

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna
Campus di Cesena
Scuola di Ingegneria e Architettura**

Corso di Laurea in Ingegneria Biomedica

**TITOLO DELL'ELABORATO:
PROSPETTIVE DELL'INGEGNERIA
TISSUTALE PER LA RIGENERAZIONE
DEL TESSUTO
TENDINEO E LEGAMENTOSO**

**Elaborato in
Biochimica**

**Relatore
Dott. Emanuele D. Giordano**

**Presentato da
Roberta Altieri**

**Sessione III
Anno Accademico 2013-2014**

Indice

RIASSUNTO	3
1 FUNZIONE E STRUTTURA DEL TESSUTO TENDINEO E LEGAMENTOSO ...	4
1.1 LE FUNZIONI	4
1.2 COMPOSIZIONE E STRUTTURA	5
1.2.1 Glicosamminoglicani (Gags)	6
1.2.2 Collagene	7
1.2.3 Elastina	9
1.2.4 Organizzazione del tendine e del legamento	10
1.3 PROPRIETÀ MECCANICHE	11
1.3.1 Proprietà statiche a trazione	11
1.3.2 Proprietà viscoelastiche	14
2 PANORAMICA SULL'INGEGNERIA TISSUTALE DEI TENDINI E DEI LEGAMENTI	16
2.1 LESIONI E PROCESSI DI GUARIGIONE DEI TENDINI E DEI LEGAMENTI ..	16
2.1.1 Meccanismi di rigenerazione naturale	16
2.1.2 Innesti biologici	17
2.1.3 Protesi artificiali	18
2.2 L'INGEGNERIA TISSUTALE (TE)	18
2.2.1 L'istologia	18
2.2.2 L'immunoistochimica	19
2.2.3 La microscopia	21
2.3 SCAFFOLDS ELETTOFILATI PER LA RIPARAZIONE TENDINEA	24
2.3.1 Fasi di realizzazione	24
2.3.2 Analisi dei risultati	26

2.4 IMPIANTO 3D A BASE DI COLLAGENE PER LA RIPARAZIONE DEL TENDINED'ACHILLE	30
2.5 LEGAMENTO CROCIATO ANTERIORE (ACL)	32
3 PROGETTAZIONE E TECNICHE DI FABBRICAZIONE DEGLI SCAFFOLDS ...	39
3.1 SCAFFOLDS NATURALI O BIOLOGICI	39
3.2 SCAFFOLDS SINTETICI	39
3.3 INFLUENZA DELLE CELLULE	41
3.3.1 Fonti cellulari per tendini e legamenti	41
3.3.2 Ruolo dei fattori di crescita	43
3.3.3 Proprietà meccaniche	45
3.4 INFLUENZA DEGLI SCAFFOLDS	48
3.4.1 Rigidezza	49
3.4.2 Architettura	50
3.5 TECNICHE DI FABBRICAZIONE	51
CONCLUSIONI	60
APPENDICE	61
MATERIALI IMPIEGATI E STRATEGIE PER IL MIGLIORAMENTO DEGLI SCAFFOLDS	61
BIBLIOGRAFIA	79

Riassunto

Il presente elaborato riassume un'analisi della letteratura scientifica corrente relativa all'approccio proposto dall'ingegneria tissutale per la sostituzione/rigenerazione del tessuto tendineo e legamentoso, e analizza le fasi che conducono alla realizzazione di un costrutto con a bordo cellule specifiche.

I tendini e i legamenti sono tessuti fibrosi specializzati che svolgono principalmente una funzione meccanica: i primi permettono la trasmissione delle forze dal muscolo all'osso per generare il movimento, i secondi invece garantiscono la stabilità tra le giunture ossee che collegano. Gravi lesioni di tali strutture sono associate all'insorgere di incombenti problematiche a livello motorio e la caratteristica peculiare di mancata rigenerazione spontanea ha indotto alla ricerca di fonti alternative per la loro ricostruzione.

L'esperienza relativa alla preparazione e all'uso di innesti allogenici e xenogenici finalizzati alla rigenerazione tissutale mostrano una difficoltà nella coltura cellulare *in vitro*, una prolungata risposta infiammatoria *in vivo*, nonché dei tempi troppo lunghi per l'impianto. L'utilizzo di scaffold, ovvero supporti 3D realizzati con materiale sintetico (p.es. acido poliglicolico) o naturale (p.es. collagene) per ospitare la crescita di cellule adeguate, sembra un approccio alternativo promettente.

In particolare, in questo documento sono state riassunte due esperienze di riparazione tissutale, ispirate alla strategia sopra indicata, per il recupero del tendine d'Achille e del legamento crociato anteriore (ACL) del ginocchio, due distretti affetti da lesioni di natura principalmente traumatica e caratterizzati da specifiche proprietà che devono essere soddisfatte *in vitro* e *in vivo*.

1 Funzione e struttura del tessuto tendineo e legamentoso

1.1 Le Funzioni

I tendini e i legamenti sono tessuti connettivi densi e la loro principale funzione è di natura meccanica in quanto trasmettono carichi tra gli elementi che raccordano.

Il tendine (figura 1.1) è una struttura connettivale fibrosa che ancora i muscoli alle ossa e assicura la continuità meccanica e il moto dell'articolazione trasmettendo il carico di trazione dal muscolo all'osso. Esso è formato da una parte esterna, che connette propriamente il muscolo all'osso, e da una interna, chiamata *aponeurosi*, che costituisce l'area di collegamento per le fibre del muscolo.

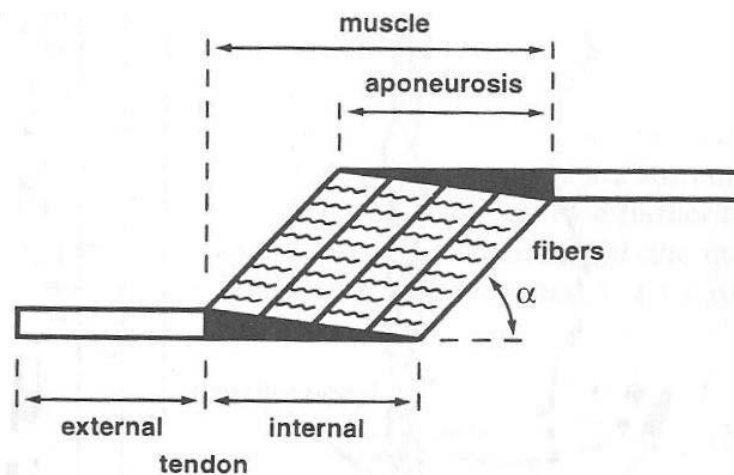


Figura 1.1 – Rappresentazione schematica del tendine.

Il legamento è una formazione di tessuto connettivo fibroso che connette le estremità articolari dell'osso riducendo i gradi di libertà delle articolazioni e limitando i movimenti non fisiologici. In particolare, la sua principale funzione è di guidare il movimento dell'articolazione mantenendone la congruenza e agendo come un suo sensore di deformazione.

Entrambi i tessuti sono avvolti da membrane o guaine sinoviali, che hanno il compito di facilitarne e proteggerne i movimenti, e presentano numerose caratteristiche comuni che portano ad affrontare il loro studio in maniera coniugata pur svolgendo funzioni diverse.

1.2 Composizione e Struttura

I tendini e i legamenti sono composti da una componente cellulare e da una matrice extracellulare (ECM).

La componente cellulare comprende principalmente fibroblasti e un piccolo numero di altre cellule che provvedono alla protezione e all'omeostasi dell'ambiente cellulare come linfociti, macrofagi e mastociti. I fibroblasti, detti anche tenociti, sono cellule ovoidali e affusolate, generalmente orientate longitudinalmente lungo il tendine e il corpo del legamento, responsabili della componente macromolecolare della ECM. Tali cellule forniscono un importante contributo all'organizzazione della matrice in quanto ne influenzano l'orientamento in base a quello del proprio citoscheletro; allo stesso tempo però, il loro relativo basso numero comporta uno scarso ricambio tissutale, motivo per il quale tendini e legamenti possiedono una limitata capacità di guarigione naturale.

La matrice extracellulare (ECM) rappresenta la più complessa unità di organizzazione strutturale dei tessuti degli organismi viventi. I tessuti, infatti, sono costituiti oltre che da cellule anche da uno spazio extracellulare, occupato da un'intricata rete di macromolecole, la cui organizzazione tridimensionale rappresenta appunto l'ECM. Le sue funzioni principali riguardano soprattutto il supporto meccanico per le funzioni biomeccaniche e per l'ancoraggio delle cellule, nonché la regolazione del trasporto di fluidi, molecole e nutrienti; essa fornisce inoltre un substrato strutturale sia per la crescita sia per il rimodellamento delle cellule ed è concepita come una vera e propria riserva di regolatori solubili.

L'ECM è costituita da acqua (60 – 65 %) e da due classi principali di macromolecole extracellulari :

- *Glicosamminoglicani (GAGs)*: catene di polisaccaridi generalmente legate covalentemente alle proteine per formare *Proteoglicani (PGs)*.
- *Proteine fibrose* con funzioni essenzialmente strutturali :
 - *Collagene*
 - *Elastina*

1.2.1 Glicosamminoglicani (GAGs)

I glicosamminoglicani sono catene di polisaccaridi, composte da unità di disaccaridi ripetute, non ramificate e troppo rigide per formare strutture compatte e globulari. Esistono due tipi principali di GAGs : l'acido ialuronico e i GAGs ricchi di gruppi funzionali carichi, divisibili a loro volta in eparansolfato, condroitinsolfato, dermatansolfato e cheratansolfato. Essi tendono ad assumere conformazioni distese, occupando un volume notevole rispetto alla loro massa, e formano gel a concentrazioni molto basse a causa dell'elevata densità delle loro cariche negative. Queste ultime, infatti, attraggono una nube di cationi, quali il Na^+ , osmoticamente attivi che provocano l'afflusso di grandi quantità di acqua nell'ECM oltre che la diffusione di molecole idrosolubili e la migrazione cellulare. Ne deriva, quindi, una tendenza al rigonfiamento che rende la matrice capace di resistere alle forze di compressione garantendo così una funzione di supporto ai vari organi.

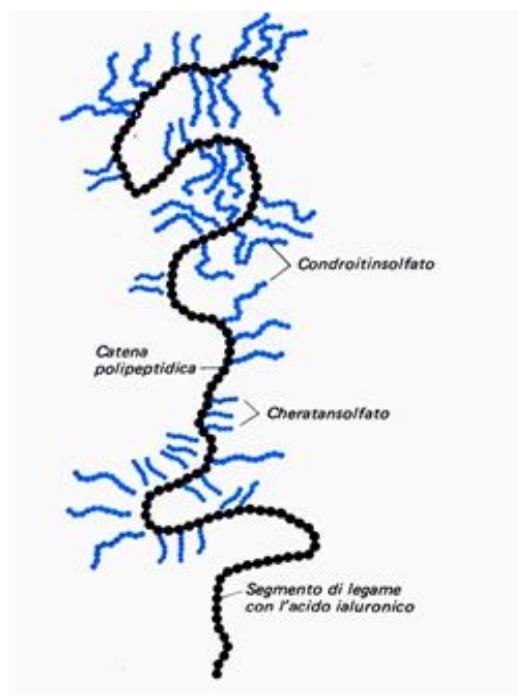


Figura 1.2.1 – Struttura generale di un proteoglicano.

L'importanza dei GAGs si riscontra nella loro capacità di legarsi in maniera covalente a strutture di natura proteica per formare i proteoglicani. Questi ultimi possono fungere da supporto a un numero variabile di catene di GAGs e svolgono funzioni differenti a seconda

delle dimensioni che possiedono: i “grandi PGs” occupano lo spazio fluido tra le fibrille limitandone e prevenendone il collasso, i “piccoli PGs”, invece, intervengono nella disposizione delle fibrille di collagene. I proteoglicani, legandosi alla superficie laterale delle fibrille tra i gap esistenti tra le molecole di collagene consecutive, impediscono l’assemblaggio di ulteriori molecole di collagene sulla superficie e dirigono, in questo modo, le fasi della fibrillogenesi determinando la struttura spaziale del tendine e del legamento. La *decorina* è il proteoglicano più abbondante nel tessuto tendineo e ha il compito di inibire la formazione di larghe fibre di collagene permettendo al tessuto di adattarsi e compensare così la forza di trazione. L’*aggrecano*, invece, è un altro proteoglicano che si trova abbondantemente nelle aree nelle quali il tessuto è soggetto a forze di compressione e contribuisce a formare macromolecole costituendo domini idratati e incomprimibili.

1.2.2 Collagene

La maggior parte dell’ECM è formata dal collagene, una proteina prettamente strutturale che costituisce il 25% della massa proteica totale dell’uomo, la cui principale caratteristica, direttamente correlata alla struttura della molecola stessa, è la capacità di fornire forza ai tessuti.

Il collagene è costituito da catene polipeptidiche, le catene α , che sono resistenti allo stiramento e strettamente intrecciate tra loro in maniera tale da formare una superelica compatta. La struttura primaria delle singole catene è composta da oltre 1400 amminoacidi ed è caratterizzata dalla ripetizione di numerose triplette di sequenza : glicina, prolina, idrossiprolina (*Gly-Pro-Hyp*)_n . La particolare sequenza *Pro-Hyp* è responsabile della struttura secondaria della molecola che descrive la relazione spaziale della proteina dovuta all’ingombro sterico tra i due suddetti amminoacidi. Ogni singolo filamento assume poi una struttura terziaria elicoidale sinistrorsa fornendo un’alta forza di trazione a causa della rigidità e della relativa inelasticità che lo contraddistinguono; tre filamenti si dispongono quindi in una superelica destrorsa formando la struttura quaternaria del tropocollagene, l’unità strutturale del collagene la cui organizzazione modula la forza e la rigidità dell’intero tessuto; la glicina infine, essendo di piccole dimensioni, si colloca all’interno della tripla elica mentre la prolina e l’idrossiprolina favoriscono l’avvolgimento a spirale delle catene.

I fattori di stabilizzazione delle molecole di collagene dipendono dalle interazioni tra le tre eliche costituenti la superelica e sono rappresentati da legami idrogeno, legami ionici o

da reticolazioni intercatena (*cross-links*) che stabilizzano meccanicamente le fibre e aumentano la forza di trazione del tessuto.

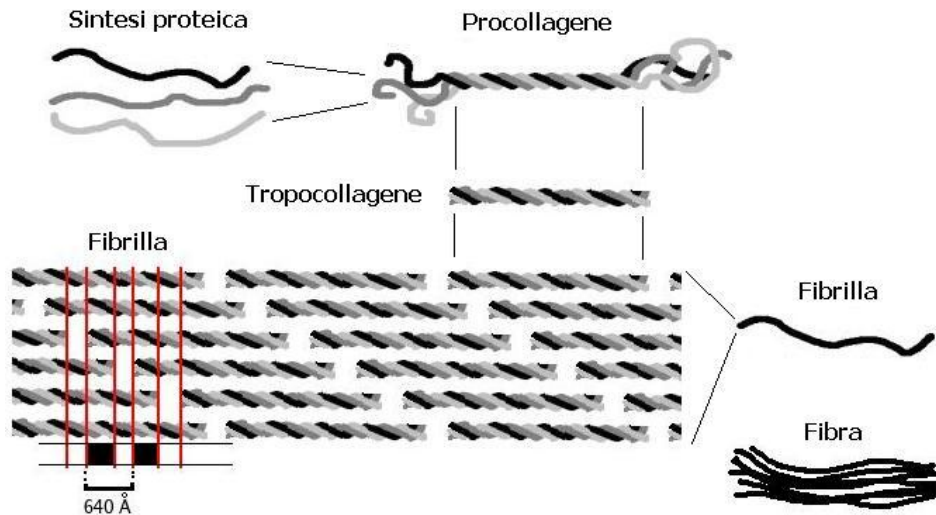


Figura 1.2.2 – Struttura generale del collagene.

Dei XXVIII tipi di collagene esistenti, tutti caratterizzati dalla presenza di triple eliche collegate tra loro in maniera differente, nei tendini e nei legamenti se ne osservano principalmente quattro tipi : il collagene di *tipo I*, *tipo III*, *tipo IV*, *tipo XII*.

- Il collagene di *tipo I* è il più comune, tant'è che costituisce oltre il 90% dell'intero collagene; fa parte dei collagene di tipo fibrillare, ovvero che formano fibrille, e la sua unità strutturale, il tropocollagene, ha formula molecolare $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$; dopo essere state secrete nello spazio extracellulare, queste molecole di collagene si assemblano in fibrille di collagene, visibili al microscopio elettronico, che, a loro volta, si aggregano in fasci più grandi simili a cavi, le fibre di collagene, che hanno diametri dell'ordine del μm osservabili al microscopio ottico.
- Il collagene di *tipo III* fa sempre parte dei collagene che formano le fibrille e il suo tropocollagene ha una diversa formula molecolare rispetto a quello di *tipo I*: $[\alpha 1(III)]_3$.

- Il collagene di *tipo IV* fa parte di quei collagene che formano reticoli. Le sue molecole, con struttura $[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$, si assemblano infatti in un reticolo che costituisce una parte principale della lamina basale, ovvero un sottile “tappeto” flessibile di materia extracellulare che separa le cellule tendinee o legamentose dal tessuto connettivo circostante.
- Il collagene di *tipo XII* è un collagene associato alle fibrille. Queste molecole, $[\alpha 1(XII)]_3$, rivestono la superficie delle fibrille di collagene e si pensa che servano a collegare quest’ultime con gli altri componenti della matrice extracellulare.

1.2.3 Elastina

L’elastina è la proteina deputata a conferire elasticità alle strutture con le quali si coordina ed è ricca in prolina e glicina come il collagene ma, a differenza di quest’ultimo, è povera in idrossiprolina. Le proprietà elastiche delle molecole di elastina sono dovute sia alla sua catena polipeptidica principale che forma gomitoli, una configurazione particolare che consente alle fibre elastiche di essere stirate per poi riacquistare il loro stato originario, e sia alle variazioni di entropia ; una forza esterna applicata sul tessuto elastico, infatti, agisce aumentando l’ordine molecolare della struttura e diminuendo simultaneamente l’entropia che, invece, cresce se il carico applicato viene rimosso così da riportare l’elastina alla sua configurazione iniziale.

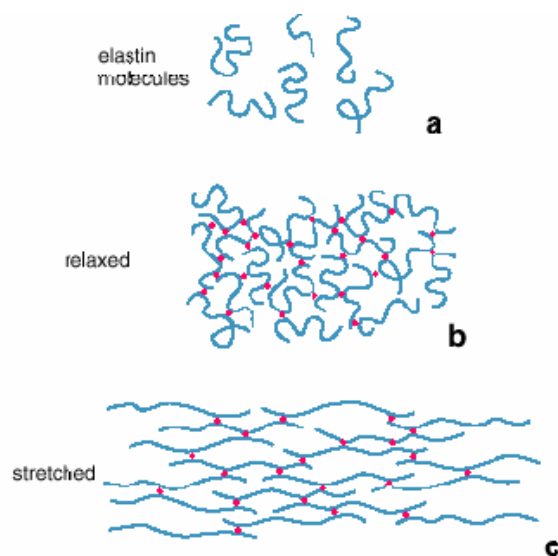


Figura 1.2.3 - Diagramma di molecole di elastina e loro interazioni.

a) molecole di elastina nella loro conformazione a gomito. La configurazione delle singole molecole cambia continuamente. b) molecole di elastina legate tra di loro mediante legami covalenti formano un reticolo 3D. c) è mostrato l'effetto di uno stiramento. Quando la forza è rimossa il reticolo ritorna nello stato rilassato come in b).

1.2.4 Organizzazione del tendine e del legamento

Il tendine è caratterizzato da una struttura modulare con sei livelli di organizzazione. Cominciando dal livello molecolare, possiamo riconoscervi la tripla elica del tropocollagene le cui macromolecole si aggregano durante la biosintesi, per formare le microfibrille a livello nanometrico; queste ultime si impacchettano quindi in subfibrille più spesse che, a loro volta, si organizzano per formare le fibrille, i blocchi che costituiscono il fascicolo del tendine. A livello fascicolare le fibrille di collagene si presentano in una forma ondulata e piegata e, se due o tre di esse vengono rivestite da una membrana reticolare, si arriva alla formazione del tendine.

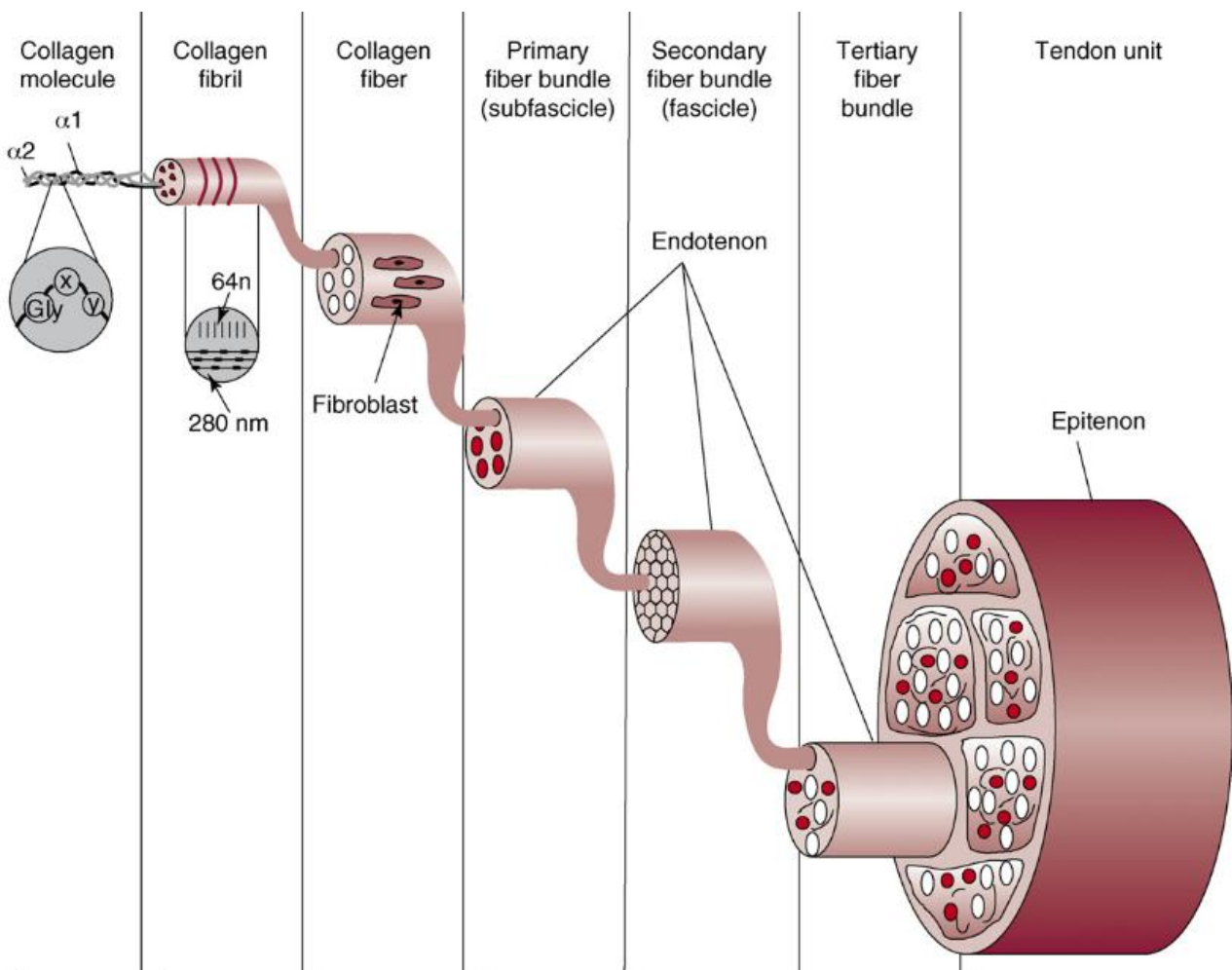


Figura 1.2.4 – Struttura modulare del tendine.

L'organizzazione strutturale dei pacchetti di fibre nei legamenti è meno organizzata che nei tessuti tendinei. Nella maggior parte dei legamenti cordiformi non tutte le fibre decorrono parallelamente in quanto, alcune di esse, attraversano la struttura incrociando il legamento stesso; quindi non tutti i pacchetti di fibre vengono stirati quando il legamento viene sottoposto a tensione nella direzione del suo asse lungo, tant'è che i grossi legamenti, infatti, presentano direzioni di fibre differenti nelle varie porzioni a seconda della direzione del lavoro che esse compiono.

1.3 Proprietà meccaniche

Le proprietà meccaniche dei tendini e dei legamenti dipendono non solo dalle caratteristiche e dall'organizzazione dei diversi costituenti ma anche dalle loro proporzioni.

L'elastina, scarsamente presente nei tendini, è contenuta nei legamenti in percentuali di circa 5% e forma reticoli interposti tra le fascicole di fibrille di collagene, contribuendo così all'organizzazione e alle funzioni delle matrici del legamento stesso. L'acqua contribuisce a circa il 60% del peso della maggior parte dei tendini e dei legamenti e, assieme ai proteoglicani, provvede alla loro lubrificazione, fondamentale per la funzione di scivolamento all'interfaccia fibra-matrice, e conferisce le proprietà viscoelastiche all'intera struttura.

