

**ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
DIPARTIMENTO DI
INGEGNERIA DELL'ENERGIA ELETTRICA E DELL'INFORMAZIONE
"GUGLIELMO MARCONI"**

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

TITOLO DELL'ELABORATO

**STATO DELL'ARTE DI SCAFFOLD OTTENUTI
MEDIANTE TECNOLOGIE ADDITIVE ED
ELETTROFILATURA PER LA RIGENERAZIONE DEL
TESSUTO MUSCOLO-SCHELETRICO**

Elaborato in

**COMPORTAMENTO MECCANICO DEI BIOMATERIALI E DELLE
STRUTTURE**

Relatore

Dott. Ing. ALBERTO SENSINI

Presentata da

ALESSANDRO MARTELLA

Correlatori

Prof. LUCA CRISTOFOLINI

Prof. ANDREA ZUCHELLI

Anno Accademico

2021/2022

INDICE

RIASSUNTO	4
ABSTRACT	5
<u>1 INTRODUZIONE</u>	<u>6</u>
1.1 PRINCIPALI TESSUTI DEL SISTEMA MUSCOLO SCHELETRICO	6
1.1.1 TESSUTO OSSEO	6
1.1.1.1 STRUTTURA	6
1.1.1.2 PROPRIETÀ MECCANICHE	8
1.1.2 TESSUTO CARTILAGINEO	10
1.1.2.1 STRUTTURA	10
1.1.2.2 PROPRIETÀ MECCANICHE	12
1.1.3 TENDINI E LEGAMENTI	13
1.1.3.1 STRUTTURA	13
1.1.3.2 PROPRIETÀ MECCANICHE	14
1.1.4 ENTESI E GIUNZIONE MIOTENDINEA	17
1.1.4.1 STRUTTURA	17
1.1.4.2 PROPRIETÀ MECCANICHE	19
1.2 DANNI AI TESSUTI E ATTUALI APPROCCI CHIRURGICI	21
1.3 INGEGNERIA TISSUTALE: APPROCCIO RIGENERATIVO ALLA LESIONE	24
1.3.1 SCAFFOLD	25
1.3.2 TECNOLOGIE ADDITIVE: 3D PRINTING E 3D BIOPRINTIG	27
1.3.2.1 MODELLAZIONE A DEPOSIZIONE FUSA (FDM)	28
1.3.2.2 MODELLAZIONE A MULTIGETTO (MJM)	29
1.3.2.3 3D BIOPRINTING	31
1.3.3 ELETTRIFILATURA (ELECTROSPINNING)	33
1.3.3.1 PARAMETRI CHE INFLUISCONO SUL PROCESSO DI ELETTRIFILATURA	34
1.3.4 MATERIALI	38
<u>2 SCOPO DELLA TESI</u>	<u>39</u>
<u>3 METODI DELLA RICERCA</u>	<u>39</u>
<u>4 RISULTATI E DISCUSSIONE</u>	<u>40</u>
4.1 TESSUTO OSSEO	40
4.2 TESSUTO CARTILAGINEO	44
4.3 TENDINI E LEGAMENTI	53
4.4 ENTESI	57
<u>5 CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI</u>	<u>59</u>
<u>6 BIBLIOGRAFIA</u>	<u>61</u>
<u>7 RINGRAZIAMENTI</u>	<u>69</u>

RIASSUNTO

Il sistema muscolo scheletrico è costituito dall'insieme di ossa, cartilagini e tessuti molli come muscoli, tendini e legamenti, che presentano una diversa struttura e differenti proprietà meccaniche tra loro. La sua principale funzione è quella di fornire supporto, forma e garantire il movimento fisiologico del corpo. Per questa ragione, il sistema muscolo scheletrico è continuamente sollecitato e di conseguenza molto soggetto a traumi o infortuni. Un'alternativa all'approccio chirurgico tradizionale è l'ingegneria tissutale che permette di creare scaffold in grado di promuovere la rigenerazione dei tessuti naturali. Negli ultimi decenni si è riscontrato un forte incremento dell'utilizzo della stampa 3D e dell'elettrofilatura come tecniche di fabbricazione di questi scaffold grazie ai loro diversi vantaggi. La stampa 3D presenta diversi benefici, tra cui la possibilità di creare costrutti personalizzati in grado di riprodurre similmente la geometria del tessuto nativo con efficienza dei costi e tempi di produzione ridotti rispetto alle tecniche tradizionali. Tuttavia, questa tecnica presenta ancora una limitata risoluzione sufficiente, ad esempio, per riprodurre la struttura e le proprietà del tessuto osseo, ma non idonea al raggiungimento della scala nanometrica, tipica dei tessuti fibrosi muscolo scheletrici. Al contrario, l'elettrofilatura è in grado di produrre fibre nanometriche che riescono a mimare la matrice extracellulare di questi tessuti. Tuttavia, si riscontrano ancora alcune difficoltà nel controllare la struttura tridimensionale e le proprietà meccaniche di questi scaffold nella scala micro e macrometrica. Lo scopo di questa tesi è quello di analizzare gli studi che utilizzano un approccio combinato tra stampa 3D ed elettrofilatura per la produzione di scaffold per la rigenerazione del tessuto muscolo scheletrico, definendo lo stato dell'arte dei vari processi di produzione e le possibili prospettive future.

ABSTRACT

The musculoskeletal system is composed of bones, cartilage and soft tissues such as muscles, tendons and ligaments, which have different structures and mechanical properties. Its main function is to provide support, shape and ensure the physiological movement of the body. Therefore, the musculoskeletal system is continuously subjected to stresses that generally cause injuries and trauma. An alternative to the traditional surgical approach is tissue engineering which permits the production of scaffolds able to promote the natural tissue regeneration. In the last decades, there has been a significant increase in the use of 3D printing and electrospinning as manufacturing techniques to produce scaffolds for the musculoskeletal tissues thanks to their different advantages. 3D printing has several benefits, including the ability to create customised constructs that reproduce the morphology of the native tissue with cost efficiency and reduced production time compared to traditional ones. However, this technique still has limited resolution sufficient to reproduce the structure and properties of bone tissue, but not suitable for achieving the nanoscale typical of fibrous musculoskeletal ones. In contrast, electrospinning can produce nanometric fibers that can mimic the extracellular matrix of these tissues. However, there are still some difficulties in controlling the three-dimensional structure and mechanical properties of these scaffolds from the micro- up to the macrometric scale. The aim of this thesis is to analyse the studies, published in the literature, which have used a combined approach between 3D printing and electrospinning to produce scaffolds for musculoskeletal tissue regeneration, defining the state of the art of this combined biofabrication strategy and its possible future perspective.

1 INTRODUZIONE

1.1 PRINCIPALI TESSUTI DEL SISTEMA MUSCOLO SCHELETRICO

Il sistema muscolo scheletrico è costituito da diversi tipi di tessuti che cooperano tra loro per garantire la protezione e il corretto movimento fisiologico del nostro corpo, ovvero, è presente una stretta collaborazione tra osso e gli altri tessuti molli del suddetto sistema come tendini, legamenti, muscoli e cartilagine [1]. Ogni tessuto svolge una specifica funzione, per questo è caratterizzato da un proprio fenotipo cellulare e una propria struttura ed organizzazione della matrice extracellulare con conseguenti uniche proprietà meccaniche. Per questo motivo tra due tessuti differenti si vengono a creare delle vere e proprie regioni di interfaccia con particolari proprietà e funzioni [2], [3].

1.1.1 TESSUTO OSSEO

1.1.1.1 STRUTTURA

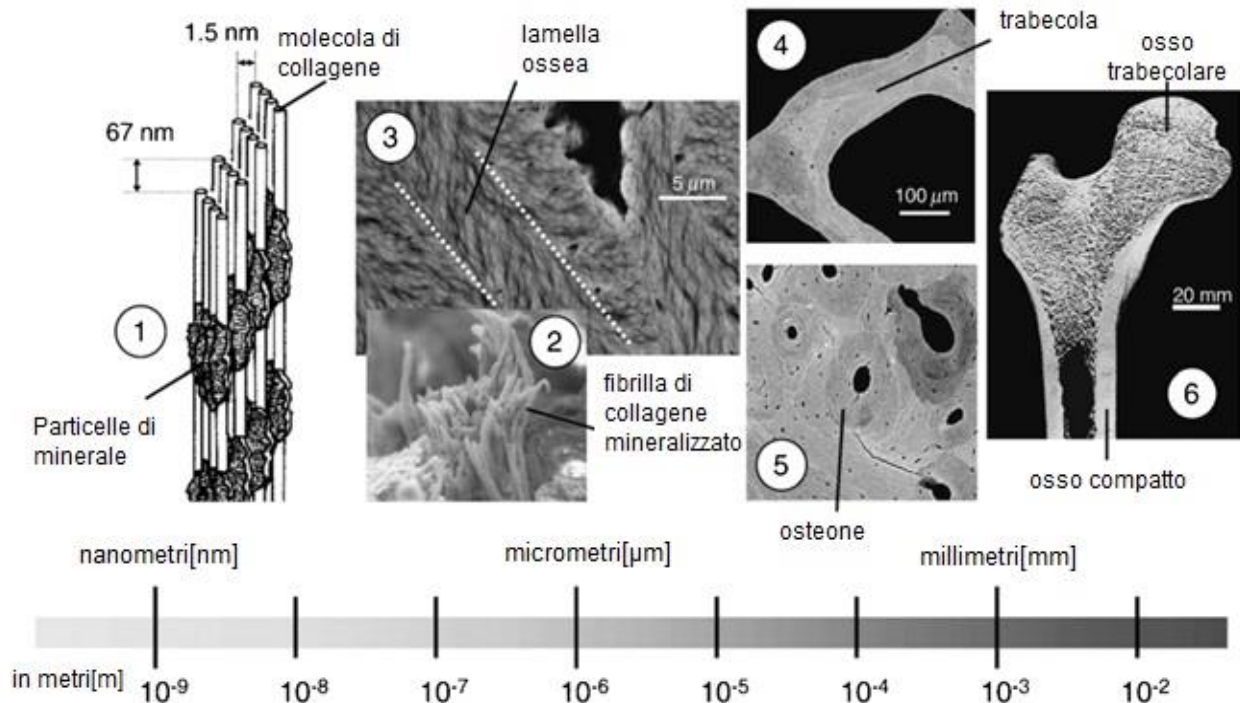


Fig.1 Struttura gerarchica dell'osso (adattata da [4])

Le principali funzioni del tessuto osseo sono: sostenere carichi interni/esterni supportando il movimento e proteggere gli organi vitali [5]. È un tessuto connettivo mineralizzato costituito da tre tipi di cellule: osteoblasti, osteociti ed osteoclasti. Diversamente da quello che si possa pensare l'osso è un organo altamente dinamico che svolge un processo di continuo rimodellamento orchestrato dagli osteociti (meccanocettori), necessario per la riparazione o per adattamento a stimoli meccanici interni ed esterni del tessuto, in cui l'osso viene riassorbito dagli osteoclasti e neoformato dagli osteoblasti fino ad arrivare ad un equilibrio detto omeostasi [6]. Il peso dell'osso è dato per il 70% da minerali (principalmente apatite di Calcio e Fosforo $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ simile a idrossiapatite), 22% proteine (principalmente collagene di tipo I) e 8% acqua[7].

A livello macroscopico l'osso è composto da:

- **una componente corticale (o compatta):** costituisce il rivestimento di tutte le ossa e presenta una struttura densa a bassa porosità (fino al massimo 15%), rappresenta circa l'80% della massa dell'intero scheletro;
- **una componente spugnosa (o trabecolare):** è presente nella parte interna delle ossa e nelle epifisi delle ossa lunghe, ad alta porosità (75-95%) con un'organizzazione porosa data dalla ripetizione di una struttura tridimensionale chiamata trabecola (unità strutturale dell'osso spugnoso) [5].

A livello nano\microscopico presenta una struttura gerarchica con diversi livelli di organizzazione. Partendo dal livello nanometrico l'osso è costituito da molecole di collagene dalla forma allungata organizzate in fibrille. Le fibrille a loro volta sono organizzate in fibre, le quali sono intermezate da cristalli di idrossiapatite. Queste fibre mineralizzate si dispongono come una serie di archi nidificati formando le lamelle ossee. Infine, diverse lamelle concentriche (4-20) attorno ad un canale di Havers (canale dove transitano vasi sanguigni e nervi) formano una struttura cilindrica detta osteone (diametro 100-300 μm), l'unità strutturale dell'osso corticale [5]. Le pareti del canale di Havers (ovvero le lamelle concentriche) presentano delle cavità, dette lacune ossee, dove sono intrappolati gruppi di osteociti. Gli osteociti all'interno delle lacune non sono isolati tra loro, ma formano una complessa rete cellulare grazie ai loro lunghi e sottili processi citoplasmatici che si diramano all'interno di canalicoli (tunnel scavati nella matrice) stabilendo giunzioni comunicanti con i prolungamenti di osteociti vicini e con i canali di Volkmann (perpendicolari) e di Havers (longitudinali), che permettono scambi metabolici, di fluidi e di gas necessari alle cellule [8]. Gli spazi che si delimitano tra i diversi osteoni sono costituiti da lamelle di forma e dimensione variabili e sono detti sistemi interstiziali. I confini fra gli osteoni e i sistemi interstiziali sono facilmente identificabili da uno strato di tessuto connettivo mineralizzato detto linea cementante, la quale

rappresenta la linea di separazione tra l'osteone e il tessuto osseo circostante [8]. Le trabecole invece sono orientate in modo casuale e si intrecciano tra loro delimitando numerose cavità intercomunicanti dette cavità midollari contenenti midollo osseo, vasi sanguigni e nervi. Questa organizzazione rende il tessuto estremamente resistente ma allo stesso tempo leggero [9].

1.1.1.2 PROPRIETÀ MECCANICHE

Le proprietà meccaniche del tessuto osseo dipendono e sono caratterizzate dal livello di organizzazione e dalle caratteristiche strutturali dell'osso in questione. In generale, i valori delle proprietà meccaniche del tessuto osseo a livello macrostrutturale variano da osso a osso nonché tra differenti regioni dello stesso osso. A livello macroscopico, come già descritto nel precedente paragrafo, si ha una distinzione del tessuto osseo in osso corticale e osso trabecolare e per ognuna di queste due categorie, in quanto presentano diverse proprietà strutturali, corrispondono differenti proprietà meccaniche [10].

Il comportamento meccanico dell'osso corticale è anisotropo, infatti, la resistenza e i moduli di trazione\compressione lungo la direzione longitudinale (direzione allineata con l'asse diafisario) sono maggiori circa del 50% rispetto a quelli lungo la direzione radiale e circonferenziale. Per quest'ultime due direzioni invece sono state osservate differenze relativamente piccole di queste proprietà, il che suggerisce che l'osso corticale può essere definito anche come un materiale trasversalmente isotropo [11]. L'osso corticale, grazie al suo alto contenuto di minerali ed alla quasi totale assenza di materia organica, possiede un elevato modulo elastico di circa 17 GPa (da 10 a 20 GPa) ed elevata rigidità [12]. Essendo un materiale anisotropo, presenta una resistenza maggiore per i carichi applicati nella direzione longitudinale (direzione preferenziale) e più in specifico ha una resistenza maggiore per carichi in compressione (130-225 MPa) rispetto quelli in trazione (60-160 MPa). In generale, l'osso corticale può essere classificato come un materiale relativamente duttile per i carichi longitudinali ed è caratterizzato da un comportamento viscoelastico, cioè è sensibile sia al tasso di deformazione che alla durata dei carichi applicati [13]. Tutte le proprietà meccaniche appena descritte sono riscontrabili, a titolo di esempio, nel femore descritto in **Tab. 1** e **Fig. 2a**. Date le sue eccellenti prestazioni meccaniche l'osso corticale svolge la funzione di struttura portante del nostro corpo.

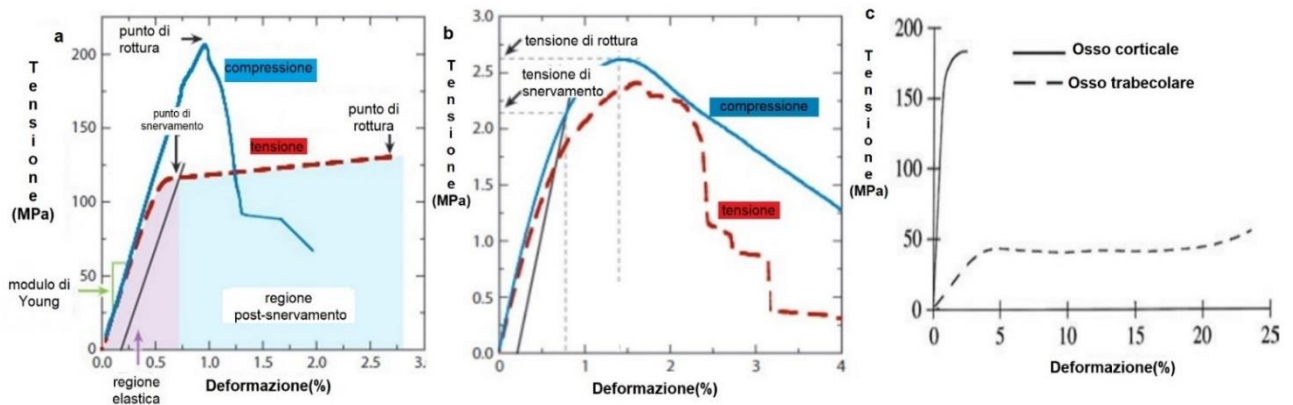


Fig.2 Curve tensione-deformazione (stress-strain): (a) dell'osso corticale, (b) dell'osso trabecolare e (c) confronto tra osso trabecolare e corticale ottenute tramite test monotonici in tensione e compressione (positivizzate) lungo la direzione longitudinale (adattata da [11]).

Tab.1 Proprietà meccaniche dell'osso corticale del femore umano. (I valori elencati sono stati elencati da prove meccaniche su provini con dimensioni dell'ordine di 1 cm). (adattata da [11]).

Direzione longitudinale	
Modulo elastico (MPa)	17900 ± 3900
Rapporto di Poisson	0.62 ± 0.26
Tensione di snervamento a trazione (MPa)	71.6 ± 10.2
Deformazione di snervamento a trazione (%)	0.67 ± 0.04
Tensione di rottura a trazione (MPa)	135 ± 15.6
Deformazione di rottura a trazione (%)	1.9 ± 0.6
Tensione di snervamento per compressione (MPa)	115 ± 16.4
Deformazione di snervamento per compressione (%)	0.98 ± 0.09
Tensione di rottura per compressione (MPa)	205 ± 17.3
Deformazione di rottura per compressione (%)	1.3 ± 0.3
Direzione trasversale	
Modulo elastico (MPa)	10100 ± 2400
Rapporto di Poisson	0.62 ± 0.26
Tensione di rottura a trazione (MPa)	53 ± 10.7
Tensione di snervamento per compressione (MPa)	41.8 ± 19.4
Deformazione di snervamento per compressione (%)	0.83 ± 0.42
Tensione di rottura per compressione (MPa)	131 ± 20.07

Per quello che concerne l'osso trabecolare, le proprietà meccaniche variano ampiamente a seconda principalmente della densità apparente e dall'architettura (quindi di conseguenza dalla locazione

anatomica) della componente dell'osso in questione che stiamo andando ad analizzare. Per questa ragione, le proprietà meccaniche dell'osso spongioso possono variare anche di un fattore 10 a seconda del tipo e orientamento delle trabecole [13]. Anch'esso si presenta come un materiale anisotropo, tuttavia, in alcuni siti anatomici come l'omero prossimale, l'osso trabecolare è quasi isotropo. Tipicamente, la media del modulo elastico del tessuto osseo trabecolare è nel range tra 1.3 a 14.8 GPa [14] e presenta una resistenza da sforzi da carico nell'intervallo 0.1-30 MPa [11]. Sotto compressione, l'osso spongioso ha caratteristiche simili a materiali porosi come il legno presentando un comportamento viscoelastico non lineare (**Fig. 2b**). Così, l'osso trabecolare ha una capacità unica di resistere ad un grande carico a compressione per una massa minima. Quest'elevata tenacità permette un tasso di deformazione da compressione oltre il 50% [11], [13].

1.1.2 TESSUTO CARTILAGINEO

1.1.2.1 STRUTTURA

La cartilagine, in base alle caratteristiche della sua matrice extracellulare (**Tab. 2**) e alla sua funzione, si divide in: ialina (o articolare), fibrosa (o fibrocartilagine) ed elastica.

La cartilagine ialina, la più diffusa nei mammiferi, è un tessuto connettivo che, nell'adulto costituisce la superficie portante delle articolazioni mobili nel corpo (cartilagine articolare). La si può trovare anche nella laringe, negli anelli che costituiscono il tubo tracheale, nelle cartilagini costali e nel setto nasale [15]. Un particolare tipo di cartilagine ialina, la cartilagine metafisaria o di accrescimento, è presente anche nella metafisi delle ossa lunghe, dove provvede al normale accrescimento della lunghezza dell'osso. Questa crescita è possibile grazie alla presenza in essa di uno strato ad alta capacità proliferativa fino ad arrivare ad uno strato detto zona di calcificazione, dove assistiamo alla completa mineralizzazione dei condrociti e della loro matrice, quindi alla formazione di vero e proprio tessuto osseo [16]. La principale funzione della cartilagine articolare è quella di lubrificare la superficie dell'articolazione e supportare il trasferimento dei carichi tra le due ossa in questione grazie al suo basso coefficiente di frizione. Morfologicamente la cartilagine articolare è composta da 4 strati o zone (**Fig. 3**), dall'alto verso il basso: zona superficiale (o tangenziale), zona intermedia, zona profonda e zona di cartilagine calcificata [17]. Una linea di confine detta tidemark separa le ultime due zone. Le cellule specializzate di questo tessuto, i condrociti, che rappresentano circa il 10% del volume totale del tessuto, sono distribuiti nella matrice extracellulare. Quest'ultima è composta da una fitta rete di fibre di collagene (circa il 50% del peso del tessuto secco) che contiene al suo interno

un gel altamente idrofilo costituito da aggregati di macromolecole di proteoglicani. Allo stato completamente idratato l'acqua costituisce il 60-80% del peso del tessuto [15].

Sono stati eseguiti pochi studi o sperimentazioni, principalmente su animali, sulle altre due tipologie di cartilagine (fibrocartilagine ed elastica) quindi non abbiamo molti dati a nostra disposizione. La fibrocartilagine è più dura ma meno resistente e meno diffusa nel corpo rispetto alla cartilagine ialina. Si può considerare un tessuto di transizione e possiede una struttura e proprietà meccaniche e funzionali intermedie tra quelle del tessuto connettivo fibroso denso e della cartilagine ialina. La si può trovare nel complesso fibrocartilagineo del polso, nei menischi, nei dischi intervertebrali e nell'interfaccia tra osso e tendini e legamenti, come nell'articolazione del ginocchio o in quella temporomandibolare. Le fibre di collagene (principalmente di tipo I, 98%) di questo tessuto possono essere disposte in maniera irregolare o formare particolari pattern come in prossimità dei tendini [18].

La cartilagine elastica si presenta di un colore giallastro, è priva di irrorazione sanguigna, e come si può intuire facilmente dal nome, è un tipo di cartilagine più elastica e resistente delle altre due grazie ad una bassa percentuale di collagene e alla presenza di una fitta rete di fibre di elastina che circonda condrociti che in questo tessuto risultano più numerosi e voluminosi rispetto a quelli nella cartilagine ialina [15], [19]. Questa tipologia di cartilagine funge da supporto rigido e flessibile e quindi si trova in corrispondenza del condotto uditivo esterno, nel padiglione auricolare, nell'epiglottide, nelle cartilagini della laringe e in parte del naso [19].

Tab. 2 Composizione della cartilagine articolare e fibrocartilagine (adattato da [8]).

	Acqua (peso %)	Organico (peso %)
Cartilagine articolare	60-80	20-40
Collagene di tipo II	---	15-20
Altri tipi di collagene	---	<2
Proteoglicani	---	10
Fibrocartilagine	74	26
Collagene di tipo I	---	20
Altri tipi di collagene	---	<1
Proteoglicani	---	<1

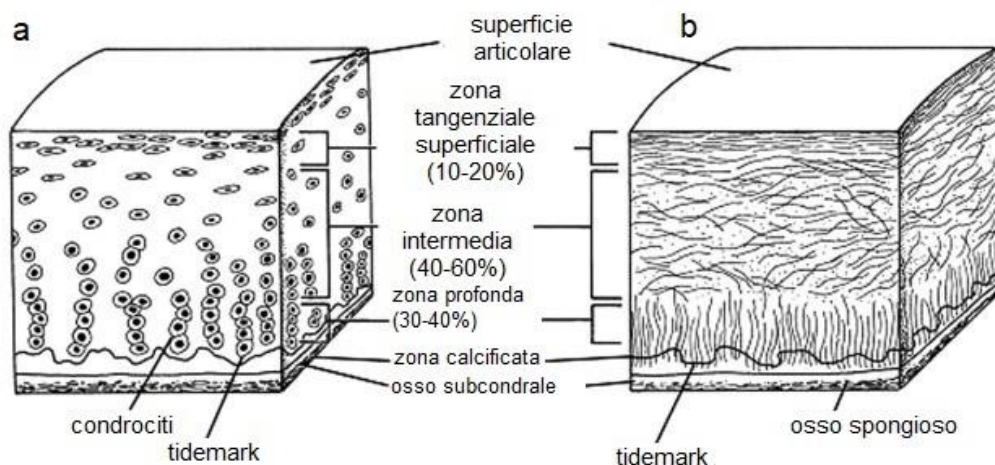


Fig. 3 Schema e sezione trasversale della cartilagine articolare: (a) organizzazione delle cellule nelle diverse zone della cartilagine articolare; (b) disposizione delle fibre di collagene nelle varie zone (adattata da [20]).

1.1.2.2 PROPRIETÀ MECCANICHE

La cartilagine articolare è un materiale bifasico composto da una massa di fluido interstiziale (60-80%) e da una matrice solida (20-40%). In condizioni normali, quando è sottoposta ad un carico meccanico, mostra un tipico comportamento viscoelastico. Applicando inizialmente un carico a compressione, mentre la cartilagine inizia a deformarsi, si nota la fuoriuscita relativamente rapida del fluido interstiziale verso il fluido sinoviale provocando così un leggero aumento della tensione di compressione e del modulo elastico della cartilagine (E) (**Fig. 4**). Aumentando poi gradualmente il carico, la resistenza opposta dal fluido aumenta con un conseguente incremento della pressione dello stesso mantenuta grazie ai proteoglicani (PG) e alla rete di collagene (principale costituente della matrice extracellulare della cartilagine). Quando il carico applicato viene rimosso (fase di scarico), si verifica prima un recupero elastico istantaneo, seguito da un recupero graduale che si conclude con il ripristino del tessuto alle sue condizioni iniziali. Grazie a questo meccanismo il tessuto presenta una caratteristica più rigida, ovvero migliora la capacità del tessuto di sopportare carichi esterni [20]. La cartilagine, in realtà, possiede una rigidità in compressione relativamente bassa ($E= 0.1-2$ MPa), un coefficiente di Poisson (ν) di 0.2 e un coefficiente di frizione pari a 0.008 [21].

Tab. 3 Confronto di varie proprietà meccaniche di cartilagine articolare umana espresse in media (\pm deviazione standard). (adattata da [22]).

Fonti della cartilagine	Modulo di Young (MPa)	Modulo di compressione (MPa)	Modulo dinamico (MPa)
Rotula	0.64 ± 0.30	3.1-10	4.67 ± 2.24
Condili femorale	1.03 ± 0.48	10.6 ± 3.62	7.71 ± 4.62

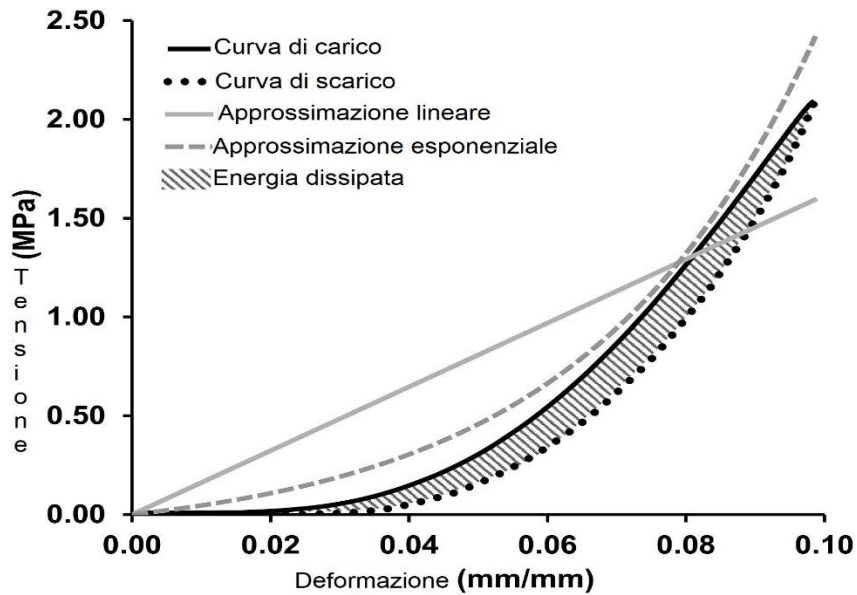


Fig. 4 Esempio di curva tensione-deformazione della cartilagine articolare.

