

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

**ANALISI DELLO STATO DELL'ARTE  
SULL'UTILIZZO DI STIMOLAZIONE DINAMICA  
CON BIOREATTORI SU SCAFFOLD  
ELETTROFILATI PER LA RIGENERAZIONE DI  
TENDINI E LEGAMENTI**

**Elaborato in**

COMPORAMENTO MECCANICO DEI BIOMATERIALI E DELLE STRUTTURE  
BIOMECCANICHE

**Relatore**

Dott. Ing. Alberto Sensini

**Presentata da**

Camilla Dragoni

**Correlatori**

Prof. Luca Cristofolini  
Prof. Andrea Zucchelli

Anno Accademico 2021-2022

## **INDICE**

<i>Abstract (italiano)</i>	<i>pag.4</i>
<i>Abstract (inglese)</i>	<i>pag.5</i>
<b>CAPITOLO 1</b>	<i>pag.6</i>
<i>Introduzione</i>	<i>pag.6</i>
<i>1.0 Tessuto tendineo e legamentoso</i>	<i>pag.6</i>
<i>1.0.1 Composizione matrice extracellulare</i>	<i>pag.7</i>
<i>1.0.2 Componente cellulare</i>	<i>pag.9</i>
<i>1.0.3 Struttura gerarchica</i>	<i>pag.10</i>
<i>1.0.4 Proprietà meccaniche</i>	<i>pag.12</i>
<i>1.1 Lesioni del tessuto tendineo/legamentoso e     approccio chirurgico</i>	<i>pag.16</i>
<i>1.2 Scaffold</i>	<i>pag.17</i>
<i>1.2.1 Scaffold biologici</i>	<i>pag.19</i>
<i>1.2.2 Scaffold sintetici</i>	<i>pag.20</i>
<i>1.3 Elettrofilatura</i>	<i>pag.22</i>
<i>1.4 Bioreattori</i>	<i>pag.24</i>
<i>1.4.1 Stimolazione meccanica</i>	<i>pag.30</i>
<i>1.4.2 Perfusionione</i>	<i>pag.36</i>
<b>CAPITOLO 2</b>	<i>pag.39</i>
<i>2.0 Scopo della Tesi</i>	<i>pag.39</i>
<i>2.1 Metodo della ricerca scientifica</i>	<i>pag.39</i>
<i>2.2 Risultati e discussione</i>	<i>pag.40</i>
<i>2.3 Conclusioni e sviluppi futuri</i>	<i>pag.83</i>
<i>Ringraziamenti</i>	<i>pag.85</i>
<i>Riferimenti</i>	<i>pag.86</i>



## **ABSTRACT (Italiano)**

Ogni anno milioni di persone, tra anziani e giovani, subiscono lesioni al tessuto tendineo/legamentoso. L'ingegneria tissutale sta cercando metodi alternativi per migliorare e velocizzare la loro guarigione. Negli ultimi vent'anni nel campo dell'ingegneria tissutale la tecnica dell'elettrofilatura si è rivelata particolarmente utile nella produzione di scaffold composti da nanofibre polimeriche in grado di mimare le fibrille di collagene che compongono la matrice extracellulare di questi tessuti. Parallelamente, al fine di incrementare la proliferazione e la differenziazione cellulare sugli scaffold, l'utilizzo di bioreattori per colture dinamiche ha acquisito sempre maggiore importanza. Esistono molti tipi di bioreattore, il più comune è quello meccanico, il quale ha la capacità di imprimere deformazioni meccaniche allo scaffold, permettendo alle cellule coltivate al suo interno di orientarsi in maniera più efficiente lungo la direzione del carico applicato. Il seguente elaborato vuole mostrare come l'uso di colture dinamiche effettuate in scaffold elettrofilati attraverso dei bioreattori, può migliorare notevolmente la rigenerazione dei tessuti interessati. Dopo una puntuale descrizione delle proprietà e caratteristiche dei tendini, dei legamenti, delle varie tipologie di scaffold e dei bioreattori, la tesi si sofferma sull'analisi dello stato dell'arte dei lavori scientifici che hanno utilizzato stimolazione dinamica in bioreattore su scaffold elettrofilati per tendini e legamenti. Da queste si è osservato come l'uso di sistemi dinamici possa aumentare notevolmente la produzione di matrice extracellulare, le proprietà meccaniche dei costrutti, la proliferazione, la crescita e l'orientamento delle cellule, velocizzando e migliorando i processi di guarigione rispetto ad una coltura statica.

## **Abstract (English)**

Every year millions of people, including the elderly and young, suffer tendon/ligament tissue injuries. Tissue engineering is looking for alternative methods to improve and speed up their recovery. Over the past two decades, in the field of tissue engineering, electrospinning has proven being particularly useful in the production of scaffolds composed of polymeric nanofibers that can mimic the collagen fibrils that compose these tissues. Simultaneously, to increase cell proliferation and differentiation on scaffolds, the use of dynamic cultures in bioreactors has become increasingly important. There are many types of bioreactors, the most common is the mechanical one, which has the ability to impart mechanical deformations to the scaffold, allowing the cells cultured within it to orient themselves more efficiently along the direction of the applied load. The following thesis aims to show how the use of dynamic cultures carried out on electrospun scaffolds through bioreactors can greatly improve the regeneration of the tissues involved. After a description of the properties and characteristics of tendons, ligaments, various types of scaffolds and bioreactors, the thesis focuses on the analysis of scientific studies that have used a dynamic stimulation in bioreactor on electrospun scaffolds for tendons and ligaments regeneration. From this analysis, it was observed how the use of dynamic systems can greatly increase the extracellular matrix production, mechanical properties of constructs, proliferation, growth and orientation of cells, speeding up and improving healing processes compared with static culture.

# ***CAPITOLO 1***

## ***INTRODUZIONE***

### ***1.0 Tessuto tendineo e legamentoso***

La complessa composizione strutturale conferisce ai tendini ed ai legamenti un'elevata forza di trazione ed un'alta resistenza strutturale ai carichi a cui il nostro corpo è sottoposto costantemente e ciclicamente, evitando che le fibre si danneggino, in particolare, la divisione in fibrille assicura che danni minori non si diffondano all'intera struttura.

Analizzando separatamente tendini e legamenti, è possibile ricavare diverse peculiarità e proprietà che li caratterizzano.

Il tendine è un cordone flessibile ma anelastico che collega il muscolo al rispettivo osso attraverso un'inserzione prossimale, chiamata "giunzione miotendinea" e una distale, che prende invece il nome di "giunzione osteotendinea". Il suo compito è quello di trasmettere le forze generate dal muscolo all'osso, per permettere il movimento articolare; inoltre, riesce a resistere ad elevate forze di trazione e di compressione e agisce come un tessuto smorzante per assorbire gli urti e limitare potenziali danni ai muscoli [1]. Considerando ad esempio il tendine di Achille, esso è il tendine più grande e forte presente nel corpo e può sostenere dei carichi con un valore pari a 17 volte il peso corporeo totale. La complessa struttura istologica del tendine smorza l'effetto delle contrazioni muscolari brusche e contribuisce al movimento fluido del corpo. Il tendine viene impiegato, nella sua estremità inferiore, per immagazzinare energia cinetica; si pensa infatti che il 20-40% dell'energia cinetica totale sia immagazzinata nel tessuto connettivo. Sia la struttura macroscopica che la composizione istologica del tendine presentano tratti caratteristici corrispondenti alle diverse esigenze funzionali dei singoli muscoli. In condizioni sane, la superficie dei tendini è bianca brillante e lucente [2].

Il legamento, invece, è un tessuto connettivo che collega “passivamente” due punti ossei mobili, per stabilizzare e supportare le articolazioni. Esso è formato da bande di fibre di collagene che si attaccano alle due estremità dell’articolazione in considerazione, guidandola a compiere il corretto movimento e cercando di mantenerla sempre in asse, quando viene applicato un carico. A livello microscopico, il legamento è formato da più strati di tessuto connettivo [3,4]. I fasci di fibre di collagene, in questo caso, presentano una disposizione più complessa, inoltre la quantità di collagene di tipo III risulta significativamente aumentata rispetto ai tendini [2].

*Tabella 1* Componente cellulare e composizione matrice extracellulare di tendini e legamenti (adattato da [3]):

<b><i>Contenuto</i></b>	<b><i>Tendine</i></b>	<b><i>Legamento</i></b>
Componente cellulare	Tenoblasti e tenociti	Fibroblasto
Sostanza fondamentale	< 20-30%	20-30%
Collagene	> 70-80%	70-80%
Collagene di tipo I	95-99%	90%
Collagene di tipo III	1-5%	10%
Elastina	<< 2 x collagene	Fino a 2 x collagene
Acqua	60-80%	60-80%

### ***1.0.1 Composizione matrice extracellulare***

Come tutti i tessuti connettivi, il tendine ed il legamento hanno una complessa rete di cellule circondate da matrice extracellulare (ECM). La matrice extracellulare è una componente fondamentale poiché consente ai tessuti di mantenere una corretta funzione meccanica e biologica, mantenendo il microambiente ottimale per la crescita delle cellule [5]. Il 70% dell’ECM è formata da acqua (in parte legata alla presenza di proteoglicani [4]), questa è importante per la modulazione delle funzioni cellulari e per il comportamento

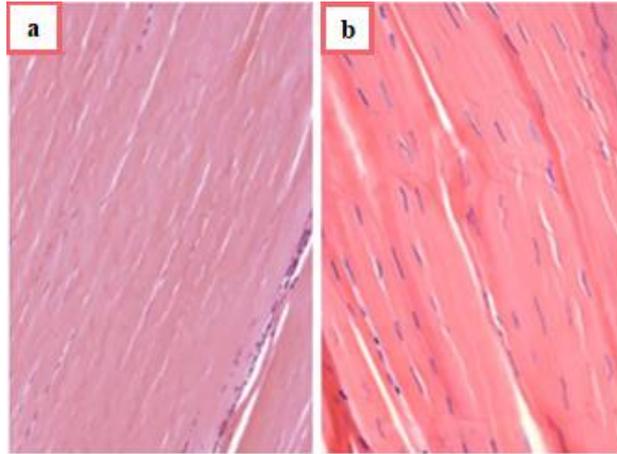
viscoelastico della struttura. Il restante 30% dell'ECM, invece, è composto da materiali solidi come il collagene e la "sostanza fondamentale". Quest'ultima è una componente non fibrosa costituita soprattutto da ialuronano, glicoproteine e proteoglicani ed ha il compito di modulare il metabolismo dei tessuti, implementare l'assorbimento di urti, diminuire l'attrito interno ed infine, può anche legarsi all'acqua, la quale svolge un ruolo di lubrificazione e distanziamento. Del peso secco del tendine, il 70-80% è collagene; esso è prevalentemente di tipo I (il 60-85%) organizzato in fibre che conferiscono rigidità e forza al tessuto. In aggiunta a questo, sono presenti altri tipi di collagene in quantità minori come quello di tipo III (0-10%) funzionalizzato nella riparazione dei tendini, di tipo V regolatore del diametro delle fibre di collagene, di tipo X, XI, XII che lega la superficie delle fibrille a componenti della matrice come la decorina e la fibromodulina e XIV; inoltre, sono presenti una piccola quantità di fibre di elastina (il 2% del peso secco totale) ed una limitata dose di sostanza inorganica (0,2%). Infine, la sostanza rimanente è composta da molteplici proteine (4,5%) di cui però, non siamo interamente a conoscenza della loro funzione [6,7].

Vi sono molti geni e proteine importanti contenuti all'interno dei tessuti connettivi. La proteina scleraxis è un membro della superfamiglia dei fattori di trascrizione di base helix-loop-helix (bHLH); attualmente sono stati identificati due geni (SCXA e SCXB) per codificare queste proteine. Le cellule progenitrici che esprimono la scleraxis portano alla formazione di tessuto tendineo e altri attaccamenti muscolari. La proteina RUNX2 è un fattore di trascrizione che si lega a specifiche regioni del DNA e aiuta a controllare l'attività di particolari geni. Il gene RUNX2 fornisce istruzioni per produrre una proteina coinvolta nello sviluppo e nel mantenimento dei denti, delle ossa e della cartilagine. Il recettore EPHA4 (recettore 4 dell'efrina di tipo A) è una proteina che nell'uomo è codificata dal gene EPHA4, quest'ultimo appartiene alla sottofamiglia del recettore dell'efrina. I recettori EPH e EPH-correlati sono stati implicati nella mediazione degli eventi dello sviluppo, in particolare nel sistema nervoso. Con l'acronimo NANOG viene identificato un fattore di trascrizione coinvolto

nell'autorinnovamento delle cellule indifferenziate staminali embrionali; nell'uomo questa proteina è codificata dal gene Nanog. Altri due fattori trascrizionali chiave sono Oct-3/4, il cui livello di espressione governa il destino della massa cellulare interna primitiva e delle cellule staminali embrionali, e SOX2, importante per mantenere l'autorinnovamento o pluripotenza delle cellule staminali embrionali indifferenziate. Entrambi sono molto promettenti nella ricerca che coinvolge la pluripotenza indotta, un campo emergente della medicina rigenerativa. Oct-3/4 e Sox2 comprendono un complesso regolatorio che controlla l'espressione di geni importanti per il mantenimento dello stato primitivo, compresi se stessi [8].

### ***1.0.2 Componente cellulare***

A livello cellulare, i tendini ed i legamenti sono strutture filamentose di collagene principalmente costituiti per il 20% del loro volume totale da fibroblasti e tenociti (cellule disposte in file tra le fibre di collagene [7]) e per l'80% da matrice extracellulare (ECM). Le componenti cellulari all'interno dei tendini e dei legamenti svolgono un ruolo importante per il mantenimento dell'omeostasi, del microambiente e sono anche coinvolte nel processo di guarigione dopo una lesione o una rottura del tessuto. Nel tendine, il 90-95% dei componenti cellulari è principalmente costituito da tenoblasti e tenociti, mentre le cellule rimanenti sono rappresentate da condrociti, cellule sinoviali e cellule vascolari. Il tenoblasto è una cellula di forma rotonda ed è il costituente cellulare primario nei tendini durante la giovane età, con l'invecchiamento dei tessuti, il tenoblasto matura fino a tenocita allungato. Nel legamento, le cellule sono costituite da fibroblasti che però rappresentano solo una piccola percentuale del volume totale del tessuto. Sia i tenociti che i fibroblasti sono coinvolti nella sintesi della matrice extracellulare e possiedono un basso tasso metabolico. Grazie a queste caratteristiche, i tendini e i legamenti sono in grado di sopportare carichi e mantenere a lungo la tensione [3].



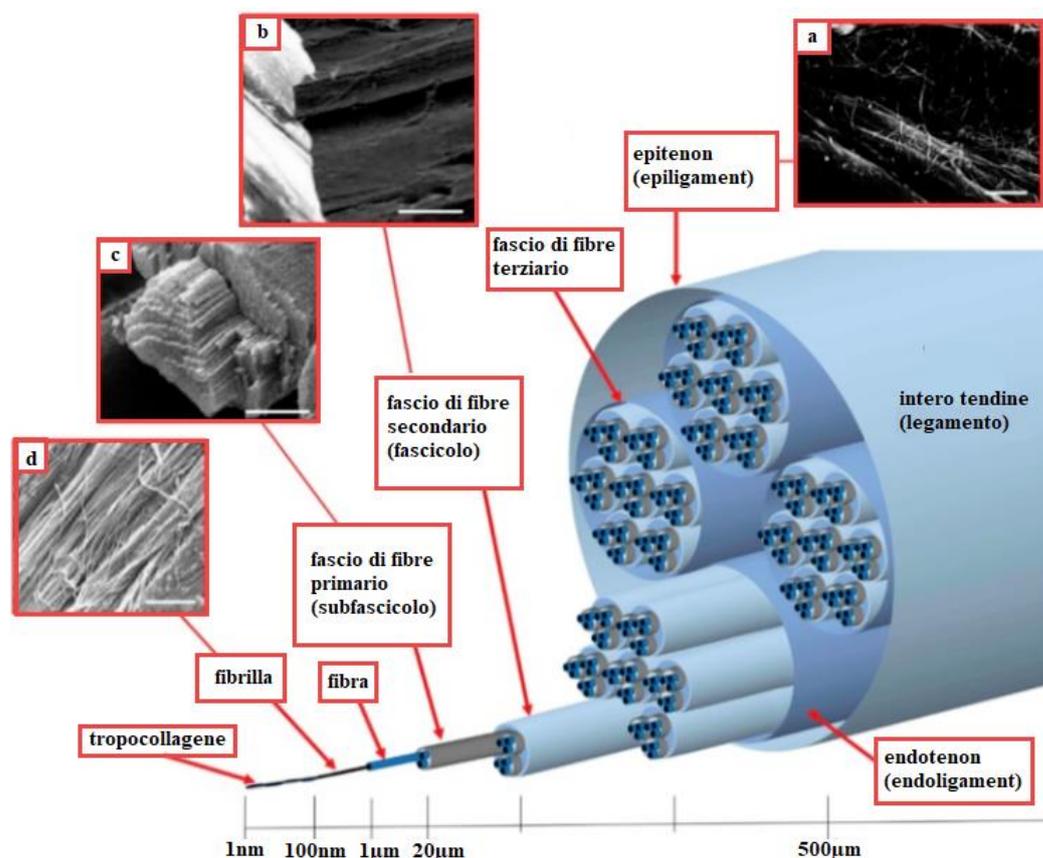
*Fig.1 Istologia del tendine (a) e del legamento (b). Le fibre di collagene sono altamente allineate. In questo caso il collagene rappresenta il 65-80% della massa secca, mentre l'elastina solo l'1-2% (adattato da [3]).*

### **1.0.3 Struttura gerarchica**

Il sistema muscolo-scheletrico svolge un ruolo fondamentale per la vita quotidiana dell'uomo e non solo, esso è composto da ossa, cartilagini, muscoli, tendini e legamenti che insieme partecipano al supporto strutturale, alla protezione e stabilizzazione del corpo e all'adempimento di movimenti più o meno complessi. I tendini ed i legamenti dell'apparato hanno una morfologia molto complessa a causa di specifici schemi di carico, che differiscono significativamente nelle singole articolazioni [2]. Nonostante le loro diverse funzioni fisiologiche e le differenti morfologie (dipendenti anche dalla sede anatomica in cui si trovano), essi hanno composizione e struttura gerarchica molto simili [7].

I tendini e i legamenti sono composti da un'articolata struttura gerarchica di fasci di tessuto connettivo (collagene) ipovascolari ed ipocellulari, allineati assialmente tra di loro. A livello strutturale, l'unità base dei tendini e dei legamenti è la molecola di tropocollagene (diametro 1nm e lunghezza 300nm), una proteina lunga e sottile composta da catene polipeptidiche di uguale

dimensione, prodotta all'interno di una cellula (ad esempio il fibroblasta) e secreta nella matrice extracellulare. A loro volta, le molecole di tropocollagene si aggregano progressivamente in fibrille (con un diametro di circa 100nm), fibre (con un diametro di circa 1 $\mu$ m), fibre primarie o subfascicoli (con un diametro di circa 45 $\mu$ m), fibre secondarie o fascicoli (con un diametro di circa 100  $\mu$ m) e fascicoli terziari.



*Fig.2 Rappresentazione schematica della struttura gerarchica di tendini e legamenti. La struttura è composta da molecole di tropocollagene che si aggregano gradualmente in fibrille, fibre, fasci di fibre primari, fasci di fibre secondari e fasci di fibre terziari. Endotenon o endoligament ed epitenon o epiligament sono le membrane che rivestono gradualmente la struttura. In alto sono presenti delle immagini a microscopio elettronico a scansione (SEM) raffiguranti le componenti strutturali dei tendini e dei legamenti (adattato da [7]).*

I valori dei diametri e delle lunghezze variano a seconda della specie, dell'età e della posizione anatomica. Le fibrille di collagene si dispongono tutte in maniera prevalentemente allineata secondo l'asse del tendine o del legamento che viene preso in esame; nel caso delle membrane, invece, queste assumono una disposizione randomica. Le fibre di collagene, in caso di rilassamento, hanno una disposizione e forma leggermente ondulata. Le strutture, dalle fibre ai fasci di tipo terziario, sono circondate da sottili strati di fibrille di collagene che fungono da membrane chiamate endotenon o endoligament, esse contengono al loro interno vasi sanguigni, vasi linfatici e nervi. Infine, i fascicoli terziari vengono a loro volta rivestiti da un'ulteriore membrana detta epitenon o epiligament, che permette un miglior scorrimento del tessuto lungo le strutture contigue [2,4,7].

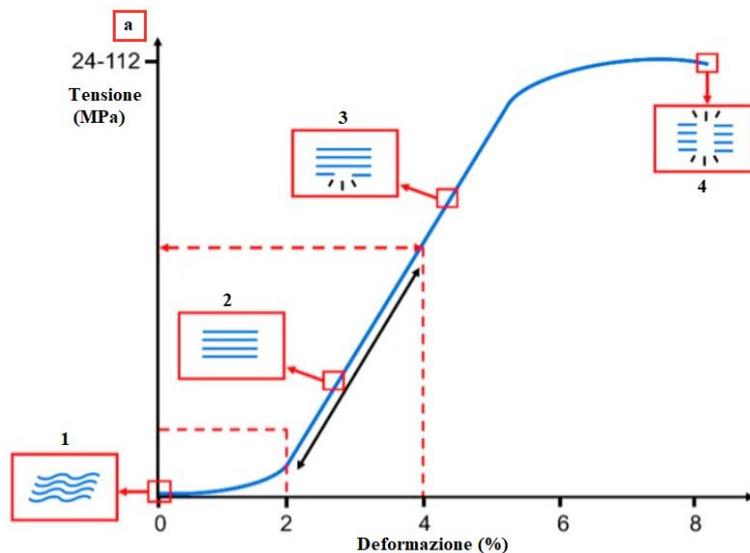
#### ***1.0.4 Proprietà meccaniche***

Un tendine è parte di un'unità più complessa, composta anche dalla muscolatura associata. Infatti, il rilascio di neurotrasmettitori e fattori di crescita e la comunicazione cellulare tra i tenociti da parte delle giunzioni avviano una cascata di trascrizioni e alterazioni metaboliche che portano ad una maggiore attività di enzimi sintetici e degradanti per garantire un adattamento funzionale ottimale del tessuto extracellulare, quindi un adattamento allo stress meccanico. Questi influenzano il metabolismo delle cellule e quindi la sintesi della matrice extracellulare. La varietà di forma, lunghezza, composizione e comportamento metabolico dei tendini e dei legamenti dipende sia dalla funzione che dai processi di maturazione ed invecchiamento cellulare del tessuto connettivo [2].

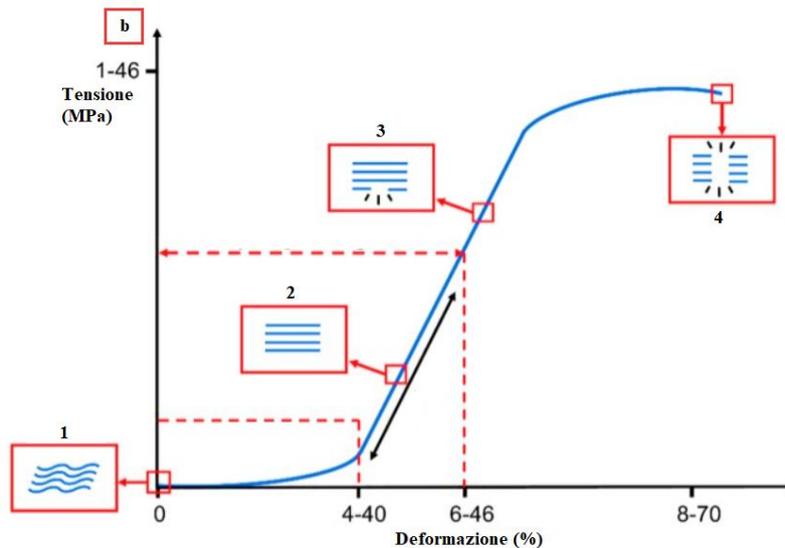
I tendini ed i legamenti hanno entrambi un comportamento meccanico non lineare che si intensifica all'aumentare dei carichi applicati. Il comportamento di questi è sia elastico che viscoso, perciò viene detto comportamento viscoelastico, dipendente dal tempo. Il comportamento viscoelastico è dovuto alla presenza di acqua e alla natura dei deboli legami del collagene ed ha lo

scopo di aiutare e proteggere le articolazioni ed il loro funzionamento, aumentando la forza di tendini e legamenti per resistere alle forze di impatto e assorbendo parte dell'energia nei carichi dinamici. Le proprietà meccaniche, tra cui la forza dei tendini e legamenti, sono determinate dalla dimensione della sezione trasversale del tessuto e dalla velocità di deformazione con cui viene applicato un carico. Infatti, ad esempio, all'aumentare della velocità di caricamento aumenterà la resistenza e la rigidità. Attraverso esperimenti di trazione e compressione svolti in laboratorio su provette di vari materiali, si sono potute ricavare le curve di tensione ( $\sigma$ )-deformazione ( $\epsilon$ ) (figura 3). Il comportamento meccanico di questi tessuti è fortemente non lineare e dipende dallo stato di sollecitazione delle fibrille di collagene. Per questo motivo le curve tensione/deformazione di tendini e legamenti possono essere suddivise in tre regioni. La prima regione la si riscontra partendo dalla sinistra del grafico, dove le fibre di collagene dei tendini e dei legamenti non sollecitate assumono una forma sinusoidale e forniscono una minima resistenza al movimento. Quando viene applicato un carico, le fibre di collagene iniziano ad allinearsi tra loro fino a raggiungere una piccola deformazione. Questa regione viene chiamata "piede della curva". Nei tendini, a causa della funzione di trasferimento del carico applicato, il piede della curva del diagramma di tensione-deformazione è relativamente breve (2-5%) ed è pressoché simile in tutti i tendini del corpo umano. Diversamente, siccome i legamenti devono consentire svariati movimenti a seconda dell'articolazione in cui si trovano, questi presentano delle maggiori sollecitazioni iniziali e quindi un piede della curva più ampio (4% nel caso del legamento crociato anteriore; 10-40% nel caso dei legamenti della colonna vertebrale). All'aumentare del carico applicato, la rigidità di tendini e legamenti aumenta e quindi sarà necessaria una forza maggiore per produrre un incremento di deformazione. All'aumentare della deformazione, si può osservare un corrispettivo aumento della pendenza della retta in maniera lineare: "regione lineare"; qui le fibre di collagene si riallineano e, se il carico venisse rimosso, potrebbero fornire un recupero elastico quasi ideale. Infine, aumentando ancora la deformazione, le fibre iniziano

progressivamente a scorrere l'una sull'altra danneggiandosi, fino a raggiungere il completo cedimento irreversibile dei tendini e dei legamenti, tale per cui non è più possibile tornare alla lunghezza originaria  $L_{iniziale}$  delle fibre. Questa terza ed ultima regione viene chiamata “regione di cedimento” [4,7]. Maggiore è la velocità di carico e maggiore sarà la pendenza della regione lineare della curva tensione-deformazione, ciò implica quindi un aumento di rigidità e un più elevato valore del carico tissutale prima di raggiungere la tensione di rottura. L'intervallo delle sollecitazioni di cedimento è variabile. Nei tendini, ad esempio, varia da 24-69 MPa della rotula ai 112 MPa del gracile; mentre nei legamenti varia da 1-15 MPa del flavo ai 24-46 MPa del laterale [7]. Generalmente, il range di deformazione fisiologico al quale lavora un tendine è circa del 4%, mentre per il legamento, il range di deformazione può essere leggermente superiore, tra il 4%-5% poiché quest'ultimi, avendo di solito un piede della curva più esteso, si deformano maggiormente [9].