1.3.1 Proprietà statiche a trazione

Proprietà, come la rigidità alla trazione e il carico di rottura, sono determinate usando convenzionali macchine di test ingegneristici; le prove, che generalmente si effettuano sotto determinate condizioni, influiscono molto sui risultati che si vogliono ottenere e sono classificate in tre differenti tipologie:

- *Prove uni-assiali*: realizzate su provini con un alto rapporto lunghezza - larghezza per caratterizzare il comportamento statico di tendini/legamenti.
- *Prove bi-assiali*: realizzate su provini con un basso rapporto lunghezza - larghezza per ottenere informazioni sul comportamento del tessuto in due dimensioni.
- *Prove a taglio*: per avere informazioni sul comportamento multi-assiale dei tessuti.

Da tali prove si ricava quindi la tipica curva tensione – deformazione ($\sigma - \varepsilon$), fondamentale per l'analisi del comportamento del tessuto soggetto a forze di diversa natura.

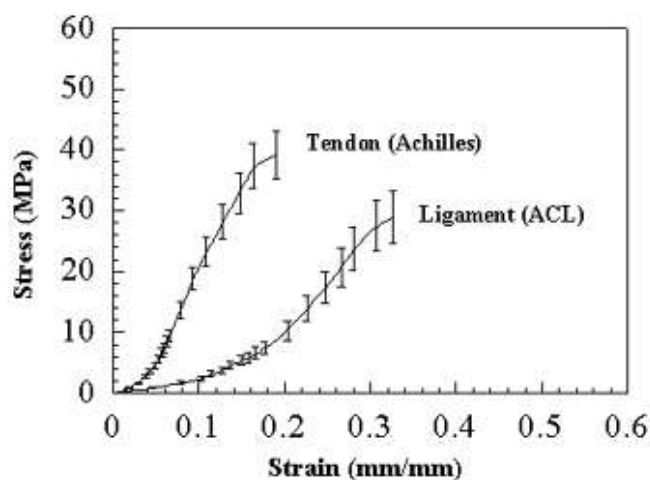


Figura 1.3.1 – Curva tensione-deformazione ($\sigma - \varepsilon$) per tendini e legamenti.

Come si evince dal confronto tra le due curve (figura 1.3), il comportamento dei tendini e dei legamenti è molto simile. Nella *toe region*, la regione iniziale del grafico che corrisponde ai valori di tensione e deformazione generati nei tessuti durante il loro normale funzionamento, non si riscontra un notevole aumento di tensione σ all'aumentare della deformazione ε ; si constata invece che questa fase, in cui le fibre e le fibrille di collagene iniziano a srotolarsi lungo la direzione del carico applicato, è più ampia per i legamenti che, per l'appunto, presentano un modulo di elasticità (ovvero il rapporto tra σ e ε) iniziale inferiore, dovuto soprattutto alle differenti composizioni e organizzazioni delle fibre di collagene.

Al termine della *toe region*, sia il tendine sia il legamento diventano più rigidi poiché le fibre di collagene sono completamente stirate e comincia una fase nella quale il comportamento diviene sostanzialmente lineare (il tendine è stirato da un minimo del 2% a un massimo del 4%, mentre il legamento tra circa il 4% e il 12%).

La pendenza di questa regione dipende dal modulo di Young (o di elasticità), che esprime la rigidità del tessuto all'allungamento o all'accorciamento, e la deformazione che caratterizza le sue fibre è di natura reversibile, cioè se non si applicano tensioni ulteriori queste ritornano al loro stato di riposo.

Alla fine della zona lineare, oltre il 4% per il tendine e oltre il 12% per il legamento, gli sforzi cominciano a non essere più sostenibili per i tessuti a causa del danneggiamento subito sia dalle fibrille di collagene sia dai proteoglicani. Con un ulteriore aumento della deformazione la lacerazione diviene macroscopica e una tensione maggiore porta alla rottura definitiva del tessuto; questa avviene in corrispondenza di valori del modulo elastico tra i 650 e 1600 MPa per i tendini e tra i 300 e i 700 MPa per i legamenti che, infatti, contenendo una quantità maggiore di elastina, possiedono una più grande elongazione prima della frattura. Oltre al modulo elastico più elevato, i tendini poi presentano uno sforzo a rottura maggiore imputabile al fatto che hanno un contenuto di collagene superiore rispetto a quello dei legamenti; è proprio questa maggior quantità di matrice fibrosa a conferirgli, quindi, notevoli proprietà meccaniche.

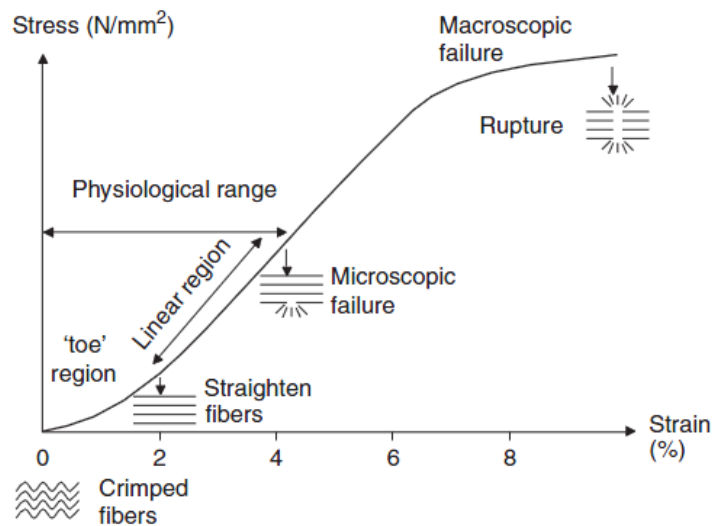


Figura 1.3.1 a - Curva σ - ϵ per il tendine.

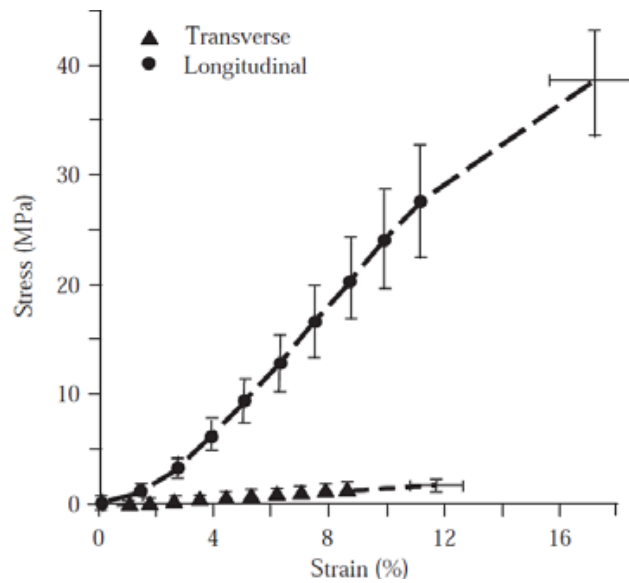


Figura 1.3.1 b- Curva σ - ε per il legamento.

1.3.2 Proprietà viscoelastiche

I tendini e i legamenti, come nella maggior parte dei tessuti molli, esibiscono un comportamento viscoelastico che dimostra la loro abilità nell'attenuare i carichi ai quali sono sottoposti quando deformati e nel limitare le rapide deformazioni, responsabili del loro danneggiamento o di quello dei tessuti circostanti.

Quando tendini e legamenti sono soggetti a velocità di carico (o deformazione) crescenti, la regione lineare della curva σ - ε diventa più ripida segnalando un incremento della rigidità del tessuto; con velocità di carico ancora più elevate, legamenti e tendini immagazzinano più energia, richiedono più forza per rompersi e subiscono così maggiori allungamenti. Nel momento in cui, durante una prova di rilassamento dallo sforzo, il carico è arrestato in condizioni di sicurezza al di sotto della regione lineare e la deformazione è mantenuta costante per un certo lasso di tempo, lo sforzo prima decresce rapidamente e poi più lentamente, divenendo meno pronunciato se la stessa prova viene ripetuta ciclicamente. Effettuando una prova di creep o deformazione, invece, il carico viene fermato sempre al di sotto della regione lineare, per motivi di sicurezza, e lo sforzo viene mantenuto costante per un lungo periodo di tempo; in questo modo la deformazione dapprima aumenta rapidamente e poi sempre più lentamente constatando che, se si compie la prova ciclicamente, diventa meno evidente.

Nel caso nel quale i carichi siano applicati e rimossi a intervalli precisi, la curva tensione-deformazione è traslata verso destra lungo l'asse delle ascisse manifestando una presenza di una componente plastica e quindi non elastica. L'ammontare della deformazione permanente e non recuperabile progredisce a ogni ciclo di carico nel quale il campione di tessuto mostra un aumento della rigidità come risultato della dislocazione molecolare subita; inoltre, se si impone un carico frequente su una struttura già danneggiata, nella quale si è avuta una diminuzione della rigidità, possono manifestarsi delle microfratture entro uno specifico intervallo fisiologico. Come dimostra la figura sottostante, il ciclo di isteresi è una caratteristica fondamentale della risposta di un tessuto con proprietà viscoso e indica la sua capacità di dissipare l'energia immagazzinata che si manifesta con la generazione di calore e l'accumulo di danno.

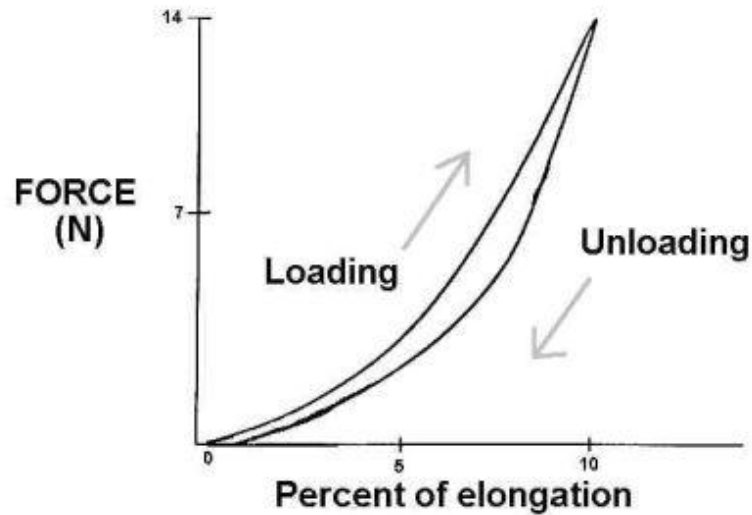


Figura 1.3.2 – Ciclo di isteresi di tendine o legamento.

2 Panoramica sull'ingegneria tissutale dei tendini e dei legamenti

2.1 Lesioni e processi di guarigione dei tendini e dei legamenti

Le lesioni riguardanti i tendini e i legamenti possono essere catalogate in due differenti tipologie: acute o croniche; le prime sono dovute principalmente a eventi traumatici, mentre le seconde dalla ripetizione di carichi meccanici al di sotto della soglia di rottura e dalla risposta infiammatoria che ne consegue. Tali danneggiamenti tissutali, inoltre, possono essere causati da fattori intrinseci e/o estrinseci alla stessa qualità di vita della persona che ne è colpita; malattie, peso corporeo, irregolarità biomeccaniche di natura anatomica o funzionale, predisposizione genetica, condizioni ambientali e alimentazione sono potenziali contributi che conducono all'insorgere di lesioni tendinee o legamentose disabilitanti e permanenti .

2.1.1 Meccanismi di rigenerazione naturale

La rigenerazione dei legamenti e dei tendini è un processo molto lento e, al contempo, inefficiente in quanto non è in grado di ripristinarne né le condizioni originarie né le proprietà biologiche e biomeccaniche a causa dell'insorgere di piccole quantità di *scar tissue* (cicatrici) nel sito del trauma.

Il meccanismo che segue al danneggiamento tissutale è l'infiammazione, che consta di una cascata di tre eventi che hanno lo scopo di rigenerare il collagene nello specifico e, in generale, l'intera ECM: *l'infiammazione, la riparazione e la ricostruzione*. Durante la prima fase le cellule responsabili della risposta infiammatoria si dirigono verso il sito danneggiato e rilasciano fattori per il reclutamento dei fibroblasti per dare inizio alla formazione di collagene. Alcuni giorni dopo l'avvenuta lesione, comincia la vera e propria riparazione, o fase fibroblastica, in quanto i fibroblasti sintetizzano abbondante collagene e altri componenti dell'ECM, come i proteoglicani, e li depositano nello stesso sito per permettere che la forza, sia del tendine sia del legamento, subisca un notevole incremento. La riparazione, infine, subentra nel momento nel quale l'organismo cerca di ripristinare

totalmente la lesione ed è caratterizzata da una riduzione nella produzione di collagene e glicosaminoglicani; il tessuto diviene più fibroso e le fibre di collagene dalle quali è formato, iniziando ad allinearsi, lo fanno evolvere in un tessuto ancora più duro, ovvero quello cicatrizzato.

Molti fattori che partecipano al meccanismo di rigenerazione, quali il monossido di azoto (NO) o i trattamenti farmacologici non invasivi come la somministrazione di corticosteroidi, sono indispensabili nel processo di riparazione tissutale in quanto preservano l'integrità del tendine o del legamento danneggiato; un adeguato apporto di nutrienti cellulari, reso possibile da una corretta vascolarizzazione tissutale, risulta infine di fondamentale importanza per garantirne una rapida guarigione.

Per permettere un aumento della qualità della riparazione dei tessuti, sono state sviluppate alcune tecniche ad *hoc* che si avvalgono dell'uso di ancoraggi e suture al tessuto molle ma che, allo stesso tempo, non conducono al risultato atteso in quanto non garantiscono il raggiungimento delle capacità biomeccaniche tissutali antecedenti alle lesioni. Attualmente, quindi, sono nate terapie alternative con tale fine quali gli innesti biologici, le protesi permanenti artificiali e l'ingegneria tissutale.

2.1.2 Innesti biologici

In caso di gravi danneggiamenti, gli innesti biologici (*autografts*, *allografts* e *xenografts*) possono essere utilizzati per la sostituzione del tessuto lesionato, prevenendone una conseguente instabilità e riducendo così il rischio di subire un'ulteriore rottura. Gli *autografts*, o autoinnesti, inducono un'elevata duttilità, oltre che una limitata accessibilità al sito donatore, provocando una scarsa integrazione tissutale e una possibile necrosi post innesto. Gli *allografts*, cioè gli alloinnesti o allotrapianti, e gli *xenografts*, xenotrapianti o trapianti eteroplastici, vengono anch'essi considerati come terapie alternative per la riparazione dei tendini e dei legamenti, ma non sono ideali poiché comportano il rischio sia di trasmissione di malattie sia di rigetto tissutale; per tali motivi, quindi, si spiega lo scarso e limitato utilizzo degli innesti.

2.1.3 Protesi artificiali

Il tessuto tendineo e legamentoso è continuamente sottoposto a carichi di natura meccanica, come la contrazione muscolare e i movimenti dell'intero corpo, ed è proprio questa una delle cause principali dell'insuccesso nell'applicazione della sostituzione protesica, specialmente per un ampio lasso temporale; la protesi artificiale permanente, difatti, necessita di materiali biocompatibili duraturi e che a contatto con i fluidi biologici non subiscano alterazioni di alcun genere, onde evitare il rilascio di sostanze che possono innescare vari meccanismi di difesa da parte dell'organismo, compromettendone la sua funzionalità nel tempo.

L'ingegneria tissutale costituisce l'approccio più promettente per questo tipo di tessuti in quanto, avvalendosi di strategie ingegneristiche interdisciplinari, ha come scopo principale la piena rigenerazione del tendine o del legamento senza doverlo "rimpiazzare" fisicamente con sostituiti estranei al corpo parzialmente funzionanti.

2.2 L'ingegneria tissutale (TE)

Come anticipato, tale branca dell'ingegneria ha offerto numerosi e grandi vantaggi nel trattamento delle lesioni tendinee e legamentose proponendo possibili sostituti biologici per garantire la riparazione o la totale rigenerazione del tessuto riproducendone la naturale struttura e funzione.

Tra i numerosi metodi atti ad analizzare la riuscita del nuovo tessuto prodotto, quelli più utilizzati sono : il confronto dei parametri biomeccanici (forze, tensioni e deformazioni) con quelli presenti durante le normali funzioni svolte dal tessuto integro, e alcune considerazioni di natura biologica, ottenute da tecniche comuni quali l'istologia, l'immunoistochimica e la microscopia.

2.2.1 L'istologia

L'istologia consente di ottenere informazioni visive su uno specifico campione descrivendone gli aspetti morfologici e strutturali. L'esame istologico inizia con un'operazione, detta *fissazione*, che consiste nel sottoporre il tessuto ad agenti chimici e fisici

che denaturano rapidamente le proteine legandosi ai numerosi gruppi funzionali e rendendo insolubili gli altri costituenti per le fasi successive; essa ha lo scopo di interrompere rapidamente i processi autolitici che si sviluppano nella cellula e nei tessuti non più nutriti e ossigenati, preservare i campioni dall'attacco di muffe e batteri e conservarne al meglio la morfologia strutturale. A seguire si procede con il *lavaggio* dei preparati, compiuto per eliminare l'eccesso di fissativo che potrebbe essere rimasto all'interno dei campioni, e con la *disidratazione* che sottopone il tessuto a un graduale passaggio nella serie degli alcoli a concentrazione progressivamente crescente. Si continua, infine, con il trattamento per garantire completo assorbimento della cera paraffina, sostanza che solidifica il tessuto permettendone il taglio in sottili sezioni; queste ultime vengono tagliate poi, a loro volta, in sezioni dell'ordine del μm , colorate per mezzo di coloranti acidi o basici e poste sui vetrini per l'analisi conclusiva.

2.2.2 L'immunoistochimica

L'istochimica è lo studio della composizione chimica delle strutture dei tessuti biologici attraverso metodi microscopici e, in particolare, l'immunoistochimica consente la localizzazione citochimica di antigeni, in genere proteine e polisaccaridi, mediante microscopio a fluorescenza o elettronico. L'esame immunoistochimico, utilizzato per quantificare il numero di proteine presenti nel campione, può essere effettuato con due metodi: uno *diretto* e l'altro *indiretto*. Nel primo le sezioni di tessuto sono esposte a un anticorpo specifico, del quale si vuole studiare la localizzazione, che può legarsi solo nei siti nei quali è presente il suo antigene specifico; se l'anticorpo viene marcato con un indicatore fluorescente, p.es. la fluoresceina, si realizza la formazione di un complesso antigene-anticorpo fluorescente, identificabile quindi al microscopio a fluorescenza. Nel metodo indiretto invece, l'antigene viene fatto reagire con un anticorpo primario, ovvero un anticorpo specifico non marcato, generando un complesso antigene-anticorpo. Quest'ultimo, a sua volta, viene fatto reagire con un altro anticorpo marcato, l'anticorpo secondario, con il fine di creare un legame con quello primario e generare un segnale amplificato.

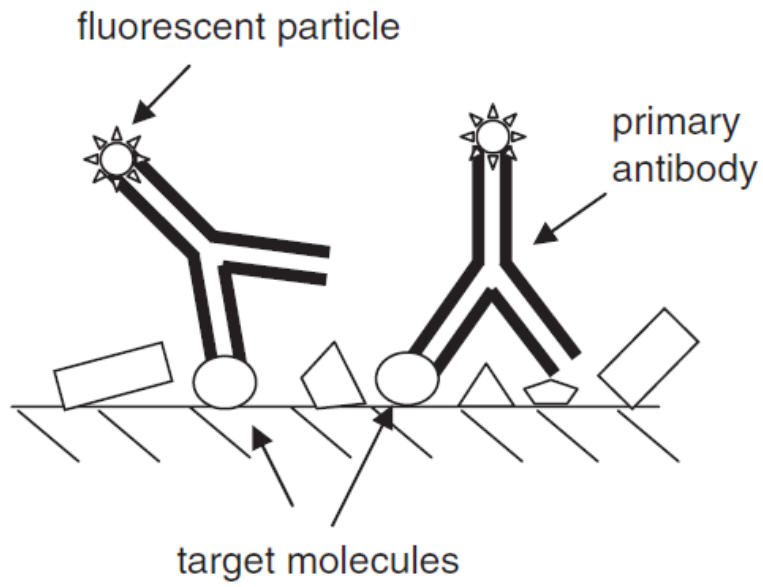


figura 2.2.2 a – Esame immunoistochimico diretto.

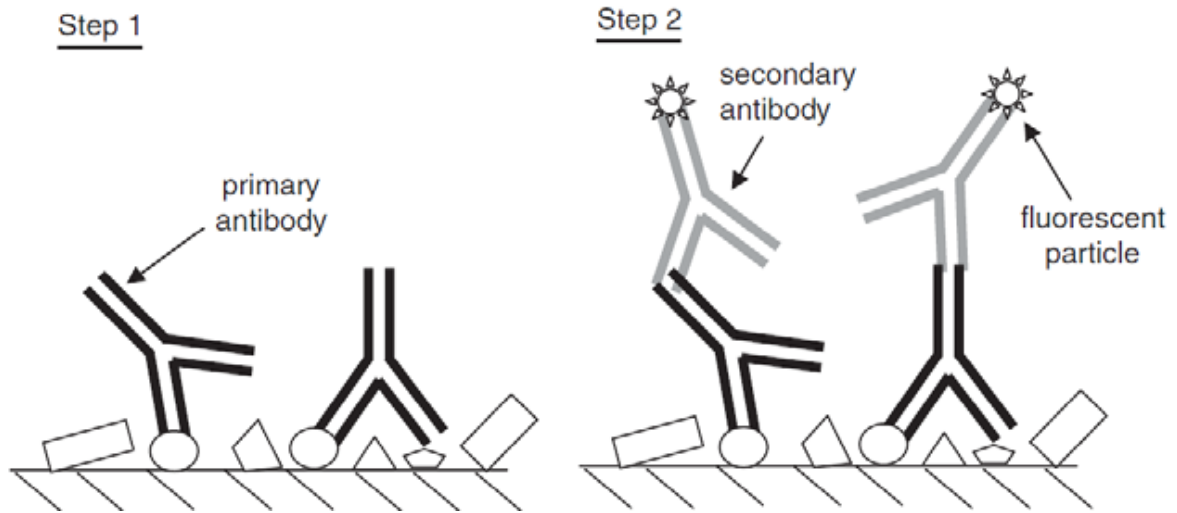


Figura 2.2.2 b – Esame immunoistochimico indiretto.

2.2.3 La microscopia

La microscopia è un'analisi indispensabile e fondamentale per la verifica dello stato del campione durante tutti i passaggi che portano alla fabbricazione del nuovo tessuto tendineo o legamentoso; lo strumento che viene utilizzato è il microscopio ottico, il quale si avvale di un sistema di lenti convergenti con lo scopo di ingrandire l'immagine: l'oculare (vicino all'occhio dell'osservatore) e l'obiettivo (prossimo all'oggetto). Il campione da osservare viene posto davanti all'obiettivo, che ne fornisce un'immagine reale, capovolta e ingrandita e fatta cadere a distanza opportuna davanti all'oculare; quest'ultimo, a sua volta, crea un'altra immagine virtuale, ingrandita e capovolta rispetto all'originale, correggendo e riducendo al contempo tutte le aberrazioni.

Le due tecniche principali delle quali si avvalgono i ricercatori per le loro verifiche sperimentali sono la microscopia confocale e la microscopia a scansione elettronica (SEM).

- La *microscopia confocale* è una tecnica ottica utilizzata principalmente per lo studio tridimensionale di strutture biologiche e si avvale, per eccitare le molecole, di una sorgente luminosa laser. Il sezionamento ottico di un sistema biologico consiste nella raccolta di una serie di immagini provenienti da piani paralleli e ottenuta spostando il fuoco dell'obiettivo lungo un asse che, generalmente, coincide con quello di propagazione della luce. Come si può constatare dalla figura sottostante, la luce emessa dai fluorocromi eccitati dal laser viene catturata dalle lenti dell'obiettivo, attraversa lo specchio dicroico e raggiunge il fotomoltiplicatore che la converte in un segnale elettronico di intensità proporzionale; tra lo specchio dicroico e il fotomoltiplicatore il fascio luminoso attraversa un diaframma, *pinhole*, che ha lo scopo di rimuovere tutte le interferenze provenienti da piani adiacenti a quello ove si è focalizzati, impedendo in questo modo alla luce delle zone di non interesse di raggiungere il fotomoltiplicatore. Si ottengono così delle immagini 2D che, elaborate al computer mediante l'utilizzo di specifici software per immagini, vengono ricostruite in formato *tridimensionale*.