1.1.3 TENDINI E LEGAMENTI

1.1.3.1 STRUTTURA

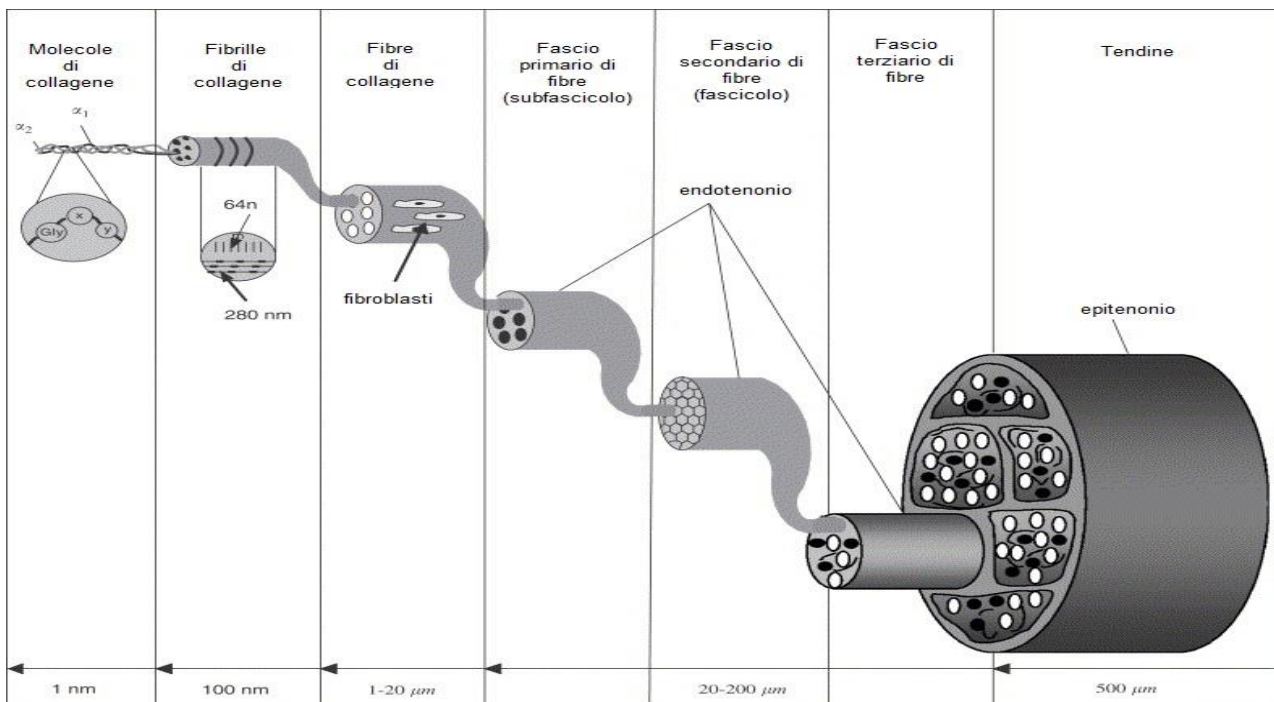


Fig. 5 Struttura gerarchica del tendine (adattata da [23]).

Il tendine è un tessuto fondamentale nel meccanismo del movimento umano in quanto ha il compito di trasmettere la forza prodotta dalla contrazione muscolare alle ossa accompagnando in questo modo il movimento dell'articolazione associata [24]. Il legamento invece collega due ossa adiacenti e quindi

in generale si trova in prossimità di un'articolazione. La sua funzione principale è quella di guidare e stabilizzare passivamente le articolazioni in un range normale di movimento irrigidendosi in presenza di movimenti non fisiologici evitando così di danneggiare le strutture articolari adiacenti. La struttura dei tendini e legamenti (T/L) risulta molto simile. La componente cellulare, che rappresenta circa il 20% del volume totale del tessuto, è composta da tenoblasti e tenociti, cellule dalla forma allungata disposte in fila tra le fibre di collagene responsabili della sintesi della matrice extracellulare e del suo rimodellamento durante un eventuale processo di guarigione del tendine [25]. Il restante 80% del volume del tessuto è costituito dalla matrice extracellulare (MEC), la quale a sua volta è composta da circa 70% di acqua e 30% di componente fibrosa (principalmente collagene) e componente non fibrosa (principalmente acido ialuronico, glicoproteine e proteoglicani). La componente fibrosa rappresenta il 75-80% del peso secco totale del tendine ed è costituita principalmente da collagene di tipo I anche se presenti in minor quantità altri tipi di collagene (di tipo III, V, X, XI, XII e XIV) [15]. Come tutti i tessuti anche i tendini e i legamenti seguono un'organizzazione gerarchica nella loro struttura, infatti, si parte a livello nanometrico dalle molecole di tropocollagene organizzate in microfibrille e poi progressivamente crescendo di diametro in subfibrille, fibrille (10-500 nm) ed infine fibre (1-50 μm). Queste fibre di collagene (unità fondamentale del tendine e del legamento), che mostrano una configurazione arricciata (crimping) nello stato di riposo, sono riunite in fasci formando i cosiddetti fascicoli (50-3000 μm), i quali sono avvolti in un tessuto connettivo innervato e vascolarizzato chiamato endotenonio [23], [26]. Il vero e proprio tendine/legamento infine è composto da un insieme di fascicoli circondati da un tessuto connettivo lasso vascolarizzato chiamato epitenonio. Si ha poi un ulteriore avvolgimento del tendine da parte di un altro tessuto connettivo, il paratenonio, il quale facilita lo scorrimento lungo le strutture adiacenti[23].

1.1.3.2 PROPRIETÀ MECCANICHE

Sebbene i tendini e i legamenti abbiano una struttura interna molto simile, la disposizione delle fibre varia nei due tessuti fornendo specifiche proprietà meccaniche in funzione del compito che ognuno dei due svolge. Nei tendini le fibrille di collagene sono parallele e allineate lungo l'asse del tendine in quanto le forze a cui sono soggetti sono applicate in un'unica direzione, invece nei legamenti, queste fibrille appaiono più arricciate (in quanto devono irrigidirsi per deformazioni fuori dal range fisiologico) e disposte in modo non uniforme e multidirezionale poiché qui le forze sono applicate lungo diverse direzioni in base al range di movimento dell'articolazione associata [27], [28]. I tendini non si comportano come un materiale inestensibile, ma fungono da vere e proprie molle biologiche in grado di immagazzinare energia e rilasciarla durante la locomozione rendendo più efficace ed

ergonomic possibile il movimento [29]. L'organizzazione delle fibre e la struttura gerarchica del tendine sono alla base del suo comportamento non lineare e viscoelastico. Questo particolare comportamento meccanico è visibile nella tipica curva tensione-deformazione del tendine che consta di 4 regioni differenti (**Fig. 6**). Nella prima regione, il piede della curva, quando la deformazione è al di sotto circa del 2%, si nota l'iniziale stiramento delle fibre di collagene inizialmente arricciate. Proseguendo fino a deformazioni del 4%, si entra nella regione lineare dove tutte le fibre sono distese e orientate lungo la direzione del carico applicato. In questa regione si ha il valore del modulo elastico più alto ($E= 500-1850$ MPa) e la deformazione risulta reversibile, ovvero si ha un recupero elastico ideale, il tendine è in grado di tornare alla sua lunghezza originale [23], [28], [30]. Dopo la regione lineare, le fibre iniziano gradualmente a scorrere l'una sull'altra e progressivamente si verificano prima delle lacerazioni a livello microscopico fino ad arrivare al definitivo cedimento macroscopico delle fibre o rottura del tendine per deformazioni comprese tra il 5-16%. Le proprietà meccaniche del tendine dipendono fortemente dalla sezione trasversale e dalla funzione del particolare tendine interessato, nonché dal tasso di deformazione con cui viene applicato il carico. Proprio per questa ragione il range delle tensioni di rottura dei tendini può variare da 24-69 MPa per il tendine della rotula fino a 112 MPa del gracile [28].

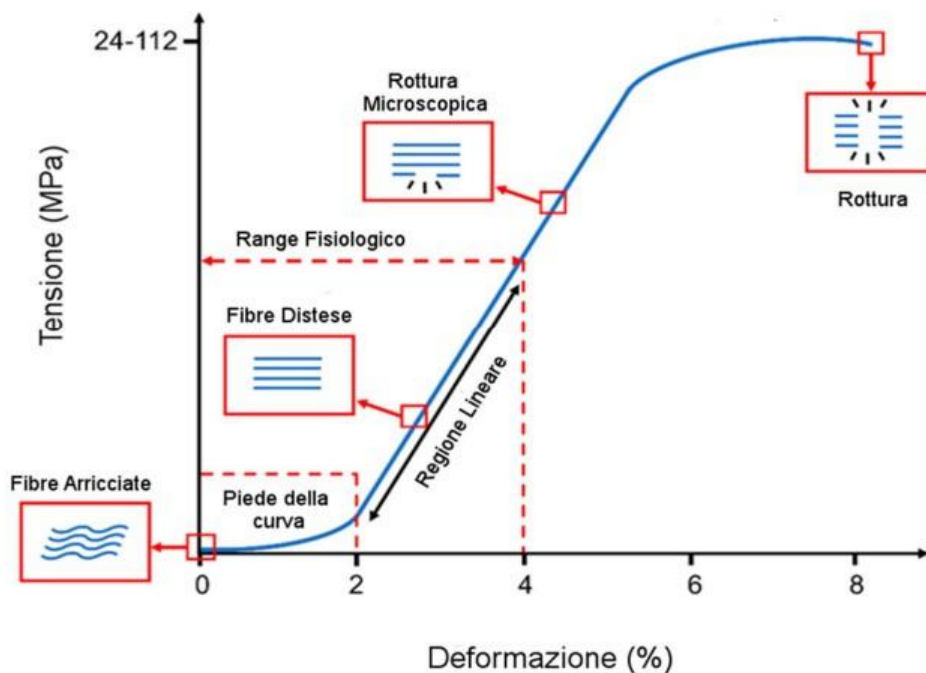


Fig. 6 Tipica curva tensione-deformazione del tendine. I tipici intervalli di tensione e deformazione sono indicati sugli assi. (adattata da [28]).

Il comportamento meccanico descritto sopra per il tendine vale anche per il legamento con la differenza che in quanto il legamento deve consentire ampi range di movimento in base

all'articolazione interessata, generalmente si riscontra un allungamento del piede della curva (prima regione) nel suo grafico tensione-deformazione (**Fig. 7**) per permettere una maggiore deformazione prima di eventuale irrigidimento in corrispondenza di movimenti anomali [28]. A titolo d'esempio, per il legamento crociato anteriore si registra una tensione di rottura tra i 13-46 MPa con una deformazione tra il 9-44% [15].

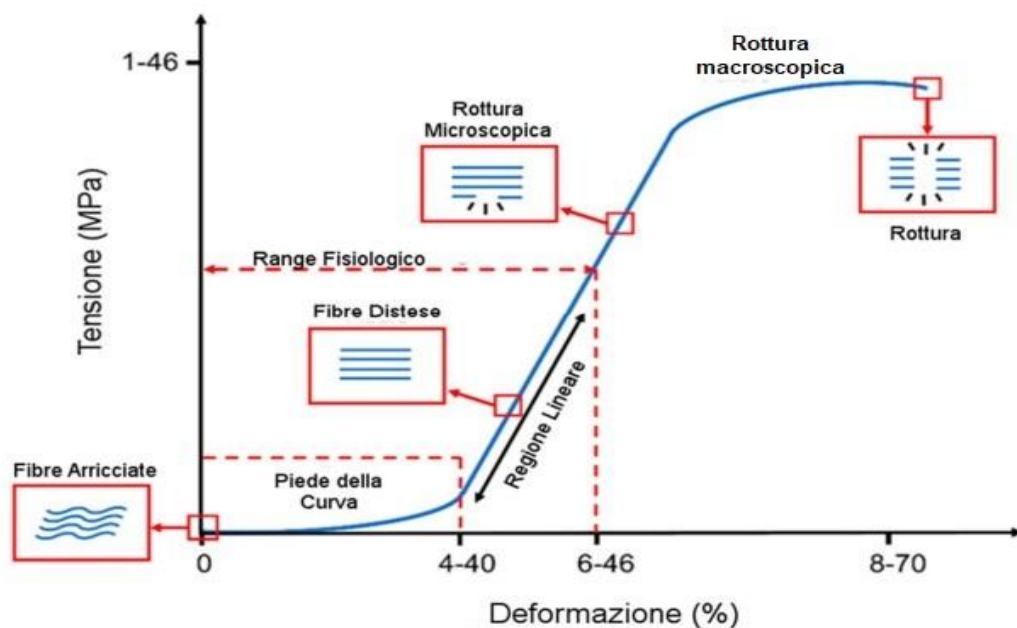


Fig. 7 Tipica curva tensione-deformazione del legamento. I tipici intervalli di tensione e deformazione sono indicati sugli assi. (adattata da [28]).

Tab. 4 Proprietà meccaniche di alcuni tendini e legamenti (adattata da [15]).

Tessuto	Modulo (MPa)	Tensione di rottura a trazione (MPa)	Deformazione di rottura a trazione (%)
Legamenti ginocchio:			
Crociato anteriore	65-541	13-46	9-44
Crociato posteriore	109-248	24-36	10-29
Tendini ginocchio:			
Patellare	143-660	24-69	14-27
Legamenti gamba:			
Collaterale laterale	216-512	24-46	13-17
Collaterale mediale	54-321	16-34	10-33
Tendini gamba:			
Tendine d'Achille	65	24-61	24-59
Tendine palmare	2310 ± 620	91 ± 15	N/A

1.1.4 ENTESI E GIUNZIONE MIOTENDINEA

1.1.4.1 STRUTTURA

Tendini e legamenti sono connessi all'osso attraverso una particolare e specializzata interfaccia chiamata entesi che costituisce il vero e proprio sito d'inserzione del tendine\legamento sull'osso e permette l'integrazione delle due strutture. Questa interfaccia supporta il corretto movimento dell'articolazione in quanto trasmette i carichi provenienti dai tessuti molli all'osso [31]. Le entesi possono essere classificate in base al tipo di tessuto e alle strutture coinvolte nel sito d'inserzione, quindi possiamo riconoscere due principali categorie: entesi fibrose ed entesi fibrocartilaginee, anche dette indirette e dirette, rispettivamente. Nelle entesi fibrose (o indirette), il tendine si inserisce sull'osso andando a formare angoli acuti mediante le fibre di Sharpey, fibre di collagene che si estendono direttamente fino all'osso o fino alla superficie periosteale dell'osso [32]. Le entesi fibrose sono caratterizzate da un denso tessuto connettivo fibroso e generalmente si trovano in presenza di tendini che vanno ad inserirsi nelle diafisi delle ossa lunghe e in corrispondenza di grossi muscoli, come il deltoide o i grandi muscoli della linea Aspera del femore, in quanto svolgono una funzione stabilizzante [33].

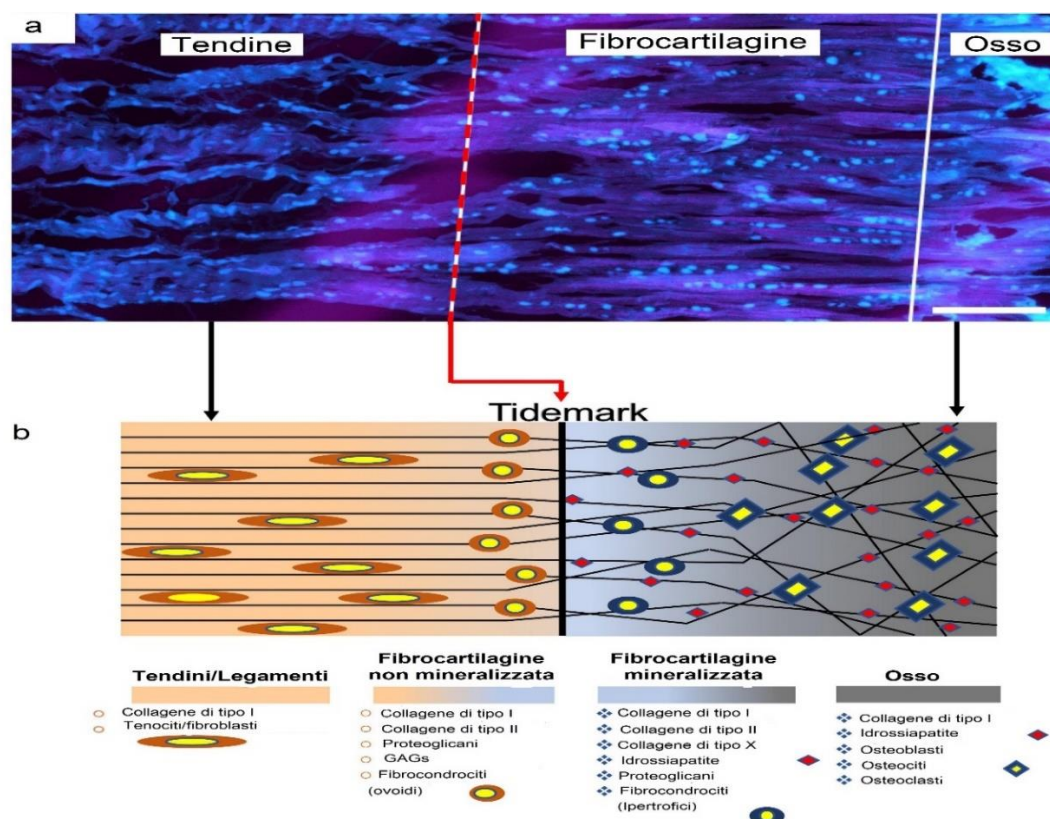


Fig. 8 (a) Struttura entesi fibrocartilaginea (sezione dell'entesi di un tendine d'Achille di suino, cellule colorate di blu ciano). (b) Rappresentazione grafica dell'entesi e delle sue componenti. (adattate da [2]).

Le entesi fibrocartilaginee (**Fig. 8**), invece, presentano una particolare struttura caratterizzata da un progressivo gradiente di mineralizzazione, un progressivo aumento di anisotropia e organizzata in quattro differenti zone (dal tendine all'osso) [32], [34]:

- **Tessuto connettivo fibroso:** generalmente simile al tessuto del normale tendine, è costituito da fibroblasti immersi in una matrice di collagene composta principalmente da fibrille allineate di collagene di tipo I (in minor quantità anche di tipo III), elastina e proteoglicani;
- **Fibrocartilagine non mineralizzata:** è una zona avascolare popolata da fibrocondrociti circolari disposti in file. La matrice extracellulare contiene per la maggior parte fibrille disposte in parallelo di collagene di tipo II (ma anche di tipo I, III, X, IX) così come proteoglicani con associati condroitina 4- e 6-solfato glicosamminoglicani (GAGs);
- **Fibrocartilagine mineralizzata:** è una zona avascolare popolata da fibrocondrociti ipertrofici, più grandi e circolari rispetto alla zona precedente, ed è presente una matrice extracellulare costituita prevalentemente da collagene di tipo II, nonché da aggregati (particolari proteoglicani) e collagene di tipo I e X;
- **Osso:** questo tessuto, come già visto nel precedente paragrafo, contiene osteoblasti, osteoclasti ed osteociti, immersi in una matrice composta principalmente da fibre mineralizzate di collagene di tipo I.

Si nota che l'entesi, circa spessa 500 μm dal tendine all'inserzione con l'osso, mostra un graduale aumento del contenuto minerale con una corrispondente diminuzione graduale del livello di organizzazione delle fibre di collagene [35]. Inoltre, tra la zona di fibrocartilaginea non mineralizzata e quella mineralizzata è presente una linea basofila che separa le due zone detta tidemark, che si può considerare come il confine, dal punto di vista meccanico, tra tessuti molli e duri. Questa linea di confine è relativamente dritta, il che indica la produzione di una superficie piatta durante il processo di mineralizzazione che è importante da punto di vista clinico in quanto questo tipo di superficie è ottimale per ridurre il rischio di danni ai tessuti molli durante il movimento dell'articolazione [31].

La giunzione miotendinea (MTJ) è definita come la connessione tra il tessuto muscolare e quello tendineo. È un'interfaccia altamente specializzata con lo scopo di trasmettere la forza generata dalle fibre muscolari alle fibre di collagene del tessuto tendineo [36]. A livello macroscopico, si nota che in corrispondenza della MTJ (**Fig. 9**) non si ha una divisione esatta e planare tra i due diversi tessuti ma si viene a creare una rete di tessuto muscolare e tendineo sovrapposti. Andando ad indagare poi a livello microscopico notiamo che le miofibre (o fibre muscolari) formano proiezioni simili a dita che vanno ad inserirsi sulle fibre di collagene della MEC del tendine [37]. Ogni proiezione proveniente dal muscolo è costituita da una rete allineata di microfilamenti di actina e varie proteine legate ad

essa (es. miosina) che ha origine dalla banda terminale Z. Questa matrice intracellulare si collega al subsarcolemma e ai complessi proteici di adesione focale contenenti diverse proteine di adesione (come talina, vinculina e paxillina), permettendo così l'ancoraggio delle proteine del citoscheletro muscolare alla matrice extracellulare del tendine, in modo che la forza generata dal meccanismo contrattile intracellulare del muscolo sia trasmessa al tendine[38].

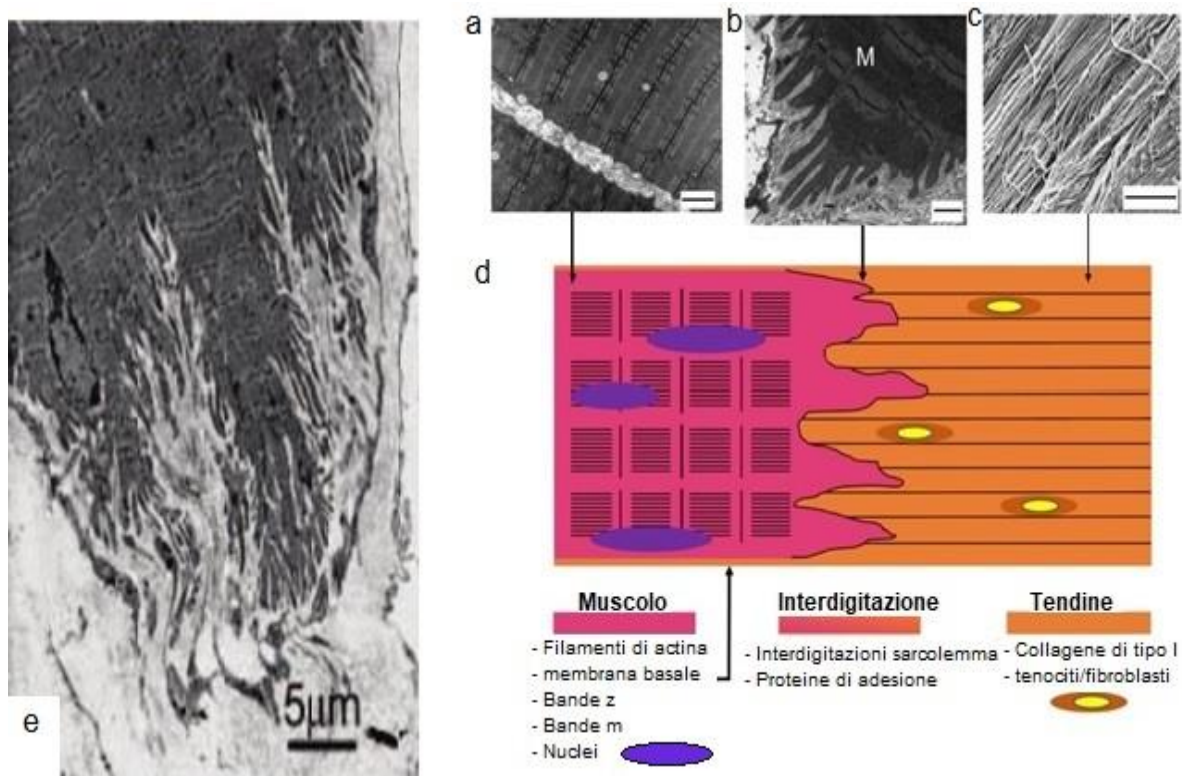


Figura 9 (a) Immagine di miofibrille al microscopio elettronico a trasmissione (dimensione scala=2 μ m). (b) Immagine della MTJ del muscolo sternomastoideo di ratto al microscopio elettronico a trasmissione (M=muscolo, T=tendine) (dimensionamento scala=0.5 μ m). (c) Vista delle fibre tendinee osservate al microscopio elettronico a scansione (SEM) (dimensione scala=1.8 μ m). (d) Rappresentazione grafica della MTJ e dei suoi componenti. (adattate da [2]). (e) Micrografia elettronica a trasmissione della giunzione miotendinea che mette in mostra la rete di interdigitazioni tra il sarcolemma del muscolo (di colorazione scura) e la matrice extracellulare del tendine (di colorazione chiara). (adattata da [37]).

1.1.4.2 PROPRIETÀ MECCANICHE

Finora nella letteratura sono presenti scarsi tentativi di studiare gli aspetti biomeccanici e le relative proprietà delle entesi in quanto si va incontro a difficoltà pratiche sia nella registrazione dei livelli di deformazione o altre proprietà in un volume di tessuto così piccolo (superficie di contatto di poche centinaia di μ m) e sia a causa della natura transitoria della regione senza chiari confini che la definiscono [39]. L'entesi, inoltre, è un'interfaccia molto complessa perché nonostante l'osso e il tendine abbiano una simile resistenza a trazione, il modulo elastico del primo è approssimativamente 10 volte maggiore rispetto a quello del secondo (**Fig. 10**). Si deduce quindi che la funzione primaria

dell'entesi è quella di bilanciare questa differenza [40]. I gradienti nella composizione e nell'organizzazione del collagene e dei minerali nelle regioni di interfaccia rendono più uniforme la distribuzione della tensione evitando delle eccessive concentrazioni di quest'ultima, migliorano l'ancoraggio e di conseguenza diminuiscono il rischio di frattura assicurando un graduale cambio delle proprietà meccaniche tra tessuto duro e molle [41]. La poca letteratura presente su questa interfaccia riguarda test meccanici svolti su animali, come l'entesi tra il tendine sovraspinato e la testa dell'omero del ratto che presenta un modulo elastico $E = 3.1 \pm 0.9$ MPa, una tensione di rottura di 45.7 ± 3.4 MPa associata ad un tasso di deformazione del $4.3 \pm 3.3\%$ [42].