*Fig.3a L'immagine raffigura la tipica curva tensione( $\sigma$ )-deformazione( $\epsilon$ ) che schematizza il comportamento delle fibre di collagene nei tendini (adattato da [7]).*

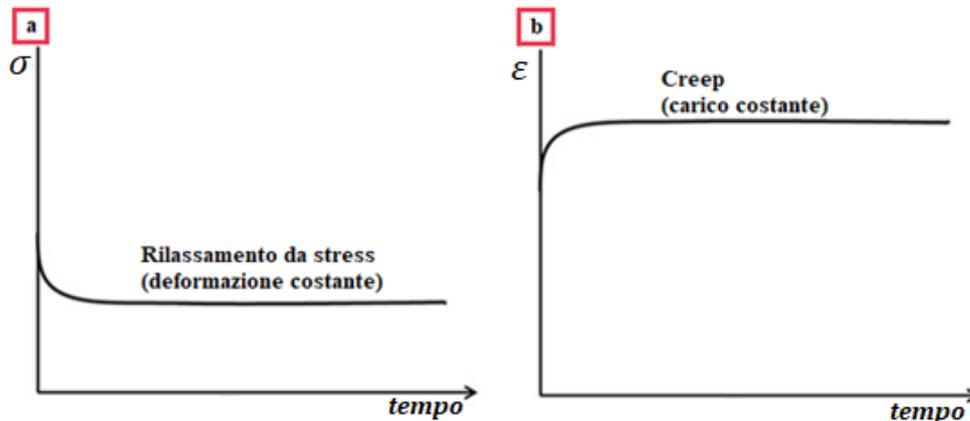


*Fig.3b L'immagine raffigura la tipica curva tensione( $\sigma$ )-deformazione( $\varepsilon$ ) che schematizza il comportamento delle fibre di collagene nei legamenti. Le curve 3a e 3b sono suddivise in tre regioni, quali il "piede della curva" (nella parte iniziale del grafico), la "regione lineare" (nella parte centrale) e la "regione di cedimento" (nella parte finale). È possibile osservare come il piede della curva dei legamenti sia molto più ampio rispetto a quello dei tendini. Vi sono inoltre dei riquadri numerati che sintetizzano le conformazioni delle fibre durante una progressiva deformazione: fibre non allineate (1), fibre allineate (2), fibre con danneggiamenti microscopici (3) e fibre con danneggiamenti macroscopici che portano al cedimento finale del tessuto (4) (adattato da [7]).*

Nonostante non ci siano differenze strutturali e di sezione trasversale, il tendine dell'uomo ha un diametro maggiore rispetto a quello della donna, per cui la forza risultante sarà più elevata [2].

Fino ad un allungamento di circa il 4%, il tessuto tendineo presenta proprietà di viscoelasticità, per cui dopo l'applicazione della forza, viene ripristinata la morfologia originaria. I comportamenti viscoelastici possono essere quantificati tramite test di creep e di rilassamento. Se la lunghezza delle fibre (deformazione) viene mantenuta costante per un certo periodo di tempo, si mostra un rilassamento cioè la tensione (o stress) diminuisce significativamente

nel tempo, ciò è possibile poiché la miscela viscosa formata da proteoglicani ed acqua viene gradualmente spostata dalle molecole di collagene tese. Questo effetto viene chiamato “rilassamento da stress”. Per lo stesso principio è possibile ottenere il “fenomeno di scorrimento” o “creep”, in questo caso la deformazione aumenta nel tempo sotto una forza di trazione costante [2,4].



*Fig.4 Le curve descrivono il comportamento viscoelastico di tendini e legamenti in funzione del tempo: “rilassamento da stress” con deformazione costante (figura a) e “creep” con carico costante (figura b) (adattato da [4]).*

### ***1.1 Lesioni del tessuto tendineo/legamentoso e approccio chirurgico***

I tendini ed i legamenti sono essenziali per il normale movimento del corpo, partecipandovi attivamente, per questo motivo, sono spesso soggetti a lesioni o rotture. Quest’ultime rappresentano ogni anno il 30% di tutte le consultazioni muscolo-scheletriche con 4 milioni di nuove incidenze in tutto il mondo [3]. Negli Stati Uniti, ad esempio, annualmente circa il 45% delle 32,8 milioni di lesioni muscolo-scheletriche coinvolge tendini e legamenti [10]. Per quanto riguarda le lesioni dell’entesi, invece, si stima che colpiscano oltre il 70% delle persone nella fascia di età compresa tra i 55 e i 78 anni, provocando gravi

disabilità e, in alcuni casi, anche artrosi [11]. I disturbi e le lesioni sono molto comuni tra sportivi (circa 2 milioni di infortuni legati al tendine d'Achille ogni anno nel mondo [11]), tra la popolazione di mezza età e tra quella più anziana. In quest'ultimo caso, il basso numero di cellule e il limitato afflusso di sangue riducono la capacità riparativa e rigenerativa dei tessuti, rallentando e peggiorando notevolmente il processo di guarigione. Le conseguenze dei processi degenerativi dei tessuti tendinei e legamentosi possono essere molto gravi, portando anche a disabilità motorie. Risulta quindi molto importante una corretta guarigione. Nelle lesioni meno gravi, il processo di guarigione avviene in maniera naturale senza causare conseguenze permanenti [11]. A mano a mano che aumenta la gravità del danneggiamento, la formazione di cicatrici potrebbe compromettere la biomeccanica articolare e apportare caratteri debilitanti [9,10]. In questo caso si può approcciare in maniera conservativa, ripristinando la forza muscolare e il suo range di movimento. Nei casi peggiori, invece, quando si ha la rottura totale del tendine o del legamento, si usa un approccio chirurgico come le suture sul tessuto oppure l'utilizzo di scaffold biologici o sintetici, a seconda dell'età del paziente, del sito di rottura e del range effettivo di movimento [11].

## ***1.2 Scaffold***

Ogni giorno, numerosi studi cercano di trovare tecniche e materiali sempre più affini a rinforzare o sostituire i tessuti danneggiati [12].

Gli scaffold (o "impalcature") sono quegli elementi che, grazie alle loro proprietà che possono essere adattate alle circostanze per garantire la vascolarizzazione, l'ossigenazione, l'apporto di nutrienti e lo scambio di rifiuti, possono fornire stabilità strutturale e biomeccanica fino a quando i tessuti nativi del corpo non riassumono la loro naturale funzione [13].

Le principali proprietà che uno scaffold deve possedere per sostituire al meglio un tessuto connettivo lesionato sono [7]:

- **Biocompatibilità:** gli scaffold devono essere biocompatibili e realizzati con materiali naturali o sintetici. Ciò aiuta le cellule a proliferare all'interno riproducendo il collagene e riduce notevolmente la probabilità di infiammazione che potrebbe compromettere il processo rigenerativo. Il vantaggio degli scaffold sintetici è la capacità di controllarne le proprietà, mentre quelli naturali sono più efficienti nel favorire l'adesione cellulare [14].
- **Biodegradabilità:** gli scaffold devono essere degradati progressivamente dalle cellule e dai fluidi corporei, senza produrre effetti infiammatori o tossici sui tessuti circostanti [7].
- **Proprietà meccaniche:** gli scaffold devono essere progettati per fornire le proprietà meccaniche nel segmento del tendine o del legamento specifico. Per prevenire gravi danni ai tessuti circostanti specifici (come, ad esempio, la necrosi dei tessuti), le nuove strutture devono essere meno performanti rispetto al tessuto nativo, devono inoltre possedere un certo grado di duttilità per evitare un cedimento improvviso in caso di sovraccarico [7].
- **Morfologia:** gli scaffold devono essere progettati con la stessa tipologia di struttura gerarchica del tessuto tendineo/legamentoso, in modo da consentire una corretta riproduzione di collagene nella direzione delle fibre [7].
- **Porosità:** gli scaffold devono essere porosi per consentire l'infiltrazione e la proliferazione delle cellule. I materiali con elevata porosità consentono il rilascio di biofattori come proteine e geni, fornendo così dei buoni substrati per lo scambio di nutrienti tra le cellule [7].

Numerosi studi continuano a produrre e scoprire nuovi possibili biomateriali e nuove tecniche per fabbricarli e, al contempo, ricercano il tipo di cellula che meglio si adatta allo scaffold a seconda della specifica situazione. Le cellule più utilizzate sono, ad esempio, le staminali del midollo osseo o del sangue periferico e le staminali derivanti da tessuti di origine adulta o fetale [13]. Per promuovere la biocompatibilità, i biomateriali utilizzati per la produzione di scaffold tendinei e legamentosi sono molteplici [15].

*Tabella 2* Qui sotto sono stati riportati alcuni dei possibili biomateriali di cui si fa uso al giorno d'oggi (adattato da [7,11,16]):

<i>Acronimo</i>	<i>Nome esteso</i>	<i>Applicazioni</i>	<i>Riferimenti</i>
PLLA	Acido poli-L-lattico	Tendine Legamento Tendine-osso Tendine-muscolo	[17]
PLGA	Acido poli-lattico-co-glicolico	Tendine Legamento Tendine-osso Legamento-osso	[18]
PCL	Poli- $\epsilon$ -caprolattone	Tendine-osso Legamento-osso Tendine-muscolo	[19]
SF	Fibroina della seta	Tendine	[20]
PUR	Poliuretano	Legamento-osso	[21]
HA	Acido ialuronico	Tendine-osso	[22]
Col	Collagene	Tendine Tendine-osso	[23]
CS	Citosina	Tendine-osso	[24]
PD	Polidopamina	Tendine-osso	[25]

### ***1.2.1 Scaffold biologici***

Tra le procedure fino ad oggi più utilizzate per la riparazione dei tessuti danneggiati vi sono la chirurgia di sutura, l'utilizzo di protesi sintetiche, l'autoinnesto o autotrapianto (autograft), l'alloinnesto o allotrapianto (allograft) e lo xenoinnesto o xenotrapianto (xenograft). Gli autoinnesti, cioè innesti in cui il donatore e il ricevente sono la stessa persona, vengono molto utilizzati per la ricostruzione di tendini e legamenti lesionati. Il tessuto autologo è dotato di una buona compatibilità e capacità di rivascularizzare e rimodellare l'ambiente ospitante e il tessuto una volta trapiantato, limitando notevolmente la probabilità di rigetto. Il principale svantaggio dell'autotrapianto è la morbidità del sito donatore. Gli alloinnesti e gli xenoinnesti, invece, sono procedure in cui il donatore e il ricevente non sono lo stesso individuo, nel primo caso si hanno

individui diversi ma della stessa specie, mentre, nel secondo caso, sono presenti individui di specie differenti (i donatori possono essere ad esempio bovini o porcini). L'allograft e lo xenograft sono limitati dalla disponibilità di tessuto, dal potenziale rischio di rigetto immunitario e dall'elevata probabilità di trasmissione di agenti patogeni. Gli autograft, utilizzando del tessuto prelevato dal paziente stesso, non necessitano sterilizzazione e decellularizzazione; al contrario, gli allograft e xenograft, prima del loro uso, devono essere decellularizzati e sterilizzati per evitare di produrre infezioni e rigetto, ciò causa un conseguente impoverimento delle proprietà meccaniche dei dispositivi e quindi una minor prestazione da parte dei tessuti riparati. Nel complesso, la metodologia di riparo tissutale basata sugli innesti soffre di numerose carenze, come la rottura precoce, la perdita di resistenza meccanica nel tempo, l'insufficiente crescita interna di nuovi tessuti e il deposito di detriti nell'innesto. Ciò ha spinto quindi alla ricerca di nuove soluzioni. Le strategie di ingegneria tissutale offrono potenziali alternative per migliorare la riparazione di tendini e legamenti lesionati attraverso l'utilizzo di scaffold sintetici, fattori di crescita, coltura cellulare o combinazione di questi diversi approcci [3,12,15].

### ***1.2.2 Scaffold sintetici***

Negli ultimi anni, il tema della rigenerazione tissutale sta prendendo sempre più campo nella ricerca ortopedica. Il concetto di ingegneria tissutale è quello di produrre un sostituto tissutale di maggiore sicurezza ed efficacia nella riparazione e nella rigenerazione dei tessuti in un ambiente biologico. L'ingegneria tissutale offre la possibilità di rigenerare strutture danneggiate senza la necessità di utilizzare impianti permanenti. Uno degli approcci utilizzati è la fabbricazione di scaffold ingegnerizzati che forniscono un ambiente fisico che modula la riparazione e la rigenerazione dei tessuti danneggiati [3]. Le dimensioni dello scaffold sono fondamentali in quanto promuovono la vicinanza tra cellule, migliorando l'autoassemblaggio e la funzione complessiva del tessuto [14]. Grazie all'utilizzo di queste strutture, le

cellule guida possono proliferare e ricreare i tessuti di interesse in direzioni specifiche; ciò è fondamentale per la rigenerazione delle fibre anisotrope di collagene dei tessuti tendinei e legamentosi. Lo scaffold permette di ottenere un miglioramento delle proprietà meccaniche, della velocità e della qualità della guarigione del tessuto danneggiato, per questo motivo è una delle strategie dell'ingegneria tissutale più studiata e analizzata oggi. La progettazione e l'idealizzazione di uno scaffold per la rigenerazione dei tessuti, però, non è così semplice poiché, considerando le articolate strutture e le caratteristiche biomeccaniche di tendini e legamenti, è necessario tenere conto e rispettare alcune proprietà e requisiti generali, affinché possano essere indotte risposte specifiche dalle cellule locali e si possa ricreare la funzionalità del tessuto nativo [7,15]. È fondamentale che nella produzione di scaffold vengano tenute in considerazione la specifica macro-architettura e microstruttura, la macro e microporosità e le proprietà meccaniche, affinché la rigenerazione dei tessuti possa avvenire nel modo più ottimale possibile. Per raggiungere questi obiettivi, scienziati e ingegneri utilizzano la "Bio-fabbricazione additiva", cioè un processo di produzione automatizzato che costruisce l'oggetto desiderato strato per strato, partendo dall'analisi computerizzata e dalla rappresentazione virtuale tridimensionale di quest'ultimo. Attualmente esiste un gran numero di tecnologie di stampa 3D utilizzate per la produzione di scaffold come, ad esempio, la "stereolitografia", la "sinterizzazione laser selettiva", la "stampa cellulare" e la "elettrofilatura" [13]. La produzione di scaffold con caratteristiche microstrutturali 3D regolabili permette di raggiungere livelli significativamente più elevati di permeabilità cellulare [15].

### ***1.3 Elettrofilatura***

L'elettrofilatura è una tecnica molto promettente per la rigenerazione e la sostituzione dei tessuti tendinei e legamentosi poiché è adatta a riprodurre sia delle fibre nanometriche con una morfologia simile alle fibrille di collagene, sia degli scaffold con le giuste proprietà biomeccaniche.

La tecnologia di elettrofilatura è un metodo che produce fibre di diametro nanometrico o micrometrico (compreso tra 100nm a pochi micrometri [12]), imitando la matrice extracellulare. Attraverso la forza prodotta da un campo elettrostatico, questo processo porta alla formazione delle nanofibre attraverso uno stiramento uniassiale di una soluzione polimerica. Gli elementi necessari per questa procedura sono: una siringa provvista di un ago metallico carica di una soluzione polimerica; una pompa a siringa che ha il compito di estrarre piccole quantità di soluzione; un alimentatore ad alta tensione e un collettore (di solito a potenziale di terra). La soluzione può essere composta da polimeri di vario genere disciolti in dei solventi volatili, tali da renderla molto fluida e più facilmente utilizzabile nell'intero processo. La soluzione viene estrusa in maniera controllata fuori dalla punta dell'ago, formando una gocciolina sferica. La punta metallica dell'ago è collegata ad un alimentatore di alta tensione, la superficie della gocciolina di soluzione viene ricoperta da cariche dello stesso segno che stirano la goccia di soluzione in direzione del collettore di terra. Quando la carica superficiale risulta superiore alla tensione superficiale della goccia, questa assume una forma conica e dalla sua punta viene a prodursi una fibra continua, tale forma conica prende il nome di "cono di Taylor". La fibra prodotta vola, immersa nel campo elettrostatico, fino a depositarsi sulla superficie del collettore. Durante la fase di volo però la fibra, caricata di cariche elettriche tutte del medesimo segno, assume un moto vorticoso (detto wipping), sotto l'effetto della repulsione delle cariche. Questo moto favorisce l'evaporazione del solvente e l'assottigliamento della fibra stessa prima del suo arrivo sul collettore.

È molto importante la scelta dei materiali da utilizzare nella produzione di scaffold attraverso la tecnica dell'elettrofilatura. È possibile far uso di polimeri biodegradabili naturali o sintetici che possono essere a loro volta arricchiti anche con nanoparticelle, farmaci o fattori di crescita [7]

Le tipologie di parametri che influenzano la produzione di fibre nella tecnica della elettrofilatura sono [7]:

- Parametri della soluzione: polimeri e solventi, viscosità, conducibilità di solventi e polimeri, concentrazione dei polimeri.
- Parametri di elettrofilatura: portata della pompa, diametro e forma dell'ago, tensione applicata, distanza tra ago e collettore, forma e movimento del collettore.
- Parametri ambientali: temperatura e umidità relativa.

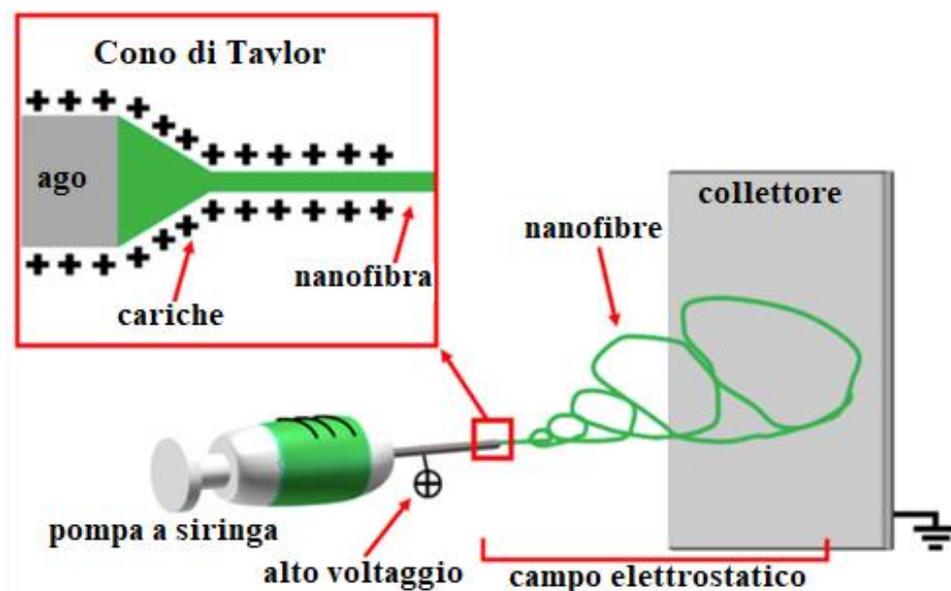
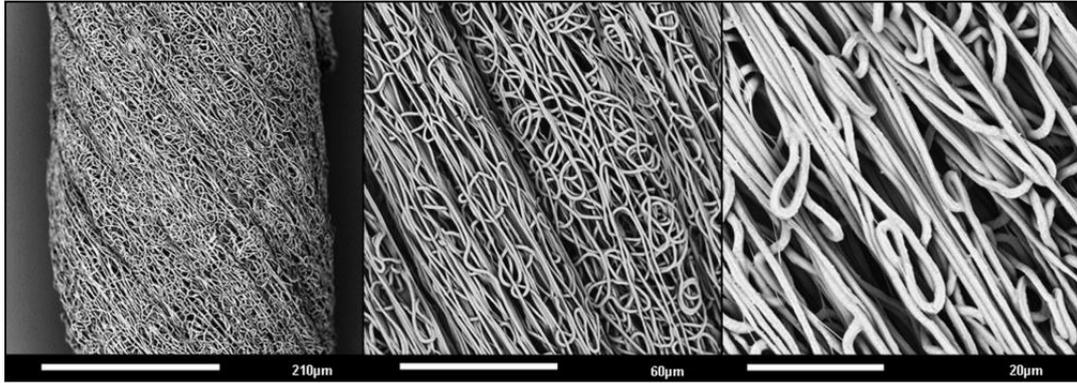


Fig.5 L'immagine schematizza il principio di funzionamento dell'elettrofilatura: dall'estrusione della soluzione polimerica dalla punta della siringa metallica caricata ad alto voltaggio, alla formazione del cono di Taylor, fino alla creazione delle nanofibre nella direzione del collettore (adattato da [7]).



*Fig.6 Immagini ottenute attraverso microscopio elettronico a scansione che mostrano la struttura e la topografia superficiale di un filato prodotto mediante la tecnica dell'elettrofilatura (adattato da [26]).*

#### **1.4 Bioreattori**

Un bioreattore è definito come un “recipiente” contenente cellule, altri organismi e/o sostanze bioattive in un ambiente controllato, dove la temperatura, i nutrienti, i rifiuti, il pH, le sollecitazioni meccaniche e la portata sono minuziosamente monitorati per ottenere delle ampie varietà di processi biotecnologici. Vi sono numerosi e differenti progetti di bioreattori per soddisfare i requisiti specifici di vari campi di ricerca [27].

Grazie all'utilizzo di bioreattori è possibile ottenere una maggior produzione e orientamento della matrice extracellulare che consentono di preservare le proprietà biomeccaniche degli scaffold, permettendo di avere una migliore distribuzione di nutrienti e una più efficace rimozione delle sostanze di scarto. Le cellule coltivate in situazioni di dinamicità, inoltre, presentano un maggior allungamento lungo l'asse delle fibre di collagene. Di contro però, questo continuo movimento e stress da parte delle cellule, può portare ad un loro danneggiamento. Per questo motivo, i carichi ciclici che vengono applicati sono spesso intervallati da periodi di stasi per permettere alle cellule di recuperare più facilmente [28]. Altri vantaggi apportati dall'uso dei bioreattori sono stati

l'aumento della produzione di matrice extracellulare e il miglioramento della formazione e della forza delle fibre di collagene nei tendini e nei legamenti [29]. La coltivazione di microrganismi nei bioreattori è una delle operazioni più importanti dei moderni processi biotecnologici; ciò avviene sotto stretto controllo (di fenomeni biologici, fisici e chimici) e monitoraggio in tempo reale, il quale è essenziale per la produttività e l'efficienza dei bioprocessi. I bioreattori, durante il loro funzionamento, consumano substrati e formano prodotti e metaboliti intermedi in presenza di cellule vive. Queste cellule sono generalmente sospese nel mezzo del bioreattore in numero variabile e la loro presenza, quantità, composizione e condizione fisiologica possono incidere sul metodo analitico di monitoraggio da utilizzare. Le tecniche di monitoraggio del bioreattore possono essere classificate come "off-line", "at-line" e "on-line" a seconda della posizione del sistema analitico rispetto al bioreattore. Le misurazioni "off-line" includono un campionamento manuale o automatico, il trasferimento del campione al laboratorio e la finale analisi di laboratorio. Le misurazioni "at-line" comprendono il campionamento manuale o automatico, ma, in questo caso, il campione rimosso viene analizzato in prossimità del bioreattore. Nelle misurazioni "on-line", invece, sono disponibili configurazioni "in situ" ed "ex situ", nel primo caso il campione non viene rimosso dal bioreattore e può essere inserito direttamente un sensore all'interno (metodo invasivo), oppure il sensore inserito può essere separato da una parete di vetro (metodo non invasivo). Un altro tipo di configurazione "in situ" prevede un circuito di campionamento con un sensore "in-line" o un analizzatore "in-line" non distruttivo e il ritorno del campione bypassato al bioreattore dopo l'analisi. Il monitoraggio in tempo reale dei bioreattori è considerato una fase fondamentale affinché si possa ottenere un efficace controllo dei bioprocessi che può portare, a sua volta, ad una maggior efficienza, produttività e riproducibilità, un miglior controllo della qualità, una riduzione dell'inquinamento ambientale e una ottimizzazione dei costi complessivi [30].

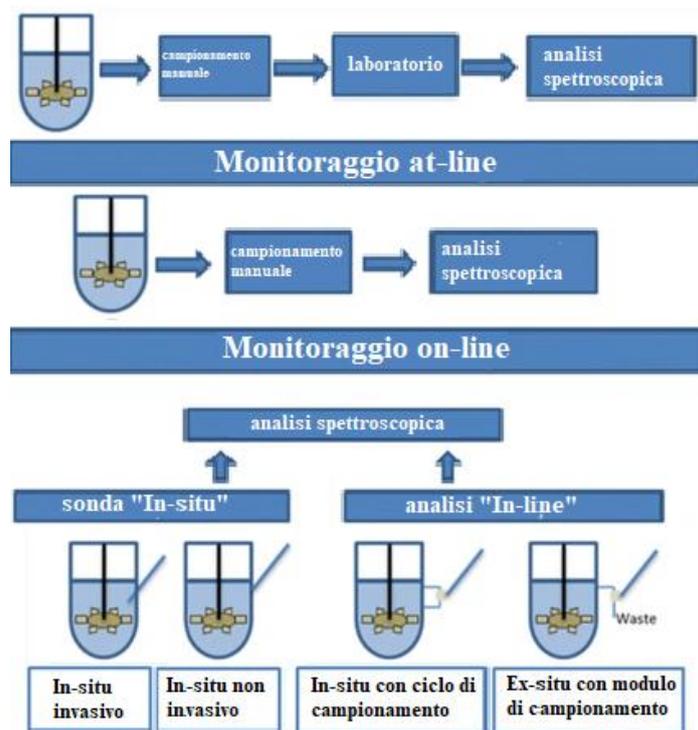


Fig.7 L'immagine rappresenta una classificazione schematica delle tecniche di monitoraggio del bioreattore e dei relativi sensori e analizzatori in base alla posizione del sistema analitico rispetto al bioreattore. Il monitoraggio viene effettuato con spettroscopia e chemometria. Nello schema vengono descritti alcuni tipi di monitoraggio (monitoraggio "at-line" e monitoraggio "on-line") di bioreattori e le varie fasi che lo compongono (adattato da [30]).

I bioreattori sono una parte importante ed inevitabile di qualsiasi strategia di ingegneria tissutale, in quanto aiutano la costruzione di tessuti funzionali tridimensionali al fine di creare un prodotto biologico. È rilevante determinare e conoscere i parametri ingegneristici ottimali come, ad esempio, il trasferimento di massa interno ed esterno, la velocità del fluido, la sollecitazione di taglio, la distribuzione della corrente elettrica e altri ancora, affinché si possano migliorare l'efficacia e la funzionalità del costrutto tissutale e si possa ridurre i costi e i tempi degli esperimenti.