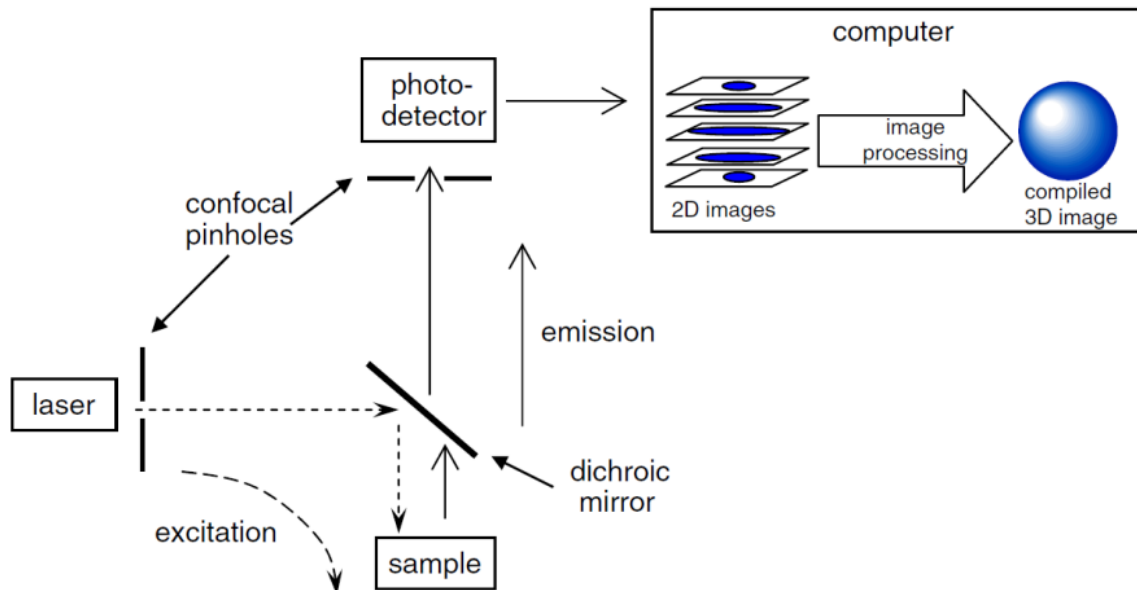


Figura 2.2.3 a – Schema di funzionamento del microscopio confocale.

- La *microscopia a scansione elettronica (SEM)* è una tecnica che permette l'osservazione dei campioni con ingrandimenti e risoluzione più di mille volte superiore alla microscopia ottica ordinaria; essa si basa sulla generazione di un fascio elettronico ad alta energia nel vuoto, focalizzato da un sistema di lenti elettromagnetiche e deflesso per scandire un'area del campione. Il pezzo di tessuto, preparato adeguatamente per essere analizzato, viene esplorato da un fascio molto sottile di elettroni, detto primario, che non è fisso ma viene fatto *scandire*, ovvero pilotato in sequenza punto dopo punto; nell'interazione tra il fascio primario e gli atomi costituenti il campione vengono emesse numerose particelle fra le quali specialmente gli elettroni secondari che a loro volta sono catturati da uno speciale rivelatore e convertiti in impulsi elettrici. Questi ultimi vengono infine inviati in tempo reale a uno schermo che esegue simultaneamente una scansione e fornisce come risultato un'immagine in bianco e nero a grande profondità di campo (fino ad alcuni μm). Il potere di risoluzione del microscopio elettronico a scansione è di circa 20 nm ma, avvalendosi di sorgenti elettroniche speciali come l'esaboruro di lantanio, si possono raggiungere risoluzioni più elevate di circa 3 nm ; tali sorgenti permettono, inoltre, la microanalisi ai raggi X dell'emissione secondaria di elettroni consentendo così una valutazione qualitativa e quantitativa della distribuzione di alcuni elementi chimici costituenti il campione.

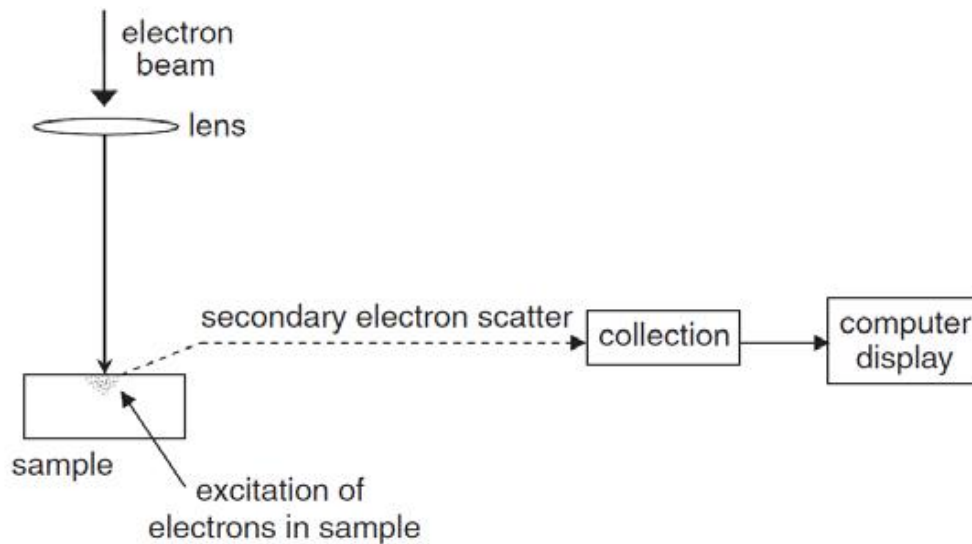


Figura 2.2.3 b – Schema di funzionamento del SEM.

Come descritto precedentemente, l'ingegneria dei tessuti offre notevoli e grandi innovazioni per quanto concerne le lesioni tendinee e legamentose poiché è alla ricerca costante di sostituti biologici che abbiano come risultato la completa rigenerazione tissutale, imitandone la naturale struttura e funzione. Quest'ultima è attribuibile ad alcune caratteristiche intrinseche allo stesso tessuto denso quali il posizionamento delle fibre di collagene nella matrice extracellulare che, sottoposte a forze di trazione e assieme all'elevato contenuto d'acqua, sono responsabili delle proprietà viscoelastiche e plastiche nonché della maggior parte delle funzioni meccaniche tissutali.

Per poter garantire, quindi, che le cellule crescano e proliferino in maniera tale da sintetizzare ECM e altre molecole biologiche essenziali, l'ingegneria tissutale ha ideato un approccio che mira a impiantare tali cellule all'interno di scaffold¹, ovvero "impalcature" che facilitino la formazione del nuovo tessuto, perfettamente integrato nell'organismo, e che si distinguono a seconda della tipologia tissutale da riparare, del materiale impiegato per la loro realizzazione² e del differente comportamento emergente dalle interazioni con le varie componenti cellulari utilizzate.

1. Per un approfondimento sulla progettazione e sulle tecniche di fabbricazione degli scaffold si rimanda al capitolo III.

2. Per un approfondimento sui materiali impiegati e sulle strategie di miglioramento degli scaffold si rimanda all'appendice.

2.3 Scaffold elettrofilati per la riparazione tendinea

A seconda delle lesioni che subiscono determinati tendini e del tipo di riparazione che necessitano, come la segmentale riparazione o ricostruzione, generalmente si tende a optare per l'innesto di tessuto autologo da un sito secondario al fine di riparare il tessuto danneggiato. Tuttavia si tratta di una scelta che comporta l'insorgere di notevoli svantaggi, tra i quali soprattutto la creazione di un sito di morbosità tissutale che conduce a un aumento del rischio di infezione e a un inevitabile prolungamento dei tempi di riabilitazione.

Per poter ovviare a tali problematiche stanno riscontrando un notevole successo le fibre elettrofilate degli scaffold¹, utilizzate nell'ambito della medicina rigenerativa e nel campo dell'ingegneria tissutale, in quanto possiedono le potenzialità per poter replicare almeno parzialmente la struttura dell'ECM. Numerose ricerche in merito si sono focalizzate sull'utilizzo di tali fibre e, specialmente il loro differente orientamento, realizzato mediante l'elettrofilatura e indispensabile per la ricreazione della gerarchia del tessuto tendineo, è oggetto di continue valutazioni come potenziali impalcature per il futuro impianto nei tendini danneggiati.

2.3.1 Fasi di realizzazione

Nello studio oggetto di analisi si sono realizzati tre diversi scaffold fibrosi a seconda della tipologia di orientamento delle fibre, orientate casualmente (foglio 2D), allineate (foglio 2D) o allineate e intrecciate in un fascio 3D, e fabbricati con la stessa concentrazione di soluzione e analoghi parametri di elettrofilatura³: una soluzione di poli-ε-caprolactone (PCL – 80.000 g/mol) disciolto in acetone. Le fibre sono state raccolte su mandrino rotante e rimosse successivamente come un singolo strato fibroso 2D (50 giri/minuto per le fibre orientate casualmente e 600 giri/ minuto per quelle allineate). Nel caso di realizzazione di fasci 3D si è fatta seguire una seconda procedura, consistente nell'immergere le strisce tagliate di fibra 2D in una soluzione di acqua distillata, per poi essere intrecciate manualmente secondo la loro lunghezza così come mostra la figura seguente (*figura 2.3.1*).

3. Per un approfondimento sulla tecnica di elettrofilatura o electrospinning si rimanda al capitolo III.

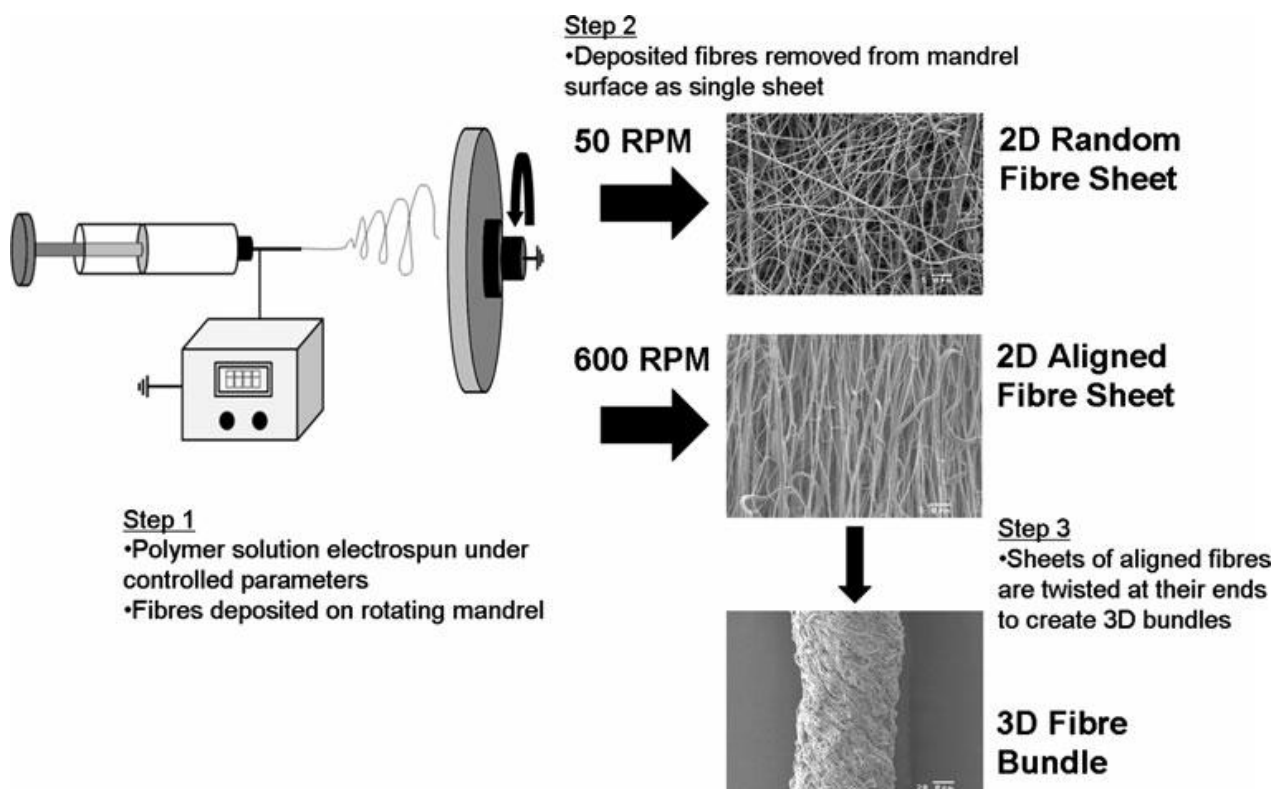


Figura 2.3.1- Rappresentazione schematica del processo di elettrospinning.

Una volta ultimata la realizzazione degli scaffold 2D o 3D, questi sono stati polverizzati d'oro e analizzati al SEM. Prima di tutto è stato esaminato il diametro delle fibre 2D, a orientamento casuale o allineato, calibrandone la lunghezza attraverso la scala di un micrografo e alla stessa maniera, poi, se ne è determinato l'orientamento misurando l'angolo tra le fibre stesse e la direzione della rotazione del mandrino. Successivamente le tre tipologie di scaffold sono state montate su finestre di cartone, utilizzando una colla a presa lenta, e afferrate lateralmente da maniglie in maniera tale da sottoporre l'intero campione ad un carico di trazione, sottoponendolo quindi ai test meccanici necessari. Per quanto concerne gli studi *in vitro*, gli scaffold sono stati sterilizzati con una concentrazione crescente di etanolo, in acqua distillata, per poi essere lavati due volte in un tampone fosfato salino (PBS); in seguito sono stati immersi in un terreno di coltura cellulare (DMEM) assieme a un quantitativo del 10% di siero fetale bovino per 24 ore.

I fibroblasti tendinei sono stati acquisiti da tendini flessori superficiali equini e sono stati coltivati in fiasche sterili da 75 cm², in DMEM, 10% di PBS e 1% di antibiotico (penicillina / streptomina). Essi sono stati quindi seminati su scaffold sterilizzati alla densità di 50 cellule / cm² a 37° C con il 5% di CO₂ per 14 giorni.

Per poter valutare la proliferazione dei fibroblasti tendinei durante l'intero arco temporale di coltura, si è utilizzato un colorante indicatore ovvero il sale resazurina sciolto in 40 ml di PBS e sterilizzato per filtrazione con il fine di ottenere una soluzione bluastra (Alamar Blue). Per ciascuno scaffold si sono inseriti 200 μ l di soluzione Alamar Blue in ogni 2 ml di mezzo di coltura incubato poi per circa 2 ore ; si è proseguito con il trasferimento di ciascun campione, in triplicato, in piastra a 96 pozzetti, letta poi da un lettore di piastre a fluorescenza funzionante a diverse lunghezze d'onda.

Il test Hoechst del DNA è stato invece utilizzato per valutare il numero di fibroblasti tendinei dopo 14 giorni di coltura e la sua soluzione madre viene preparata diluendo la soluzione di TNE, ottenuta dal tri (idrossimetil) metilamina, cloruro di sodio e acido etilendiamminotetraacetico, in acqua distillata e conservata alla temperatura di 4° C per poter essere utilizzata entro 3 giorni. Gli scaffold, una volta rimosso il terreno di coltura, sono stati lavati con il PBS e riempiti con 500 ml di acqua distillata per poi essere sottoposti a tre cicli di congelamento / scongelamento; 50 μ l provenienti dal campione dello scaffold sono stati infine prelevati e collocati, in triplicato, in piastra a 96 pozzetti sottoposta all'analisi in lettore a fluorescenza dopo l'aggiunta di 50 μ l di soluzione di TNE in ogni pozzetto.

2.3.2 Analisi dei risultati

Variando la velocità di rotazione del mandrino si sono ottenute differenti morfologie di fibre mediante l'elettrospinning del PCL. La rete fibrosa casuale, difatti, è stata generata dalla raccolta di fibre su un mandrino dotato di una più lenta rotazione (50 giri / minuto) rispetto a quella prelevata, invece, da un mandrino rotante in maniera più veloce (600 giri / minuto) ; ruotando manualmente il foglio 2D di PCL si è potuto creare poi un fascio 3D di PCL. Anche l'allineamento delle fibre è stato influenzato dalla direzione di rotazione del mandrino e ha indotto differenze significative: lente rotazioni hanno condotto a un'ampia distribuzione di allineamento delle fibre, la maggior parte dirette perpendicolarmente alla direzione di rotazione, contrariamente a quanto accade per rotazioni più rapide che hanno portato invece alla raccolta di fibre inclinate di 20° rispetto all'asse di rotazione del mandrino.

Le proprietà tensili degli scaffold 2D sono state influenzate e sono variate notevolmente a seconda dell'orientamento delle fibre, tant'è che scaffold formati da una rete di fibre disposte casualmente hanno riportato dei valori dei dati a trazione, in termini di rigidità e stress di rottura, inferiori rispetto a quelli realizzati mediante un perfetto allineamento fibroso unidirezionale. Per quanto concerne la valutazione delle proprietà meccaniche degli scaffold 3D, si è evidenziato un notevole incremento, sia di resistenza sia di rigidità, di quasi tre volte maggiore rispetto a quelli 2D.

Struttura Scaffold	Modulo di Young (MPa)	Sollecitazione ultima di tensione (MPa)	Massima forza (cm / cm)
2D casuale	1.54	0.45	1.14
2D allineata	4.84	1.30	1.11
3D fascio	14.11	4.74	1.05

Figura 2.3.2 a – Confronto tra proprietà tensili per scaffold elettrofilati.

L'osservazione al SEM dei fibroblasti disseminati sulle tre differenti tipologie di scaffold ha dimostrato una buona adesione cellulare alle pareti dello scaffold di riferimento e ne ha constatato soprattutto un notevole incremento di copertura, dopo un periodo di coltura di due settimane, indice dell'attività di proliferazione delle cellule stesse. Inoltre, si è riscontrato un'evidente differenza morfologica dipendente dalla tipologia di superficie di contatto cellulare: se coltivate su fibre casuali 2D, le cellule si sono diffuse in maniera tendenzialmente caotica, mentre, se su fibre allineate o 3D, sono riuscite a organizzarsi parallelamente alla fibra sottostante.

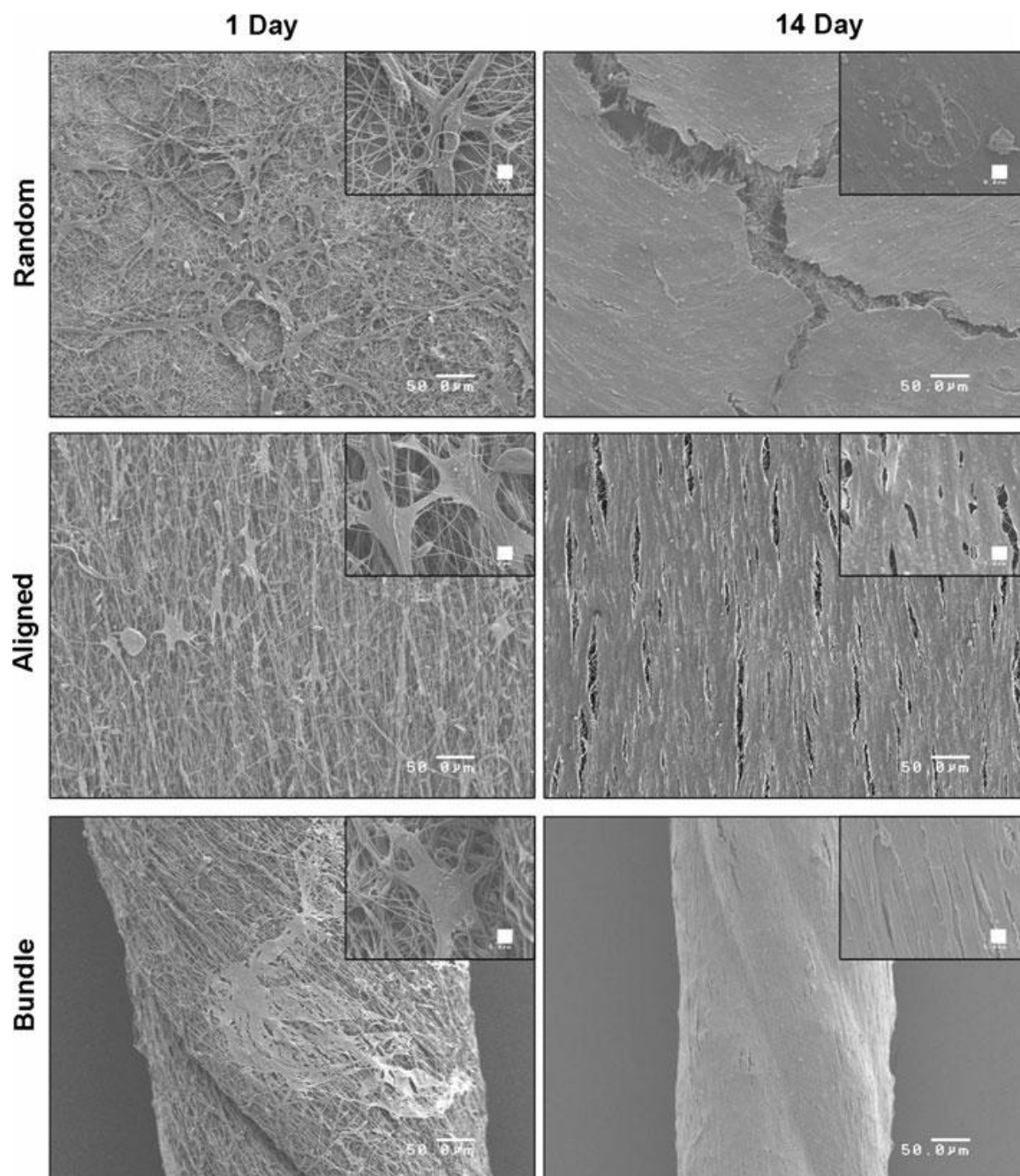


Figura 2.3.2 b – Analisi al SEM dei tenociti in coltura.

Confrontando le differenti tipologie 2D di fibre con il tessuto tendineo naturale si è evidenziata una certa somiglianza delle fibre allineate al tessuto stesso poiché ne imitavano perfettamente la disposizione delle fibre di collagene a livello degli strati sub fascicolari tendinei. Tuttavia queste fibre non potevano essere assolutamente paragonabili al fascio di tessuto tendineo, che possiede una gerarchia 3D e, per ovviare a tale problema e poter realizzare uno scaffold fibroso che soddisfi questa proprietà, il singolo strato allineato è stato attorcigliato manualmente attorno al suo asse longitudinale con il fine di realizzare un

fascio 3D del diametro di 150 / 200 μm . In questo modo si è riusciti a emulare perfettamente il terzo livello del tessuto tendineo.

Affinché lo scaffold possa essere considerato come un innesto di successo deve dimostrare accettabili proprietà meccaniche, visto che una delle principali funzioni tendinee è quella di sopportare ripetuti carichi di tensione, e, a tal proposito, lo scaffold 3D è risultato il più favorevole nel soddisfare tale requisito. Al contempo però, se confrontato con il tessuto originario, ha dimostrato delle debolezze in merito che sono state sormontate avvalendosi di una tecnica finalizzata alla realizzazione di fasci di fibre più larghi e disposti in maniera tale da resistere maggiormente alla trazione. Ulteriori indagini sui fasci di fibre 3D, infine, si sono incentrate sulla ricerca del miglioramento del grado di infiltrazione cellulare che, essendo limitato a causa della modesta area della superficie di adesione, deve poter raggiungere un livello di accettabilità tale da poter essere considerato come potenziale innesto sintetico utilizzato alternativamente agli autoinnesti per la riparazione tendinea.

2.4 Impianto 3D a base di collagene per la riparazione del tendine d'Achille

Un difetto del tendine d'Achille, relativamente ad una grande perdita di tessuto, costituisce un problema molto più difficile da affrontare rispetto alla semplice riparazione di un generico tendine lacerato. La vascolarità molto bassa, la capacità di tollerare le forze dovute al peso durante il processo di guarigione nonché lo sviluppo di adesioni peritendinee, sono tutti esempi di significative problematiche da affrontare nel corso di qualsiasi strategia di trattamento ed è proprio in questo contesto che assume un ruolo di rilevata importanza l'ingegneria tissutale. Dalle conoscenze inerenti le tecnologie dell'elettrospinning, infatti, si è ottenuto come risultato un nuovo impianto 3D di collagene ibridato composto da un'ultrastruttura allineata e da fibre di collagene (dell'ordine del micro e del nanometro) volte a emulare la struttura originaria del tendine sia nella dimensione che nell'architettura. Dopo aver compiuto le opportune valutazioni *in vitro* e aver eseguito le necessarie prove di controllo qualità, si è proseguito con la seconda fase sperimentale ovvero con lo studio dell'efficacia dell'impianto *in vivo* negli animali, specificatamente conigli.

Una volta inserito chirurgicamente l'impianto di collagene nel tessuto lesionato, ciascun campione è stato sottoposto a controlli di molteplice natura per poterne determinare caratteristiche essenziali quali la corretta trasmissione bioelettrica nonché il monitoraggio di parametri clinici ed ematologici. Già dalle prime settimane successive all'intervento, l'analisi degli studi istopatologici hanno mostrato ottime caratteristiche di biocompatibilità, citocompatibilità e biodegradabilità da parte dell'impianto 3D di collagene; quest'ultimo infatti ha evidenziato l'abilità di promuovere il processo di guarigione del tendine modulando i suoi effetti nell'attivazione delle cellule infiammatorie e fibroblastiche, attratte inevitabilmente nell'area lesionata, controllandone la proliferazione. In particolar modo si è constatata una forte integrazione tra la risposta infiammatoria e il tessuto tendineo rivelando un effetto, da parte del processo infiammatorio, di promozione piuttosto che di rigetto dell'intero impianto di collagene e dimostrando di possedere un ruolo predominante nella guarigione del tendine. Uno dei limiti principali di tale costrutto, però, è lo sviluppo dell'adesione peri-tendinea in quanto si è constatata una difficoltà da parte del tendine sano di svolgere le normali funzioni caratteristiche; difatti, la riduzione dell'adesione peri-tendinea nella zona lesionata è strettamente correlata ad una diminuzione della capacità tissutale di sostenere specifici carichi nonché dell'attività fisica muscolare dato lo sviluppo di una lieve atrofia muscolare riscontrata negli animali.

