

**ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA**  
**CAMPUS DI CESENA**  
**SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA**  
**CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

**BIOPRINTING:**  
**STATO DELL'ARTE ED APPLICAZIONI BIOMEDICHE**

Elaborato in  
Ingegneria Clinica

Relatore  
Claudio Lamberti

Presentata da  
Andrea Giovanelli

Sessione I

Anno Accademico 2014/2015



# INDICE

<b>Abstract</b> .....	1
 <b>CAPITOLO 1.</b>	
1.1 Introduzione .....	3
1.2 Ingegneria dei tessuti .....	4
1.3 Bioprinting .....	6
1.3.1 Definizione .....	6
1.3.2 Concetti fondamentali per la nascita del Bioprinting .....	8
1.3.2.1 Formazione di un tessuto negli organismi viventi .....	9
1.3.2.2 Principi alla base del Bioprinting .....	10
 <b>CAPITOLO 2.</b>	
2.1 Fasi del processo .....	13
2.2 Tecniche di stampa .....	14
2.2.1 Ink-jet based Bioprinting .....	14
2.2.2 Laser Assisted Bioprinting .....	16
2.2.3 Solenoid Valve based Bioprinting .....	20
2.3 Confronto tra le tecniche di stampa .....	21
2.4 Cell Damage .....	22
2.5 Fattori limitanti .....	24
2.5.1 La vascolarizzazione .....	25
2.5.2 I fenomeni di trasporto .....	26
2.5.3 La differenziazione cellulare .....	27
2.5.4 La reazione dell'organismo all'impianto di cellule e tessuti .....	28
 <b>CAPITOLO 3.</b>	
3.1 Materiali .....	31
3.2 Biomateriali .....	31
3.2.1 Definizione .....	31

3.2.2 Proprietà dei Biomateriali .....	32
3.3 Biomateriali polimerici .....	34
3.3.1 Biomateriali polimerici sintetici .....	34
3.3.2 Biomateriali polimerici naturali .....	35
3.3.2.1 Biomateriali polimerici naturali a struttura proteica .....	36
3.3.2.2 Biomateriali polimerici naturali a struttura polisaccaridica .....	37
3.4 Bioink .....	39
3.4.1 Preparazione del Bioink .....	40
3.4.2 Vantaggi e criticità nell'utilizzo di sferoidi .....	41
3.5 Scaffold .....	42
3.5.1 Una nuova concezione di scaffold: il Biopaper .....	44
3.5.2 Idrogel come Biopaper .....	45
3.5.2.1 Idrogel naturali .....	46
3.5.2.2 Idrogel compositi .....	46
3.5.3 Conclusioni sul Biopaper .....	47
3.6 Bioreattore .....	47
3.6.1 Definizione e funzioni .....	47
 <b>CAPITOLO 4.</b>	
4.1 Vasi sanguigni .....	49
4.1.1 Struttura e funzioni .....	49
4.1.2 Importanza dei vasi sanguigni .....	51
4.1.3 Problemi relativi all'utilizzo di scaffold .....	51
4.1.4 Bioprinting di vasi sanguigni .....	52
4.1.5 Bioprinting di microvasi .....	55
4.2 La cartilagine .....	56
4.2.1 Bioprinting della cartilagine .....	58
4.2.2 Limitazioni e criticità .....	62
4.3 La pelle .....	63
4.3.1 Struttura e funzioni .....	63
4.3.2 Infortuni della pelle .....	65
4.3.3 Bioprinting di pelle umana .....	66
4.3.4 Potenzialità e criticità della tecnica .....	68

<b>Conclusioni</b> .....	71
<b>Bibliografia</b> .....	73
<b>Pubblicazioni</b> .....	73
<b>Sitografia</b> .....	75



## **ABSTRACT**

L'argomento trattato in questo elaborato riguarda una nuova tecnologia che si sta sviluppando nel settore dell'ingegneria dei tessuti: il Bioprinting. Tale rivoluzionario approccio completamente automatizzato, consiste nell'elaborazione automatica delle immagini CAD (Computer-Aided Design) e nella fabbricazione assistita CAM (Computer-Aided Manufacturing) al fine di ricreare tessuti ed organi. Nel seguito verrà data una definizione del processo, verranno analizzate le varie fasi di elaborazione, le tecniche ed i materiali utilizzati. Verranno infine riportati studi riguardanti alcune applicazioni della tecnica, quali la realizzazione di vasi sanguigni, cartilagine e pelle.





# CAPITOLO 1

## 1.1 INTRODUZIONE

La medicina moderna, nel senso di medicina scientifica basata sul metodo sperimentale, rappresenta il risultato di continui progressi a partire dall'inizio del secolo scorso.

Nonostante gli sviluppi e le sofisticazioni introdotte in campo biomedico, ad oggi la sostituzione di tessuti ed organi danneggiati da traumi o malattie rappresenta un problema cruciale. Il trapianto di organi è infatti tuttora limitato dalla scarsa disponibilità di donatori e problemi di incompatibilità e rigetto.

Anche con organi artificiali, ambito di ricerca ancora aperto, si incontrano severe complicazioni: nel progettare un organo artificiale si ha, infatti, come obiettivo quello di realizzare un dispositivo che replichi le funzioni di un organo o di un tessuto di origine naturale. Ciò evidentemente riduce i gradi di libertà del progetto in quanto le specifiche funzionali, cioè le prestazioni, sono fissate abbastanza rigidamente. Inoltre se, come è auspicabile, l'organo artificiale deve essere in grado di sostituire fisicamente l'organo naturale, anche gli ingombri, la forma, le interfacce, le masse e le altre proprietà fisiche sono fissate. Globalmente si hanno quindi una grande quantità di vincoli, spesso purtroppo nemmeno completamente conosciuti. [3]

Non si è, quindi, in grado di sostituire le complesse reazioni che sono alla base del funzionamento degli organi originari con dispositivi artificiali, se non tramite semplificazioni che non possono però riprodurre completamente la complessità delle funzioni cellulari.

In questo panorama, grandi aspettative vengono riposte nella medicina rigenerativa e nell'ingegneria dei tessuti che mirano a riparare, rigenerare e riprodurre tessuti e organi danneggiati.

Molti ricercatori e dottori sperano infatti, aumentando la conoscenza di come cellule e tessuti interagiscono su nano scala, di trovare soluzioni che

trattino in maniera più efficiente lesioni e malattie, tramite la realizzazione di tessuti biomimetici che meglio emulino il disegno naturale.

## **1.2 INGEGNERIA DEI TESSUTI**

Il termine ingegneria dei tessuti (TE: Tissue Engineering) fu coniato dalla fondazione Washington National Science nel meeting del 1987 ed oggi rappresenta una scienza in forte evoluzione con pubblicazioni che nel corso degli anni si sono fatte sempre più numerose ed ampie.

L'ingegneria dei tessuti è stata definita dai suoi fondatori, il Prof. Langer ed il Dott. Vacanti, come segue:

*“L'ingegneria dei tessuti è una scienza interdisciplinare che applica i principi ed i metodi dell'ingegneria e delle scienze biologiche con l'obiettivo di comprendere le relazioni fondamentali tra struttura e funzione nei tessuti sani e malati dei mammiferi e di sviluppare sostituti biologici in grado di ripristinare, mantenere o migliorare le funzioni di organi o tessuti danneggiati” [1].*

Lo scopo principale del tissue engineering è di creare tessuti corporei di varia natura (epiteliali, vascolari, nervosi, ossei, cartilaginei, ...) da poter poi applicare a pazienti che ne necessitano, creare quindi un sistema che permetta in laboratorio di fabbricare tessuti da poter utilizzare sull'uomo per impianti o sostituzione di tessuti danneggiati.

Prevede la collaborazione di diverse figure professionali in quanto coinvolge numerose discipline: gli ambiti interessati sono le scienze di base, la scienza dei biomateriali, le biotecnologie, la bioingegneria, la medicina rigenerativa e la biologia cellulare. [1] Tra queste, la biologia cellulare assume un'importanza rilevante: risulta sempre più necessario studiare e comprendere nel dettaglio i meccanismi che regolano la crescita, la proliferazione, la differenziazione delle cellule e le modalità attraverso

le quali i componenti della matrice extracellulare interagiscono con le funzioni cellulari.

La progettazione di questi tessuti avviene attraverso l'utilizzo combinato di materiali, cellule, mediatori biochimici e sistemi innovativi di coltura attraverso due tipologie di approccio:

- in vitro: il biomateriale viene seminato con le cellule del paziente e posto in un bioreattore che simula l'ambiente biologico, creando condizioni culturali ottimali per la crescita cellulare. Una volta ultimato il tessuto verrà poi impiantato nel paziente.
- in vivo (tissue guided regeneration): in questo approccio non viene realizzata la semina cellulare in vitro poiché la rigenerazione viene ottenuta direttamente nel paziente.

Tre elementi fondamentali per la realizzazione dei tessuti biologici sono:

- cellule: la scelta della corretta fonte cellulare è un punto cruciale per l'ingegnerizzazione di un tessuto. Le cellule impiegate possono essere di vario tipo:
  - o autologhe: prelevate dallo stesso individuo su cui sarà eseguito l'impianto. Questo tipo di cellule abbatte drasticamente i problemi di rigetto e di trasmissione di malattie;
  - o allogeniche: provenienti da un donatore della stessa specie;
  - o xenogeniche: ottenute da un donatore di un'altra specie;
  - o staminali: cellule indifferenziate che hanno la capacità, crescendo, di dividersi in cellule specializzate di vario tipo.

- scaffold: costituisce il supporto su cui vengono impiantate le cellule, può essere naturale o sintetico, permanente o biodegradabile, ma sempre e necessariamente biocompatibile con l'ambiente naturale nel quale verrà impiantato. Oltre alla funzione di sostegno, deve permettere l'adesione e il movimento delle cellule e fungere da trasportatore di fattori biochimici (e.g. grow factors) e di sostanze necessarie per lo sviluppo delle cellule. Lo scaffold in ingegneria tissutale è quindi l'analogo della matrice extracellulare (ECM) nell'ambiente fisiologico. [4]
- bioreattore: dispositivo progettato e realizzato per sollecitare le cellule in coltura in particolari condizioni biofisiche e meccaniche, al fine di riprodurre in modo biomimetico le condizioni naturali che regolano i processi di generazione e accrescimento tissutale negli organismi viventi. Vengono inoltre utilizzate sostanze chimiche quali i fattori di crescita (grow factors) che servono per fare maturare il tessuto appena stampato il più velocemente possibile.

## **1.3 BIOPRINTING**

### **1.3.1 DEFINIZIONE**

Mentre la Stampa 3D, che permette la fabbricazione digitale diretta (DDM: direct digital manufacture) di una grande varietà di articoli in plastica e metallo, sta guidando una rivoluzione manifatturiera, di gran lunga più sorprendente è la sua applicazione in ambito biologico: una delle più recenti e promettenti tecniche di ingegneria dei tessuti è, infatti, il Bioprinting.

Una definizione di Bioprinting fu data nel 2009 alla Conferenza Internazionale sul Bioprinting e sulla Biofabbricazione, tenutasi a Bordeaux:

*“Bioprinting can be defined as the use of computer-aided transfer processes for patterning and assembling living and non-living materials with a prescribed 2D or 3D organization in order to produce bio-engineered structures serving in regenerative medicine, pharmacokinetic and basic cell biology studies.” [6]*

Il Bioprinting consiste quindi in una tecnica che, tramite l’impiego di software e hardware dedicati per la progettazione di schemi e strutture in 2D e 3D, si prefigge di produrre una struttura o un tessuto ingegnerizzato da poter impiegare direttamente sull’uomo per riparare o sostituire i tessuti danneggiati o come materiale per test e studi biologici e farmacologici.

Per gli organi più semplici o per strutture cartilaginee come le orecchie o la trachea, la biostampa 3D utilizza degli “scaffold” disegnati in CAD e stampati in 3D usando materiali biocompatibili, sui quali verranno poi impiantate le cellule che formeranno i tessuti e l’organo.

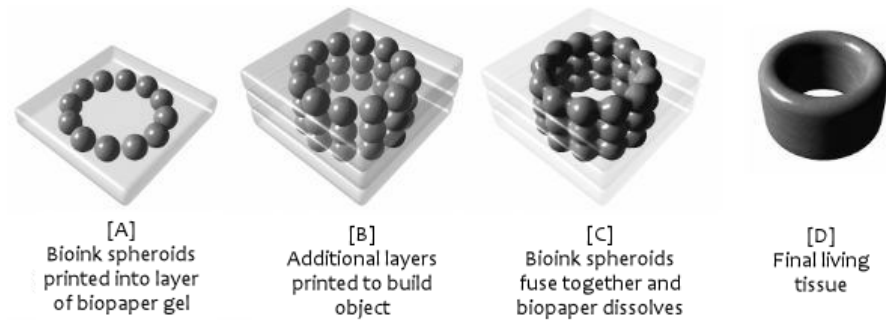
Per gli organi più complessi e formati da moltissime cellule diverse, come il fegato, il cuore o i reni, questo metodo non è applicabile e occorre stampare direttamente e contemporaneamente tessuti e scaffold. In questo caso si adotta un processo simile alla stampa inkjet 2D, dove tanti “foglietti” 2D verranno stampati uno sopra l’altro (layer-by-layer) fino a formare una complessa struttura 3D.

Gli elementi fondamentali del Bioprinting sono i seguenti:

- Bioprinter: il dispositivo per l’erogazione e la deposizione del bio-  
inchiostro “*drop-on-demand*”, ovvero solamente dove e quando il  
computer dice di stampare in modo da ricreare il più fedelmente possibile  
il modello voluto;
  
- Bioink: gocce di singole cellule o aggregati cellulari che vengono  
stampati “layer-by-layer” in modo alternato in concomitanza con la bio-  
carta;

- Biopaper: la base su cui depositare il bioink strato dopo strato, con cui poi si fonderà a formare il costruito desiderato;

- Bioreattore: ambiente in cui far maturare e crescere i costrutti nonché mantenerli in vita.



**Fig. 1.1:** Processo schematizzato di realizzazione layer-by-layer del tessuto ingegnerizzato

### 1.3.2 CONCETTI FONDAMENTALI PER LA NASCITA DEL BIOPRINTING

Come anticipato, la biologia cellulare ricopre particolare importanza nella tecnica del Bioprinting. È essenziale studiare e capire i meccanismi che regolano la formazione di organi e tessuti per sviluppare un modello che emuli quello naturale e ne riproduca morfologia e funzionalità.

Si assume quindi come modello la natura e si cerca di replicarne e sfruttarne le dinamiche per la realizzazione di costrutti che siano il più possibile simili agli originali, al fine di renderne possibile la rigenerazione o la sostituzione senza la comparsa degli effetti indesiderati che ad oggi limitano le tecniche conosciute.

### 1.3.2.1 FORMAZIONE DI UN TESSUTO NEGLI ORGANISMI VIVENTI

A determinare l'organizzazione cellulare in aggregati, con formazione di tessuti ed organi, sono principalmente recettori adesivi chiamati CAM (Cell Adhesion Molecules): permettono alle cellule di riconoscersi reciprocamente e di instaurare interazioni stabili, sia con le altre cellule sia con la matrice extracellulare.

Le classi principali di CAM sono quattro: Integrine, Caderine, Ig CAM e Selectine. I recettori adesivi appartenenti alle quattro classi sono proteine che attraversano la membrana plasmatica della cellula da parte a parte e sono costituiti da tre porzioni distinte: una rivolta all'esterno della cellula, una che attraversa il doppio strato lipidico della membrana e una terza porzione che si affaccia nel citoplasma all'interno della cellula. Nel caso delle caderine, la porzione rivolta all'esterno della cellula può legare molecole identiche a sé stessa (*legami omofilici*) presenti sulla membrana di cellule adiacenti, permettendo così la formazione di aggregati cellulari. Nel caso delle integrine, la porzione esterna lega proteine della matrice extracellulare o degli scaffold, ancorando così le cellule a questa impalcatura di supporto esterna (*legami eterofilici*). La funzione adesiva di questi recettori richiede, tuttavia, anche la loro interazione con le impalcature di supporto intracellulari. Questa funzione è svolta dalle porzioni dei recettori rivolte verso il citoplasma che legano diversi elementi del citoscheletro. In questo modo si realizza una continuità fisica tra strutture di sostegno interne ed esterne alla cellula, necessaria per garantire la stabilità di un tessuto e la sua capacità di resistere alle sollecitazioni meccaniche.

In seguito all'interazione cellula-cellula o cellula-matrice extracellulare, i recettori adesivi attivano circuiti biochimici di reazioni intracellulari che modificano sia l'organizzazione del citoscheletro, sia la risposta cellulare a stimoli differenziativi e proliferativi. L'adesione cellulare esercita così un controllo sul differenziamento e sulla proliferazione cellulare, necessario allo sviluppo coordinato dei tessuti in un organismo pluricellulare. [4]

La capacità di riconoscersi, di cellule appartenenti ad uno stesso tessuto, è stata suggerita inizialmente da una serie di esperimenti di aggregazione cellulare: quando cellule provenienti da tessuti differenti venivano mescolate in un mezzo adeguato, esse si aggregavano in agglomerati contenenti tipi cellulari omogenei. Era quindi chiaro che le cellule provenienti dallo stesso tessuto erano in grado di riconoscersi e di stabilire interazioni che permettevano la formazione di aggregati.