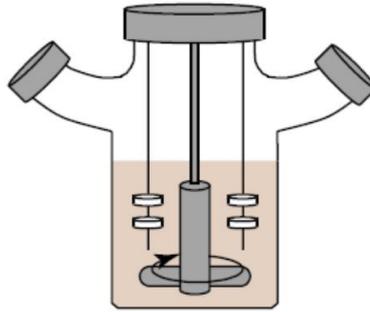
Nell'ingegneria tissutale, durante la produzione di tessuti 3D funzionali, i bioreattori svolgono importanti compiti come: mantenere una concentrazione cellulare uniforme e desiderata all'interno dello scaffold durante la coltura

cellulare; controllare dei parametri micro-ambientali (come temperatura, pH, pressione, concentrazione di ossigeno, metaboliti, molecole regolatrici, stress da taglio e stimolazione elettrica); controllare parametri aseptici (come alimentazione, rimozione dei rifiuti e campionamento); facilitare il trasferimento di massa e consentire fasi di elaborazione automatizzate.

Per ogni tipo di struttura tissutale ingegnerizzata, esiste una specifica procedura di produzione per la progettazione del bioreattore, con determinate condizioni biologiche, ingegneristiche, di affidabilità, di riproducibilità e di sicurezza [31].

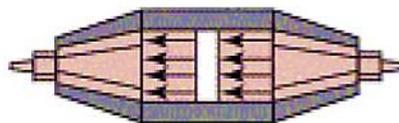
Per l'ingegneria dei tessuti sono stati sviluppati diversi tipi di bioreattore classificabili principalmente in: sistemi di agitazione (come Spinner Flask e il bioreattore a parete ondulata), sistemi di perfusione, sistemi rotanti (come il bioreattore a pareti rotanti) e sistemi a stimolazione meccanica [32].

- **Spinner Flask:** è un bioreattore utilizzato per la coltura cellulare di scaffold 3D. Al suo interno sono presenti uno o più scaffold, sostenuti da aghi, immersi in una soluzione di coltura. Attraverso la rotazione di un'asta magnetica presente all'interno del contenitore, viene messa in movimento la soluzione attorno allo scaffold, generando un moto convettivo del fluido che favorisce il trasporto di ossigeno e metaboliti e la rimozione delle sostanze di scarto. Questo tipo di bioreattore, però, presenta molte limitazioni, ad esempio, le cellule che si trovano più in profondità nello scaffold non riescono a ricevere un sufficiente apporto di nutrienti e ossigeno e quindi o rischiano di andare in contro ad apoptosi oppure si trasferiscono in zone più superficiali dello scaffold. Inoltre, non è possibile applicare stimoli meccanici o elettrici tranne la tensione di taglio sulle pareti dello scaffold, generata dal moto della soluzione di coltura [32].
- **Bioreattore a parete ondulata:** è una forma modificata dello Spinner Flask, presenta la parete del contenitore ondulata al fine di ridurre gli stress turbolenti che potrebbero danneggiare le cellule coltivate [32].



*Fig.8 Rappresentazione schematica dello Spinner Flask (adattato da [32]).*

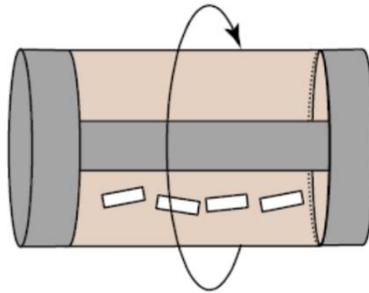
- Bioreattore a perfusione diretta: è un bioreattore utilizzato per la coltura cellulare di costrutti 3D. In questo caso uno scaffold viene fissato in una camera di coltura e la soluzione di coltura gli fluisce attraverso, messa in moto da una pompa posta a monte della camera. La perfusione può essere “confinata” cioè quando la soluzione di coltura è costretta a passare attraverso i pori dello scaffold, oppure “non confinata” cioè quando la soluzione scorre all’interno e all’esterno del contenitore [32].



*Fig.9 Rappresentazione schematica di un bioreattore a perfusione (adattato da [32]).*

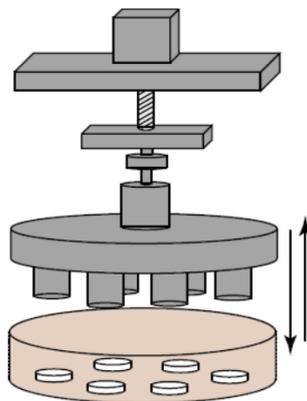
- Bioreattore a pareti rotanti: è un bioreattore che fornisce un ambiente dinamico ai costrutti con limitati sforzi di taglio ed elevate velocità di trasferimento della massa. In questo caso è il costrutto a muoversi all’interno della soluzione e non viceversa. Lo scaffold viene alloggiato su un supporto cilindrico, immerso nella soluzione di coltura e messo in rotazione grazie ad un attuatore presente all’esterno della camera di coltura. Il risultato che si ottiene è una coltura e colonizzazione cellulare più omogenea rispetto allo Spinner Flask, ma rimane la problematica del non sufficiente trasporto di

massa per elevate densità cellulari o per maggiore spessore dello scaffold [32].



*Fig.10 Rappresentazione schematica di un bioreattore a parete rotante (adattato da [32]).*

- Bioreattore meccanico: fanno parte di questa categoria numerosi dispositivi, anche molto diversi tra di loro a causa della loro alta specificità. Essi applicano stimoli meccanici controllati (come compressioni dinamiche) a costrutti ingegnerizzati che possono essere usati come modello di sviluppo di tessuti sotto condizioni di carico fisiologico per generare innesti tissutali funzionali. In generale, questi bioreattori sono formati da una camera contenente la soluzione di coltura in cui vengono posti gli scaffold fissati ad un supporto e ad un attuatore in grado di fornire uno stimolo meccanico. Molti bioreattori di questo tipo possono sviluppare delle stimolazioni predeterminate e variabili nel tempo [32].



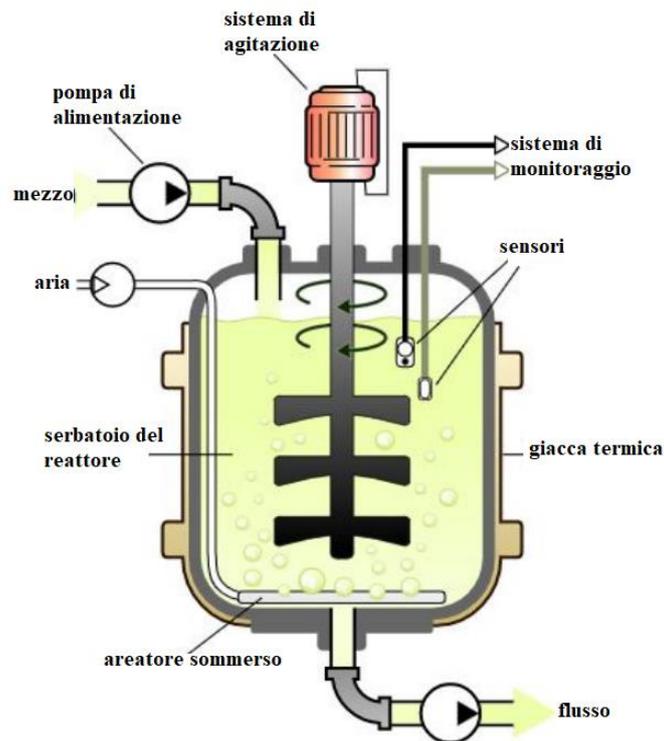
*Fig.11 Rappresentazione schematica di un bioreattore a stimolazione fisica (adattato da [32]).*

I bioreattori consentono una comoda documentazione dei cambiamenti della forma e dell'orientamento di tutte le cellule presenti all'interno dei costrutti, utilizzando tecniche come la microscopia elettronica a scansione (SEM), la microscopia a fluorescenza e l'istologia. Grazie al notevole sviluppo delle tecnologie che consente un'elevata qualità delle immagini, è possibile ricavare numerose informazioni riguardanti le caratteristiche e proprietà delle cellule dei vari studi e sperimentazioni. Allo stesso tempo però, queste nuove tecniche di imaging presentano alcune limitazioni per gli scaffold tridimensionali più complessi, ad esempio, le immagini SEM sono limitate dalla superficie delle strutture, la microscopia a fluorescenza è limitata dai possibili effetti autofluorescenti delle nanofibre, mentre, l'istologia può produrre solo una rappresentazione bidimensionale dei campioni e delle cellule che si trovano al loro interno. Inoltre, altre limitazioni sono dovute alle procedure di affettatura e lavaggio, le quali possono danneggiare parti dello scaffold, causando una perdita di informazioni. Per superare queste circoscrizioni, alcune possibili soluzioni possono essere date dall'utilizzo della tomografia computerizzata (micro-CT) oppure dai raggi X ad alta risoluzione, anche se, complessivamente, sono indagini molto impegnative [33].

#### ***1.4.1 Stimolazione meccanica***

In passato è stata ampiamente utilizzata la coltura cellulare statica, dove le cellule venivano depositate su scaffold, forniti di mezzi di crescita appropriati e coltivati in incubatrici. La coltura statica, però, determina una distribuzione cellulare non omogenea, ciò contribuisce a rendere difficoltoso il trasporto dei nutrienti negli scaffold di grandi dimensioni e, complessivamente, conferisce al costrutto ingegnerizzato proprietà morfologiche e biomeccaniche non uniformi e lontane da quelle del tessuto nativo [34]. Affinché si superino le numerose limitazioni nella rigenerazione tissutale dovute alla complessa e densa struttura del collagene delle matrici tendinee decellularizzate, la quale ostacola il

ripopolamento cellulare, l'ingegneria dei tessuti combina cellule autologhe e scaffold biologici con adeguati stimoli biochimici e fisici utilizzando appositi bioreattori. L'uso di bioreattori supporta meglio l'allineamento, la differenziazione cellulare, la deposizione e l'organizzazione della matrice extracellulare lungo gli innesti decellularizzati [35].



*Fig.12 Rappresentazione schematica di un bioreattore meccanico (adattato da [36]).*

Alcune tecniche utilizzate nella mecano-stimolazione delle colture cellulari in vitro includono carichi di compressione, stiramento longitudinale e sistemi di piegatura del substrato. Sono stati progettati diversi macchinari di trazione affinché fosse possibile eseguire dei cicli di stretching durante la produzione degli scaffold per la rigenerazione dei tessuti lesionati. In particolare, i gel di collagene sono stati molto utilizzati come scaffold per costrutti di ingegneria tissutale, soprattutto per tessuti tendinei e legamentosi. La grandezza e la forma di stress applicativi durante la coltura, influisce in modo significativo sulla

proprietà biomeccanica dei fasci di collagene e delle altre componenti extracellulari. Alcune ore dopo aver allungato i gel di collagene coltivati con fibroblasti, le cellule hanno iniziato ad allinearsi parallelamente alla direzione delle forze applicate, conferendo così una struttura simile a quella tendinea. L'allungamento meccanico ha inoltre aumentato il pattern di secrezione di importanti fattori di crescita nei tendini. In questo modo, è possibile comprendere come lo stretching abbia un'influenza positiva sulla guarigione di tendini e legamenti [34].

Numerosi studi svolti nel 2020 da Jaiswal e coautori [35] hanno quindi dimostrato che la stimolazione meccanica influisce sul comportamento di tenociti e fibroblasti aumentandone la produzione di collagene. Questa viene rilevata da mecano-sensori cellulari come le integrine, le chinasi di adesione focale e altri recettori transmembrana che promuovono l'espressione genica, tenogena e la sintesi di componenti della matrice extracellulare tendinea come, ad esempio, il collagene di tipo I. I vari regimi di carico per la stimolazione tendinea sono guidati dal comportamento anisotropo tendineo e dall'orientamento delle fibre. Vi sono diversi parametri che devono essere considerati nel momento in cui si pianifica il regime di carico come la deformazione percentuale, l'ampiezza, la frequenza, la durata, il ciclo on/off e la direzione di carico rispetto all'orientamento della fibra. Sono stati svolti molti studi con differenti valori di deformazione percentuale tali da poter essere confrontati in modo tale da ottenere la condizione ottimale che può offrire il massimo grado di sopravvivenza cellulare e una maggiore espressione dei marcatori tendinei [35].

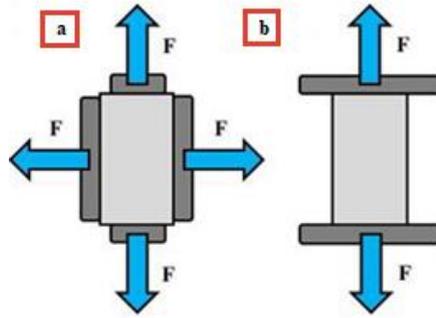


Fig.13 Rappresentazione schematica di un bioreattore meccanico: a) stimolazione biassiale; b) stimolazione uniassiale di scaffold coltivati con cellule e tenuti tra due morsetti durante l'applicazione di una forza bidirezionale o unidirezionale  $F$  (adattato da [35]).

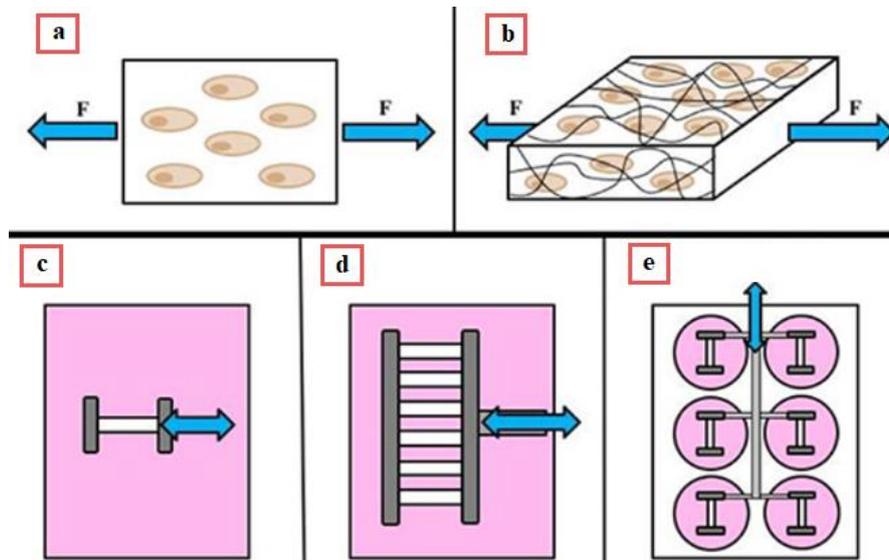


Fig.14 L'immagine raffigura dei bioreattori tendinei che stimolano: una membrana monostrato ricca di cellule (a); cellule disposte in uno scaffold fibroso 3D (b). Esistono vari tipi di bioreattori a camera: camera singola con un campione (c); camera singola con più campioni (d); camere multiple con più campioni (e). Tutti questi bioreattori applicano una deformazione uniassiale ai campioni. La stimolazione meccanica mediante bioreattori ha mostrato che le cellule 2D e le cellule coltivate su uno scaffold 3D rispondono al ceppo unidirezionale per facilitare la differenziazione cellulare (adattato da [35]).

*Tabella 3* Sono stati riportati i regimi di caricamento utilizzati per la stimolazione dello scaffold 3D, attraverso una deformazione ciclica intermittente (ICS) oppure una deformazione ciclica continua (CCS) [35]:

*Legenda:* ↑↑ aumento; ↑ lieve aumento; ↓↓ diminuzione; ↓ lieve diminuzione; - nessun cambiamento.

<i>Routine di carico</i>	<i>Tensione (%)</i>	<i>Frequenza (Hz)</i>	<i>Rapporto on/off (h)</i>	<i>Proliferazione</i>	<i>Produzione collagene</i>	<i>Allineamento cellulare</i>
ICS	4	0.1	1:2	↑	↑	↑↑
ICS	4	0.1	1:5	↑↑	↑↑	↑↑
CCS	8	1	Sempre acceso	↓↓	↑↑	↑↑
CCS	10	0.1	Sempre acceso	-	↑↑	↑↑
ICS	3	0.25	8:16	↑↑	↑↑	↑↑
ICS	6	0.25	8:16	↑↑	↑↑	↑↑
ICS	9	0.25	8:16	↓↓	↑↑	↓↓

All'aumentare della percentuale di deformazione, aumenta anche la probabilità di causare danni alle cellule. Alcuni studi dimostrano come un'ampiezza di deformazione inferiore applicata alle cellule staminali derivanti dal tendine può indurre ad una maggiore differenziazione tenogena, mentre valori più elevati possono indurre ad una differenziazione osteogena, adipogena o condrogena. Dopo numerose ricerche e considerazioni, si è giunti alla

conclusione che una deformazione a ciclo continuo inibisce la proliferazione cellulare e aumenta la produzione di collagene, mentre una deformazione a ciclo intermittente aumenta la proliferazione cellulare, l'allineamento cellulare e l'allungamento nucleare; nel complesso, fornisce quindi migliori risultati. Nonostante ciò, è importante tenere presente come non esista un unico regime di carico che possa essere utilizzato universalmente per la rigenerazione dei tendini. Inoltre, la stimolazione fisica delle cellule può influenzare anche le proteine coinvolte come ad esempio le integrine. Anche la quantità di calcio può variare a seconda del tipo di regime di deformazione applicato. Nel caso dei tenociti umani, si è ottenuto il più alto livello di calcio intracellulare con una tensione del 12% e una durata di 8-12 ore [35]. Per far crescere tessuti funzionali, l'ambiente di stress in vivo deve essere imitato all'interno del bioreattore, con combinazione di diversi tipi di carico meccanico come trazione, compressione, flessione, taglio e torsione, necessari per avviare percorsi di reazione biochimica. I bioreattori possono essere utilizzati per applicare regimi di carico ciclici e controllati e studiarne i rispettivi effetti sulla coltura cellulare in un ambiente tridimensionale. Recentemente sono stati sviluppati bioreattori che applicano forze meccaniche tramite sistemi pistone/compressione, flessione del substrato, compressione idrodinamica e fluido di taglio. Ci sono però dei problemi legati a questi tipi di bioreattore, infatti, i vari meccanismi di produzione di forze possono causare infezioni o lente degradazioni degli scaffold in esame [32].



*Fig.15 L'immagine rappresenta un esempio di bioreattore meccanico (adattato da [36]).*

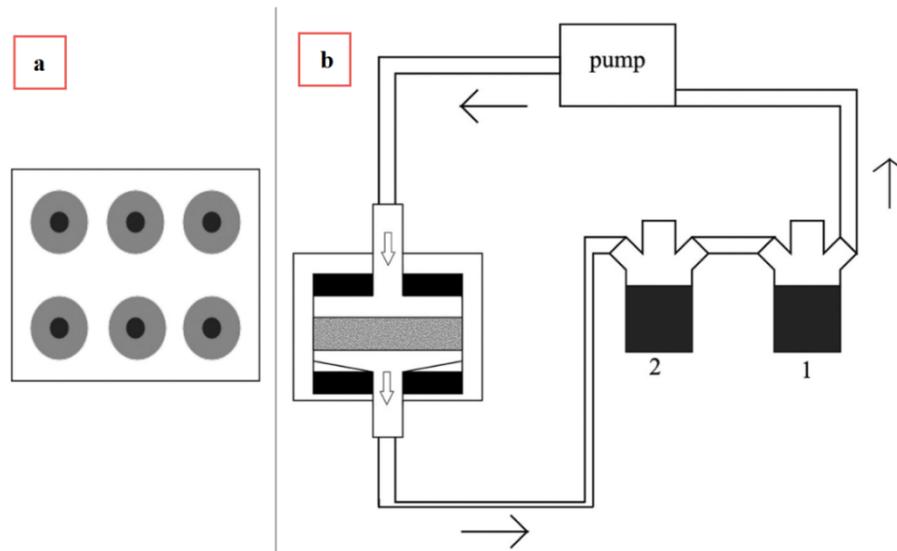
### ***1.4.2 Perfusion***

I sistemi a perfusione sono stati sviluppati per migliorare la crescita cellulare all'interno di matrici tridimensionali. Le varie tipologie di flusso dipendono dal materiale della matrice, dalla dimensione e dalla distribuzione dei pori, dalla forma del contenitore e dalla modalità di perfusione. I sistemi di perfusione migliorano la distribuzione cellulare sia all'esterno che all'interno della matrice, la proliferazione e il differenziamento cellulare; forniscono inoltre uno scambio continuo di materia che assicura l'eliminazione delle sostanze di scarto e l'integrazione dei nutrienti essenziali durante la coltivazione. Anche se molti bioreattori di perfusione intendono ottenere modelli di flusso laminare, si possono verificare comunque delle locali turbolenze, a seconda della configurazione del bioreattore, della portata media, della viscosità e della porosità degli scaffold. Le turbolenze fluide si creano principalmente nei punti di ramificazione dove si possono presentare altri problemi come l'ipoperfusione dei canali cellulari e la caduta di pressione del contenitore. Inoltre, ad un incremento della portata o della viscosità del fluido, corrisponde un aumento della tensione di taglio lungo i canali. Un esempio di bioreattore a perfusione è il RWVR, sviluppato originariamente dalla NASA per imitare la gravità [32].

Per coltivare diversi tipi di cellule su tendini decellularizzati è necessaria un'adeguata stimolazione meccanica per indurre la differenziazione cellulare verso il lignaggio tenogenico e per mantenere le proprietà biomeccaniche dei tessuti tendinei. Per ingegnerizzare i tessuti tendinei, vengono utilizzati i bioreattori, in particolare sono stati sviluppati bioreattori multicamera che permettono di controllare in modo indipendente i vari parametri [28].

I bioreattori a perfusione di flusso utilizzano una pompa per percolare continuamente il mezzo attraverso dei pori interconnessi dello scaffold, conseguendo al miglioramento del trasferimento delle sostanze nutritive, alla maggiore omogeneità della distribuzione cellulare e alla maggiore efficienza della coltura su tutto lo spessore della struttura. A differenza delle tecniche di

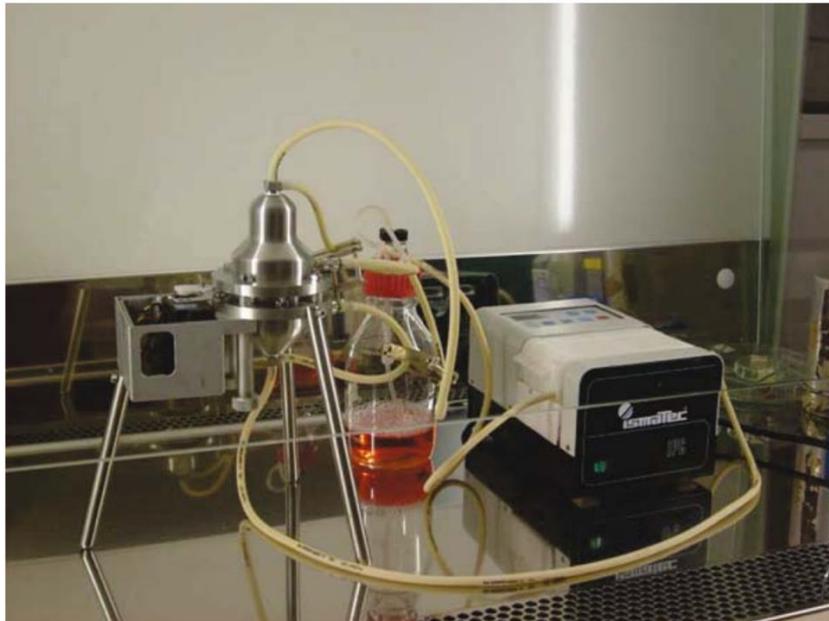
coltura dinamica, con la perfusione del flusso non si ha più la limitazione del trasporto interno ma, grazie all'intensità del flusso, i fluidi riescono a raggiungere l'interno della struttura [34].



*Fig.16 Schema del sistema di perfusione descritto da Bancroft et al. L'immagine a) raffigura la vista dall'alto della camera di perfusione con sei supporti per scaffold. L'immagine b) rappresenta il sistema completo, con lo scaffold (in grigio) inserito a pressione tra i due O-ring (in nero). Le frecce rappresentano il flusso medio. I due serbatoi 1 e 2 consentono il cambio completo del mezzo quando il collegamento tra i due è chiuso. (adattato da [37]).*

Ad esempio, il bioreattore oscillante stretch-perfusion (OSPB), automatizzato su misura, è costituito da più camere di coltura indipendenti in grado di combinare una perfusione oscillatoria bidirezionale con un ceppo uniassiale intermittente e cicli di allungamento programmati. Esso è pensato per funzionalizzare i tendini decellularizzati coltivati sulle loro superfici da cellule e consente l'elaborazione parallela di diversi costrutti tendinei da utilizzare come innesti per migliorare la riparazione chirurgica di grandi difetti o lesioni tendinee. Il dispositivo è stato sviluppato con camere indipendenti che si inseriscono su una piattaforma oscillante fornendo un supporto per il tessuto

attraverso un elemento per bloccare il tendine in sicurezza senza danneggiarlo. Ciascuna camera fornisce, inoltre, uno stiramento assiale ai costrutti con un precarico e uno stress/deformazione fisiologico. L'OSPB utilizza materiali sterilizzabili, biocompatibili e chimicamente inerti. L'intero sistema deve essere alloggiato in incubatori di colture cellulari standard [28].



*Fig.17 L'immagine rappresenta un prototipo di un bioreattore a perfusione a flusso laminare durante la sua fase di test (adattato da [9]).*

## ***CAPITOLO 2***

### ***2.0 Scopo della tesi***

Il presente lavoro di tesi ha come obiettivo lo studio e l'analisi delle varie tipologie di bioreattore, delle loro proprietà nel campo della rigenerazione tissutale di tendini e legamenti, utilizzando in particolare scaffold elettrofilati. La tesi prevede una prima parte di analisi generale delle caratteristiche principali dei tessuti tendinei e legamentosi, per quanto riguarda la loro struttura, la composizione cellulare, la composizione della matrice extracellulare e le proprietà meccaniche. Si concentra poi sulle lesioni tissutali e sui loro possibili metodi di riparazione, tra cui quindi l'utilizzo di scaffold biologici e sintetici. Nella prima parte, la tesi si concentra sui bioreattori, sulle loro caratteristiche, proprietà e modalità d'utilizzo. Nella seconda parte, sono stati analizzati gli studi che hanno utilizzato scaffold elettrofilati all'interno di colture dinamiche in bioreattore, soffermandosi su come questi dispositivi abbiano influenzato la proliferazione e la morfologia delle cellule coltivate e la produzione di matrice extracellulare sugli scaffold investigati, con particolare attenzione ai parametri di test utilizzati. Sono inoltre state analizzate le variazioni che hanno interessato gli scaffold dopo le colture, attraverso varie tecniche di imaging e test meccanici. Nella parte conclusiva sono stati evidenziati i vari punti di forza e le limitazioni degli attuali studi cercando di individuare i possibili sviluppi futuri di questo campo di ricerca.