Dopo 3 settimane dall'intervento si è visto che l'impianto non era stato ancora completamente assorbito; ciononostante le zone di collagene del costrutto restanti hanno mostrato possedere un importante ruolo nell'allineamento tissutale e, nel momento in cui l'impianto è stato completamente sostituito dal tessuto rigenerato, non si è riscontrato alcun segno di rifiuto ma, al contrario, si è notata una perfetta analogia morfologica e biochimica con il tessuto intatto fino ai 120 giorni successivi, come si evince dalla figura successiva.

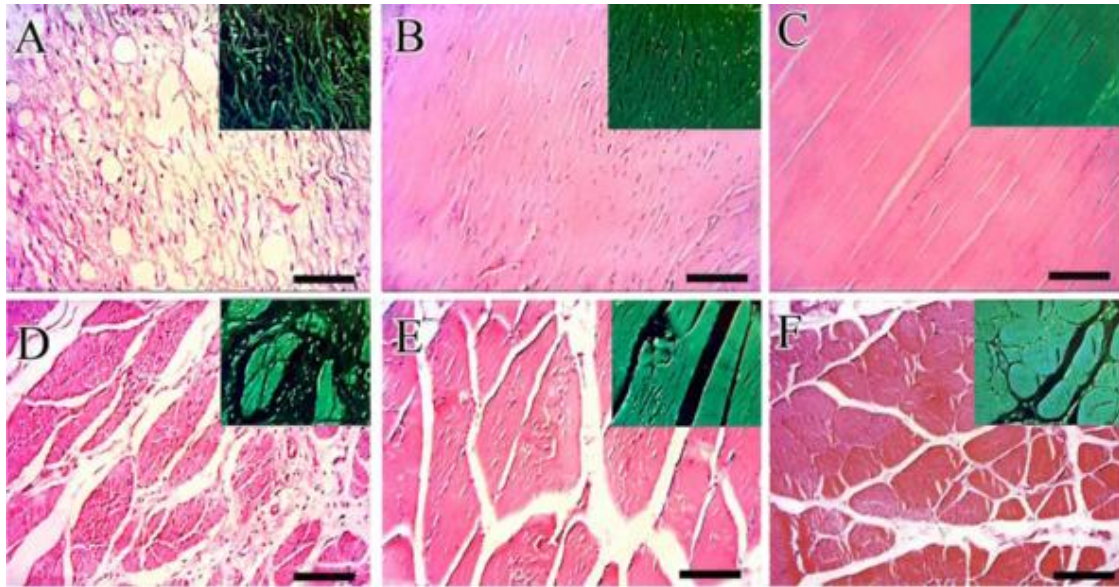


Figura 2.4 – Analisi istopatologica dopo 120 giorni dalla lesione.

In conclusione tale ricerca viene considerata come punto di partenza per l'applicazione dell'ingegneria tissutale basata sui bioimpianti di collagene *in vivo*, nonostante i limiti riscontrati e gli effetti consequenziali analizzati. Essa ha soprattutto gettato le basi per le indagini future relative allo studio del ruolo degli impianti TE a base di collagene sugli aspetti molecolari del tendine in fase di guarigione, verificandone tutti gli effetti che ne scaturiscono *in vivo*.

2.5 Riparamento del legamento crociato anteriore (ACL)

Il legamento crociato anteriore è uno dei legamenti del ginocchio maggiormente soggetti a lesioni e le strategie relative alla sua ricostruzione consistono nell'utilizzo locale di autoinnesti o alloinnesti con lo scopo di sostituirne le funzionalità peculiari. Tuttavia l'uso di questi allo innesti comporta il rischio di trasmissione di malattie, infezione batterica e la possibilità di una risposta immunogenica scatenata nel sito ospitante, motivi per cui la ricerca si è orientata verso la scoperta di sostituti sintetici ACL che possano ovviare a tali problematiche. Anche questa tipologia di innesti, però, presenta dei limiti nel successo clinico dovuti essenzialmente alle reazioni infiammatorie, causate dalla non degradabilità che li caratterizza, e al conseguente fallimento dell'intero costruito. Per tali ragioni l'ingegneria tissutale si è focalizzata prevalentemente sulla selezione di materiali biologici, quindi sull'identificazione di un'appropriata composizione di polimeri basata sulla risposta cellulare ottenuta, sulla degradazione del costruito e sulle proprietà meccaniche associate. Sono state considerate infatti tre differenti composizioni di fibre poli- α -idroestere⁴ con diversi tassi di degradazione:

- PGA (Acido Poliglicolico)
- PLLA (Acido Poli - L - Lattico)
- PLAGA (Acido Polilattico - Co - Glicolico)

Molteplici studi condotti in merito, dopo aver opportunamente definito le caratteristiche di tali fibre in termini di architettura (diametro dei pori, porosità e area di superficie) e di proprietà meccaniche, si sono incentrati sulla realizzazione di 6 scaffold differenti, la metà dei quali con una superficie rivestita da fibronectina per aumentare l'adesione cellulare. Dopo aver ottenuto i fibroblasti ACL, questi sono stati impiantati negli scaffold a loro volta esaminati successivamente mediante un'analisi al SEM per verificare l'adesione e la crescita cellulare in funzione del tempo di coltura, come dimostrano le immagini seguenti.

4. Per un approfondimento sui materiali impiegati nella fabbricazione degli scaffold si rimanda all'appendice.

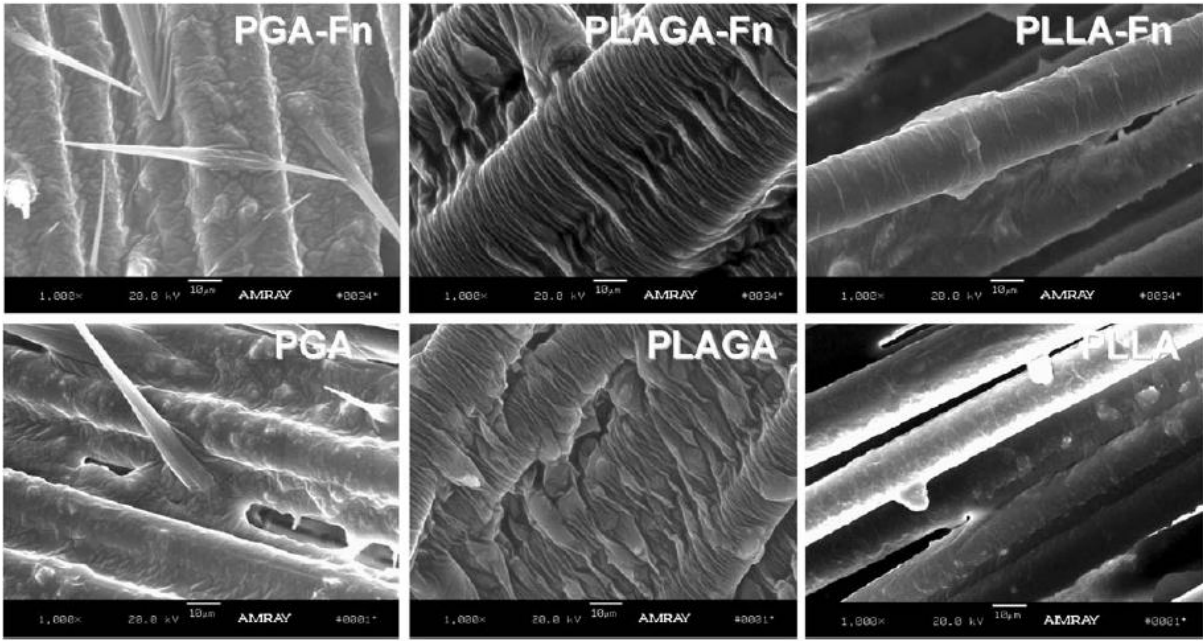


Figura 2.5 a – Analisi scaffold al SEM dopo un giorno di coltura.

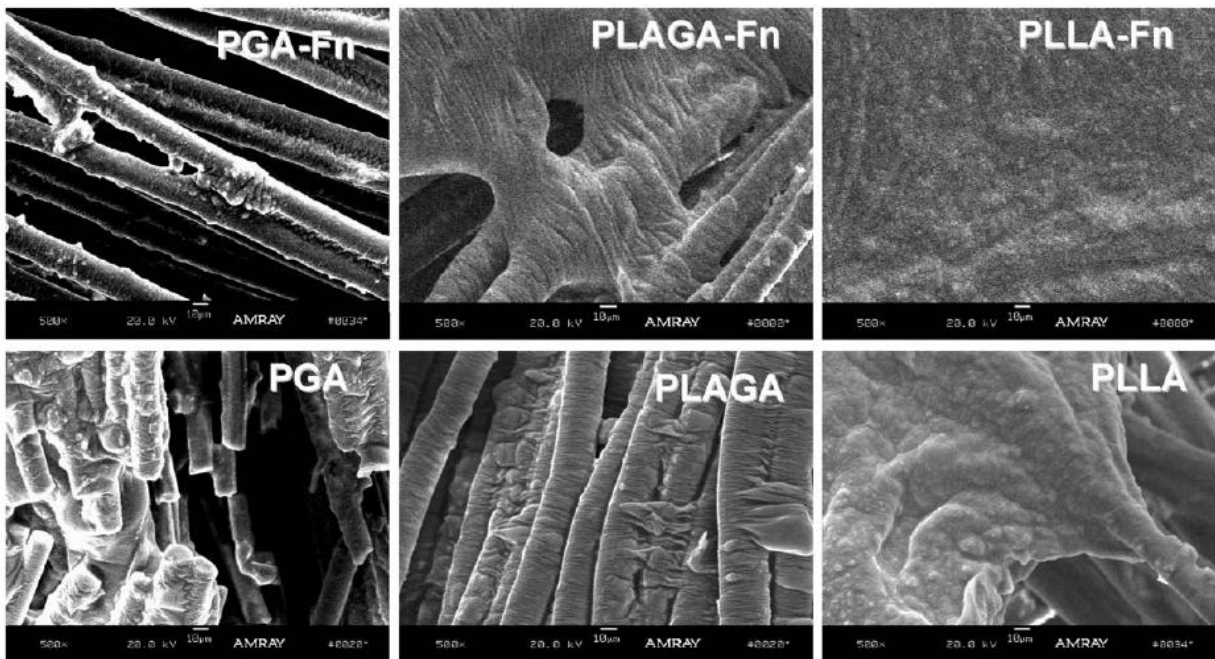


Figura 2.5 b – Analisi scaffold al SEM dopo una settimana di coltura.

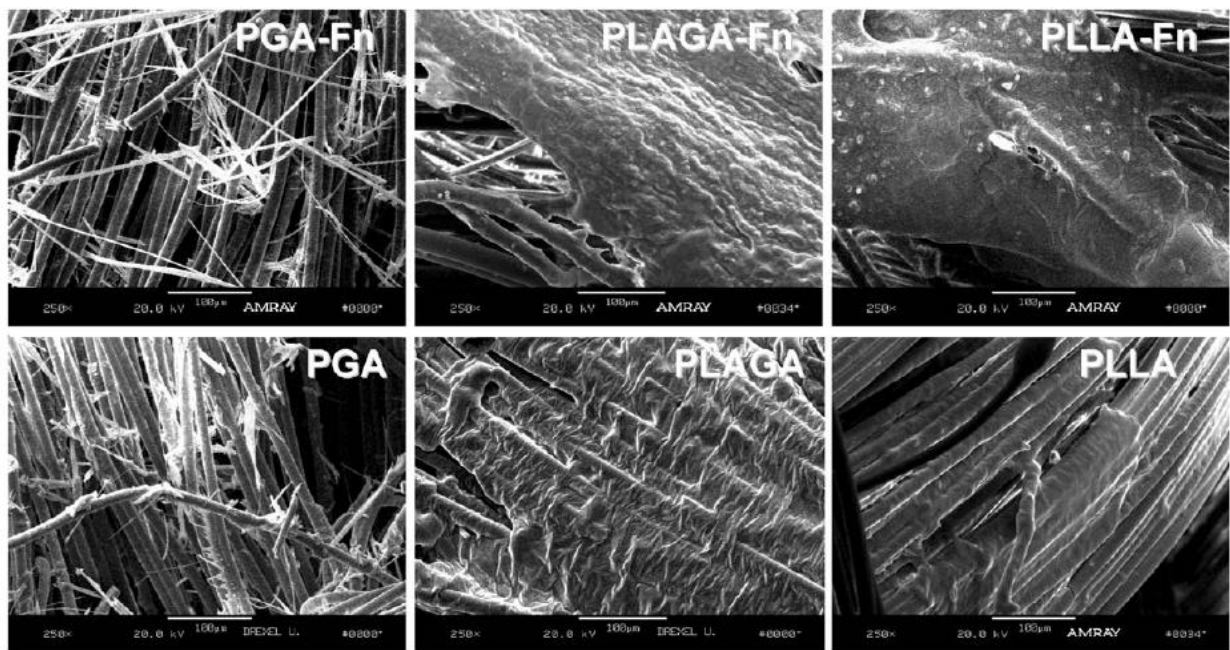


Figura 2.5 c - Analisi scaffold al SEM dopo 14 giorni di coltura.

La figura 2.5a mostra l'adesione dei fibroblasti ACL agli scaffold e l'effetto della fibronectina dopo solo un giorno di coltura. La diffusione cellulare è stata osservata in tutti e tre gli scaffold esaminati, indipendentemente dalla composizione polimerica e dal rivestimento di fibronectina, e si è notato che i fibroblasti si sono ben adeguati soltanto alla geometria degli scaffold composti da PLAGA e PLLA; In quelli composti da PGA si è riscontrata invece una formazione di ponti tra le varie fibre e su quello rivestito da fibronectina e composto da PLLA (PLLA – Fn) si è verificato un significativo aumento dell'adesione cellulare.

Dopo 7 giorni (figura 2.5 b), su tutti gli scaffold esaminati, si è osservata una vasta produzione di matrice con ponti formati tra le varie fibre. Le cellule cresciute sugli scaffold prerivestiti di fibronectina, tra cui soprattutto il PLLA- Fn, hanno generato più matrice rispetto a quelli che ne erano privi e si è notato che, per quanto concerne lo scaffold PGA, la sua rapida degradazione in presenza di cellule e del terreno di coltura ha portato alla formazione di una matrice costituita da molti filamenti frammentati. Dopo una settimana, la degradazione dello scaffold PGA e PGA – Fn ha comportato la perdita di molte cellule e la formazione di larghi buchi sull'intera matrice contrariamente a ciò che è avvenuto agli scaffold rivestiti da fibronectina per cui, difatti, la crescita cellulare ha

portato ad un aumento considerevole di matrice , nonché ad un'integrità complessiva dell'intera struttura.

Dopo 14 giorni (*Figura 2.5 c*) lo scaffold formato di PGA si è notevolmente rovinato : la densità cellulare è risultata essere molto bassa e la degradazione ha condotto alla formazione di ampi spazi vuoti. Contrariamente gli altri due scaffold , ovvero quelli formati da PLAGA e PLLA, hanno mantenuto una buona integrità complessiva continuando a sostenere quindi un' ampia area di matrice.

Risulta evidente quindi come la risposta delle cellule ad un determinato scaffold è dipendente dalla composizione polimerica con la quale esso è stato fabbricato e soprattutto si è confermato che l'assorbimento di fibronectina ha aumentato l'efficienza dell'adesione cellulare, riscontrando effetti positivi sulla produzione di matrice da parte delle cellule cresciute sugli scaffold composti da PLLA e PLAGA. Basandosi sulla morfologia delle cellule attaccatesi , sulla proliferazione cellulare e specialmente sulle proprietà meccaniche e di degradazione, lo scaffold di PLLA è considerato il più idoneo per l'ingegnerizzazione tissutale dell'ACL rispetto a quello di PLAGA e di PGA , nonostante quest'ultimo abbia dimostrato possedere inizialmente una maggiore forza che è andata scemando, a causa della degradazione del substrato , portando alla distruzione della matrice e della sua integrità.

Con lo sviluppo dell'ingegneria dei tessuti assistita da calcoli, che consiste nel trovare lo scaffold più appropriato , relativamente ad una specifica applicazione , avvalendosi di strumenti numerici , si è realizzato un nuovo scaffold per ACL formato da fibre di acido lattico – co- (ϵ – capro lactone) (PLCL) organizzate in una struttura intrecciata multistrato con lo scopo di garantire una rete di pori adattabile alla crescita tissutale. Il numero degli strati, il diametro delle fibre e l'angolazione degli intrecci della struttura sono tutti parametri utilizzati per prevedere sia la morfologia che le proprietà di trazione dello scaffold , definite numericamente da un'analisi ad elementi finiti (FE) per la simulazione della meccanica delle fibre tessili.

L'obiettivo principale di tale studio è stato quello di presentare un modello numerico di scaffold per l'ingegneria dei tessuti ACL , utilizzando specifici metodi numerici applicabili ai materiali delle fibre , preoccupandosi prima di tutto del disegno dell'architettura intrecciata multistrato della struttura e della determinazione della migliore composizione di materiale ricercata e poi del confronto tra la geometria “ calcolata ” ricavata dalla simulazione FE e quella dello scaffold intrecciato realizzato.

Per quanto concerne l'architettura dello scaffold, questa è in accordo con i requisiti morfologici e biomeccanici associati alla riparazione del ACL ed è stata realizzata con un insieme di strati intrecciati in maniera circolare concentrica, scelta appositamente in questo modo per diversi motivi:

- 1) E' deformabile in un range di bassi carichi e ciò garantisce tensioni minime per qualsiasi movimento.
- 2) Mostra un'elevata rigidità e forza per ampi carichi.
- 3) Offre una rete di pori interconnessi indispensabile per la migrazione cellulare, per il supporto di fattori biochimici e per la formazione di tessuto legamentoso.
- 4) Si adatta all'ingegneria tissutale assistita da computer grazie alla prevedibile geometria risultante dal processo di intreccio.
- 5) Garantisce una dimensionalità dei pori che facilita il trasporto di nutrienti e rifiuti dal cuore dello scaffold verso la sua periferia.

Il numero delle fibre per strato è stato fissato a 16, un comune valore a livello industriale, e il parametro "angolo dell'intreccio" θ corrisponde ad una procedura che fissa l'angolo iniziale tra la direzione dell'intreccio e quella della fibra antecedente al suo arrotolamento attorno all'intreccio stesso. Quando il numero degli strati cresce la fibra si arrotola attorno ad un diametro sempre più grande e, conseguentemente, anche l'angolo θ subisce proporzionalmente un aumento così come si evince dalla figura seguente.

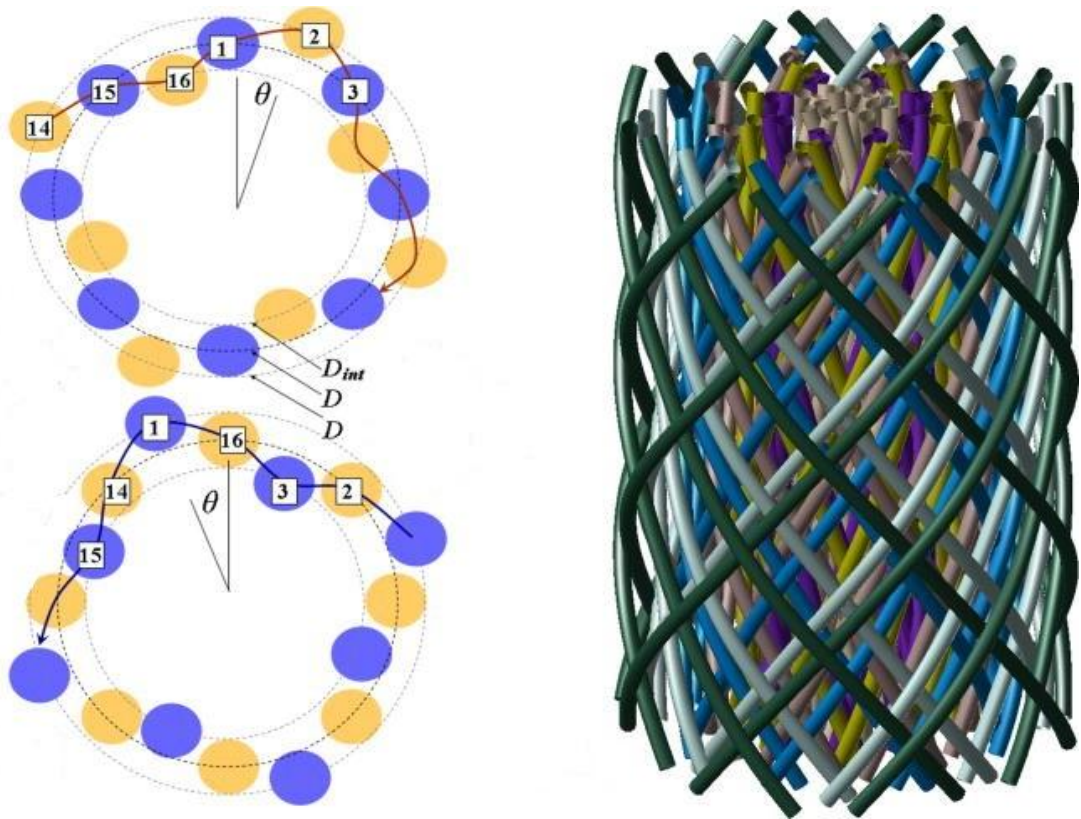


Figura 2.5 d – Analisi di uno scaffold multistrato intrecciato preposto per l'ingegneria dei tessuti ACL.

Riguardo alla scelta del materiale dello scaffold, questo deve essere selezionato avvalendosi di considerazioni biologiche e meccaniche e il PLCL quindi si è dimostrato il più idoneo per la realizzazione dello scaffold intrecciato multistrato grazie ai seguenti motivi:

- 1) Offre un'eccellente biocompatibilità associata ad un basso tasso di degradazione.
- 2) Permette di compensare sia il comportamento fragile del PLLA e sia la bassa rigidità del PCL.
- 3) Può essere trasformato in fibre utilizzando comuni estrusori plastici capaci di controllarne il diametro.

La validazione dei risultati ottenuti mediante l'analisi agli FE, compiuta secondo specifiche regole e algoritmi, consiste nel confrontare la geometria derivante da tale procedura con quella dello scaffold reale avvalendosi di due diversi metodi: il primo si basa sulla comparazione tra i rispettivi diametri esterni per un crescente numero di strati, il secondo, invece, sul paragone tra la distribuzione di fibre nelle loro sezioni di intreccio. In un secondo momento sono state poi confrontate le risposte ai carichi dei due differenti

scaffold, sia sperimentalmente che in maniera analitica , e i risultati dei test a cui sono sottoposte le due “ impalcature ” sono stati valutati in termini di rigidità , zone critiche e carico subito.

Un punto saliente su cui si è focalizzato tale studio riguarda la deformazione delle fibre , considerata di natura plastica e a cui corrispondono piccoli effetti viscoelastici, che viene valutata sottoponendo la singola fibra isolata ad una specifica velocità di carico per poterne studiare il comportamento di natura meccanica. I risultati così ottenuti sono stati infine raccolti , assieme a quelli precedenti , con lo scopo ultimo di realizzare un nuovo scaffold che miri ad assumere il ruolo di fonte d'innesto per gli interventi chirurgici, l'innovativa frontiera nell'ambito dell'ingegneria tissutale ACL.

3 Progettazione e tecniche di fabbricazione degli scaffold

3.1 Scaffold naturali o biologici

Gli scaffold naturali o biologici sono proteine di base appartenenti alla matrice extracellulare contenuta nei tessuti dei mammiferi come quelli umani, bovini, suini ed equini; la mucosa intestinale, il pericardio o l'epidermide sono tutti tessuti che vengono trattati e trasformati per rimuovere le componenti di non – collagene, principali cause di rigetto, mantenendone al contempo la struttura e le proprietà meccaniche che, però, risultano comunque inferiori se paragonate a quelle dei normali tendini e legamenti.

Un altro tipo di scaffold biologico utilizzato in questo settore deriva dai tessuti degli allo innesti decellularizzati, a cui fa seguito una ricellularizzazione in vitro, che promette numerosi vantaggi in quanto, grazie alla ridotta immunogenicità, preserva la naturale struttura nonché la forza e la stabilità biomeccanica tendinea o legamentosa. Anche in questo caso esistono degli inconvenienti da dover considerare e sono di natura sia enzimatica che chimica poiché, essendo ambedue metodi utilizzati per la decellularizzazione tissutale, possono provocare nel primo caso una risposta immunitaria oppure, nel secondo, una forma di tossicità dovuta ai residui chimici che si manifesta nel momento in cui lo scaffold è impiantato in vivo.

3.2 Scaffold sintetici

Contrariamente agli scaffold biologici, quelli sintetici possiedono delle proprietà meccaniche più forti ma, allo stesso tempo, sono caratterizzati da una limitata biocompatibilità; per ovviare a tale problema, quindi, sono stati realizzati dei polimeri sintetici specifici per l'ingegneria tissutale e più versatili rispetto ai corrispettivi naturali poiché maggiormente abili nel controllare le proprietà chimiche e fisiche, nonché le caratteristiche strutturali del tessuto tendineo e legamentoso. *L'acido poliglicolico* (PGA), *l'acido polilattico* (PLA) e alcuni co – polimeri vengono tutti ampiamente utilizzati nell'ambito dell'ingegneria tissutale e sono indispensabili sia per la manipolazione dei parametri strutturali nell'architettura degli scaffold, sia per la loro bioattività che, assieme a segnali che promuovono l'attività cellulare, garantiscono la neoformazione tissutale.