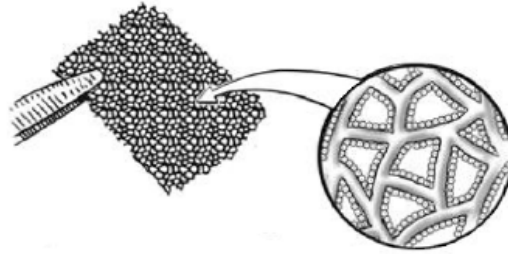
#### 1.3.2.2 PRINCIPI ALLA BASE DEL BIOPRINTING

Altre conoscenze pregresse che hanno suggerito e permesso la nascita della tecnica del Bioprinting sono di seguito elencate:

- l'istologo e medico tedesco Gustav V. R. Born (1851-1900), studiando embrioni di specie anfibe, notò che tagliando due differenti embrioni e mettendone in contatto le zone di taglio, queste si univano formando una struttura unica;
- il biologo americano H. V. Wilson (1863-1939) pubblicò nel 1907 uno studio condotto sulle cellule delle spugne marine nelle quali notò un particolare modo di rigenerazione: la ricostituzione di individui da cellule dissociate. Si accorse cioè che, dissociando una spugna (*Microciona*) in frammenti mediante aghi o dissociando le cellule costituenti tali frammenti, gli elementi cellulari così finemente separati, se posti in una soluzione salina, si raggruppavano formando nuove spugne. Inoltre si rese conto che le cellule provenienti da specie di spugne differenti non si mischiavano in organismi ibridi, ma si univano solo fra cellule della stessa specie;
- Robert Langer, professore di chimica e ingegneria biomedica al MIT, produsse nel 1974 uno scaffold polimerico per l'impianto e la crescita di cellule umane, partendo dalle conoscenze fino ad allora acquisite.



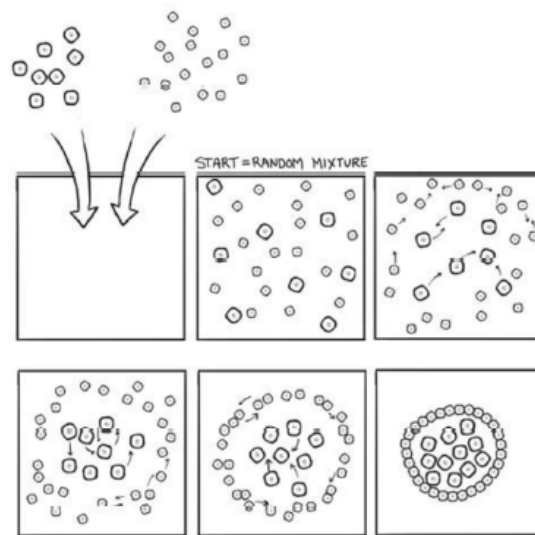
Per questo motivo è considerato uno dei padri fondatori dell'ingegneria dei tessuti;



**Fig. 1.2:** Tessuto Ingegnerizzato

- l'embriologo tedesco J. Holtfreter (1901-1992) studiò le interazioni tra i tessuti. Egli notò che disaggregando embrioni anfibio (Gastrula), i tre tipi di cellule di cui erano formati si riaggregavano secondo uno schema prevedibile e non in modo casuale;

- Malcom Steinberg (1930-2012), professore di biologia molecolare a Princeton, propose l'ipotesi di adesione differenziale: specie cellulari differenti tendono naturalmente a raggrupparsi insieme e, se le proprietà di adesione sono differenti, una di queste specie tenderà a circondare ed inglobare l'altra. Questa ipotesi e le proprietà che ne conseguono sono alla base del meccanismo di formazione del bioink;



**Fig. 1.3:** meccanismo di adesione differenziale

- a partire dai primi anni '60, con il lavoro del biologo Paul Weiss, si dimostrò la possibilità di formare tessuti in vitro a partire da singole cellule. [8]

## CAPITOLO 2

### 2.1 FASI DEL PROCESSO

Terapie di medicina rigenerativa scaffold-based richiedono la fabbricazione dello scaffold, l'impianto su quest'ultimo di cellule, ed in seguito il condizionamento del costruito in un bioreattore al fine di ottenere un'adeguata proliferazione cellulare.

Tradizionalmente la fabbricazione dello scaffold e l'impianto di cellule sono due fasi separate e distinte del processo. Le più recenti tecniche di 3D Bioprinting combinano i due step in un unico passaggio, permettendo la scrittura layer-by-layer di biomateriali, molecole chimiche e cellule viventi in modo da costituire un costruito 3D eterogeneo e della forma desiderata.

L'abilità fondamentale nella biostampa consiste essenzialmente nella possibilità di controllare in maniera accurata la quantità di bioink eiettata dall'ugello e depositata sul substrato.

Il processo di 3D Bioprinting inizia con la definizione di un modello digitale dell'architettura da fabbricare che può essere direttamente ottenuta da immagini CT (Computed Tomography) e MRI (Magnetic Resonance Imaging) del paziente che necessita del trapianto di tessuto.

Tramite l'elaborazione automatica delle immagini CAD (*Computer-Aided Design*) otteniamo quindi un modello 3D da realizzare.

Strumenti software possono inoltre aiutare ad identificare regioni di materiali differenti che specifichino la posizione dei biomateriali, delle molecole biologiche e delle cellule viventi.

Tramite specifici algoritmi il modello digitale viene poi convertito in una serie di istruzioni necessarie per guidare i sistemi hardware; l'esatto formato di istruzioni macchina, in questo processo di fabbricazione CAM (*Computer-Aided Manufacturing*), dipende dalla tecnica di stampa e dalla configurazione hardware utilizzata.

Una volta attivato il segnale di stampa, il sistema di controllo guida i componenti hardware per la realizzazione fisica del costruito desiderato.

Complessi tessuti ingegnerizzati saranno formati da strati (layer) spazialmente modellati di cellule, le quali aggregandosi assieme andranno a costituire il tessuto specializzato.

L'intera procedura deve avvenire in ambiente sterile per limitare la contaminazione sia delle materie prime, che del costruito finale.

Essendo implicate nel processo di fabbricazione anche cellule viventi, un aspetto critico da considerare è il tempo necessario per produrre il costruito: la quantità di tempo disponibile dipende dal tipo cellulare utilizzato e, a meno di condizioni particolarmente favorevoli, non dovrebbe superare un'ora. Tempi più lunghi si tradurranno in una ridotta vitalità cellulare e in stress cellulare anormalmente elevato, che porterà ad un degrado delle funzioni.

I costrutti 3D realizzati potranno poi essere utilizzati per screening di farmaci, come modelli per studi sui tumori o come materiali per impianto.  
[5]

## **2.2 TECNICHE DI STAMPA**

### **2.2.1 INK-JET BASED BIOPRINTING**

Ink-jet Bioprinting è un processo di stampa che prevede la precisa deposizione di gocce di bioink, di dimensioni variabili dal nanolitro al picolitro, sul biopaper secondo un modello digitale preciso. Si tratta di un adattamento del tradizionale processo di stampa a getto d'inchiostro (ink-jet) e nella maggior parte dei casi viene realizzato modificando parzialmente stampanti desktop in commercio.

Le metodologie di stampa ink-jet sono fondamentalmente due:

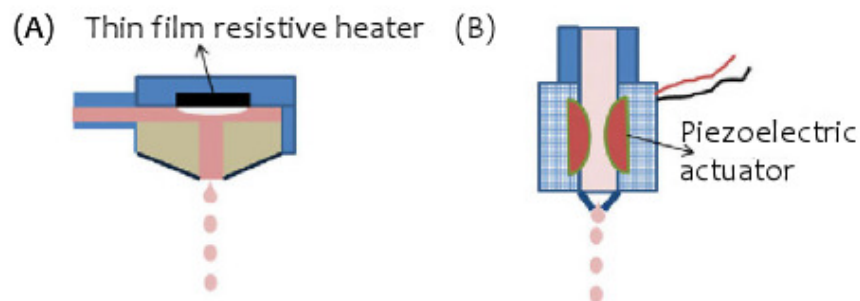
- CIJ (*Continuous Ink-Jet*): un flusso continuo di goccioline è prodotto forzando l'inchiostro attraverso un ugello microscopico sotto pressione e deviato sul substrato mediante un campo elettrico. Dove, nel modello digitale, non è richiesta la deposizione di bioink,

le goccioline vengono guidate in una sorta di grondaia e raccolte per essere riutilizzate;

- DOD (*Drop-on-Demand*): le goccioline di inchiostro sono emesse attraverso l'ugello tramite una pressione impulsiva solo quando richiesto dal modello.

Nel Bioprinting l'approccio DOD è preferibile per la sua natura impulsiva e per rischi di contaminazione dovuti al ricircolo di bioink nella tecnica CIJ. La stampa Drop-on-demand può essere ulteriormente suddivisa in base al meccanismo di attuazione della goccia di inchiostro:

- Effetto Termico (*Thermal DOD*): un sottile elemento resistivo viene riscaldato per effetto Joule da una corrente impulsiva. L'aumento della temperatura provoca l'evaporazione dell'inchiostro adiacente la resistenza formando una bolla che espandendosi fa espellere la goccia di bioink dall'ugello;
- Effetto Piezoelettrico (*Piezoelectric DOD*): si utilizza un trasduttore piezoelettrico che, sottoposto a variazioni di voltaggio, si espande determinando la fuoriuscita di bioink.



**Fig. 2.1:** Meccanismo di attuazione resistivo (A) e piezoelettrico (B)

Le dimensioni delle gocce e la risoluzione spaziale nella stampa ad inchiostro sono determinate da vari fattori: la viscosità del bioink, la dimensione degli ugelli, la distanza tra questi ed il substrato, la frequenza dell'impulso di corrente nel Thermal-DOD e la frequenza dell'impulso di tensione nel Piezoelectric-DOD.

La tecnica ink-jet offre la possibilità di stampare differenti specie cellulari, biomateriali o loro combinazioni tramite diverse testine di stampa in un unico processo di fabbricazione, permettendo la realizzazione di complessi costrutti multicellulari. [5]

### 2.2.2 LASER ASSISTED BIOPRINTING

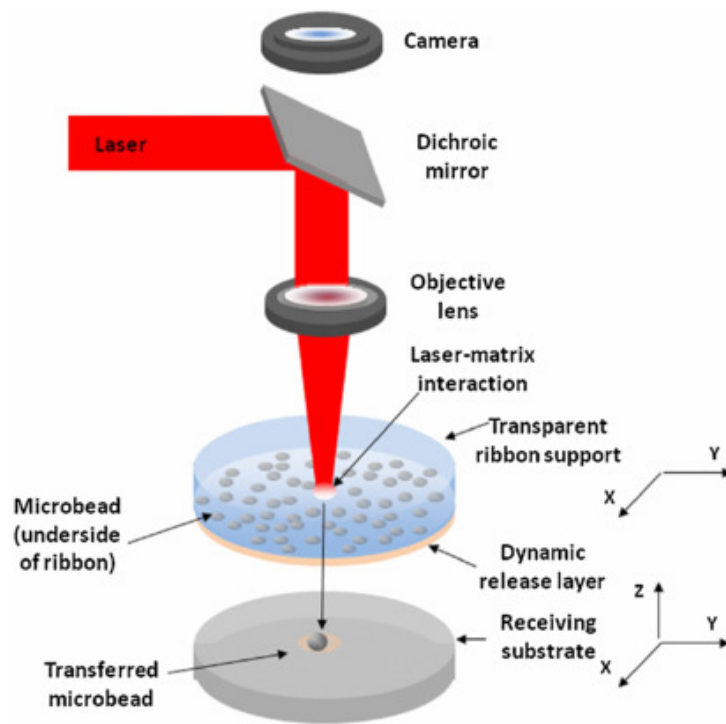
La tecnologia di stampa a laser (LAB: Laser-Assisted Bioprinting) è un processo di scrittura diretta, senza contatto.

I sistemi LAB sono caratterizzati da tre componenti principali: una sorgente laser impulsiva, un “nastro” donatore contenente cellule sospese in un gel ed un substrato ricevente. Di seguito sono analizzate singolarmente in modo più dettagliato:

- Impulsi laser della durata del nanosecondo, con lunghezze d'onda vicine o prossime al UV, vengono utilizzati come sorgente di energia;
- Il “nastro” è costituito da una piastra di vetro o quarzo, trasparente alle lunghezze d'onda di radiazione laser, con un lato rivestito da bioink termosensibile incapsulato all'interno di un sottile strato di idrogel.

A seconda delle caratteristiche ottiche del bioink e della lunghezza d'onda del laser, il sistema può anche contenere un sottile strato (~100 nm) di assorbimento laser, costituito da metalli (come Au, Ti, Ag) o ossidi di metallo (TiO<sub>2</sub>), per proteggere le cellule dall'esposizione diretta al fascio e per consentirne il mantenimento in vita durante il trasferimento;

- Il substrato ricevente è montato su una base con motorizzazione triassiale, posizionata sotto al nastro ad una distanza compresa tra 700-2000  $\mu\text{m}$ . Questo substrato è rivestito solitamente con un biopolimero a bassa viscosità (ad esempio idrogel) scelto con cura per attuire l'impatto delle cellule, favorirne l'adesione e mantenere la struttura del costruito. [5]



**Fig. 2.2:** Laser Assisted Bioprinting

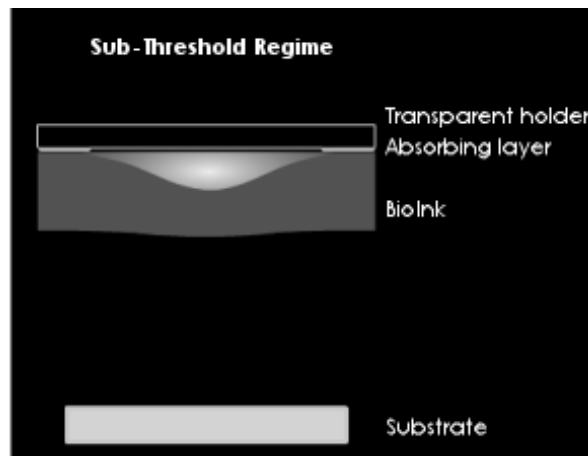
L'impulso laser viene focalizzato tramite lenti sul vetrino donatore, contenente le cellule sospese in gel, creando una bolla di vapore dalla cui formazione vengono generate onde d'urto che spingono le cellule verso il substrato ricevente.

La crescita e la successiva compressione della bolla dipendono dai seguenti fattori:

- intensità dell'energia laser (E);
- viscosità del bioink ( $\nu$ );
- tensione superficiale ( $\sigma$ );
- spessore del film di bioink ( $\epsilon$ );

Il termine critico  $\Gamma$  (E,  $\nu$ ,  $\sigma$ ,  $\epsilon$ ), funzione dei precedenti parametri, determina il regime di stampa:

- se  $\Gamma$  è maggiore di un valore soglia  $\Gamma_2$  l'espulsione della goccia di bioink non può verificarsi in quanto l'espansione della bolla è troppo debole per raggiungere la superficie libera. In questo caso si parla di *Sub-Threshold-Regime*; [Fig. 2.3]



**Fig. 2.3:** Sub-Threshold Regime

- se  $\Gamma$  è compreso tra  $\Gamma_1$  e  $\Gamma_2$  allora la bolla si espande per poi collassare, consentendo in questo modo la deposizione di una goccia di bioink. Questo è il caso del *Jetting-Regime*; [Fig. 2.4]



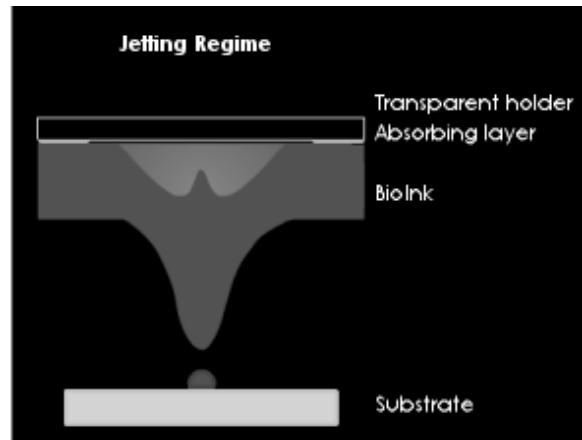


Fig. 2.4: Jetting Regime

- se  $\Gamma$  è inferiore di un valore soglia  $\Gamma_1$  l'espansione della bolla è così violenta da vincere la tensione superficiale del bioink, determinandone l'esplosione e la fuoriuscita di liquido sul substrato senza alcuna coerenza spaziale. In questo caso si parla di *Plume-Regime*; [Fig. 2.5]

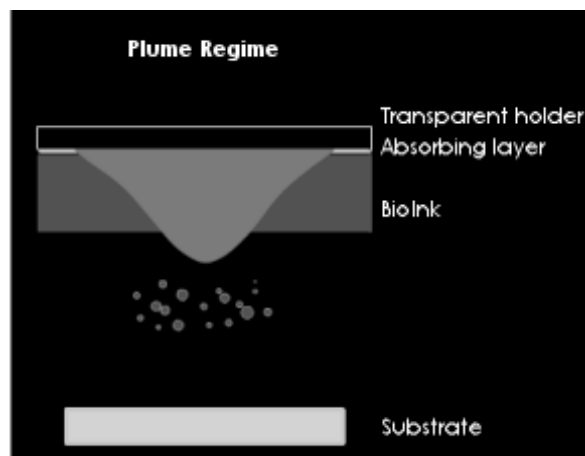


Fig. 2.5: Plume Regime

La scrittura di diversi tipi di cellule è possibile tramite una propulsione selettiva di cellule differenti dal vetrino donatore al substrato ricevente. La tecnologia di stampa laser, così come la tecnologia a getto d'inchiostro,

avviene contemporaneamente alla stampa del biopaper permettendo la realizzazione di costrutti di tessuto tridimensionali.