### ***2.1 Metodo della ricerca scientifica***

I motori di ricerca utilizzati sono stati "PubMed", "Google Scholar" e "Scopus". Gli articoli individuati sono stati pubblicati tra il 2011 e il 2022 su riviste che risultano avere un fattore di impatto compreso tra 1,856 e 17,7. Le parole chiave usate per la ricerca sono: "cell culture", "cell morphology", "dynamic cell culture", "extracellular matrix", "electrospinning", "bioreactor", "perfusion

bioreactor”, “mechanical bioreactor”, “biofabrication”, “nanofiber”, “scaffold”, “hierarchical scaffold”, “hierarchical structure”, “ligaments”, “tendons”, “high-resolution X-ray tomography”, “tissue engineering”, “dynamic culture”.

## ***2.2 Risultati e discussione***

Le lesioni di tendini e legamenti rappresentano un’importante sfida clinica a causa della loro scarsa capacità di guarigione. La rigenerazione naturale porta di solito alla formazione di tessuto cicatriziale con proprietà meccaniche inferiori. Per questo motivo l’ingegneria tissutale si è prefissata il compito di cercare di sviluppare strategie in grado di rigenerare i tessuti lesionati cercando di promuovere una produzione di matrice extracellulare la più simile possibile al tessuto nativo. Nel 2011, Barber e coautori hanno fabbricato scaffold nanofibrosi intrecciati (BNFS) come potenziali costrutti per la rigenerazione dei tessuti tendinei e legamentosi lesionati. Gli scaffold BNFS sono stati fabbricati attraverso la tecnica dell’elettrofilatura, preparando una soluzione polimerica dove l’acido poli-L-lattico (PLLA) è stato disciolto in esafluoro-2-propanolo. La soluzione polimerica ottenuta è stata poi caricata in una siringa da 10 ml ed estrusa a 0,50 ml/h da un ago a punta smussata che si trova a 13 cm di distanza da un mandrino rotante, con velocità di rotazione di 9,0 m/s e ad un potenziale di 16 kV. Le nanofibre ottenute sono state raggruppate in fasci (bundle) e i fasci a loro volta in gruppi da 3, 4 o 5, cercando di incrementare progressivamente la complessità gerarchica degli scaffold ottenuti [38].

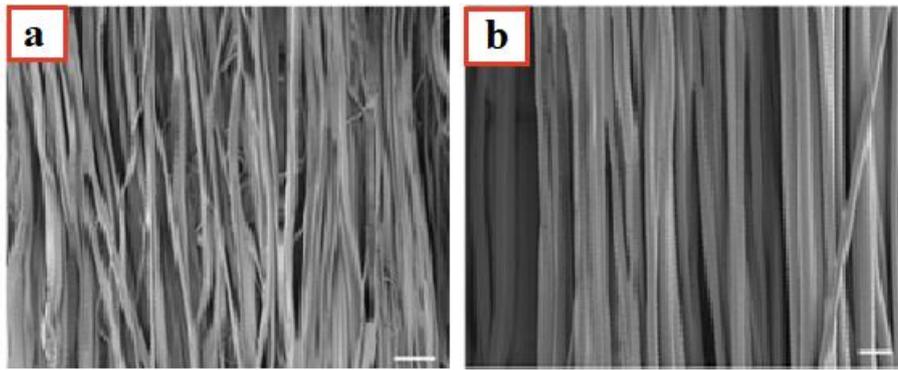


Fig.18 Immagini a scansione di nanofibre di PLLA uniformi con una fibra di diametro medio di  $702 \pm 205$  nm. Scala bar  $10 \mu\text{m}$  (a) e  $2 \mu\text{m}$  (b) (adattato da [38]).

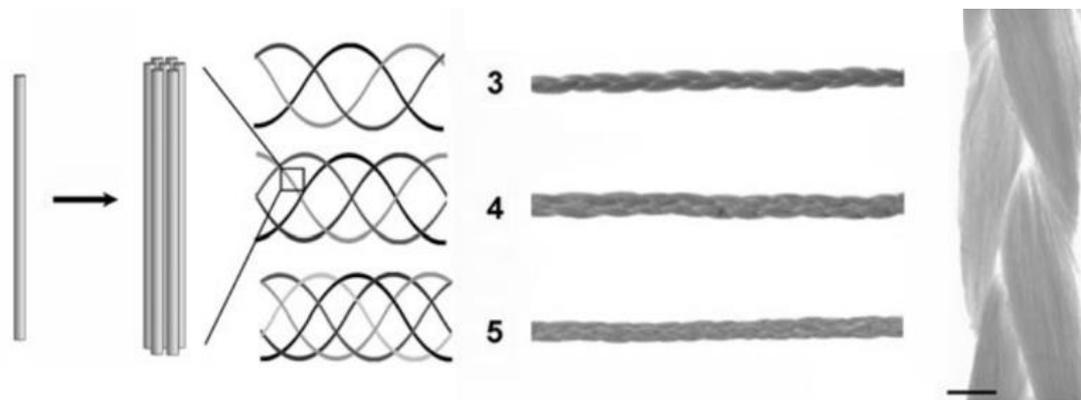
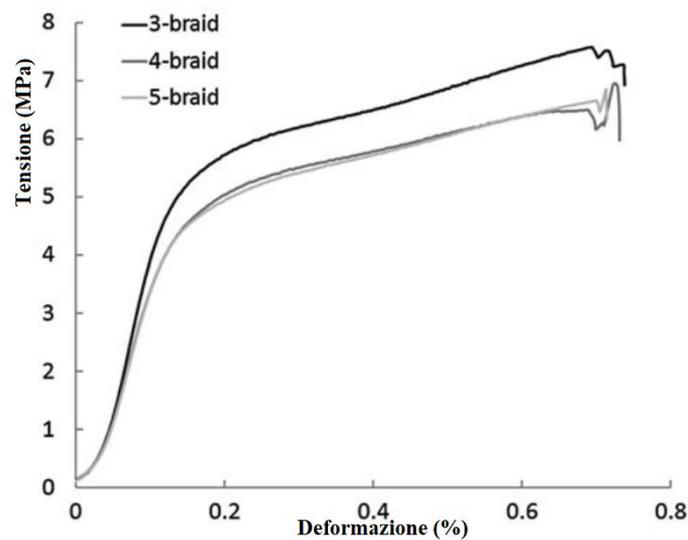


Fig.19 L'immagine raffigura lo schema della struttura gerarchica e dell'intreccio dei BNFS. Le singole nanofibre vengono raccolte a fascio allineato e poi raggruppati a gruppi di 3, 4 o 5 (scala bar  $4 \text{ mm}$ ). A destra un BNFS a 3 fasci (scala bar  $0,5 \text{ mm}$ ) (adattato da [38]).

Per la coltura cellulare dei BNFS, sono state utilizzate delle cellule staminali mesenchimali umane (hMSC) ricavate dalle teste femorali di pazienti sottoposti a protesi totale d'anca e coltivate in una soluzione contenente penicillina. Dopo aver sterilizzato e idratato con etanolo e radiazioni UV gli scaffold a 3 bundle, scelti per le loro proprietà meccaniche favorevoli, le cellule sono state coltivate su entrambi i lati del costrutto e lasciate aderire prima di aggiungere il mezzo di

coltura, ottenendo alla fine una densità di  $10 \times 10^6 \frac{\text{cellule}}{\text{cm}^3}$ . Successivamente gli scaffold sono stati coltivati per 7, 14 e 21 giorni, poi raccolti e fissati con una soluzione di glutaraldeide al 2,5% contenente sodio, saccarosio e cloruro di calcio. Per ricavare dati sufficienti, sia i costrutti coltivati con cellule che quelli acellulari sono stati osservati mediante microscopia elettronica a scansione SEM alla tensione di 3 kV e alla distanza di lavoro di 3 mm.

Con l'obiettivo di analizzare le proprietà di trazione dei BNFS è stato applicato un carico uniassiale fino a rottura [38].



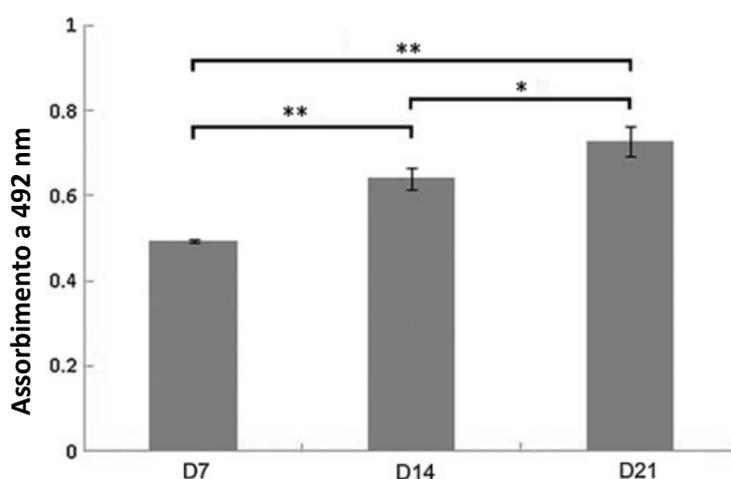
*Fig.20 Il grafico riporta la curva tensione-deformazione degli scaffold di differente composizione (3, 4 o 5 bundle), mostrando un comportamento trifasico che imita il tendine e legamento nativo durante il carico (adattato da [38]).*

I test di trazione uniassiale hanno rilevato che le caratteristiche meccaniche dei costrutti ingegnerizzati in questione imitano fedelmente quelle del tessuto tendineo e legamentoso nativo. Ad esempio, i legamenti del crociato anteriore umano ottenuti da campioni anziani hanno mostrato un modulo di Young medio di 65 - 24 MPa, allo stesso modo, nello studio attuale, il modulo di Young dei BNFS variava da 47,6 a 55,0 MPa a seconda del numero di fasci di fibre intrecciate. Man mano che lo scaffold viene ulteriormente caricato, i fasci di

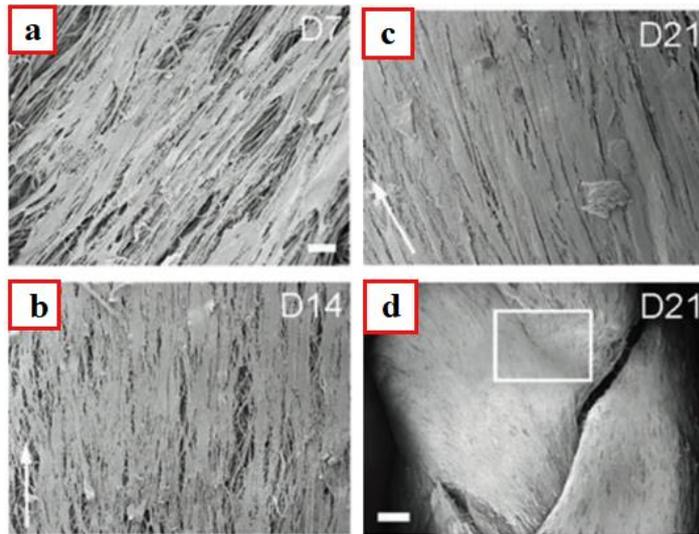
fibre (bundle) si allungano e si comprimono l'un l'altro per allinearsi in maniera uniassiale secondo il carico applicato.

I dati mostrano che le proprietà meccaniche dei BNFS possono essere alterate variando il numero di fasci di fibre intrecciati, infatti i fasci a 3 bundle differiscono dagli altri due nella regione lineare e nel rendimento generale. Oltre ad avere uno stress di snervamento più elevato di ( $4,11 \pm 0,3$  MPa), il modulo di Young medio degli scaffold a 3 bundle è compreso nell'intervallo di ( $55,0 \pm 2,8$  MPa) ed è superiore a quello da 4 bundle ( $47,8 \pm 7,5$  MPa) e anche a quello da 5 ( $47,6 \pm 2,8$  MPa). Inoltre, anche lo stress finale medio dei BNFS a 3 bundle che rientra nell'intervallo di ( $7,62 \pm 0,2$  MPa) è più elevato rispetto agli altri due tipi di scaffold (rispettivamente ( $6,57 \pm 0,5$  MPa) e ( $6,67 \pm 0,4$  MPa)).

Per studiare la capacità degli scaffold di supportare la proliferazione cellulare, le hMSC sono state coltivate su BNFS a 3 fasci in terreno di crescita per 21 giorni e valutate con analisi. I risultati hanno mostrato che l'attività metabolica è aumentata con il tempo (fig.21), suggerendo che i BNFS supportano la proliferazione cellulare. A sostegno di questa conclusione, le immagini elettroniche a scansione hanno mostrato che i BNFS dopo 21 giorni erano più densamente ricoperte di cellule rispetto a quelle dopo 7 e 14 giorni (fig.22) [38].



*Fig.21 L'istogramma rappresenta i valori di proliferazione cellulare di hMSC coltivate su scaffold BNFS a 3 bundle. Si nota come l'attività metabolica aumenta con il tempo nell'arco di 21 giorni (adattato da [38]).*



*Fig.22 Immagini a scansione di hMSC coltivate in BNFS: a) dopo 7 giorni di coltura le cellule si sono attaccate e allineate lungo le nanofibre sottostanti; b) dopo 14 giorni; c) dopo 21 giorni i costrutti erano ricoperti di cellule; d) dopo 21 giorni il tessuto appena cresciuto ha fatto ponte tra i fasci di nanofibre. (scala bar 20  $\mu$ m) (adattato da [38]).*

Per lo studio della differenziazione tenogonica, i BNFS coltivati (dopo 7 giorni) sono stati inseriti nel bioreattore “Bose Electroforce multicamera BioDynamic” sia a stimolazione meccanica che a perfusione attiva a 20 ml/min, per 10 giorni consecutivi. Il bioreattore considerato, il cui il medium di coltura è stato sostituito ogni 5 giorni, ha la capacità di imprimere una deformazione ciclica del 10% a 1 Hz per 2 h al giorno [38].



*Fig.23 Bioreattore “Bose Electroforce multicamera BioDynamic”.*

Per valutare in modo più approfondito la risposta biologica alle BNFS, le hMSC sono state coltivate su BNFS per 17 giorni in presenza di terreno di crescita, terreno di differenziazione o terreno di differenziazione con stimolazione meccanica ed è stata analizzata la loro espressione genica mediante qPCR.

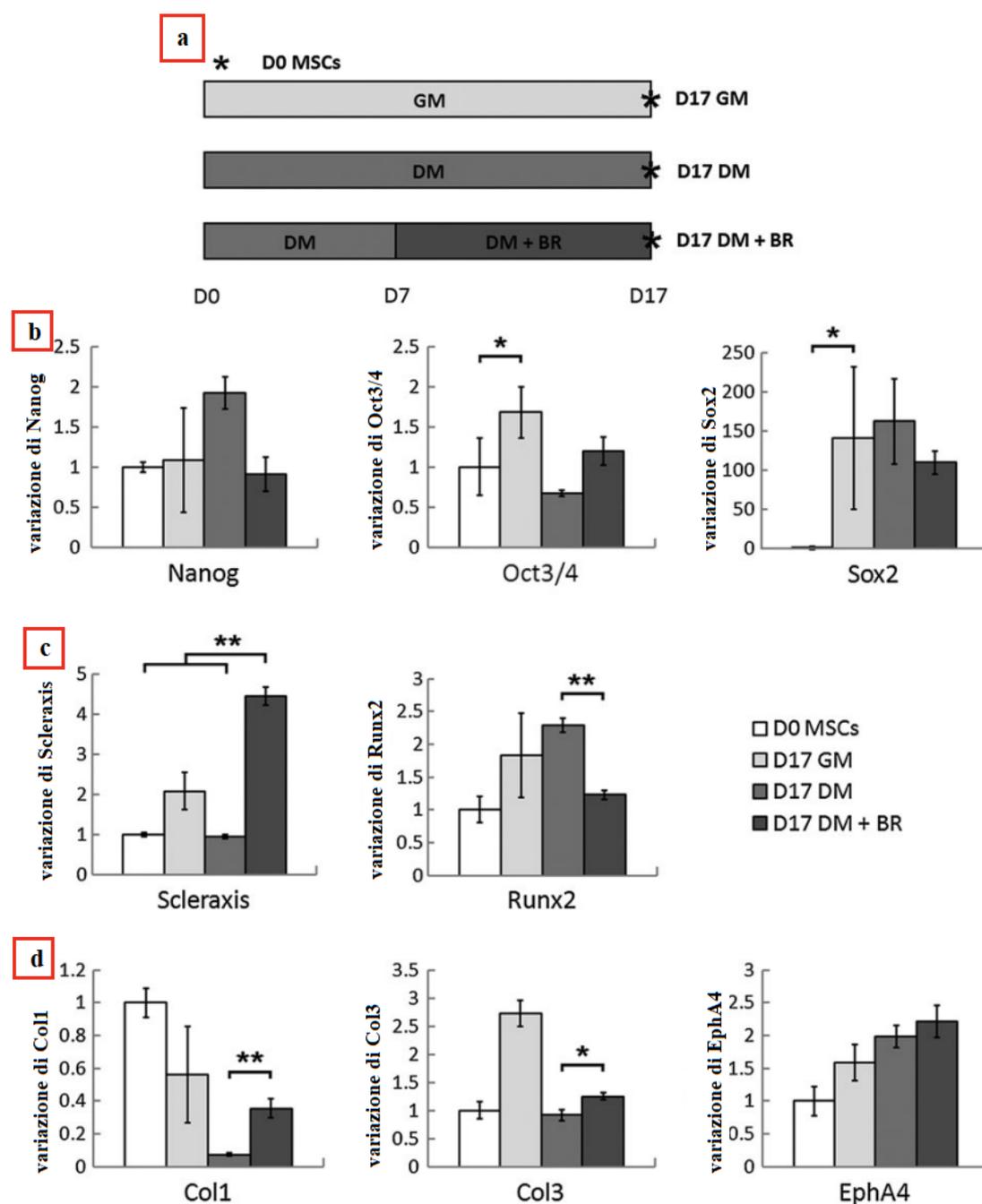
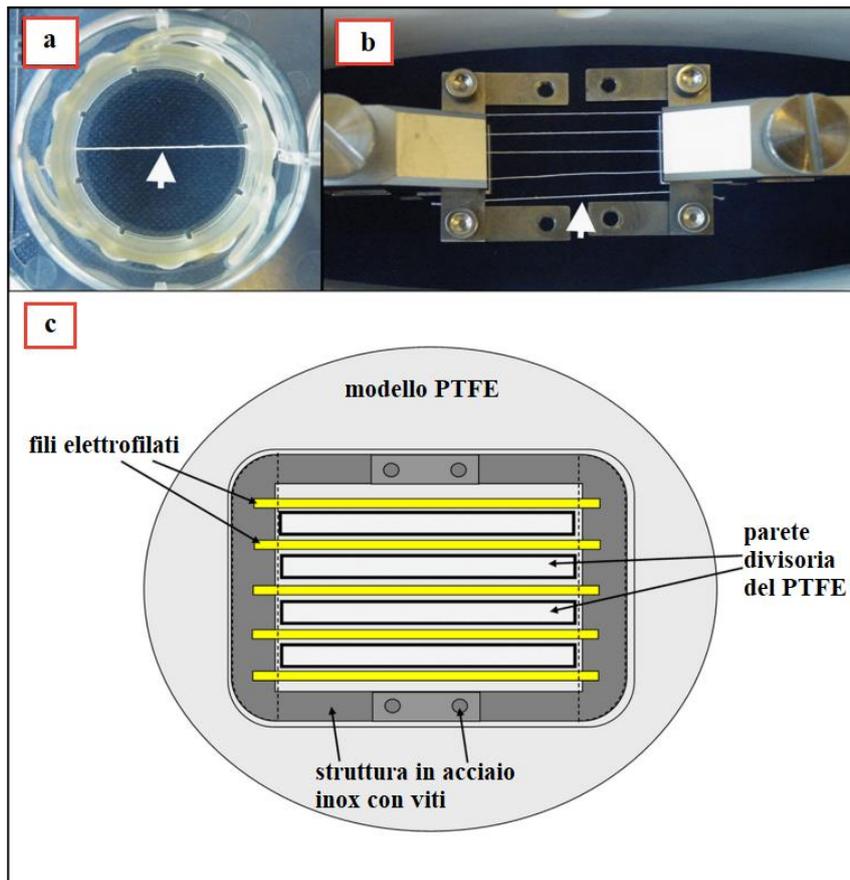


Fig.24 a) Configurazione sperimentale che mostra le quattro condizioni: le hMSC seminate su BNFS a D0 e coltivate per 17 giorni in GM (terreno di crescita), DM (terreno di differenziazione) o DM per 7 giorni seguiti da 10 giorni di stimolazione meccanica in un bioreattore (DM + BR). L'RNA è stato

*isolato prima della semina dello scaffold (D0 MSCs) o dopo 17 giorni di coltura su BNFS (indicato con \*). b) Istogrammi relativi alla variazione di Nanog, Oct3/4 e Sox2. c) Istogrammi relativi alla variazione di Scleraxis e Runx2. d) Istogrammi relativi alla variazione di Coll1, Col3 e EphA4 (adattato da [38]).*

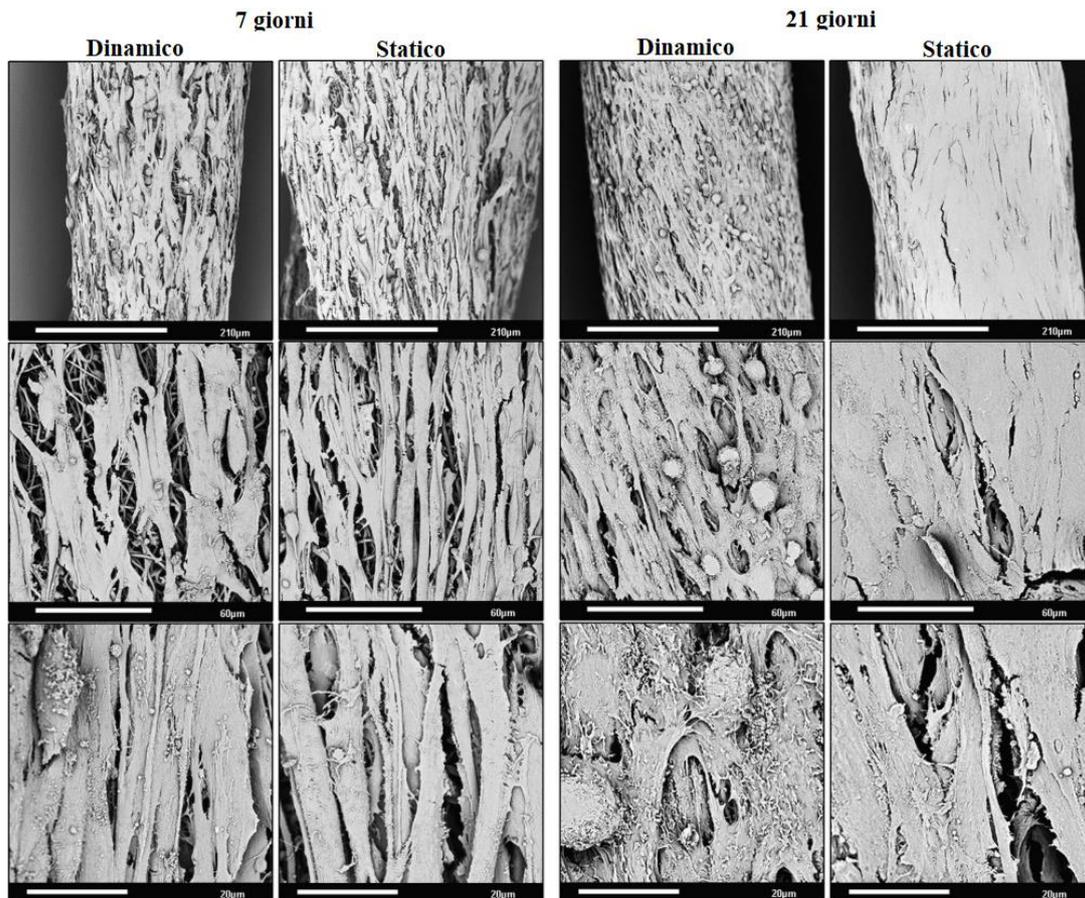
Le hMSC hanno mostrato un'espressione genica significativamente aumentata dei fattori di trascrizione Oct3/4 e Sox2, necessari per la pluripotenza e l'autorinnovamento delle cellule staminali, quando sono state coltivate su BNFS per 17 giorni. L'insieme di questi risultati suggerisce che le BNFS rafforzano la potenza delle hMSC prima della differenziazione e che, dopo l'induzione mediante fattori di crescita e/o stimolazione meccanica, le hMSC perdono un grado di potenza (fig.24b). Confrontando i modelli di espressione genica di Scleraxis e Runx2, fattori di trascrizione specifici che controllano rispettivamente la differenziazione del lignaggio tenogenico ed osteogenico, si è riscontrato che la stimolazione meccanica è stata in grado di invertire la tendenza rilevata nel terreno di differenziazione nell'espressione genica, portando a un significativo aumento di 4,66 volte ( $p < 0,001$ ) dell'espressione di Scleraxis e una significativa diminuzione dell'espressione di Runx2 di 1,86 volte ( $p < 0,001$ ) rispetto al solo terreno di differenziazione (fig.24c). Inoltre, la stimolazione meccanica ha aumentato l'espressione del Collagene di tipo I di 4,82 volte ( $p < 0,001$ ) e l'espressione di Collagene di tipo III di 1,36 volte ( $p < 0,05$ ). Analogamente, l'espressione di EphA4, recettore associato alle condensazioni di cellule mesenchimali importanti per la formazione dei tendini, è stata aumentata (fig.24d). Nel complesso, questi risultati suggeriscono che il terreno di differenziazione guida le hMSC verso un lignaggio osteogenico e la stimolazione meccanica attraverso i bioreattori è capace di indurre la diminuzione dell'osteogenesi e avviare la tenogenesi [38].

Per ricostruire i tendini danneggiati quando l'autotrapianto non è sufficiente o disponibile, sono necessarie delle strategie alternative. A tal proposito, con un articolo pubblicato nel 2016, Bosworth e coautori propongono degli scaffold elettrofilati coltivati con cellule staminali mesenchimali umane (hMSC) e sottoposti ad un carico di trazione dinamico. Il processo di elettrofilatura è stato effettuato mediante una soluzione al 10% di poli- $\epsilon$ -caprolattone (PCL) disciolto in 3-esafloisopropanolo (HFIP) ad una tensione di 20 kV, una portata di 1 ml/h, una distanza dal collettore di 200 mm e un tempo di rotazione di 15 min. Le fibre generate sono state raccolte su un mandrino rotante (a 600 giri/min) e successivamente tagliate in lunghezze di 50 mm ed immerse in acqua distillata. Al termine del processo, le strisce sono state attorcigliate manualmente per creare filati di fibre elettrofilate. Gli elementi prodotti sono stati prima sterilizzati in soluzioni di etanolo e acqua distillata e poi posizionati in una cornice su misura all'interno di uno stampo di politetrafluoroetilene (PTFE) con partizioni che hanno consentito di coltivare separatamente ciascun elettrofilato con delle cellule staminali mesenchimali umane (hMSC, derivate dal midollo osseo di una femmina di 60 anni caucasica) con l'aggiunta di un mix di integratori e antibiotico. Le cellule sono state lasciate aderire e acclimatarsi agli scaffold per 5 giorni a 37°C con il 5% di  $CO_2$ . Successivamente i ricercatori hanno proseguito lo studio sottoponendo alcuni costrutti a carichi ciclici e altri a carichi statici, sia nel caso in cui fossero stati prima coltivati da cellule che viceversa. Nel caso statico, gli scaffold sono stati montati all'interno di una cultura a 6 pozzetti (CellCrowns) e mantenuti in condizioni con deformazioni nulle. Nel caso dinamico, gli scaffold sono stati caricati all'interno della camera biodinamica BOSE di un bioreattore meccanico con cella di carico da 225 N che applica una deformazione del 5%, alla frequenza di 1 Hz per 1 h al giorno, per un totale di 3600 cicli per giorno [26].