Per la rigenerazione dei tessuti sono stati infine proposti alcuni scaffold realizzati con polimeri naturali :

- La seta , un materiale biocompatibile e biodegradabile con intrinseche caratteristiche meccaniche.
- Il collagene , il principale costituente dell'ECM.
- La fibrina , una proteina fibrosa fondamentale per i processi di coagulazione sanguinei e caratterizzata dal possedere una struttura riassorbibile utilizzata principalmente per incapsulare le cellule in maniera stabile.
- Polisaccaridi o altre proteine che mostrano una certa familiarità con la matrice extracellulare.
- La combinazione di diversi biomateriali , una nuova strategia per la realizzazione di scaffold ibridi.

Molti studi invece , più che focalizzarsi sulla ricerca di nuovi biomateriali per ottenere notevoli e vantaggiosi miglioramenti nella fabbricazione degli scaffold , si sono concentrati prettamente sul tipo più idoneo di cellula da impiantare , basandosi su una scelta a priori dello specifico scaffold. La relazione esistente nella selezione sia della tipologia di “impalcatura” da utilizzare che delle cellule da impiantarvi ha portato alla realizzazione di un ciclo cellula – scaffold – cellula che , così come si evince dalla *figura 3.2* , dimostra la reciproca influenza dovuta da un lato alle funzionalità cellulari e dall'altro alle proprietà salienti dello scaffold.

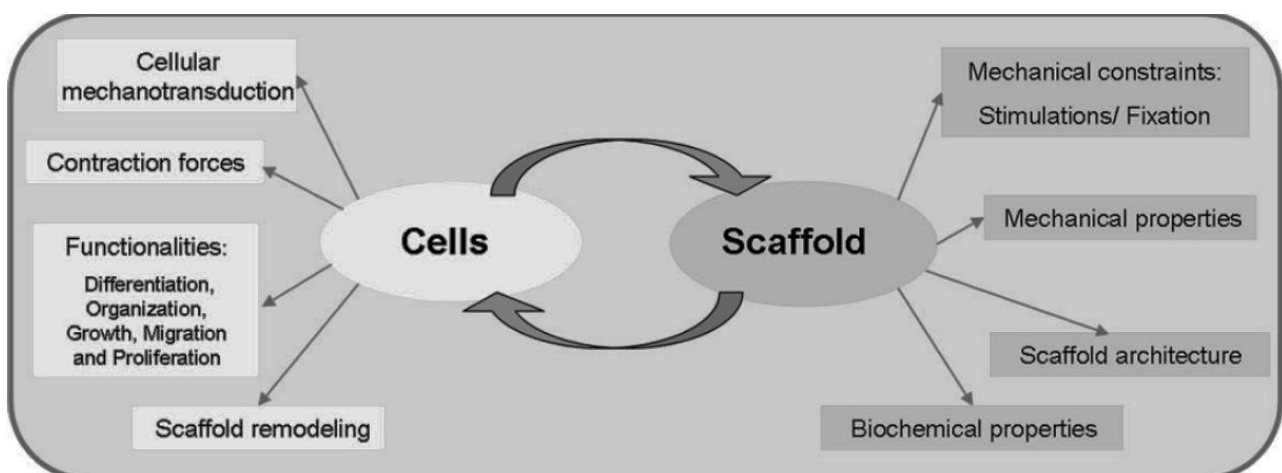


Figura 3.2 – interazione tra cellule e scaffold.

3.3 Influenza delle cellule

I tessuti “neonati”, che siano indifferentemente di natura tendinea o legamentosa, possiedono un elevato contenuto cellulare e, in particolare, una notevole presenza di matrice con il compito di supportare le stesse cellule sia nella crescita che nel relativo sviluppo, fasi indispensabili per il mantenimento delle funzionalità tissutali. Nell’ambito dell’ingegneria dei tessuti (TE) si sono sviluppate alcune tecniche che vertono sull’utilizzo di terapie a base cellulare con lo scopo di indurre una rigenerazione del tessuto stimolando la proliferazione delle cellule locali e la produzione della matrice strutturale, fondamentale nel momento in cui lo scaffold impiantato comincia a degradarsi.

3.3.1 Fonti cellulari per tendini e legamenti

Le cellule autologhe, come ad esempio i tenociti, rappresentano un’ottima scelta sia per garantire la sostituzione cellulare a livello strutturale e funzionale e sia per evitare qualsiasi reazione immunitaria o forma di “debolezza” causata dall’utilizzo di innesti. Difatti l’isolamento e la coltura dei tenoblasti / tenociti, provenienti da differenti siti anatomici come il muscolo rotatorio del polso e il tendine d’Achille, è tuttora possibile ma, sono così pochi a livello quantitativo che questo comporta la perdita a lungo termine di resistenza tissutale, nonché l’insorgere di difetti indesiderabili.

I fibroblasti provenienti dall’epidermide (DFs) sono un’accessibile fonte cellulare, utilizzabile nella riparazione di tendini e legamenti, ed hanno molte caratteristiche comuni ai tenociti poiché ambo sono cellule differenziate che hanno origine dal mesoderma; I DFs sono generalmente ricavati dal tessuto mediante una biopsia della pelle, ovvero una semplice, immediata e poco costosa procedura, e in seguito vengono fatti sviluppare in colture *in vitro*.

La membrana sinoviale che circonda il legamento del crociato posteriore potrebbe essere, inoltre, una buona fonte cellulare in quanto le cellule costituenti, oltre ad avere molteplici origini, riescono ad estendersi e a colonizzare la zona danneggiata.

Negli ultimi anni sono stati compiuti alcuni studi basati sulla ricerca e il confronto di fonti cellulari, ideali per la rigenerazione dei tendini e dei legamenti, e le cellule staminali, per l’appunto, sono state considerate come potenziali cellule con la capacità di adattarsi e

differenziarsi in una specifica tipologia cellulare tendinea o legamentosa . Da un paragone , ad esempio , compiuto tra le cellule staminali prelevate dal legamento del crociato anteriore (LSCS) e tra quelle derivanti dal midollo osseo (BMSCs), sempre ottenute dallo stesso donatore , è emerso che le LSCs proliferino più velocemente e mantengano uno stato indifferenziato , nonostante la stimolazione dovuta a fattori di crescita a cui sono sottoposte ; inoltre , se trattate specificatamente , le LSCs regolano una maggiore espressione del gene tendineo e producono una notevole quantità di proteine dell' ECM del legamento. Dai risultati invece ottenuti dall'utilizzo delle BMSCs , si è constatato come i parametri molecolari e biochimici dello stato tendineo subiscano un notevole incremento e ciò ha portato a considerarle come le più promettenti per le applicazioni nell'ambito del TE.

Recentemente hanno cominciato ad esser prese in considerazione le cellule staminali provenienti dal tessuto adiposo (ASCs) , specialmente per la rigenerazione tendinea , dimostrando come queste posseggano l'abilità di differenziarsi in più modi , provochino una minima duttilità al sito donatore e permettano di ottenere un elevato contenuto cellulare e , quindi , di tessuto.

Ricerche relative alla tenogenesi o alla differenziazione tenogenica mostrano come essa sia frenata dalla carenza di specifici markers o segnali , fondamentali e indispensabili per la differenziazione cellulare ; le cellule del tessuto connettivo infatti hanno tutte prevalentemente origine dallo strato mesodermale embrionale e la loro differenziazione fenotipica è basata su specifiche procedure di espressione genetica modulate da fattori ambientali quali possono essere le molecole associate alla formazione e allo sviluppo dei tendini e dei legamenti elencati nella *tabella 3.3.1*.

<u>Fattori di trascrizione</u>	<u>Funzioni nel tessuto tendineo/legamentoso</u>
TGF-β	Induttore di markers tendinei nelle cellule mesenchimali. Ruolo significativo nella formazione di tendini e legamenti.
Decorina(SLRPs)	La più abbondante nei tendini. Stabilizza e allinea le fibre di collagene durante la fibrinogenesi e contribuisce alla forza e all'elasticità del tendine.

Tenomodulina	Regolatore della proliferazione dei tenociti. Coinvolto nella crescita delle fibre di collagene. Elevata espressioni nelle cellule staminali/progenitrici tendinee.
Fibromodulina	Facilita la formazione e la crescita delle fibre di collagene. Coinvolto nella modulazione della forza tendinea.
Collagene I	Il maggior quantitativo di collagene nei tendini. Fornisce una maggiore compattezza e densità tissutale.
Collagene III	Ruolo importante nella fibrillogenasi del collagene. Strutturalmente simile al collagene I.
Scleraxis	Considerato un marker specifico per le cellule progenitrici tendinee. Associato alla differenziazione dei tendini e all'organizzazione della ECM. Partecipa nella formazione di forze di trasmissione tendinee.

Tabella 3.3.1 – Molecole associate alla formazione e allo sviluppo di tendini e legamenti.

3.3.2 Ruolo dei fattori di crescita

Il processo di riparazione tissutale comprende una complessa cascata di eventi biologici, regolati da numerose citochine e fattori di crescita. Quest'ultimi sono proteine secrete da un ampio range di tipi di cellule ed hanno lo scopo principale di trasmettere segnali, in grado di attivare specifici programmi di sviluppo cellulare, grazie ad un legame con i recettori presenti sulle membrane delle cellule stesse. Alcuni di essi, tra cui si ricorda il TGF β e i fattori di crescita dell'insulina 1 (IGF - 1), dell'endotelio vascolare (VEGF), degli epatociti (HGF) e quelli derivanti dalle piastrine sanguinee (PDGF), partecipano attivamente alla formazione del tendine o del legamento e alla sintesi o guarigione della matrice extracellulare, mentre altre molecole, come ad esempio l'ossido nitrico, ne influenzano essenzialmente il volume, modulando l'espressione genica e l'adesione cellulare

dei tenociti. Nel momento in cui tali fattori di crescita vengono rilasciati all'interno del sito danneggiato, modificano la proliferazione, la migrazione e la differenziazione cellulare, così come la sintesi matriciale che assume un ruolo chiave nella stimolazione della produzione locale di ECM e tenociti.

Si è condotto un esperimento basato sull'applicazione di segnali extracellulari ad un costrutto ingegnerizzato seta – BMSC con lo scopo di assistere e seguire la proliferazione delle BMSC, fornendogli dei fattori di crescita derivanti dall'epidermide (EGF) nei primi giorni per poi proseguire con la stimolazione della produzione di ECM, avvalendosi del TGFβ1 per altri nove giorni; si è constatata, quindi, una crescita significativa nell'espressione della trascrizione del collagene di tipo I e, al contempo, una perdita di integrità meccanica che ha rilevato la complessità peculiare dell'intero meccanismo nonché della risposta delle cellule sottoposte a tali stimoli esterni.

Il plasma ricco di piastrine (PRP) è una soluzione considerata come un'ulteriore strategia nell'ambito della rigenerazione tendinea e legamentosa in quanto le piastrine sono una fonte di numerosi fattori di crescita che vengono rilasciati e in seguito attivati per essere poi coinvolti nella riparazione di molti tessuti. Il PRP impedisce qualsiasi manifestazione di malattie trasmissive o immuni e, se combinato con fattori di crescita endogeni, provoca l'insorgere di numerosi effetti sinergistici con quest'ultimi. Le iniezioni locali di tale soluzione hanno evidenziato un rilascio, da parte del plasma che si coagula e dalle piastrine stesse, di fattori di crescita provenienti dalle proteine autologhe, promuovendo così la proliferazione e inducendo la sintesi di fattori di crescita angiogenici.

L'utilizzo di questo trattamento ha condotto ad un'alternativa meno invasiva rispetto alla chirurgia perché promuove un processo di guarigione tissutale prettamente naturale e, pur essendo ancora in fase sperimentale, fornisce già molteplici *input* per la scelta delle concentrazioni dei fattori indispensabili per la rigenerazione dei tendini e dei legamenti.

Di seguito, nella *tabella 3.3.2*, vi è una sintesi dei principali fattori di crescita associati allo sviluppo dell'ingegneria tissutale

<u>Fattori di crescita</u>	<u>Funzioni nei tendini / legamenti</u>
TGFβ	Associato con la formazione del tendine, è un forte induttore di markers tendinei nelle cellule mesenchimali.

	Incrementa la proliferazione delle BMSCs negli scaffold intrecciati PLGA
VEGF	Coinvolto nel rimodellamento degli innesti tendinei. In <i>vitro</i> viene prodotto dalle cellule dei tendini in seguito a stimoli provenienti dal plasma coagulato o dalle piastrine.
PDGF	Artefice delle risposte biologiche durante la fase di riparazione dei tendini flessori.
HGF	In <i>vitro</i> viene prodotto dalle cellule dei tendini in seguito a stimoli provenienti dal plasma coagulato o dalle piastrine.

Tabella 3.3.2 – Fattori di crescita associati all'ingegneria dei tessuti tendinei e legamentosi.

3.3.3 Proprietà meccaniche

Uno tra i problemi più affrontati dai ricercatori riguarda gli effetti meccanici indotti dalle cellule sullo scaffold a loro associato, provocandone conseguentemente alterazioni strutturali, e, per l'appunto, si sta cercando di capire quali siano le cellule che influiscono maggiormente nelle deformazioni e soprattutto quali siano i metodi più idonei per controllarle.

Esperimenti condotti in laboratorio, basati solitamente su scaffold fatti di gel di collagene, hanno constatato una contrazione relativa a tale composto che è preparato su appositi dischi di Petri e nel quale sono stati impiantati fibroblasti dermali umani. Per misurare i diametri dei reticoli di collagene, i dischi sono stati posizionati su una matrice trasparente rigata, permettendo così ai fibroblasti di interagire con le fibrille di collagene e di generare a loro volta un arrangiamento più denso mediante un processo che esclude acqua. Si è notato che ad ogni contrazione cellulare consegue una riduzione dell'area del reticolo e, nel momento in cui quest'ultima è ridotta di 7-8 mm, i bordi dello stesso disco iniziano a deformarsi e a perdere la loro forma circolare. Per regolare la velocità e l'estensione della contrazione, inoltre, si può operare *in vitro* variando le proteine contenute nel reticolo e il

numero di cellule impiantatovi all'interno, nonché applicando inibitori in appropriate concentrazioni.

Da un ulteriore studio a riguardo evince che la riduzione dell'area dello scaffold, pari al 60% di quella iniziale, ha origine dalle forze meccaniche esercitate dalle cellule seminate ma, ponendo un *device*, ovvero un dispositivo di supporto lungo i bordi dello scaffold stesso, si riescono a prevenire le deformazioni poiché lo si aiuta a resistere alle forze cellulari e a mantenere, quindi, le proprie dimensioni originali.

Per poter quantificare le forze generate dalle popolazioni cellulari all'interno di "un'impalcatura 3D" sono nati molti metodi che poi sono stati utilizzati per poter migliorare la comprensione dei molteplici processi biologici. A tal fine infatti si è sviluppata la cosiddetta *Culture Force Monitor* (CFM) che permette l'asestamento delle forze meccaniche attraverso una forza traduttrice estremamente sensibile; la sua prima versione prevede che la matrice di gel di collagene, ove all'interno sono impiantate le cellule, venga posizionata su un disco di Petri e sottoposta ad una piccola tensione da parte di due barrette, con appositi morsetti, di cui una fissa e l'altra è flessibile e connette il campione direttamente ad un estensimetro. Quest'ultimo ha la peculiarità di registrare lo spostamento dello scaffold, rispetto alla sua posizione di zero, per poi convertirlo in una forza a cui, però, viene sottratta quella cosiddetta "rumorosa" di background generata dalle cellule di gel di collagene libere. Il risultato ottenuto viene riportato alla fine su una curva la quale mostra, in funzione del tempo, l'andamento della forza generata dai fibroblasti presenti all'interno del composto e, specialmente, permette di individuare la forza media generata da ogni singolo fibroblasto così come dimostra il grafico in *figura 3.3.3*.

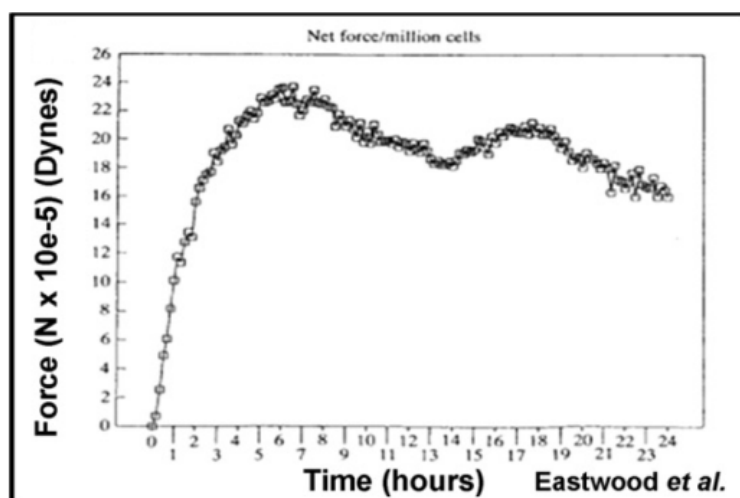


Figura 3.3.3 a – Andamento forza generata da 10^6 fibroblasti in funzione del tempo.

Compiendo alcune modifiche al sistema appena descritto, è stato possibile ricavare tali dati effettuando delle misurazioni molto più accurate, con lo scopo di limitare il più possibile il rumore di background. A tal fine si è adottato un cambiamento relativo al morsetto o *clamp* flessibile poiché quest'ultimo, essendo questa volta collegato alla trave a sbalzo, cioè una trave orizzontale vincolata ad una sola estremità, permette di ottenere una misura più "pulita" delle deformazioni che vengono poi ricavate, sempre tramite estensimetro, direttamente dalla deflessione della trave stessa convertita successivamente in forza.

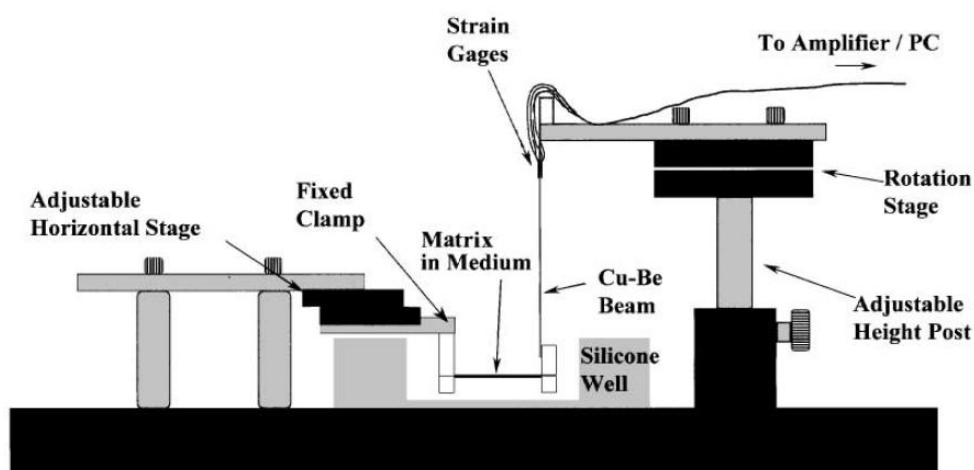


Figura 3.3.3 b – Schema CFM.

Avvalendosi di questa nuova strumentazione, si è potuta determinare una curva che descrive l'andamento della forza contrattile dei fibroblasti in funzione, oltre che del tempo, anche della densità di fibroblasti e quindi del numero di cellule che aderiscono alla matrice. Come emerge dalla figura sottostante, infatti, si ottiene come risultato un grafico che dimostra come la forza contrattile, a prescindere dalla densità cellulare, raggiunga un valore pressoché costante in seguito ad un ritardo iniziale causato dalla differenza, in termini di forza, tra le cellule che stanno aderendo e quelle libere presenti all'interno della matrice.

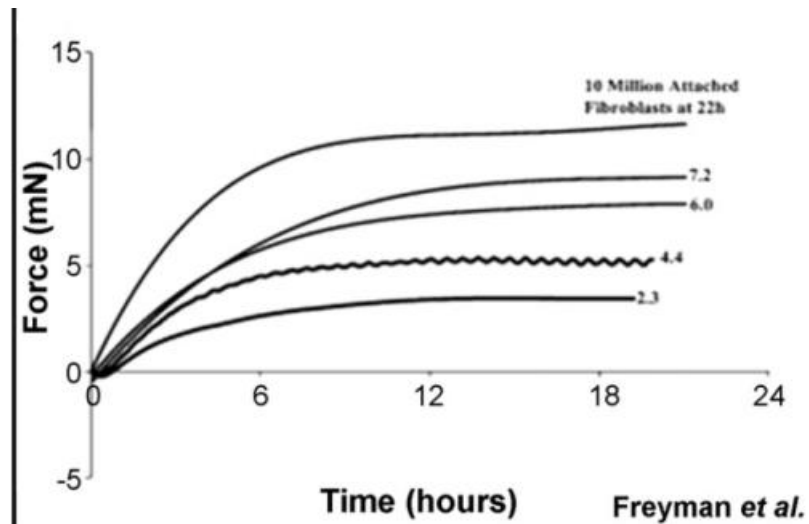


Figura 3.3.3 c – Forza generata da diverse densità di popolazioni di fibroblasti all'interno del gel di collagene.

Le tecniche appena descritte mostrano come sia possibile quantificare le forze contrattili cellulari, utili e indispensabili per la conoscenza sia del tipo che della quantità di cellule da impiantare negli scaffold senza influenzarne notevolmente l'assetto architettonico e la dimensione dei pori, tutte variazioni che conducono all'insorgere di fenomeni di adesione o dissociazione cellulare anomali.

Per ottenere quindi dei miglioramenti nel settore dell'ingegneria tissutale e fornire, conseguentemente, dei tessuti più robusti con incrementi terapeutici, è essenziale conoscere a pieno le interazioni tra appropriati tipi di cellule e proprietà degli scaffold e capire, oltre al contributo delle forze di trazione sulle deformazioni del substrato, anche l'influenza della rigidità matriciale sul tessuto ingegnerizzato finale.

3.4 Influenza degli scaffold

Affinché si possa rigenerare il tessuto naturale, è necessario realizzare delle strutture tridimensionali, per l'appunto gli scaffold, che inducano stimoli adeguati alla ricrescita tissutale e stimolino l'attività delle cellule, non in grado di organizzarsi autonomamente per la formazione di tessuti più complessi. Nella maggior parte dei casi, infatti, le cellule in coltura presentano la tendenza a moltiplicarsi e a proliferare solo in due dimensioni ma, nel momento in cui devono organizzarsi in strutture più complesse, richiedono necessariamente un supporto che le guidi durante le fasi del processo di differenziazione, sotto appropriate condizioni.

L'interazione esistente tra le cellule e il loro ambiente dipende sia dall'architettura della matrice e sia dalle proprietà meccaniche e biochimiche che la caratterizzano ; per quanto concerne , infatti , l'influenza di natura meccanica dello scaffold , questa scaturisce direttamente dalle sue stesse proprietà strutturali tra le quali emergono soprattutto la rigidità , la dimensione e il numero dei pori , il livello di degradazione e i materiali utilizzati per la sua composizione.

3.4.1 Rigidità

La rigidità dello scaffold è un parametro di rilevata importanza per lo sviluppo cellulare ed è definita dal modulo di Young , la pendenza ricavabile dalla tipica curva tensione – deformazione che rappresenta la forza su unità d'area indotta da una normale deformazione.

Per riuscire a progettare al meglio i tessuti connettivi ingegnerizzati , basati su scaffold di collagene o gel di collagene , è di fondamentale importanza saper regolare la proliferazione cellulare e , a tal fine , alcuni studi hanno dimostrato che determinati carichi meccanici , applicati alla matrice , inducono stimoli per la divisione cellulare ma che perdite di tensione meccanica , al contempo , inibiscono la stessa proliferazione e portano all'apoptosi.

Tra i molteplici approcci utilizzati per il controllo efficace della rigidità delle matrici , quello prettamente utilizzato in ambito sperimentale riguarda l'applicazione di tecniche di compressione che , in combinazione con specifici processi di assorbimento , hanno lo scopo di compattare al meglio i gel. Come descrive la *figura 3.4.1*, vengono collocati , su un doppio strato di carta assorbente , una maglia inossidabile d'acciaio e una di nailon e , a sua volta , su quest'ultima si posiziona una matrice di collagene che viene poi ricoperta da un' ulteriore maglia di nailon e caricata con un blocchetto di metallo da 120 g a temperatura ambiente. Una volta compattata , la matrice di collagene viene sfilata da i due strati protettivi di nailon , collocata in appositi pozzi di coltura e , successivamente , su carta assorbente ove è lasciata soggetta a una compressione , dovuta al suo stesso peso , che ne comporta una perdita di liquidi che permette , quindi , il raggiungimento del livello di densità prestabilito.

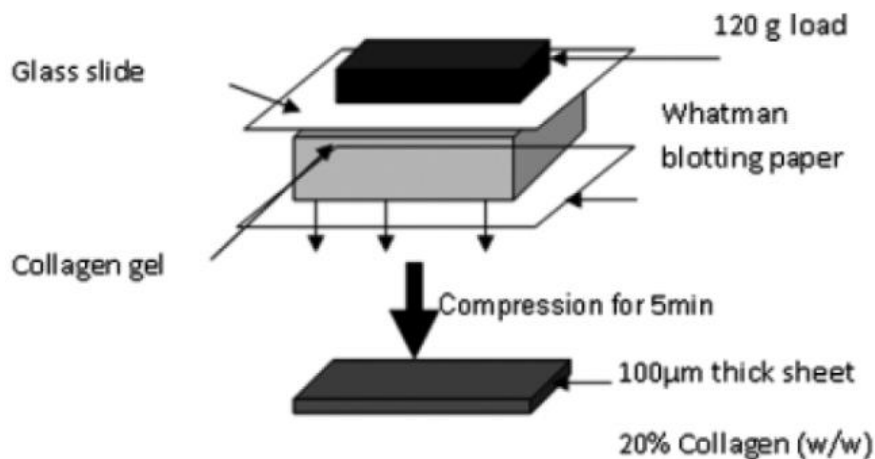


Figura 3.4.1 – Gel di collagene compresso con carico applicato.

