kannus, P.; Balint, J. B.; Reffy, A. (1991). Three-dimensional ultrastructure of human tendons, *Cells Tissues Organs*, Vol. 142, No. 4, 306–312. doi:10.1159/000147207
- [10] Franchi, M.; Trirè, A.; Quaranta, M.; Orsini, E.; Ottani, V. (2007). Collagen structure of tendon relates to function, *TheScientificWorldJournal*. doi:10.1100/tsw.2007.92
- [11] Chansky HA, I. I. (1991). The vascularity of the rotator cuff, *Clin Sports Med*, Vol. 10, 807–822
- [12] Jozsa L, Kvist M, Kannus P, Vieno T, Järvinen M, L. M. (1991). Structure and macromolecular composition of the myotendinous junction., *Acta Morphol Hung*, Vol. 39, 287–297

- [13] Viidik, a.; Ekholm, R. (1968). Light and electron microscopic studies of collagen fibers under strain, *Anatomy and Embryology*. doi:10.1007/BF00521981
- [14] Viidik, A. (1972). Simuhaneous Mechanical and Light Microscopic Studies of Collagen Fibers, *Z Anat Entwickl Gesch*. doi:10.1007/BF00519178
- [15] Elliott, D. (1965). Structure and function of mammalian tendon, *Biological Reviews*. doi:10.1111/j.1469-185X.1965.tb00808.x
- [16] Hansen, K. A.; Weiss, J. A.; Barton, J. K. (2002). Recruitment of Tendon Crimp With Applied Tensile Strain, *Journal of Biomechanical Engineering*. doi:10.1115/1.1427698
- [17] Franchi, M.; Fini, M.; Quaranta, M.; De Pasquale, V.; Raspanti, M.; Giavaresi, G.; Ottani, V.; Ruggeri, A. (2007). Crimp morphology in relaxed and stretched rat Achilles tendon, *Journal of Anatomy*, Vol. 210, No. 1, 1–7. doi:10.1111/j.1469-7580.2006.00666.x
- [18] Frisén, M.; Mägi, M.; Sonnerup, L.; Viidik, A. (1969). Rheological analysis of soft collagenous tissue. Part I: Theoretical considerations, *Journal of Biomechanics*. doi:10.1016/0021-9290(69)90037-2
- [19] Cristofolini, L. (n.d.). Dispense di Meccanica dei Tessuti - Classificazione , composizione e struttura dei tessuti biologici
- [20] Robi, K.; Jakob, N.; Matevz, K.; Matjaz, V. (2013). The Physiology of Sports Injuries and Repair Processes, *Current Issues in Sports and Exercise Medicine*. doi:10.5772/54234
- [21] Wren, T. A. L.; Yerby, S. A.; Beaupré, G. S.; Carter, D. R. (2001). Mechanical properties of the human achilles tendon, *Clinical Biomechanics*. doi:10.1016/S0268-0033(00)00089-9
- [22] Murphy, W.; Black, J.; Hastings, G. (2016). *Handbook Of Biomaterial Properties Springer: New York, NY, USA* (2nd ed.), Springer: New York, NY, USA
- [23] Sensini, A.; Cristofolini, L. (2018). Biofabrication of Electrospun Scaffolds for the Regeneration of Tendons and Ligaments, *Materials*, Vol. 11, No. 10, 1963. doi:10.3390/ma11101963
- [24] Rumian, A. P.; Wallace, A. L.; Birch, H. L. (2007). Tendons and ligaments are anatomically distinct but overlap in molecular and morphological features - A comparative study in an ovine model, *Journal of Orthopaedic Research*.