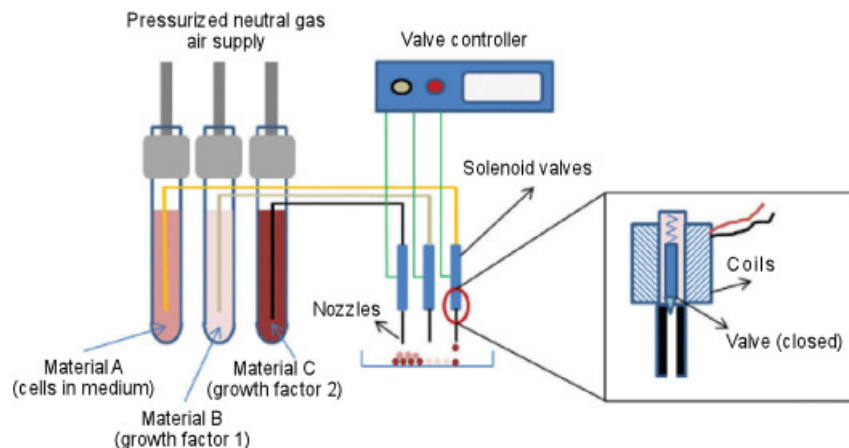
Quest'ultimi si ottengono tramite la scrittura laser eseguita congiuntamente con la foto-polimerizzazione dell'idrogel: le cellule vengono deposte secondo una schema preciso su un substrato ricevente mediante un fascio laser, e tale operazione è seguita dalla stampa di idrogel sulla cima della superficie di ciascuna cellula; il processo viene ripetuto per più cicli fino ad ottenere una struttura tridimensionale.

Al fine di poter lavorare con cellule viventi e biomateriali, la radiazione utilizzata non deve indurre alterazioni nel materiale biologico a causa della potenziale denaturazione del DNA da parte di radiazioni UV. Devono quindi essere tenute in considerazione durata, intensità e frequenza dell'impulso per non causare un eccessivo surriscaldamento cellulare, così come la qualità del fascio laser e delle lenti focali per contenerne la divergenza. [18]

### 2.2.3 SOLENOID VALVE BASED PRINTING

La stampa a valvole solenoidi utilizza valvole a comando elettromagnetico. Un sistema completo è costituito da un serbatoio di fluido, un dispositivo di erogazione basato su valvole solenoidi con volumi di bioink tra 1 nl e 5 pl, elementi riscaldanti per controllare la temperatura della testina dell'ugello, collegamenti al sistema di controllo ed una sorgente di gas inerte. Il funzionamento dell'elettrovalvola è assimilabile ad un rubinetto comandato elettricamente; è costituita da un dispositivo meccanico di apertura e chiusura molto simile ad una membrana, che viene alzato o abbassato permettendo o impedendo la fuoriuscita di bioinchiostro. Questa membrana è attuata da un solenoide che, percorso da corrente, genera un campo magnetico in grado di sollevare l'elemento meccanico occludente (tipicamente metallico), determinando quindi, l'apertura o la chiusura della valvola. Il sistema di controllo stabilisce frequenza e durata degli impulsi elettrici inviati permettendo quindi la stampa Drop-On-

Demand. In un sistema ad ugelli multipli possono essere stampati contemporaneamente molteplici materiali, ognuno prelevato dal rispettivo serbatoio, permettendo la realizzazione di un complesso costruito eterogeneo. Il sistema non comporta problematiche relative al surriscaldamento ed è in grado di accettare polimeri viscosi come collagene e 1-2% di alginato di sodio. [5]



**Fig. 2.6:** Solenoid Valve Based Bioprinting

### 2.3 CONFRONTO TRA LE TECNICHE DI STAMPA

I sistemi basati su scrittura laser hanno un'alta risoluzione con un errore che ricade nell'intorno di  $5.6 \pm 2.5 \mu\text{m}$  rispetto al modello digitale.

Questa risoluzione non può essere ottenuta con nessun'altra tecnica di Bioprinting, il che rende la stampa a laser ottima per tecniche micro cellulari di organi e tessuti come la micro vascolarizzazione. Tuttavia lo shock laser collegato alle deformazioni termiche e meccaniche indotte alle cellule e le interazioni dei componenti cellulari con le radiazioni emesse, rappresentano dei fattori di rischio per la vitalità del costruito stampato.

È necessario pertanto ottimizzare parametri quali:

- durata dell'impulso;

- lunghezza d'onda;
- velocità di ripetizione degli impulsi;
- energia e diametro della messa a fuoco del fascio laser;
- proprietà reologiche del bioink (tensione superficiale, viscosità);
- proprietà del substrato ricevente.

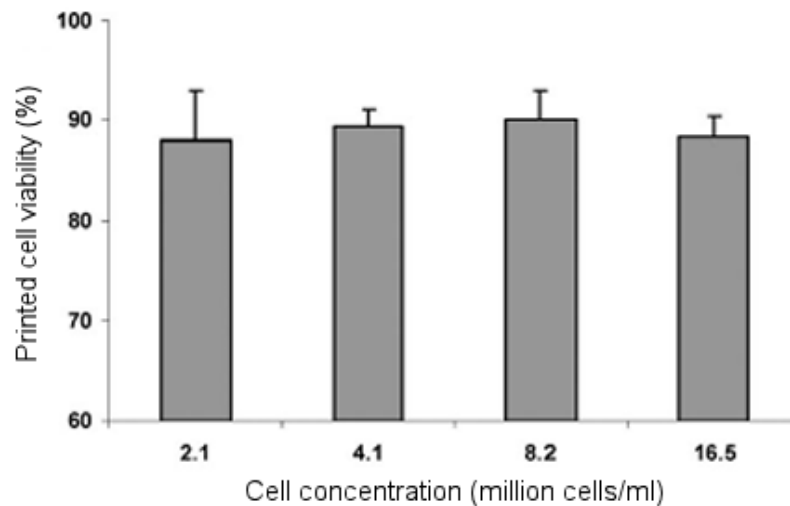
I sistemi a getto d'inchiostro ed a valvole solenoidi sono versatili ed a basso costo, favoriscono l'incapsulamento delle cellule ed inoltre, attraverso l'utilizzo di più testine di stampa, consentono una più semplice realizzazione di costrutti etero cellulari rispetto alla scrittura laser. Tuttavia tecnologie di questo tipo vanno incontro ad inconvenienti come sedimentazione e aggregazione cellulare nell'orifizio dell'ugello, con conseguente intasamento di quest'ultimo. Occorre pertanto che il processo di realizzazione del costrutto sia di breve durata, dato che il materiale sedimenta in condizioni statiche. Inoltre il diametro dell'ugello deve essere progettato adeguatamente al fine di non danneggiare la cellula durante la deposizione. In conclusione, quindi, i parametri da ottimizzare al fine di rendere questa tecnica funzionale sono il diametro dell'ugello, la viscosità del materiale biologico ed il tempo di erogazione del bioink.

## **2.4 CELL DAMAGE**

Lo scopo ultimo del processo di stampa è quello di realizzare tessuti "vitali", si deve quindi porre particolare attenzione agli aspetti che potrebbero provocare danni o morte delle cellule: variazioni di temperatura imposte dalle resistenze, ugelli troppo piccoli o eccessiva pressione nell'espulsione delle gocce.

In uno studio condotto dai ricercatori Xiaofeng Cui e Thomas Boland si è voluto dimostrare che rispettando i parametri ottimali, il bioprinting

consente di preservare la vitalità delle cellule e di non alterarne le proprietà, valutando due parametri: la cell viability e la media apoptotica. [9] Il primo è il rapporto tra il numero di cellule vive e la somma di cellule vive e morte. L'apoptosi invece, è definita come morte cellulare programmata e contribuisce al mantenimento del numero di cellule di un organismo; è dunque un processo che avviene normalmente nei nostri tessuti, ma lo scopo dello studio è valutare se il bioprinting possa alterarlo. Come tecnica di stampa si è scelta la stampa inkjet ad effetto termico. Dopo dodici ore dalla stampa le cellule vive sono state evidenziate usando un marcatore verde, mentre quelle morte con un marcatore rosso e sono state contate tramite microscopio calcolando così la cell viability. Il test è stato inoltre ripetuto con varie concentrazioni di cellule per trovare quella ideale: 8 milioni di cellule per mL, alla quale corrisponde una vitalità media pari all'89%. [FIG. 2.7]



**Fig. 2.7:** Cell viability a varie concentrazioni

La media apoptotica è calcolata invece dividendo il numero di cellule apoptotiche per il numero totale di cellule. I risultati mostrano che per le cellule sottoposte al processo di stampa la media è di  $3.5 \pm 1.3\%$  contro il

$3.2 \pm 1.6\%$  per quelle non sottoposte, evidenziando quindi una variazione minima.

Sono stati inoltre condotti dei test sul possibile danno della membrana: i pori che si venivano a creare nella membrana subito dopo la stampa, di diametro pari a  $105 \text{ \AA}$ , venivano richiusi in meno di due ore dalla cellula stessa. [FIG 2.8] Si è quindi verificata la sicurezza del processo di stampa, confermandone le potenzialità. [5, 9]

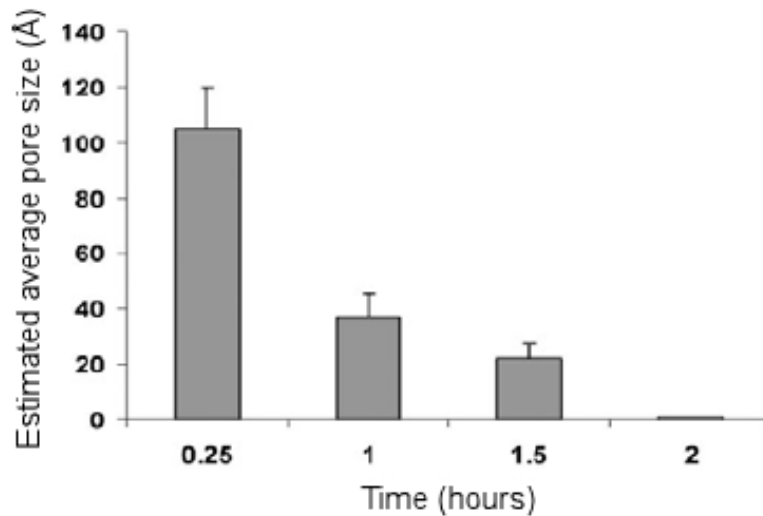


Fig. 2.8: Diametro dei pori sulla membrana cellulare in funzione del tempo

## 2.5 FATTORI LIMITANTI

Le potenzialità offerte dalle ultime scoperte di biologia cellulare sono molto promettenti nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti e del bioprinting tuttavia, si devono considerare anche dei fattori limitanti.

Oggi si sta cercando di ridefinire più propriamente come questi fattori influiscano sulla struttura e sulla funzione di cellule e tessuti, e si stanno apportando nuove strategie e tecniche basate sulle conoscenze disponibili nell'ambito delle colture cellulari e dei biomateriali utilizzati per supportare meccanicamente la componente cellulare. Nel seguito sono descritte queste particolarità del sistema in oggetto e sono delineate le

strategie necessarie per superare le difficoltà che insorgono nel tentativo di ricreare un tessuto biologico.

### 2.5.1 LA VASCOLARIZZAZIONE

La funzionalità di cellule e di tessuti impiantati in un organismo dipende in modo determinante dalla possibilità di essere adeguatamente ossigenati e di poter allontanare i prodotti di scarto del metabolismo. Questa funzione deve essere garantita sia durante la fase di crescita e maturazione in vitro che durante l'impianto e la successiva integrazione nell'organismo.

In vitro è possibile mantenere le cellule ad una pressione parziale di ossigeno elevata, vicina sostanzialmente a quella dell'aria nell'atmosfera.

L'utilizzo di cellule in monostrati piani facilita enormemente il trasporto dalle cellule al medium di coltura e viceversa. Tuttavia, quando si coltivano sistemi tridimensionali o quando le cellule sono impiantate in un organismo vivente sorgono difficoltà per garantire questa funzione. Nei sistemi tridimensionali in coltura si cerca di sopperire alla limitata diffusione dell'ossigeno e degli altri nutrienti con la perfusione del medium attraverso colture dinamiche, ma il trasporto di sostanze è comunque fortemente limitato. In vivo invece, si cerca di fare in modo che la presenza di arterie e capillari connessi in modo adeguato alla circolazione possano garantire una sufficiente perfusione del tessuto. Tuttavia, soprattutto nella fase iniziale, questa situazione non è di solito presente e si può sviluppare anossia e necrosi del tessuto appena impiantato.

Questi fattori hanno fino ad oggi limitato in modo importante le applicazioni caratterizzate da dimensioni geometriche che superino alcuni decimi di millimetro. Gli epiteli ed i tessuti con geometria piana sono stati quindi i primi ad essere studiati e sono stati penalizzati in misura minore da queste difficoltà.

Altri sistemi, costituiti da aggregati cellulari di dimensioni più consistenti non possono essere impiantati se non si predispone una sede

opportunamente vascolarizzata e la possibilità di formazione di nuovi vasi. Una condizione diversa è invece quella dell'impianto di tessuti a contatto con la parete vascolare, come le protesi vascolari o le valvole cardiache. In questo caso il contatto col sangue, sia arterioso che venoso, può garantire una adeguata ossigenazione. Nonostante ciò, sorgono proprio in questi casi altre difficoltà. La presenza del sangue aumenta infatti la possibilità di deposizione di elementi circolanti e la formazione di trombi. Per risolvere questo problema si sta cercando di utilizzare superfici a contatto col sangue che siano rivestite da cellule endoteliali del paziente.

Le difficoltà in questo caso sono legate alla reperibilità di queste cellule o dei loro progenitori, e alla capacità di farle resistere alla sollecitazione meccanica imposta dal moto del sangue. [4]

### 2.5.2 I FENOMENI DI TRASPORTO

In conseguenza delle considerazioni precedenti, appare evidente che la possibilità di impiantare un tessuto ingegnerizzato nell'organismo dipende dall'instaurarsi di trasporti di molecole guidati da processi diffusivi e convettivi. Mentre la diffusione può avvenire in tempi adeguati attraverso volumi di dimensioni limitate, è proprio il trasporto convettivo, garantito in condizioni fisiologiche dalla microcircolazione, che permette di far arrivare a tutte le cellule impiantate i nutrienti e di rimuovere i prodotti di scarto. Questi fenomeni sono molto complessi e dipendono dalle caratteristiche fisico-chimiche dei componenti in gioco: cellule, matrice extracellulare e scaffold. È quindi evidente che la sperimentazione e le relative applicazioni cliniche, vadano adeguatamente studiate anche da un punto di vista teorico, per identificare i fattori limitanti e mettere in atto le strategie che possano permettere di superarli. La struttura dei tessuti biologici a livello microscopico è molto differenziata proprio in funzione della necessità di garantire il trasporto di sostanze e di fornire una risposta adeguata alle sollecitazioni meccaniche a cui sono sottoposti. Queste specificità, insieme all'eterogeneità delle componenti cellulari, rendono



veramente difficile riprodurre in laboratorio tessuti biologici anche semplici. Si tenta quindi di garantire alla componente cellulare di base un adeguato supporto meccanico mediante l'utilizzo di scaffold micro strutturati, mentre la presenza di fattori di crescita e/o di differenziazione è garantita dalla composizione del medium di coltura. In questi sistemi diventa difficile poter instaurare movimenti convettivi e diffusivi, a causa della struttura tridimensionale del materiale e dell'assenza di un sistema efficiente di movimentazione dei liquidi come quello della microcircolazione. [4]

### 2.5.3 LA DIFFERENZIAZIONE CELLULARE

Un altro fattore importante nel tentativo di rigenerare i tessuti biologici è costituito dalla differenziazione cellulare. La possibilità di far crescere in laboratorio cellule differenziate di tessuti quali la cute, la cartilagine, la parete vascolare, etc. presuppone l'ottenimento di queste dal tessuto nativo, la loro espansione in coltura e la loro semina e crescita su uno scaffold. Come detto precedentemente ci sono almeno due possibilità a questo riguardo. La prima è quella di partire da cellule differenziate del paziente e indurre la loro proliferazione in vitro, la seconda è quella di partire da cellule progenitrici o staminali e di indurre un certo grado di differenziazione. A livello clinico si stanno tentando entrambe le alternative.