*Fig.25 L'immagine a) rappresenta singoli filamenti prodotti attraverso la tecnica dell'elettrofilatura ancorati saldamente all'interno di CellCrowns a 6 pozzetti. L'immagine b) raffigura cinque filamenti elettrofilati tenuti all'interno di un telaio in acciaio inossidabile, il tutto caricato nella camera biodinamica BOSE. L'immagine c) è una rappresentazione schematica dei filamenti elettrofilati e dello stampo in PTFE (adattato da [26]).*

Dopo rispettivamente 7 e 21 giorni di coltura, gli scaffold sono stati prima sciacquati due volte in un tampone fosfato salino (PBS) e fissati in glutaraldeide a 4°C, per poi essere osservati e studiati mediante varie tecniche di imaging tra cui la microscopia a scansione SEM (operante a 5 keV) e tomografia a raggi X ad alta risoluzione (con tensione di alimentazione a 40 kV e potenza a 10 W) [26].



*Fig.26 Immagini a scansione di filamenti elettrofilati coltivati con cellule staminali mesenchimali umane per 7 e 21 giorni, sia in condizioni statiche che dinamiche (adattato da [26]).*

Indipendentemente dal regime di carico applicato, gli hMSC hanno aderito e proliferato meglio sulla superficie delle fibre elettrofilate e il loro orientamento ha seguito principalmente la direzione delle fibre sottostanti. Dopo 21 giorni, le superfici dei filati si trovavano ad essere confluenti con le cellule; tuttavia, le hMSC sugli scaffold caricati ciclicamente erano più strutturate e rotonde rispetto a quelle sugli scaffold statici in cui queste sembravano essere più piatte e fuse insieme. Attraverso la micro-CT è stata valutata la porosità dei costrutti del 56%. A livello meccanico, i filati sono stati sottoposti a prove di trazione fino alla rottura per i gruppi cellulari e acellulari in condizioni statiche o dinamiche. Si è osservato come, indipendentemente dal gruppo preso in esame, la resistenza alla trazione e la rigidità dei filati siano aumentate con il tempo.

Attraverso la coltura dinamica, però, si sono ottenuti risultati nettamente migliori: al termine dei 21 giorni, infatti, gli scaffold cellulari coltivati dinamicamente avevano una resistenza a trazione di circa 50 MPa e un modulo di Young di circa 100 MPa, mentre con la coltura statica si sono ottenuti rispettivamente circa 20 MPa di resistenza a trazione e 80 MPa di modulo di Young. Per quanto riguarda gli scaffold acellulari si sono ottenuti risultati meno significativi, infatti, in condizioni dinamiche si aveva una resistenza a trazione di circa 16 MPa e un modulo di Young di 30 MPa, mentre in condizioni statiche 15 MPa e 35 MPa [26].

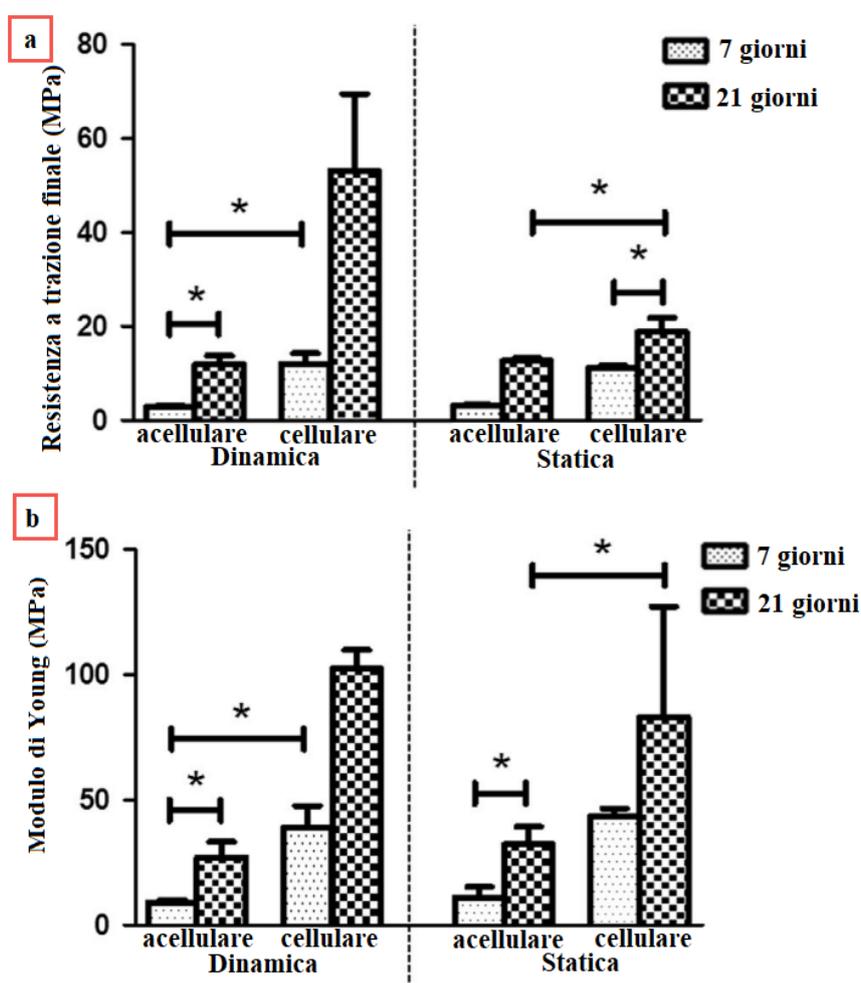
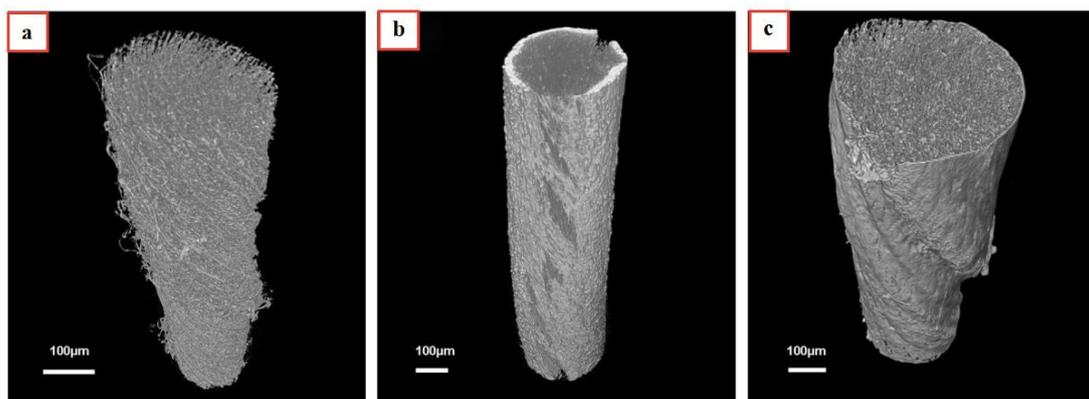


Fig.27 L'immagine raffigura dei grafici contenenti dati di prova di trazione di scaffold elettrofilati coltivati con cellule e acellulari, sottoposti a carico ciclico o tenuti in condizioni statiche. Il grafico a) rappresenta la resistenza alla trazione finale (MPa), mentre il grafico b) il modulo di Young (MPa) (adattato da [26]).

Si è inoltre notato che, dopo 21 giorni, i filamenti soggetti a carico ciclico possedevano uno spesso strato di matrice extracellulare di circa 30  $\mu\text{m}$  intorno alla circonferenza esterna delle fibre; al contrario, quelli coltivati in condizioni statiche non hanno mostrato alcuno ispessimento. In entrambi i casi è stata osservata un'adesione delle cellule attorno all'intera superficie della struttura filata, ma non c'era nessuna evidenza di infiltrazione cellulare interna [26].



*Fig.28 Le immagini rappresentano delle scansioni micro-CT di: a) un filamento elettrofilato senza la presenza di cellule al tempo zero; b) un filamento elettrofilato coltivato con cellule e sottoposto a carico ciclico per 21 giorni; c) filamento elettrofilato coltivato con cellule e tenuto in condizioni statiche per 21 giorni (scala bar 100  $\mu\text{m}$ ) (adattato da [26]).*

Dopo i 21 giorni di coltura, sono stati quantificati i livelli di espressione genica delle cellule per quanto riguarda gli scaffold caricati ciclicamente. Si è verificato un aumento dell'espressione genica del collagene I e III, della tenascina-C, elastina e fibronectina e una riduzione della regolazione dei controlli negativi, dimostrando quindi che le hMSC non si stavano differenziando verso un lignaggio osseo/cartilagineo. Per quanto riguarda la cristallinità dei filati, questa non è cambiata significativamente durante le due colture, varia tra il 25% e il 33%. In conclusione, i filati caricati hanno mostrato uno strato di matrice extracellulare ispessito nell'esterno dell'impalcatura rispetto ai costrutti coltivati staticamente, ciò suggerisce un maggiore tasso di proliferazione cellulare, di produzione di collagene di tipo I e di deposizione di

matrice extracellulare, mantenendo sempre un orientamento uniassiale predominante delle cellule coltivate. Complessivamente, lo studio ha mostrato quindi come il supporto di scaffold nanofibrosi e bioreattori a stimolazione meccanica porta ad una miglior differenziazione del lignaggio tendineo [26].

Dato che ogni anno una ricca parte della popolazione mondiale subisce lesioni e rotture ai tendini ed ai legamenti, Rinoldi e coautori hanno pubblicato nel 2019 uno studio con l'obiettivo di migliorare le tecniche di riparazione e di rigenerazione di questi. Per raggiungere il loro scopo, hanno utilizzato degli scaffold elettrofilati compositi multistrato 3D, in cui un substrato nanofibroso elettrofilato è stato rivestito con un sottile strato di idrogel ricco di cellule. I materiali utilizzati per la fabbricazione degli scaffold sono una combinazione di policaprolattone (PCL), nylon 6 (PA6), alginato ad alta viscosità, esafluoroisopropanolo (HFIP) e anidride metacrilica ad una tensione di 15 kV. Il PCL è un biomateriale approvato dalla FDA per i dispositivi di somministrazione di farmaci, mentre il PA6 è un polimero molto utilizzato nelle applicazioni di ingegneria biomedica poiché ha un'elevata tenacità, resistenza meccanica e un lento profilo di degradazione. L'intera struttura è stata ottimizzata per ottenere adeguate proprietà meccaniche e fisiche, vitalità e proliferazione cellulare. Le cellule utilizzate sono state le staminali mesenchimali MSC, ricavate dal midollo osseo di un donatore umano non identificato, differenziate mediante l'aggiunta della proteina BMP-12 (utile per il differenziamento del carattere tenogenico delle MSC) [12].

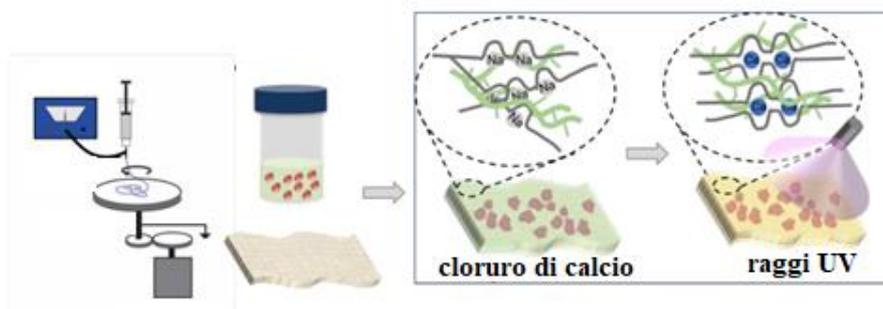


Fig.29 L'immagine rappresenta lo schema di fabbricazione degli scaffold elettrofilati. È presente il sintetico processo dell'elettrofilatura, in cui le nanofibre prodotte sono state rivestite da idrogel ricco di cellule per creare un'impalcatura multistrato per l'ingegneria dei tessuti tendinei. Il gel è stato prima reticolato in una soluzione di cloruro di calcio e poi esposto ai raggi UV (adattato da [12]).

Le proprietà meccaniche dei costrutti sono state misurate mediante un test di resistenza alla trazione uniassiale utilizzando una macchina universale per prove meccaniche. Cinque campioni di ciascuna membrana sono stati tagliati in forma rettangolare (10 x 5 mm), posizionati tra le due pinze della macchina e sottoposti a trazione con una cella di carico da 10 N. Il modulo di elasticità a trazione è stato calcolato utilizzando la regione lineare iniziale dello 0-5% della curva tensione-deformazione. Le proprietà meccaniche a compressione degli scaffold sono state misurate mediante una prova di compressione utilizzando i campioni sotto forma di dischi con un diametro di 10 mm. La vitalità e la proliferazione cellulare sono state osservate mediante la tecnica LIVE/DEAD. Le curve di tensione-deformazione ricavate dai campioni rivestiti di idrogel sono paragonabili a quelle non rivestite (fig.30a); anche le caratteristiche di deformazione e modulo elastico non variano molto nei due casi (fig.30b-c). Tuttavia, le proprietà meccaniche delle strutture che sono state misurate durante i test di compressione meccanica sono state notevolmente influenzate dalla presenza di idrogel. Infatti, gli scaffold con una percentuale di alginato maggiore hanno ottenuto proprietà di compressione più elevate (fino a 27 kPa) (fig.30d); mentre quelli con una percentuale minore hanno comportato un

fattore di rigonfiamento circa il doppio dei precedenti (fig.30e). Lo scaffold con percentuale minore di alginato ha registrato il tasso di degradazione più rapido nei 14 giorni rispetto agli altri [12].

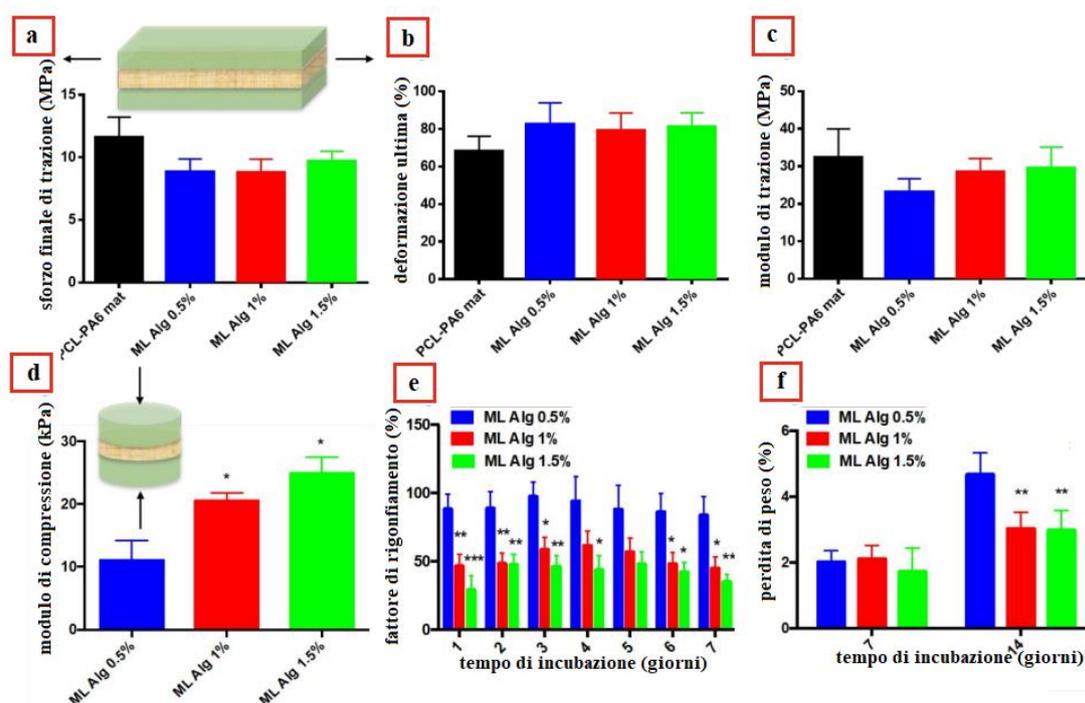
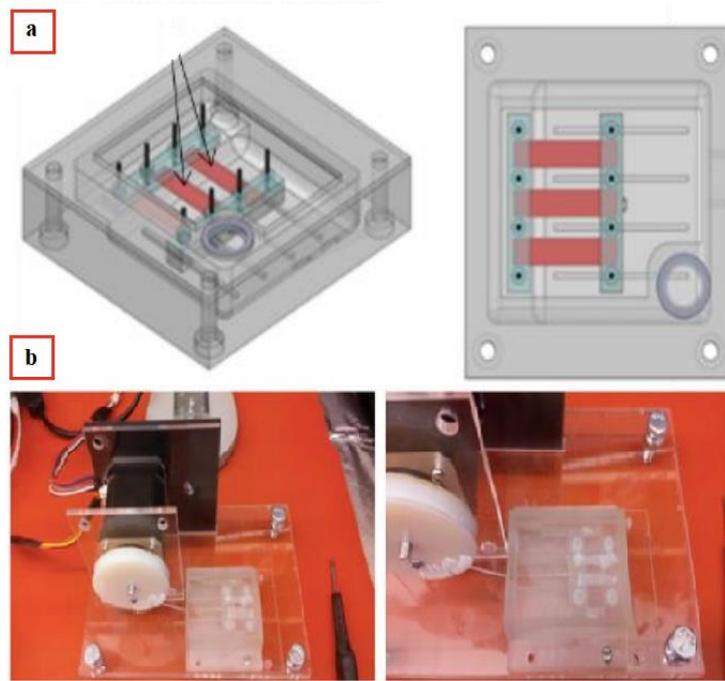


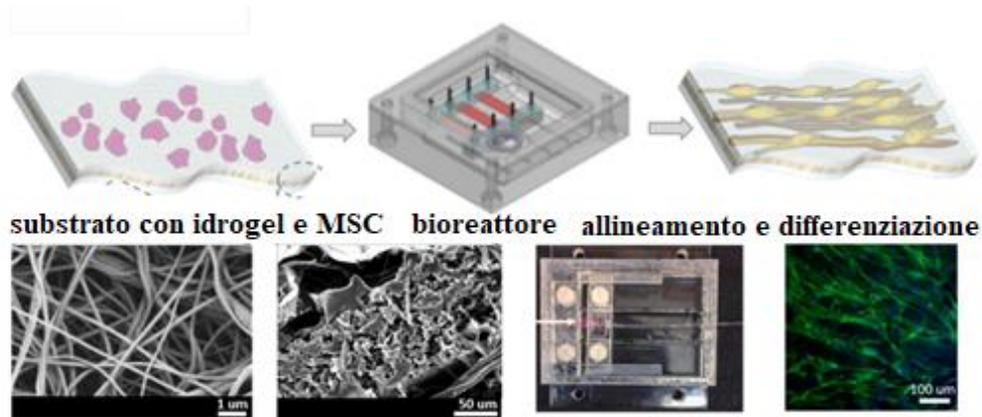
Fig.30 L'immagine raffigura le proprietà meccaniche e fisiche degli scaffold fibrosi multistrato (rivestiti da uno strato di idrogel di 100-150  $\mu\text{m}$ ) a seconda della variazione di concentrazione del PCL-PA6 e dell'Alginato. Nel grafico a) vengono riportati i valori di sollecitazione a trazione; nel b) quelli di deformazione; nel c) quelli relativi al modulo elastico; nel d) quelli del modulo di compressione; nel grafico e) sono presenti i valori del "fattore di rigonfiamento" ed infine nel grafico f) quelli relativi alla perdita di peso cellulare (adattato da [12]).

In un secondo momento, per imitare la funzione naturale dei tendini, gli scaffold sono stati stimolati meccanicamente utilizzando un bioreattore meccanico particolare, idealizzato e perfezionato dagli studiosi stessi (fig.31).



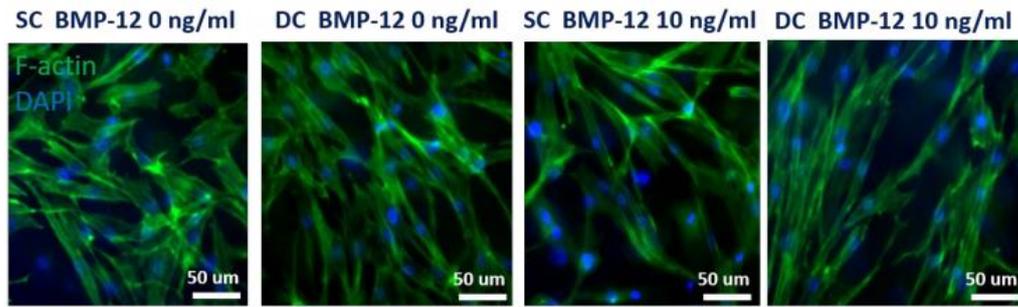
*Fig.31 L'immagine a) rappresenta il bioreattore utilizzato nello studio; mentre la b) il sito di caricamento degli scaffold (adattato da [12]).*

Il bioreattore permette di creare un ambiente biochimico e biomeccanico adatto per stimolare l'ECM, la differenziazione e la proliferazione cellulare in condizioni sterili e può contenere più campioni contemporaneamente di dimensioni variabili: 5-37 mm di lunghezza, 0,2-13,5 mm di larghezza e 0,1-0,2 mm di spessore, con fibre di diametro di  $(149 \pm 32 \text{ nm})$ . La stimolazione meccanica è stata eseguita sui campioni periodicamente e ciclicamente in direzione assiale, con una deformazione del 10% ad una frequenza di 1 Hz per 4 ore al giorno per sette giorni consecutivi [12].



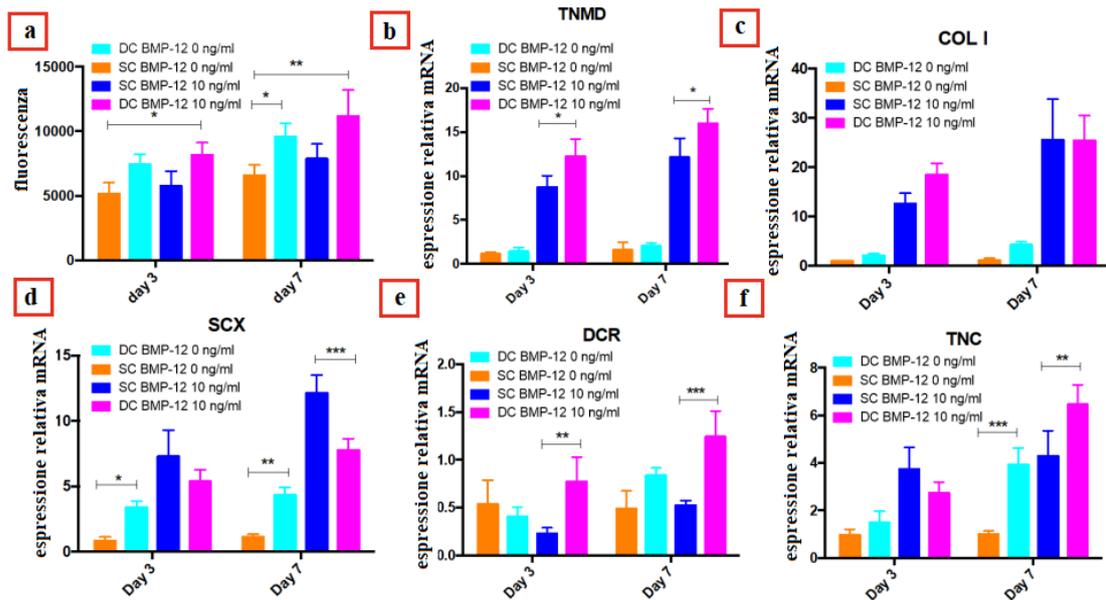
*Fig.32 L'immagine rappresenta scaffold carichi di cellule coltivate nel bioreattore ad allungamento meccanico con l'aggiunta di fattori di crescita per promuovere l'allineamento e la differenziazione cellulare. In basso, è possibile riscontrare immagini SEM e a microscopia a fluorescenza del substrato nanofibroso e della rispettiva sezione trasversale (adattato da [12]).*

Gli scaffold sono stati stimolati biochimicamente e meccanicamente per imitare la funzione naturale dei tendini e per ottenere un effetto sinergico sulle funzioni cellulari. Gli stimoli biochimici sono stati forniti coltivando i campioni in un terreno di coltura modificato con 10 ng/mL di BMP-12. Per eseguire la coltura dinamica dei costrutti è stato utilizzato un bioreattore costruito su misura. Gli stimoli meccanici applicati hanno portato a un orientamento longitudinale dei citoscheletri cellulari. Le cellule coltivate in condizioni dinamiche (DC) tendevano ad allinearsi nella direzione della deformazione applicata fino al 40%, mentre le cellule coltivate in condizioni statiche (SC) hanno mostrato un orientamento casuale (fig.32) [12].



*Fig.33 Immagini a microscopio a fluorescenza dello scaffold multistrato dopo sette giorni. Le immagini 2 e 4 mostrano l'allineamento cellulare nella direzione dello stiramento nel caso dinamico (DC); le immagini 1 e 3 mostrano gli scaffold coltivati in condizioni statiche (SC) aventi cellule orientate casualmente (adattato da [12]).*

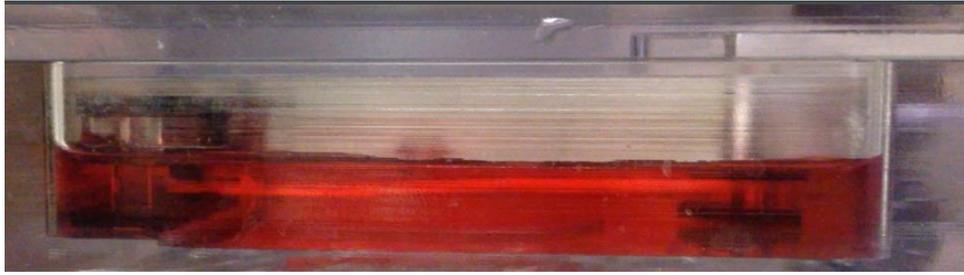
Anche la maturazione e la funzione delle cellule coltivate sono state studiate sotto stimoli biochimici e meccanici (fig.34). L'espressione del collagene di tipo I, componente principale della matrice extracellulare prodotta dalle cellule, è stata valutata mediante colorazione della proteina. La stimolazione meccanica ha mostrato un impatto positivo sul tasso di proliferazione delle cellule coltivate nel tempo, suggerendo quindi che la condizione di coltura dinamica ha sostenuto la vitalità cellulare e promosso la proliferazione (fig.34a). L'influenza della tensione meccanica applicata alle MSC coltivate negli scaffold multistrato è stata analizzata in termini di potenziale tenacità. L'espressione genica degli specifici marcatori tenogenici come la tenomodulina, il collagene I, la scleraxis, la decorina e la tenascina C è stata studiata per valutare la differenziazione delle cellule in un contesto dinamico. I risultati hanno indicato un significativo aumento della differenziazione tenogenica delle cellule coltivate in condizioni dinamiche.