doi:10.1002/jor.20218

- [25] Cristofolini, L. (n.d.). Dispense di meccanica dei tessuti - Tessuti connettivi molli o non calcificati
- [26] Abbah, S. A.; Spanoudes, K.; O'Brien, T.; Pandit, A.; Zeugolis, D. I. (2014). Assessment of stem cell carriers for tendon tissue engineering in pre-clinical models, *Stem Cell Research and Therapy*. doi:10.1186/scrt426
- [27] Maffulli, N.; Wong, J.; Almekinders, L. C. (2003). Types and epidemiology of tendinopathy, *Clinics in Sports Medicine*, Vol. 22, No. 4, 675–692. doi:10.1016/S0278-5919(03)00004-8
- [28] Järvinen, M. (1992). Epidemiology of tendon injuries in sports, *Clinics in Sports Medicine*. doi:10.1016/j.orthr.2017.07.007
- [29] Bruns, W.; Maffulli, N. (2000). Lower limb injuries in children in sports, *Clinics in Sports Medicine*. doi:10.1016/S0278-5919(05)70230-1
- [30] Maffulli, N.; Bruns, W. (2000). Injuries in young athletes, *European Journal of Pediatrics*. doi:10.1007/s004310050011
- [31] Khan, K. M.; Cook, J. L.; Bonar, F.; Harcourt, P.; Åstrom, M. (1999). Histopathology of common tendinopathies: Update and implications for clinical management, *Sports Medicine*. doi:10.2165/00007256-199927060-00004
- [32] Sensini, A.; Gualandi, C.; Cristofolini, L.; Tozzi, G.; Dicarolo, M.; Teti, G.; Monica, M.-B.; Focarete, M. L. (n.d.). Biofabrication of bundles of poly (lactic acid) -collagen blends mimicking the fascicles of the human Achille tendon
- [33] Rodrigues, M. T.; Reis, R. L.; Gomes, M. E. (2013). Engineering tendon and ligament tissues: Present developments towards successful clinical products, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. doi:10.1002/term.1459
- [34] K. Dheerendra, S. (2012). Anterior Cruciate Ligament Graft Choices: A Review of Current Concepts, *The Open Orthopaedics Journal*. doi:10.2174/1874325001206010281
- [35] Colaço, H. B.; Lord, B. R.; Back, D. L.; Davies, A. J.; Amis, A. A.; Ajuied, A. (2017). Biomechanical properties of bovine tendon xenografts treated with a modern processing method, *Journal of Biomechanics*. doi:10.1016/j.jbiomech.2017.01.011
- [36] Kim, H. S.; Seon, J. K.; Jo, A. R. (2013). Current Trends in Anterior Cruciate Ligament

- Reconstruction, *Knee Surgery & Related Research*. doi:10.5792/ksrr.2013.25.4.165
- [37] Fu, F. H.; Bennett, C. H.; Lattermann, C.; Ma, C. B. (1999). Current trends in anterior cruciate ligament reconstruction. Part 1: Biology and biomechanics of reconstruction, *American Journal of Sports Medicine*. doi:10.1177/03635465990270062501
- [38] Sharma, P.; Maffulli, N. (2005). Tendon Injury and Tendinopathy, *The Journal of Bone & Joint Surgery*, Vol. 87, No. 1, 187–202. doi:10.2106/JBJS.D.01850
- [39] Zhao, J.; Griffin, M.; Cai, J.; Li, S.; Bulter, P. E. M.; Kalaskar, D. M. (2016). Bioreactors for tissue engineering: An update, *Biochemical Engineering Journal*. doi:10.1016/j.bej.2016.01.018
- [40] Langer, R.; Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering., *Science (New York, N.Y.)*. doi:10.1126/science.8493529
- [41] O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materials Today*. doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X
- [42] Moshiri, A.; Oryan, A. (2012). Role of tissue engineering in tendon reconstructive surgery and regenerative medicine: Current concepts, approaches and concerns, *Hard Tissue*, Vol. 1, 1–11
- [43] Loh, Q. L.; Choong, C. (2013). Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size, *Tissue Engineering Part B: Reviews*. doi:10.1089/ten.teb.2012.0437
- [44] Chen, J.; Xu, J.; Wang, A.; Zheng, M. (2009). Scaffolds for tendon and ligament repair: Review of the efficacy of commercial products, *Expert Review of Medical Devices*. doi:10.1586/17434440.6.1.61
- [45] Brennan, D. A.; Conte, A. A.; Kanski, G.; Turkula, S.; Hu, X.; Kleiner, M. T.; Beachley, V. (2018). Mechanical Considerations for Electrospun Nanofibers in Tendon and Ligament Repair, *Advanced Healthcare Materials*, Vol. 7, No. 12, 1–31. doi:10.1002/adhm.201701277
- [46] Lu, T.; Li, Y.; Chen, T. (2013). Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering, *International Journal of Nanomedicine*. doi:10.2147/IJN.S38635
- [47] O'Connor, R. A.; McGuinness, G. B. (2016). Electrospun nanofibre bundles and yarns for tissue engineering applications: A review, *Proceedings of the Institution of*

- Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, Vol. 230, No. 11, 987–998. doi:10.1177/0954411916656664
- [48] Stratton, S.; Shelke, N. B.; Hoshino, K.; Rudraiah, S.; Kumbar, S. G. (2016). Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering, *Bioactive Materials*. doi:10.1016/j.bioactmat.2016.11.001
- [49] Wang, T.; Kumar, S. (2006). Electrospinning of polyacrylonitrile nanofibers, *Journal of Applied Polymer Science*. doi:10.1002/app.24123
- [50] Agarwal, S.; Wendorff, J. H.; Greiner, A. (2008). Use of electrospinning technique for biomedical applications, *Polymer*, Vol. 49, No. 26, 5603–5621. doi:10.1016/j.polymer.2008.09.014
- [51] Liu, W.; Thomopoulos, S.; Xia, Y. (2012). Electrospun nanofibers for regenerative medicine, *Advanced Healthcare Materials*. doi:10.1002/adhm.201100021
- [52] Sun, B.; Long, Y. Z.; Zhang, H. D.; Li, M. M.; Duvail, J. L.; Jiang, X. Y.; Yin, H. L. (2014). Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning, *Progress in Polymer Science*. doi:10.1016/j.progpolymsci.2013.06.002
- [53] Jiang, T.; Carbone, E. J.; Lo, K. W. H.; Laurencin, C. T. (2015). Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration, *Progress in Polymer Science*. doi:10.1016/j.progpolymsci.2014.12.001
- [54] Teo, W. E.; Ramakrishna, S. (2006). A review on electrospinning design and nanofibre assemblies, *Nanotechnology*. doi:10.1088/0957-4484/17/14/R01
- [55] Laudenslager, M.; Sigmund, W. (2012). Electrospinning, *Encyclopedia of Nanotechnology*. doi:10.1007/978-94-017-9780-1
- [56] Haider, A.; Haider, S.; Kang, I. K. (2015). A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology, *Arabian Journal of Chemistry*. doi:10.1016/j.arabjc.2015.11.015
- [57] Bae, H.-S.; Haider, A.; Selim, K. M. K.; Kang, D.-Y.; Kim, E.-J.; Kang, I.-K. (2013). Fabrication of highly porous PMMA electrospun fibers and their application in the removal of phenol and iodine, *Journal of Polymer Research*. doi:10.1007/s10965-013-0158-9
- [58] Haider, S.; Al-Zeghayer, Y.; Ahmed Ali, F. A.; Haider, A.; Mahmood, A.; Al-Masry, W.