Nel primo caso le cellule così coltivate, a seconda delle condizioni fisiche e chimiche che sperimentano, vanno incontro ad un processo di de-differenziazione. Va quindi compreso nel dettaglio quali sono le trasformazioni del fenotipo cellulare durante la fase di preparazione in laboratorio ed il successivo adattamento una volta che esse vengono impiantate nell'organismo. Solo attraverso questo processo si potranno far avanzare le attuali possibilità di generare tessuti in laboratorio, migliorare le applicazioni cliniche esistenti e introdurre di nuove nella pratica clinica. Nel caso invece si utilizzino cellule progenitrici, o staminali, le

conoscenze dei meccanismi molecolari responsabili della loro differenziazione sono fondamentali, ma ancor meno note. Si devono infatti conoscere in modo approfondito i fattori in grado di indurre il differenziamento delle cellule utilizzate. È per questo che sono in corso numerose ricerche e da esse dipende la possibilità di sfruttare effettivamente nuove vie per la generazione di tessuti in laboratorio. Le ricerche in corso sulle cellule staminali stanno aprendo nuove prospettive a questo riguardo, anche se la strada da percorrere è ancora lunga e complessa prima di poter disporre di tessuti autologhi ingegnerizzati a partire da cellule staminali, siano esse adulte o embrionali. [4]

#### 2.5.4 LA REAZIONE DELL'ORGANISMO ALL'IMPIANTO DI CELLULE E TESSUTI

Tra le difficoltà che si sono incontrate nell'utilizzo di sostituti cellularizzati per l'impiego clinico c'è anche la risposta dell'organismo al materiale impiantato. Le reazioni messe in atto dall'organismo, in particolare dalle cellule circostanti l'impianto e da quelle circolanti, sono fondamentali per permettere la funzione dello stesso o per determinarne il deterioramento e la perdita di funzionalità. Il processo di adattamento del materiale cellulare impiantato, solitamente contenuto in uno scaffold, è caratterizzato da complessi fattori che determinano la reazione cellulare dell'organismo ricevente. Non si può pensare che il materiale impiantato sia passivamente accettato, in questo caso non sarebbe possibile ottenere la funzione desiderata. D'altra parte è noto che i tessuti del corpo umano sono continuamente vigilati dalle cellule del sistema immunitario per riconoscere agenti estranei come batteri, funghi e virus. La scelta di utilizzare cellule autologhe per ingegnerizzare tessuti destinati all'uso clinico garantisce una completa accettabilità delle componenti cellulari, ma non garantisce che l'impianto cellulare possa indurre attrazione cellulare e produzione di matrice extracellulare. È infatti comune assistere alla formazione di tessuto fibrotico attorno agli impianti di tessuti

ingegnerizzati. Questa reazione è solitamente generata dalla presenza del materiale dello scaffold o dalla matrice cellulare prodotta durante la maturazione del costrutto. Il tessuto fibrotico è generato e sostenuto dalla presenza di cellule infiammatorie e da fibroblasti. Per sviluppare strategie efficaci che limitino queste reazioni cellulari indesiderate devono essere ancora chiariti nel dettaglio alcuni meccanismi relativi alla reazione cellulare e umorale del sistema immunitario verso i biomateriali. [4]



## CAPITOLO 3

### 3.1 MATERIALI

Nel campo della bioingegneria e dell'ingegneria dei tessuti, oltre agli strumenti e alle tecniche utilizzate, sono di fondamentale importanza i materiali impiegati. I materiali tradizionali non sono adatti poiché, operando in ambito biologico, sono richieste caratteristiche peculiari: per questo motivo si utilizzano i biomateriali.

### 3.2 BIOMATERIALI

#### 3.2.1 DEFINIZIONE

Una prima definizione di biomateriale fu data durante la Consensus Development Conference on the Clinical Application of Biomaterials nel 1982 presso l'NHI (National Institute of Health, Bethesda, USA):

*“Ogni sostanza o combinazione di sostanze, diversa da un farmaco, di origine sintetica o naturale, che può essere impiegata per qualsiasi periodo di tempo, da sola o come parte di un sistema che tratta, aumenta o sostituisce un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo.” [3]*

Tale definizione è sicuramente troppo generica in quanto comprende tessuti e organi trapiantati, materiali utilizzati per la realizzazione di parti di apparecchiature biomediche che non vengono impiegate in diretto contatto con i tessuti del corpo umano, materiali impiegati per la realizzazione di dispositivi completamente extracorporei, anche non medici quali gli indumenti, ecc.

Nel 1986 durante una seconda Consensus Development Conference tenutasi a Chester la definizione di biomateriale è stata così modificata:

*“Una sostanza non vivente utilizzata nella fabbricazione di un dispositivo medico che ha in qualche punto un’interfaccia con un tessuto vivente.” [3]*

Non si fa più riferimento alla durata del contatto tra il materiale e il tessuto vivente dell’organismo ospite, ma si richiede che tale contatto avvenga affinché il materiale sia un biomateriale. Dalla definizione sono esclusi i materiali viventi quali gli organi trapiantati, ma inclusi i tessuti di origine biologica trattati e non più viventi.

Data l’eterogeneità e la vastità dei biomateriali è opportuno classificarli ad esempio basandosi su aspetti chimico strutturali; secondo tale classificazione è possibile raggruppare i diversi materiali in cinque categorie: metalli, polimeri, ceramici, compositi e materiali biologici.

Fra tutti, i materiali maggiormente impiegati nell’ingegneria dei tessuti sono i polimerici grazie alla loro maggior somiglianza con i tessuti corporei ed alla loro facilità di lavorazione. Sono impiegati in particolare nella costruzione di supporti (*scaffold*) dove vengono impiantate le cellule in attesa che si organizzino e si fondano tra loro creando così il tessuto voluto.

Con l’avvento del Bioprinting si sta cercando di sostituire i tradizionali biomateriali con materiali costituiti per lo più da cellule viventi. La comunità scientifica dovrà quindi accettare sempre più che questi “living tissue blocks” siano considerati biomateriali a tutti gli effetti, anche se esulano dalla tradizionale definizione. [3, 6, 8]

### 3.2.2 PROPRIETÀ DEI BIOMATERIALI

- **BIOCOMPATIBILITÀ:** La capacità di un materiale di determinare, da parte di un sistema vivente, una favorevole reazione alla sua presenza in una specifica applicazione. È il fattore discriminante tra un biomateriale ed un materiale;

- **BIODEGRADAZIONE:** Ogni materiale impiantato provoca una reazione da parte dell'organismo e viceversa subisce un attacco dallo stesso. I materiali possono essere divisi quindi in biostabili e biodegradabili. I primi resistono all'azione dell'ambiente biologico preservando le proprie caratteristiche; i secondi subiscono invece una progressiva demolizione o trasformazione chimica in conseguenza di specifiche azioni da parte dell'organismo. I residui provocati dalla degradazione del materiale stesso possono produrre reazioni infiammatorie indesiderate. I materiali polimerici sono generalmente biodegradabili;
  
- **BIOASSORBIMENTO :** I materiali biorassorbibili sono invece quei materiali che subiscono una progressiva degradazione a contatto con l'organismo. A differenza dei biodegradabili il riassorbimento è predeterminato e voluto. I materiali biorassorbibili che compongono l'impalcatura per la crescita del tessuto, devono avere un tempo di degradazione strettamente sincronizzato con quello di formazione del nuovo tessuto: il riassorbimento troppo rapido della matrice non permette la formazione di un tessuto completo e robusto, tempi troppo lunghi, al contrario, inducono la formazione di tessuto attorno allo scaffold in modo imperfetto o incompleto;
  
- **BIOATTIVITÀ:** La bioattività indica la capacità del materiale di indurre nell'organismo una specifica attività biologica. Questo tipo di materiali permette la formazione di legami biochimici e di interazioni dirette con il tessuto biologico, il quale può crescere liberamente sulla superficie. Tutto ciò permette l'instaurarsi di un solido legame, dal punto di vista meccanico, tra il tessuto naturale e l'impianto protesico. [1, 3]

### 3.3 BIOMATERIALI POLIMERICI

#### 3.3.1 BIOMATERIALI POLIMERICI SINTETICI

I materiali polimerici sintetici hanno due significativi vantaggi: possono essere industrialmente riprodotti su larga scala e permettono il controllo di alcuni parametri come peso molecolare, tempi di degradazione, forma e porosità della struttura. Lo svantaggio principale è invece dovuto alla mancanza di segnali per consentirne il riconoscimento cellulare.

I materiali polimerici per uso biomedico differiscono dagli stessi materiali impiegati per applicazioni tradizionali in quanto devono contenere quantità molto limitate di additivi e residui monomerici che potrebbero essere rilasciati nei tessuti.

I biomateriali più utilizzati nell'ingegneria dei tessuti sono poliesteri degradabili, in particolare *acido polilattico* (PLA) e *acido poliglicolico* (PGA). Il successo è stato determinato principalmente dal fatto di essere noti e approvati per l'impiego nella produzione di fili di sutura e sistemi per il rilascio controllato di farmaci.

L'*acido poliglicolico* è un poliestere termoplastico rigido ad elevata cristallinità (circa 50%), caratterizzato da un elevato punto di fusione (225°C). L'interesse per questo tipo di poliestere deriva dal fatto che i prodotti della degradazione sono metaboliti naturali. La scissione idrolitica del legame estere porta alla formazione di acido glicolico, che può quindi essere degradato a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, analogamente a quanto avviene per l'acido polilattico, o seguire un diverso percorso che prevede l'ossidazione enzimatica a gliossilato e successiva conversione in glicina mediante l'azione della glicina transaminasi.

A causa della sua natura idrofilica, il PGA tende a perdere la sua resistenza meccanica rapidamente, il 50% in due settimane, e viene riassorbito circa 4 settimane dopo l'impianto.

Come il PGA, anche l'*acido polilattico* (PLA) è un poliestere termoplastico, la cui degradazione idrolitica porta alla formazione di acido

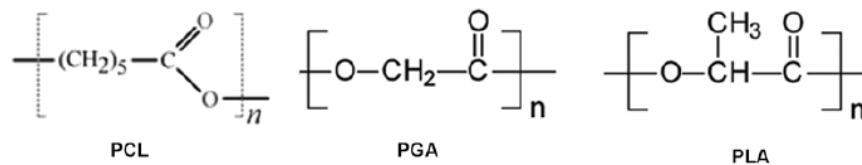


lattico, un metabolita naturale. L'isomero L dell'acido lattico viene preferenzialmente metabolizzato nel corpo umano.

La minore idrofilicità dell'acido polilattico rispetto all'acido poliglicolico ne determina una idrolisi più lenta.

Sia il PGA che il PLA sono stati impiegati anche nella fabbricazione di chiodi, viti e placche per impianti ortopedici dove, invece di essere rimossi quando hanno esaurito la loro funzione stabilizzante, vengono riassorbiti ed eliminati dall'organismo ospite.

Il *policaprolattone* (PCL) è un poliestere semicristallino sintetico biodegradabile. Essendo dotato di buone caratteristiche di biocompatibilità e di un'elevata stabilità termica, ha ricevuto una particolare attenzione per la realizzazione di dispositivi impiantabili. In particolare, è utilizzato per la realizzazione di impianti di lunga durata dato che la degradazione del PCL è molto più lenta rispetto a PGA e PLA ed è dell'ordine di 2-3 anni. [2, 5]



**Fig. 3.1:** Struttura chimica PCL, PGA e PLA

### 3.3.2 BIOMATERIALI POLIMERICI NATURALI

I biomateriali di origine naturale, quali proteine e polisaccaridi, rappresentano un'alternativa all'impiego dei materiali sintetici. Il vantaggio principale rispetto ai biomateriali sintetici è l'ottenimento da fonti naturali con il conseguente mantenimento delle specifiche funzioni quali il riconoscimento cellulare.

La tecnica più diffusa consiste nel prelevare tali materiali da tessuti umani o animali che, però, non sono disponibili in grandi quantità e possono

essere veicolo di agenti patogeni. Sono quindi necessari processi di purificazione, mediante metodologie chimiche e biochimiche, che potrebbero però indurre modificazioni strutturali del materiale stesso.

[2, 5]

### 3.3.2.1 BIOMATERIALI POLIMERICI NATURALI A STRUTTURA PROTEICA

Il *collagene* è la componente principale della matrice extracellulare e rappresenta la proteina più abbondante nei mammiferi: circa il 25% della massa proteica totale e nell'uomo, circa il 6% del peso corporeo.

Ne esistono di diversi tipi e nei tessuti dei mammiferi formano fibre che si trovano nella pelle, nei tendini, nelle ossa, nelle cartilagini e nei tessuti cardiovascolari. Le fibre di collagene hanno lo scopo di limitare le deformazioni dei tessuti e di prevenirne le rotture meccaniche.

La struttura base del collagene è costituita da tre amminoacidi fondamentali, glicina (GLY), prolina (PRO), idrossiprolina (HYP), più un quarto amminoacido. Questi amminoacidi sono arrangiati in una sequenza tipica GLY, PRO, HYP, GLY, altro amminoacido. I polimeri lineari di collagene interagiscono tra loro sotto forma di tripla elica.

Le triple eliche del collagene sono unite da legami a idrogeno e da veri e propri legami (cross-links) fra le eliche. Si formano pertanto fibrille di collagene e queste ultime formano a loro volta fibre di diametro pari a 0.2-1.2  $\mu\text{m}$ . La particolare struttura delle fibre di collagene è responsabile del suo comportamento meccanico, infatti, sottoposte a trazione le fibre ruotano e si flettono modificando la loro geometria spaziale dalla forma elicoidale a quella lineare. Quando le catene proteiche sono distese le proprietà meccaniche aumentano diventando dipendenti dai legami intra ed intermolecolari.

Il collagene è inoltre molto stabile chimicamente e viene utilizzato come supporto per la rigenerazione dei tessuti poiché agevola la proliferazione e

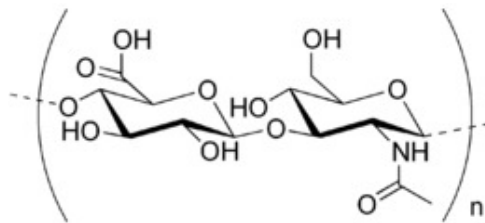
il metabolismo cellulare tuttavia, è difficile regolarne la biodegradabilità e le proprietà meccaniche. [2, 3, 5]

### 3.3.2.2 BIOMATERIALI POLIMERICI NATURALI A STRUTTURA POLISACCARIDICA

L'*acido ialuronico* è un polisaccaride ad altissimo peso molecolare appartenente alla famiglia dei glicosamminoglicani. Ha una struttura lineare formata da unità ripetute di acido D-glucuronico e N-acetil glucosammina.

È presente nella matrice extracellulare di tutti i tessuti molli (cartilagine, pelle, tendini, ...) con un ruolo importante nell'idratazione dei tessuti, nella diffusione dei nutrienti e nella differenziazione cellulare.

I gruppi reattivi -OH e -NHCOCH<sub>3</sub> determinano le proprietà specifiche dell'acido ialuronico e forniscono siti di reticolazione per la formazione di idrogel. Come biomateriale per l'ingegneria dei tessuti viene impiegato per la rigenerazione del derma, dell'epidermide e della cartilagine.

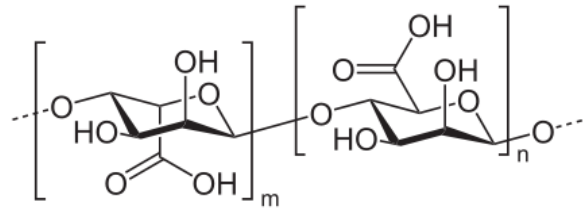


**Fig. 3.2:** Struttura chimica acido ialuronico

L'*alginato* è un polimero naturale derivato dalla parete cellulare di svariate alghe, costituito da unità di acido mannuronico e acido glucuronico, in proporzione variabile a seconda delle fonti vegetali.

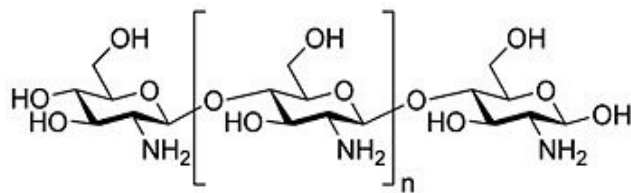
Può essere reticolato e formare gel ad alto assorbimento di acqua con cationi polivalenti che, in condizioni fisiologiche, formano ponti ionici tra

le catene polimeriche. Ha una vasta gamma di applicazioni mediche specialmente nella stabilizzazione e nel trasporto di fattori chimici e nell'incapsulamento di cellule.



**Fig. 3.3:** Struttura chimica alginato

Il *chitosano* è un polisaccaride cationico caratterizzato da un'unità monosaccaridica che lo rende strutturalmente simile ai glicosamminoglicani, la N-acetilglucosammina. Può essere degradato da enzimi quali lisozima. Tuttavia la sua solubilità in ambiente acido ne limita la lavorabilità e pertanto viene modificato per renderlo solubile in acqua. È stato dimostrato che derivati del chitosano sono in grado di ricreare un microambiente favorevole alla crescita cellulare. [2, 5]



**Fig. 3.4:** Struttura chimica chitosano

### **3.4 BIOINK**

Il bioink è il materiale utilizzato nella procedura di stampa, allo stato semiliquido, formato da una parte cellulare e da elementi di complemento. Seguendo l'analogia con la stampa tradizionale, viene definito bioink in quanto le gocce di materiale biologico, dopo essere state deposte, fondono tra loro così come le comuni gocce d'inchiostro.