*Fig.34* Insieme di istogrammi che descrivono gli effetti delle stimolazioni meccaniche e biochimiche sulle cellule MSC incapsulate negli scaffold multistrato differenziati da una diversa concentrazione di BMP-12. In arancione e in blu gli scaffold coltivati staticamente a 0 ng/mL e 10 ng/mL di BMP-12; in azzurro e viola gli scaffold coltivati dinamicamente rispettivamente a 0 ng/mL e 10 ng/mL di BMP-12. Il grafico a) esprime il tasso di proliferazione delle MSC; b) tenomodulina; c) collagene di tipo I; d) sclerassi; e) decorina; f) tenascina-C. In ogni caso, al termine dei sette giorni di coltura dinamica, tutti i valori sono aumentati notevolmente (adattato da [12]).

Con la fig.34, grazie all'utilizzo degli istogrammi, viene messo in evidenza come i parametri presi in esame aumentino notevolmente in ogni caso dalla coltura statica a quella dinamica col passare del tempo. Ad esempio, nel caso degli scaffold con 10 ng/ml di BMP-12, la proliferazione cellulare passa da un valore di circa 8000 ad uno di 11000 (fig.34a), allo stesso modo la tenomodulina passa da 12 a 16 (fig.34b), mentre la tenascina-C da 4 a 6 (fig.34f). In conclusione, si può affermare che l'effetto sinergico della stimolazione meccanica e biochimica si traduce in un miglioramento della vitalità, della proliferazione, dell'allineamento e della differenziazione cellulare [12].

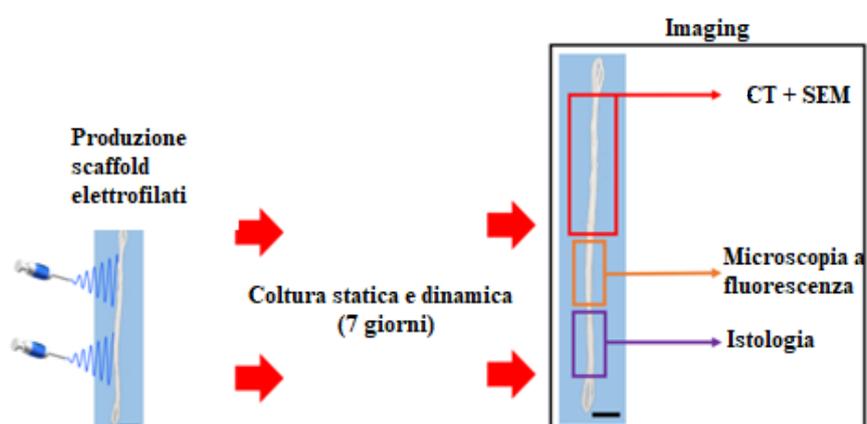
Con l'obiettivo di rigenerare tendini e legamenti, nel 2019, Sensini e coautori hanno creato degli scaffold gerarchici elettrofilati con una morfologia e delle proprietà meccaniche simili al tessuto tendineo/legamentoso investigando, attraverso colture statiche o dinamiche in bioreattore, come questi potessero guidare la proliferazione e la modifica della struttura dei fibroblasti umani. Nello studio proposto, sono stati prodotti quattro scaffold nanofibrosi attraverso la tecnica dell'elettrofilatura al fine di ottenere costrutti, strutturati gerarchicamente, fatti con una miscela di acido poli-L-lattico (PLLA) e Collagene, con un diametro di sezione trasversale delle nanofibre di  $(0,36 \pm 0,06 \mu\text{m})$ . I parametri e i mezzi utilizzati nel processo di elettrofilatura sono molteplici: un collettore e un tamburo con velocità di rotazione di 22,8 m/s, tempo di avanzamento di 0,5 ml/h e velocità di rotazione di 1200 mm/min. Al termine della produzione del fascio di nanofibre, quest'ultimo viene estratto dal tamburo, attorcigliato al centro, ripiegato su sé stesso e ricoperto con una guaina simile ad un epitenon/epiligament. I costrutti sono stati tagliati in pezzi di  $(89,4 \pm 2,1 \text{ mm})$  di lunghezza e  $(1,46 \pm 0,08 \text{ mm})$  di diametro di sezione, coltivati e poi studiati con diverse tecniche di imaging. Le cellule che sono state utilizzate sono dei fibroblasti del prepuzio umano che, insieme ad un mezzo completo, vengono percolati nell'impalcatura attraverso una siringa all'interno di una capsula di Petri sterile. Prima del loro utilizzo, gli scaffold sono stati sterilizzati per immersione su etanolo al 70% per un'ora, poi coltivati con le rispettive cellule ed infine coltivati per altri sette giorni in due condizioni diverse: due scaffold in condizioni statiche e altri due in condizioni dinamiche. La coltura dinamica è stata eseguita attraverso un bioreattore meccanico commerciale (MCB1, CellScale, Waterloo, Ontario, Canada).



*Fig.35 Le immagini rappresentano il bioreattore a stimolazione meccanica (MCB1, CellScale, Waterloo, Ontario, Canada) utilizzato durante lo studio.*

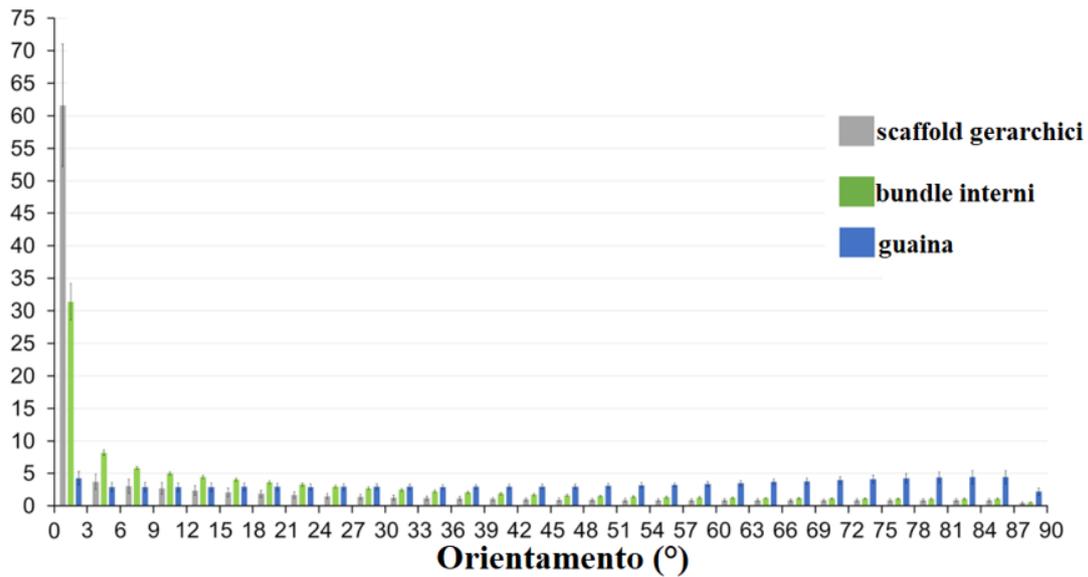
Prima di ogni ciclo di stretching uniassiale, il bioreattore è stato a sua volta sterilizzato con etanolo e radiazioni UV per un'ora, mentre i campioni sono stati ricoperti con 150 ml di mezzo completo. Ciascun costrutto è stato allungato per due volte durante i sette giorni di coltura (precisamente nel terzo e sesto giorno); ogni stimolazione ha avuto una durata di un'ora, una deformazione del 5% e una frequenza di 1 Hz, cioè circa 3600 cicli. Parallelamente alla coltura dinamica, due scaffold su quattro sono stati coltivati staticamente sempre per lo stesso numero di giorni, in matrici T25 con 5 ml di mezzo completo. Dopo i sette giorni di coltura, gli scaffold gerarchici sono stati prima fissati per 48 ore

in paraformaldeide (PFA) al 4% e poi tagliati a metà in modo tale che una parte potesse essere analizzata con l'imaging SEM e micro-CT, mentre l'altra con la microscopia a fluorescenza e l'istologia [33].

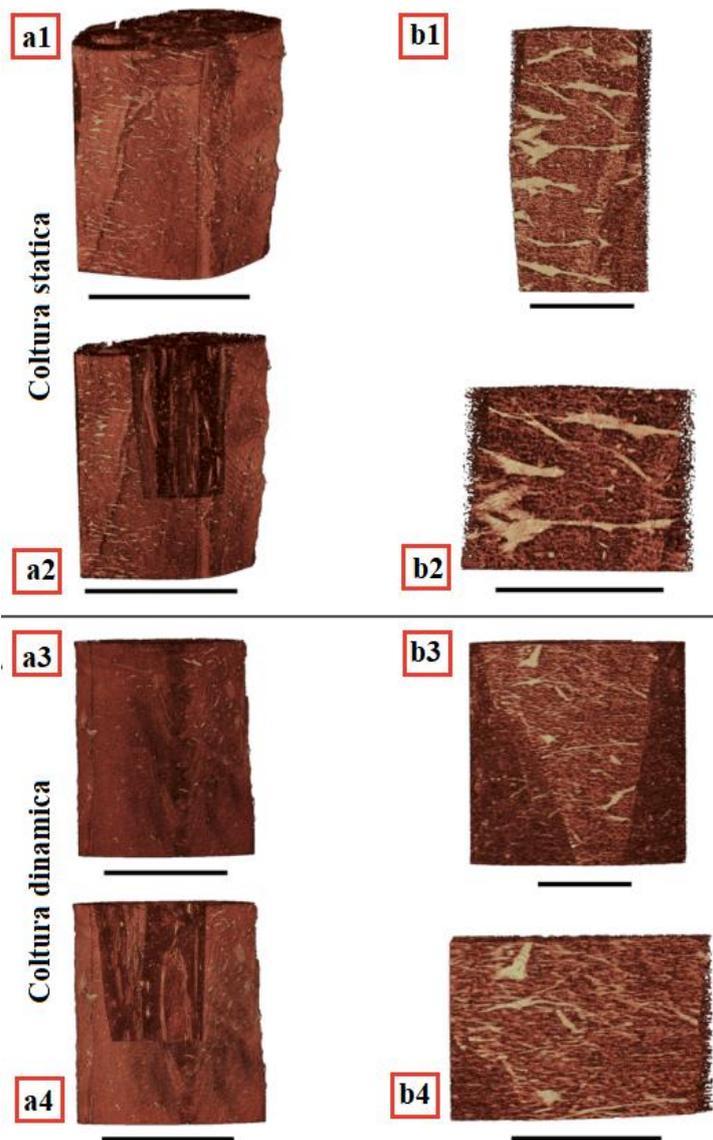


*Fig.36 L'immagine rappresenta il flusso di lavoro effettuato durante la ricerca. Da sinistra: assemblaggio degli scaffold mediante elettrofilatura; coltura in condizioni statiche e dinamiche (con cicli uniassiali di stretching all'interno di un bioreattore); preparazione degli scaffold per le diverse indagini effettuate con varie tecniche di imaging (adattato da [33]).*

Per studiare l'orientamento delle nanofibre e dei fasci nei diversi livelli degli scaffold gerarchici, è stata eseguita un'analisi di direzionalità. Questa ha confermato un orientamento assiale preferenziale delle nanofibre nei fasci interni ( $31,4 \pm 2,82$  %), dove solo una piccola quantità di nanofibre ( $0,55 \pm 0,08$  %) possedeva invece una disposizione perpendicolare. Lo studio ha inoltre mostrato come le nanofibre periferiche presenti nelle guaine avessero un lieve orientamento circonferenziale (circa il 31%), mentre i fasci all'interno dello scaffold gerarchico si trovavano principalmente in una disposizione allineata ( $61,6 \pm 9,43$  %) (fig.37) [33].

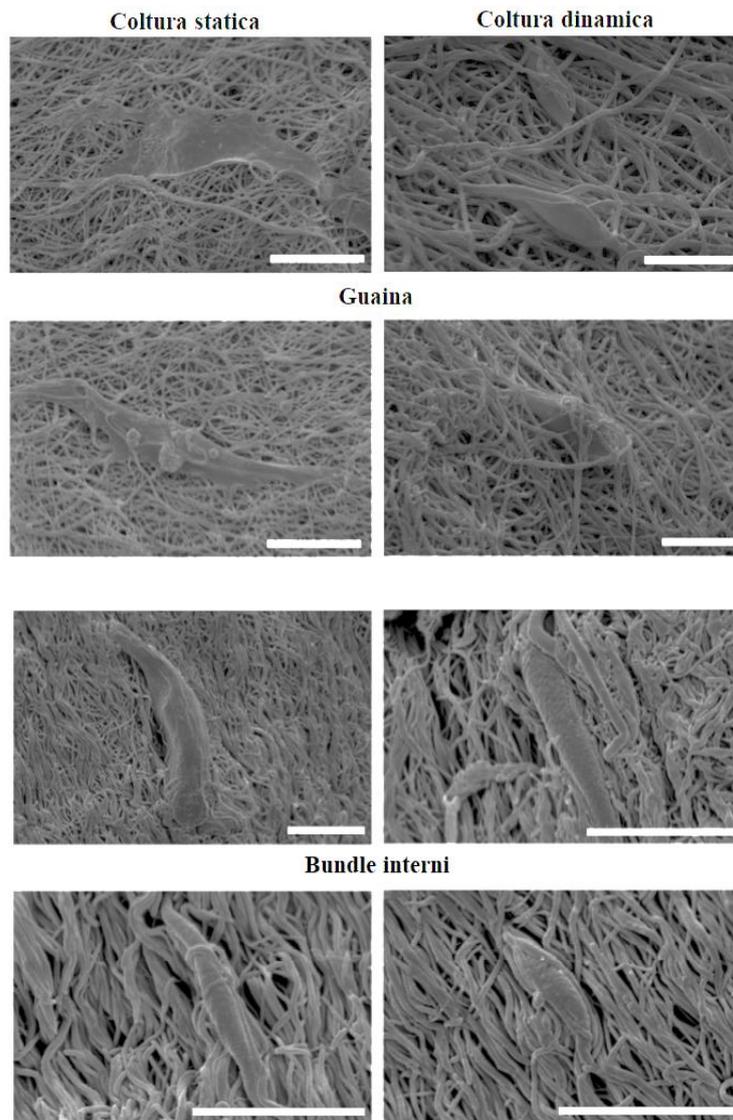


*Fig.37 La figura illustra l'analisi di direzionalità di scaffold e delle sue componenti. Le barre grigie rappresentano l'allineamento dei fasci all'interno dello scaffold gerarchico; le barre verdi rappresentano la distribuzione delle nanofibre nelle diverse direzioni del fascio; le barre blu la distribuzione delle nanofibre sulla guaina elettrofilata. Un angolo di 0° significa che le nanofibre sono allineate con l'asse longitudinale dello scaffold, mentre un angolo di 90° significa che le nanofibre si trovano ad essere perpendicolari all'asse (adattato da [33]).*



*Fig.38 Immagine micro-CT di fibroblasti coltivati sugli scaffold gerarchici in condizioni statiche e dinamiche. È possibile osservare come gli scaffold siano omogenei e i fasci interni fortemente raggruppati. Tra i campioni statici i fibroblasti sono orientati in maniera circonferenziale lungo l'asse delle impalcature, mentre nei campioni dinamici i fibroblasti si trovano ad essere più sottili e con orientamento assiale maggiore (scala bar 200  $\mu\text{m}$ ) (adattato da [33]).*

Come evidenziato già nella micro-CT, anche con la microscopia a scansione elettronica SEM e con la microscopia a fluorescenza, si è potuto osservare che negli scaffold statici, i fibroblasti della guaina esterna hanno ottenuto un orientamento circonferenziale, mentre in quelli dinamici le cellule sono apparse più sottili e prevalentemente allungate lungo l'asse [33].



*Fig.39 Immagini SEM di fibroblasti, sulla guaina elettrofilata e sui fasci interni, coltivati su scaffold gerarchici in condizioni statiche e dinamiche, (scala bar 10  $\mu$ m) (adattato da [33]).*

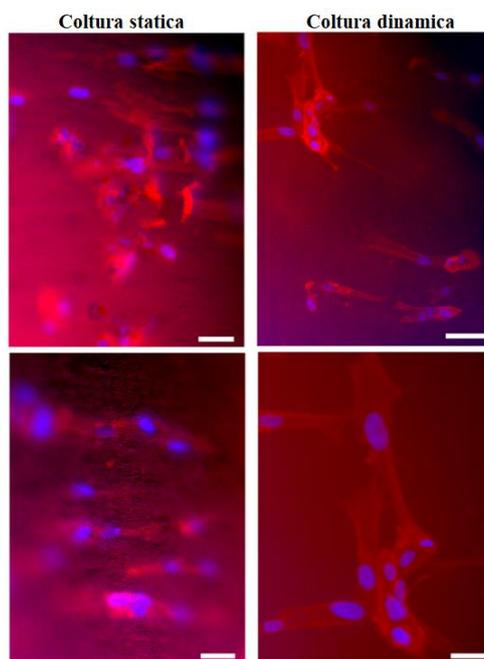


Fig.40 Immagini a microscopio a fluorescenza di fibroblasti coltivati su scaffold gerarchici in condizioni statiche e dinamiche (scala bar 30  $\mu\text{m}$ ) (adattato da [33]).

Attraverso l'analisi di direzionalità dei nuclei cellulari nelle guaine elettrofilate, si è visto come il 71,1 % delle cellule coltivate in condizioni statiche fosse orientato in un intervallo di  $72^\circ$ - $90^\circ$ , mentre il 53,4 % delle cellule coltivate in campioni dinamici sono orientate in un intervallo angolare di  $0^\circ$ - $18^\circ$  (fig.41)

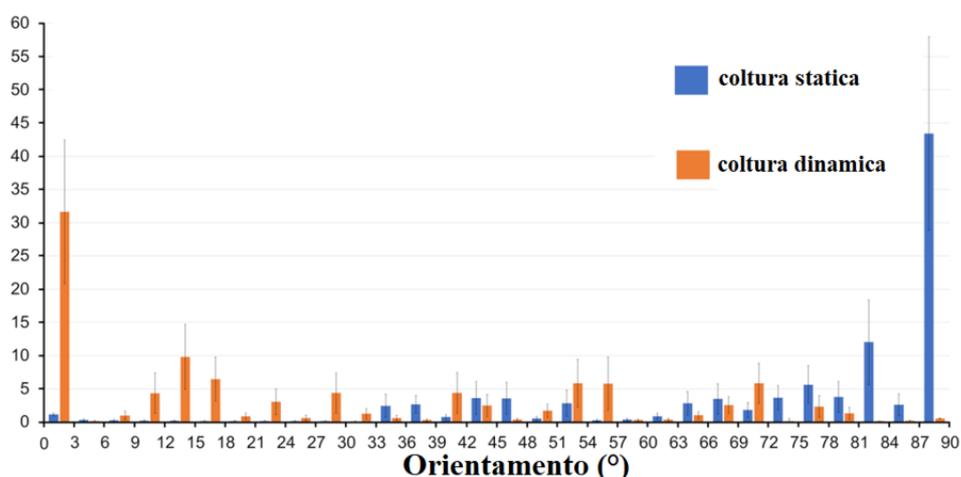
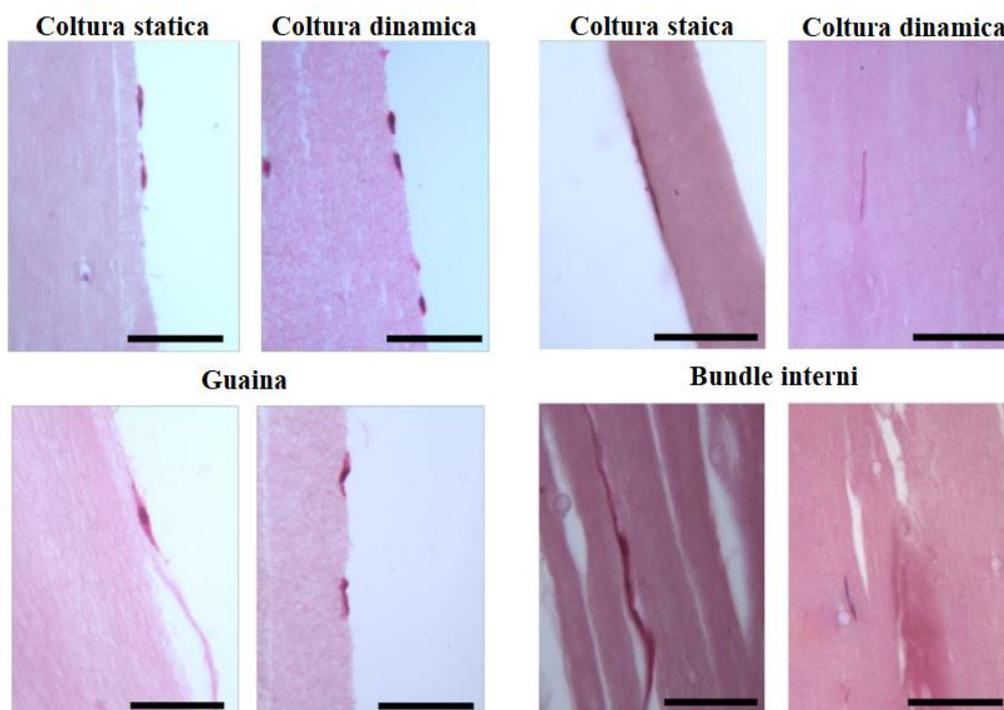


Fig.41 Il grafico raffigura l'analisi di direzionalità delle cellule cresciute sulle guaine elettrofilate in condizioni statiche (in blu) e dinamiche (in arancione) (adattato da [33]).

Con l'analisi istologica, per quanto riguarda lo studio della guaina esterna, sia nei campioni statici che in quelli dinamici i fibroblasti appaiono disposti preferenzialmente in maniera circonferenziale a causa del ridotto allungamento assiale dei loro corpi. Sui campioni dinamici però, i fibroblasti sono riusciti ad infiltrarsi all'interno degli scaffold gerarchici, allineandosi nella direzione delle nanofibre [33].

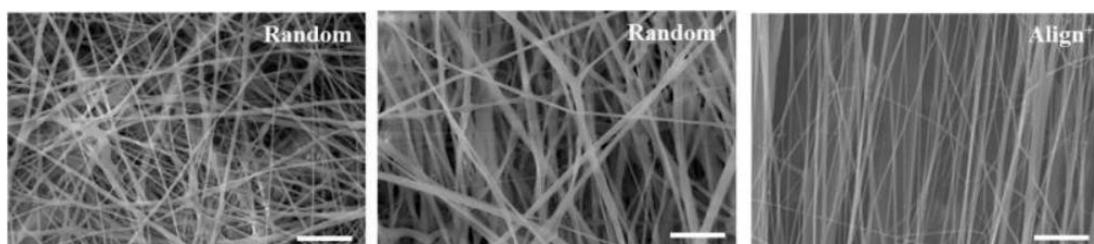


*Fig.42 L'immagine rappresenta l'indagine istologica degli scaffold elettrofilati coltivati in condizioni statiche e dinamiche nella guaina elettrofilata e sulle nanofibre dei fasci interni (scala bar 50  $\mu$ m) (adattato da [33]).*

Attraverso l'uso della coltura dinamica la morfologia delle cellule dei fasci interni è modificata; queste, infatti, sono risultate più appiattite (con ridotto spessore) e fuse insieme, suggerendo una proliferazione più efficace. Grazie all'integrazione di varie tecniche di imaging tra la tomografia a raggi X ad alta risoluzione (micro-CT), la microscopia a scansione elettronica (SEM), la

microscopia a fluorescenza e l'istologia, i ricercatori hanno potuto osservare i cambiamenti morfologici e di orientamento delle cellule. Sono pertanto arrivati alla conclusione che gli scaffold elettrofilati, insieme ad un'opportuna coltura dinamica eseguita con bioreattori meccanici, permettono di orientare le cellule nella direzione assiale sia nella zona interna che in quella esterna al costrutto; ciò potrebbe quindi risultare adatto per studi futuri in vivo [33].

Con l'intento di ricreare del tessuto tendineo in vitro con le rispettive caratteristiche biochimiche e biofisiche, Chih-Hao Chen e coautori hanno utilizzato vari tipi di scaffold elettrofilati e osservato i cambiamenti dell'ambiente e delle proprietà di questi con e senza l'uso di bioreattori a stimolazione meccanica. Sono stati preparati tre tipi di scaffold a membrana in nanofibra: nanofibre casuali con nucleo di acido ialuronico (HA) e guaina in policaprolattone (PCL) (Random), nanofibre casuali con nucleo HA/plasma ricco di piastrine (PRP) e guaina PCL (Random<sup>+</sup>) e nanofibre allineate con nucleo HA/PRP e guaina PCL (Align<sup>+</sup>) [39].



*Fig.43 Immagini a scansione SEM (scala bar 10  $\mu$ m) degli scaffold elettrofilati in cui si evidenzia la differenza tra una distribuzione di nanofibre casuale e una allineata (adattato da [39]).*

I costrutti sono stati coltivati con circa  $10^4$  tenociti di coniglio e tagliati con dimensioni di 0,5 cm x 0,5 cm e 8-10 mg di peso ciascuno. Grazie anche al solo utilizzo di scaffold elettrofilati, si è osservato una crescita unidirezionale dei tenociti, indotta dalla topografia delle fibre allineate (fig.43). Per quanto riguarda le proprietà meccaniche degli scaffold, le curve tensione-deformazione

ottenute grazie ad una prova di trazione con una cella di carico di 10 N, indicano che Align<sup>+</sup> ha migliori proprietà meccaniche (fig.44).

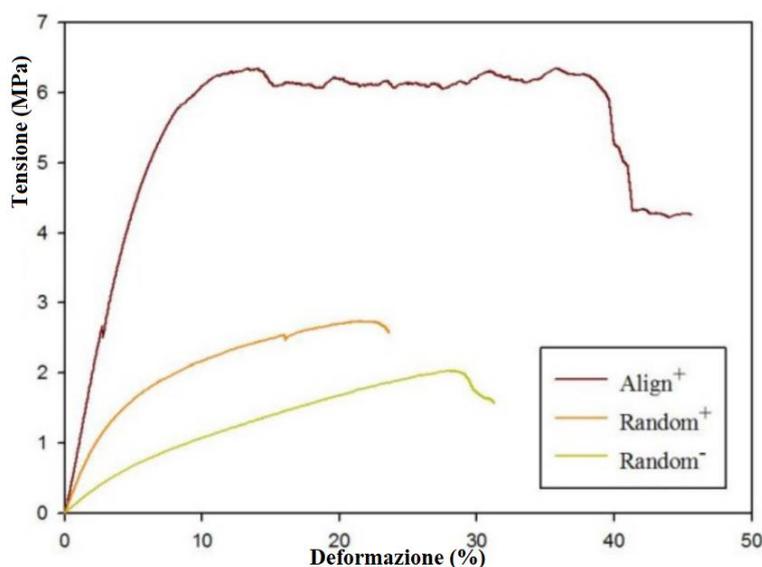


Fig.44 Il grafico tensione-deformazione raffigura la prova di trazione meccanica di Random, Random<sup>+</sup> e Align<sup>+</sup> (adattato da [39]).