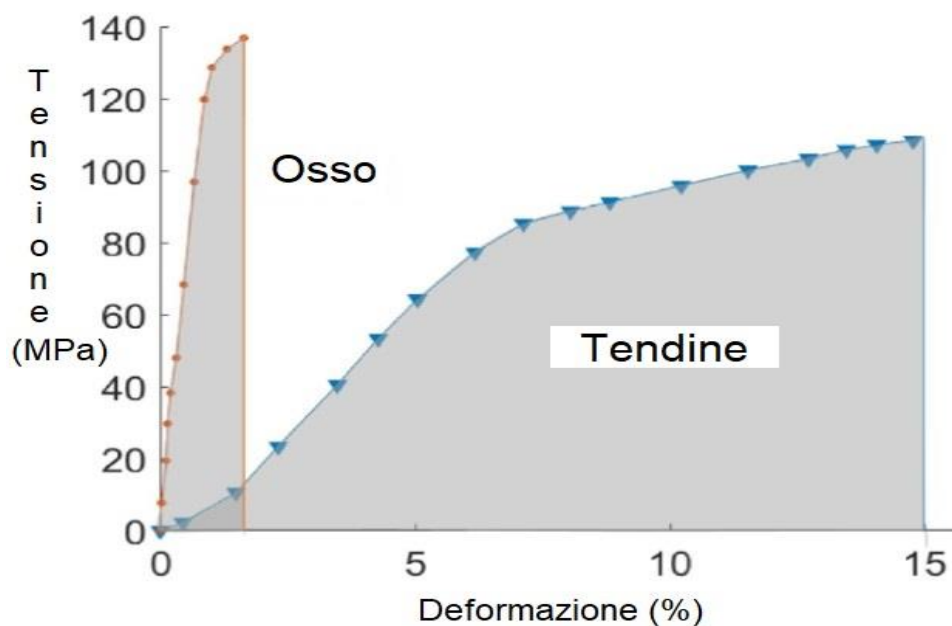


Fig. 10 Tipica caratteristica tensione-deformazione dell'osso e del tendine, mettendo in evidenza le differenze nella rigidità (osso più rigido del tendine) e durezza/tenacità (il tendine è più tenace dell'osso. (adattata da [43])

La giunzione miotendinea, come già accennato nel paragrafo precedente, ha la funzione principale di trasmettere la forza generata dal muscolo al tendine. La particolare configurazione delle fibre muscolari (estroflessioni simili a dita) (**Fig. 9e**) all'inserzione con il tessuto tendineo svolge un ruolo chiave nella trasmissione della forza generata dalla contrazione muscolare, principalmente per due motivi: (1) Aumenta la superficie di almeno un fattore 10-20 rispetto ad una superficie piana con una conseguente non trascurabile riduzione della tensione. (2) Posiziona le membrane ad angoli molto bassi rispetto ai vettori di forza applicati quindi le rende principalmente soggette a tensioni di taglio. Ciò è molto efficiente in quanto vari studi dimostrano che le membrane sono molto più resistenti a sforzi da taglio rispetto agli altri [36]. Anche la MTJ è stata principalmente studiata negli animali a

causa della difficoltà ad ottenere campioni dall'uomo (**Tab. 5**). Queste scarse sperimentazioni sugli umani unite alla complessità della struttura bifasica e gerarchica dell'interfaccia rendono molto difficile la rigenerazione o riproduzione di questa regione.

Tab. 5 Range delle proprietà meccaniche di alcune MTJ (Media \pm dev.standard) (adattata da [2]).

MTJ	Modulo di Young (MPa)	Tensione di rottura (MPa)	Deformazione di rottura (%)	Riferimenti
Diaframma (maiale)	0.28 \pm 0.15	0.15 \pm 0.02	122 \pm 19.2	[44]
Tendine d'Achille-tricipite surale (maiale):				[45]
Distale	79.1 \pm 9.38	32.1 \pm 8.26	55 \pm 12	[45]
Prossimale	126 \pm 40.4	47 \pm 10	40 \pm 9	[45]
Aponeurosi del gastrocnemio laterale (tacchino)	744 \pm 219	53.2 \pm 12.9	8.58 \pm 4.22	[46]

1.2 DANNI AI TESSUTI E ATTUALI APPROCCI CHIRURGICI

A differenza degli altri tessuti, l'osso ha la capacità intrinseca di rigenerarsi in risposta ad una lesione tramite il suo continuo processo di rimodellazione, infatti, la frattura, una delle lesioni più comuni per questo tessuto in tutto il mondo (ogni anno si verificano 6.3 milioni di fratture negli Stati Uniti), nella maggior parte dei casi guarisce in autonomia grazie alle proprietà di riparazione intrinseche dell'osso senza la formazione di tessuto cicatriziale. Tuttavia, ci sono casi in cui la rigenerazione da parte del tessuto stesso non basta e bisogna inevitabilmente ricorrere a pratiche cliniche. Inoltre, occorre considerare particolari condizioni nella chirurgia ortopedica e maxillofaciale che necessitano obbligatoriamente di pratiche chirurgiche di riparazione ossea, come infezioni, resezioni tumorali (principalmente osteosarcomi), difetti congeniti o casi in cui la capacità dell'osso di rigenerarsi è compromessa come nel caso di malattie come osteoporosi. Infine, tirando le somme, circa 2 milioni di casi di difetti scheletrici all'anno richiedono l'ospedalizzazione e procedure d'innesto di impianti biologici, con associati costi di trattamento che superano i miliardi di dollari l'anno [47]–[49].

La degenerazione della cartilagine è correlata a diverse condizioni patologiche, come l'ossificazione eterotopica, la fibrodisplasia o la più diffusa osteoartrite [50]. L'osteoartrite, patologia che porta alla totale distruzione della cartilagine, interessa circa 27 milioni di adulti negli Stati Uniti. In aggiunta alle condizioni patologiche vere e proprie, le lesioni al tessuto cartilagineo possono essere semplicemente dovute a traumi causati dall'eccessiva sollecitazione delle articolazioni durante lo sport o durante classiche attività di routine. La cartilagine danneggiata ha una capacità di autorigenerazione molto limitata a causa della sua scarsa vascolarizzazione che di conseguenza non

permette l'ottimale replicazione dei condrociti (cellula principale del tessuto cartilagineo). I trattamenti chirurgici attuali per piccoli difetti consistono principalmente in cure palliative, riparazione tramite tecniche di stimolazione del midollo osseo o impianto di condrociti autologhi. Per grandi difetti si ricorre a trapianti biologici (osteocondrali) o ad un'artroplastica articolare totale [50], [51].

Tendini e legamenti (T/L) sono costantemente esposti a sollecitazioni durante tutte le attività che svolgiamo e per questo sono spesso soggetti a lesioni o rotture, infatti, si registrano circa 30 milioni di casi di lesioni al sistema muscolo scheletrico a livello globale ogni anno, la maggior parte di questi interessano tendini e legamenti, con una spesa sanitaria europea associata che supera i 115 miliardi di euro l'anno [52]. Il tendine d'Achille, il patellare e i tendini della cuffia dei rotatori risultano i tendini più interessati da lesioni. A titolo di esempio si registrano circa 2 milioni di lesioni del tendine d'Achille correlate ad attività sportive ogni anno nel mondo e di queste più di 250 000 richiedono un intervento chirurgico seguito da una lunga riabilitazione [24]. I soggetti colpiti sono principalmente la popolazione anziana (la lesione alla cuffia dei rotatori colpisce il 40% delle persone di età superiore ai 60 anni negli Stati Uniti) e sportivi che sono coinvolti in attività ad alto carico meccanico o che portano ad usura del tessuto (si suppone che il 50% delle lesioni legate allo sport coinvolgano i tendini) [53], [54]. Diversi fattori intrinseci come età, peso e nutrizione sono responsabili di infortuni ai T/L. [53]. Le lesioni tendinee si dividono in 2 principali categorie: (1) lesioni croniche, o tendinopatie, in cui non si hanno lacerazioni a livello macroscopico ma sono presenti variazioni a livello cellulare e molecolare del tendine (disorganizzazione fibrille di collagene, aumento di proteoglicani e glicosamminoglicani, ipercellularità, neovascolarizzazione, ecc...) che comportano dolore e diminuzione della resistenza dei tendini colpiti ; (2) lesioni acute, causate principalmente da fattori esterni (o estrinseci) come forti traumi, in cui si ha la parziale o la completa rottura del tendine che in casi estremi può portare alla perdita del movimento [55]. I T/L non possiedono un alto potenziale rigenerativo e di solito, durante il limitato processo di guarigione, in corrispondenza della lesione si assiste alla formazione di tessuto cicatriziale con un conseguente peggioramento delle proprietà meccaniche e quindi un incremento del rischio di recidiva. Attualmente, dal punto di vista clinico si utilizzano diversi approcci per le lesioni ai T/L: conservativo, chirurgico o una combinazione dei due. Il primo consiste in riposo, esercizi mirati, crioterapia con ghiaccio, terapia farmacologica antinfiammatoria, ultrasuoni o terapia laser per permettere la naturale guarigione del tessuto. Questa tipologia di approccio richiede lunghi tempi di trattamento e recupero. Una ferita estesa, soprattutto nel caso di lesioni acute, invece richiede necessariamente un trattamento chirurgico che consiste nella sutura della lesione o dell'unità osteo-tendinea oppure nell'innesto di trapianti biologici [53].

Le due interfacce (entesi e giunzione miotendinea) sono costantemente sollecitate durante il movimento, anche nelle normali attività quotidiane, e perciò vanno spesso incontro a lesioni o rotture. A livello mondiale, i disturbi e le lesioni al tessuto muscolo scheletrico sono la seconda maggiore causa di disabilità globale e si registra un aumento del 19.9% nell'ultimo decennio. Solo negli Stati Uniti, il peso delle malattie e degli infortuni che colpiscono il sistema muscolo scheletrico è stato stimato essere di circa 980.1 miliardi di dollari all'anno [56]. Per quel che riguarda l'entesi, la maggior parte delle lesioni si verificano in prossimità del tendine d'Achille, della cuffia dei rotatori e della patella. Queste lesioni provocano spesso una disabilità acuta e possono predisporre l'articolazione in questione a malattie come l'osteoartrite, una malattia che colpisce oltre il 70% delle persone di età compresa tra i 55 e 78 anni [57]. Tuttavia, l'entesopatia (patologia che colpisce l'entesi) è comune anche nei giovani, soprattutto negli sportivi, dove si sentono espressioni familiari come "il gomito del tennista" o "il ginocchio del saltatore" [58]. Anche la giunzione miotendinea, a causa della sua ridotta capacità di assorbire energia è largamente esposta a varie patologie e traumi [59]. Come per l'entesi, i danni alla MTJ sono molto frequenti nello sport, rappresentano tra il 10 e il 55% di tutte le lesioni sportive acute e hanno un alto tasso di recidiva [24]. I siti anatomici di questa interfaccia più frequentemente colpiti sono quelli in corrispondenza dei muscoli bicipite brachiale, retto femorale, semimembranoso e gastrocnemio mediale. Le lesioni della giunzione miotendinea sono classificate in base all'entità dello stiramento o della lacerazione: stiramento senza particolari conseguenze (grado 1), lacerazioni parziali (grado 2) e completa rottura (grado 3) [59]. Il recupero o la ricostruzione di entrambe le interfacce, fondamentale visto la casistica di questi infortuni, rimane ancora una grossa sfida a causa della complessità strutturale e organizzativa e della differenza nelle proprietà meccaniche dei diversi tipi di tessuto coinvolti [60]. Per piccoli stiramenti o lacerazioni, la procedura standard consiste nella suturazione, la quale consente il riattacco dell'unità muscolo-tendinea o osteo-tendinea. Nei casi in cui l'interfaccia è completamente recisa, a causa di lesioni traumatiche, si ricorre all'uso di impianti biologici.

I trapianti utilizzati per tutti i tessuti sopracitati vengono classificati in base alla loro natura di provenienza [61]:

- **Autotrapianti:** composti di un tessuto proveniente dal paziente stesso;
- **Allotrapianti:** composti di un tessuto o da un intero organo proveniente da un altro donatore umano o da un cadavere;
- **Xenotrapianti:** composti di un tessuto decellularizzato proveniente da animale;
- **Trapianti sintetici:** composti da materiali sintetici costituiti da vari composti chimici, come polimeri, ceramiche e metalli.

Generalmente, la scelta del trapianto corretto da utilizzare dipende da diversi fattori come età, livello di attività fisica, grado della lesione e sesso del paziente [62]. Ogni tipologia di trapianto ha le sue diverse limitazioni: gli autotrapianti richiedono il sacrificio di tessuto sano e funzionale e l'eventuale necessità di effettuare incisioni in più siti anatomici con possibile dolore o complicazioni per il paziente, mentre gli allotrapianti aumentano il rischio di trasmissione di malattie o di rigetto da parte del sistema immunitario. A causa della scarsa disponibilità di queste due tipologie, molti studi si sono focalizzati verso trapianti di provenienza animale, i quali richiedono un'accurata decellularizzazione per evitare reazioni immunitarie avverse o zoonosi. Ad ogni modo, tutte le tecniche sopra elencate comportano un'immobilizzazione parziale o totale durante il periodo di crescita del tessuto rimpiazzato, la formazione di tessuto cicatriziale che comporta un graduale peggioramento delle proprietà meccaniche della regione interessata rispetto a quelle pre-infortunio e un aumento del rischio di ricaduta [24], [60], [63].

1.3 INGEGNERIA TISSUTALE: APPROCCIO RIGENERATIVO ALLA LESIONE

Viste le limitazioni di tutte le soluzioni citate finora, un'alternativa all'approccio chirurgico tradizionale può essere l'ingegneria tissutale. L'ingegneria tissutale (IT) e la medicina rigenerativa sono aree multidisciplinari che combinano le conoscenze e le tecnologie di differenti campi come biologia, chimica, ingegneria, medicina, farmaceutica e scienze dei materiali per sviluppare terapie e prodotti per la riparazione o rimpiazzo di tessuti e organi danneggiati [64].

Questa nuova alternativa favorisce la rigenerazione dei tessuti basandosi su tre elementi chiave [65], [66]:

- **Cellule:** sintetizzano la matrice extracellulare e promuovono la formazione del nuovo tessuto, sono di vari tipi (autologhe, allogene, xenogene o staminali) in base al tessuto da rigenerare o rimpiazzare;
- **Scaffold:** supporto poroso tridimensionale che funge da matrice extracellulare permettendo l'adesione, la proliferazione e la crescita delle cellule;
- **Fattori di crescita o di regolazione:** stimoli meccanici e/o biochimici che influenzano il comportamento cellulare.

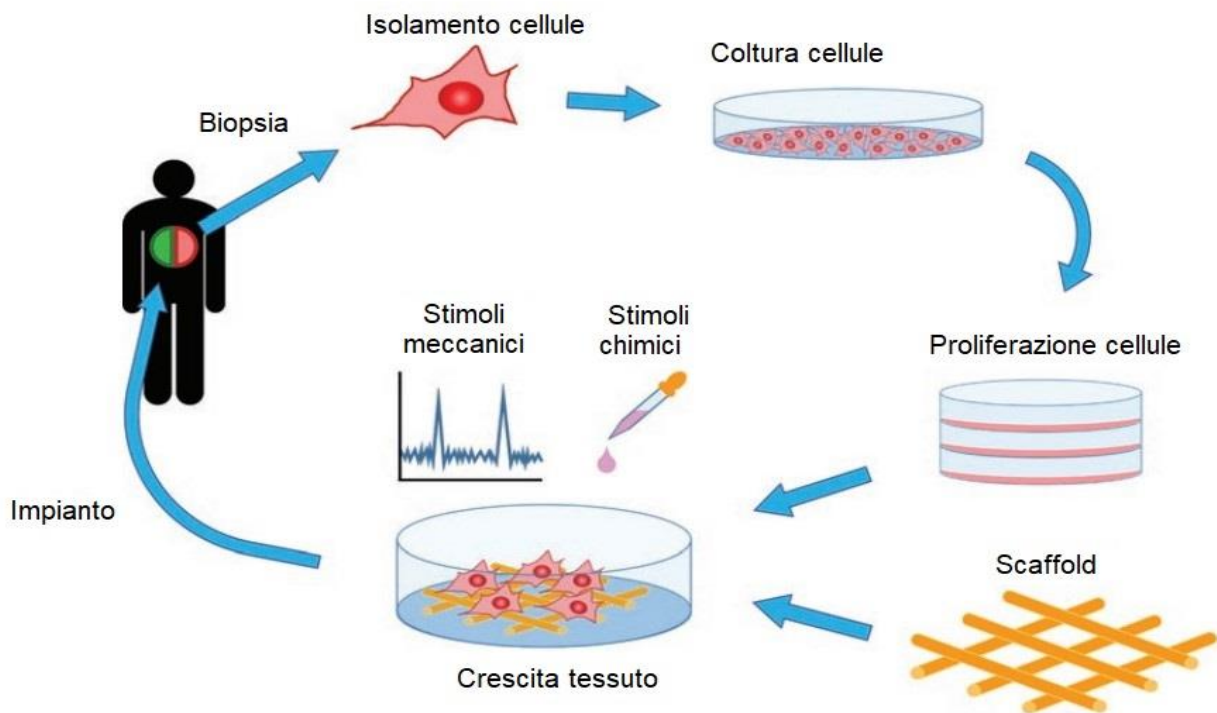


Fig. 11 Schema dell'approccio classico dell'ingegneria tissutale

La strategia classica dell'ingegneria tissutale (**Fig. 11**) consiste nel prelievo di una piccola quantità di cellule dal tessuto del donatore/paziente mediante biopsia. A questo punto le cellule o vengono impiantate direttamente nell'ospite, oppure si procede con l'isolamento e l'espansione di queste in colture in vitro. Successivamente le cellule vengono seminate (a volte anche incapsulate) sullo scaffold (matrice extracellulare) e coltivate in regime statico, nel caso in cui non è presente nessuno stimolo esterno, o in regime dinamico, il quale prevede l'utilizzo di un bioreattore. Infine, il processo si conclude con l'impianto del sistema (scaffold + cellule) nel corpo del paziente. Questi scaffolds dopo l'impianto tendono a degradarsi lentamente e ad essere rimpiazzati progressivamente dalla matrice extracellulare secreta dalle cellule ospiti, ovvero dal nuovo tessuto rigenerato [67].

1.3.1 SCAFFOLD

Gli scaffolds sono uno degli elementi chiave di questa disciplina in quanto permettono la crescita delle cellule in un ambiente ottimale che mima la forma e l'organizzazione strutturale della matrice extracellulare nativa. Perciò è intuibile che l'obiettivo principale è quello di avere uno scaffold

quanto più strutturalmente e funzionalmente simile alla matrice extracellulare (MEC) del tessuto originale (**Tab. 6**), quindi deve possedere determinate caratteristiche e funzioni [68]:

- **Architettura/porosità:** uno scaffold ottimale deve presentare un'architettura simile a quella del difetto da trattare ed un'elevata porosità con pori interconnessi per permettere l'infiltrazione delle cellule, un efficiente trasporto di nutrienti e il trasporto di metaboliti e scarti di degradazione. La dimensione dei pori è un parametro chiave in quanto pori grandi incentivano maggiormente la crescita del nuovo tessuto, mentre pori più piccoli permettono una più facile infiltrazione cellulare. La dimensione ottimale dei pori è nel range 100-500 μm in quanto con queste dimensioni si ha il giusto compromesso per favorire la colonizzazione da parte delle cellule senza andare a deteriorare eccessivamente le proprietà meccaniche dello scaffold [65], [68];
- **Cito/Biocompatibilità:** lo scaffold deve fornire un supporto per le cellule, quindi, deve essere compatibile con le cellule del tessuto ingegnerizzato e con quelle endogene del tessuto ospite, senza innescare reazioni avverse di qualsiasi tipo (immunitarie, locali, sistemiche) [68];
- **Composizione chimica:** deve essere quanto più simile possibile alla matrice extracellulare del tessuto di interesse. Inoltre, questo parametro è legato anche alla bioattività, ovvero lo scaffold deve essere bioattivo per permettere le interazioni biochimiche con i tessuti biologici o con segnali esterni (come i fattori di crescita).
- **Biodegradabilità:** essendo un supporto temporaneo la biodegradabilità è un parametro richiesto in quanto lo scaffold deve degradarsi per lasciar spazio alla nuova matrice extracellulare prodotta dalla componente cellulare. Occorre però fare attenzione a non scegliere materiali che producano prodotti di degradazione tossici per evitare l'innescare di risposte infiammatorie. Questi prodotti di scarto devono essere rimossi dal corpo attraverso le vie metaboliche ad un tasso adeguato in modo da mantenere la loro concentrazione nei tessuti ad un livello tollerabile. Infine, è molto importante che la velocità di degradazione sia comparabile con quella di formazione del nuovo tessuto per avere un ottimale sviluppo di quest'ultimo [67];
- **Proprietà meccaniche:** lo scaffold deve avere una forma e fornire un'appropriata stabilità meccanica coerenti con il tessuto da creare o rigenerare, ovvero le sue proprietà meccaniche devono corrispondere quanto più possibile a quelle del tessuto ospite senza però compromettere l'adesione e la migrazione cellulare [68].

Tab. 6 Funzioni della matrice extracellulare (MEC) nei tessuti nativi e degli scaffold nei tessuti ingegnerizzati (adattata da [68]).

Funzioni della MEC nel tessuto originale	Analoghe funzioni degli scaffold	Caratteristiche architettoniche, biologiche e meccaniche degli scaffold
<ul style="list-style-type: none"> • Supporto strutturale alle cellule ospiti 	<ul style="list-style-type: none"> • supporto strutturale alle cellule applicate per aderire, crescere, migrare e differenziarsi in vitro ed in vivo 	<ul style="list-style-type: none"> • Siti di legame per le cellule; • struttura porosa con pori interconnessi per la migrazione delle cellule e diffusione delle sostanze nutritive; • resistenza temporanea alla biodegradazione
<ul style="list-style-type: none"> • Contribuisce alle proprietà meccaniche dei tessuti 	<ul style="list-style-type: none"> • Fornisce la forma e la stabilità meccanica al difetto del tessuto; • conferisce rigidità e resistenza al tessuto ingegnerizzato 	<ul style="list-style-type: none"> • Sufficienti proprietà meccaniche per simulare il tessuto originale
<ul style="list-style-type: none"> • Fornisce stimoli/segnali alle cellule 	<ul style="list-style-type: none"> • Interagisce attivamente con le cellule per facilitare attività come la proliferazione e la differenziazione 	<ul style="list-style-type: none"> • Stimoli biologici come siti di legame adesivi per le cellule; • Stimoli fisici come la topografia della superficie
<ul style="list-style-type: none"> • Agisce come un serbatoio di fattori di crescita e potenzia il loro effetto 	<ul style="list-style-type: none"> • Agisce come veicolo e serbatoio per fattori di crescita applicati dall'esterno 	<ul style="list-style-type: none"> • Microstrutture ed altri fattori della matrice che trattengono agenti bioattivi nello scaffold
<ul style="list-style-type: none"> • Fornisce un ambiente fisico flessibile in risposta ai processi dinamici del tessuto 	<ul style="list-style-type: none"> • Fornisce un certo volume vuoto per permettere la vascolarizzazione e la formazione del nuovo tessuto 	<ul style="list-style-type: none"> • Microstrutture porose per la diffusione; • Design della matrice con meccanismi e tassi di degradazione controllabili; • Biomateriali e loro prodotti di degradazione in concentrazioni accettabili

1.3.2 TECNOLOGIE ADDITIVE: 3D PRINTING E 3D BIOPRINTING

La stampa 3D, conosciuta anche come additive manufacturing, per definizione è un processo che consente la realizzazione di oggetti, mediante più tecniche diverse tra loro, ma che si basano principalmente sulla deposizione di strati successivi di materiale fino alla fabbricazione dell'intero oggetto tridimensionale [69]. Permettendo di superare alcune limitazioni presenti nei metodi tradizionali, questa tecnica di fabbricazione ha avuto un forte sviluppo nel campo della medicina rigenerativa nelle ultime due decadi. Questa rapida espansione è dovuta ai numerosi vantaggi della stampa 3D nell'ingegneria tissutale rispetto ai precedenti processi di fabbricazione. La capacità di creare scaffold con strutture complesse e di forma controllata specifiche per il paziente grazie all'utilizzo di una varietà di programmi CAD o tecniche di imaging, la possibilità di impiego di diversi

biomateriali, la minore necessità di manodopera e i minori costi di produzione sono le principali ragioni dell'impressionante impatto di questa tecnologia [70], [71]. Il processo di stampa 3D consta di quattro fasi [72]:

1. Creazione di un modello digitale 3D (attraverso diversi programmi CAD, ma anche da imaging medico come CT o raggi x);
2. Software di slicing 'affettano' il modello CAD in un file di immagini 2D che infine viene convertito in un file contenente una serie di istruzioni leggibili dalla stampante, noto anche come codice G [73];
3. Fabbricazione, assistita da un computer, dell'oggetto (scaffold) strato per strato mediante il dispositivo di stampa;
4. Se necessario, si attuano modifiche o rifiniture post-fabbricazione (p.es. rifinitura superficie).

Attualmente sono disponibili molte varianti e tecnologie diverse tra loro che possono essere classificate in due grandi gruppi a seconda della fonte di energia utilizzata durante la fabbricazione, cioè il calore o la luce [70]. La scelta tra le varie tecniche è influenzata dalle esigenze di velocità di stampa, costo e livello di risoluzione, parametri che variano a seconda della procedura e del materiale utilizzato. A causa della vastissima disponibilità di tecniche di stampa, ora verranno analizzate solo le tecnologie citate in seguito in questo elaborato evidenziandone il principio di funzionamento, vantaggi e limiti di ciascuna.

1.3.2.1 MODELLAZIONE A DEPOSIZIONE FUSA (FDM)

La modellazione a deposizione fusa (FDM) è una tecnica di stampa 3D che utilizza polimeri termoresponsivi riscaldati appena oltre la loro temperatura di transizione vetrosa [74]. Il sistema in questione è costituito da una o più bobine di filo polimerico termoplastico che viene convogliato verso un ugello opportunamente riscaldato, da dove viene estruso per andare a costituire gli strati dell'oggetto (scaffold) sulla piattaforma di fabbricazione. L'ugello contiene al suo interno riscaldatori resistivi che mantengono ad una certa ed opportuna temperatura il materiale facilitandone la sua fuoriuscita. Al contatto con la piattaforma, la quale si trova ad una temperatura più bassa, il polimero si indurisce e si fissa. Dopo che uno strato viene depositato, la piattaforma si sposta verso il basso con un passo stabilito dall'utilizzatore, il processo si ripete depositando un altro strato fino alla completa realizzazione dello scaffold. È possibile, inoltre, modificare diversi parametri come il diametro e la temperatura dell'ugello, la velocità di rifornimento di materiale verso l'ugello o la velocità di stampa [69], [74]. I principali vantaggi di questa metodica sono l'eliminazione di

potenziali tossicità causate da solventi organici che spesso sono impiegati per solubilizzare certi polimeri (esempio: diclorometano per solubilizzare PLGA), produzione di scaffold con una buona resistenza meccanica, costi contenuti, sistemi di controllo semplici e velocità di stampa. Le limitazioni della FDM sono la non ottimale risoluzione di stampa, l'uso esclusivo di polimeri termoplastici e a causa della temperatura troppo elevata del processo (range: 150-260°), l'impossibilità di produrre scaffold con biomolecole o cellule già incorporate nel materiale polimerico [70].

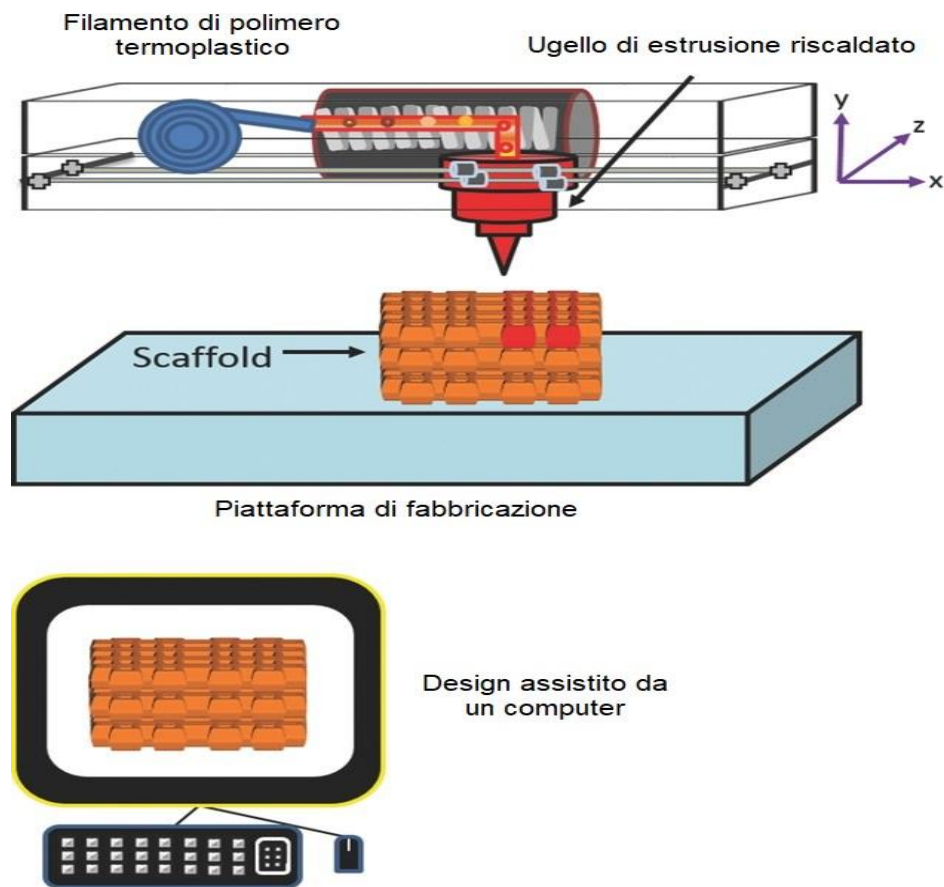


Fig. 12 Schema della modellazione a deposizione fusa (adattato da [69]).