Nella preparazione del bioink si possono utilizzare cellule differenziate del paziente oppure cellule staminali. Nel primo caso le cellule differenziate sono cellule specializzate che presentano un fenotipo ben definito e stabile nel tempo. Sebbene da un lato l'utilizzo di cellule prelevate direttamente dal paziente rappresenti una soluzione al problema del rigetto post-impianto, dall'altro lato si deve considerare che potrebbero essere trasportatrici di agenti patogeni e che la capacità proliferativa delle cellule differenziate dei tessuti adulti, diminuisce con l'età.

La seconda possibilità riguarda l'utilizzo di cellule staminali indifferenziate e comporta la conoscenza adeguata e approfondita dei fattori in grado di indurre la differenziazione delle cellule utilizzate. Le cellule staminali sono in grado di differenziarsi in vitro (cioè in determinate condizioni di coltura sterile in laboratorio) ed in vivo (nell'animale da esperimento e nell'uomo) in tessuti tra loro molto diversi (tessuto adiposo, osseo, cartilagineo, tendineo, muscolare scheletrico e cardiaco, neuroni, cellule epatiche o polmonari, ecc.): hanno quindi una particolare proprietà detta pluripotenza.

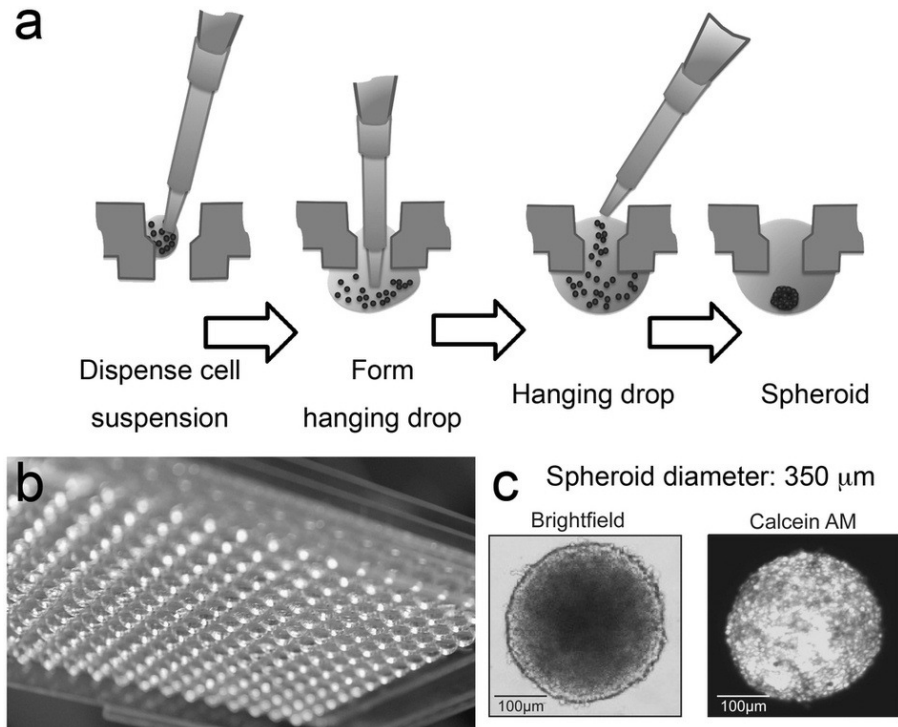
Tuttavia, affinché sia possibile indurre la differenziazione di tali cellule in cellule specifiche per il costrutto di tessuto desiderato, è necessaria l'aggiunta di fattori di crescita che possono presentare comportamenti indesiderati nell'organismo in seguito all'impianto.

### 3.4.1 PREPARAZIONE DEL BIOINK

Gli sferoidi possono essere ottenuti con diverse tecniche finalizzate all'aggregazione delle cellule attraverso la promozione dell'adesione cellulare. Una strategia introdotta ormai da decenni ma ancora diffusa prevede la continua agitazione della sospensione cellulare all'interno di "*spinner flasks*", in tal modo si formano spontaneamente aggregati sferici e si previene l'adesione ad altri substrati. Un sistema simile alle colture in spinner flasks utilizza agitatori circolari o tubi rotanti, che mantengono le cellule in sospensione grazie alla microgravità.

Una tecnica alternativa è il metodo "*hanging drops*" (gocce sospese), che rappresenta una valida variante per la produzione di sferoidi, in quanto è un metodo semplice, che può essere utilizzato con diverse linee cellulari e permette la produzione di sferoidi compatti e di dimensioni omogenee.

Il metodo prevede la deposizione di un piccolo volume di cellule (20-40µl) nel coperchio di una capsula di Petri oppure di una piastra a pozzetti. Su inversione del coperchio, la goccia viene tenuta in posizione dalla tensione superficiale del mezzo di coltura cellulare. In questo modo si forma una "goccia pendente" e le cellule, spinte verso il fondo della goccia dalla forza di gravità, sono indotte ad aggregarsi. Il volume della goccia sospesa deve rimanere al di sotto di un valore di soglia (tipicamente 50µl) affinché la tensione superficiale sia sufficiente per la ritenzione della goccia. È possibile modificare la dimensione dello sferoide che si viene a formare semplicemente variando il numero di cellule presenti in sospensione. [10]



**Fig. 3.5:** (a) Meccanismo di formazione Hanging Drops; (b) piastra a pozzetti; (c) sferoide multicellulare

### 3.4.2 VANTAGGI E CRITICITÀ NELL'UTILIZZO DI SFEROIDI

La possibilità di stampare aggregati cellulari sotto forma di sferoidi ha permesso un notevole sviluppo della tecnica del Bioprinting, mettendone in risalto potenzialità e vantaggi.

Innanzitutto il sistema permette la formazione di aggregati fisiologicamente più simili alla realtà, mimando la struttura dei tessuti in maniera più realistica ed efficiente: la naturale aggregazione delle cellule permette lo sviluppo di una rete di connessioni cellula-cellula e cellula-matrice che regola i meccanismi di crescita e differenziamento.

Risulta inoltre migliorata la vitalità cellulare post-stampa, infatti, dato che gli sferoidi sono costituiti da più cellule, la loro densità è maggiore e maggiore è la resistenza a stress meccanici e termici derivanti dalla stampa. L'elevata densità cellulare permette anche di ridurre al minimo i tempi di

stampa, dato che ogni singola goccia di bioink contiene un elevato numero di cellule.

Tuttavia è bene sottolineare che questo aspetto implica anche problematiche relative al dimensionamento degli sferoidi. Infatti la loro dimensione viene considerata come la risoluzione della tecnologia di fabbricazione, che quindi non deve limitare la realizzazione di costrutti su scala ridotta. Allo stesso tempo essi devono essere disponibili per le varie tecnologie di stampa, quindi è necessaria una standardizzazione delle dimensioni degli sferoidi in modo tale da evitare problemi di occlusione degli ugelli e ostruzione. Infine gli sferoidi di tessuto consentono di ridurre al minimo l'utilizzo di biomateriali, riducendo le complicanze correlate alla degradazione ed ai prodotti di scarto che ne derivano.

### **3.5 SCAFFOLD**

Uno scaffold può essere definito come un substrato in grado di fornire supporto all'attività cellulare senza indurre fenomeni avversi di tipo locale o sistemico. Il ruolo dello scaffold è quello di fornire un substrato per l'adesione cellulare garantendo nel contempo un supporto meccanico nelle fasi iniziali del processo rigenerativo.

I requisiti variano a seconda del tipo di tessuto da rigenerare e sono strettamente dipendenti dal tipo di biomateriale. La forma fisica può essere tridimensionale, con pori interconnessi, bidimensionale (ad esempio per la rigenerazione dell'epidermide) o tubulare (rigenerazione delle terminazioni nervose). La porosità, la forma dei pori e l'interconnessione tra di essi sono caratteristiche fondamentali e dipendenti dal tipo di cellula. Una elevata porosità con pori interconnessi favorisce l'alloggiamento di un adeguato numero di cellule, il contatto intercellulare, e lo scambio di sostanze da e verso l'ambiente esterno.

Sono state appositamente sviluppate diverse tecnologie di produzione per scaffold porosi, ma la loro applicabilità può essere in alcuni casi strettamente limitata dal tipo di materiale da impiegare. La progettazione



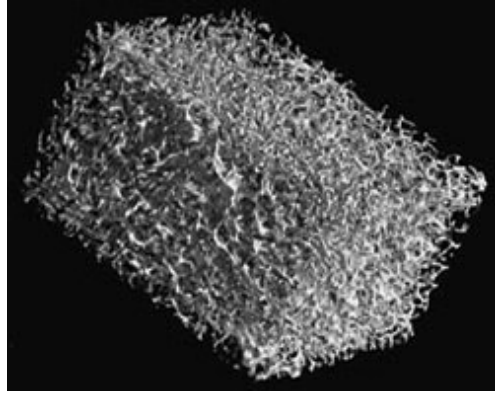
di materiali per questa specifica applicazione non può essere svincolata dalla possibilità di impiegare processi di lavorazione per l'ottenimento di forme specifiche con caratteristiche di porosità controllata.

Le proprietà meccaniche, strettamente dipendenti dal tipo e dalle caratteristiche strutturali dei materiali, hanno un effetto che va ben oltre il semplice mantenimento dell'integrità meccanica durante le prime fasi della rigenerazione. È stato recentemente dimostrato, infatti, che il microambiente meccanico ha effetti sull'adesione, sulla differenziazione e sull'evoluzione verso fenotipi patologici, regolando la complessa funzionalità cellulare. In senso più generale, le cellule sono sensibili alla rigidità dei substrati e della matrice extracellulare in condizioni fisiologiche. La produzione di biomateriali per la medicina rigenerativa deve tener conto anche della necessità di ricreare il microambiente meccanico favorevole alla risposta cellulare desiderata.

I biomateriali impiegati per la produzione di scaffold sono generalmente materiali degradabili nell'ambiente fisiologico, con meccanismi di degradazione di massa o di superficie. Poiché le cinetiche di rigenerazione dei tessuti sono assai variabili a seconda della specificità di ciascun paziente, una delle maggiori difficoltà nel progettare un biomateriale per uno scaffold risiede nella necessità di controllare i tempi di degradazione in funzione della rigenerazione del tessuto. Una degradazione precoce determina il venir meno del supporto meccanico necessario, mentre un degradazione troppo lenta potrebbe ostacolare i processi rigenerativi.

I prodotti di degradazione non devono inoltre scatenare meccanismi di difesa a livello locale o sistemico, quale una eccessiva risposta infiammatoria, e devono poter essere eliminati.

I biomateriali impiegati nell'ingegneria dei tessuti sono per lo più biomateriali polimerici, grazie alla loro facilità di lavorazione, la possibilità di degradarsi e la capacità di adattarsi al sito d'impianto. Tuttavia, anche i materiali ceramici e compositi sono largamente rappresentati come possibili substrati, specialmente per quanto riguarda la rigenerazione ossea. [2, 5, 13]



**Fig. 3.6:** Esempio di scaffold tradizionale

Gli sforzi della comunità scientifica si stanno indirizzando sempre più, anche grazie alla tecnica del Bioprinting, verso un approccio *bottom up* nella realizzazione di nuovi organi e tessuti, emulando il modello naturale. Questo procedimento prevede un impiego sempre più ridotto di scaffold tradizionali (*solid scaffold free*), a vantaggio di impalcature temporanee e riassorbibili dette *Biopaper* con la prospettiva futura di implementare una tecnica completamente scaffold free. [6]

### 3.5.1 UNA NUOVA CONCEZIONE DI SCAFFOLD: IL BIOPAPER

Il biopaper rappresenta il supporto dove deporre strato su strato il bioink; nell'analogia con la stampa tradizionale rappresenta il foglio su cui stampare. È su questo substrato che gli sferoidi, dopo essere stati depositati, si fondono, moltiplicano e organizzano fino a formare il tessuto o il costrutto desiderato.

Tuttavia non rappresenta una semplice base di appoggio in quanto, affinché possano avvenire i processi cellulari di differenziazione, auto-assemblaggio e maturazione, deve fornire un continuo e costante apporto di sostanze nutritive e ossigeno alle cellule, simulando il più fedelmente possibile l'ambiente cellulare naturale.

Contrariamente agli approcci tradizionali di ingegneria dei tessuti in cui gli scaffold rappresentano impalcature preformate e successivamente seminate con le cellule, il biopaper viene stampato contemporaneamente al bioink tramite due differenti testine di stampa.

Dal punto di vista strutturale solitamente è composto da idrogel, si presenta in forma liquida, ma dopo essere stato deposto tramite lo stesso procedimento del bioink, passa a una consistenza solida-gelatinosa.

Una volta terminato il processo di fusione degli aggregati cellulari in seguito alla stampa, il biopaper si degrada lasciando intatta la struttura neo formata, oppure viene rimosso manualmente.

### 3.5.2 IDROGEL COME BIOPAPER

Gli idrogel sono particolarmente utilizzati nella realizzazione di biopaper a causa del loro alto contenuto di acqua. Sono strutture macromolecolari tridimensionali, costituite da catene polimeriche idrofile, interconnesse tramite interazione chimica o fisica.

Il processo di reticolazione del polimero in soluzione, che porta alla formazione dei pori e alla formazione dell'idrogel vero e proprio può avvenire spontaneamente o essere forzato.

Idrogel formati da legami chimici, quali legami covalenti, vengono ottenuti usando varie metodologie come reazioni indotte da reagenti chimici, irraggiamento gamma e irraggiamento ultravioletto, che garantiscono brevi tempi di reticolazione e risultano convenienti conferendo all'idrogel ottime proprietà meccaniche.

D'altra parte negli idrogel formati attraverso interazioni fisiche (ad esempio legami ad idrogeno o forze ioniche) la reticolazione viene innescata regolando parametri come pressione, temperatura e volume.

La differente struttura ne determina comportamenti diversi in acqua: gli idrogel a interazioni fisiche, sprovvisti di legami forti tra catene, in acqua diventano solubili, quelli a legami chimici sono invece insolubili a causa dei legami covalenti.

L'alto contenuto di acqua determina la possibilità di inglobare un soluto; questa proprietà, combinata con la somiglianza ai tessuti molli e alle caratteristiche della matrice extracellulare in genere, li rende substrati con notevoli potenzialità applicative nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti. Gli idrogel rappresentano quindi "scaffold" non tradizionali, temporanei e riassorbibili, in cui le cellule possono venire inglobate nel gel, che deve fornire supporto all'attività cellulare. [5, 7]

#### 3.5.2.1 IDROGEL NATURALI

Idrogel naturali sono largamente utilizzati nel bioprinting poiché solitamente contengono già specifiche regioni bioattive, che conferiscono loro una buona compatibilità con le cellule di interesse. Sono generalmente biodegradabili e possiedono proprietà meccaniche simili a quelle della ECM naturale della cellula. Proprio per questo motivo sono i costituenti principali del biopaper che si propone di riprodurre il più fedelmente possibile l'ambiente cellulare. Tuttavia, possono presentare problemi di immunogenicità ed instabilità rispetto ai loro omologhi sintetici. Tra i polimeri naturali da cui si possono ricavare idrogel ci sono l'alginato, il chitosano, il collagene, la fibrina e l'acido ialuronico (HA).

#### 3.5.2.2 IDROGEL COMPOSITI

Alcuni gruppi di ricerca hanno integrato materiali termoplastici rigidi, come policaprolattone (PCL) e polilattico-co-glicolico (PLGA), con idrogel per aumentare la resistenza meccanica dei costrutti e garantire una migliore fedeltà nella riproduzione della forma desiderata.

In questo modo si otterrà una microstruttura altamente porosa e della geometria richiesta, con la possibilità di controllare tasso di degradazione ed effetti citotossici, dato che i materiali sono sintetici.

Le condizioni necessarie per trattare PCL termoplastico e PLGA sono però sfavorevoli per le cellule, quindi la maggior parte dei sistemi di bioprinting comprende un sistema di distribuzione di materiali termoplastici ed uno di erogazione per idrogel e cellule.

### 3.5.3 CONCLUSIONI SUL BIOPAPER

Lo sviluppo di materiali specifici per il bioprinting è ancora agli albori, tanto che la maggior parte dei biomateriali utilizzati per questa tecnologia corrisponde con quelli utilizzati in ingegneria dei tessuti.

Molti di questi mancano di alcuni requisiti fondamentali per il bioprinting, come la capacità di gelificare velocemente, la resistenza meccanica o la compatibilità con il processo di stampa.

Gli idrogel ideali devono avere buona porosità e granulometria, bassa quantità di monomeri residui e contenuti solubili, stabilità durante la coltura ed il mantenimento delle cellule, elevata degradabilità senza formare residui chimici tossici.