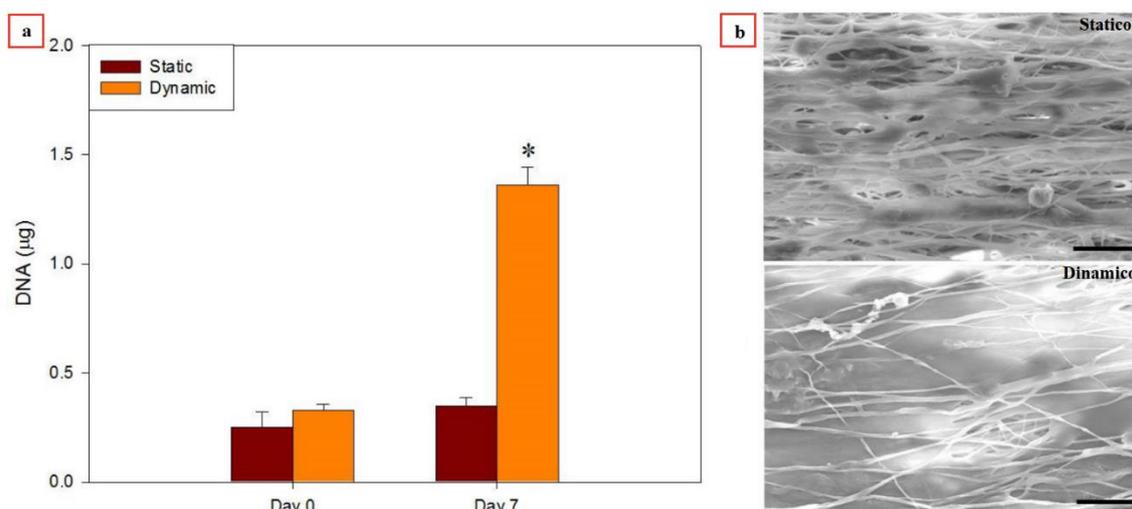
L'orientamento delle fibre influenza notevolmente le proprietà meccaniche dei costrutti, infatti le fibre allineate forniscono uno scaffold più rigido con un modulo di Young più alto, rispetto alle fibre casuali. Il modulo di Young di Align<sup>+</sup> è 76,02 MPa cioè 4,1 volte e 8,5 volte quello di Random<sup>+</sup> e Random. Anche lo stress finale e la deformazione finale sono significativamente più alti per Align<sup>+</sup> rispetto agli altri. Il grado di cristallinità delle membrane di nanofibre PCL allineate è risultato superiore a quello delle membrane di nanofibre PCL casuali; ciò può aumentare la resistenza alla trazione oltre all'effetto dell'allineamento delle fibre [39]. Complessivamente i tre scaffold utilizzati (Random, Random<sup>+</sup> e Align<sup>+</sup>) hanno proprietà meccaniche differenti: rispettivamente, una tensione a rottura di  $(2,21 \pm 0,99 \text{ MPa})$ ,  $(1,61 \pm 0,51 \text{ MPa})$ ,  $(6,62 \pm 0,21 \text{ MPa})$ ; una deformazione a rottura di  $(31,3 \pm 1,4 \%)$ ,  $(23,63 \pm 1,1 \%)$ ,  $(45,65 \pm 1,0 \%)$  e un modulo di Young di  $(8,90 \pm 0,88 \text{ MPa})$ ,  $(18,64 \pm 4,08 \text{ MPa})$ ,  $(76,02 \pm 9,21 \text{ MPa})$  [39]. I ricercatori hanno voluto poi osservare i cambiamenti delle cellule a seguito di coltura statica e dinamica, cioè con e

senza stimolazioni biochimiche e biofisiche, attraverso l'utilizzo di bioreattori. La coltura dinamica è avvenuta grazie al bioreattore a stimolazione ciclica meccanica chiamato "ElectroForce" (fig.45) che ha effettuato uno stiramento di 3 ore al giorno per 7 giorni consecutivi, ad una velocità di deformazione del 6% e ad una frequenza di 1 Hz. È stato utilizzato lo scaffold Align<sup>+</sup> poiché ha dimostrato di possedere migliori proprietà meccanico-chimiche [39].



*Fig.45 L'immagine rappresenta il bioreattore a stimolazione meccanica "ElectroForce" utilizzato durante lo studio.*

Attraverso la coltura dinamica, si sono registrati una riduzione dei tempi di rigenerazione del tendine in vitro (infatti in dinamica si ottengono circa 1,5 $\mu$ g di DNA in 7 giorni a fronte dei 21 giorni necessari nella coltura statica) (fig.46), migliori tassi di proliferazione (fig.46) e di differenziazione tenogena (fig.47).



*Fig.46 Il grafico a) raffigura la differenza di proliferazione che si ha tra il giorno 0 e il giorno 7 con coltura dinamica o statica. Attraverso la stimolazione ciclica si può osservare come i valori di DNA siano notevolmente incrementati. L'immagine b) a microscopia elettronica a scansione SEM (scala bar 20 $\mu$ m) rappresenta l'orientamento dei tenociti dopo la coltura statica e dinamica al termine dei 7 giorni, in scaffold di membrana in nanofibra allineata CSNM (adattato da [39]).*

La proliferazione dei tenociti ha avuto un aumento di DNA di 3,9 volte rispetto alla coltura statica (fig.46a). Tutto ciò si è osservato grazie ad un'attenta analisi effettuata con il microscopio a scansione SEM dalla quale si è riscontrato un vertiginoso aumento della densità cellulare dei tenociti (fig.46b). Inoltre, la matrice extracellulare ECM secreta dai tenociti è notevolmente migliorata quando sottoposta a ripetuti stress meccanici per imitare le condizioni riscontrate durante la crescita delle cellule, dove il carico meccanico può indurre

una fenotipizzazione favorevole. La coltura dinamica induce una maturazione tendinea più rapida; infatti, l'espressione genica individuata da qRT-PCR sotto stimolazione ripetuta porta ad un aumento di collagene di tipo I, biglycan e tenascina-C e ad una diminuzione dei geni di collagene di tipo III (fig.47). Oltre a essere vantaggioso per la crescita dei tenociti, il carico meccanico controllato durante la coltura dinamica può anche aumentare l'espressione di geni tendinei specifici attraverso cambiamenti anabolici. Dall'esame al microscopio confocale, si è osservato come l'allineamento dei tenociti si sia preservato o addirittura sia migliorato durante la coltura dinamica, con stimolazione uniassiale nella direzione dell'allineamento delle fibre (fig.48) [39].

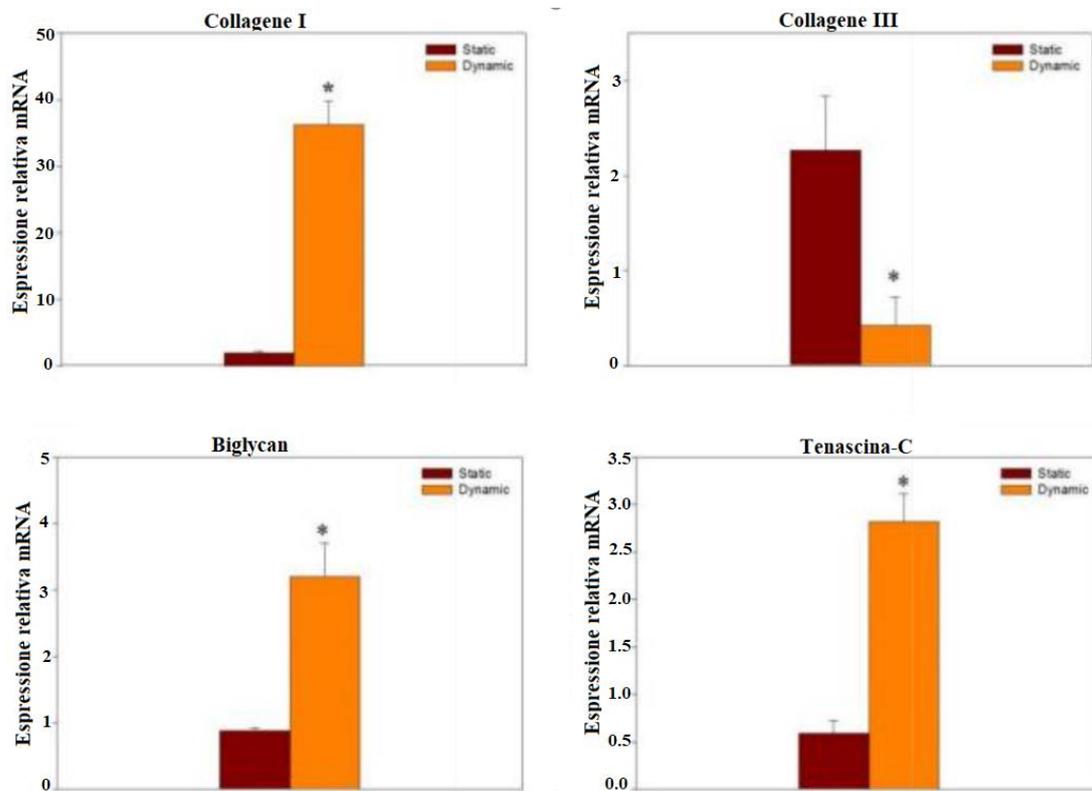
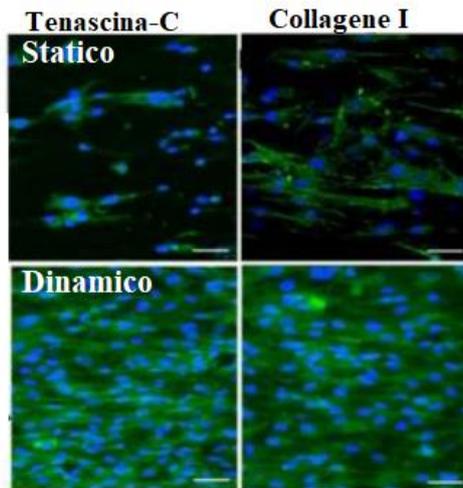


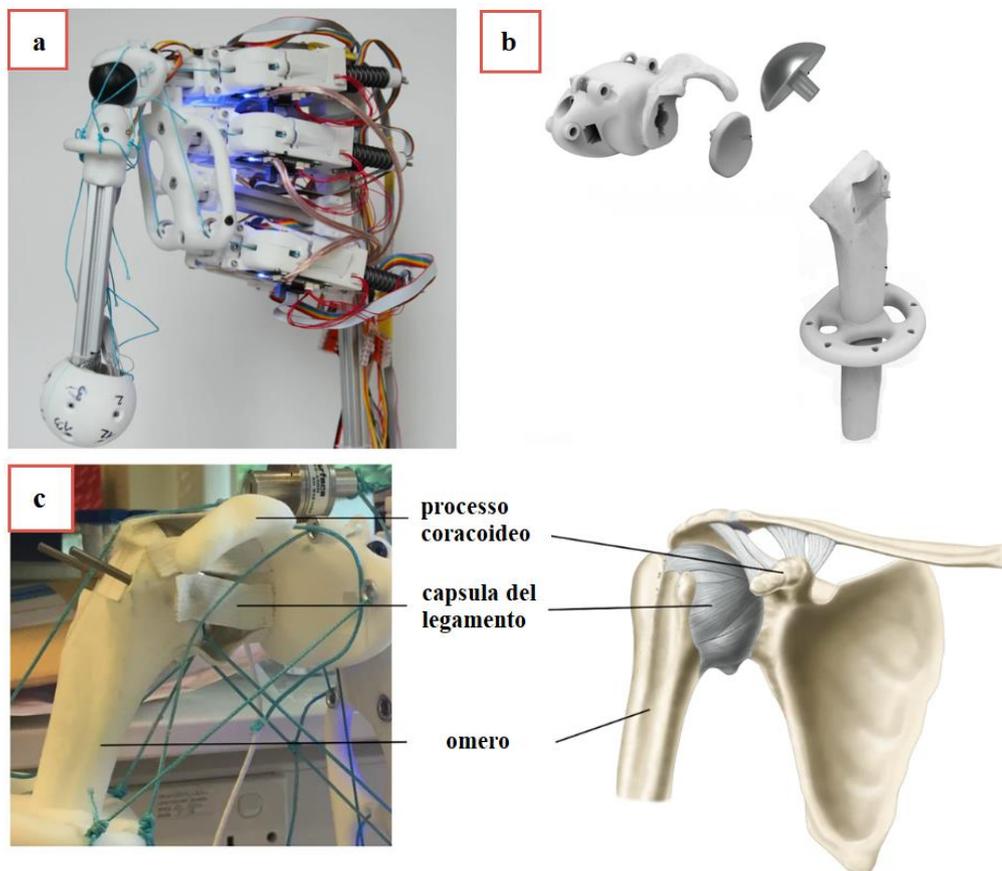
Fig.47 L'immagine raffigura l'espressione relativa dell'mRNA attraverso la variazione di Collagene I, Collagene III, Biglycan e Tenascina-C tra la coltura statica e la dinamica (adattato da [39]).



*Fig.48 Immagine a fluorescenza (scala bar 50  $\mu$ m) dopo aver effettuato la colorazione con immunofluorescenza della tenascina-C e del collagene I (adattato da [39]).*

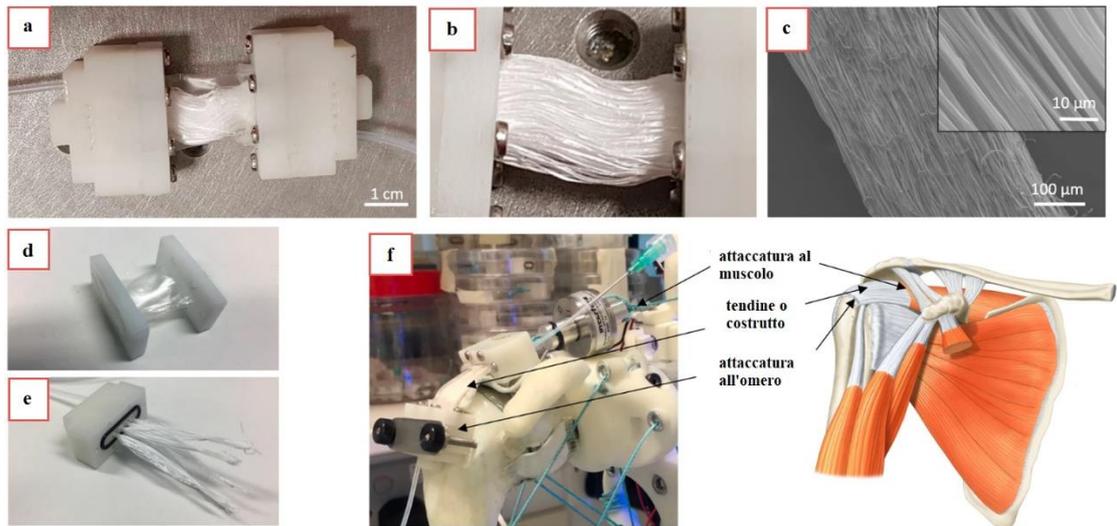
In conclusione, si può affermare come i tenociti mostrano sia tassi di proliferazione più elevati che un migliore mantenimento del fenotipo tenogenico quando vengono coltivati in un bioreattore con stimolazione ciclica della tensione. È percepibile che la coltura dinamica possa accelerare la maturazione del tendine con la regolazione concertata dei geni rilevanti, durante il processo di maturazione, e l'aumento della proliferazione cellulare. Nel complesso, combinando la stimolazione meccanica con l'ambiente di coltura cellulare 3D in Align<sup>+</sup>, è stato possibile ottenere il miglior mantenimento del fenotipo dei tenociti. Quindi l'esposizione dei tenociti a segnali biofisici e biochimici può migliorare i risultati dell'ingegneria dei tessuti tendinei in vitro [39].

Per studiare la fattibilità di un bioreattore umanoide nel contesto dell'ingegneria tissutale dei tendini dell'articolazione della spalla, Mouthuy e coautori hanno progettato (e pubblicato i risultati nel 2022) una camera di bioreattore flessibile che può essere collegata ad un'articolazione della spalla di un robot umanoide muscoloscheletrico (MSK), dimostrando che le cellule di fibroblasti possono essere coltivate mentre subiscono adduzione-abduzione fisiologica sul braccio robotico. Il robot umanoide impiegato in questo studio è una versione modificata dell'articolazione della spalla proposta dal toolkit robotico MSK modulare open source di Devanthro [40].



*Fig.49 a) Design originale del braccio umanoide (Devanthro); b) parti chiave del nuovo design della spalla che mostra un omero stampato in 3D (parziale) e una presa di giunzione (con processo coracoideo), dotato dei due componenti di un impianto di spalla senza stelo; c) articolazione della spalla assemblata che sostituisce quella originale (a sinistra) che mostra somiglianze con la struttura di una spalla umana (a destra) (adattato da [40]).*

I ricercatori hanno progettato una camera di bioreattore le cui componenti principali (biocompatibili) includono una matrice artificiale (scaffold) porosa e allineata, una membrana tubolare (un sottile foglio di poliuretano trasparente arrotolato in una forma tubolare) e inserti rigidi con tubi attaccati. Lo scaffold è costituito da filamenti paralleli di policaprolattone prodotti mediante elettrofilatura, ciascuno dei quali è costituito da fibre submicrometriche allineate con un diametro medio di  $1\mu\text{m}$  (fig.50c). 200 filamenti (raggruppati in 5 fasci di 40 filamenti ciascuno) sono stati tesi attraverso la membrana tubolare e fissati negli inserti ad entrambe le estremità (fig.50a-b). Questa struttura altamente anisotropa è stata progettata per imitare l'allineamento delle fibre di collagene nei tendini. L'uso di filamenti paralleli ha portato ad ottenere una struttura altamente porosa con ampi spazi che consentono la distribuzione delle cellule attraverso l'impalcatura durante la coltura. La camera assemblata risultante offre due vantaggi principali rispetto alle camere dei bioreattori esistenti. Il primo riguarda la morbidezza e flessibilità della camera, ciò fa sì che le sollecitazioni di torsione, compressione e trazione possono essere facilmente trasmesse attraverso la membrana non portante; mentre il secondo riguarda l'indipendenza della camera dal sistema di attuazione, ciò facilita la manipolazione della struttura del tessuto durante la coltura in modo da effettuare un monitoraggio non invasivo della vitalità cellulare. La camera è stata posizionata in corrispondenza del tendine sovraspinato: un'estremità è stata inserita nella testa omerale, mentre l'altra è stata fissata alla corda muscolare superiore tramite un sensore di forza (fig.50f) [40].



*Fig.50 Insieme di immagini rappresentanti: a) camera del bioreattore assemblata; b) messa a fuoco sul materiale dell'impalcatura; c) immagini SEM di un singolo filamento a due diversi ingrandimenti che mostrano le microfibre altamente allineate; d) membrana e le sue parti di sostegno; e) fasci di filamenti inseriti nei canali ciechi dell'insero principale; f) camera posizionata in corrispondenza della posizione sovraspinato sul braccio robotico (a sinistra) e la rispettiva la corrispondenza con la posizione del tendine su una spalla umana (a destra) (adattato da [40]).*

Per quanto riguarda le caratteristiche fisico-meccaniche della camera di bioreattore, la caratterizzazione delle proprietà di trazione indica che la membrana ha contribuito in modo trascurabile al carico a basse deformazioni, mentre ha mantenuto la sua integrità fino al  $(440,8 \pm 47,8 \%)$  di deformazione (fig.51c). Nel caso degli scaffold, invece, è stata osservata una sollecitazione massima di  $(150,0 \pm 26,5 \text{ MPa})$  corrispondente ad una deformazione pari a  $(34,8 \pm 3,5 \%)$  (fig.51c). La curva a campana riportata (fig.51c) evidenzia la vertiginosa differenza che vi è tra il modulo di Young dello scaffold pari a  $(550,6 \pm 63,4 \text{ MPa})$  e quello della membrana pari a  $(10,3 \pm 1,0 \text{ MPa})$  (fig.51d). Nel complesso, le proprietà meccaniche dell'impalcatura elettrofilata corrispondono ragionevolmente ai valori tipicamente osservati per i tessuti tendinei umani [40].

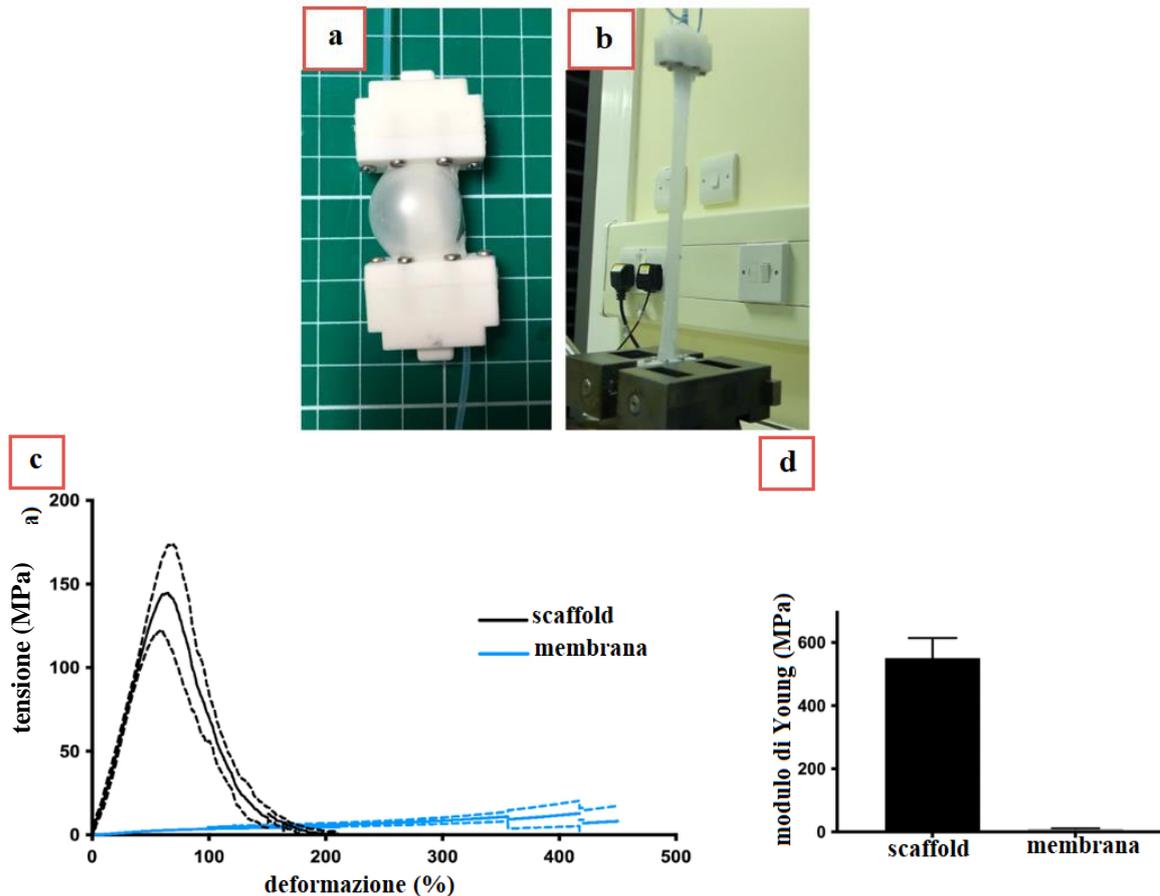
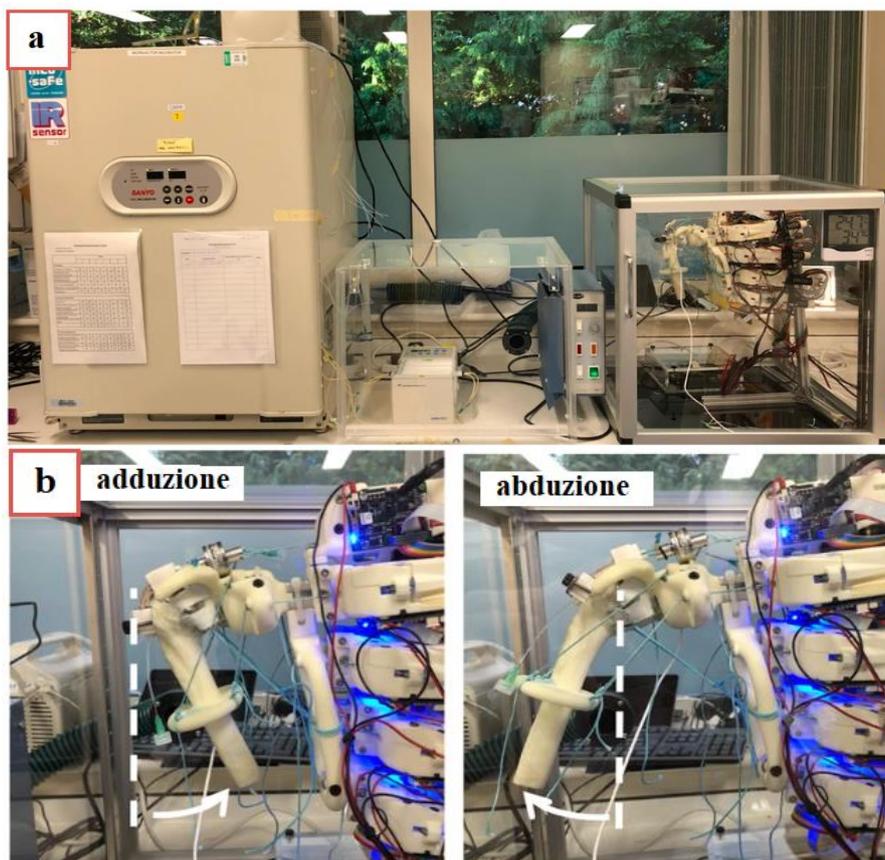


Fig.51 L'immagine a) rappresenta la camera sotto pressione d'aria con rispettiva espansione della membrana, mentre la b) la prova di trazione fino a rottura di una camera mostrando come la membrana si mantenga integra a sollecitazioni elevate. Il grafico c) raffigura la curva tensione-deformazione media dello scaffold e della membrana (misurate separatamente) con deviazione standard (linee tratteggiate), suggerendo il piccolo contributo della membrana alla sollecitazione a basse deformazioni. L'istogramma d) riporta il modulo di Young dell'impalcatura e della membrana a basse deformazioni, le barre di errore rappresentano la deviazione standard (adattato da [40]).