1.3.2.2 MODELLAZIONE A MULTIGETTO (MJM)

Nota anche come stampa a getto d'inchiostro, è un processo di fabbricazione molto simile alla stampa ad inchiostro tradizionale presente nelle nostre case, ma al posto del normale inchiostro, tramite un ugello (o più ugelli), si depositano gocce di fotopolimeri liquidi solidificabili nei punti della superficie in cui si dovrà formare lo strato. Con questa metodologia si riescono a creare strati sottilissimi di

materiale (range tra i 16 e 30 μm) che esposti a raggi ultravioletti, si solidificano velocemente formando lo strato desiderato. Il processo viene ripetuto per un certo numero di strati fino a realizzare l'intero oggetto. Se sono presenti delle forme complesse o particolari da realizzare, alcune stampanti sono dotate di ulteriori testine per depositare eventuale materiale di supporto che può essere rimosso con varie tecniche a fine stampa [75], [76]. Questa tecnologia offre un buon compromesso tra risoluzione, velocità e qualità del prodotto finale permettendo di creare prototipi con forme complesse ad alto dettaglio. Queste stampanti utilizzano energia acustica (generata da un impulso su cristallo piezoelettrico) o energia termica per generare una pressione all'interno del serbatoio che permette la fuoriuscita delle gocce di liquido dall'ugello. Inoltre, diversi studi ([77], [78]) hanno dimostrato che questa tipologia di stampa, compresi i casi in cui si utilizza energia termica per il suo funzionamento, può essere inclusa nelle tecniche di bioprinting, in quanto nonostante le temperature raggiunte siano elevate (200-300°), se mantenute per brevissimi intervalli di tempo (ordine dei μs), non creano danni alle molecole biologiche o interferiscono in maniera significativa con la vitalità e funzione post-stampa delle cellule. Una limitazione, a prescindere dalla fonte di energia utilizzata, si ha sulla scelta del liquido che non deve avere una viscosità molto alta (≤ 10 cP) per evitare la necessità di utilizzare pressioni elevate durante il processo [76].

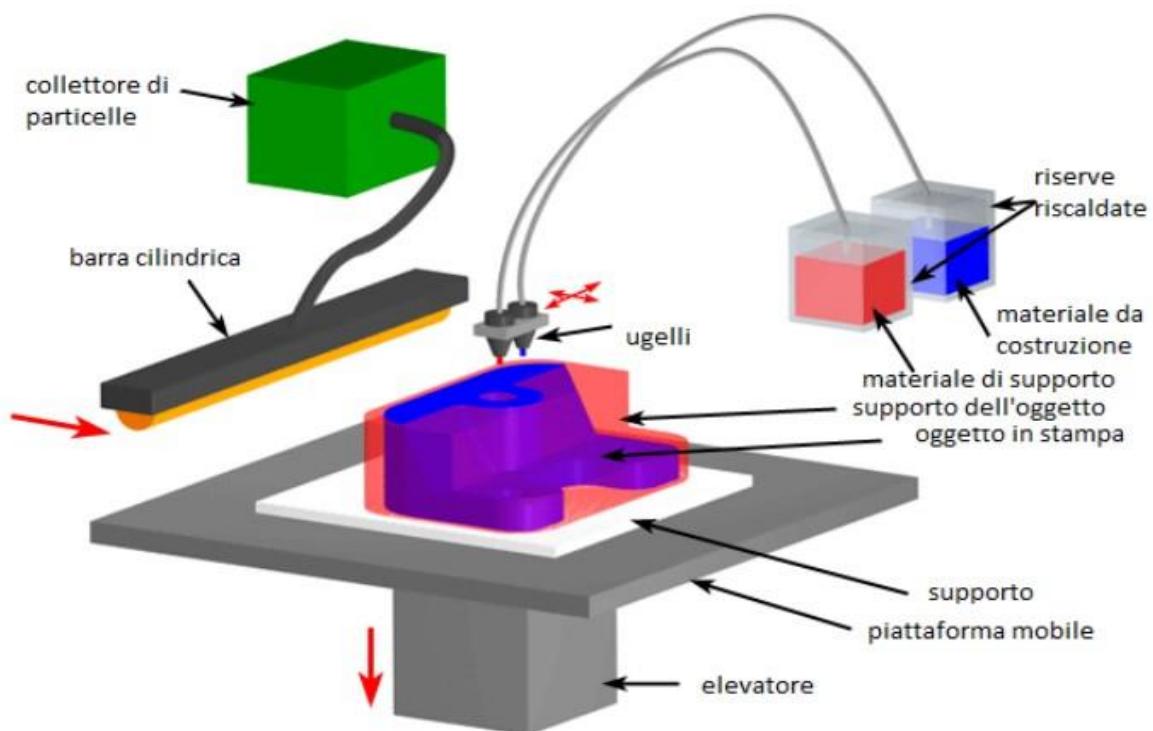


Fig. 13 Schema di una stampante multigetto (adatta da custompartnet.com,2018).

1.3.2.3 3D BIOPRINTING

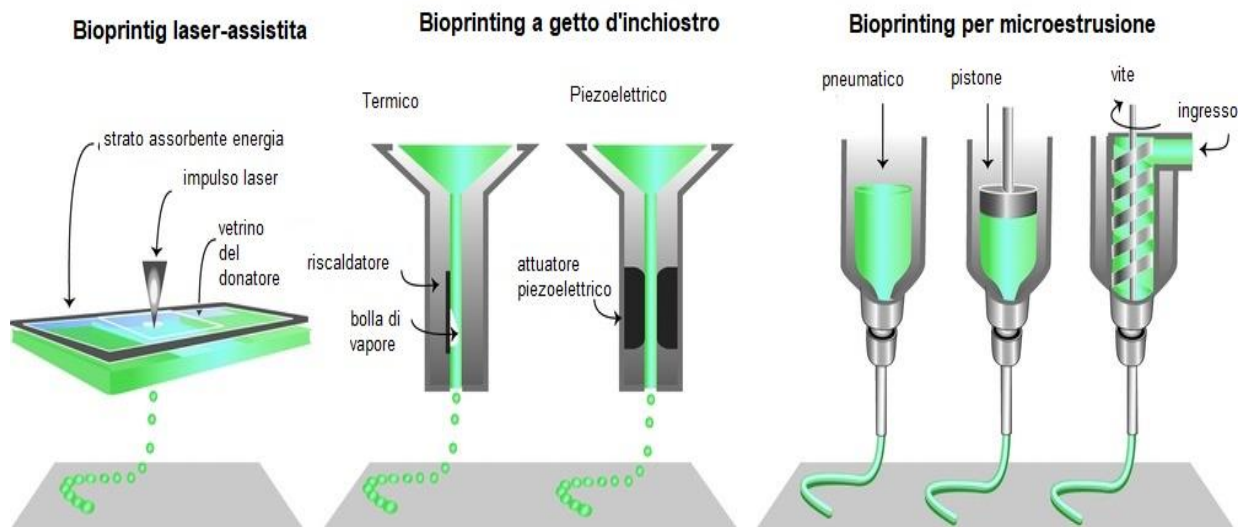


Fig. 14 Componenti della stampa laser-assistita, a getto d'inchiostro e per microestruzione (adattata da [79]).

Grazie ai costanti progressi nella stampa 3d, nella biologia cellulare e nella scienza dei materiali, nelle ultime decadi si è assistito alla nascita e allo sviluppo della 3d bioprinting. È una tecnica di stampa che, a differenza della stampa 3d tradizionale, permette la realizzazione di scaffold o tessuti ingegnerizzati 3d con cellule già incorporate nel materiale di stampa o anche la produzione di scaffold acellulari biocompatibili [80]. Per ottenere ciò si hanno a disposizione varie tecniche di stampa che vengono raggruppate in una prima classificazione in 3 principali categorie [76] (**Fig. 14**):

- **A getto d'inchiostro (inkjet bioprinting):** è il tipo di stampante più comunemente usato sia per applicazioni biologiche che non biologiche, sono note anche come stampanti drop-on-demand. Il suo funzionamento, i suoi vantaggi e limitazioni sono già stati descritti nel paragrafo precedente 'modellazione a multigetto';
- **Per microestruzione (microextrusion bioprinting):** è un sistema di estrusione automatizzato (simile alla FDM), il quale deposita il materiale estruso su un substrato (piattaforma) attraverso l'ugello di una testina di stampa. Successivamente, in base ad un software CAD-CAM, la piattaforma o la testina si spostano lungo l'asse z per realizzare lo strato successivo fino alla formazione dell'intero oggetto tridimensionale. L'estrusione è possibile o grazie a un sistema pneumatico (quindi grazie alla generazione di aria compressa) o grazie a sistemi meccanici (pistoni o viti). I principali vantaggi di questa tecnica sono la ripetibilità, la velocità di stampa e la possibilità di utilizzare una vasta gamma di materiali (tra cui idrogel, aggregati cellulari e molti polimeri appartenenti ad un vasto range di viscosità).

Un altro vantaggio molto importante è la sua capacità di depositare un'elevata densità di cellule, anche se post-estrazione la vitalità delle cellule (range: 40-86%) è più bassa rispetto alla stampa a getto d'inchiostro con un tasso che è inversamente proporzionale alla pressione di estrusione e al diametro dell'ugello [76].

- **Laser-assistita (laser-assisted bioprinting):** è una tecnica che si basa sui principi di trasferimento indotto da laser. Il set-up sperimentale di un classico dispositivo LAB è costituito da una sorgente laser, un sistema di focalizzazione, un 'nastro' (di solito di vetro e a forma di disco) coperto da uno strato che assorbe energia laser (di solito metallico come oro o titanio) e uno strato di materiale biologico (bioinchiostro carico di cellule), e un substrato o collettore ricevente rivolto in direzione del nastro. Quando il raggio laser viene emesso, le lenti di focalizzazione indirizzano il percorso del laser verso lo strato assorbente del nastro e nel punto di irradiazione si viene a creare una bolla che tende ad espandersi sempre di più fino a collassare. Spinto dall'alta pressione generata al polo della bolla, il bioinchiostro carico di cellule, sotto forma di gocce, viaggia dal nastro al collettore (distanza di circa 100-500µm) depositandosi su quest'ultimo. Esistono diverse tipologie di laser-assisted bioprinting che si differenziano in base alle diverse configurazioni del nastro. Le più comuni sono la stampa indotta da laser (LIFT = laser-induced forward transfer) (appena descritta), stampa diretta tramite evaporazione da impulsi laser sulla matrice (MAPLE-DW = matrix-assisted pulse laser evaporation direct writing) e la stampa indotta da laser su strato assorbente (AFA-LIFT = absorbing film assisted laser-induced forward transfer). La differenza tra l'AFA-LIFT e la MAPLE-DW è rispettivamente la presenza o l'assenza dello strato che assorbe energia sul nastro. Il volume depositato, la risoluzione e la vitalità cellulare sono fattori che dipendono fortemente dai vari parametri di stampa come l'energia dell'impulso laser, lo spessore dello strato assorbente e dello strato di bioinchiostro, distanza nastro-substrato e proprietà fisiche del bioinchiostro. È stato dimostrato che tanto maggiore è la fluenza laser allora tanto maggiore è il numero di cellule che possono essere trasferite sul substrato. L'uso della LAB presenta numerosi vantaggi: possiede un'elevata risoluzione di stampa, ampio range di tollerabilità della viscosità del bioinchiostro (1-8000 mPa/s), capacità di stampa di bioinchiostri ad alta densità cellulare ed elevata vitalità cellulare. Un altro punto a favore, essendo una tecnica che non utilizza ugelli/testine, è l'assenza di problemi di occlusione o intasamento che invece possono essere presenti nelle altre due tecniche. Sebbene si notino numerosi vantaggi, sono presenti anche altrettante limitazioni. La complessità dei sistemi di controllo, l'elevato costo dell'intero sistema e il rischio di contaminazione da particelle metalliche sono i principali punti deboli della LAB. Inoltre, la limitata quantità di

bioinchiostro che può essere trasferita ad ogni impulso laser, rende la produttività e l'efficienza di questa tecnica non ancora alla pari delle altre metodiche [76], [81].

Tab. 7 Confronto delle caratteristiche dei tre processi di 3d bioprinting (adattata da [76]).

Processi di stampa			
	Getto d'inchiostro	Microestrusione	Laser-assistita
Velocità di stampa	Veloce (1-10000 gocce/s)	Lenta (10-50 $\mu\text{m/s}$)	Medio-veloce (200-1600 mm/s)
Risoluzione	50 μm	Da 5 μm a mm	microscopica
Vitalità cellulare	> 85%	40-80%	>95%
Densità cellulare	Bassa, < 10^6 cellule/ml	Alta, sferoidi cellulari	Media, 10^8 cellule/ml
Costo stampante	Basso	Medio	Alto

1.3.3 ELETTROFILATURA (ELECTROSPINNING)

Un'altra tecnica di particolare interesse per la produzione di scaffold è l'elettrofilatura. L'elettrofilatura (electrospinning) è un processo tecnologico che utilizza un campo elettrico ad alta tensione per produrre fibre con diametri che vanno da pochi micrometri fino a all'ordine dei nanometri [2]. Per questa ragione, questa tecnica ha guadagnato sempre più rilevanza nel campo dell'ingegneria tissutale, in quanto è in grado di generare reti 3d interconnesse con un'elevata porosità e area superficiale che sono in grado di imitare, quanto più possibile, la matrice extracellulare di diversi tessuti, requisito fondamentale per uno scaffold (o in generale per la rigenerazione di un tessuto) in quanto permette l'ottimale proliferazione e crescita cellulare all'interno di esso. Il setup più generale possibile nel processo di elettrofilatura consta di 4 componenti: una siringa contenente la soluzione polimerica, una punta/ago metallico, un alimentatore elettrico ad alto potenziale e un collettore metallico (ne esistono di vari tipi e forme) [82], [83]. I polimeri vengono disciolti in solventi molto volatili prima del processo, per ottenere la soluzione polimerica vera e propria che verrà introdotta poi nella siringa. Il processo di elettrofilatura inizia applicando un campo elettrico ad alto voltaggio (10-30 kV) tra l'ago metallico e il collettore. Il primo viene caricato con una tensione positiva, invece il collettore sul lato opposto viene posto a massa. Grazie a questa configurazione si crea un'instabilità all'interno della soluzione polimerica con una distribuzione delle cariche positive sulla superficie del liquido. Le cariche positive sono attratte dal collettore (posto a massa) e all'aumentare dell'intensità del campo elettrico, la goccia di soluzione presente sulla punta dell'ago

metallico inizia ad allungarsi assumendo una forma conica denominata cono di Taylor. Sulla punta di questo cono, raggiunto un livello di tensione critico, le forze elettrostatiche prevalgono sulla tensione superficiale causando un ulteriore allungamento del cono e la successiva espulsione di un getto di liquido verso il collettore. Nel suo percorso verso il collettore, il getto lineare compie un movimento vorticoso (dovuto ad un'instabilità di flessione) e nello stesso tempo il solvente evapora, ottenendo così una fibra solida con una riduzione significativa (fino al nanometro) del suo diametro che si andrà a depositare in modo casuale sulla piattaforma di raccolta [2], [84].

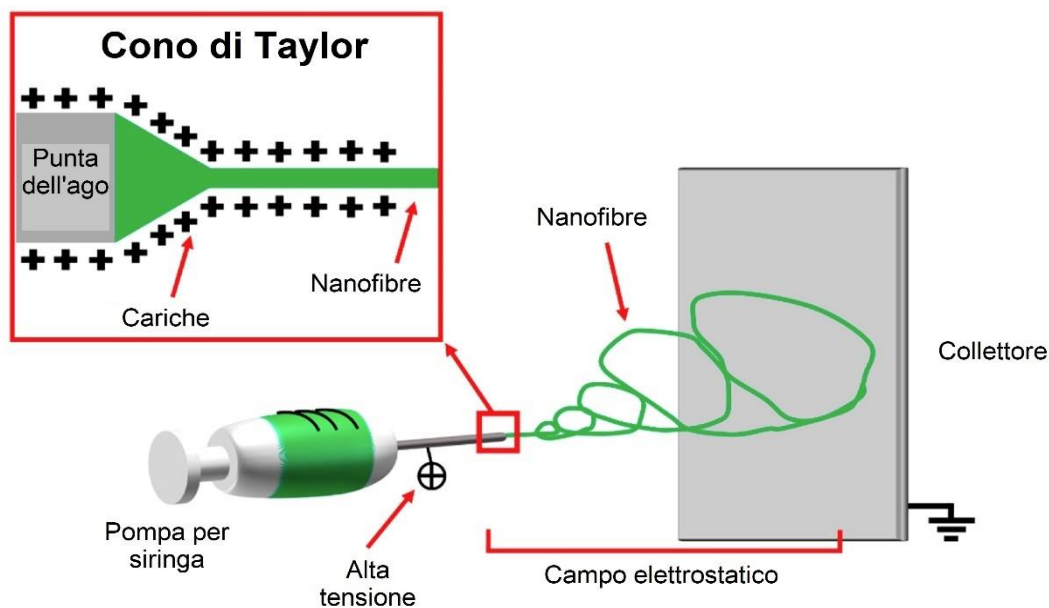


Fig. 15 Schema del principio di funzionamento e setup classico di un sistema di elettrofilatura (adattata da [85]).

1.3.3.1 PARAMETRI CHE INFLUISCONO SUL PROCESSO DI ELETTROFILATURA

Nonostante a livello teorico il processo dell'elettrospinning sembri relativamente semplice, sono presenti una serie di parametri da ottimizzare per ottenere fibre con una struttura e morfologia desiderata. Infatti, una scarsa attenzione nell'ottimizzazione di questi parametri può portare ad una scarsa o discontinua produzione di fibre o alla presenza di difetti di filatura. Questi parametri sono raggruppati in 3 principali categorie: parametri della soluzione, di processo e ambientali [82].

In seguito, una descrizione di alcuni dei principali parametri nella rispettiva categoria:

1. Parametri della soluzione:

- a. **Concentrazione e viscosità:** per la corretta formazione delle fibre, è richiesta una minima e ottimale concentrazione della soluzione. Si è notato che per una concentrazione più bassa del minimo richiesto si ottiene una miscela di perline e fibre, invece per alte concentrazioni (oltre un valore critico) si generano fibre con perline (beads) o con un diametro troppo grande per il nostro campo di interesse. In poche parole, più aumenta la concentrazione della soluzione più aumenta il diametro della fibra generata. Anche la viscosità gioca un ruolo importante, in quanto influenza anch'essa la concentrazione e viceversa, quindi bisogna tenere sotto controllo anche questa proprietà per riuscire ad ottenere fibre continue [82];

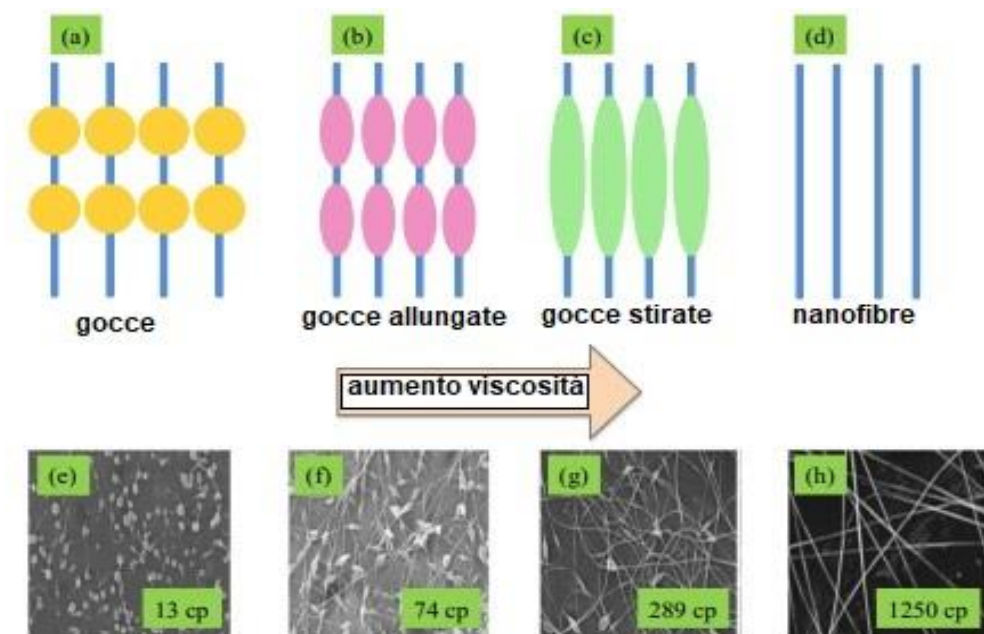


Fig. 16 Variazione nella morfologia delle nanofibre elettrofilate di PEO in base alla viscosità: (a-d) schema e (e-h) micrografie al microscopio elettronico a scansione. (adattata da [83]).

- b. **Peso molecolare:** influisce in modo significativo sulle proprietà reologiche ed elettriche come la viscosità, tensione superficiale, conduttività e forza dielettrica. Il peso molecolare (PM), in realtà, si riflette nel numero e nell'intreccio delle catene polimeriche in soluzione. Per avere un valore ottimale per questo parametro occorre trovare un buon compromesso in quanto se il PM è troppo basso rischiamo di ottenere delle perline piuttosto che fibre continue, al contrario se il PM è troppo alto si favorisce la formazione di 'micronastri' (fibre con diametri eccessivi). Nella maggior parte dei casi nell'elettrospinning utilizziamo polimeri ad alto PM in quanto forniscono la viscosità desiderata, anche se in alcune circostanze non è essenziale come nel caso di alcuni oligomeri [86];

- c. **Conduttività:** questo parametro oltre ad influenzare pesantemente la formazione del cono di Taylor, influisce molto anche sul diametro delle fibre. Una conduttività molto bassa potrebbe portare alla formazione di perline o addirittura compromettere la formazione del cono di Taylor e quindi l'avvio di tutto il processo [83]. Aumentando la conduttività della soluzione ad un valore critico si promuove la formazione del cono e si assiste ad una diminuzione del diametro delle fibre (inversamente proporzionale alla radice cubica della conduttività). Tuttavia, superato il valore critico, si viene a creare un forte instabilità di flessione con associate distribuzioni di diametri molto elevate e non controllabili [87]. Inoltre, la conduttività della soluzione può essere controllata anche con l'aggiunta di determinati sali [83];
- d. **Tensione superficiale:** possiamo attribuire questo parametro alla composizione del solvente della soluzione e quindi di conseguenza diversi solventi contribuiscono in modo diverso alla tensione superficiale. Intuitivamente, un'alta tensione superficiale inibisce il processo di elettrofilatura e il getto scaturito risulta instabile con generazione di goccioline. Al contrario con una bassa tensione superficiale è possibile ottenere fibre prive di difetti e operare con campi elettrici inferiori [82].

2. Parametri di processo:

- a. **Voltaggio applicato:** è un elemento cruciale nel processo in quanto determina la formazione del cono di Taylor e quindi la riuscita dell'elettrofilatura. Generalmente l'aumento del voltaggio (aumento dell'intensità del campo elettrico), fino ad una determinata tensione critica, comporta una diminuzione del diametro delle fibre a causa di un aumento dello stretching della soluzione polimerica per effetto di una maggiore repulsione tra cariche nel polimero. Con un incremento oltre la tensione critica si va incontro alla formazione di perline o nanofibre difettose [83]. È ancora in corso un dibattito sull'effetto di questo parametro sul processo, infatti, alcuni studi riportano un aumento del diametro delle fibre correlato ad un aumento del voltaggio applicato attribuito all'accorciamento del cono di Taylor e all'aumento della lunghezza e velocità del flusso [83], [88].
- b. **Flow rate (portata):** la porosità e la geometria della nanofibra sono fortemente influenzati dal flow rate della soluzione. Per ottenere fibre uniformi senza difetti (perline), bisogna operare con un flow rate basso (al di sopra di una soglia minima necessaria) affinché ci sia abbastanza tempo per l'evaporazione del solvente. Ad un incremento del flow rate è associato un aumento del diametro delle fibre e della

dimensione dei pori, ma una portata troppo elevata aumenta la probabilità di formazione di fibre con perline [84], [87].

- c. **Distanza tra ago e collettore:** esiste una distanza minima richiesta tra la punta dell'ago e il collettore che dipende da vari fattori come il tasso di evaporazione del solvente, il tempo di deposizione o l'intervallo di instabilità. È stato dimostrato che quando la distanza è minore di quella minima si osservano nanofibre con un più largo diametro o difettose, mentre si assiste ad un decremento del diametro all'aumentare della distanza [83]. Esistono poi casi particolari, come quelli del PVA, gelatina, chitosano, in cui non si è osservato nessun effetto significativo in corrispondenza di una variazione della distanza ago-collettore [89].
- d. **Forma e movimento del collettore:** classicamente come collettore viene usato un foglio metallico, spesso alluminio, ma a causa delle difficoltà di trasferimento delle fibre raccolte e alla necessità di avere fibre allineate per varie applicazioni, si sono sviluppati diversi tipi di collettore come carta conduttiva, pin, reti metalliche, griglie con particolari patterns, liquidi non solventi, barre parallele o tamburi rotanti. A titolo di esempio, molti studi hanno dimostrato che per ottenere fibre allineate è possibile utilizzare come collettore un tamburo (o ruota) rotante (**Fig. 17c**) ad una certa velocità tangenziale in modo tale che le fibre si allineino lungo la sua circonferenza. Per lo stesso scopo, in altri esperimenti si sono utilizzati collettori costituiti da due o più elettrodi separati (p. es. barre metalliche parallele), ovvero due substrati conduttivi separati da un vuoto dove si depositano le nanofibre allineate (gap collector, **Fig. 17d**) [82], [84].

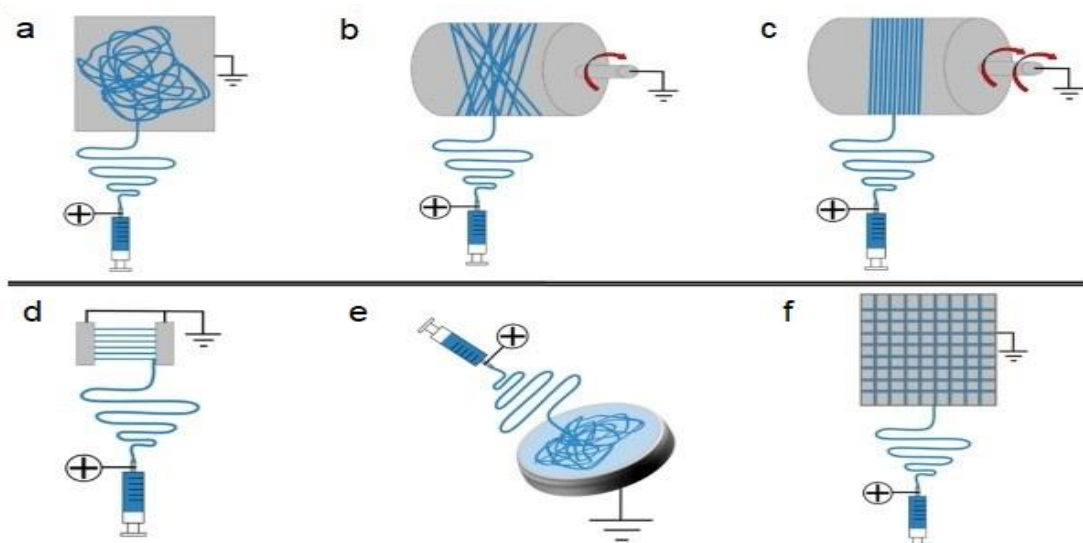


Fig. 17 Differenti collettori nel processo di elettrospinning: (a) collettore a piastra planare; (b) collettore a tamburo rotante a bassa velocità; (c) collettore a tamburo rotante ad alta velocità (produce fibre allineate); (d) gap collector; (e) collettore a bagno liquido; (f) collettore a piastra planare con un particolare pattern. (adattata da [90]).