Gli idrogel sono i materiali ad oggi maggiormente utilizzati come biopaper, sebbene rappresentino ancora un aspetto da migliorare e potenziare per rispettare i criteri indicati e rendere la tecnica ancora più funzionale. [5, 7]

## 3.6 BIOREATTORE

### 3.6.1 DEFINIZIONE E FUNZIONI

I bioreattori sono definiti come segue:

*“dispositivi in cui i processi biologici e/o biochimici si sviluppano in un ambiente e in condizioni operative altamente monitorati e controllati”*

Il processo di fusione, differenziazione e assemblaggio degli sferoidi tessutali è realizzato, quindi, in appropriati ambienti che trasmettono stimoli precisi al costrutto in formazione. Tramite lo sviluppo di specifiche strategie di coltura si cerca di fare ottenere al costrutto densità cellulari paragonabili a quelle naturali.

Le funzioni svolte dal bioreattore sono le seguenti:

- Promuove il trasporto di sostanze nutritive alle cellule e garantisce la rimozione di prodotti tossici o inibitori del metabolismo cellulare. In ambiente fisiologico questi fenomeni sono effettuati dal flusso sanguigno attraverso i vasi, ma la mancanza di vascolarizzazione, almeno in una prima fase, fa sì che tale compito debba essere svolto da un bioreattore tramite flussi fluidi a perfusione.
- Stimola il costrutto attraverso sollecitazioni di tipo meccanico o elettrico, che possono essere tradotte in segnali biochimici all'interno delle cellule. Tali sollecitazioni passano infatti tramite le integrine (proteine di membrana) e, una volta giunte al citoscheletro vengono trasdotte al nucleo, innescando l'inibizione o l'espressione di particolari geni.
- Regola e controlla dinamicamente parametri di coltura quali temperatura, pH, concentrazione di gas, ioni inorganici e carboidrati disciolti in coltura.

Concludendo, attraverso tali azioni il bioreattore si propone di mantenere in vita il costrutto in formazione e allo stesso tempo di consentirne la crescita, al fine di raggiungere caratteristiche il più possibilmente simili a quelle del tessuto originale.

## CAPITOLO 4

### 4.1 VASI SANGUIGNI

Nel campo dell'ingegneria dei tessuti uno dei settori in più rapida evoluzione è la rigenerazione dei vasi sanguigni, dove si concentrano gli sviluppi di tecnologie e metodi per favorire la crescita di nuovi vasi (angiogenesi) e la riparazione o sostituzione di quelli nativi.

La particolare importanza di questo campo di applicazione è dovuta al fatto che le malattie cardiovascolari rappresentano una delle principali cause di morte. Negli anni recenti ci sono stati progressi significativi nel trattamento di malattie cardiache e cardiovascolari, tuttavia l'uso di materiali sintetici è ancora critico a causa di complicazioni associate al loro utilizzo, quali occlusioni progressive ed aumento di eventi trombo embolici.

#### 4.1.1 STRUTTURA E FUNZIONI

I vasi sanguigni sono costituiti da tre strati: tonaca intima, tonaca media e tonaca avventizia; questi sono organizzati in strati concentrici dall'interno verso l'esterno e sono caratterizzati da differenti cellule e componenti matriciali.

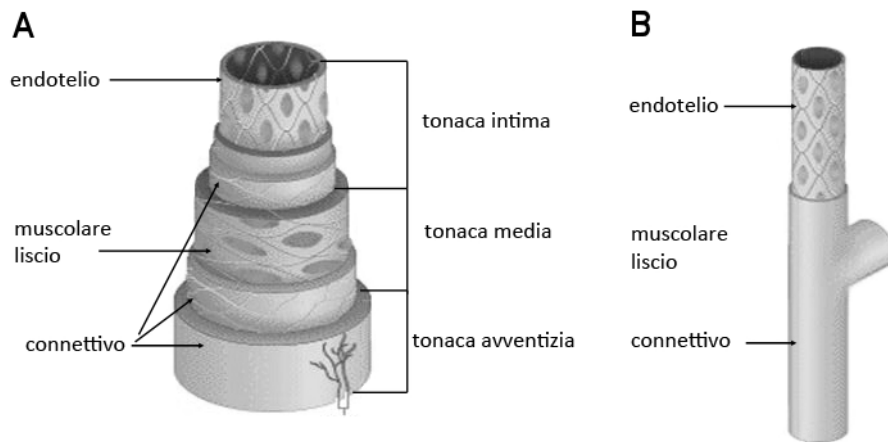
La tonaca intima è costituita da un sottile strato di cellule endoteliali, direttamente in contatto con il sangue che scorre nel vaso e da un sottile strato sub-endoteliale contenente fibre di collagene. Queste cellule sono fondamentali per il controllo dell'emostasi e nel mantenimento della pervietà del vaso, forniscono uno strato selettivamente permeabile ed allo stesso tempo regolano l'adesione e l'aggregazione di leucociti e piastrine.

Lo strato intermedio, o tonaca media, è caratterizzato dalla presenza di cellule muscolari lisce e generalmente costituisce lo strato più spesso della parete. Queste cellule sono organizzate concentricamente e controllano la vasocostrizione e la vasodilatazione. Fra l'intima e la media è interposta

una lamina elastica costituita da fibre di elastina. Lo strato più esterno, o tonaca avventizia, può avere lo stesso spessore della media ed è composto da fasci di fibre di collagene in direzione longitudinale e da fibre di elastina. Tutti e tre gli strati cooperano per controllare e modulare le proprietà fisiche e biologiche del vaso sanguigno. La struttura dei capillari è invece più semplice: le pareti non hanno fibre muscolari, ma sono costituite da un singolo strato di cellule endoteliali piatte che poggiano sulla membrana basale.

Per il successo di un impianto vascolare è quindi fondamentale sviluppare metodi che siano in grado di riprodurre la natura eterogenea del sistema vascolare sia dal punto di vista morfologico che da quello funzionale.

Il sistema vascolare è un ambiente molto dinamico: in media il cuore di un adulto pompa 5 litri di sangue al minuto in tutto il corpo, organi e tessuti diversi ricevono flussi differenti a seconda delle loro esigenze nutrizionali. Questi livelli possono inoltre variare dinamicamente, in base ad attività quali la digestione, lo sforzo fisico e le attività del metabolismo basale. Ciò determina un insieme di condizioni in continua variazione e, come risultato, qualsiasi impianto deve essere in grado di sopravvivere in un ampio range di condizioni. [3, 5, 11]



**Fig. 4.1:** Struttura vasi sanguigni (A) e capillari (B)



#### 4.1.2 IMPORTANZA DEI VASI SANGUIGNI

Un aspetto critico nel progresso del Bioprinting è lo sviluppo di tessuti vascolarizzati. Una vascolarizzazione efficiente consentirebbe l'impianto del tessuto, oltre a fornire una via necessaria per lo scambio di nutrienti e rifiuti. Il sistema circolatorio è il mezzo tramite il quale il corpo mantiene l'omeostasi, trasporta le sostanze nutritive, rimuove i rifiuti metabolici e fornisce segnali chimici. È particolarmente importante che costrutti 3D di tessuto ingegnerizzato prevedano in fase di progettazione anche un sistema di vascolarizzazione.

Non appena il tessuto supera spessori di 150-200  $\mu\text{m}$ , subentra infatti il problema di rifornire le cellule di ossigeno e nutrienti. È fondamentale quindi ricreare un sistema completo e capillare di vasi e microvasi che irrorino il tessuto in formazione, così da sostenerlo nella crescita.

In questo senso sono già stati fatti dei passi in avanti creando scaffold con canali per la diffusione di fattori di crescita e altre sostanze, ma il modello da perseguire è quello che prevede la formazione di vasi il più possibile simili a quelli naturali e con analoghe proprietà meccaniche e fisiche.

#### 4.1.3 PROBLEMI RELATIVI ALL'UTILIZZO DI SCAFFOLD

L'utilizzo di scaffold, ampiamente previsto in numerose tecniche, può però presentare svantaggi nella realizzazione di particolari tessuti.

Come dimostrato nell'ingegnerizzazione di tessuto miocardico, è necessaria un'elevata densità cellulare per assicurare il sincronismo del battito. Il segnale di sincronismo passa tramite le *gap junctions* che uniscono le cellule adiacenti e più queste sono vicine tra loro, più il segnale passa velocemente e senza dispersioni. L'uso di uno scaffold riduce invece l'interconnessione cellula-cellula, non permettendo una pulsazione perfettamente sincrona delle cellule cardiache e comporta una deposizione inadeguata dei componenti della matrice extracellulare (ECM). Altre criticità risiedono nelle proprietà meccaniche dello scaffold,

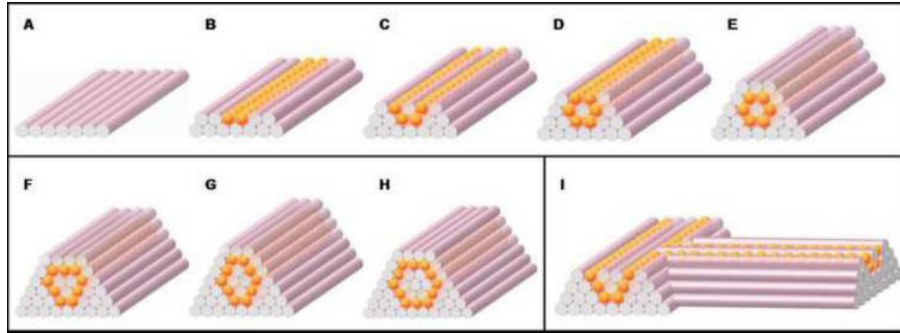
spesso realizzato da idrogel la cui intrinseca debolezza incide sulla resistenza finale del vaso, e nei residui di materiali biodegradabili che potrebbero intralciare la normale formazione delle pareti dei vasi o influenzare il fenotipo delle cellule muscolari lisce (SMC: smooth muscle cells) che ricoprono la parete interna. [11]

#### 4.1.4 BIOPRINTING DI VASI SANGUIGNI

L'estrusione meccanica è un altro metodo per realizzare costrutti 3D con cellule incorporate. Bioink multicellulare e biopaper vengono stampati contemporaneamente in precise posizioni, seguendo il modello digitale desiderato. In questo approccio vengono depositati in maniera alternata sferoidi ed un materiale di complemento: l'agarosio, polisaccaride purificato dall'agar-agar, una sostanza gelatinosa isolata a sua volta a partire dalle alghe. L'agarosio liquido (temperatura superiore ai 400°C) viene caricato in micro pipette, le quali poi immerse in un ambiente freddo (40°C) determinano la gelificazione del materiale.

Le aste di agarosio stampate, vengono utilizzate come matrice per il bioink e come riempitivo degli spazi che andranno a costituire il lume del vaso; terminata la stampa, infatti, l'agarosio viene rimosso senza compromettere la vitalità cellulare del costrutto. Tramite questo metodo, il tubo più piccolo che si può realizzare ha il diametro di 900 µm e lo spessore delle pareti è di 300 µm.

Una volta deposte, le sfere di bioink fondono tra loro in un periodo di tempo che va da 5 a 7 giorni. Come si può vedere dalla figura 4.2, si possono realizzare strutture complesse, con ramificazioni di diametri differenti che partono dal vaso principale, riproducendo quella che è la reale conformazione dei vasi sanguigni.

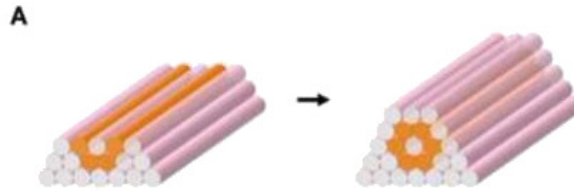


**Fig. 4.2:** Formazione di strutture tubolari: (A-E) schema di deposizione con aste di agarosio (rosa) e sferoidi multicellulari (arancione), (F-H) strutture complesse, (I) strutture ramificate

L'impiego di sfere di bioink comporta però alcune problematiche:

- la realizzazione di una quantità sufficiente di bioink per produrre un vaso abbastanza lungo e ampio richiede molto tempo;
- la fusione delle sfere richiede anche una settimana e non sempre porta a una superficie regolare del vaso;
- assemblare manualmente un vaso in un ambiente perfettamente sterile richiede numerosi accorgimenti.

Per questo motivo alle sfere di bioinchiostro vengono preferiti cilindri ottenuti depositando gocce di bioink tramite bioprinting su stampi non aderenti in teflon o agarosio; dopo una notte di maturazione negli stampi i cilindri sono sufficientemente coesi da poter essere utilizzati come nuovo bioink. La stampante utilizza quindi due testine, una per la preparazione e l'estrusione di aste di agarosio, l'altra per la deposizione di cilindri multicellulari.



**Fig. 4.3:** Deposizione con cilindri di bioink

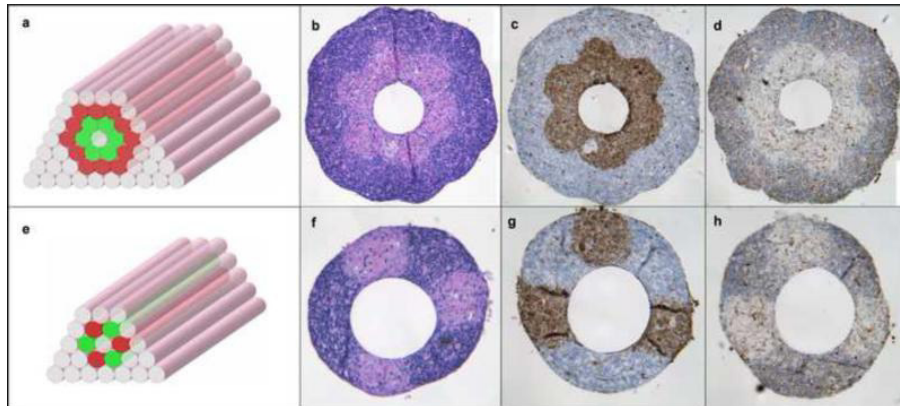
La formazione delle aste di agarosio avviene in un ciclo automatizzato: la testina carica agarosio liquido prelevandolo da un ambiente riscaldato, e lo immerge poi in ambiente freddo per una rapida gelificazione.

I due materiali vengono quindi depositi simultaneamente tramite processo di fabbricazione CAM secondo il modello desiderato; i cilindri multicellulari si uniscono tra loro formando la struttura tubolare finale in un periodo di 2-4 giorni.

Rispetto all'uso di sferoidi di tessuto, si ottiene in questo modo un notevole progresso in termini di tempo, ma anche di precisione nella realizzazione del costruito.

Successivamente sono stati realizzati vasi formati da due strati simili alla tonaca media e avventizia, tramite l'utilizzo di cilindri di cellule della muscolatura liscia dell'utero (HUSMCs) e di fibroblasti della pelle (HSFs). Per mostrare la versatilità della tecnica sono stati anche ingegnerizzati vasi depositando alternativamente cilindri di HUSMCs e HSF, realizzando un modello che non ha equivalenti in vivo.

Un vantaggio delle seguenti tecniche consiste nell'elevata densità cellulare ottenibile, mentre uno svantaggio è rappresentato dal fatto che più è complessa ed eterogenea la struttura da realizzare, maggiore è il tempo necessario affinché i cilindri si fondano.



**Fig. 4.4:** Realizzazione di vasi a doppio strato (HUVSMC: verde; HSF: rosso). C-H: analisi istologica dopo 3 giorni

Gli studiosi hanno quindi mostrato l'effettiva possibilità di realizzare costrutti vascolari di composizione e geometria ben definita mediante tecnologia bioprinting solid scaffold-free. Sono infatti riusciti a creare strutture tubulari lineari e ramificate, a singolo o doppio strato con diametri variabili da 0.9 mm a 2.5 mm e con un'elevata densità cellulare. Tuttavia vi sono ancora limitazioni come la risoluzione spaziale (il diametro più piccolo attualmente realizzabile è di 0.90 mm) o l'estrazione di agarosio da strutture con geometrie complesse. [3, 5, 11]

#### 4.1.5 BIOPRINTING DI MICROVASI

Per quanto riguarda il microcircolo sono state realizzate strutture microvascolari tramite tecnica inkjet usando come bioink cellule endoteliali (HMVECs) e come scaffold fibrina.

Le prime sono le uniche costituenti delle pareti interne dei vasi; la fibrina viene invece prodotta dal sangue dei pazienti stessi e rappresenta una sorta di scaffold autologo. Si forma da una sostanza proteica di partenza contenuta nel plasma, il fibrinogeno, purché questo venga attivato da una sostanza a carattere enzimatico, la trombina, a sua volta prodotta da protrombina in presenza di tromboplastina e ioni calcio. Questo processo

rappresenta la risposta del sangue durante un processo di guarigione e determina la formazione del coagulo che ripristina la continuità fisica del vaso e la sua funzionalità.

In seguito alla realizzazione dello scaffold di fibrina, tramite analisi SEM si nota all'interno della fibra la presenza di un canale vuoto adatto alla deposizione ed alla proliferazione delle cellule. Cellule endoteliali vengono quindi stampate tramite Bioprinting ed il costrutto viene lasciato maturare in un bioreattore per un periodo di circa tre settimane, durante il quale le cellule proliferano e si allineano rivestendo internamente il canale come conseguenza del processo di angiogenesi.

Si è inoltre dimostrata l'integrità a lungo termine della struttura tubolare così formata e la sua compatibilità per un futuro impiego clinico.