Le proprietà meccaniche delle matrici di collagene compresse sono state rilevate mediante utilizzo di un analizzatore dinamico che permette di determinare la relazione tra la forza e la deformazione, quindi calcolare il modulo di Young per tutti i campioni analizzati. Lo studio compiuto ha difatti dimostrato che i diversi livelli di perdita dei fluidi, a cui sono soggetti i vari campioni di gel di collagene, portano all'insorgere di cambiamenti, riguardanti il loro modulo di elasticità, e alla nascita di matrici con differenti percentuali di densità di collagene che aumenta proporzionalmente alla rigidità della matrice stessa.

3.4.2 Architettura

Lo scaffold ha la capacità e la possibilità di poter regolare le varie funzioni cellulari attraverso la sua architettura, specialmente agendo sui suoi tratti morfologici ovvero sui pori che presenta al proprio interno. La percentuale di porosità, nonché il diametro, l'interconnettività e l'orientazione dei pori, sono tutte caratteristiche determinanti per l'adesione e la proliferazione cellulare e controllare tali proprietà è una delle maggiori sfide da affrontare in fase di progettazione dello scaffold.

Per riprodurre fedelmente tutte le peculiarità di un tessuto cosiddetto "normale", cioè non danneggiato, non è sufficiente, però, realizzare uno scaffold con un'elevata porosità e depositarvi all'interno la tipologia di cellule più idonea e appropriata poiché bisogna, allo stesso tempo, conferire una certa importanza anche alla geometria del substrato della matrice associata al comportamento cellulare. Difatti, il riconoscimento del ruolo significativo assunto da tale geometria, ha portato allo sviluppo di molte tecniche di realizzazione di

scaffold 3D ben definite che , nonostante si stiano affinando notevolmente e abbiano mostrato le potenzialità per riprodurre “ strutture architettoniche ” molto simili a quelle dei tessuti originali , non riescono a generarne alla perfezione i tratti salienti : la rete completa di pori di interconnessione , la morfologia finemente regolabile e la microstruttura variabile all’interno della stessa matrice.

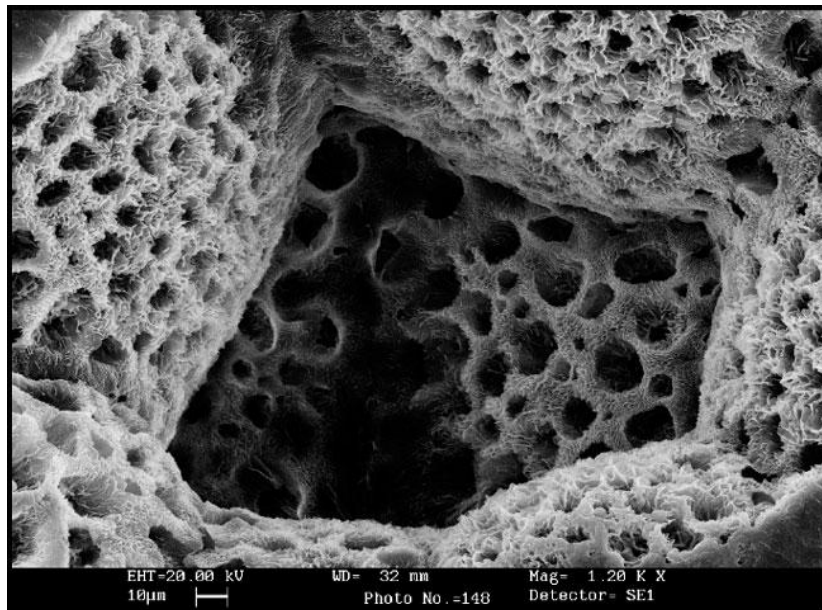


Figura 3.4.2 – Porosità di uno scaffold 3D.

3.5 Tecniche di fabbricazione

Sulla base dei prerequisiti strutturali descritti precedentemente , uno tra i principali obiettivi della produzione degli scaffold è quello di garantire e assicurare un controllo accurato sulle loro proprietà macroscopiche (geometria , resistenza meccanica , densità , porosità) e microstrutturali , come la dimensione e l’interconnessione dei pori. Le tecniche utilizzate variano a seconda del polimero utilizzato e dell’applicazione a cui sono preposte e quelle principali , maggiormente utilizzate per la realizzazione di scaffold , sono :

- *Tecnologie tessili (Fiber Bonding o Fiber Networking)*
- *Solvent casting – Particulate leaching*
- *Gas Foaming e Phase Separation*

- *Elettrospinning*
- *Solid Free Form (SFF) fabrication*
- *Sinterizzazione di microparticelle*

Fiber Bonding o Fiber Networking

Molte tecnologie tessili , tra le quali le fibre , possono essere applicate per la progettazione e la fabbricazione di scaffold in quanto sono da considerarsi promettenti elementi per l' elevato rapporto tra area di superficie e volume che possiedono.

Le maglie che si producono e che sono formate con appropriati intrecci di fibre , collocate ad una determinata distanza , sono caratterizzate da una porosità che è ben definita dallo spazio interno degli anelli che si vogliono creare ; se poi tali maglie si uniscono , se ne possono creare delle tipologie particolari e più complesse dette *Woven* , se le fibre costituenti hanno una densità molto alta che non permette ulteriori intrecci e quindi altre formazioni di pori , oppure *NonWoven* se , al contrario , la densità non è molto elevata e si permette al poro di un anello di intrecciarsi ad un filamento appartenente ad un altro strato.

L'utilizzo del *Fiber Networking* comporta numerosi vantaggi , tra cui emerge soprattutto quello relativo alla presenza dell'elevata area superficiale , che facilita l'adesione cellulare e la rapida diffusione di sostanze nutritive per la crescita e lo sviluppo cellulare , e , al tempo stesso , anche notevoli inconvenienti. Tra questi il principale risulta essere un'insufficiente stabilità strutturale che può essere , però , superata con una lavorazione a caldo delle fibre , provocandone un miglioramento dell'orientazione molecolare e della cristallinità.

Attraverso la tecnica del *Fiber Bonding* , si sono ottenute reti di fibre interconnesse mediante un'iniezione di soluzione di polimero all'interno di un capillare , in maniera tale da formarne una goccia alla sua estremità a cui successivamente , assieme ad un bersaglio di raccolta a terra , viene applicata un'alta tensione. Quando la forza del campo elettrico, generato dalle cariche della corrente in movimento , vince la tensione superficiale della suddetta gocciolina, un getto di soluzione di polimero schizza accelerando verso il bersaglio; Si permette quindi al solvente , mentre attraversa l'aria , di evaporare e portare alla formazione di un tessuto polimerico con maglie *NonWoven* sul bersaglio stesso sennonché alla realizzazione di scaffold con un' alta porosità interconnessa , ideale per la TE.

Solvent Casting – Particulate leaching

Un altro metodo per realizzare scaffold porosi è il *Solvent Casting – Particulate leaching* ovvero la cosiddetta Liscivazione, un processo chimico attraverso il quale si separano dei componenti solubili da un solido con l'utilizzo di specifici solventi. Tale tecnica prevede l'aggiunta di sali, come ad esempio NaCl, ad una soluzione polimerica e il successivo allontanamento del suo solvente mediante evaporazione; a seguire, poi, per fondere completamente i cristalli del composto polimero-sale appena formatosi, questo viene riscaldato, oltre la propria temperatura di fusione, e viene sottoposto ad un'estrazione dell'acqua per poter eliminare le particelle di sale rimaste e determinare, così, la formazione dei pori dello scaffold. La loro dimensione, quindi, dipende esclusivamente da quella dei cristalli di sale, mentre la porosità appena ottenuta può essere controllata tramite il quantitativo di sale aggiunto.

I problemi principali, però, legati all'utilizzo di questa tecnologia sono che, nonostante sia di facile impiego, funziona esclusivamente per strutture 3D molto sottili e che, inoltre, prevede l'utilizzo di solventi organici che in molti casi precludono la possibilità di aggiungere agenti farmacologici allo scaffold in fase di preparazione. Spesse volte, infine, è necessario raggiungere valori di porosità molto elevati e, per ottenere tale risultato, si agisce sull'intera struttura, alterandone e modificandone la porosità di interconnessione a discapito delle sue proprietà meccaniche.

Gas Foaming e Phase Separation

La tecnica del *Gas Foaming* prevede l'utilizzo di gas ad alta pressione, come CO₂, per la realizzazione di spugne macroporose, non ricorrendo all'uso di solventi organici, i cui residui andrebbero comunque eliminati prima dell'utilizzo degli scaffold in campo biomedico. A seguito della realizzazione di una soluzione polimero-gas, si dà origine ad un fenomeno di instabilità termodinamica, conseguenziale alla depressione della sua fase gassosa, che conduce alla creazione dei pori. Per minimizzare, infatti, l'energia libera generata da tali fenomeni di instabilità termodinamica, le molecole di gas si uniscono formando dei nuclei che, assieme ad altre molecole di gas disciolte al proprio interno, creano dei macropori determinando alla fine una struttura con scarsa interconnessione, o addirittura con pori chiusi, limitata nel suo impiego.

Una tecnica simile è quella della cosiddetta *Phase Separation* che consente di convertire una soluzione polimerica omogenea in un sistema bifasico in cui la fase ricca in polimero dà luogo alla matrice della membrana, mentre quella che ne ha un contenuto inferiore dà origine ai pori. Tale fenomeno può essere realizzato inducendo una specifica instabilità termodinamica, per mezzo o di un cambiamento di composizione oppure della stessa temperatura, e consente di controllare la porosità dello scaffold grazie alla variazione delle condizioni di separazione.

Electrospinning

L'elettrospinning è una delle tecnologie più impiegate in molteplici settori dell'ingegneria perché mira a trattare polimeri biodegradabili e biocompatibili, permettendo la realizzazione di fibre con un diametro variabile, a seconda delle necessità, su scale che vanno dal micrometro al nanometro. Contrariamente alle usuali tecniche di tessitura delle fibre che sfruttano sollecitazioni di natura meccanica, l'elettrospinning si basa sull'azione di forze di natura elettrostatica in quanto il suo funzionamento si basa sull'applicazione di un'elevata differenza di potenziale tra due elettrodi. Quest'ultimi sono costituiti, rispettivamente, al catodo da un capillare contenente il polimero fuso o la soluzione polimerica, e all'anodo da un piatto metallico su cui avviene la raccolta di fibre come dimostra lo schema riportato nella pagina seguente; la polarizzazione della soluzione polimerica e il suo successivo trascinarsi verso l'anodo avvengono, inoltre, in maniera più o meno significativa a seconda della tensione applicata ai due elettrodi.

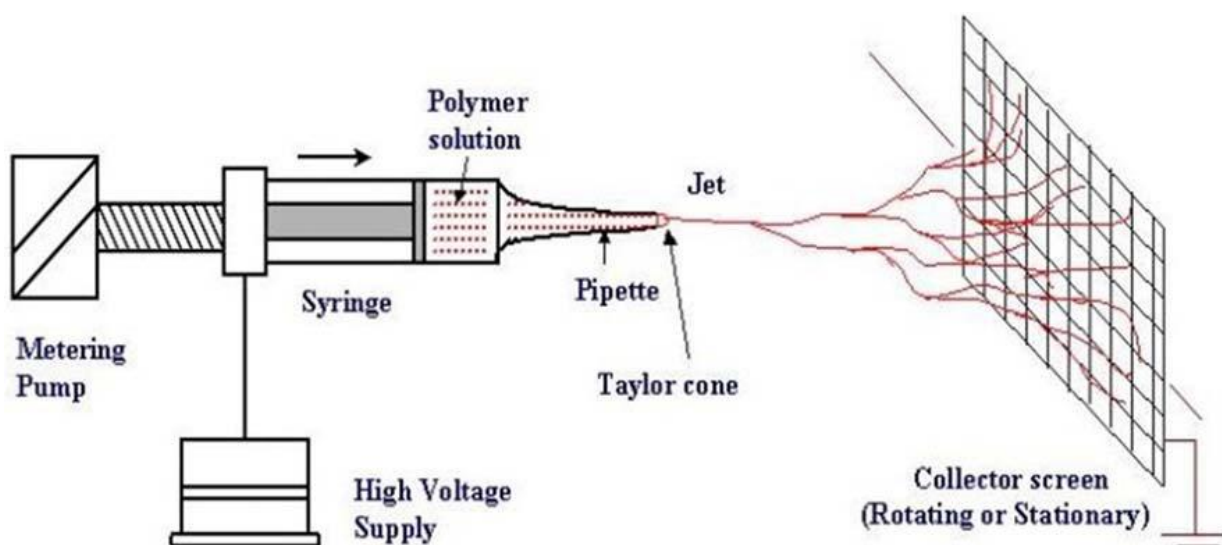


Figura 3.5 - Schema di funzionamento dell'elettrospinning.

Il principale vantaggio di tali scaffold risiede nella possibilità delle cellule seminate all'interno dei tessuti, nati dalla sovrapposizione di fibre nanometriche, di mantenere la loro forma e di garantire al tessuto stesso una certa integrità strutturale e morfologica, simile alla matrice extracellulare del tessuto nativo. Tale procedura, tuttavia, non permette un controllo accurato della forma dello scaffold e, per di più, realizza delle strutture con spessore limitato.

Le tecniche sopramenzionate e illustrate finora hanno come principale limite quello di non riuscire a programmare la dimensione e la distribuzione dei pori sulla superficie dello scaffold e quindi, più in generale, di non avere il controllo sulla sua struttura da un punto di vista sia micro che macroscopico. Si spiega così il motivo per cui molte ricerche attuali vertono essenzialmente sul miglioramento dell'affidabilità e dell'efficacia dei substrati, ponendo l'attenzione su alcune nuove tecniche che utilizzano sistemi di elaborazione automatica delle immagini.

Solid Freeform Fabrication (SFF)

La *Solid Freeform Fabrication (SFF)* utilizza strategie di lavorazione dei *layers* per creare oggetti fisici direttamente dai modelli generati dal computer e, a tal fine, un gran numero di tecniche e macchine si stanno sempre più evolvendo e specializzando in questa direzione, combinando sistemi di elaborazione automatica di immagini CAD (computer-aided design) con quelli di fabbricazione assistita al calcolatore CAM (computer-aided manufacturing). La maggior parte di tali sistemi *SFF* converte le immagini tridimensionali, ottenute direttamente o dallo Scanning 3D o dalla ricostruzione tridimensionale di immagini 2D ricavate con appropriate strumentazioni come la CT (Tomografia Computerizzata), la TAC (Tomografia Assiale Computerizzata) e la MR (Risonanza Magnetica), e migliora, in questo modo, il disegno "dell'impalcatura" degli scaffold controllandone la dimensione, il numero e la distribuzione dei pori. Per l'appunto, le immagini ottenute da CT, TAC o MR, vengono analizzate sulla base di modelli matematici e geometrici, per ricostruire virtualmente le caratteristiche anatomiche dei tessuti, e quindi digitalizzate e convertite in un formato di dati esaminabili esclusivamente da elaboratori CAD/CAM. Questi ultimi, poi, guidano i sistemi *SFF* attraverso appositi software di controllo numerico del computer ottenendo una corretta modellazione tissutale basata sulla sua ricostruzione strato per strato.

Nel corso del tempo si sono sviluppati molti sistemi *SFF* ma quelli maggiormente impiegati per la produzione di scaffold sono:

- **La Stampa Tridimensionale (3DP)**

Tecnica che prevede l'utilizzo di tecnologie di stampa basate sull'iniezione di un legante, lungo gli assi x e y, che compatta la polvere di polimero così come impongono i dati trasmessi dal software CAD. Una volta ultimata tale operazione, si fa scendere, lungo l'asse z, il pistone fino a che non arrivi a comprimere il layer appena formatosi, permettendogli poi di aderire a quello successivo. Tutte queste operazioni vengono ripetute finché non si ottiene la forma tridimensionale ricercata e desiderata.

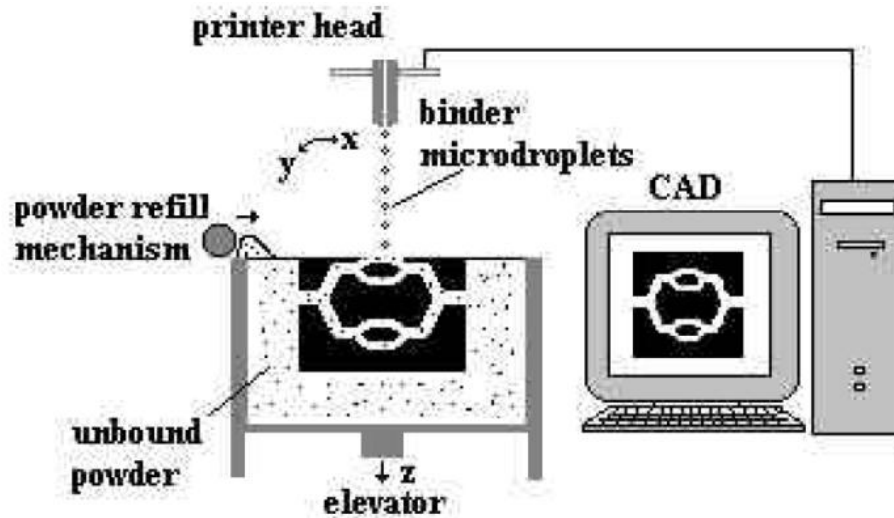


Figura 3.5 a – Schema di funzionamento 3DP.

- **Stereolitografia (SLA)**

Il processo coinvolge la polimerizzazione selettiva di un monomero liquido mediante un fascio di raggi ultravioletti UV, guidato sulla sua superficie lungo gli assi x e y secondo i dati forniti dal sistema CAD. Dopo la costruzione del primo layer, l'elevatore si abbassa all'interno del recipiente per permettere al polimero di coprire la superficie che viene, in seguito, appiattita da un *wiper arm*. La procedura viene ripetuta fino a quando il modello non viene completato e, una volta terminata, quest'ultimo viene sollevato per poter rimuovere manualmente le strutture.

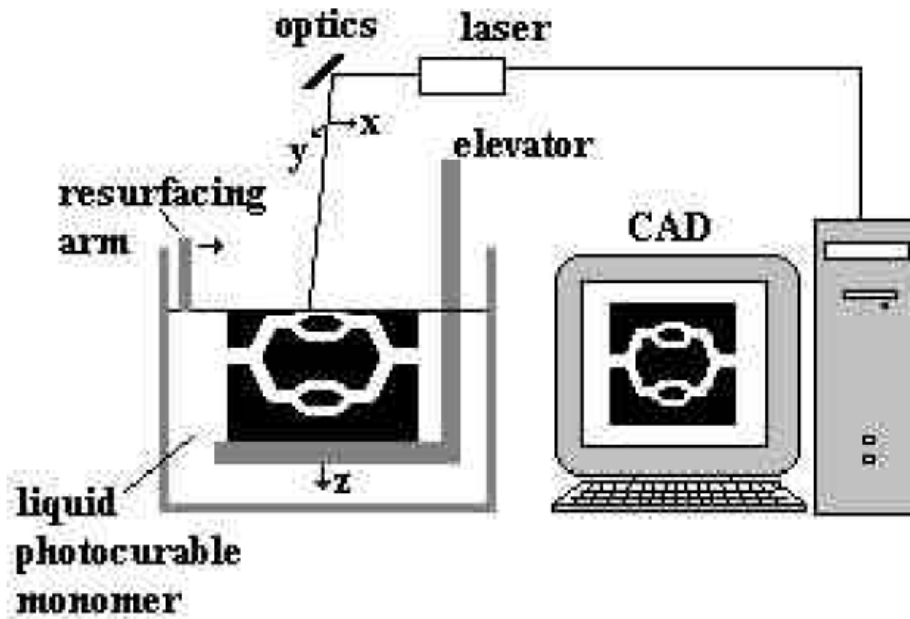


Figura 3.5 b – Schema di funzionamento SLA.

- **Solid Freeform Fabrication Moulds (SFFM)**

La *Solid Freeform Fabrication Moulds* è una forma di *SFF* indiretta in quanto utilizza tale sistema con un approccio diverso avvalendosi per la formazione di un modello negativo, *negative mould*, basato sul disegno dello scaffold. Un biomateriale, o una combinazione di essi, viene fusa sul modello appena generato e viene in seguito dissolto, una volta assestatosi il biomateriale stesso, per ottenere lo scaffold voluto.

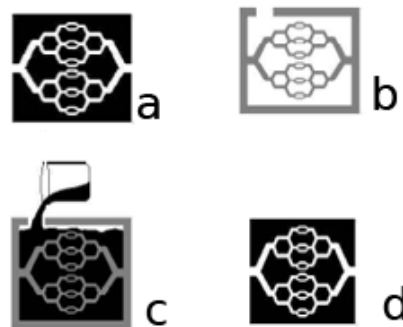


Figura 3.5 c – SFFM o SFF indiretta.

Gli scaffold per l'ingegneria tissutale, realizzati con le suddette tecnologie *Solid Freeform Fabrication*, permettono di risolvere problematiche relative alla crescita cellulare nelle zone in cui le sezioni di tessuto sono molto dense e interconnesse e, inoltre, consentono di controllare l'intero processo di fabbricazione della microstruttura interna dello scaffold, garantendo un continuo afflusso d'ossigeno e nutrienti per le cellule impiantatovi all'interno.

Il successo di tali metodologie di progetto, però, risulta ancor'oggi molto limitato e ciò è dovuto sia al costo elevato, che aumenta in proporzione al grado di interazione e precisione richiesto per la fabbricazione dell'oggetto stesso, e sia al fatto che ogni tecnica *SFF* richiede determinati requisiti, come i parametri di viscosità, di solubilità e il punto di fusione, che si differenziano a seconda del materiale utilizzato.

Sinterizzazione di micro particelle

La tecnica di sinterizzazione di micro particelle polimeriche consente la realizzazione di strutture tridimensionali macroporose per mezzo di una fusione parziale delle particelle adiacenti, sottoposte a determinati stati fisici. Specificatamente, infatti, alcune condizioni di temperatura e/o pressione possono innescare meccanismi di fusione polimerica, a partire dagli strati più superficiali, e favorire la parziale compenetrazione delle particelle dando origine ad interstizi interparticellari che determinano la macroporosità all'interno della struttura.

Il concetto di sinterizzazione di micro particelle trae origine dal processo di densificazione di polveri, alla base dei processi di realizzazione dei ceramici fondato sul concetto di redistribuzione della massa del sistema consequenziale alla formazione di gradienti di materia verso zone ad alta concentrazione di difetti cristallini. Il caso più semplice di sinterizzazione è quello che avviene quando un aggregato di particelle viene riscaldato ed è costituito da due soli stati: il primo, caratterizzato dalla presenza di due particelle a contatto, e il secondo, ovvero la situazione finale, in cui i pori sono chiusi in una matrice continua. Nel momento in cui le sfere o le particelle cominciano a unirsi, la loro area di contatto, che è definita come colletto, presenta un raggio di curvatura molto inferiore rispetto a quello superficiale delle particelle stesse e ciò determina l'insorgere di una pressione negativa, la principale causa del flusso viscoso del materiale lungo la regione interparticellare.

Il restringimento, la densificazione e l'eliminazione dei pori avvengono tutti ad una velocità determinata da alcuni parametri fondamentali, tra i quali la dimensione iniziale della

particella, il valore dell'energia di superficie e la viscosità del materiale, e bisogna sceglierli accuratamente per poter ottenere materiali porosi desiderati.

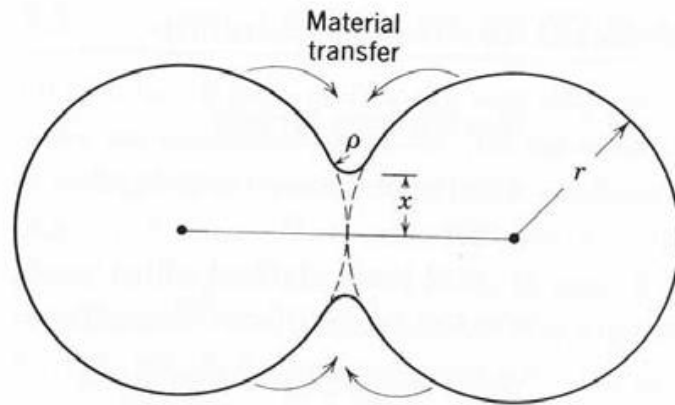


Figura 3.5 c – Schematizzazione di un colletto formatosi tra due particelle a contatto.

Negli ultimi anni molte ricerche si sono poste come obiettivo principale la realizzazione di scaffold porosi, attraverso la sinterizzazione di microsfele polimeriche, in maniera tale da poter superare le varie limitazioni riscontrabili nelle tecniche convenzionali e legate essenzialmente alle proprietà meccaniche, all'interconnessione dei pori o all'utilizzo di solventi tossici. Nonostante questo, però, tale tecnica di sinterizzazione presenta dei notevoli svantaggi poiché necessita di un controllo accurato delle condizioni di processo e non permette di guidare la rigenerazione tissutale attraverso il rilascio controllato, sia spaziale che temporale, di alcuni fattori ad essa essenziali.