3. **Parametri ambientali:** anche questi parametri influiscono sulla morfologia delle fibre. L'umidità agisce sul diametro influenzando il processo di solidificazione del getto. All'eccessivo aumentare del tasso di umidità si può assistere alla formazione di fibre con perline a causa della minore volatilità del solvente e all'introduzione di pori sulla loro superficie. Al contrario, con un'umidità troppo bassa si possono riscontrare tassi di evaporazione così veloci tanto da creare problemi con l'elettrofilatura vera e propria come l'occlusione della punta dell'ago [87].
- Per quanto riguarda la temperatura, si è riscontrato che ad un suo aumento segue un decremento della viscosità e di conseguenza una diminuzione del diametro delle fibre[82].

1.3.4 MATERIALI

Nei vari studi analizzati in letteratura riguardanti l'utilizzo combinato di stampa 3D ed elettrofilatura, i materiali utilizzati, principalmente polimeri in quanto molto versatili, biodegradabili e biocompatibili, sono riportati di seguito in **Tab. 8**.

Tab. 8 Materiali utilizzati nel processo combinato di stampa 3d ed elettrofilatura in letteratura.

Acronimo	Nome esteso	Applicazioni	Riferimenti
PCL	Policaprolattone	Osso, cartilagine, tendini/legamenti, entesi	[91]
PLA	Acido polilattico	Osso, tendini/legamenti	[92]
PEG	Polietilenglicole	Osso	[93]
PEOT	Polietilene-neossido-tereftalato	Cartilagine	[94]
PBT	Polibutilene-tereftalato	Cartilagine	[94]
PLGA	Acido poli(lattico-co-glicolico)	Cartilagine, entesi	[95]
PGS	Poliglicerolo sebacato	Tendini/legamenti	[96]
BGs	Vetri bioattivi	Tendini/legamenti	[96]
Gelatina	Gelatina	Osso, cartilagine	[91]
Forsterite	Forsterite	Osso	[92]
HA	Idrossiapatite	Osso	[93]
Collagene	Collagene	Cartilagine	[97]

2 SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi consiste in una critica e accurata analisi della letteratura di articoli e studi che utilizzano come metodo di fabbricazione la combinazione di stampa 3d ed elettrofilatura per la produzione di scaffold per la rigenerazione del tessuto muscolo scheletrico, andando così a definire lo stato dell'arte e gli eventuali possibili progressi delle attuali tecniche di produzione utilizzate. Le due tecniche sopra citate, negli ultimi decenni, risultano i metodi di fabbricazione maggiormente utilizzati per la produzione di scaffold per la rigenerazione del tessuto muscolo scheletrico. Ciascuna tecnica presenta diverse limitazioni: la stampa 3d, nonostante permetta la creazione di scaffold con buone proprietà meccaniche e con una forma personalizzabile per ogni tipo di difetto o paziente, presenta il problema di una limitata risoluzione nella geometria e dimensione dei pori dello scaffold scostandosi dalle naturali caratteristiche strutturali della matrice extracellulare (MEC), quindi, di conseguenza non consente un'ottimale adesione e proliferazione delle cellule all'interno di esso. Al contrario, l'elettrofilatura, grazie alla capacità di produrre pattern di fibre nanometriche e con un elevato rapporto superficie-volume, permette di creare strutture che mimano il più fedelmente possibile le proprietà strutturali e funzionali della MEC del tessuto nativo, ma che al contempo presentano scarse proprietà meccaniche. Per superare queste diverse limitazioni, da circa due decenni a questa parte, molti studi si sono concentrati nella realizzazione di scaffold mediante la combinazione delle due tecniche cercando così di migliorare le carenze di entrambi i metodi.

3 METODI DELLA RICERCA

Per la produzione di questo elaborato è stata svolta una ricerca sistematica principalmente mediante PubMed, Google Scholar e testi universitari da gennaio fino ad aprile 2022 utilizzando le seguenti parole chiave: 'anatomy, biology and structure of AND (musculoskeletal tissues OR tendon and ligament OR bone OR cartilage OR enthesis OR myotendinous junction)', 'damage and surgical approach AND (musculoskeletal tissues OR tendon OR ligament OR bone OR cartilage OR enthesis OR myotendinous junction)', 'additive manufacturing and electrospinning', '3d bioprinting and electrospinning AND (process OR setup OR advantages and disadvantages OR techniques OR parameters)', '3d bioprinting and electrospinning for AND (musculoskeletal tissues OR tendon OR ligament OR bone OR cartilage OR enthesis OR myotendinous junction) repair or regeneration', 'hybrid scaffold for musculoskeletal tissues', 'multilayered scaffold for musculoskeletal tissues', 'multiphasic scaffold for musculoskeletal tissues'.

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

Tab. 9 Colture cellulari *in vitro* sviluppate su scaffold per la rigenerazione dei tessuti muscolo-scheletrici dall'analisi della letteratura seguente.

Tipo di cellule	Time point (giorni)	Applicazioni	Riferimenti
Preosteoblasti di topo (MC3T3-E1)	1, 3, 5, 7, 14	Tessuto osseo	[91]
	1, 4, 7	Tessuto osseo	[93]
condrociti articolari primari di bovino	1, 7, 28	Tessuto cartilagineo	[94]
Condrociti articolari primari di maiale	1, 4, 7	Tessuto cartilagineo	[97]
Osteosarcoma umano (MG-63)	7	Tessuto cartilagineo	[98]
Staminali adipose umane (hASC)	1, 4, 7, 11, 20	Tessuto cartilagineo	[99]
	21	Tessuto cartilagineo	[99]
Condrociti articolari di coniglio	1, 5, 9	Tessuto cartilagineo	[95]
	5	Tessuto cartilagineo	[95]
Fibroblasti umani (ATCC MRC-5 CCL-171TM)	7	Tendini e legamenti	[100]
Fibroblasti di topo (3T3)	1, 2, 7	Tendini e legamenti	[96]
Staminali mesenchimali umane	1, 5, 7	Entesi (osso-legamento)	[101]
	3	Entesi (osso-legamento)	[101]

Tab. 10 Test *in vivo* su scaffold per la rigenerazione dei tessuti muscolo-scheletrici dall'analisi della letteratura seguente (MCD=matrice cartilaginea decellularizzata, 3DP= stampato in 3D).

Animali	N° campioni (ogni time point)	Time point (settimane)	Sito chirurgico	Applicazioni	Riferimenti
Ratti	4	20	Cranio	Tessuto osseo	[102]
Topi nudi:		4, 8	Sottocute	Tessuto cartilagineo	[95]
Scaffold fibra-3DP	6				
Scaffold MCD-fibra 50%	6				
Conigli:		12	Solco trocleare gamba	Tessuto cartilagineo	[95]
Scaffold fibra-3DP	5				
Scaffold MCD-fibra 50%	5				
Difetto non trattato (controllo)	5				

4.1 TESSUTO OSSEO

Sono stati eseguiti diversi studi, applicando diversi approcci e strategie, per la rigenerazione del tessuto osseo combinando l'utilizzo della stampa 3D ed elettrofilatura. Yu et al. [91] hanno prodotto uno scaffold 3D composito incorporando nanofibre disperse e discontinue di PCL/gelatina nelle maglie di uno scaffold di PCL stampato in 3D. Per prima cosa, le nanofibre ottenute tramite

elettrospinning sono state tagliate in piccoli pezzi ($2 \times 2 \text{ mm}^2$) e disperse in un omogeneizzatore ad alta velocità. In seguito, a circa 80° viene stampato lo scaffold di PCL puro e per concludere il processo le nanofibre di PCL/gelatina vengono infuse nelle maglie impilate dello scaffold. La struttura composita realizzata esibisce migliori proprietà meccaniche (modulo di compressione $E_c = 30.5 \pm 0.82 \text{ MPa}$ con una deformazione di rottura $\epsilon = 15.5\%$ circa) rispetto a quelle dello scaffold elettrofilato liofilizzato ($E_c = 18.55 \pm 0.56 \text{ MPa}$ con $\epsilon = 25\%$ circa). Inoltre, i test in vitro (H&E = colorazione ematossilina-eosina, CCK-8 = kit conteggio cellule-8) effettuati durante la coltura di cellule MC3T3-E1 (preosteoblasti di topo) con un time point di 1, 3, 5, 7 e 14 giorni, hanno dimostrato una buona biocompatibilità (merito anche della presenza di gelatina, materiale naturale che se miscelato con un polimero sintetico come il PCL ne fa aumentare la biocompatibilità) e, mediante test a colorazione fluorescente, con l'aiuto del software Image J, si osserva anche un significativo aumento della proliferazione e migrazione cellulare sullo scaffold composito (valori di area positiva cellule = $29.55 \pm 4.54\%$) rispetto a quello stampato semplicemente in 3D senza alcuna aggiunta di nanofibre (valori di area positiva cellule = $3.60 \pm 2.58\%$). Questi risultati suggeriscono un potenziale uso di questa tipologia di scaffold per applicazioni in rigenerazione ossea, sebbene ci sia la possibilità di migliorare le prestazioni di questo scaffold tramite l'applicazione di fattori di crescita (come BMP-2 e TGF) e la necessità di effettuare test in vivo su animali per verificarne la corretta funzionalità.

Simili risultati sono stati ottenuti da Naghieh et al. [92] con lo sviluppo di un altro scaffold composito. Lo scaffold è stato prodotto tramite l'aggiunta di strati di fibre nanometriche di gelatina-forsterite tramite elettrofilatura ogni due strati di microfibre di PLA (**Fig. 18**). Dopo la deposizione dei primi due strati di PLA attraverso una stampante FDM, lo strato di fibre nanometriche disposte in maniera

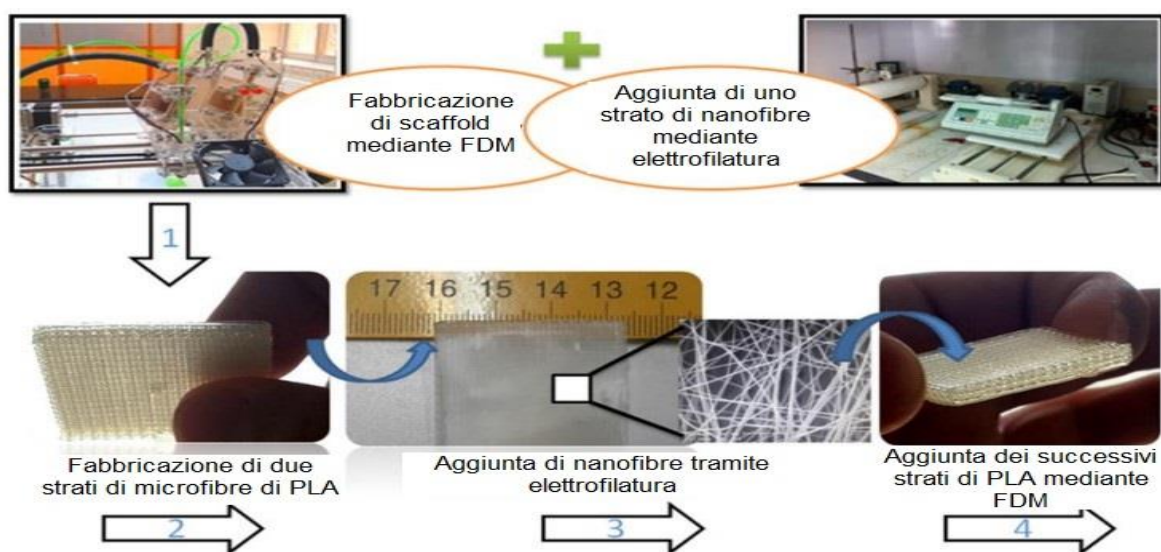


Fig. 18 Processo di produzione dello scaffold mediante l'approccio combinato di FDM ed elettrospinning (adattata da [92]).

casuale viene elettrofilato sulla superficie stessa dello scaffold dove viene posto un foglio di alluminio che funge da collettore. Questo procedimento si ripete fino a quando lo spessore dello scaffold raggiunge i 4 mm. Attraverso l'aggiunta dello strato di nanofibre si è riscontrato un incremento dell'area disponibile con una conseguente riduzione della dimensione dei pori. Il test a compressione rivela anche un significativo incremento del modulo elastico ($E_c = 170.3 \pm 13.9$ MPa, aumento del 52%) paragonato a quello dello scaffold polimerico puro ($E_c = 112.08 \pm 29.6$ MPa), dovuto alla presenza di nanoparticelle di forsterite nella matrice della gelatina. Per testare la bioattività/compatibilità, il nuovo scaffold è stato immerso in un fluido biologico simulato (SBF) per 28 giorni. Dopo aver recuperato lo scaffold, attraverso un microscopio a scansione elettronica (SEM) si è osservata una significativa formazione di cristalli di idrossiapatite (HA) sulla superficie, grazie anche all'alto potenziale della forsterite, dimostrato da alcuni studi, di promuovere la formazione ossea in vivo. Basandoci sui risultati raggiunti, lo scaffold composito di PLA/gelatina-forsterite creato mediante l'approccio combinato di stampa 3d ed elettrofilatura mostra delle buone proprietà meccanobiologiche, migliori rispetto allo scaffold 3d privo di fibre, che lo rendono un buon candidato come sostituto osseo bioattivo, specialmente in applicazioni maxillofacciali.

Nonostante i numerosi vantaggi dell'elettrospinning nel campo dell'ingegneria tissutale, il problema principale degli scaffold elettrofilati (soprattutto per la rigenerazione del tessuto osseo) è quello di avere insufficienti proprietà meccaniche, ovvero una scarsa rigidità e resistenza meccanica. Per superare questa limitazione, Pensa et al. [102] hanno stampato una rete di PLA in 3D (mediante FDM) direttamente su uno scaffold elettrofilato a base di PCL/gelatina. Come primo passo è stato realizzato lo scaffold mediante la deposizione delle fibre di PCL/gelatina su un collettore rotante con una velocità di 20 giri/minuto. Successivamente, lo scaffold stesso viene inserito all'interno del dispositivo di stampa 3D e la rete di PLA viene depositata su un lato di esso (in superficie) ad una temperatura di lavoro di circa 185° . Attraverso immagini al SEM, si è constatato che la deposizione della rete 3D non ha compromesso la struttura e l'architettura delle fibre ed inoltre ha permesso un considerevole miglioramento della rigidità e della resistenza meccanica dello scaffold mostrando una resistenza a trazione (1001 ± 302 kPa) 13 volte maggiore rispetto a quella dello scaffold solo elettrofilato (77 ± 44 kPa) con un modulo elastico di 501 ± 197 kPa e 8 ± 4 kPa rispettivamente. Inoltre, dalla misura della deformazione di rottura dei vari scaffold si può constatare che la rete stampata in 3D ha notevolmente ridotto anche la duttilità delle strutture, difatti per lo scaffold solo elettrofilato si registra una ϵ (%) = $27.35 \pm 9.9\%$, mentre per quello rinforzato con la rete 3D si misura una ϵ (%) = $1.96 \pm 0.50\%$. Una volta realizzato lo scaffold, per testare la sua cito/biocompatibilità, sono stati effettuati dei test in vivo su difetti calvari (dimensione: 8 mm) creati su ratti Sprague-Dawley. I materiali impiantati e tessuti circostanti sono stati prelevati dopo 20 settimane

dall'impianto ed esaminati istologicamente senza esibire nessuna risposta immunitaria ad un corpo estraneo suggerendo la biocompatibilità dello scaffold per la rigenerazione di tessuto osseo.

Procedendo in maniera inversa rispetto al precedente studio, Dong et al. [93], con lo sviluppo di un nuovo apparato capace di integrare stampa 3D ad estrusione termica (un miglioramento della FDM) ed elettrospinning, hanno prodotto uno scaffold ibrido per il tessuto osseo prima stampando la struttura 3D e successivamente elettrofilando sulla superficie la rete di nanofibre.

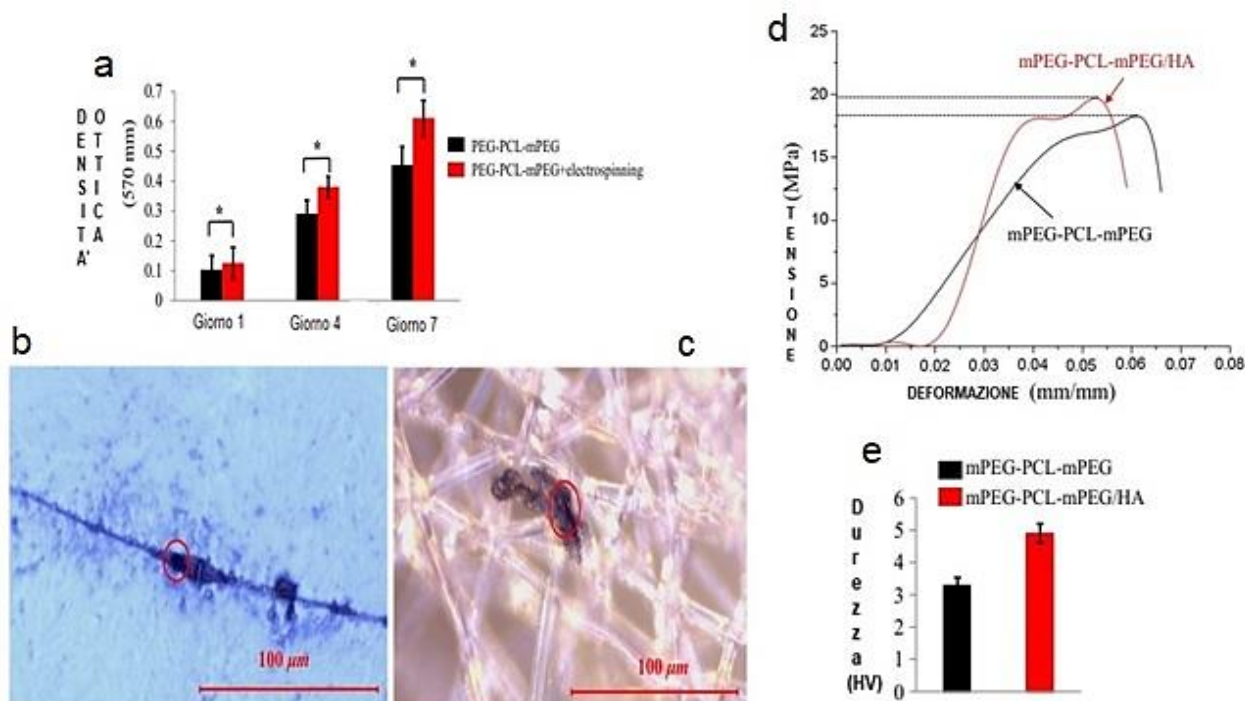


Fig. 19 (a) Test MTT (gli asterischi '*' indicano $p < 0,05$); Osservazione in rosso neutro (più scuro per i nuclei) dell'adesione delle cellule osteoblastiche MC3T3-E1 dopo una coltura di 3 giorni: (b) morfologia cellulare mediante coltura senza scaffold; (c) morfologia cellulare mediante coltura sullo scaffold con superficie elettrofilata. (d) curva tensione-deformazione per carichi in compressione e (e) risultati dal test di durezza Vickers di mPEG-PCL-mPEG e mPEG-PCL-mPEG/HA. (adattata da [93]).

La procedura consiste nello stampare uno scaffold a base del copolimero mPEG-PCL-mPEG e un altro, a scopo comparativo, con lo stesso copolimero ma con l'aggiunta di idrossiapatite (mPEG-PCL-mPEG/HA), un principale componente del tessuto osseo umano. Dopo aver realizzato gli scaffold, sulla loro superficie viene elettrofilato uno strato di fibre nanometriche con orientazione random prodotto dalla soluzione dello stesso polimero dissolto con diclorometano (DCM). Da i risultati provenienti da test a compressione e test di durezza Vickers, si nota come l'apatite abbia migliorato, oltre la biocompatibilità, anche la resistenza a compressione e la durezza dello scaffold in quanto il valore della tensione di rottura a compressione misura 19.6 MPa per lo scaffold con HA e 18.2 MPa per quello senza con valori di durezza Vickers (HV) di 4.98 e 3.31 MPa, rispettivamente (**Fig. 19 d-**

e). Per testare la vitalità cellulare, sono state seminate sugli scaffold cellule MC3T3-E1 (linea cellulare simile a osteoblasti) in un terreno di coltura essenziale alfa-modificato (α -MEM) rinnovato ogni giorno. La vitalità delle cellule è stata osservata attraverso il test MTT con un time point di 1, 4 e 7 giorni sotto condizioni standard (**Fig. 19a**). Da questo emerge una crescente proliferazione (rappresentata dai valori dell'assorbanza nel test MTT) al crescere dei giorni di coltura ed inoltre, spicca una maggiore proliferazione sullo scaffold con lo strato di nanofibre elettrofilate in superficie rispetto a quello senza fibre dimostrando il fatto che esse, oltre ad influenzare la morfologia delle cellule (**Fig. 19 b-c**), incrementano l'area superficiale riempiendo i pori della faccia superiore dello scaffold fornendo così un migliore supporto per l'adesione e la crescita degli osteoblasti. I risultati emersi da questo studio rendono lo scaffold ibrido appena realizzato più adatto per applicazioni nel campo dell'ingegneria tissutale ossea sebbene debbano essere svolti ulteriori test in vitro ed in vivo per ottimizzare i parametri di lavoro e le proprietà dello scaffold desiderato.

4.2 TESSUTO CARTILAGINEO

Moroni et al. [94] furono i primi a combinare la tecnica della prototipazione rapida (in questo caso FDM) con l'elettrospinning per produrre uno scaffold multistrato con lo scopo di valutarne l'influenza sull'adesione e la differenziazione cellulare nel tessuto cartilagineo. Il materiale scelto per lo studio è il copolimero PEOT/PBT che, dopo essere stato riscaldato ad una temperatura di 190°, viene estruso ad una velocità di 300 mm/min su una piattaforma andando a realizzare una struttura 3D strato dopo strato, ognuno perpendicolare al successivo. Ogni due strati stampati, viene depositata una rete di fibre dello stesso copolimero, dissolto precedentemente in una miscela di cloroformio/esa-fluoroisopropanolo ed elettrofilato ad un voltaggio costante di 15 kV con un flow rate di 0.39 mL/min, fino a che lo scaffold raggiunga un'altezza pari a 4 mm. La porosità dello scaffold realizzato è del $50 \pm 3\%$, inferiore allo scaffold non elettrofilato, con pori totalmente interconnessi. Per lo scopo dello studio, condrociti articolari primari di bovino sono stati seminati e coltivati su tre tipologie di scaffold (solo stampato, stampato con strati elettrofilati per 2 min, stampato con strati elettrofilati per 30 min) per 4 settimane ed esaminati mediante la misurazione del contenuto di DNA e la deposizione di glicosaminoglicani solfati (GAG) (indicano la quantità di MEC prodotta) dopo 1, 7 e 28 giorni (**Fig. 20g**). I risultati ottenuti dai test fanno dedurre un progressivo incremento del quantitativo di DNA rispetto allo stesso scaffold non elettrofilato durante la proliferazione cellulare già dal giorno 7, suggerendo quindi anche una migliore adesione delle cellule. Lo stesso andamento positivo è stato registrato per la quantità di GAG depositato e quindi per il rapporto GAG/DNA, il che si traduce in

un più alto grado di differenziazione cellulare nello scaffold ibrido e quindi in una maggiore formazione di tessuto cartilagineo rispetto a quello realizzato solo mediante stampa 3D.

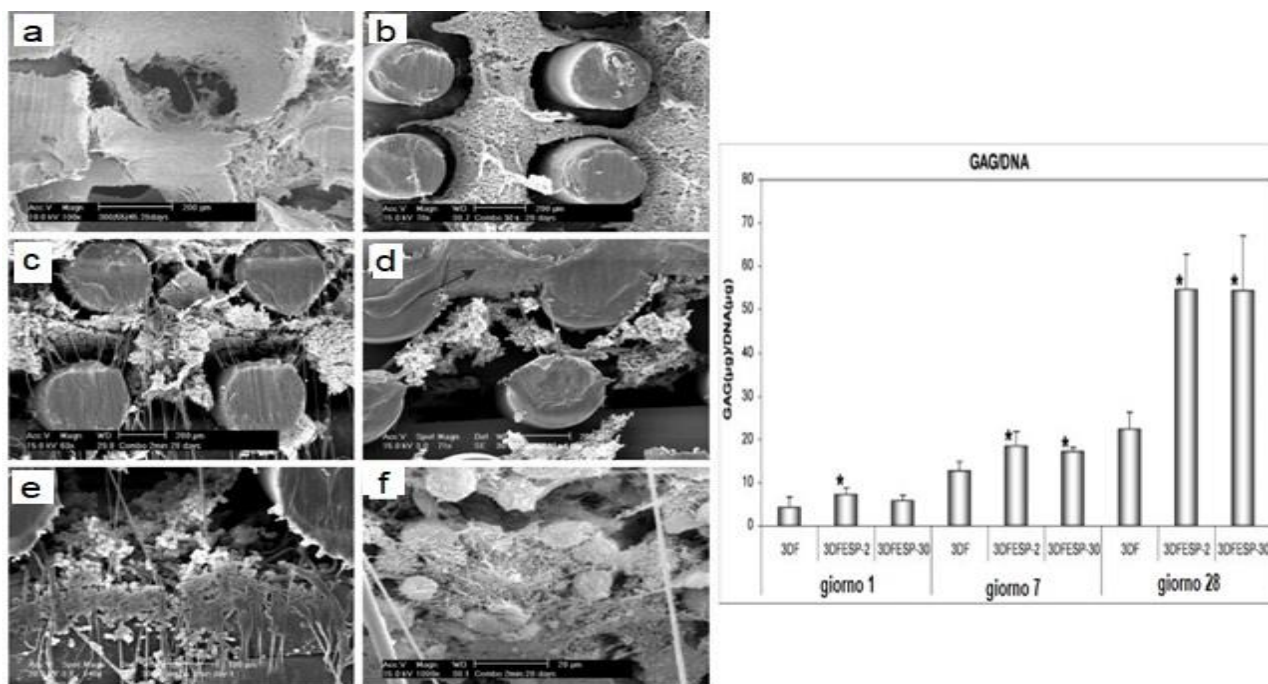


Fig. 20 Le micrografie al microscopio elettronico a scansione (SEM) illustrano la morfologia e la distribuzione dei condrociti su (a) 3DF, (b,d) 3DFESP-30 e (c,e,f) 3DFESP-2. Dopo 28 giorni i pori degli scaffold sono stati colmati da cellule (a-c) e MEC (f). I condrociti hanno mantenuto la loro morfologia circolare sugli scaffold 3DFESP (b-f). (a-d) scala: 200 µm; (e) scala: 100 µm; (f) scala: 20 µm. (g) rapporto GAG/DNA nei rispettivi scaffold dopo 1,7 e 28 giorni di coltura. 3DF indica lo scaffold esclusivamente stampato, 3DFESP-2 e 3DFESP-30 indicano rispettivamente lo scaffold con rete di fibre elettrofilate per 2 minuti e per 30 secondi (adattata da [94]).

Inoltre, in questi nuovi scaffold realizzati, i condrociti mantengono la loro forma circolare naturale (**Fig. 20 b-f**) con una conseguente maggiore produzione di GAG (indicatore della MEC prodotta) e collagene di tipo II. In base ai dati raccolti, questo scaffold si rivela una possibile e adatta soluzione per la rigenerazione o la riparazione del tessuto cartilagineo.