[5, 12]

## **4.2 LA CARTILAGINE**

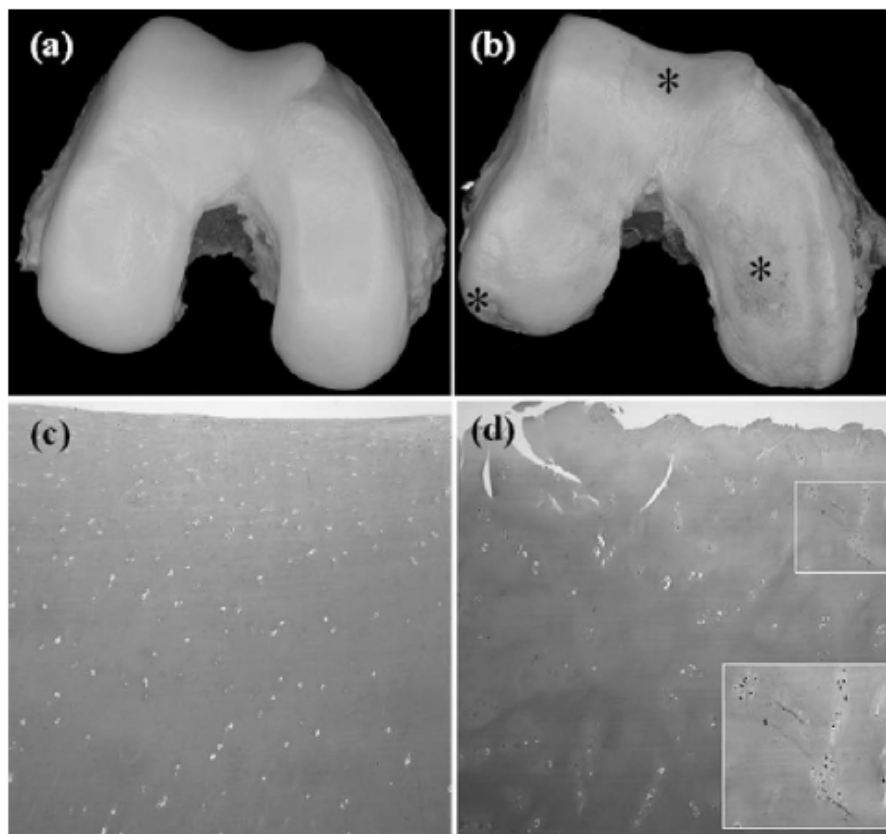
La cartilagine è una forma specializzata di tessuto connettivo caratterizzata da un'abbondante matrice extracellulare nella quale, racchiusi all'interno di lacune o cavità, si trovano i condrociti.

La matrice amorfa della cartilagine, diversamente dal comune tessuto connettivo, è solida; il suo contenuto in collagene, quello in proteoglicani e altre proteine, come ad esempio le glicoproteine, è variabile a seconda del tipo di cartilagine. Il tessuto cartilagineo appartiene ai tessuti connettivi di sostegno o scheletrici ed è per questo dotato di particolari proprietà meccaniche e funzionali: elevata resistenza alla tensione e alla pressione ed elasticità; infatti, specialmente quello presente nelle giunture delle articolazioni, deve resistere a stimoli importanti primo fra tutti il carico corporeo, come nel caso significativo di anca e ginocchio, ed eliminare l'attrito tra le ossa.

A differenza del connettivo propriamente detto, la cartilagine non contiene né vasi né nervi, il nutrimento raggiunge quindi i condrociti situati nelle lacune grazie alla permeabilità della matrice extracellulare.

Ad esclusione delle superfici articolari, la cartilagine è rivestita da uno strato di tessuto connettivo fibroso compatto ricco di vasi chiamato pericondrio, che provvede a conferire maggiore resistenza e a fornire nutrimento per diffusione alla cartilagine stessa, di per sé non vascolarizzata.

Nella vita fetale il tessuto cartilagineo forma la quasi totalità dello scheletro e viene successivamente sostituito da tessuto osseo, ad esclusione delle superfici articolari, della porzione cartilaginea delle coste, della parte esterna dell'orecchio, del naso, della laringe, della trachea e dei bronchi. La sua funzione però, è spesso compromessa a causa di traumi, infortuni cronici o come parte del naturale processo d'invecchiamento. [Fig. 4.5]



**Fig. 4.5:** Immagini macro e istologiche della cartilagine umana:

(a) articolazione del ginocchio sana; (b) articolazione del ginocchio usurata; (c-d) analisi istologica delle due cartilagini

Data la completa assenza di vascolarizzazione e innervazione, mostra scarse capacità rigenerative in caso di lesione, soprattutto se di grave entità; anche quando questa si rigenera, dà comunque origine ad un tessuto di tipo fibrocartilagineo, meno resistente ed elastico dell'originale. [5, 16]

#### 4.2.1 BIOPRINTING DELLA CARTILAGINE

Il più comune trattamento in caso di degenerazione avanzata della cartilagine dell'articolazione prevede la sostituzione chirurgica, ma questa procedura è altamente invasiva, complicata e costosa.

Attuali tecniche di ingegneria dei tessuti non riescono ancora a fabbricare da zero un nuovo costrutto che sia indistinguibile dalla cartilagine nativa per quanto riguarda morfologia, composizione della matrice extracellulare (ECM) e proprietà meccaniche.

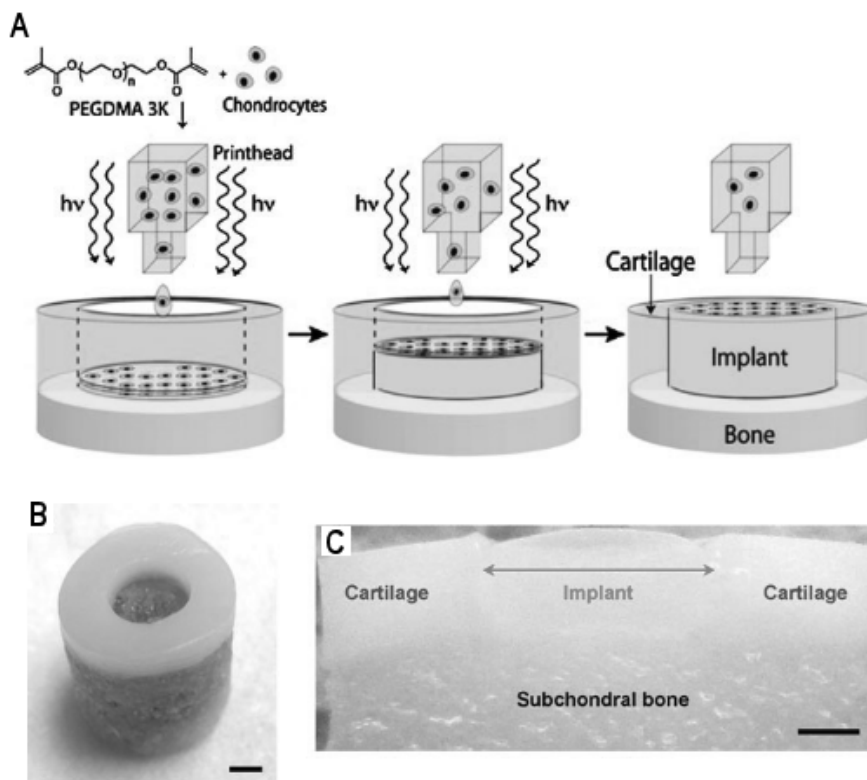
Inoltre in quasi tutte le tecniche è prevista la rimozione di tessuto cartilagineo sano intorno al sito della lesione per successivo trattamento ed impianto autologo, procedura che però crea difetti che possono condurre alla degenerazione della cartilagine finale ed al fallimento dell'impianto.

L'obiettivo è quindi quello di riparare lesioni di differenti dimensioni e spessori tramite l'impianto diretto di tessuto ingegnerizzato, che si integri col tessuto sano, senza apportare difetti ulteriori.

Date le seguenti premesse nell'esperimento condotto da Xiaofeng Cui et al. nel 2012 venne dimostrata la possibilità di riparare il tessuto cartilagineo danneggiato tramite la tecnica di stampa 3D inkjet direttamente in sito.

In questo esperimento si è utilizzata una stampante Hewlett-Packard (HP) Deskjet 500 modificata per eseguire la biostampa su un cilindro di tessuto osteocondrale bovino (cartilagine e osso) appositamente espantato, nel quale è stata asportata cartilagine realizzando una lesione di 4 mm di diametro e 2 mm di profondità. [Fig. 4.6 (B)]





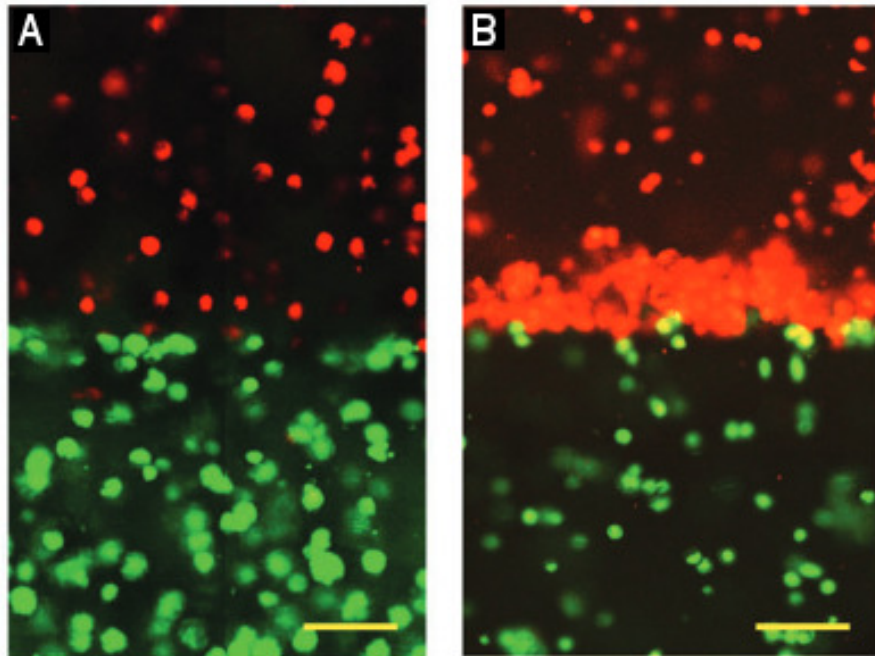
**Fig. 4.6:** (A) Schematizzazione del processo di bioprinting della cartilagine con contemporaneo processo di foto-polimerizzazione; (B) osteo-condro bovino con lesione cartilaginea di 4 mm di diametro e 2 mm di spessore; (C) immagine della sezione del tessuto ingegnerizzato

Come biopaper si è utilizzato un idrogel sintetico formato a partire da macromeri di glicole polietilenico (PEG), i quali permettono il mantenimento della vitalità dei condrociti ed inducono la produzione di proteoglicani e collagene di tipo II, componenti della matrice extracellulare.

Idrogel così costituiti hanno modulo di compressione compatibile con quello della cartilagine umana, sono solubili in acqua a bassa viscosità e possono essere modificati rendendoli foto-polimerizzabili (PEGDMA).

Questa caratteristica permette la stampa di condrociti e la contemporanea reticolazione del biopaper, assicurando una precisa deposizione delle cellule ed il mantenimento nel tempo della posizione desiderata;

contrariamente, nel caso di fabbricazione dello scaffold con successivo impianto di cellule, si ha un accumulo di condrociti all'interfaccia col tessuto ospite per effetto della gravità. [Fig. 4.7]

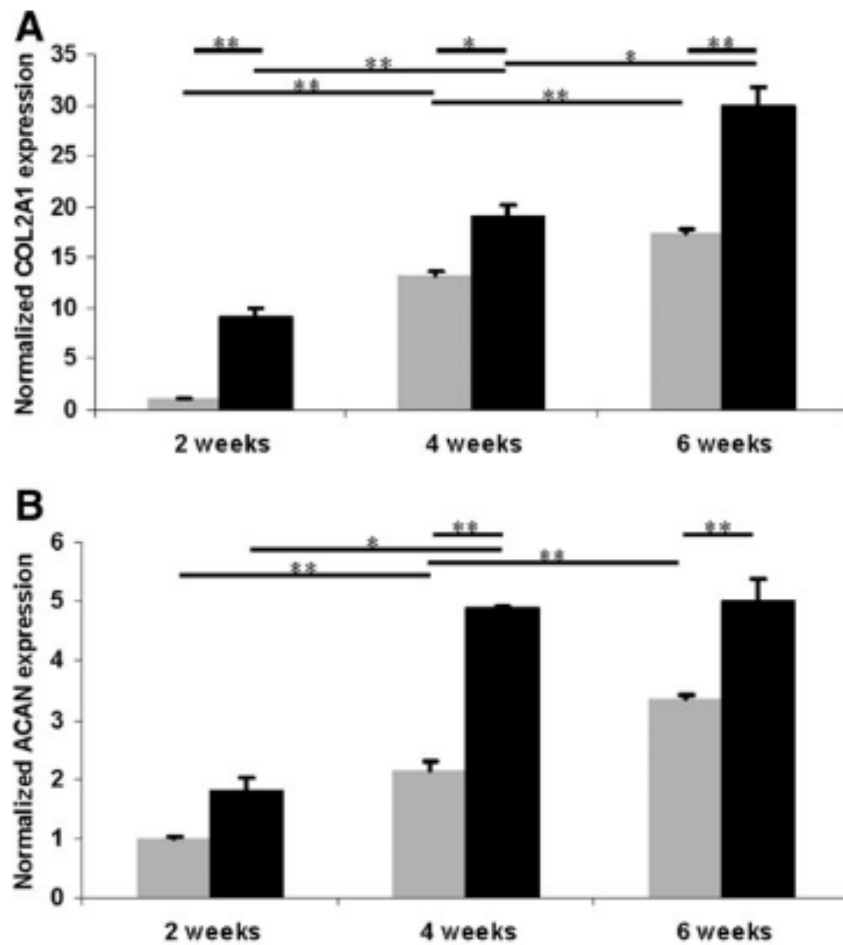


**Fig. 4.7:** (A) Cellule stampate con contemporanea foto-polimerizzazione mantengono la posizione di deposizione; (B) le cellule si accumulano all'interfaccia con il tessuto nativo a causa della gravità se polimerizzate dopo la deposizione;

L'intero processo di stampa ha una durata di 108 secondi rispetto agli 11 minuti richiesti dalla fabbricazione manuale, l'esposizione ai raggi UV necessaria per la polimerizzazione è ridotta dell'80% e conseguentemente la vitalità cellulare è aumentata del 26%.

L'idrogel contenente cellule si è quindi saldato alla cartilagine circostante ed all'osso subcondrale [Fig. 4.6 (C)], mostrando inoltre un significativo incremento nella produzione di collagene di tipo II e proteoglicani a dimostrazione della stabilità ed integrazione ottenuta dal neocostrutto.

[Fig. 4.8]



**Fig. 4.8:** Espressione genica in PEG idrogel con condrociti (barre nere) e senza condrociti (barre grigie): (A) espressione collagene di tipo II; (B) espressione di proteoglicani

È stata quindi dimostrata l'integrazione della cartilagine stampata con il tessuto circostante, il mantenimento della vitalità cellulare e la conseguente produzione di proteoglicani e collagene; la tecnica si è quindi rivelata promettente nella realizzazione di tessuto cartilagineo ingegnerizzato usando la tecnologia di stampa 3D in sito. [5, 14, 15]

#### 4.2.2 LIMITAZIONI E CRITICITÀ

Poiché la biopsia permette di ottenere una piccola quantità di cellule, i metodi di ingegnerizzazione dei tessuti ne richiedono la proliferazione per ottenerne un numero sufficiente alla realizzazione del costrutto.

L'espansione cellulare deve avvenire in un bioreattore mediata da appositi fattori di crescita per consentire la corretta espressione del fenotipo delle cellule cartilaginee. Un approccio alternativo è quello di utilizzare cellule staminali autologhe adulte che possono essere espanse in quantità sufficienti prima di differenziarsi in condrociti.

Un altro fattore problematico è rappresentato dalla qualità dei condrociti di partenza: la loro capacità di proliferare e di rigenerare tessuto è, infatti, dipendente non solo dallo stato di salute della cartilagine in cui si effettua la biopsia, ma è estremamente variabile anche tra individui della stessa età e senza precedenti disturbi articolari. Solo l'impiego di specifici fattori di crescita e piccole percentuali di siero può ridurre la variabilità di proliferazione dei condrociti, ma non può comunque garantire un risultato riproducibile dal punto di vista della qualità del tessuto ingegnerizzato ottenuto. In alternativa, è possibile usare altre sorgenti cellulari per la coltivazione dinamica di costrutti cartilaginei, cioè le cellule staminali adulte mesenchimali o stromali, che presentano una maggiore capacità di rendere il tessuto coltivato riproducibile e meno variabile nelle proprietà e nella struttura.