Conclusioni

L'ambizioso obiettivo proposto dall'ingegneria tissutale è quello di coltivare tessuti in laboratorio tant'è che, per quanto concerne tendini e legamenti, i ricercatori stanno sviluppando notevoli tecniche, dimostratosi sempre più efficaci nella guarigione ed estremamente competitive rispetto alle terapie tradizionali.

Avendo come scopo principale la rigenerazione del tessuto lesionato e non la sua sostituzione con un dispositivo estraneo, i progressi nell'ambito dell'ingegneria tissutale riescono a evitare l'insorgere di rilevanti problematiche come il rigetto, il propagarsi delle infezioni e il peggioramento della competenza meccanica nel corso del tempo, tutti limiti dominanti nei trattamenti basati su innesti biologici, protesi artificiali o suture chirurgiche.

L'esperienza accumulata negli anni riguardo alla fabbricazione di scaffold biocompatibili e biodegradabili, con la possibilità di seminarvi al proprio interno cellule autologhe o staminali, ha permesso la produzione di tessuti tendinei e legamentosi con caratteristiche simili ai loro corrispettivi omologhi naturali. Tuttavia, anche questa disciplina rivoluzionaria comporta molteplici svantaggi, derivanti soprattutto dalla produzione degli scaffold stessi, in quanto si necessita di una struttura appropriata (sia micro che macroscopica) per fare in modo che le cellule riescano a diffondersi in tutte le sue parti e a crescere grazie al giusto apporto nutritivo.

La produzione di un tessuto *ex novo* richiede delle tempistiche decisamente maggiori se paragonate a quelle per l'impianto di una protesi o di un innesto tradizionale; ciononostante, date le premesse e i primi risultati, investire su tale disciplina può condurre a importanti traguardi così come dimostrano le prime terapie affacciatosi sul panorama clinico che prevedono l'ingegneria tissutale come principale tecnica di guarigione per le lesioni tendinee e legamentose.

Appendice

Materiali impiegati e strategie per il miglioramento degli scaffold.

Materiali per scaffold

Il principale obiettivo preposto dall'ingegneria tissutale è quello di trovare una soluzione ideale che possa completamente riportare il tendine o il legamento al proprio naturale stato di pre - danneggiamento. Per adempiere a ciò quindi ripara le loro lesioni mediante un'integrazione ingegneristica atta a garantire non solo il ripristino *in situ* delle funzioni basilari, ma anche l'impianto *in vivo* di sostituti biologici che possano rimpiazzare *in toto* quelli nativi.

A tal fine , quindi , è indispensabile l'utilizzo di materiali appropriati per la costruzione degli scaffold che devono soddisfare specifici prerequisiti quali :

- Biodegradabilità con regolabile tasso di degradazione.
- Biocompatibilità sia prima che durante e dopo la fase di degradazione.
- Proprietà meccaniche superiori a quelle del tessuto da riparare e mantenimento della forza meccanica durante il processo di rigenerazione tissutale.
- Biofunzionalità ovvero l'abilità di supportare la proliferazione e la differenziazione delle cellule , la secrezione di ECM e la formazione tissutale.
- Processabilità cioè la capacità di poter elaborare il materiale per formare i costrutti desiderati anche con forme e strutture complicate.

In passato si riteneva che le proprietà meccaniche del tessuto fossero i requisiti primari che un materiale dovesse soddisfare per poter essere impiegato nella fabbricazione degli scaffold ma, in un secondo momento, si è constatato che queste non sono strettamente necessarie poiché lo scopo principale del TE è quello di rigenerare il tessuto danneggiato e non sostituirlo come accade nel caso delle protesi artificiali. Piuttosto, ciò che deve esser

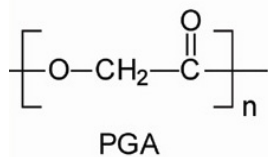
considerato maggiormente è l'interfaccia tra gli scaffold e le cellule con cui interagiscono in quanto i materiali con cui sono costruite le "impalcature" devono essere in grado di garantire una bio - funzionalità tale da stimolare la risposta rigenerativa delle cellule a qualsiasi livello molecolare , nonché la loro proliferazione , differenziazione e la naturale composizione della matrice extracellulare ; perciò sono stati studiati e utilizzati tre principali tipi di materiali per la produzione di scaffold:

- Poliesteri
- Derivati del collagene
- Polisaccaridi

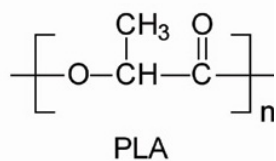
Poliesteri

I poliesteri appartengono alla categoria dei polimeri biodegradabili e i più comuni nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti sono :

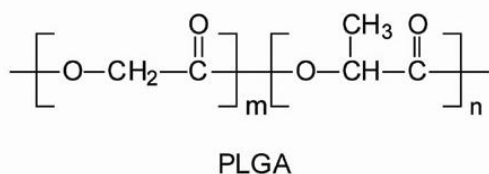
- Acido Poliglicolico (PGA)



- Acido Polilattico (PLA)



- Acido Polilattico co-glicolico (PLGA)



Tali polimeri vengono molto impiegati in quanto i loro prodotti di degradazione, tra cui si ricorda l'acido glicolico e lattico, sono metaboliti naturali normalmente presenti nel corpo umano , di conseguenza altamente biocompatibili che presentano ottime qualità meccaniche e una buona facilità a livello di lavorazione.

Nonostante questi molteplici vantaggi, i poliesteri soffrono però di alcuni limiti da dover tenere in considerazione tra cui in primo luogo, appartenendo al gruppo dei poli- α -idroesteri, quello di non supportare un elevato livello di adesione cellulare che è lo step principale per la realizzazione di un tessuto ingegnerizzato. Perlopiù, malgrado la degradazione di PGA, PLA e PLGA porti alla formazione di metaboliti naturali, questi prodotti sono sempre acidi e la loro presenza in alte concentrazioni può dare origine a reazioni sintomatiche locali anche molto significative. Quando le dimensioni degli scaffold sono piccole, l'insorgere di tali reazioni biologiche però è molto ridotta ed è per questo motivo che, generalmente, i poliesteri sono più adatti e vengono adoperati per la riparazione di piccoli difetti o lesioni.

Derivati del collagene

Assieme ai poliesteri, i derivati del collagene sono molto studiati per le applicazioni in ambito dell'ingegneria tissutale poiché altamente biocompatibili sia con i tendini che con i legamenti le cui ECM sono perlopiù costituite da collagene *tipo I*; questi, inoltre, esibiscono una peculiare biofunzionalità grazie alla quale riescono a supportare meglio l'adesione e la proliferazione cellulare rispetto ad altri materiali. Il gel di collagene, ad esempio, non possiede un'elevata resistenza agli sforzi meccanici come quella presentata dalle spugne di collagene ma, ciononostante, è comunque molto utilizzato per aumentare la qualità della riparazione tendinea e legamentosa.

Malgrado l'appurata biofunzionalità e biocompatibilità del collagene, tale sostanza presenta molti limiti per gli scaffold perché, data la scarsa resistenza meccanica che lo caratterizza, non è capace di sottoporsi a lungo a eccessivi carichi quando impiantato in ambiente di stimolazione tendinea o legamentosa. Ciò che però lo conduce ad una scarsa considerazione è che ha una processabilità limitata, che comporta una complicata realizzazione della fine struttura degli scaffold, ma soprattutto è che si tratta di un biopolimero naturale e, in quanto tale, è molto propenso a innescare e indurre reazioni antigeniche e immunogeniche.

Polisaccaridi

I polisaccaridi hanno cominciato soltanto negli ultimi anni ad essere presi in considerazione come potenziali biomateriali da utilizzare nel settore dell'ingegneria biomedica. Tradizionalmente erano concepiti solo come materiali idonei alla produzione di scaffold per la rigenerazione di tessuti densi come cartilagine e ossa; la *chitina*, il *chitosano*, l'*alginato* e l'*agarosio* sono difatti tutti polisaccaridi che più recentemente hanno preso piede nel campo dell'ingegneria dei tessuti molli tra cui prima di tutto il *chitosano*, un interessante candidato per la rigenerazione tendinea e legamentosa. Quest'ultimo, prodotto di de-acetilazione della chitina, è un polisaccaride lineare composto da D-glucosamina (l'unità de acetilata) e N-acetil-D-glucosamina (l'unità acetilata), legate tramite legami $\beta(1-4)$.

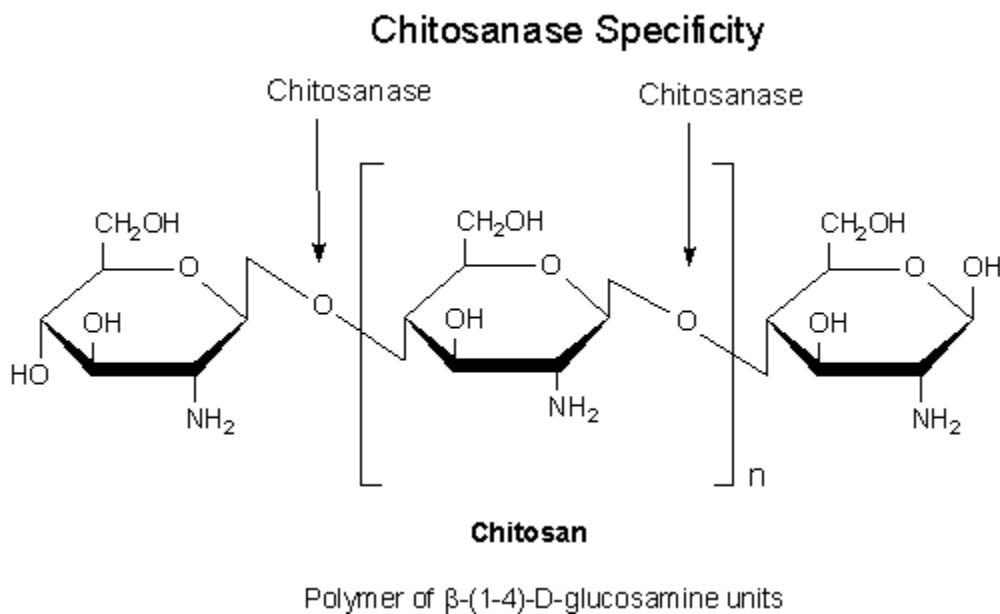


Figura 1 – Struttura molecolare del chitosano.

Nella sua forma cristallina, il *chitosano* è normalmente insolubile in soluzioni acquose con pH maggiore di 7.0 ma lo è, al contrario, in soluzioni acide a pH minore di 6.0 grazie alla presenza di gruppi amminici protonati che facilitano la solubilità delle molecole stesse. In genere il *chitosano* ha tre tipi di gruppi funzionali reattivi: uno è quello amminico (NH_2), gli altri due sono entrambi ossidrilici primario e secondario (OH). Proprio questi gruppi sono quelli che permettono la modifica del *chitosano* per le specifiche applicazioni, oltre alla natura chimica della molecola in sé che consente di effettuare modifiche ioniche o covalenti, permettendo il miglioramento delle proprietà meccaniche e biologiche.

Gli scaffold che utilizzano *chitosano* possiedono proprietà molto utili nel settore dell'ingegneria tissutale in quanto, prima di tutto, tale sostanza ha la possibilità di essere realizzata con strutture porose interconnesse mediante tecniche di congelamento e di liofilizzazione. La formazione di questa struttura è indispensabile perché le cellule hanno la capacità di migrare verso l'interno dello scaffold incrementando il loro numero e permettendo, così, che arrivi un gran quantitativo di nutrienti per la loro sopravvivenza. Il controllo del numero di pori e della loro morfologia è infatti di fondamentale importanza per verificare *in toto* il tasso di colonizzazione cellulare nonché la loro organizzazione all'interno del tessuto.

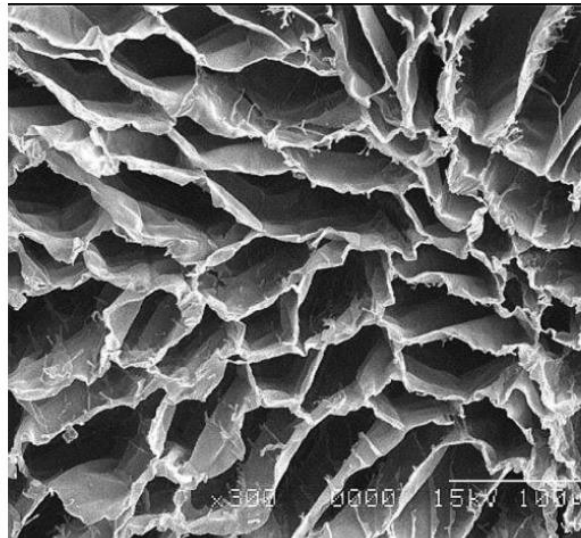


Figura 2 – Struttura porosa scaffold contenente chitosano.

La natura cationica del *chitosano* permette inoltre di avere interazioni elettrostatiche pH-dipendenti sia con i glicosaminoglicani (GAGs) e i proteoglicani (PGs) distribuiti in tutto il corpo che con altre specie cariche negativamente e, grazie alla sua spiccata idrofilicità, dimostra infine ottime caratteristiche di proliferazione e adesione cellulare.

L'*acido ialuronico* (HA), un importante componente dell'ECM, è una ripetizione lineare uniforme GAG composta da disaccaridi di acido glucuronico e N-acetil-glucosamina che, interagendo con altre macromolecole come le proteine e i proteoglicani, facilita la morfogenesi del tessuto nonché la migrazione, la differenziazione e l'adesione delle cellule. Spesse volte l'ibridazione con il *chitosano* dell'HA è impiegata per aumentare le proprietà

meccaniche e bioattive degli scaffold TE ed è quella che viene maggiormente prediletta, nonostante vi sia un altro tipo di polisaccaride utilizzato con lo stesso scopo ovvero l'*alginato*. Quest'ultimo per l'appunto è un polisaccaride anionico formato da regioni omopolimeriche di acido glucuronico e acido mannuronico intrecciate fra loro e, se combinato con il *chitosano*, aumenta la biofunzionalità dello scaffold grazie all'insorgere di interazioni ioniche che facilitano il reclutamento non solo di cellule ma anche di fattori di crescita e adesione.

Strategie per il miglioramento degli scaffold

Gli scaffold proposti dall'ingegneria tissutale mirano a promuovere e supportare la rigenerazione tendinea e legamentosa e ne migliorano la qualità di guarigione specialmente se, dopo la realizzazione, vengono applicate alcune strategie finalizzate ad ottimizzare alcune loro caratteristiche.

Ibridazione cellulare

Il concetto di ibridazione cellulare è basato sull'introduzione di una certa tipologia cellulare all'interno dello scaffold in maniera tale da incoraggiare la riparazione del tessuto danneggiato. Il pre-impianto di queste cellule comporta un miglioramento della composizione biochimica, della struttura istologica e delle proprietà biomeccaniche del tessuto riparato tant'è che quelle che si prestano meglio ad essere adoperate in tal senso sono:

- **Cellule staminali mesenchimali (MSCs)** multi potenti ovvero capaci di differenziarsi in diversi tipi di cellule, come miociti e tenociti, impiantabili in diversi scaffold, tra cui specialmente quelli formati da gel di collagene, e che consentono notevoli miglioramenti per le proprietà meccaniche e rigenerative tissutali.
- **Tenociti**, le cellule più abbondanti presenti nei tendini e nei legamenti che, in quanto tali, riescono ad apportare significativi incrementi alle caratteristiche meccaniche degli scaffold. Ciononostante, uno dei principali ostacoli riguardanti il loro utilizzo è quello che, pur prelevando e innescando tenociti autologhi per evitare eventuali problemi di rigetto, questi possono comunque arrecare danni al loro sito di donazione.
- **Fibroblasti da derma**, candidati interessanti in quanto sono cellule prelevabili con molta facilità senza che si generino danni al sito di prelievo. Si è constatato che le

loro potenzialità sono molto simili a quelle dei tenociti e di conseguenza, come quest'ultimi, migliorano le competenze meccaniche dello scaffold su cui vengono innestate.

Modifica dell'interfaccia

Lo *step* iniziale e fondamentale nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti tendinei e legamentosi riguarda l'adesione delle cellule sullo scaffold, visto che un'ottima genesi dei tessuti richiede la presenza di un gran numero di cellule per proliferare e organizzare la matrice in maniera funzionale. L'adesione e la forza d'adesione delle cellule sullo scaffold è variabile ed è regolata da alcuni recettori situati sulle superfici cellulari come le integrine, glicoproteine etero dimere di membrana agenti da recettori sia per le proteine del ECM (adesione cellula-matrice) e sia per molte proteine della membrana cellulare (adesione cellula-cellula). Le integrine possono legarsi a sequenze molto corte di amminoacidi tant'è che uno dei legami più studiati riguarda quello con la sequenza RGD (*Arg-Gly-Asp Arginina-Glicina- Acido Aspartico*). Si è dimostrato infatti che un innesto diretto delle sequenze RGD sullo scaffold aumenta l'adesione cellulare e ciò avviene mediante il rivestimento della sua superficie con proteine quali il collagene, la vitronectina, la laminina e la fibronectina, la migliore in termini di legame con le integrine.

La fibronectina (*figura 3*) è composta da due subunità molto grandi, unite da legami disolfuro alle due estremità, ciascuna delle quali è ripiegata in una serie di domini funzionali distinti e separati. Ogni dominio poi è composto, a sua volta, da piccoli moduli ripetuti in serie e quello principale ha il ruolo di legante con l'integrina, essendo presente al suo interno la sequenza tripeptidica specifica RGD. Le sequenze RGD sono riconosciute da molti recettori di membrana delle cellule che devono aderire sullo scaffold e, come dimostra il grafico sottostante (*figura 4*), la fibronectina (FN) è quella che, una volta iniettata al suo interno, provoca maggiormente un incremento di tale fenomeno.

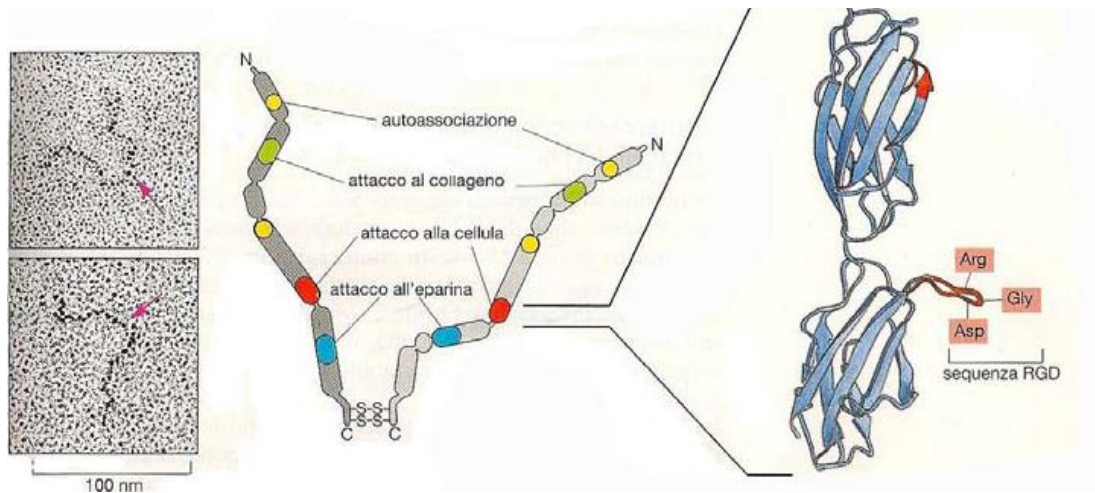


Figura 3 – Struttura molecolare fibronectina.

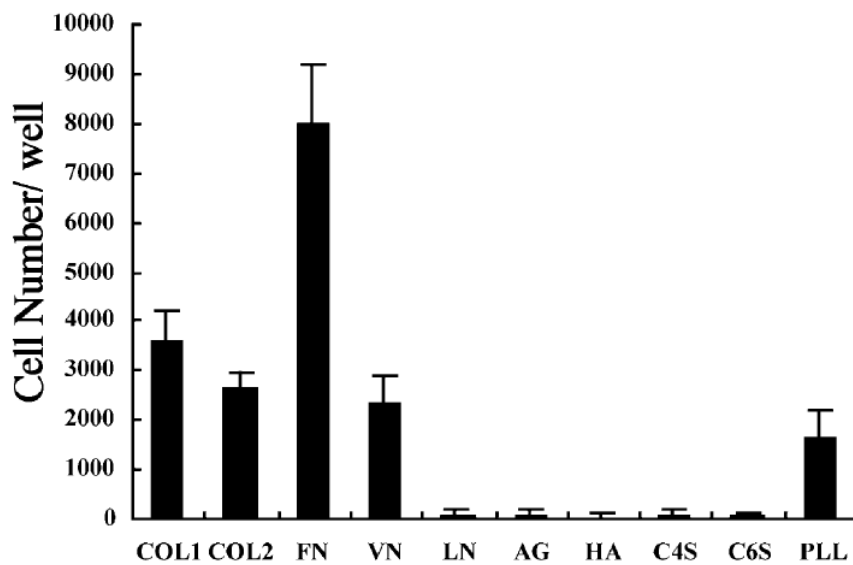


Figura 4 – Adesione cellulare nello scaffold dopo l'innesto di alcune proteine.

Fattori di crescita

I fattori di crescita sono un gruppo di proteine di origine naturale indispensabili per il regolamento di molteplici varietà di risposte cellulari. Essi sono coinvolti in tutti i passi del processo di guarigione, stimolano la differenziazione cellulare, la deposizione di ECM e la crescita del tessuto tant'è che quelli più studiati e analizzati sono :

- **PDGF-BB** (Platelet-Derived Growth Factor- BB)
- **IGF-1** (Insulin- like Growth Factor-1)
- **bFGF** (basic Fibroblasts Growth Factor)

Per poter comprendere a pieno quanto l'innesto di queste proteine possa essere influente, è significativa l'analisi dei dati raccolti da uno studio che verte sull'ottimizzazione della proliferazione cellulare dei tenociti attraverso l'integrazione della coltura cellulare, effettuata prima con singoli fattori di crescita e poi mediante due loro sinergismi. I ricercatori infatti hanno constatato come la massima proliferazione cellulare si è ottenuta con una combinazione dei tre fattori di crescita *IGF-1 + PDGF-BB + bFGF* (in dose 100-50-5 ng/ml) e hanno dimostrato che predisporre, nel processo di fabbricazione del nuovo tessuto, un'analisi per l'integrazione nello scaffold di opportune dosi di fattori di crescita costituisca un potenziale aiuto nella riuscita dell'intero processo di guarigione.

Guida per contatto

L'ostacolo più grande che si manifesta nel settore dell'ingegneria tissutale tendinea e legamentosa è il ripristino, in seguito a gravi lesioni, della complessa organizzazione strutturale dell'ECM, la quale contribuisce a rendere uniche le proprietà biomeccaniche dei tessuti appena menzionati. Questa necessità richiede la presenza sia di un allineamento assiale delle cellule e sia di un arrangiamento parallelo delle fibre di collagene ed è noto come i fibroblasti possano soddisfare tali requisiti allineandosi e depositando ECM assialmente alle guide depositate appositamente sulla superficie dello scaffold (ad esempio *micro-grooves*, *micro-scanalature*, o *micro-channel*, *micro-canali*).

Tale fenomeno, denominato per l'appunto "guida per contatto", fornisce un mezzo per promuovere la crescita del tessuto all'interno della struttura ECM fortemente organizzata ed è una nuova tecnica che sta già fornendo dei buoni risultati. Come dimostra uno studio in merito, che ha portato alla realizzazione di uno scaffold con un canale di fibra contenente delle scanalature, in seguito all'impianto della matrice di PLA con fibroblasti le cellule sono proliferate all'interno delle scanalature guida in tempi brevissimi e, soprattutto, hanno depositato proteine dell'ECM come collagene parallelamente alla direzione della scanalatura stessa (*figura 5*). In questo modo si è riuscito a realizzare un canale che ha permesso il trasporto di nutrienti e ossigeno fin dentro lo scaffold, dando così la possibilità di generare un tessuto altamente organizzato. Malgrado ciò però, anche questa strategia presenta alcuni limiti tra cui, prima di tutto, il fatto che la somiglianza morfologica del "tendine ingegnerizzato" con quello naturale non implica necessariamente che esso possieda allo stesso tempo delle competenze funzionali similari e, soprattutto, che la qualità della

proliferazione cellulare , nonché la produzione di ECM risultante , necessita di essere indirizzata regolarmente e costantemente.

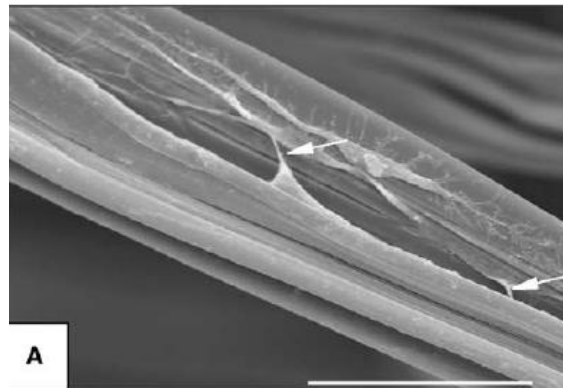


Figura 5 – Orientamento parallelo dei fibroblasti rispetto alle microscanalature.