Analoghi risultati sono stati ottenuti da Kim et al. [97] che proposero un modello di scaffold 3D gerarchico a base di PCL combinando la 3D printing con il processo dell'elettrospinning. Mediante FDM, viene stampato il primo strato di scaffold (con un pattern costituito da filamenti perpendicolari tra loro, a griglia) e successivamente vengono elettrofilate le nanofibre di PCL sulla superficie di quest'ultimo. Questo processo si ripete diverse volte fino a fabbricare uno scaffold cubico alto 5 mm. Lo scaffold è stato testato a livello meccanico attraverso un'analisi meccanica dinamica (AMD) con una temperatura di 30 °C rivelando un modulo di compressione $E_c = 9.68 \pm 1.32$ MPa, leggermente più basso dello scaffold stampato solo in 3D ($E_c = 10.93 \pm 1.74$ MPa), ma che può variare in un range

tra 15-33 MPa in base alla dimensione dei pori e alla porosità. Ciò è un ottimo vantaggio in quanto le proprietà meccaniche dello scaffold realizzato possono essere facilmente manipolate variando la geometria dello scaffold, ovvero ottimizzando i parametri del sistema. Per quanto concerne l'aspetto cellulare, condrociti primari prelevati da cartilagine articolare porcina, dopo essere stati opportunamente trattati, sono stati seminati sullo scaffold con una densità di 5×10^5 cellule per campione per 7 giorni. L'adesione e la proliferazione delle cellule è stata osservata mediante test MTT (con un time point di 1, 4, 7 giorni) esibendo differenze significative tra lo scaffold ibrido e quello solo stampato soprattutto nel 1° e 4° giorno di coltura. A conclusione dell'esperimento si può dedurre che lo scaffold ibrido in questione mostra proprietà meccaniche facilmente controllabili e una migliore proliferazione cellulare (condrociti) rispetto al normale scaffold.

La strategia di produrre scaffold ibridi multistrato, come quelli sopra citati, venne utilizzata anche da Sooriyaarachchi et al. [98] per fabbricare uno scaffold biomimetico per il menisco, con una struttura che si avvicinasse il più possibile alla topografia della MEC nativa. Lo scaffold è composto da due strati di PLA stampanti in 3D tramite FDM (scheletro dello scaffold) con uno strato elettrofilato di PCL/collagene (di tipo I e III) nel mezzo. La stampa dello scheletro del menisco segue il modello CAD illustrato (**Fig. 21 a-e**), con una distanza tra due filamenti di 1 mm. Per quanto riguarda il processo di elettrofilatura, dopo aver dissolto PCL e collagene in esa-fluoro-isopropanolo, a scopo comparativo sono stati elettrofilati due tipi di reti di nanofibre (random e allineate) utilizzando due tipi di collettore differenti. Su un gap collector costituito da due barre metalliche distanti 4 cm tra loro e ad una distanza dalla punta metallica di 12.5 cm sono state prodotte fibre allineate lungo una direzione longitudinale o trasversale, mentre su un foglio di alluminio sono state prodotte nanofibre con un'orientazione random (**Fig. 21 f-g**). Il menisco del ginocchio è una struttura soggetta a una pressione continua e perciò risulta fondamentale che lo scaffold proposto abbia proprietà meccaniche almeno simili o superiori a quelle del tessuto originale. Per verificare ciò, sono stati svolti test di compressione per lo scaffold con fibre allineate, con fibre random e per quello privo di fibre. I risultati dei test indicano che una struttura con organizzazione monoassiale è significativamente più resistente e rigida, in quanto per lo scaffold con fibre allineate si è registrato un modulo di compressione $E_c = 216.66$ MPa, ovvero un aumento del 100% rispetto alla struttura priva di fibre ($E_c = 99.46$ MPa) e del 29% rispetto a quella con fibre orientate casualmente ($E_c = 167.66$ MPa). Per lo studio di compatibilità sono state seminate sullo scaffold cellule di osteosarcoma umano (MG-63), circa 300000 cellule per pozzetto per 7 giorni per poi essere analizzate. Al giorno 7, con un microscopio ottico, grazie alla colorazione dovuta all'applicazione di falloidina nella coltura, si è osservata l'adesione, la proliferazione e la morfologia dei fibroblasti. Si nota una buona adesione cellulare (grazie ad un aumento della porosità dovuta allo strato elettrofilato) e la disposizione delle cellule lungo le

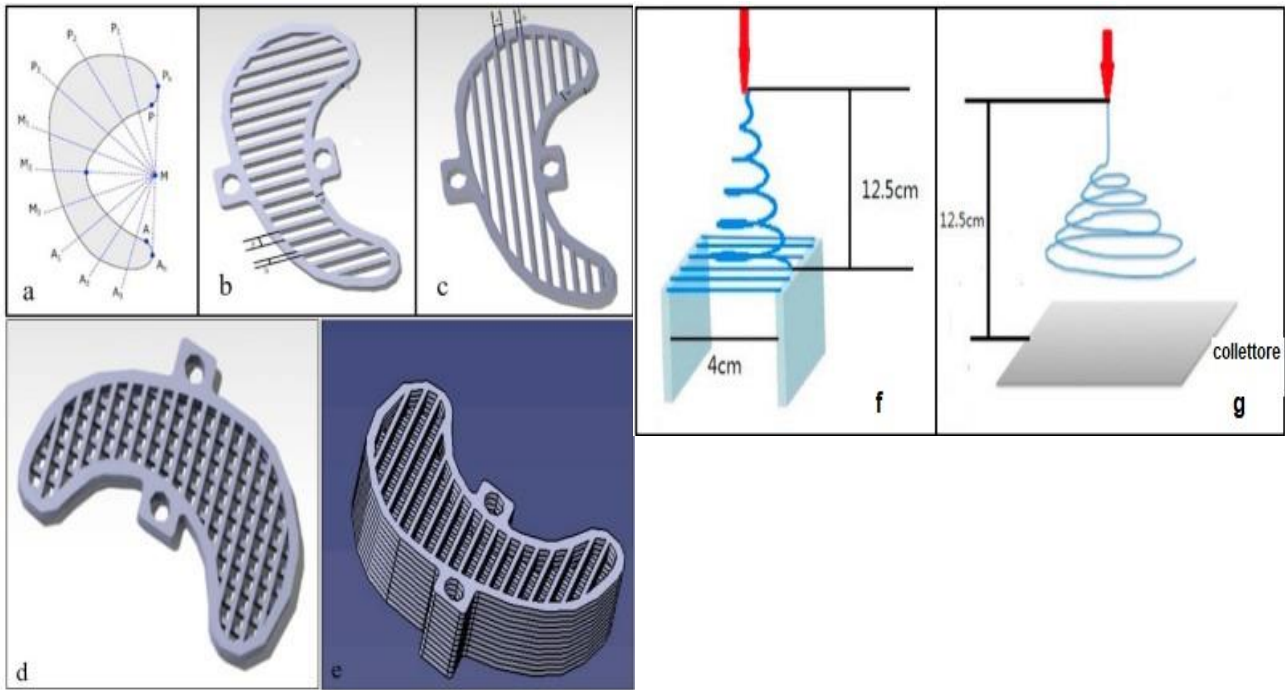


Fig. 21 (a) Modello menisco, (b-c) design scaffold con modello radiale e circonferenziale della struttura del menisco, (d, e) scaffold costituito da strati impilati. (f, g) schemi di elettrospinning rispettivamente per fibre allineate e random. (adattata da [98]).

nanofibre. Nel caso di fibre allineate, la morfologia cellulare è stata ampiamente influenzata in quanto le cellule risultano allungate lungo la direzione della fibra e organizzate in una matrice direzionale, riproducendo molto similmente l'organizzazione delle cellule e della MEC nel tessuto nativo. Questo risultato indica che stimoli topologici e biofisici possono influenzare la crescita delle cellule come in questo caso attraverso un'opportuna matrice di nanofibre. Questa organizzazione cellulare ottenuta sullo scaffold con fibre allineate che riesce a imitare la struttura del tessuto del menisco nativo, unita alle buone proprietà meccaniche trovate, pongono delle ottime basi per la rigenerazione del menisco su larga scala.

Mellor et al. [99] hanno impiantato uno scaffold ibrido realizzato attraverso la combinazione di FDM ed elettrospinning in un ginocchio di un cadavere di maiale (ex-vivo). Il polimero utilizzato nello studio è il PCL. Lo scaffold è costituito da 4 mm di sezione di base stampata in 3D con un'orientazione dei filamenti stampati di $0^\circ/120^\circ/240^\circ$ tra gli strati adiacenti, successivamente sulla superficie si pone uno strato elettrofilato in precedenza su un foglio di alluminio e per concludere un'altra sezione di 2 mm di PCL viene stampata sopra la rete di nanofibre in modo tale da raggiungere un'altezza finale di 6 mm. Lo scaffold così realizzato viene seminato con cellule staminali adipose umane (hASC) e coltivato in un terreno di crescita completo per 21 giorni. L'analisi della vitalità cellulare tramite LIVE/DEAD test dopo 21 giorni rivela una buona vitalità con un minimo numero di cellule morte, mentre la proliferazione è stata osservata tramite il test colorimetrico AlamarBlue al

giorno 1, 4, 7, 11 e 20 giorni risultando stabile per tutto il periodo di coltura, anche se inferiore rispetto ad uno scaffold solo stampato o solo elettrofilato. Le tre diverse tipologie di scaffold (elettrofilato, stampato e combinato) sono state impiantate nel ginocchio di un cadavere di maiale seguendo un modello di impianto rilevante per il tessuto osteocondrale (**Fig.22**). È stato riscontrato che, sebbene gli scaffold solo elettrofilati abbiano un maggior livello di proliferazione, risultano difficili da manipolare durante un classico impianto osteocondrale, a differenza dello scaffold composito realizzato che è facilmente impiantabile nelle procedure chirurgiche comuni senza incorrere in fenomeni di delaminazione o rottura, problemi molto importanti per impianti in vivo.

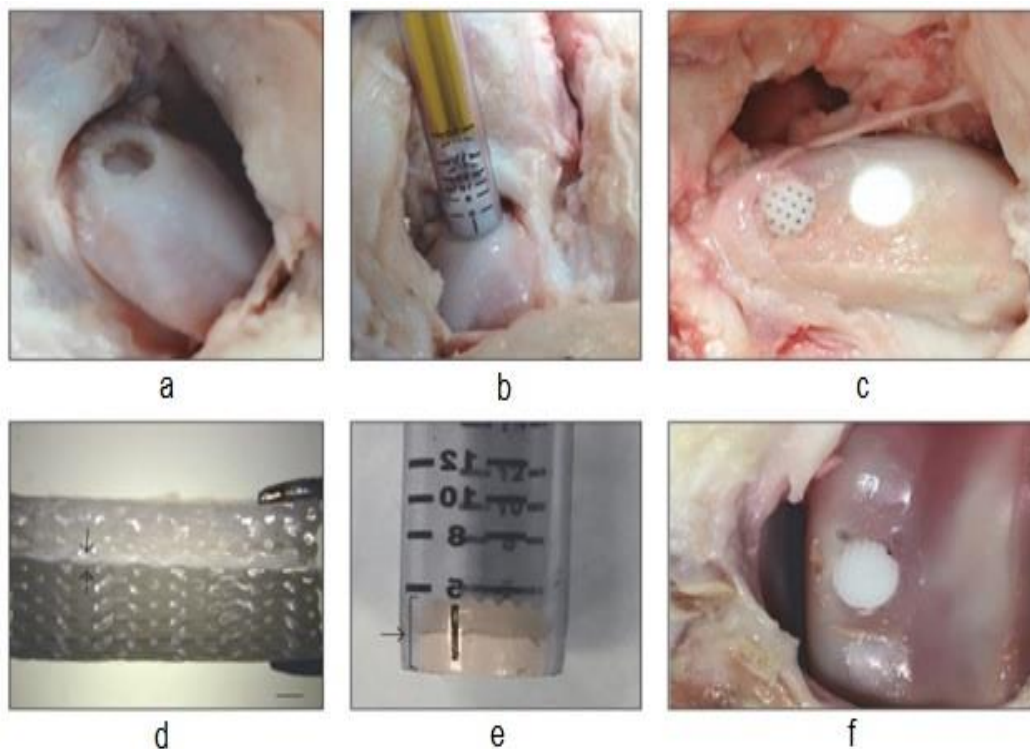


Fig. 22 Tecnica di impianto di uno scaffold stampato in 3d, elettrofilato e stampato/elettrofilato in un ginocchio di un cadavere di maiale. (a) creazione di un difetto osteocondrale con una profondità di 8 mm e 8 mm di diametro. (b) Il sistema COR che è stato usato per impiantare lo scaffold nel difetto osteocondrale. (c) Vista dello scaffold stampato in 3D (sinistra) e dello scaffold elettrofilato (destra) dopo l'impianto. (d) scaffold ibrido 3D/elettrofilato prima dell'impianto (frecche nere indicano lo strato elettrofilato, scala = 1 mm). (e) scaffold ibrido 3D/elettrofilato inserito nel sistema COR per l'impianto. (f) scaffold ibrido 3D/elettrofilato dopo l'impianto. (tratta da [99]).

Una strategia, completamente diversa dalle precedenti, che combina le due tecniche di fabbricazione, è stata applicata da Chen et al. [95] (**Fig. 23**). In questo studio, per la prima volta, una matrice cartilaginea decellularizzata (MCD) ridotta in polvere (con aggiunta di una soluzione di acido ialuronico) dopo vari processi viene trasformata in un inchiostro adatto per la stampa 3D. Siccome lo

scaffold così prodotto presentava scarse proprietà meccaniche, delle nanofibre elettrofilate disperse di PLGA/gelatina sono state aggiunte all'inchiostro a base di matrice sopra citato con lo scopo di aumentare la resistenza e la rigidità dello scaffold. La MCD è stata ottenuta dalla cartilagine scapolare di mucca. Dopo una pulizia completa e la rimozione del tessuto connettivo fibroso, la cartilagine ottenuta è stata affettata e successivamente incubata in una soluzione di idrossido di sodio 1 M per 4 ore. Dopo di che, la matrice cartilaginea è stata liofilizzata e frantumata in piccole particelle mediante una sorta di macina. Le particelle di MCD dopo essere state omogeneizzate attraversano un nuovo processo di liofilizzazione. Per quanto riguarda le nanofibre, gelatina e PLGA sono stati separatamente dissolti in 1, 1, 1, 3, 3, 3-esfluoro-2-propanolo. La soluzione ottenuta è stata poi elettrofilata ad un voltaggio pari a 16 kV, con un flow rate di 3 mL/h ed una distanza ago-collettore di 15 cm. La rete di nanofibre realizzata viene poi tagliata in piccoli pezzi, i quali poi vengono inseriti in un omogeneizzatore.

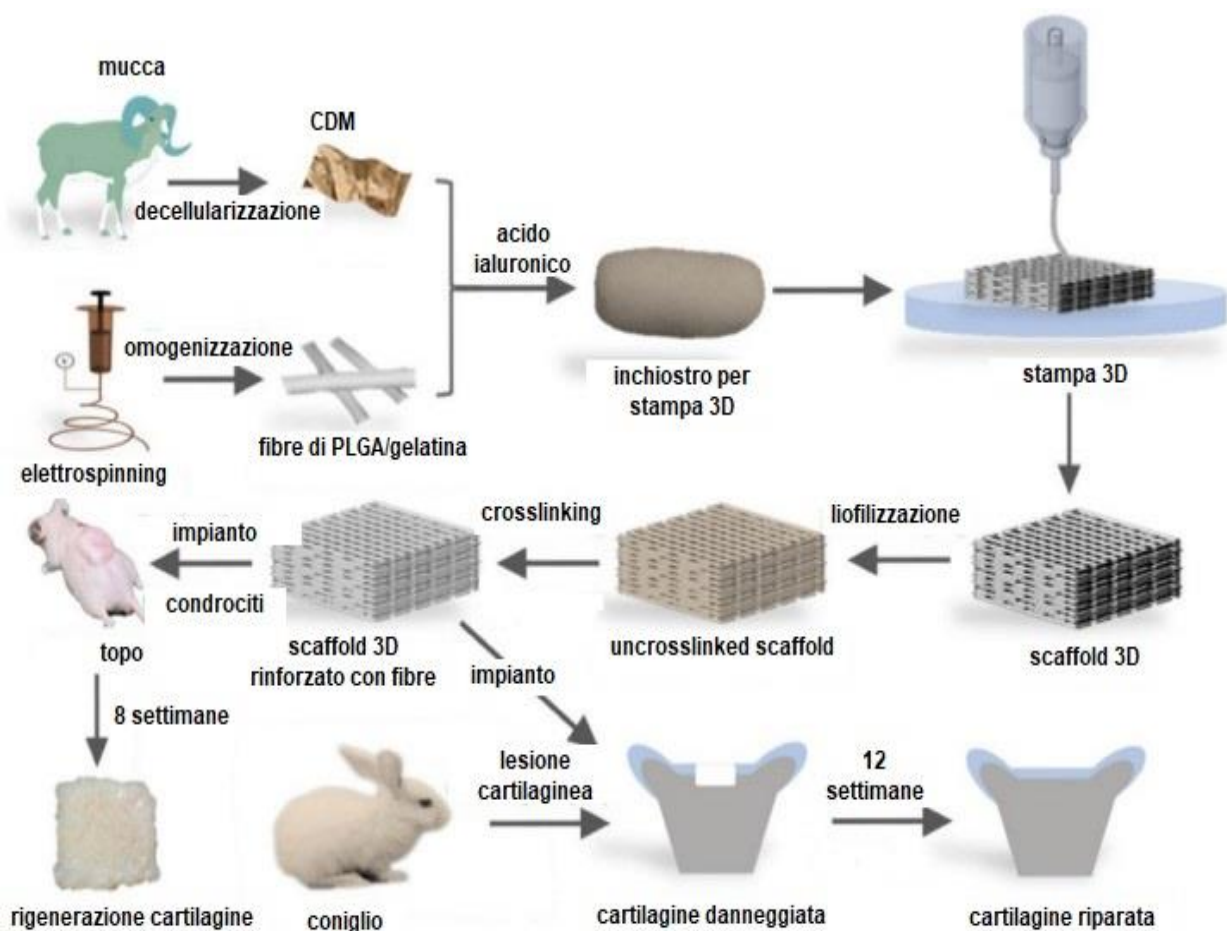


Fig. 23 Illustrazione schematica del processo di fabbricazione dello scaffold stampato in 3D a base di inchiostro di matrice decellularizzata cartilaginea rinforzato da fibre di PLGA/gelatina per la rigenerazione della cartilagine e correlati test in vivo eseguiti. (adattata da [95]).

Il processo per le nanofibre si conclude con l'asciugatura tramite evaporazione delle corte fibre di PLGA/gelatina disperse. Infine, le fibre e la polvere di MCD vengono miscelate in una soluzione di acido ialuronico per formare il vero e proprio inchiostro stampabile in 3D.

Sono stati prodotti 4 tipi di inchiostro: a base di MCD senza fibre rinforzanti (MCD-3DP), con il 25% (sul peso totale di MCD e fibre utilizzati per l'inchiostro) di fibre rinforzanti (MCD-fibra 25%), con il 50% di fibre rinforzanti (MCD-fibra 50%) e con solo fibre (fibra-3DP). I derivanti 4 scaffold sono stati fabbricati estrudendo i corrispettivi inchiostri mediante una stampante 3D a getto d'inchiostro attraverso un ugello con un diametro interno di 500 μm , una velocità della testina di stampa di 0,5 mm/s e un angolo di orientazione tra due strati successivi di 90°. Tutte le tipologie di scaffold sono state sottoposte allo stato umido a test a compressione (al 40% e al 60% di deformazione a compressione e ad una velocità di spostamento costante di 5mm/min) e a dei cicli di carico/scarico (con una deformazione a compressione del 50% ad una velocità di deformazione di 10 mm/min). Solo gli scaffold a base di MCD-fibra 50% e il fibra-3DP hanno mostrato un accettabile elasticità a compressione e capacità di sopportare fino al 60% di deformazione (gli altri si rompono prima), precisando che il primo presenta un modulo elastico $E_c = 20$ kPa e il secondo un $E_c = 58$ kPa (calcolati dal grafico tensione-deformazione in un range di deformazione di 0-40%). Dopo 100 cicli di carico/scarico a compressione al 60% di deformazione, lo scaffold MCD-fibra 50%, in confronto agli altri scaffold MCD-3DP e MCD-fibra 25%, ha ancora la capacità di tornare alla sua forma originale (comportamento elastico) con la minima perdita di tensione (15.08%). Questi risultati dimostrano che le fibre elettrofilate, non solo incrementano significativamente la resistenza meccanica degli scaffold 3D, ma conferiscono loro anche ottime proprietà elastiche. Scartate le altre tipologie di scaffold in quanto prive di sufficienti proprietà meccaniche, d'ora in avanti tutti i test saranno svolti solo sugli scaffold MCD-fibra 50% e fibra-3DP. Per valutarne la vitalità, sui due scaffold sono stati seminati condrociti isolati provenienti da cartilagine articolare di coniglio. L'efficienza della semina cellulare in percentuale è stata calcolata dopo 24 ore (secondo la formula: $(n^\circ \text{ totale di cellule} - n^\circ \text{ di cellule rimaste}) / n^\circ \text{ totale di cellule} \times 100$), la vitalità attraverso MTT test con un time point di 1, 5 e 9 giorni e test LIVE/DEAD dopo 5 giorni ed infine la proliferazione attraverso il test della quantificazione del DNA con un time point di 1, 5 e 9 giorni.

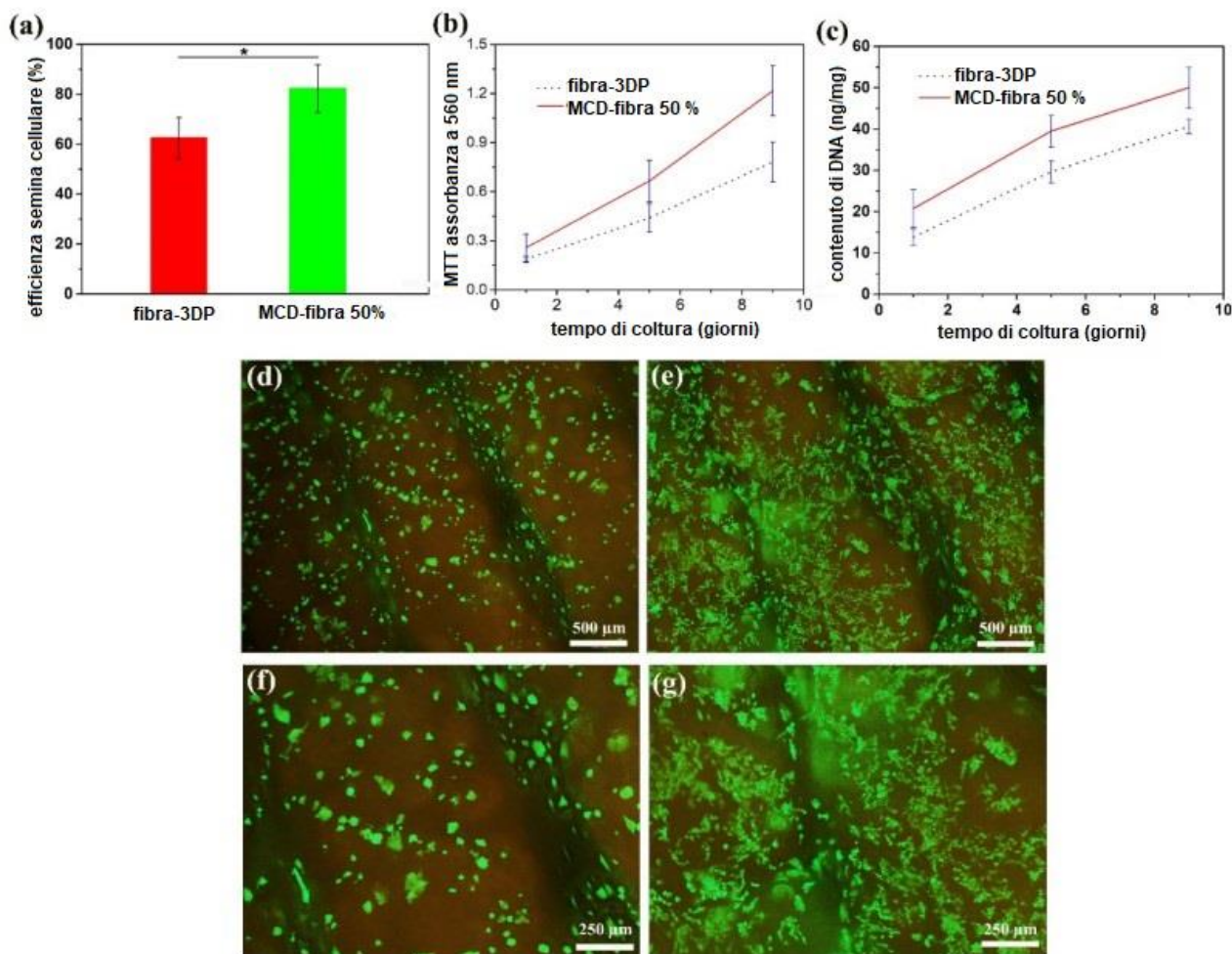


Fig. 24 Efficienza della semina, vitalità e proliferazione cellulare. (a) efficienza della semina cellulare sul fibra-3DP e MCD-fibra 50% dopo 24 ore di coltura. (b) Vitalità dei condrociti su fibra-3DP e MCD-fibra 50% con test MTT e (c) proliferazione cellulare attraverso test quantitativo del DNA dopo 1, 5 e 9 giorni. Micrografie fluorescenti grazie a test LIVE/DEAD di condrociti coltivati su (d, f) fibra-3DP e (e, g) su MCD-fibra 50 % al giorno 5 di coltura. (adattata da [95]).

I test in vitro evidenziano che efficienza della semina, vitalità e proliferazione cellulare risultano tutte significativamente maggiori nel MCD-fibra 50% rispetto al solo fibra-3DP per tutto il tempo di coltura (**Fig. 24**), dimostrando che la presenza della MCD favorisce la proliferazione cellulare e conferisce un'ottima biocompatibilità allo scaffold. Per testare l'efficacia di questi scaffold in vivo, sono stati eseguiti anche test su animali (topo nudo e coniglio) (**Fig. 23**). Per quanto riguarda il topo, 200 μL di condrociti con una concentrazione di 5×10^8 cellule/mL sono stati seminati uniformemente sui due tipi di scaffold, i quali sono stati poi impiantati nel tessuto sottocutaneo del topo nudo per 4 e 8 settimane. Gli studi in vivo riguardanti i conigli invece, consistono inizialmente nel praticare, tramite una piccola fresa, un difetto osteocondrale di 3.5 mm di diametro e 4 mm di profondità nel solco trocleare della gamba per poi impiantare i due tipi di scaffold puri (non seminati con cellule) in essi per 12 settimane con lo scopo di valutarne la capacità di riparazione del tessuto cartilagineo in

situ. Per entrambi, al termine della coltura, è stata eseguita una valutazione istologica sulle sezioni degli scaffold tramite colorazione con ematossilina ed eosina (H&E), Safranin-O ed una colorazione immunohistochimica per valutare la presenza di collagene di tipo II.

Dopo 8 settimane, l'impianto in vivo sul topo presenta in entrambi i gruppi di scaffold (MCD-fibra 50% e fibra-3DP) la formazione di tessuto bianco simile alla cartilagine, anche se gli scaffold contenenti la MCD hanno conservato meglio la loro forma quadrata originale rispetto all'altro gruppo.