Per la coltura cellulare sono stati utilizzati dei fibroblasti umani coltivati negli scaffold elettrofilati successivamente inseriti all'interno delle camere dei bioreattori. Le camere sono state collegate ad un sistema di perfusione contenente una pompa peristaltica, un ossigenatore e una bottiglia serbatoio

contenente un mezzo di coltura. Durante la perfusione, la camera è stata riempita con circa 2 ml di mezzo di coltura, che è notevolmente inferiore ai volumi tipici che circondano i costrutti di tessuto nelle camere dei bioreattori esistenti (in genere tra 10 e 100 ml). Dopo un periodo di riposo di 24 ore dalla coltura cellulare, i campioni dinamici sono stati trasferiti quotidianamente per un periodo di 30 minuti sul braccio umanoide per subire movimenti di adduzione-abduzione (fig.52b) [40].



*Fig.52 L'immagine a) rappresenta il bioreattore utilizzato con l'incubatrice (a sinistra), la pompa peristaltica (al centro) e il braccio umanoide (a destra); la b) il braccio in movimento in adduzione e abduzione (adattato da [40]).*

Sono stati utilizzati due regimi di carico: un regime a bassa forza (LFR) e uno ad alta forza (HFR); i movimenti sono stati eseguiti alla frequenza di 4 alzate del braccio al minuto (circa 0,066 Hz) ed è stato imposto un periodo di riposo

di 5 secondi ad ogni sollevamento. Il regime LFR ha mostrato una forza media di 11 N, mentre il regime HFR ne ha mostrata una di 45 N (fig.53). L'intervallo di forza utilizzato nel braccio robotico è coerente con quelli stimati nel tendine sovraspinato per piccoli movimenti di adduzione-abduzione. Durante l'applicazione delle forze, le deformazioni calcolate hanno mostrato valori pari a circa il 2,6 % per l'LFR e l'8% per l'HFR [40].

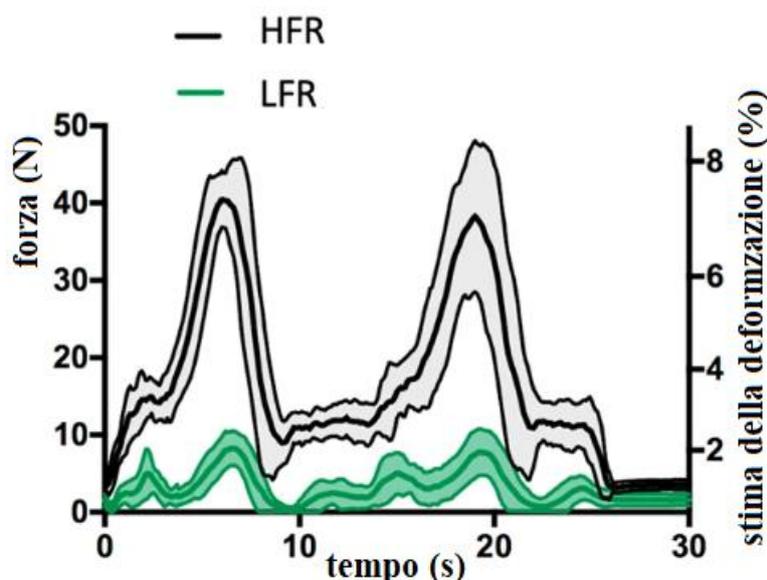


Fig.53 Il grafico raffigura le forze misurate e deformazioni stimate per LFR e HFR, i limiti superiori e inferiori rappresentano la deviazione standard (adattato da [40]).

A livello cellulare, attraverso la microscopia confocale e la colorazione istologica delle criosezioni del campione è stata rilevata una sostanziosa presenza di cellule nei campioni statici e LFR, al contrario, nei campioni HFR ve ne erano poche (fig.54d-i). È stata osservata una proliferazione cellulare più veloce per i costrutti statici, mentre una leggermente più lenta per LFR e una riduzione della popolazione cellulare per il regime HFR (fig.54l). Indipendentemente dalla condizione applicata, le cellule hanno mostrato una morfologia molto allungata [40].

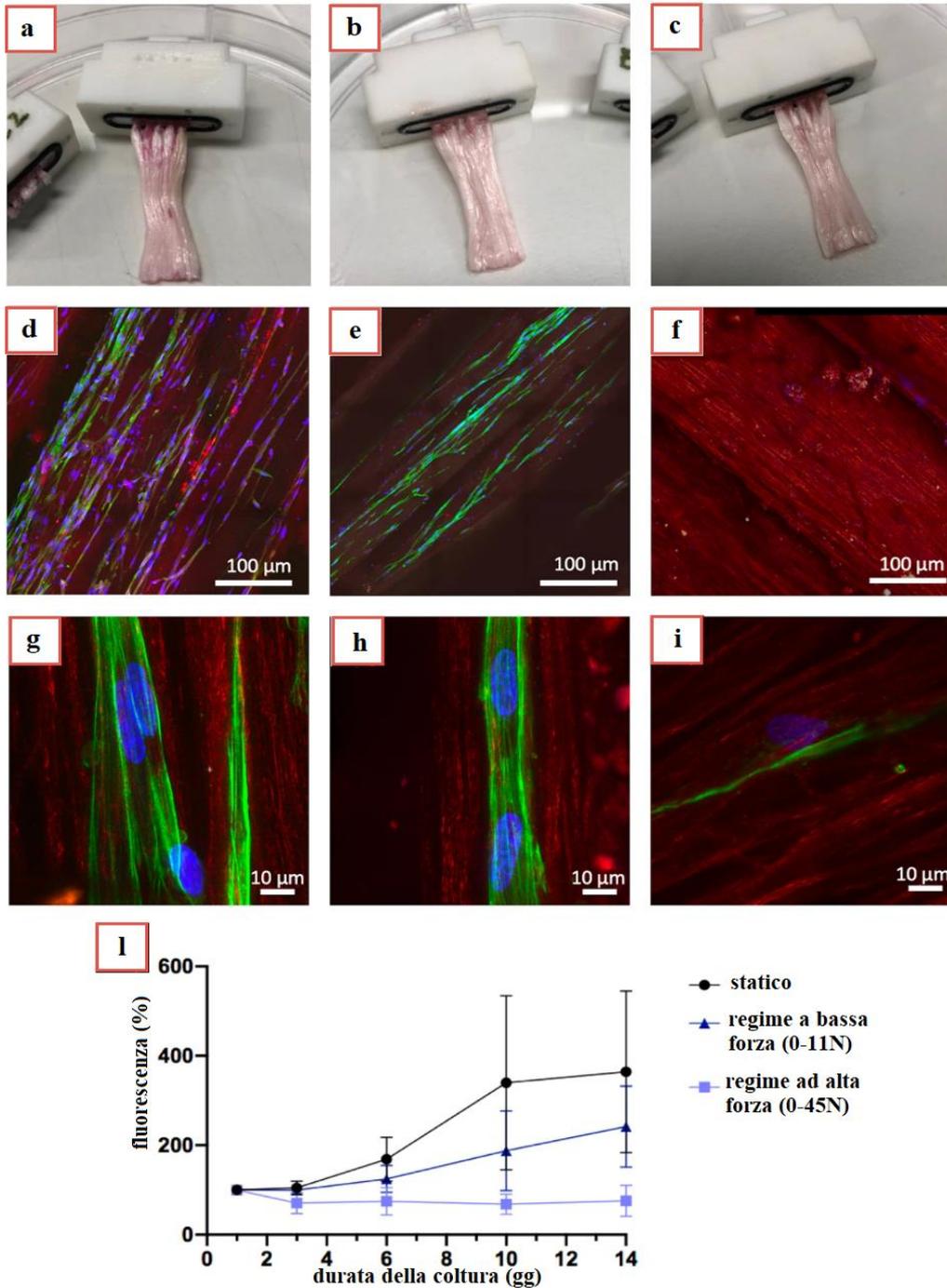


Fig.54 Le immagini a) b) e c) mostrano l'aspetto grossolano dei campioni dopo un periodo di coltura di 14 giorni di fibroblasti umani rispettivamente nel caso statico, LFR e HFR. Al di sotto sono presenti le immagini a fluorescenza panoramiche e di dettaglio che mostrano le cellule (verde: actina, blu: nuclei) nei campioni statici d) g), LFR e) h) e HFR f) i). Nel grafico l) sono riportati i dati di vitalità ottenuti dal test PrestoBlue per campioni coltivati per 14 giorni nei diversi regimi di carico (adattato da [40]).

La riduzione del numero di cellule osservata sotto regime HFR (0-45 N) suggerisce che le cellule hanno subito l'apoptosi o si sono staccate dallo scaffold in risposta agli elevati stress meccanici. La rigidità dello scaffold (550 MPa) è molto più alta rispetto a quelli testati in altri studi (tipicamente < 100 MPa). L'elevata rigidità potrebbe aver provocato sforzi di taglio locali sfavorevoli per la sopravvivenza cellulare all'HFR. Al contrario, le impalcature più morbide imitano meglio le proprietà meccaniche del tendine ai diversi livelli gerarchici e possono ridurre lo stress cellulare e migliorare la vitalità. Un altro motivo che porta alla ridotta proliferazione cellulare è che i carichi sono stati applicati molto presto dopo la coltura cellulare (al giorno 1), mentre regimi di carico progressivi potrebbero dare più tempo alle cellule per generare un ambiente di matrice extracellulare più adatto. Infine, è probabile che i costrutti cellula-materiale abbiano subito sollecitazioni di compressione sotto adduzione-abduzione, influenzando la vitalità cellulare, a differenza di quando sono sottoposti a carico uniassiale nei bioreattori tradizionali. In conclusione, si può affermare che imponendo forze fisiologiche, la configurazione del bioreattore umanoide applica sollecitazioni ai costrutti di materiale cellulare in modo simile a ciò che il corpo umano fa al tendine sovraspinato o farebbe a un materiale impiantato in quella posizione anatomica. Questo approccio porta quindi una chiara rilevanza clinica per l'ingegneria dei tessuti anche se sarà necessario nei lavori futuri garantire che il bioreattore umanoide corrisponda meglio alle prestazioni dei bioreattori tradizionali in termini di vitalità e cambiamenti nell'espressione genica, esplorando materiali di scaffold più simili a quelli utilizzati in precedenza, coinvolgendo una gamma più ampia di regimi di carico e garantendo un movimento con almeno 3 gradi di libertà (invece che uno, come in questo caso) [40].

*Tabella 4* Cellule utilizzate negli studi presi in esame per la rigenerazione dei tessuti tendini e legamentosi lesionati:

<i>Tipo di cellula</i>	<i>Applicazioni</i>	<i>Architettura scaffold</i>	<i>Riferimenti</i>
MSC umane di teste femorali	tendini/legamenti	bundle raggruppati in 3, 4 o 5	[38]
MSC umane del midollo osseo	tendini	scaffold elettrofilati	[26]
MSC del midollo osseo di un donatore umano	tendini/legamenti	scaffold elettrofilati compositi multistrato	[12]
fibroblasti del prepuzio umano	tendini/legamenti	scaffold nanofibrosi	[33]
tenociti di coniglio	tendini	scaffold a membrana in nanofibra	[39]
fibroblasti umani	tendine	scaffold elettrofilati	[40]

*Tabella 5* Proprietà meccaniche dei vari scaffold presi in esame negli studi per la rigenerazione dei tessuti tendini e legamentosi lesionati:

<i>Tensione a rottura a trazione (MPa)</i>	<i>Modulo elastico a trazione/compressione (MPa)</i>	<i>Deformazione di rottura (%)</i>	<i>Riferimenti</i>
7,62 ± 0,2	55,0 ± 2,8	70	[38]
100-110	52-70	-	[26]
12-14	33-40	70-80	[12]
-	-	-	[33]
6,62 ± 0,21	76,06 ± 9,21	45,65 ± 1,0	[39]
150,0 ± 26,5	550,6 ± 63,4	34,8 ± 3,5	[40]

Tabella 6 Tipologie di bioreattore utilizzate e relative proprietà:

<i>Tipo bioreattore</i>	<i>Proprietà bioreattore</i>				<i>Riferimenti</i>
	<i>Frequenza (Hz)</i>	<i>Deformazione (%)</i>	<i>Ore Stimolazione al giorno (h/gg)</i>	<i>Giorni coltura (gg)</i>	
meccanico “Electroforce multicamera BioDynamic”	1	10	2	10	[38]
meccanico BOSE	1	5	1	21	[26]
meccanico idealizzato dai ricercatori	1	10	4	7	[12]
meccanico “MCB1, CellScale”	1	5	1	2	[33]
meccanico “ElectroForce”	1	6	3	7	[39]
braccio umanoide Devanthro + perfusione	0,066	2,6 / 8	$\frac{1}{2}$	14	[40]

Tabella 7 Proprietà meccaniche degli scaffold prima e dopo l'uso del bioreattore:

<i>Caratteristiche meccaniche</i>	<i>Coltura statica</i>		<i>Coltura dinamica</i>		<i>Riferimenti</i>
	<i>7 giorni</i>	<i>21 giorni</i>	<i>7 giorni</i>	<i>21 giorni</i>	
<i>Resistenza a trazione (MPa)</i>	10	20	14	50	[26]
<i>Modulo di Young (MPa)</i>	50	80	40	100	[26]

### **2.3 Conclusioni e sviluppi futuri**

Con l'effettivo progresso dell'ingegneria tissutale, grazie anche alla produzione di scaffold sempre più specifici e vicini alla struttura interna del tessuto nativo come nel caso degli elettrofilati, si stanno facendo enormi passi avanti sulla rigenerazione dei tessuti, specialmente di quelli connettivi come il tendine e il legamento. Nel seguente elaborato, sono stati messi in evidenza quelli che sono i vantaggi nell'utilizzo di scaffold elettrofilati uniti ad una coltura dinamica effettuata da dei bioreattori a stimolazione meccanica. Questi vantaggi si traducono in un aumento della produzione di matrice extracellulare che ha portato ad un miglior attaccamento, proliferazione e crescita cellulare nel tessuto ingegnerizzato. Grazie alla coltura dinamica, le cellule nello scaffold hanno modificato la loro morfologia allungandosi lungo le nanofibre, ottenendo quindi un maggior orientamento e allineamento nella direzione del regime di carico. Complessivamente, si è osservato un netto miglioramento delle proprietà meccaniche dei costrutti prodotti, sempre più simili a quelle dei tessuti nativi, ciò potrebbe quindi incrementare le probabilità di successo dei processi di guarigione e rigenerazione dei tessuti lesionati. Come mostrato nell'ultimo articolo citato, già ad oggi, si stanno sviluppando bioreattori sottoforma di robot

umanoidi che forniscono stimolazioni meccaniche fisiologicamente rilevanti ad innesti e impianti che potrebbero accelerare il loro dispiegamento clinico, producendo costrutti con proprietà sempre più simili ai tessuti nativi. In futuro, con il progressivo miglioramento di queste strumentazioni, avvicinandosi sempre di più agli stimoli fisiologici subiti dagli scaffold per i tessuti tendinei e legamentosi, si potrà offrire un valido supporto in vitro che suggerisca come questi costrutti risponderanno poi in vivo. Per più di 20 anni, i sistemi di bioreattori robotici hanno facilitato la crescita di costrutti di ingegneria tissutale utilizzando la stimolazione meccanica. Tuttavia, non siamo ancora in grado di produrre innesti funzionali che possano tradursi in uso clinico. Infatti, si continua ancora a ricercare la giusta combinazione di biomateriali per la produzione degli scaffold elettrofilati e la giusta calibrazione e fabbricazione dei bioreattori, affinché si riescano ad ottenere dei tessuti ingegnerizzati completamente compatibili e sostituibili a quelli nativi non più funzionanti.

## ***Ringraziamenti***

A conclusione di questo elaborato, desidero menzionare tutte le persone senza le quali questo lavoro di tesi non esisterebbe nemmeno.

In primis, un ringraziamento speciale al mio relatore Alberto Sensini, per me una guida, disponibile in ogni momento per suggerimenti e chiarimenti.

Ringrazio infinitamente i miei genitori per aver creduto in me fin dal primo istante e per esserci sempre stati, soprattutto nei momenti più difficili. Grazie babbo per essere stato il primo ad indirizzarmi in questo percorso e mamma per aver sopportato le mie ansie e paure, la tua compagnia mentre ripetevo svariati esami, per ore e ore, è stata essenziale.

Ringrazio tutta la mia famiglia, ma soprattutto le mie nonne che, oltre ad avermi sempre incoraggiata, hanno fatto in modo che mi sentissi a casa anche a distanza, inviandomi cibo e sughi per tutto l'arco dei tre anni.

Un pensiero va anche a mio fratello Andrea, per aver sopportato i miei nervi a fior di pelle durante le innumerevoli sessioni.

Alla mia compagna di viaggio Alessia, il mio caterpillar, sempre pronta ad aiutarmi sia nel lavoro che fuori, senza di te a quest'ora sarei ancora ad algebra!!

Un ringraziamento immenso a Sara, Antonella, Nick e Giova, il "team dei superstiti", covid o no, noi sempre presenti in Facoltà, a studiare e non solo.

Per ultimi, ma non per questo meno importanti, grazie a Letizia, Niccolò e a tutti i miei amici per il supporto, la tanta pazienza, per farmi sempre sorridere e per tutti i momenti passati insieme. Se non sono impazzita del tutto durante questi anni di studio matto e disperatissimo è anche grazie a voi. Le distanze non contano quando gli amici son veramente "boni".

Con la speranza di potervi nuovamente citare in elaborati futuri,

Vi voglio bene,

Camilla

## ***Riferimenti***

- [1] Patel D, Zamboulis D E, Spiesz E M, Birch H L, Clegg P D, Thorpe C T and Screen H R C 2021 Structure-function specialisation of the interfascicular matrix in the human achilles tendon *Acta Biomater* **131** 381–90
- [2] Zschäbitz A 2005 Anatomie und verhalten von sehnen und bändern *Orthopade* **34** 516–25
- [3] Lim W L, Liau L L, Ng M H, Chowdhury S R and Law J X 2019 Current Progress in Tendon and Ligament Tissue Engineering *Tissue Eng Regen Med* **16** 549–71
- [4] Murphy W, Black J and Hastings G 2016 *Handbook of biomaterial properties, second edition* (Springer New York)
- [5] Screen H R C, Berk D E, Kadler K E, Ramirez F and Young M F 2015 Tendon functional extracellular matrix *Journal of Orthopaedic Research* vol 33 (John Wiley and Sons Inc) pp 793–9
- [6] Kjær M 2004 Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical Loading *Physiol Rev* **84** 649–98
- [7] Sensini A and Cristofolini L 2018 Biofabrication of electrospun scaffolds for the regeneration of tendons and ligaments *Materials* **11**
- [8] Liu H, Zhu S, Zhang C, Lu P, Hu J, Yin Z, Ma Y, Chen X and OuYang H 2014 Crucial transcription factors in tendon development and differentiation: Their potential for tendon regeneration *Cell Tissue Res* **356** 287–98
- [9] D. Wendt S A R M C I M (auth. ), Dr C K Prof M van G Dr R P (eds. )-B 2008 *Bioreactor Systems for Tissue Engineering*
- [10] Sensini A, Gualandi C, Focarete M L, Belcari J, Zucchelli A, Boyle L, Reilly G C, Kao A P, Tozzi G and Cristofolini L 2019 Multiscale hierarchical bioresorbable scaffolds for the regeneration of tendons and ligaments *Biofabrication* **11**
- [11] Sensini A, Massafra G, Gotti C, Zucchelli A and Cristofolini L 2021 Tissue Engineering for the Insertions of Tendons and Ligaments: An Overview of Electrospun Biomaterials and Structures *Front Bioeng Biotechnol* **9**
- [12] Rinoldi C, Fallahi A, Yazdi I K, Campos Paras J, Kijeńska-Gawrońska E, Trujillo-De Santiago G, Tuoheti A, Demarchi D, Annabi N, Khademhosseini A, Swieszkowski W and Tamayol A 2019 Mechanical and Biochemical Stimulation of 3D Multilayered Scaffolds for Tendon Tissue Engineering *ACS Biomater Sci Eng* **5** 2953–64
- [13] Holzapfel B M, Rudert M and Hutmacher D W 2017 Gerüstträgerbasiertes Knochen-Tissue-Engineering *Orthopade* **46** 701–10

- [14] Dado D and Levenberg S 2009 Cell-scaffold mechanical interplay within engineered tissue *Semin Cell Dev Biol* **20** 656–64
- [15] Sandri M, Filardo G, Kon E, Panseri S, Montesi M, Iafisco M, Savini E, Sprio S, Cunha C, Giavaresi G, Veronesi F, Fini M, Salvatore L, Sannino A, Marcacci M and Tampieri A 2016 Fabrication and pilot in vivo study of a collagen-BDDGE-elastin core-shell scaffold for tendon regeneration *Front Bioeng Biotechnol* **4**
- [16] Kundu B, Rajkhowa R, Kundu S C and Wang X 2013 Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations *Adv Drug Deliv Rev* **65** 457–70
- [17] Surrao D C, Waldman S D and Amsden B G 2012 Biomimetic poly(lactide) based fibrous scaffolds for ligament tissue engineering *Acta Biomater* **8** 3997–4006
- [18] Thayer P S, Dimling A F, Plessl D S, Hahn M R, Guelcher S A, Dahlgren L A and Goldstein A S 2014 Cellularized cylindrical fiber/hydrogel composites for ligament tissue engineering *Biomacromolecules* **15** 75–83
- [19] Deepthi S, Jeevitha K, Nivedhitha Sundaram M, Chennazhi K P and Jayakumar R 2015 Chitosan-hyaluronic acid hydrogel coated poly(caprolactone) multiscale bilayer scaffold for ligament regeneration *Chemical Engineering Journal* **260** 478–85
- [20] Yang C, Deng G, Chen W, Ye X and Mo X 2014 A novel electrospun-aligned nanoyarn-reinforced nanofibrous scaffold for tendon tissue engineering *Colloids Surf B Biointerfaces* **122** 270–6
- [21] Zhao X, Jiang S, Liu S, Chen S, Lin Z Y W, Pan G, He F, Li F, Fan C and Cui W 2015 Optimization of intrinsic and extrinsic tendon healing through controllable water-soluble mitomycin-C release from electrospun fibers by mediating adhesion-related gene expression *Biomaterials* **61** 61–74
- [22] Ladd M R, Lee S J, Stitzel J D, Atala A and Yoo J J 2011 Co-electrospun dual scaffolding system with potential for muscle-tendon junction tissue engineering *Biomaterials* **32** 1549–59
- [23] Buschmann J, Meier-Bürgisser G, Bonavoglia E, Neuenschwander P, Milleret V, Giovanoli P and Calcagni M 2013 Cellular response of healing tissue to DegraPol tube implantation in rabbit Achilles tendon rupture repair: An in vivo histomorphometric study *J Tissue Eng Regen Med* **7** 413–20
- [24] Zhang C, Yuan H, Liu H, Chen X, Lu P, Zhu T, Yang L, Yin Z, Heng B C, Zhang Y and Ouyang H 2015 Well-aligned chitosan-based ultrafine fibers committed teno-lineage differentiation of human induced pluripotent stem cells for Achilles tendon regeneration *Biomaterials* **53** 716–30
- [25] Buschmann J, Calcagni M, Bürgisser G M, Bonavoglia E, Neuenschwander P, Milleret V and Giovanoli P 2015 Synthesis, characterization and histomorphometric analysis of cellular response to a new elastic DegraPol® polymer for rabbit Achilles tendon rupture repair *J Tissue Eng Regen Med* **9** 584–94

- [26] Bosworth L A, Rathbone S R, Bradley R S and Cartmell S H 2014 Dynamic loading of electrospun yarns guides mesenchymal stem cells towards a tendon lineage *J Mech Behav Biomed Mater* **39** 175–83
- [27] Baudequin T, Nyland R and Ye H 2021 Objectives, benefits and challenges of bioreactor systems for the clinical-scale expansion of T lymphocyte cells *Biotechnol Adv* **49**
- [28] Talò G, D'Arrigo D, Lorenzi S, Moretti M and Lovati A B 2020 Independent, Controllable Stretch-Perfusion Bioreactor Chambers to Functionalize Cell-Seeded Decellularized Tendons *Ann Biomed Eng* **48** 1112–26
- [29] Cook C A, Huri P Y, Ginn B P, Gilbert-Honick J, Somers S M, Temple J P, Mao H Q and Grayson W L 2016 Characterization of a novel bioreactor system for 3D cellular mechanobiology studies *Biotechnol Bioeng* **113** 1825–37
- [30] Lourenço N D, Lopes J A, Almeida C F, Sarraguça M C and Pinheiro H M 2012 Bioreactor monitoring with spectroscopy and chemometrics: A review *Anal Bioanal Chem* **404** 1211–37
- [31] Salehi-Nik N, Amoabediny G, Pouran B, Tabesh H, Shokrgozar M A, Haghhighipour N, Khatibi N, Anisi F, Mottaghy K and Zandieh-Doulabi B 2013 Engineering parameters in bioreactor's design: A critical aspect in tissue engineering *Biomed Res Int* **2013**
- [32] Anon (Advances in Biochemical Engineering\_Biotechnology 112) D. Wendt, S. A. Riboldi, M. Cioffi, I. Martin (auth.), Dr. Cornelia Kasper, Prof. Martijn van Griensven, Dr. Ralf Pörtner (eds.) - Bior
- [33] Sensini A, Cristofolini L, Zucchelli A, Focarete M L, Gualandi C, de Mori A, Kao A P, Roldo M, Blunn G and Tozzi G 2020 Hierarchical electrospun tendon-ligament bioinspired scaffolds induce changes in fibroblasts morphology under static and dynamic conditions *J Microsc* **277** 160–9
- [34] Abousleiman R I and Sikavitsas V I *BIOREACTORS FOR TISSUES OF THE MUSCULOSKELETAL SYSTEM*
- [35] Jaiswal D, Yousman L, Neary M, Fernschild E, Zolnoski B, Katebifar S, Rudraiah S, Mazzocca A D and Kumbar S G 2020 Tendon tissue engineering: Biomechanical considerations *Biomedical Materials (Bristol)* **15**
- [36] Didonè Relatore Agatino Christian Tavilla D 2019 *Modulo per bioreattore smart Progetto di diploma*
- [37] Gaspar D A, Gomide V and Monteiro F J 2012 The role of perfusion bioreactors in bone tissue engineering. *Biomatter* **2** 167–75
- [38] Barber J G, Handorf A M, Allee T J and Li W J 2013 Braided nanofibrous scaffold for tendon and ligament tissue engineering *Tissue Eng Part A* **19** 1265–74

- [39] Chen C H, Li D L, Chuang A D C, Dash B S and Chen J P 2021 Tension stimulation of tenocytes in aligned hyaluronic acid/platelet-rich plasma-polycaprolactone core-sheath nanofiber membrane scaffold for tendon tissue engineering *Int J Mol Sci* **22**
- [40] Mouthuy P-A, Snelling S, Hostettler R, Kharchenko A, Salmon S, Wainman A, Mimpfen J, Paul C and Carr A 2022 Humanoid robots to mechanically stress human cells grown in soft bioreactors *Communications Engineering* **1**