Stimolazione meccanica

Spesse volte le cellule , prima di essere impiantate , subiscono un periodo di coltivazione *in vitro* durante il quale sono sottoposte all'azione di diversi sforzi e carichi meccanici. Tra questi , specialmente l'applicazione di forze cicliche esterne ha un notevole effetto sulla funzionalità cellulare perché ne influenzano il metabolismo, la proliferazione , l'orientamento nonché la deposizione stessa di matrice.

Alcuni studi hanno dimostrato come uno sforzo di natura ciclica possa influire soprattutto sulla morfologia cellulare in due maniere differenti : migliorandone l'allineamento e cambiandone la forma. In particolare si è constatato che , applicando una forza ciclica a diverse frequenze , risulta molto evidente la variazione a livello microscopico del comportamento delle cellule le quali, infatti, passano da una forma poligonale ad una più affusolata all'aumentare della frequenza del carico, mostrando una particolare tendenza ad allinearsi nella direzione della forza assiale.



Figura 6 – Effetto su un campione di tessuto di un carico ciclico a diverse frequenze.

Ulteriori ricerche riguardanti gli effetti della stimolazione meccanica sul metabolismo cellulare hanno notato che i tessuti rispondono a tali stimoli per via di un “flusso di carichi indotti” derivanti dal liquido interstiziale. Le integrine, per l'appunto, mediano il trasferimento trans-membranale dei segnali meccanici andando ad attivare, una volta stimulate, specifici “sentieri di segnali” per trasmettere la forza bi-direzionalmente tra il citoscheletro e l'ECM e influenzare, così l'espressione genetica nonché la sintesi proteica, la proliferazione e la differenziazione cellulare. Inoltre, gli stress meccanici che provocano la distorsione cellulare possono innescare programmi di crescita, differenziazione, motilità e apoptosi delle cellule tant'è che si è osservato che i segnali sinergistici tra l'integrina mediata dalla mecano-trasduzione e la forma della cellula stessa conducono le cellule attorno a diventare apoptotiche e a dare origine ad una risposta di crescita.

Bioreattori

Il termine “Bioreattore” fa riferimento ad un sistema in cui le condizioni sono strettamente controllate per permettere o indurre specifici trattamenti nelle cellule e nei tessuti viventi. La conoscenza relativa al fatto che stimoli fisici possano modulare la funzione cellulare e lo sviluppo tissutale ha permesso la realizzazione di sistemi di simulazione attiva biomeccanica con il fine di ricellularizzare i tessuti *in vitro*, sottoponendoli a stimolazioni fisiologicamente rilevanti di natura meccanica o idrodinamica. I principali obiettivi preposti da questi sistemi riguardano la determinazione di un'uniformità spaziale della distribuzione delle cellule su scaffold tridimensionali il mantenimento delle concentrazioni desiderate di gas e nutrienti nell'ambiente di coltura e l'esposizione del tessuto sviluppato ad appropriati stimoli fisici.

I requisiti indispensabili per la realizzazione di bioreattori per l'ingegneria tissutale dipendono essenzialmente dalle dimensioni, dalla complessità e dalle condizioni fisiologiche del tessuto che deve essere “ingegnerizzato” e il traguardo principale è quello di realizzare sistemi che riproducano, in maniera piuttosto attendibile, forma e funzionalità tissutali di supporto e sostegno anche *in vivo*. Essenzialmente quindi un bioreattore deve provvedere all'appropriata stimolazione meccanica delle cellule, al continuo supporto di nutrienti, ossigeno e fattori biochimici e alla diffusione di specie chimiche per le “reazioni interne”

come quelle finalizzate alla rimozione dei prodotti derivanti dal metabolismo cellulare . Inoltre , siccome un bioreattore deve essere capace di operare sempre in condizioni asettiche per lunghi lassi temporali , la maturazione e la formazione di un tessuto funzionale può avvenire in un periodo che oscilla tra i tre o quattro mesi tant'è che il monitoraggio della sua crescita costituisce uno degli obiettivi principali dei bioreattori nel settore dell'ingegneria tissutale. Generalmente il metodo di monitoraggio deve essere individuato per ogni tipologia tissutale ma, ciononostante, per i tessuti che hanno prevalentemente una funzione meccanica come quelli tendinei e legamentosi si predilige controllarne esclusivamente le proprietà di tale natura durante le sue fasi di crescita.

Nel corso degli anni si sono sviluppati diversi sistemi atti a indurre differenti stimolazioni fisiche alle cellule *in vitro*; quello più semplice , ovvero lo *Spinner-Flask* , è costituito da un contenitore di vetro nel quale è collocata una paletta che ruota consentendo l'agitazione e il rimescolamento del mezzo di coltura , introdottovi tramite appositi fori , attorno ad un costrutto bidimensionale ancorato sul fondo , senza alcuna possibilità di movimento. Lo *Spinner-Flask* (*figura 7*) è stato progettato per risolvere uno dei principali problemi inerenti la coltivazione cellulare statica *in vitro* : il trasporto dei metaboliti e dell'ossigeno necessari alla sopravvivenza della cellula , nonché la rimozione dei cataboliti e dell'anidride carbonica per evitare che , in assenza del rimescolamento del mezzo di coltura , si crei un gradiente di ossigeno tra il costrutto e l'ambiente circostante che possa portare alla morte delle cellule stesse.

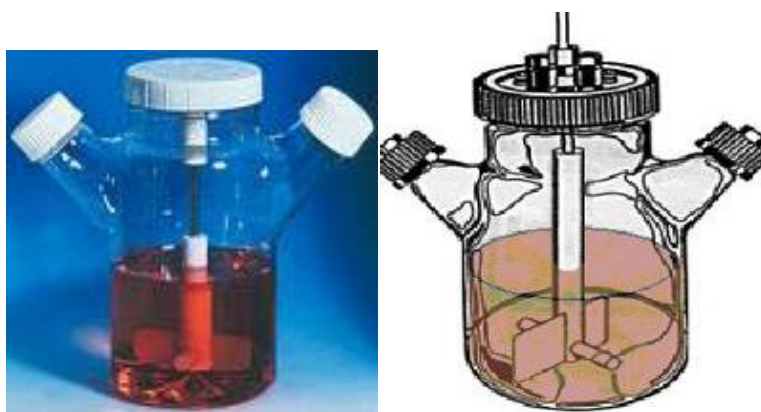


Figura 7 – Bioreattore Spinner-Flask.

Un modello più complesso è quello a vaschetta ruotante (*figura 8*) composto difatti da una vaschetta cilindrica con una zona centrale cava e isolata dal resto del sistema tramite una membrana semipermeabile attraverso la quale viene immesso il mezzo di coltura e avvengono gli scambi di gas. Il substrato viene così lasciato libero di muoversi e questo gli permette di entrare in contatto con tutte le sostanze presenti nel mezzo, la cui introduzione avviene mediante tubi collegati alla membrana centrale e il cui rimescolamento comporta una maggiore crescita cellulare e una loro migliore uniformità di distribuzione. La rotazione, che è alla base di tale rimescolamento, deve essere regolata in maniera tale da non provocare turbolenze o il distacco delle cellule dal supporto polimerico ma permettere che l'urto tra il mezzo e il substrato possa favorire l'adesione per garantire la produzione di un costrutto completamente ricoperto da uno strato omogeneo di cellule.

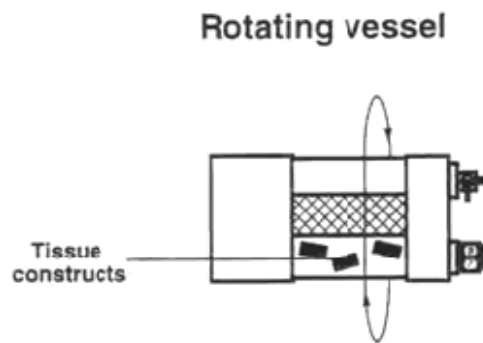


Figura 8 – Bioreattore a vaschetta ruotante.

Un terzo tipo di bioreattore associa alla perfusione forzata del costrutto una stimolazione di tipo meccanico che consente di indirizzare l'organizzazione, la composizione e la funzionalità del tessuto ingegnerizzato (*figura 9*). Tale sollecitazione difatti favorisce la proliferazione delle cellule, la distribuzione delle matrici extracellulari e l'orientamento delle strutture costituenti il tessuto ingegnerizzato, caratterizzato da proprietà meccaniche superiori rispetto a quelle di un tessuto cresciuto in un regime statico e molto simili, quindi, a quelle di un tessuto nativo. I costrutti utilizzati sono perlopiù di forma rettangolare e vengono sottoposti a carichi ciclici uniassiali in direzione longitudinale; solitamente poi il supporto è ancorato a un'estremità fissa mentre l'altra è agganciata ad un'afferraggio in grado di spostarsi con deformazioni e frequenze differenti.

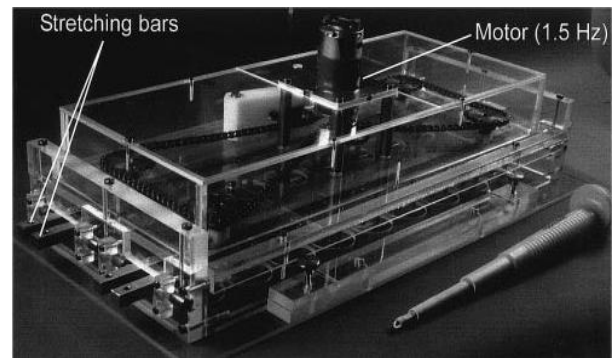
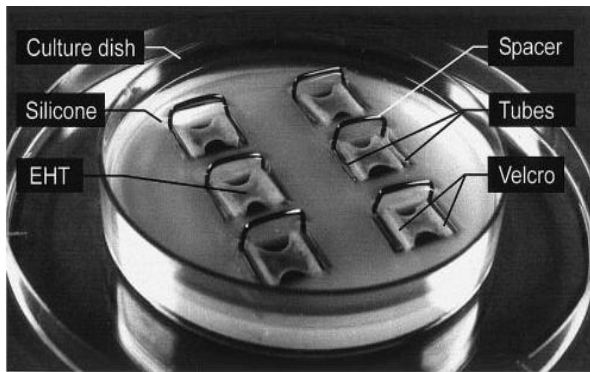


Figura 9 – Disco di coltura prima della sollecitazione meccanica (sinistra); Dispositivo memorizzato per la stimolazione (destra).

Si è ipotizzato che, in questo caso, le forze idrodinamiche che investono le cellule in coltura sono le responsabili dello stiramento delle membrane cellulari a causa di forti oscillazioni di natura pressoria a cui sono soggette. In ogni caso, a prescindere dal tipo di bioreattore che sottopone il tessuto in fase di crescita a tensioni dinamiche piuttosto che a compressioni o pressioni idrodinamiche, l'aspetto che accomuna tutti questi sistemi è la presenza di forze meccaniche durante la coltivazione cellulare che costituiscono la principale fonte di stimolazione tissutale al variare delle frequenze degli stimoli fisiologici o dei carichi.

Con l'avanzare delle ricerche in merito, si è constatato infine che lo sviluppo di sistemi di simulazione funzionale per la crescita dei tessuti in risposta alla stimolazione meccanica non solo provvedono alla ricerca di soluzioni nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti ma, soprattutto, forniscono importanti modelli di sistemi *in vitro* utili ad un miglioramento nella comprensione sia della mecano trasduzione e sia della relazione vigente tra condizioni fisiche, funzione cellulare e sviluppo tissutale.

Nanofibre polimeriche

Con l'avvento e lo sviluppo delle nanotecnologie, le nano fibre polimeriche hanno riscosso una gran popolarità nell'ambito dell'ingegneria tissutale, specialmente nella rigenerazione di molteplici varietà di tessuti. Il termine "nano fibra" viene impiegato per descrivere fibre che possiedono un diametro appartenente al range che va da 1 a 1000 nm e che mostrano notevoli ed elevati vantaggi relativamente al tasso di assorbimento proteico

e alla mediazione dell'attaccamento cellulare alla superficie del biomateriale. Si è constatato inoltre che queste fibre possiedono proprietà meccaniche uniche, riguardanti soprattutto il modulo e la forza di trazione, indispensabili per la modulazione del comportamento cellulare dato che forniscono un'adeguata resistenza alle forze generate dal citoscheletro.

La produzione delle nano fibre polimeriche avviene comunemente secondo tre metodi differenti ognuno dei quali, come già descritto nel precedente capitolo, è caratterizzato da specifici vantaggi e svantaggi:

- *l'elettrospinning*
- *la separazione di fase*
- *l'auto-assemblaggio*

L'*elettrospinning* è una tecnica, molto efficiente e dal punto di vista del costo e da quello temporale, utilizzata per la produzione di reticoli di fibre secondo un processo basato sulla repulsione elettrostatica di una soluzione di polimero per la formazione di fibre polimeriche. Generalmente questa soluzione di polimeri, essenzialmente sintetici, viene espulsa tramite un ago e collocata su una piastra di raccolta; durante questo passaggio, per non permettere che la tensione superficiale generata dalla punta dell'ago possa trattenere la miscela, ci si avvale di un campo elettrico che genera all'interno di quest'ultima una carica repulsiva fondamentale per opporsi a tale forza. Una volta contrapposta, il solvente evapora dal polimero prima di arrivare a destinazione permettendo, così, la formazione di reticoli di fibre polimeriche sulla piastra stessa.

Durante questa procedura esistono diverse variabili da dover tenere in considerazione per il controllo del diametro delle fibre e queste includono la concentrazione del polimero dissolto in soluzione, la portata della soluzione di polimero, l'ampiezza della tensione applicata e la distanza tra l'ago e la piastra di raccolta. I vantaggi quindi che scaturiscono dall'utilizzo dell'*elettrospinning* riguardano prettamente la semplicità e l'efficienza della procedura stessa, nonché l'abilità nel controllo di vari fattori come il diametro, l'orientamento e la formazione delle fibre; gli svantaggi invece sono relativi all'utilizzo di solventi organici e al limitato controllo della struttura dei pori.

La *separazione di fase* è il metodo maggiormente utilizzato per la formazione di pori per le membrane polimeriche e gli scaffold ed è basato sulla separazione di una soluzione in due fasi, una povera e una ricca di polimero. Difatti, per produrre le matrici, si discioglie il polimero in un solvente e lo si induce rapidamente alla separazione di fase,

dopodiché si prosegue con la sostituzione del solvente con l'acqua in maniera tale da garantire il congelamento dell'intero costrutto.

Le nano fibre appena formatesi mostrano una non dipendenza della dimensione dei pori dalla concentrazione di polimero tant'è che si è notato che un suo incremento comporta esclusivamente un aumento del modulo e della forza di trazione del costrutto, senza avere alcun tipo di effetto sul diametro delle fibre. I vantaggi derivanti dall'utilizzo di questo metodo sono l'assenza di attrezzature specifiche per la realizzazione di costrutti con forme geometriche differenti. Ciononostante il processo può essere adoperato soltanto con un ristretto numero di polimeri e questo comporta l'insorgere di notevoli difficoltà nell'atto di diffusione e commercializzazione del metodo stesso.

L'*auto-assemblaggio* consiste in un approccio dal basso verso l'alto nella fabbricazione delle nano fibre nel senso che fa affidamento sulle deboli interazioni non-covalenti, a partire da piccole molecole, proteine, peptidi e acidi nucleici, per la formazione di queste fibre. Tale tipologia di approccio viene specialmente utilizzata per assemblare le nano fibre *in vivo* e creare uno "scaffold iniettabile" ai fini della riparazione tissutale, ma si tratta di una tecnica molto impegnativa, limitata a pochi polimeri e che, soprattutto, conduce alla realizzazione di fibre con una lunghezza molto limitata.

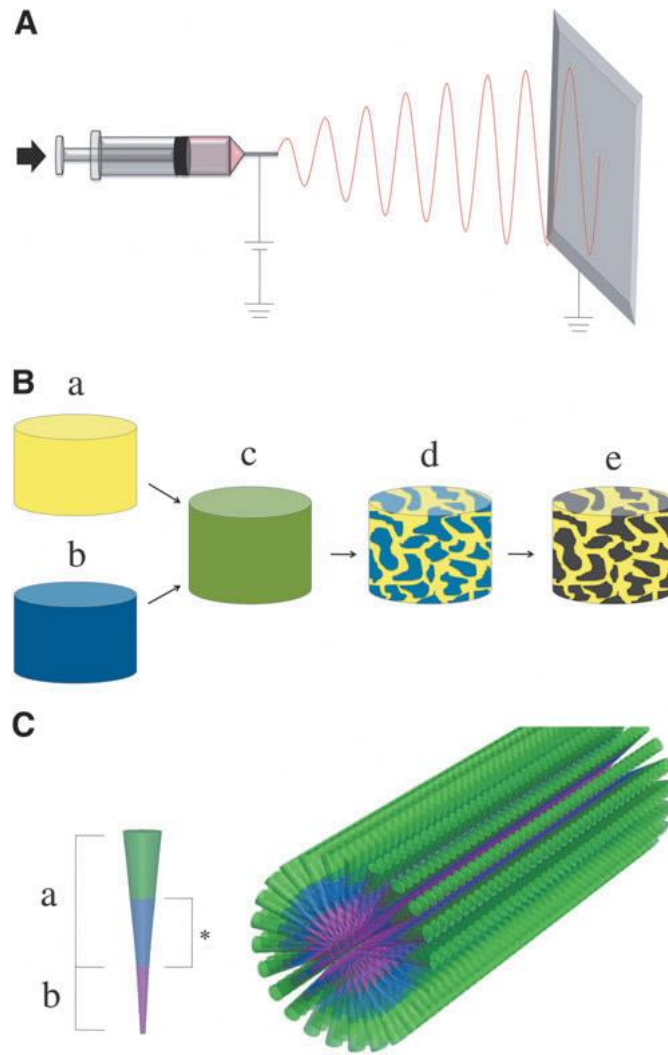


Figura 10 – A) Elettrospinning ; B) Separazione di fase; C) Auto-assemblaggio;

Oltre a servire da scaffold per il supporto dell'infiltrazione delle cellule e la formazione del tessuto, i costrutti di nano fibre possono essere impiegati come sorta di veicoli di consegna dei fattori bioattivi, indispensabili per l'induzione della risposta cellulare o tissutale desiderata. Questi costrutti possono essere arricchiti di fattori bioattivi in maniere differenti ma, a prescindere dal metodo utilizzato, si verifica in ogni caso una significativa manifestazione d'attività cellulare, non apprezzabile nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti, la cui intensità decresce col passare del tempo. Nel caso specifico delle nano fibre polimeriche, difatti, tale attività inaspettata dipende dalle procedure seguite per il controllo del profilo di rilascio di fattori bioattivi che può avvenire o alterando la composizione del

polimero oppure rivestendo la superficie delle fibre con un polimero al fine di ridurre l'insorgere dell'improvvisa manifestazione d'attività cellulare.

Riguardo alle proprietà meccaniche dei costrutti realizzati con nano fibre polimeriche, queste sono testate con metodi speciali sviluppatasi negli ultimi anni e difficili da applicare alle singole fibre, data la loro piccola dimensione, poiché si necessita di una strumentazione adeguata come un trasduttore di forza ad elevata sensibilità e accuratezza e un attuatore con una risoluzione piuttosto elevata per applicare precisamente la tensione. Spesso, infatti, si predilige produrre il polimero direttamente sulla superficie d'analisi per poter stimare il modulo di tensione, avvalendosi del metodo dei fasci di flessione, e misurare la deflessione della fibra stessa generata dalla forza che vi si applica. Nonostante le difficoltà tecniche riscontrate nell'analisi dei test meccanici a cui vengono sottoposte le singole nano fibre, i modelli che sono stati realizzati per poter predire le proprietà delle fibre, come il diametro, la struttura, il materiale componente e le tecniche di fabbricazione, sono di ampia utilità nell'ambito dell'ingegneria tissutale, specialmente nella realizzazione del disegno degli scaffold.

I biomateriali degradabili vengono utilizzati generalmente per il supporto durante la rigenerazione o la crescita tissutale ed hanno la peculiarità di degradarsi, per l'appunto, nel momento in cui non è più necessaria la loro funzione. Per questo motivo le caratteristiche di degradazione delle nano fibre polimeriche, dipendenti da molteplici parametri come la composizione e la struttura del materiale, costituiscono un fattore indispensabile per la comprensione dell'implementazione di successo nell'ingegneria tissutale. Si ritiene che la struttura delle nano fibre polimeriche influisca sul tasso di degradazione in maniera differente: l'ampiezza dell'area rispetto al tasso volumetrico delle nano fibre le rende particolarmente vulnerabili alla degradazione idrolitica, al contrario invece l'incremento della cristallinità o dell'orientamento delle fibre di piccolo diametro possono condurre ad una diminuzione del tasso di degradazione. Infine, la riduzione del diametro delle fibre e l'aumento della superficie dell'area comportano un incremento del livello di degradazione delle fibre e, al contempo, una diminuzione di quello auto-catalitico.

Le nano fibre allineate hanno dimostrato essere molto promettenti per la realizzazione di scaffold per tendini e legamenti eppure superiori vantaggi sono emersi dall'utilizzo di maglie di microfibre realizzate con l'aggiunta di nano fibre con lo scopo di aumentare la superficie d'attacco cellulare e promuovere, in questo modo, la coltura, la proliferazione e la funzione cellulare.

Bibliografia

- [1] N. Ashammakhi & R.L Reis , “*Topics in Tissue Engineering*” , Vol. 2 , Chapter 8, 2005.
- [2] Mary Ann Liebert , “*Tissue Engineering*”, Part B, Vol. 17 , Number 5 , 2011.
- [3] Yang Liu , H. S. Ramanath & Dong-An Wang , “*Tendon tissue engineering using scaffold enhancing strategies* ” (Review) , Division of Bioengineering , School of Chemical and Biomedical Engineering , Nanyang Technological University , 2008.
- [4] Marcia T. Rodrigues,Rui L. Reis and Manuel E. Gomes, “ *Engineering tendon and ligament tissues : present developments towards successful clinical products*” , Journal of tissue engineering and regenerative medicine (Review) , 2012.
- [5] James Cho-Hoong, Hong-Wei Ouyang , Swee-hin Teoh , Casey K.C. Chan and Eng-Hin Lee , “ *Tissue-Engineering Approach to the Repair and Regeneration of tendons and ligaments*”, Tissue Engineering , Vol. 9 , 2003.
- [6] S.A. Korossis , F. Bolland , J. N. Kearney , J. Fisher and E. Ingham , “ *Bioreactors in tissue engineering* ”, Topics in tissue engineering , Vol. 2 , Chapter 8 , 2005.
- [7] Ahmad Oryan & Ali Moshiri & Abdolhamid Meimandi- Parizi, “ *Implantation of a novel tissue-engineered in a large tendon defect initiated inflammation , accelerated fibroplasia and improved remodeling of the new Achilles tendon : a comprehensive detailed study with new insights*” , Cell tissue res , 2014.
- [8] Frank A. Petrigliano , David R. McAllister and Benjamin M. Wu , “ *Tissue Engineering for Anterior Cruciate Ligament Reconstruction : A review of Current Strategies*” , The Journal of Arthroscopic and Related Surgery , Vol. 22 , 2006.
- [9] Abdolhamid Meimandi – Parizi , Ahmad Oryan and Ali Moshiri , “ *Role of tissue engineered collagen based tridimensional implant on the healing response of the experimentally induced large Achilles tendon defect model in rabbits : a long term study with high clinical relevance* ” , Journal of Biomedical Science , 2013.

- [10] Natalia Juncosa - Melvin , Gregory Boivin , Marc T. Galloway , Cindi Gooch , John R. West and David L. Butler , “ *Effects of cell-to-Collagen Ratio in Stem Cell-Seeded Constructs for Achilles Tendon Repair* ” , Tissue Engineering , Vol. 12 , Num. 4 , 2006.
- [11] L. A. Bosworth , N. Alam , J. K. Wong , “ Investigation of 2D and 3D electrospun scaffold intended for tendon repair ” , Shool of Materials , The University of Manchester , 2013.
- [12] Rebecca L. Dahlin , F. Kurtis Kasper and Antonios G. Mikos , “ *Polymeric Nanofibers in Tissue Engineering* ” , Tissue Engineering , Vol. 17 , Num. 5, 2011.
- [13] Cédric P. Laurent , Damien Durville , Didier Mainard , Jean – Francois Ganghoffer , Rachid Rahouadj , “ *A multilayer braided scaffold for Anterior Cruciate Ligament : Mechanical modeling at the fiber scale* ” , Journal of the mechanical behavior of biomedical materials , 2012.
- [14] James A. Cooper , Helen H. Lu , Frank K. Ko , Joseph W. Freeman , Cato T. Laurencin , “ *Fiber – based tissue – Engineered scaffold for ligament replacement design considerations and in vitro evaluation* ” , Biomaterials , 2005.
- [15] http://amsdottorato.unibo.it/1698/1/Govoni_Marco_tesi.pdf.
- [16] http://www.fedoa.unina.it/1861/1/Luciani_Ingegneria_dei_Materiali_e_delle_Strutture.pdf.
- [17] http://tesi.cab.unipd.it/27055/1/MARCO_MONARO_575388-IBM.pdf.
- [18] www.amedeolucente.it/public/13.
- [19] <http://www.galileicrema.it/intraitis/documenti/orientamentoMedie/galilab-chimica/microscopio.pdf>.
- [20] <https://www.docenti.unina.it/downloadPub.do?tipoFile=md&id>.