Dopo 12 settimane dall'impianto dei gruppi di scaffold nei difetti creati nella cartilagine articolare di coniglio, a occhio nudo è visibile che nel gruppo non trattato (**Fig. 25a**) il difetto non si sia per niente riparato, a differenza del gruppo di fibra-3DP (**Fig. 25b**) che mostra un difetto parzialmente riempito e del MCD-fibra 50 % (**Fig. 25c**) dove il difetto è stato totalmente riempito, quindi ripristinato, da un

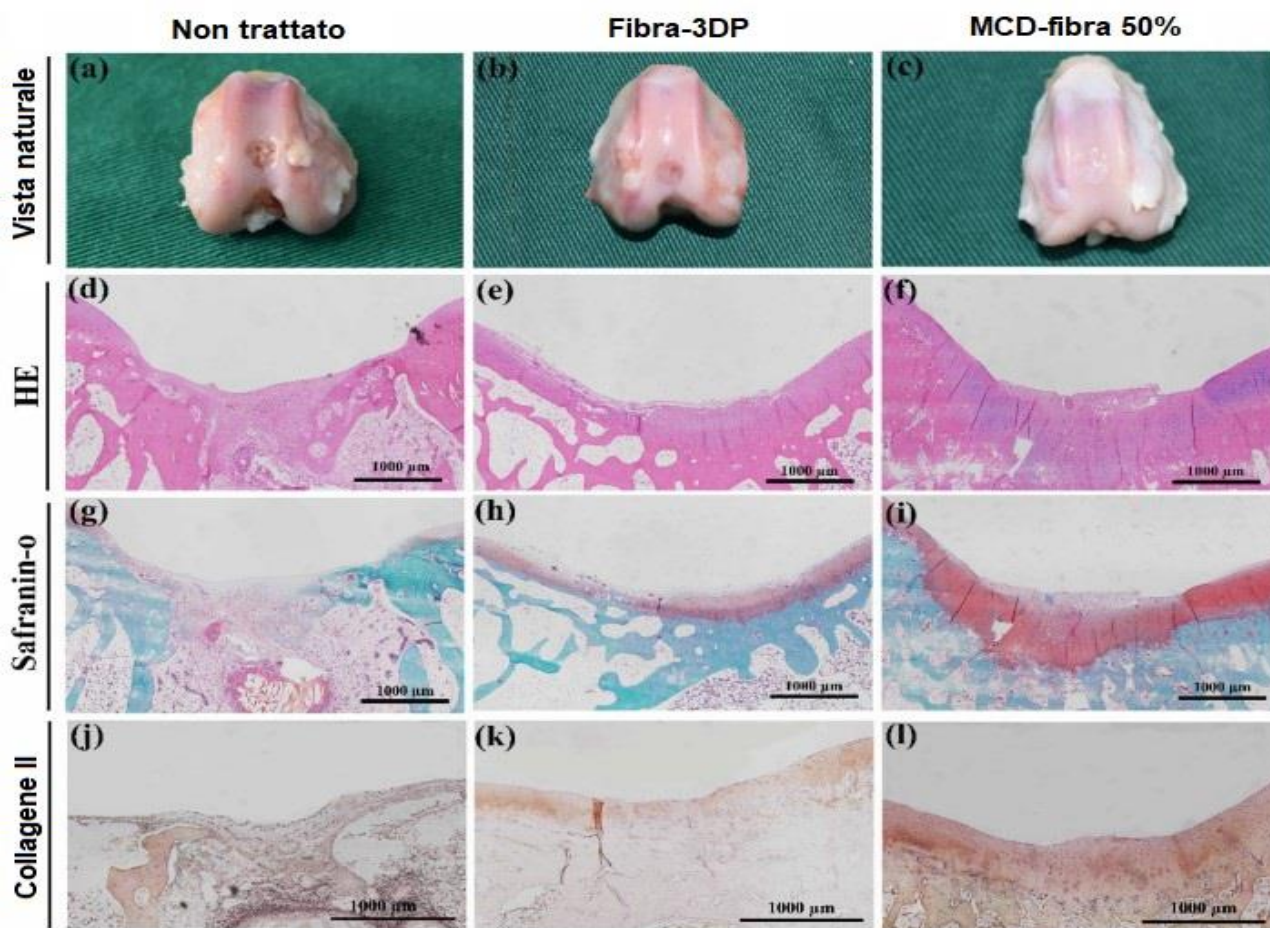


Fig. 25 Riparazione della cartilagine articolare in conigli. Immagini macroscopiche della cartilagine articolare di un gruppo (a) non trattato, (b) fibra-3DP e (c) MCD-fibra 50% dopo 12 settimane. Analisi istologica e immunohistochimica dell'area del difetto cartilagineo nei diversi gruppi dopo 12 settimane, colorata con (d-f) HE e (g-i) Safranin O-fast green e (j-l) dal collagene di tipo II. (adattata da [95]).

tessuto bianco uniforme simile alla cartilagine con una superficie piatta. Grazie alle diverse colorazioni associate ai vari test in vitro è ben visibile la formazione del nuovo tessuto rigenerato

(**Fig. 23f, i**). Nel gruppo degli scaffold MCD-fibra 50% si osservano numerosissimi nuovi condrociti formarsi sulla superficie del difetto in linea con i risultati delle analisi immunohistochemiche che rivelano una significativa deposizione di collagene di tipo II (segnale di formazione del nuovo tessuto). Questo studio presenta una tipologia di scaffold molto promettente per la rigenerazione/riparazione della cartilagine ed espone, per la prima volta, una nuova strategia che permette la stampa 3D di scaffold con un inchiostro a base di matrice cartilaginea decellularizzata (MCD) rinforzato con fibre.

4.3 TENDINI E LEGAMENTI

Per la rigenerazione dei tessuti muscolo-scheletrici, in particolare tendini e legamenti, Sooriyaarachchi et al. [100] propongono uno scaffold composto da 4 strati di PLA realizzati mediante FDM con l'aggiunta di una rete elettrofilata di PCL (prima dissolto in DMF/cloroformio) ogni due strati. Per confronto, vengono realizzate due tipologie di scaffold, una con strati di nanofibre ad orientamento casuale realizzati mediante elettrofilatura su un foglio di alluminio come collettore (**Fig. 26c**), e l'altra con strati di nanofibre allineate (**Fig. 26a, b**) ottenuti attraverso un gap collector costituito da due elettrodi metallici distanti 4 cm. Sono stati condotti test a compressione per tutti gli scaffold per valutare l'influenza della nanofibre e del loro orientamento sulle proprietà meccaniche dello scaffold.

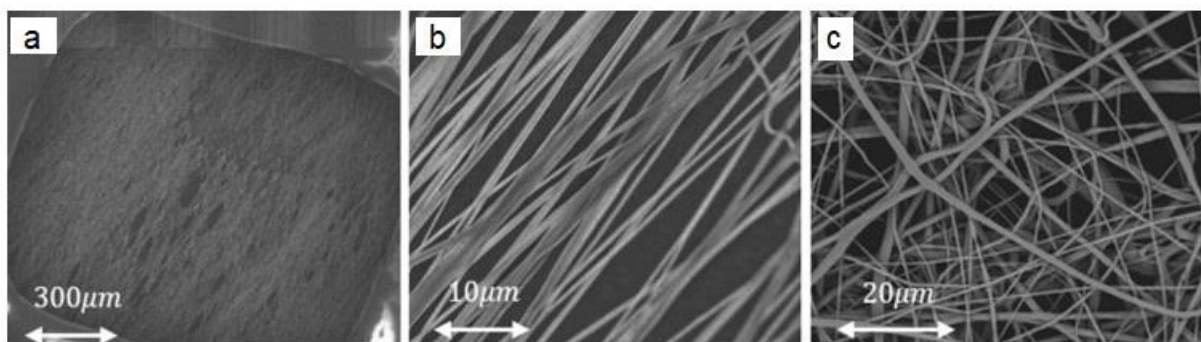


Fig. 26 Immagine al microscopio a scansione elettronica di (a, b) fibre allineate e (c) fibre random su scaffold 3D. (adattata da [100]).

I risultati dei test a trazione (con una velocità di spostamento di 2.5 mm/min) (**Fig. 27**) mostrano un modulo di compressione dello scaffold privo di nanofibre di circa 380 MPa, contro i 400 MPa dello scaffold con fibre random e il più alto di tutti, circa 490 MPa, dello scaffold con fibre allineate. Da ciò si deduce quindi che l'aggiunta di nanofibre random influisce pochissimo sulla resistenza

meccanica della struttura, mentre si registra un aumento del 46% in presenza di nanofibre allineate, dimostrando quindi che un'organizzazione monoassiale rende una struttura più rigida e resistente.

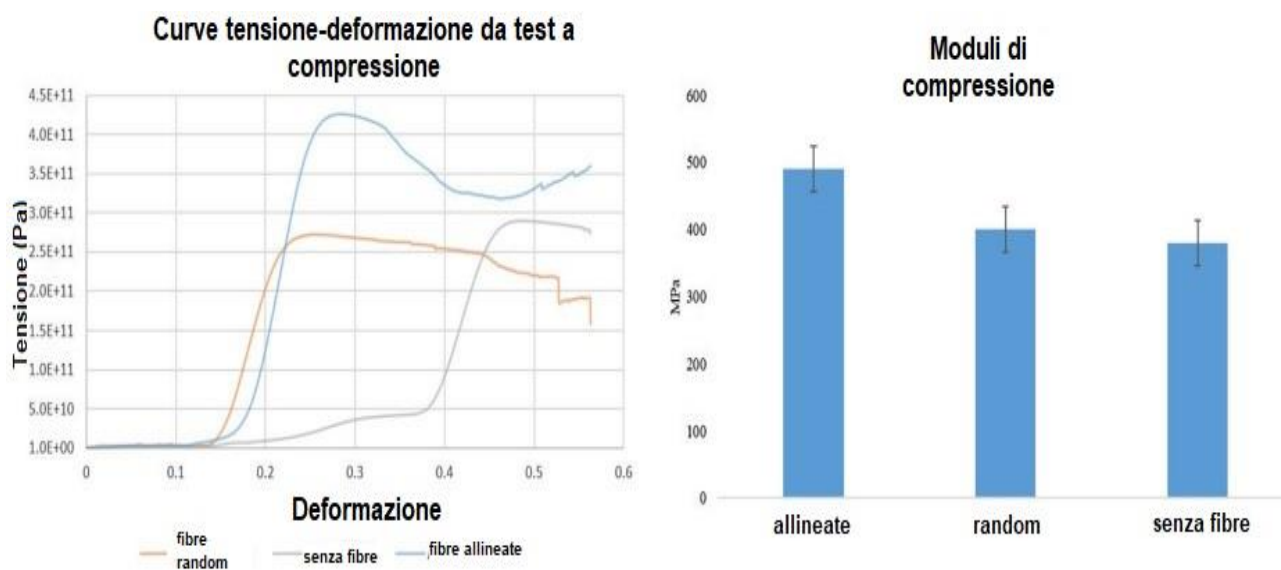


Fig. 27 Risultati da test a compressione degli scaffold ibridi e puro. (adattata da [100]).

Per lo studio cellulare sono state seminate circa 300000 cellule di fibroblasti umane per 7 giorni. Al settimo giorno gli scaffold sono stati analizzati tramite test AlamarBlue per quantificare la vitalità cellulare (più alta è la percentuale di riduzione più alta è la vitalità cellulare) e tramite un microscopio a fluorescenza per valutare la morfologia delle cellule grazie alla colorazione di esse con DAPI (colorazione blu dei nuclei) e falloidina (colorazione verde per i filamenti di actina). Dai risultati (**Fig. 28**) si nota visibilmente che tutti gli scaffold ibridi sono biocompatibili e presentano un tasso di proliferazione cellulare maggiore dello scaffold puro in quanto la rete di nanofibre fornisce una maggiore area a disposizione per le cellule. Osservando poi con il microscopio a fluorescenza, dopo la colorazione, si nota che gli scaffold elettrofilati, soprattutto quello con fibre random, presentano una maggiore densità cellulare ma a differenza degli altri lo scaffold con fibre allineate influisce sulla morfologia cellulare e induce ad un'organizzazione allineata delle cellule che mima il modello di organizzazione del tessuto tendineo/legamentoso nativo, caratteristica fondamentale per un ottimo scaffold. Il processo di produzione proposto è in grado di produrre un biomimetico ed efficiente scaffold proponendosi come una futura soluzione clinica per la rigenerazione dei tendini/legamenti e gli altri tessuti del sistema muscolo-scheletrico.

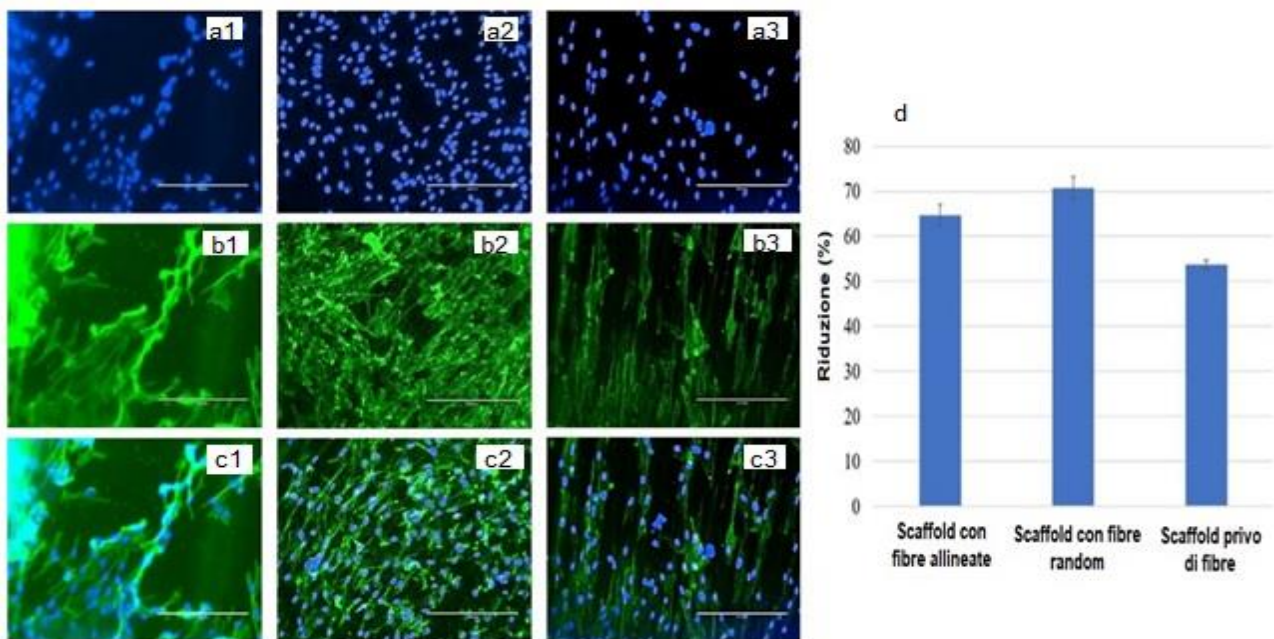


Fig. 28 Immagini a fluorescenza dei fibroblasti (a1-c1) sui filamenti dello scaffold senza nanofibre, (a2-c2) sulle nanofibre random e (a3-c3) sulle nanofibre allineate dello scaffold ibrido. (Scala= 200 μ m) (blu = nuclei cellule, verde = filamenti di actina delle cellule). (d) Risultati dal AlamarBlue test al 7° giorno di coltura. (adattata da [100]).

In un altro studio, Touré et al. [96] combina la stampa 3D e l'elettrofilatura per produrre una struttura multistrato costituita da uno scaffold di PCL/PGS con l'aggiunta di microsferi di vetri bioattivi (BGs) (con il compito di regolare la biodegradazione e regolare il pH), su la cui superficie viene direttamente depositato uno strato di nanofibre dello stesso polimero prodotto mediante elettrofilatura. La stampa dei diversi strati dello scaffold di base avviene alla temperatura di 37° mediante una stampante 3D ad estrusione, dotata di una testina di stampa dal diametro interno di 340 μ m, su una piattaforma rivestita da un foglio di alluminio. Ogni strato è costituito da filamenti paralleli distanti 1.45 mm e disposto perpendicolarmente rispetto al precedente in modo da formare una sorta di griglia. Infine, per concludere il processo di fabbricazione, nella stessa postazione (il foglio di alluminio funge da collettore per l'elettrofilatura) viene elettrofilato lo strato di fibre su una sola faccia dello scaffold (la superficie) ad un voltaggio di 8 kV e un flow rate di 0.8 mL/h. Per lo studio in questione sono stati prodotti 3 tipi di scaffold di base: PCL-PGS (3D PCL-PGS), PCL-PGS contenente 5 m/m% di vetri bioattivi (3D PCL-PGS-5BGs) e PCL-PGS contenente 10 m/m% di vetri bioattivi (3D PCL-PGS-10BGs). Per la caratterizzazione meccanica le strutture realizzate sono state sottoposte a test di trazione monoassiale (con un tasso di estensione impostato a 10 mm/min) con risultati evidenziati in **fig. 29**. Osservando le curve di carico-deformazione si può notare la resistenza conferita dalla rete di fibre e come all'aumentare della concentrazione dei vetri bioattivi nella matrice dello scaffold

corrisponda una riduzione significativa della deformazione di rottura indipendentemente dalla presenza o meno di fibre.

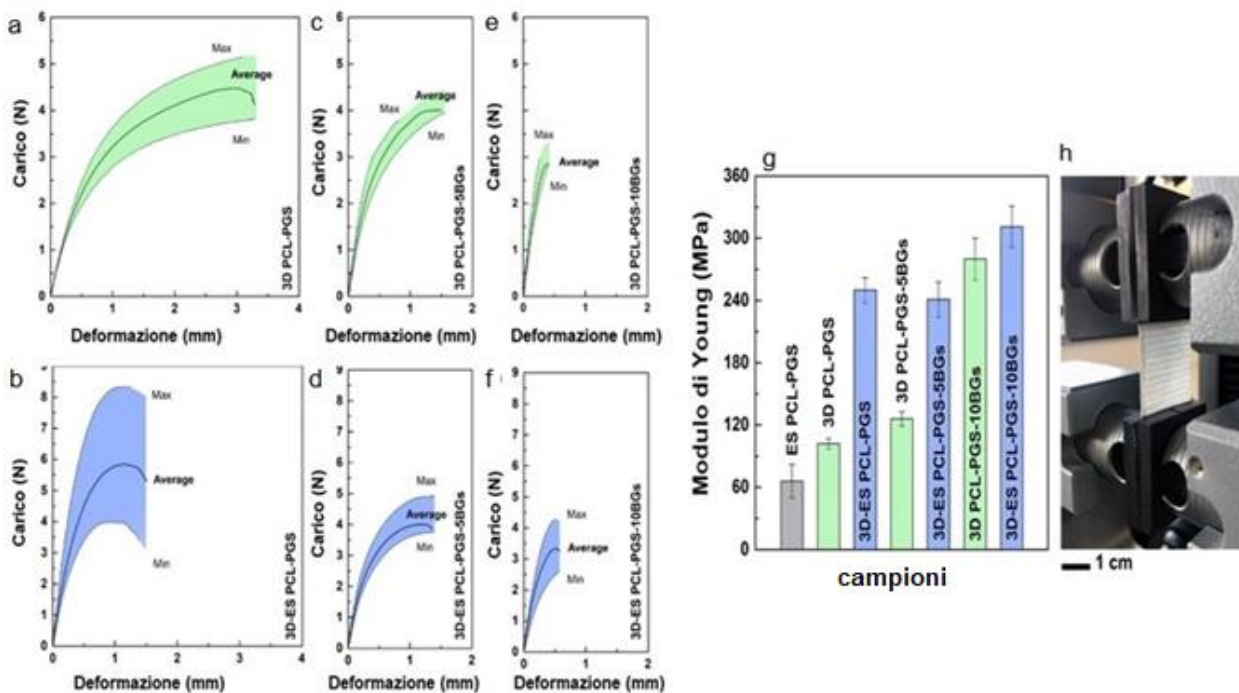


Fig. 29 Curve di carico-deformazione dei 3 tipi di scaffold: (a, c, e) senza strato elettrofilato e (b, d, f) con lo strato elettrofilato di PCL-PGS. (g) Valori dei moduli di Young dei diversi scaffold. (h) Fotografia di uno scaffold composito durante il test a trazione. (adattata da [96]).

Guardando invece i moduli di Young, calcolati all'interno della regione lineare della curva nel range di deformazioni 0.001-0.005 (**Fig. 29g**) si può dedurre che l'inserimento degli strati di fibre e dei BGs hanno aumentato significativamente la rigidità delle diverse strutture (con e senza vetri bioattivi), caratteristica fondamentale per tessuti come tendini e legamenti. Da 102 ± 5 MPa per i campioni 3D PCL-PGS a 250 ± 12 MPa per quelli 3D-ES PCL-PGS. Anche per gli scaffold stampati in 3D con 5 e 10 m/m% di BGs assistiamo allo stesso trend avendo prima valori del modulo elastico di 126 ± 7 MPa e 280 ± 20 MPa, rispettivamente e dopo la deposizione dello strato di fibre valori fino a 241 ± 17 MPa per 3D-ES PCL-PGS-5BGs e 311 ± 20 MPa per 3D-ES PCL-PGS-10BGs. Per i test di biocompatibilità, dopo essere state opportunamente trattate, cellule 3T3 (fibroblasti) prelevate da topi sono state seminate su estratti di tutte le tipologie di scaffold e ne è stata valutata la vitalità cellulare attraverso il reagente di vitalità cellulare PrestoBlue attraverso misure a fluorescenza con un time point di 1, 2 e 7 giorni. I risultati confermano che la vitalità cellulare risulta superiore all'80% per tutti i time point ed un effetto positivo dei BGs, che contrastando l'acidità del PGS, permettono una più lunga vitalità cellulare in vitro. Questa tipologia di scaffold composito può trovare ampiamente spazio nel campo dell'ingegneria tissutale dei tendini e legamenti in quanto presenta

un'ottima biocompatibilità e soprattutto possiede le proprietà meccaniche che ricadono nel range di quelle del tessuto nativo (modulo elastico compreso tra 100-300 MPa).

4.4 ENTESI

A causa della loro dimensione (poche centinaia di μm), dei confini indefiniti che delimitano queste zone, della loro natura transitoria e struttura a gradiente, gli studi e gli esperimenti per la rigenerazione della entesi e della giunzione miotendinea presenti in letteratura sono veramente pochissimi.

Uno di questi studi, il primo che combinò le due tecniche di fabbricazione per un riprodurre un tessuto di interfaccia, condotto da Criscenti et al. [101] propone la realizzazione di uno scaffold trifasico per la rigenerazione dell'entesi (osso-legamento) tramite la combinazione di una struttura di PCL stampata tramite una stampante 3D ad estrusione e uno strato di fibre di PLGA elettrofilato.

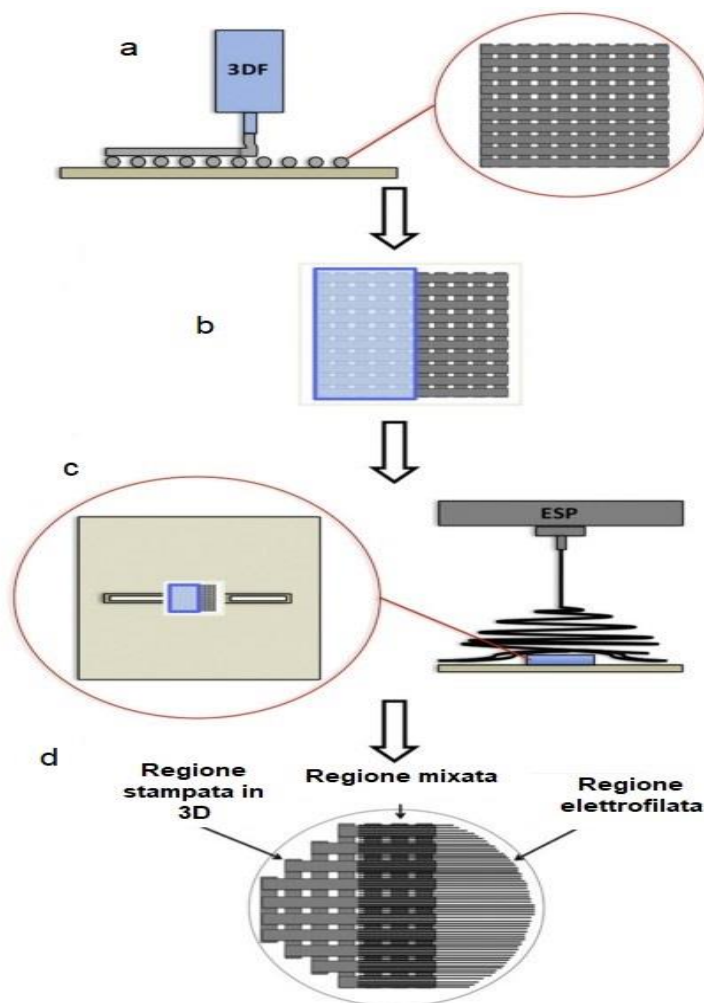


Fig. 30 Processo di fabbricazione in due step: (a) stampa dello scaffold 3D di PCL; (b) copertura parziale dello scaffold 3D di PCL con un foglio di carta; (c) elettrofilatura di una rete di fibre allineate sulla porzione di superficie scoperta dello scaffold 3D; (d) scaffold ottenuto costituito da 3 regioni differenti (stampata 3D, elettrofilata, mixata). (adattata da [101]).

La realizzazione dello scaffold avviene in 2 step (**Fig. 30**): per prima cosa vengono stampati per estrusione da una siringa (diametro interno: 250 μm) 4 strati di PCL, con un'orientazione perpendicolare tra loro ed ognuno con uno spessore di 150 μm , ad una velocità di stampa di 275-325 mm/min. Successivamente lo scaffold 3D realizzato viene parzialmente coperto da un foglio di carta. Dopo ciò, una volta dissolto il PLGA con 1, 1, 1, 3, 3, 3-esafuoro-2-propanolo (HFIP), sullo scaffold viene elettrofilata una rete di nanofibre allineate sotto un voltaggio di 20 kV, con una distanza punta-collettore di 20 cm e un flow rate di 1 mL/h. Per concludere, il foglio di carta (con le fibre in superficie da scartare) viene rimosso con uno scalpello ottenendo così come prodotto finale uno scaffold con 3 regioni differenti: una regione stampata in 3D (rappresenta l'osso), una regione solo elettrofilata (rappresenta il legamento) e una regione mixata (rappresenta l'interfaccia legamento-osso, entesi). Lo scaffold ottenuto presenta una buona porosità e nessun fenomeno di delaminazione. Le proprietà meccaniche sono state valutate tramite un test a trazione monoassiale (risultati in **tab. 11**) per ogni singola regione dimostrando che lo scaffold trifasico è caratterizzato da un gradiente di proprietà meccaniche (come nel tessuto originale) che potrebbe stimolare diverse risposte e una diversa differenziazione cellulare tra le varie regioni.

Tab. 11 Proprietà meccaniche nelle tre differenti regioni. (adattata da [101]).

Proprietà meccaniche	Regione 3D	Regione mixata	Regione elettrofilata
Tensione di rottura (MPa)	1.62 \pm 0.27	2.57 \pm 0.51	5.21 \pm 1.11
Deformazione di rottura (%)	4.81 \pm 0.69	6.71 \pm 0.31	22.1 \pm 3.2
Modulo di Young (MPa)	43.6 \pm 8.1	50.6 \pm 10.5	88.8 \pm 15.1
Densità energetica di deformazione (MPa)	1.78 \pm 0.27	1.81 \pm 0.39	2.14 \pm 0.81

Attraverso diversi test (Presto blue, DNA, enzima ALP, GAG), le cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs), seminate sull'intero scaffold per 7 giorni, rivelano una distribuzione uniforme sull'intero scaffold con una proliferazione cellulare maggiore nella regione elettrofilata. Significativi sono il test con l'enzima ALP che suggerisce una differenziazione osteogenica più alta nella zona stampata (risultato positivo in quanto è la regione che rappresenta l'osso) rispetto alle altre due regioni e il test GAG (misura il quantitativo di glicosaminoglicani che loro volta esprimono la produzione di MEC) che rivela un grado di legamentogenesi più alto nella zona trifasica. In base a quanto detto, questa tipologia di scaffold trifasico può rappresentare un modello in vitro di interfaccia legamento-osso e pone delle buone basi per i futuri studi nel campo.