- A.; Imran, M.; Aijaz, M. O. (2013). Highly aligned narrow diameter chitosan electrospun nanofibers, *Journal of Polymer Research*. doi:10.1007/s10965-013-0105-9
- [59] Lannutti, J.; Reneker, D.; Ma, T.; Tomasko, D.; Farson, D. (2007). Electrospinning for tissue engineering scaffolds, *Materials Science and Engineering C*. doi:10.1016/j.msec.2006.05.019
- [60] Sill, T. J.; von Recum, H. A. (2008). Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering, *Biomaterials*. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.01.011
- [61] Baumgarten, P. K. (1971). Electrostatic spinning of acrylic microfibers, *Journal of Colloid And Interface Science*. doi:10.1016/0021-9797(71)90241-4
- [62] Megelski, S.; Stephens, J. S.; Bruce Chase, D.; Rabolt, J. F. (2002). Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers, *Macromolecules*. doi:10.1021/ma020444a
- [63] Zargham, S.; Bazgir, S.; Tavakoli, A.; Rashidi, A. S.; Damerchely, R. (2012). The Effect of Flow Rate on Morphology and Deposition Area of Electrospun Nylon 6 Nanofiber, *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*
- [64] Matabola, K. P.; Moutloali, R. M. (2013). The influence of electrospinning parameters on the morphology and diameter of poly(vinylidene fluoride) nanofibers- Effect of sodium chloride, *Journal of Materials Science*. doi:10.1007/s10853-013-7341-6
- [65] Ali, U.; Zhou, Y.; Wang, X.; Lin, T. (2011). Electrospinning of Continuous Nanofiber Bundles and Twisted Nanofiber Yarns, *Nanofibers - Production, Properties and Functional Applications*. doi:10.2106/JBJS.J.01112
- [66] Abbasipour, M.; Khajavi, R. (2013). Nanofiber bundles and yarns production by electrospinning: A review, *Advances in Polymer Technology*. doi:10.1002/adv.21363
- [67] Sahay, R.; Thavasi, V.; Ramakrishna, S. (2011). Design modifications in electrospinning setup for advanced applications, *Journal of Nanomaterials*. doi:10.1155/2011/317673
- [68] Sensini, A.; Cristofolini, L.; Focarete, M. L.; Belcari, J.; Zucchelli, A.; Kao, A.; Tozzi, G. (2018). High-resolution x-ray tomographic morphological characterisation of electrospun nanofibrous bundles for tendon and ligament regeneration and replacement, *Journal of Microscopy*, Vol. 00, No. 0, 1–11. doi:10.1111/jmi.12720
- [69] Barber, J. G.; Handorf, A. M.; Allee, T. J.; Li, W.-J. (2013). Braided Nanofibrous Scaffold for Tendon and Ligament Tissue Engineering, *Tissue Engineering Part A*.

doi:10.1089/ten.tea.2010.0538

- [70] Rothrauff, B. B.; Lauro, B. B.; Yang, G.; Debski, R. E.; Musahl, V.; Tuan, R. S. (2017). Braided and Stacked Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Tendon and Ligament Tissue Engineering, *Tissue Engineering Part A*. doi:10.1089/ten.tea.2016.0319
- [71] Pauly, H. M.; Kelly, D. J.; Papat, K. C.; Trujillo, N. A.; Dunne, N. J.; McCarthy, H. O.; Haut Donahue, T. L. (2016). Mechanical properties and cellular response of novel electrospun nanofibers for ligament tissue engineering: Effects of orientation and geometry, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. doi:10.1016/j.jmbbm.2016.03.022
- [72] Naghashzargar, E.; Farè, S.; Catto, V.; Bertoldi, S.; Semnani, D.; Karbasi, S.; Tanzi, M. C. (2015). Nano/micro hybrid scaffold of PCL or P3HB nanofibers combined with silk fibroin for tendon and ligament tissue engineering, *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*. doi:10.5301/jabfm.5000216
- [73] Milano, G.; Mulas, P. D.; Ziranu, F.; Piras, S.; Manunta, A.; Fabbriani, C. (2006). Comparison Between Different Femoral Fixation Devices for ACL Reconstruction With Doubled Hamstring Tendon Graft: A Biomechanical Analysis, *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery*. doi:10.1016/j.arthro.2006.04.082
- [74] Baxter, F. R.; Bach, J. S.; Detrez, F.; Cantournet, S.; Corté, L.; Cherkaoui, M.; Ku, D. N. (2010). Augmentation of bone tunnel healing in anterior cruciate ligament grafts: Application of calcium phosphates and other materials, *Journal of Tissue Engineering*. doi:10.4061/2010/712370
- [75] Cummins, C. A.; Murrell, G. A. C. (2003). Mode of failure for rotator cuff repair with suture anchors identified at revision surgery, *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*. doi:10.1067/mse.2003.21
- [76] Liu, Y.; Ramanath, H. S.; Wang, D. A. (2008). Tendon tissue engineering using scaffold enhancing strategies, *Trends in Biotechnology*, Vol. 26, No. 4, 201–209. doi:10.1016/j.tibtech.2008.01.003
- [77] Bergsma, E. J.; Rozema, F. R.; Bos, R. R. M.; Bruijn, W. C. D. (1993). Foreign body reactions to resorbable poly(l-lactide) bone plates and screws used for the fixation of unstable zygomatic fractures, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. doi:10.1016/S0278-2391(10)80267-8