Tab. 12 Proprietà meccaniche dei vari scaffold per la rigenerazione dei tessuti muscolo-scheletrici dall'analisi della letteratura effettuata

Tessuto da riparare/rigenerare	Tensione a rottura (MPa)	Modulo elastico a trazione/compressione (MPa)	Deformazione di rottura (%)	Riferimenti
Tessuto osseo	N/A	30.5 ± 0.82	N/A	[91]
	N/A	170.3 ± 13.9	N/A	[92]
	1 ± 0.302	0.501 ± 0.197	1.96 ± 0.5	[102]
Tessuto cartilagineo	N/A	9.68 ± 1.32	N/A	[97]
(menisco)	N/A	216.66	N/A	[98]
	N/A	0.020 - 0.058	N/A	[95]
Tendini/legamenti	N/A	490	N/A	[100]
	N/A	238-331	N/A	[96]
Entesi:				[101]
Lato osso	1.62 ± 0.27	43.6 ± 8.1	4.81 ± 0.69	
Lato legamento	5.21 ± 1.11	88.8 ± 15.1	22.1 ± 3.2	
Interfaccia osso-legamento	2.57 ± 0.51	50.6 ± 10.5	6.71 ± 0.31	

5 CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

L'ingegneria tissutale rappresenta un'alternativa ambiziosa e attualmente in continuo sviluppo con lo scopo di scoprire nuovi biomateriali sempre più compatibili e nuove tecniche di fabbricazione di scaffold per rigenerare o riparare i diversi tessuti del nostro corpo. Questo campo dell'ingegneria ha avuto una forte espansione negli ultimi decenni con l'avvento della stampa 3D e dell'elettrospinning, sebbene ognuna delle due presenti delle limitazioni (principalmente una bassa risoluzione per mimare la MEC del tessuto originale per la stampa 3D e scarse proprietà meccaniche per l'elettrofilatura) che rimangono ancora oggi una sfida per questo settore. Nell'ultimo decennio, sono stati proposti diversi studi riguardanti l'approccio combinato di queste due tecniche con lo scopo di superare, o almeno compensare, le limitazioni di entrambe e di riuscire a produrre un'innovativa e funzionale tipologia di scaffold per una più efficace rigenerazione dei vari tessuti umani. In questo elaborato, l'attenzione è stata rivolta alla rigenerazione dei tessuti del sistema muscolo scheletrico. Dall'analisi della letteratura si evince che la combinazione delle due tecniche di fabbricazione mediante diverse strategie di processo ha permesso la realizzazione di scaffold ibridi con varie forme e strutture (tra cui scaffold a struttura gerarchica, multifase, multistrato o con superficie modificata) che esibiscono buone e migliori proprietà sia dal punto di vista meccanico (resistenza e rigidità) che dal punto di

vista biologico (efficienza semina cellulare, vitalità e proliferazione) rispetto agli scaffold realizzati solo mediante una delle due tecniche. Nonostante gli incoraggianti risultati, siamo ancora lontani dall'applicazione di queste strutture nelle pratiche cliniche di routine. Nei futuri studi, mediante ulteriori test in vitro e in vivo, bisognerebbe svolgere uno studio più approfondito su alcune funzionalità degli scaffold, come diffusione, osmosi e perfusione, in quanto influiscono molto sull'infiltrazione e la morfologia cellulare. Un altro aspetto da approfondire sono gli scaffold caricati con farmaci, in modo da regolare al meglio il tempo di degradazione dello scaffold con tempo di rilascio del farmaco e viceversa. Inoltre, è fondamentale effettuare ulteriori studi per adattare ancora di più le tecniche e le proprietà dei biomateriali alle caratteristiche strutturali, biologiche e meccaniche dei tessuti (spesso ancora molto lontane da quelle del tessuto originale) anche tramite la ricerca di nuove strategie che fanno uso di stimoli meccanici o chimici, in quanto deve essere ancora riprodotta in modo convincente la struttura gerarchica dei tessuti a livello multiscala, soprattutto per quanto riguarda le interfacce (entesi e giunzione miotendinea) che rappresentano ancora una grossa sfida a causa della loro natura e delle conseguenti difficoltà ad imitare il loro gradiente strutturale. Sebbene per l'entesi qualche sperimentazione o studio preliminare sia già stato fatto, per quanto riguarda la giunzione miotendinea la sfida rimane ancora completamente aperta e l'approccio combinato di stampa 3d ed elettrofilatura potrebbe rivelarsi una vantaggiosa opportunità che per questa interfaccia deve ancora essere esplorata. Un'altra soluzione potrebbe essere l'uso di una recente tecnica di fabbricazione, chiamata melt electrowriting (MEW), una tecnica in grado, grazie ad un campo elettrico, di depositare fibre micrometriche predefinite su un collettore con elevata stabilità e risoluzione, conferendo alla struttura realizzata buone proprietà meccaniche e allo stesso tempo una buona biocompatibilità, anche se su questo processo di produzione sono ancora in corso valutazioni per il suo utilizzo per la rigenerazione dei tessuti. Infine, un'altra considerazione, a mio parere rilevante, è l'uso di piccoli modelli animali per i test in vivo, che sicuramente aiutano a comprendere le varie fasi della rigenerazione del tessuto, ma limitano o comunque ritardano la traslazione dei progressi della medicina rigenerativa nella pratica clinica in quanto sarebbe più efficace usare animali di taglia più grande.

Nonostante le varie problematiche da risolvere e gli studi da approfondire in futuro, i risultati finora ottenuti suggeriscono che gli scaffold realizzati tramite l'approccio combinato di tecnologie additive ed elettrofilatura rappresentino una grande potenzialità per applicazioni cliniche di routine in futuro.

6 BIBLIOGRAFIA

- [1] M. A. Barajaa, L. S. Nair, and C. T. Laurencin, “Bioinspired Scaffold Designs for Regenerating Musculoskeletal Tissue Interfaces,” *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, vol. 6, no. 4, pp. 451–483, Dec. 2020, doi: 10.1007/s40883-019-00132-3.
- [2] A. Sensini, G. Massafra, C. Gotti, A. Zucchelli, and L. Cristofolini, “Tissue Engineering for the Insertions of Tendons and Ligaments: An Overview of Electrospun Biomaterials and Structures,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 9. Frontiers Media S.A., Mar. 02, 2021. doi: 10.3389/fbioe.2021.645544.
- [3] D. Qu, C. Z. Mosher, M. K. Boushell, and H. H. Lu, “Engineering Complex Orthopaedic Tissues Via Strategic Biomimicry,” *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 43, no. 3, pp. 697–717, Mar. 2015, doi: 10.1007/s10439-014-1190-6.
- [4] R. Weinkamer and P. Fratzl, “Mechanical adaptation of biological materials — The examples of bone and wood,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 31, no. 6, pp. 1164–1173, Aug. 2011, doi: 10.1016/J.MSEC.2010.12.002.
- [5] P. Laugier and G. Haiat, *Bone quantitative ultrasound*. Springer Netherlands, 2011. doi: 10.1007/978-94-007-0017-8.
- [6] R. Florencio-Silva, G. R. D. S. Sasso, E. Sasso-Cerri, M. J. Simões, and P. S. Cerri, “Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells,” *BioMed Research International*, vol. 2015. Hindawi Publishing Corporation, 2015. doi: 10.1155/2015/421746.
- [7] P. Augat and S. Schorlemmer, “The role of cortical bone and its microstructure in bone strength,” in *Age and Ageing*, Sep. 2006, vol. 35, no. SUPPL.2. doi: 10.1093/ageing/af1081.
- [8] S. Qiu, D. P. Fyhrie, S. Palnitkar, and A. D. S. Rao, “Histomorphometric Assessment of Haversian Canal and Osteocyte Lacunae in Different-Sized Osteons in Human Rib,” 2003, doi: 10.1002/ar.a.10058.
- [9] Elaine Nicpon Marieb and Katja Hoehn, *Human Anatomy and Physiology*, Seventh Edition. 2007.
- [10] J.-Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, and P. Zioupos, “Mechanical properties and the hierarchical structure of bone,” 1998.
- [11] E. F. Morgan, G. U. Unnikrisnan, and A. I. Hussein, “Annual Review of Biomedical Engineering Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States,” 2018, doi: 10.1146/annurev-bioeng-062117.
- [12] A. Wubneh, E. K. Tsekoura, C. Ayranci, and H. Uludağ, “Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering,” *Acta Biomaterialia*, vol. 80. Acta Materialia Inc, pp. 1–30, Oct. 15, 2018. doi: 10.1016/j.actbio.2018.09.031.
- [13] R. Narayan, *Biomedical materials*. Springer US, 2009. doi: 10.1007/978-0-387-84872-3.

- [14] X. E. Guo and S. Goldstein, “Is trabecular bone tissue different from cortical bone tissue? Forma,” 1997. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/264382915>
- [15] W. Murphy, J. Black, and G. Hastings, *Handbook of biomaterial properties, second edition*. Springer New York, 2016. doi: 10.1007/978-1-4939-3305-1.
- [16] D. Jaramillo and F. Shapiro, “GROWTH CARTILAGE Normal Appearance, Variants and Abnormalities,” 1998.
- [17] G. M. Peretti, L. Mangiavini, and R. Ballis, “Fisiopatologia del complesso osso-cartilagine,” *Archivio di Ortopedia e Reumatologia*, vol. 120, no. 3–4, pp. 3–5, Nov. 2009, doi: 10.1007/s10261-009-0039-2.
- [18] F. M. Benjamin and E. J. Evans, “Fibrocartilage,” 1990.
- [19] A. Rehfeld, M. Nylander, and K. Karnov, “Cartilage,” in *Compendium of Histology*, Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 147–155. doi: 10.1007/978-3-319-41873-5_8.
- [20] H. Li, J. Li, S. Yu, C. Wu, and W. Zhang, “The mechanical properties of tibiofemoral and patellofemoral articular cartilage in compression depend on anatomical regions,” *Scientific Reports* /, vol. 11, p. 6128, 123AD, doi: 10.1038/s41598-021-85716-2.
- [21] W. Swieszkowski, B. Ho, S. Tuan, K. J. Kurzydowski, and D. W. Hutmacher, “Repair and regeneration of osteochondral defects in the articular joints”, doi: 10.1016/j.bioeng.2007.07.014.
- [22] W. Kabir, C. di Bella, P. F. M. Choong, and C. D. O’Connell, “Assessment of Native Human Articular Cartilage: A Biomechanical Protocol,” *Cartilage*, vol. 13, no. 2_suppl, pp. 427S-437S, Dec. 2021, doi: 10.1177/1947603520973240.
- [23] J. H. C. Wang, “Mechanobiology of tendon,” *Journal of Biomechanics*, vol. 39, no. 9. pp. 1563–1582, 2006. doi: 10.1016/j.jbiomech.2005.05.011.
- [24] L. Baldino, S. Cardea, N. Maffulli, and E. Reverchon, “Regeneration techniques for bone-To-Tendon and muscle-To-Tendon interfaces reconstruction,” *British Medical Bulletin*, vol. 117, no. 1, pp. 25–37, Mar. 2016, doi: 10.1093/bmb/ldv056.
- [25] J. H. C. Wang, “Mechanobiology of tendon,” *Journal of Biomechanics*, vol. 39, no. 9. pp. 1563–1582, 2006. doi: 10.1016/j.jbiomech.2005.05.011.
- [26] P. Kannus, “Structure of the tendon connective tissue,” *J Med Sci Sports*, vol. 10, pp. 312–320, 2000.
- [27] A. P. Rumian, A. L. Wallace, and H. L. Birch, “Tendons and Ligaments Are Anatomically Distinct But Overlap in Molecular and Morphological Features-A Comparative Study in an Ovine Model,” *J Orthop Res*, vol. 25, pp. 458–464, 2007, doi: 10.1002/jor.20218.
- [28] A. Sensini and L. Cristofolini, “Biofabrication of electrospun scaffolds for the regeneration of tendons and ligaments,” *Materials*, vol. 11, no. 10. MDPI AG, Oct. 12, 2018. doi: 10.3390/ma11101963.
- [29] C. N. Maganaris and J. P. Paul, “In vivo human tendon mechanical properties,” *Journal of Physiology*, pp. 307–313, 1999.

- [30] K. Robi, N. Jakob, K. Matevz, and V. Matjaz, "The Physiology of Sports Injuries and Repair Processes," in *Current Issues in Sports and Exercise Medicine*, InTech, 2013. doi: 10.5772/54234.
- [31] J. Apostolakos *et al.*, "The enthesis: a review of the tendon-to-bone insertion," 2014.
- [32] P. J. Yang and J. S. Temenoff, "Engineering Orthopedic Tissue Interfaces," 2009. [Online]. Available: www.liebertonline.com=ten.
- [33] M. Benjamin, T. Kumai, S. Milz, B. M. Boszczyk, A. A. Boszczyk, and J. R. Ralphs, "Comparative Biochemistry and Physiology Part The skeletal attachment of tendons-tendon 'entheses.'" 2006.
- [34] S. Font Tellado, E. R. Balmayor, and M. van Griensven, "Strategies to engineer tendon/ligament-to-bone interface: Biomaterials, cells and growth factors," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 94. Elsevier B.V., pp. 126–140, Nov. 01, 2015. doi: 10.1016/j.addr.2015.03.004.
- [35] G. M. Genin *et al.*, "Functional grading of mineral and collagen in the attachment of tendon to bone," *Biophysical Journal*, vol. 97, no. 4, pp. 976–985, Aug. 2009, doi: 10.1016/j.bpj.2009.05.043.
- [36] A. B. Knudsen *et al.*, "The human myotendinous junction: An ultrastructural and 3D analysis study," 2014, doi: 10.1111/sms.12221.
- [37] K. W. VanDusen and L. M. Larkin, "Muscle-tendon interface," in *Regenerative Engineering of Musculoskeletal Tissues and Interfaces*, Elsevier Inc., 2015, pp. 409–429. doi: 10.1016/B978-1-78242-301-0.00017-3.
- [38] J. A. Trotter, "Structure-function considerations of muscle-tendon junctions," 2002.
- [39] M. Benjamin, H. Toumi, J. R. Ralphs, G. Bydder, T. M. Best, and S. Milz, "Where tendons and ligaments meet bone: attachment sites ('entheses') in relation to exercise and/or mechanical load," 2006.
- [40] Hems Thorsten and Tillmann Bernhard, "Tendon entheses of the human masticatory muscles," 2000.
- [41] S. Suresh, "Graded Materials for Resistance to Contact Deformation and Damage," *Science*, vol. 292, no. 5526, Jun. 29, 2001. [Online]. Available: www.sciencemag.org
- [42] A. C. Deymier *et al.*, "Micro-mechanical properties of the tendon-to-bone attachment," *Acta Biomaterialia*, vol. 56, pp. 25–35, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.actbio.2017.01.037.
- [43] A. Tits and D. Ruffoni, "Joining soft tissues to bone: Insights from modeling and simulations," *Bone Reports*, vol. 14. Elsevier Inc., Jun. 01, 2021. doi: 10.1016/j.bonr.2020.100742.
- [44] M. R. Ladd, S. J. Lee, J. D. Stitzel, A. Atala, and J. J. Yoo, "Co-electrospun dual scaffolding system with potential for muscle-tendon junction tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 32, no. 6, pp. 1549–1559, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.10.038.

- [45] C. Zhao *et al.*, “Preparation of decellularized biphasic hierarchical myotendinous junction extracellular matrix for muscle regeneration,” *Acta Biomaterialia*, vol. 68, pp. 15–28, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.actbio.2017.12.035.
- [46] E. Azizi, G. M. Halenda, and T. J. Roberts, “Mechanical properties of the gastrocnemius aponeurosis in wild turkeys,” *Integrative and Comparative Biology*, vol. 49, no. 1, pp. 51–58, Jul. 2009, doi: 10.1093/icb/icp006.
- [47] A. S. Mistry and A. G. Mikos, “Tissue engineering strategies for bone regeneration,” *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 94. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, pp. 1–22, Mar. 07, 2005. doi: 10.1007/b99997.
- [48] G. Battafarano *et al.*, “Molecular Sciences Strategies for Bone Regeneration: From Graft to Tissue Engineering,” *J. Mol. Sci*, vol. 22, p. 1128, 2021, doi: 10.3390/ijms22031128.
- [49] R. Dimitriou, E. Jones, D. McGonagle, and P. v Giannoudis, “Bone regeneration: current concepts and future directions,” 2011. doi: 10.1186/1741-7015-9-66.
- [50] M. Bhattacharjee *et al.*, “Tissue engineering strategies to study cartilage development, degeneration and regeneration,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 84. Elsevier B.V., pp. 107–122, Apr. 01, 2015. doi: 10.1016/j.addr.2014.08.010.
- [51] R. S. Tuan, A. F. Chen, and B. A. Klatt, “Cartilage regeneration,” *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, vol. 21, no. 5. pp. 303–311, May 2013. doi: 10.5435/JAAOS-21-05-303.
- [52] S. A. Abbah, K. Spanoudes, T. O’Brien, A. Pandit, and D. I. Zeugolis, “Generation of disease-specific induced pluripotent stem cells from patients with different karyotypes of Down syndrome,” 2012. doi: 10.1186/scrt105.
- [53] E. Bianchi *et al.*, “pharmaceutics Innovative Strategies in Tendon Tissue Engineering,” 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13010089.
- [54] H. L. Birch, M. J. Peffers, and P. D. Clegg, “Influence of ageing on tendon homeostasis,” in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 920, Springer New York LLC, 2016, pp. 247–260. doi: 10.1007/978-3-319-33943-6_24.
- [55] G. Nourissat, F. Berenbaum, and D. Duprez, “Tendon injury: From biology to tendon repair,” *Nature Reviews Rheumatology*, vol. 11, no. 4. Nature Publishing Group, pp. 223–233, Apr. 01, 2015. doi: 10.1038/nrrheum.2015.26.
- [56] D. Wang *et al.*, “Engineering multi-tissue units for regenerative Medicine: Bone-tendon-muscle units of the rotator cuff,” *Biomaterials*, vol. 272. Elsevier Ltd, May 01, 2021. doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.120789.
- [57] A. J. Boys, M. C. McCorry, S. Rodeo, L. J. Bonassar, and L. A. Estroff, “Next generation tissue engineering of orthopedic soft tissue-to-bone interfaces,” *MRS Communications*, vol. 7, no. 3, pp. 289–308, Sep. 2017, doi: 10.1557/mrc.2017.91.
- [58] M. Benjamin, T. Kumai, S. Milz, B. M. Boszczyk, A. A. Boszczyk, and J. R. Ralphs, “Comparative Biochemistry and Physiology Part The skeletal attachment of tendons-tendon ‘entheses.’”

- [59] W. E. Palmer, S. J. Kuong, and H. M. Elmadbouh, “MR Imaging of Myotendinous Strain.” [Online]. Available: www.ajronline.org
- [60] A. J. Boys, M. C. Mccorry, L. J. Bonassar, and L. A. Estroff, “Biomaterials for 3D Cell Biology Prospective Article”, doi: 10.1557/mrc.2017.91.
- [61] A. R. (Aldo R.) Boccaccini and Julie. Gough, *Tissue engineering using ceramics and polymers*. CRC, 2007.
- [62] H. S. Kim, J. K. Seon, and A. R. Jo, “Current trends in anterior cruciate ligament reconstruction,” *Knee Surgery and Related Research*, vol. 25, no. 4. BioMed Central Ltd, pp. 165–173, 2013. doi: 10.5792/ksrr.2013.25.4.165.
- [63] M. A. Barajaa, L. S. Nair, and C. T. Laurencin, “Bioinspired Scaffold Designs for Regenerating Musculoskeletal Tissue Interfaces,” *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, vol. 6, no. 4, pp. 451–483, Dec. 2020, doi: 10.1007/s40883-019-00132-3.
- [64] R. Lanza, R. Langer, J. P. Vacanti, and A. Atala, *Principles of Tissue Engineering*, 5th ed. 2020.
- [65] Y. Ikada, “Challenges in tissue engineering”, doi: 10.1098/rsif.2006.0124.
- [66] J. D. Sipe, “Tissue Engineering and Reparative Medicine,” 2002.
- [67] A. Atala, “Tissue engineering of reproductive tissues and organs,” *Fertility and Sterility*, vol. 98, no. 1. pp. 21–29, Jul. 2012. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.05.038.
- [68] B. P. Chan and K. W. Leong, “Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations,” in *European Spine Journal*, Dec. 2008, vol. 17, no. SUPPL. 4. doi: 10.1007/s00586-008-0745-3.
- [69] A. V. Do, R. Smith, T. M. Acri, S. M. Geary, and A. K. Salem, “3D printing technologies for 3D scaffold engineering,” in *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds: Materials, Technologies, and Applications*, Elsevier, 2018, pp. 203–234. doi: 10.1016/B978-0-08-100979-6.00009-4.
- [70] G.-H. Wu and S.-H. Hsu, “Review: Polymeric-Based 3D Printing for Tissue Engineering”, doi: 10.1007/s40846-015-0038-3.
- [71] U. Jammalamadaka and K. Tappa, “Functional Biomaterials Review Recent Advances in Biomaterials for 3D Printing and Tissue Engineering”, doi: 10.3390/jfb9010022.
- [72] H. N. Chia and B. M. Wu, “Recent advances in 3D printing of biomaterials,” *Journal of Biological Engineering*, vol. 9, no. 1, Mar. 2015, doi: 10.1186/s13036-015-0001-4.
- [73] S. Spiegel, “Recent advances in applied polymer science,” *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 135, no. 24. John Wiley and Sons Inc., Jun. 20, 2018. doi: 10.1002/app.46279.
- [74] A. V. Do, B. Khorsand, S. M. Geary, and A. K. Salem, “3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications,” *Advanced Healthcare Materials*, vol. 4, no. 12. Wiley-VCH Verlag, pp. 1742–1762, Aug. 01, 2015. doi: 10.1002/adhm.201500168.

- [75] P. Neuzil, “From chip-in-a-lab to lab-on-a-chip: towards a single handheld electronic system for multiple application-specific lab-on-a-chip (ASLOC),” *Lab-on-a-chip*, 2014, doi: 10.1039/c6lc00163g.
- [76] S. v. Murphy and A. Atala, “3D bioprinting of tissues and organs,” *Nature Biotechnology*, vol. 32, no. 8. Nature Publishing Group, pp. 773–785, 2014. doi: 10.1038/nbt.2958.
- [77] T. Xu *et al.*, “Viability and electrophysiology of neural cell structures generated by the inkjet printing method,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 19, pp. 3580–3588, Jul. 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.048.
- [78] X. Cui, D. Dean, Z. M. Ruggeri, and T. Boland, “ARTICLE Cell Damage Evaluation of Thermal Inkjet Printed Chinese Hamster Ovary Cells,” *Wiley InterScience* (www.interscience.wiley.com). *Biotechnol. Bioeng*, vol. 106, pp. 963–969, 2010, doi: 10.1002/bit.22762.
- [79] J. Malda *et al.*, “25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication,” *Advanced Materials*, vol. 25, no. 36. pp. 5011–5028, Sep. 2013. doi: 10.1002/adma.201302042.
- [80] H. Cui, M. Nowicki, J. P. Fisher, and L. G. Zhang, “3D Bioprinting for Organ Regeneration,” *Advanced Healthcare Materials*, vol. 6, no. 1. Wiley-VCH Verlag, Jan. 11, 2017. doi: 10.1002/adhm.201601118.
- [81] C. Dou, V. Perez, J. Qu, A. Tsin, B. Xu, and J. Li, “A State-of-the-Art Review of Laser-Assisted Bioprinting and its Future Research Trends”, doi: 10.1002/cben.202000037.
- [82] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, “Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique,” *Biotechnology Advances*, vol. 28, no. 3. pp. 325–347, May 2010. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004.
- [83] A. Haider, S. Haider, and I. K. Kang, “A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology,” *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 11, no. 8. Elsevier B.V., pp. 1165–1188, Dec. 01, 2018. doi: 10.1016/j.arabjc.2015.11.015.
- [84] S. Islam, B. C. Ang, A. Andriyana, · Amalina, and M. Afifi, “A review on fabrication of nanofibers via electrospinning and their applications,” *SN Applied Sciences*, vol. 1, 2019, doi: 10.1007/s42452-019-1288-4.
- [85] A. Sensini and L. Cristofolini, “materials Biofabrication of Electrospun Scaffolds for the Regeneration of Tendons and Ligaments,” 2008, doi: 10.3390/ma11101963.
- [86] Z. Li and C. Wang, “Effects of Working Parameters on Electrospinning,” 2013, pp. 15–28. doi: 10.1007/978-3-642-36427-3_2.
- [87] H. M. Ibrahim and A. Klingner, “A review on electrospun polymeric nanofibers: Production parameters and potential applications,” *Polymer Testing*, vol. 90. Elsevier Ltd, Oct. 01, 2020. doi: 10.1016/j.polymertesting.2020.106647.
- [88] P. K. Baumgarten, “Electrostatic Spinning of Acrylic Microfibers,” *Journal of Colloid and Interface Science*, pp. 71–79.

- [89] Q. P. Pham, U. Sharma, and A. G. Mikos, “Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review,” vol. 12, no. 5, pp. 1197–1211, 2006.
- [90] A. Sensini and L. Cristofolini, “Biofabrication of electrospun scaffolds for the regeneration of tendons and ligaments,” *Materials*, vol. 11, no. 10. MDPI AG, Oct. 12, 2018. doi: 10.3390/ma11101963.
- [91] Y. Yu *et al.*, “Fabrication and characterization of electrospinning/3D printing bone tissue engineering scaffold,” *RSC Advances*, vol. 6, no. 112, pp. 110557–110565, 2016, doi: 10.1039/C6RA17718B.
- [92] S. Naghieh, E. Foroozmehr, M. Badrossamay, and M. Kharaziha, “Combinational processing of 3D printing and electrospinning of hierarchical poly(lactic acid)/gelatin-forsterite scaffolds as a biocomposite: Mechanical and biological assessment,” *Materials and Design*, vol. 133, pp. 128–135, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.matdes.2017.07.051.
- [93] J. Dong, R. J. Jhu, L. Wang, C. P. Jiang, and C. J. Xian, “A hybrid platform for three-dimensional printing of bone scaffold by combining thermal-extrusion and electrospinning methods,” *Microsystem Technologies*, vol. 26, no. 6, pp. 1847–1861, Jun. 2020, doi: 10.1007/s00542-019-04730-7.
- [94] L. Moroni, R. Schotel, D. Hamann, J. R. de Wijn, and C. A. van Blitterswijk, “3D fiber-deposited electrospun integrated scaffolds enhance cartilage tissue formation,” *Advanced Functional Materials*, vol. 18, no. 1, pp. 53–60, Jan. 2008, doi: 10.1002/adfm.200601158.
- [95] W. Chen *et al.*, “3D printing electrospinning fiber-reinforced decellularized extracellular matrix for cartilage regeneration,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 382, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.cej.2019.122986.
- [96] A. B. R. Touré, E. Mele, and J. K. Christie, “Multi-layer Scaffolds of Poly(caprolactone), Poly(glycerol sebacate) and Bioactive Glasses Manufactured by Combined 3D Printing and Electrospinning”, doi: 10.3390/nano10040626.
- [97] G. H. Kim, J. G. Son, S. Park, and W. D. Kim, “Hybrid process for fabricating 3D hierarchical scaffolds combining rapid prototyping and electrospinning,” *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 29, no. 19, pp. 1577–1581, Oct. 2008, doi: 10.1002/marc.200800277.
- [98] D. Sooriyaarachchi, J. Wu, A. Feng, M. Islam, and G. Z. Tan, “Hybrid fabrication of biomimetic meniscus scaffold by 3D printing and parallel electrospinning,” 2019, vol. 34, pp. 528–534. doi: 10.1016/j.promfg.2019.06.216.
- [99] L. F. Mellor *et al.*, “Fabrication and Evaluation of Electrospun, 3D-Bioplotted, and Combination of Electrospun/3D-Bioplotted Scaffolds for Tissue Engineering Applications,” 2017, doi: 10.1155/2017/6956794.
- [100] D. Sooriyaarachchi, H. J. Minière, S. Maharubin, and G. Z. Tan, “Hybrid Additive Microfabrication Scaffold Incorporated with Highly Aligned Nanofibers for Musculoskeletal Tissues,” *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 16, no. 1, pp. 29–38, Feb. 2019, doi: 10.1007/s13770-018-0169-z.
- [101] G. Criscenti *et al.*, “Triphasic scaffolds for the regeneration of the bone-ligament interface,” *Biofabrication*, vol. 8, no. 1, Jan. 2016, doi: 10.1088/1758-5090/8/1/015009.

[102] N. W. Pensa *et al.*, “3D printed mesh reinforcements enhance the mechanical properties of electrospun scaffolds,” *Biomaterials Research*, vol. 23, no. 1, Nov. 2019, doi: 10.1186/s40824-019-0171-0.

7 RINGRAZIAMENTI

Alla fine di questo percorso innanzitutto trovo doveroso ringraziare il Professor Sensini per la sua disponibilità e il suo costante supporto durante tutta la stesura della tesi.

Ringrazio la mia famiglia che mi è sempre stata vicino, soprattutto nei momenti più difficili, supportando sempre le mie decisioni e stimolandomi a dare sempre il massimo. Devo molto a loro per i sacrifici che fanno e hanno fatto per me, spero che questo traguardo sia una soddisfazione anche per loro e possa ricambiare almeno in parte i loro sforzi.

Ringrazio i miei compagni di corso e tutte le persone che mi hanno accompagnato in questi tre anni condividendo con me tantissimi momenti che mi hanno permesso di scoprire tante cose nuove, di crescere e di divertirmi ma anche di superare i periodi più difficili. Non mi sarei mai aspettato di conoscere persone come voi a cui mi sarei affezionato così tanto, vi voglio bene!