- [78] Shields, K. J.; Beckman, M. J.; Bowlin, G. L.; Wayne, J. S. (2004). Mechanical Properties and Cellular Proliferation of Electrospun Collagen Type II, *Tissue Engineering*. doi:10.1089/ten.2004.10.1510
- [79] Choi, J. S.; Lee, S. J.; Christ, G. J.; Atala, A.; Yoo, J. J. (2008). The influence of electrospun aligned poly(ϵ -caprolactone)/collagen nanofiber meshes on the formation of self-aligned skeletal muscle myotubes, *Biomaterials*. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.03.031
- [80] Lopes, M.; Jardini, A.; Filho, M. R. (2014). Synthesis and Characterizations of Poly (Lactic Acid) by Ring-Opening Polymerization for Biomedical Applications, *Chemical Engineering Transactions*, Vol. 38, 331–336. doi:10.3303/CET1438056
- [81] Wikipedia. (n.d.). Acido Polilattico, from https://it.wikipedia.org/wiki/Acido_polilattico
- [82] Qin, T. W.; Yang, Z. M.; Wu, Z. Z.; Xie, H. Q.; Qin, J.; Cai, S. X. (2005). Adhesion strength of human tenocytes to extracellular matrix component-modified poly(DL-lactide-co-glycolide) substrates, *Biomaterials*. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.04.023
- [83] Böstman, O. M.; Pihlajamäki, H. K. (2000). Adverse tissue reactions to bioabsorbable fixation devices., *Clinical Orthopaedics and Related Research*. doi:10.5588/ijtdl.15.0090
- [84] Böstman, O.; Pihlajamäki, H. (2000). Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: A review, *Biomaterials*. doi:10.1016/S0142-9612(00)00129-0
- [85] Pietrabissa, R. (1996). *Biomateriali per Protesi e Organi Artificiali*, (P. Editore, Ed.)
- [86] Barnes, C. P.; Pemble, C. W.; Brand, D. D.; Simpson, D. G.; Bowlin, G. L. (2007). Cross-Linking Electrospun Type II Collagen Tissue Engineering Scaffolds with Carbodiimide in Ethanol, *Tissue Engineering*. doi:10.4319/lo.2007.52.5.1978
- [87] Zeeman, R. (1998). *Cross-linking of collagen-based materials* University of Twente
- [88] Woo, S. L.-Y.; Debski, R. E.; Zeminski, J.; Abramowitch, S. D.; Chan Saw, MS, S. S.; Fenwick, J. A. (2000). Injury and Repair of Ligaments and Tendons, *Annual Review of Biomedical Engineering*. doi:10.1146/annurev.bioeng.2.1.83
- [89] Sensini, A.; Gualand, C.; Zucchelli, A.; Boyle, L. A.; Kao, A. P.; Reilly, G. C.; Tozzi, G.; Cristofolini, L.; Focarete, M. L. (2018). Tendon Fascicle-Inspired Nanofibrous Scaffold of Polylactic acid / Collagen with Enhanced 3D-Structure and Biomechanical Properties,

No. October, 1–15. doi:10.1038/s41598-018-35536-8

- [90] Sensini, A. (2018). No Title
- [91] Shepherd, J. H.; Legerlotz, K.; Demirci, T.; Klemt, C.; Riley, G. P.; Screen, H. R. C. (2014). Functionally distinct tendon fascicles exhibit different creep and stress relaxation behaviour, *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*. doi:10.1177/0954411913509977
- [92] Bradley, R. S.; Robinson, I. K.; Yusuf, M. (2017). 3D X-Ray Nanotomography of Cells Grown on Electrospun Scaffolds, Vol. 201600236, 1–8. doi:10.1002/mabi.201600236
- [93] University of Washington State. (2015). Histology - Epithelia & Connective Tissues, from http://undergraduate.vetmed.wsu.edu/courses/vph-308/histology/lab-2-histology-epithelia-connective-tissue/tendon-slide-wsu_1_041