Il costrutto realizzato deve inoltre rapidamente trasformarsi da liquido a solido tramite il processo di foto-polimerizzazione affinché il processo di stampa sia efficiente, deve avere sufficienti proprietà meccaniche per resistere alle sollecitazioni ricevute e trasmettere segnali biochimici e biofisici per mantenere il fenotipo delle cellule stampate. [5, 14, 15, 16]

### 4.3 LA PELLE

La pelle, ricoprendo interamente il corpo, è l'organo più esteso con una superficie di 1.5-2 m<sup>2</sup> ed un peso variabile da 3 a 10kg.

Grazie alla sua particolare struttura costituisce una barriera tra l'ambiente esterno e l'interno della persona, rappresentando un mezzo altamente efficace per la protezione contro danni ambientali, chimici, meccanici, influenze termiche, irradiazioni o agenti patogeni.

La prima protezione contro gli agenti patogeni si ottiene dal pH acido della pelle con valore tipico di 5,5 - 5,7; inoltre, la superficie apicale è abitata da batteri e funghi che costituiscono la normale flora cutanea e contribuiscono alla sua funzione protettiva. Altra importante funzione è il mantenimento della temperatura e del bilancio idrico, evitando condizioni come ipotermia o disidratazione. Agisce anche come organo sensoriale in grado di rilevare il dolore, il contatto, la pressione, le vibrazioni e la temperatura, contribuendo cioè non solo alla nostra protezione, ma anche alla percezione generale dell'ambiente che ci circonda. [5]

#### 4.3.1 STRUTTURA E FUNZIONI

La cute è costituita da un insieme di tre tessuti, disposti uno sull'altro, con differenti caratteristiche e funzioni:

- Epidermide: funge da barriera impedendo da un lato la penetrazione dall'esterno di acqua, sostanze estranee e microrganismi e dall'altro la perdita di acqua ed elettroliti dall'organismo. È un tessuto spesso circa 0,2 mm, formato da più strati, il cui componente principale è la cheratina.

Lo strato corneo, quello più esterno, è formato da cellule cheratinizzate morte che vengono continuamente rinnovate ed eliminate secondo un ciclo di 3-4 settimane.

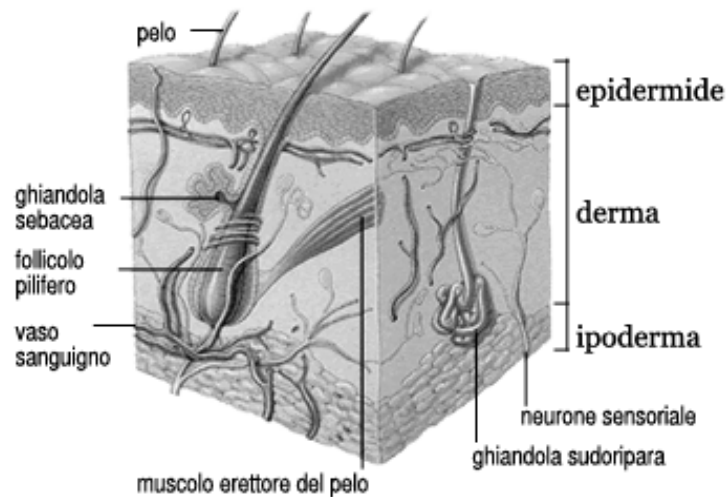
- Derma: è un tessuto di tipo connettivo sottostante l'epidermide, con spessore variabile da 0.6 mm nelle palpebre a più di 3 mm nella pianta del piede. È costituito da abbondante ECM prodotta da fibroblasti, da fibre di elastina, che assicurano elasticità alla cute e da fibre di collagene, con funzione di sostegno e resistenza meccanica. Complessivamente, il derma è quindi in grado di assorbire sforzi di taglio o compressione, pur rimanendo molto flessibile.

Contrariamente all'epidermide è ricco di vasi sanguigni e linfatici avendo quindi anche funzione di nutrizione. Inoltre, il derma contiene ghiandole sebacee e sudoripare, follicoli piliferi e nervi, responsabili del tatto, della percezione del dolore e della temperatura. Vi si trovano infine, cellule del sistema immunitario.

- Ipoderma: è il terzo e più profondo strato cutaneo, direttamente a contatto con il derma da un lato e con i tessuti adiposi e muscolari sottocutanei dall'altro. È costituito, come il derma, da tessuto connettivo ed è particolarmente ricco di adipociti, le cellule preposte alla biosintesi dei grassi. Grazie alla presenza di questa tipologia cellulare, questo tessuto funge da riserva energetica e, nel contempo, da isolante termico e da cuscinetto.

Nell'ipoderma hanno origine i follicoli e le ghiandole sudoripare: è qui infatti che ricevono nutrimento e cedono i loro prodotti di scarto.

Completano la struttura della pelle i cosiddetti "annessi cutanei", che comprendono le ghiandole, l'apparato circolatorio e le terminazioni nervose. [3, 5]



**Fig. 4.9:** Struttura della cute

#### 4.3.2 INFORTUNI DELLA PELLE

Se la pelle è danneggiata superficialmente è in grado di rigenerarsi tramite un apposito processo di guarigione; in determinate circostanze però, questo non può avvenire come ad esempio nel caso di grandi ustioni.

Terapie attuali inoltre, non sono sufficienti per trattare accuratamente questi difetti: si utilizzano infatti innesti cutanei autologhi per coprire le ferite, ma spesso i siti donatori sono insufficienti e cicatrici estese sono inevitabili con conseguenti problemi funzionali ed estetici.

I sostituti cutanei disponibili non contengono follicoli piliferi, melanociti, ghiandole sebacee e sudoripare, il che li priva delle normali funzioni del tessuto nativo e la loro scarsa vascolarizzazione può portare al rigetto del trapianto. Per questo motivo è estremamente importante sviluppare una tecnica affidabile che permetta di realizzare sostituti cutanei che replichino l'organotipica struttura 3D della pelle riproducendone non solo le funzioni, ma anche l'aspetto. [5]

### 4.3.3 BIOPRINTING DI PELLE UMANA

L'approccio utilizzato nell'ingegnerizzazione della pelle ne prevede innanzitutto la semplificazione tramite un modello bi-compartimentale: il primo emula l'epidermide formata dagli strati basale, spinoso, granuloso e lucido, ognuno dei quali costituito da cheratinociti (KCs) a differenti stadi di differenziazione e lo strato corneo formato da elementi cellulari morti che prendono il nome di corneociti. Il secondo compartimento rappresenta il derma ed è costituito da fibroblasti (FBs) immersi in uno scaffold di collagene.

La piattaforma di stampa utilizzata è costituita da otto canali indipendenti in grado di depositare contemporaneamente cellule, materiali costituenti lo scaffold e fattori di crescita, secondo un modello 3D predefinito.

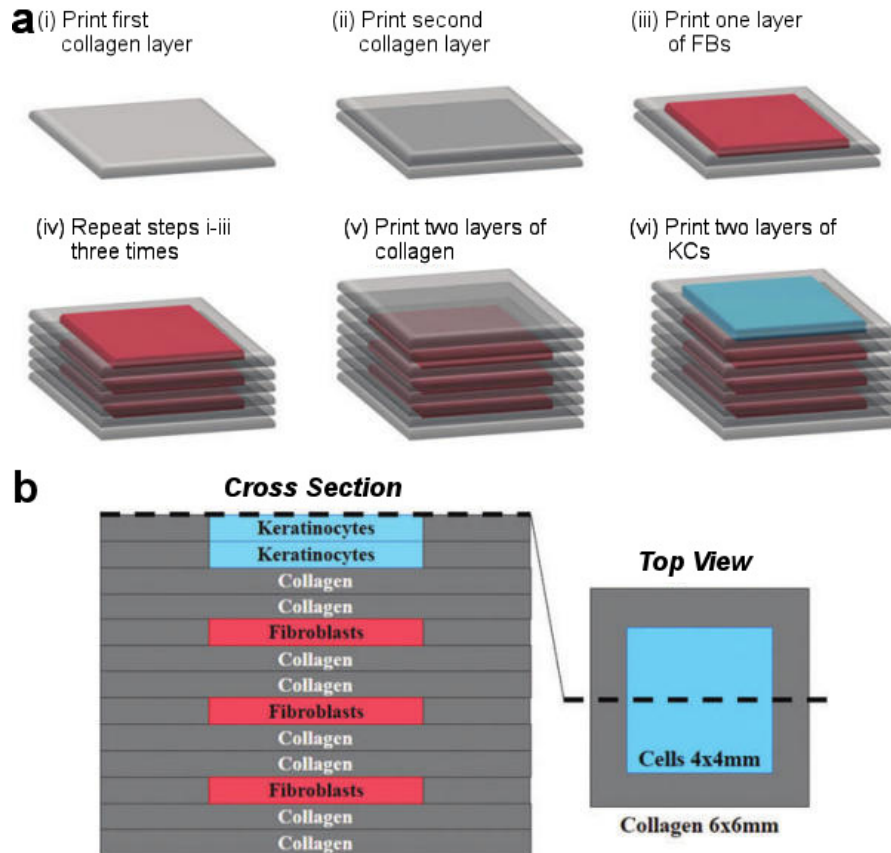
Ogni testina di stampa ha un meccanismo di attuazione basato su valvole elettromeccaniche, i materiali sono quindi depositati tramite pressione pneumatica durante la fase di apertura di queste ultime; il volume delle gocce depositate può essere variato agendo sul tempo di apertura della valvola e sulla pressione del gas inerte.

La risoluzione minima di stampa varia in base alla viscosità del materiale: per materiali acquosi (acqua e mezzi di coltura cellulari) è di  $\sim 100\mu\text{m}$  ed è maggiore per materiali viscosi (collagene).

Il costrutto si ottiene tramite un approccio layer-by-layer come illustrato in Fig. 4.10: tre strati di fibroblasti sono separati ognuno da due strati di collagene, e due strati di collagene separano la struttura ottenuta da altrettanti strati di cheratinociti posti in superficie.

Tra la stampa di uno strato ed il successivo si attende un minuto e viene vaporizzato bicarbonato di sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) per favorire la gelificazione del collagene; la porzione superficiale si ottiene stampando due strati di cheratinociti al fine di ottenere la densità cellulare caratteristica dell'epidermide.





**Fig. 4.10:** Processo di bioprinting di pelle umana: (a) deposizione layer-by-layer di collagene, KCs e FBs; (b) rappresentazione schematica della sezione di taglio e della vista dall'alto del tessuto 3D

Al termine della fase di stampa, la struttura composita viene posta per un'ora in un incubatore (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) per completare la gelificazione del collagene e poi immersa in mezzi di coltura (detti anche terreni di coltura) per 4-8 giorni.

Per completare il processo di stratificazione e differenziazione dei cheratinociti, i costrutti ottenuti vengono poi trattati per circa 14 giorni tramite protocollo "ALI culture" (Air-Liquid Interface Culture), vengono cioè posizionati su una apposita membrana di supporto che fornisce liquidi e nutrimento dal basso, permettendo invece il contatto con l'aria nello strato esterno, così come avviene nel nostro corpo. Questo step determina

la maturazione e la differenziazione delle cellule depositate che proliferano ricoprendo interamente lo strato di collagene. [5, 17]

#### 4.3.4 POTENZIALITÀ E CRITICITÀ DELLA TECNICA

Vari idrogel possono essere utilizzati come scaffold, in questo studio si è utilizzato collagene di tipo I. Tipicamente la gelazione della matrice si ottiene tramite variazioni di pH o temperatura, ma questo approccio è adatto solamente per strutture sottili; si possono infatti formare regioni eterogenee di materiale gelificato e non, a causa di limitazioni nella diffusione o nel trasferimento di calore in strutture di maggiore spessore.

Aumentare invece i gradienti di pH o temperatura potrebbe indurre effetti indesiderati sulla vitalità cellulare; per evitare questo tipo di problemi la gelificazione del collagene si è ottenuta nebulizzando  $\text{NaHCO}_3$ .

La tecnica così descritta permette quindi di stampare una struttura 3D costituita da due strati principali, realizzando un tessuto epiteliale ingegnerizzato in grado di coprire ferite, prevenire la perdita di liquidi o proteine e l'insorgere di infezioni.

In confronto con i metodi tradizionali di ingegnerizzazione della pelle, il bioprinting 3D offre diversi vantaggi: permette la realizzazione ed il mantenimento della forma desiderata, consente l'ottenimento di proprietà meccaniche quali resistenza e flessibilità ed è una tecnica riproducibile.

Tuttavia, queste strutture mancano ancora di importanti funzioni della pelle naturale quali la regolazione della temperatura, la funzione immunitaria e la funzione sensoriale.

Forse, alcune di queste potrebbero essere ottenute migrando cellule dell'organismo del paziente: cellule endoteliali per la rapida formazione di vasi sanguigni, cellule dei follicoli piliferi, melanociti per la pigmentazione e cellule nervose per la percezione; tuttavia non è sufficiente semplicemente aggiungere cellule, ma devono essere ricreati i microambienti necessari affinché ogni tipo di cellula possa manifestare il proprio fenotipo ed assolvere i rispettivi compiti.

Nel caso di grandi ustionati una sfida ulteriore è costituita dal fatto che la superficie di pelle da stampare è molto grande in contrasto con l'area di stampa solitamente piccola e la velocità ridotta.

Per quanto riguarda l'area di stampa si tratta di una sfida ingegneristica che potrebbe essere vinta attraverso il funzionamento in parallelo di numerose testine di stampa, mentre per quanto riguarda la velocità ci sono limiti biologici dovuti ai tempi necessari per la proliferazione e la differenziazione cellulare. È quindi necessario implementare e sviluppare continuamente tecniche di coltura, bioreattori e fattori di crescita affinché si possano diminuire i tempi di realizzazione degli innesti.

Sono quindi ancora necessari sviluppi per realizzare tessuto cutaneo ingegnerizzato che possa emulare al meglio la complessità morfologica e funzionale di quello naturale e che permetta di passare dal laboratorio all'applicazione clinica.

A testimonianza della potenzialità della tecnica del Bioprinting a maggio di quest'anno è stato ufficializzato un contratto di collaborazione tra L'Oréal e Organovo, un'unione capace di scardinare le tradizionali dinamiche dei test cosmetici e di aprire le porte ad una stampa 3D biologica pienamente matura. La L'Oréal Usa Products Inc., è una delle più grandi realtà al mondo nel campo dello skincare, mentre Organovo è l'azienda leader nel settore dell'industria della biostampa 3D. [5, 17, 19]



## CONCLUSIONI

L'introduzione della tecnologia di stampa 3D sta guidando una rivoluzione in tutti i settori di applicazione con risvolti sorprendenti in ambito biomedico, rappresentando un salto che modifica radicalmente i parametri di cura delle patologie esistenti: dalla Medicina conservativa e cronicizzante alla Medicina rigenerativa e risolutiva.

Un'applicazione clinica è stata realizzata nel mese di giugno presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna, dove cinque pazienti con ossa del bacino compromesse, sono stati operati impiantando protesi stampate in 3D, realizzate in titanio trabecolare. Le protesi, progettate su misura sulla base di dati forniti da tac e risonanza, hanno permesso la ricostruzione nel modo più appropriato possibile dal punto di vista anatomico dei rapporti tra femore e bacino fornendo quindi ai pazienti una maggiore probabilità di tornare ad una deambulazione corretta dopo l'intervento. [20]

L'obiettivo finale e più ambizioso è però quello di riuscire a produrre tessuti e soprattutto organi completi e funzionanti (Organ Printing) realizzati a partire da cellule autologhe del paziente stesso, permettendo di limitare al minimo il rischio di rigetto. Applicando il procedimento bottom up e assumendo come modello la natura, si cerca quindi di replicarne e sfruttarne le dinamiche per la realizzazione di organi e tessuti che siano il più possibile simili agli originali.

Stampare una valvola, un femore, un fegato o una qualsiasi parte dell'organismo che permetta di riparare o sostituire ciò che si è danneggiato, consentirebbe ad esempio, di salvare la vita di molte persone, che altrimenti sarebbero in balia dei lunghi tempi d'attesa necessari per trapianti tradizionali.

Sullo sfondo di un contesto nel quale secondo le stime del Fondo Monetario Internazionale, senza innovazioni nell'approccio terapeutico, i costi dei servizi sanitari lieviteranno del 50% con un aumento di soli 3 anni di vita della popolazione, e nel quale, secondo il World Economic Forum, ogni giorno, solo in Europa, muoiono 12 persone in lista di attesa per un organo, si comprende la portata fondamentale di questa nuova

tecnica: veloce, sicura, riproducibile ed al tempo stesso tra le più precise in circolazione.

Altri obiettivi e applicazioni della tecnica possono essere ad esempio studi tossicologici e farmacologici, effettuabili non più su colture bidimensionali, ma su veri e propri tessuti 3D funzionanti, che consentano di predire il comportamento del tessuto nativo e di colmare quindi il divario tra sperimentazione preclinica e clinica.

I ricercatori credono che una chiave per liberare l'intero potenziale del bioprinting sia identificare un processo o l'integrazione di più processi che soddisfino due requisiti contrapposti: la realizzazione di forme voluminose che possano essere immediatamente tradotte nell'uso clinico ed un'elevata fedeltà nel complesso arrangiamento microstrutturale di cellule e ECM per riprodurre un adeguato ambiente cellulare.

Infatti, se da un lato sono state realizzate macrostrutture tramite tecniche a prototipazione rapida, dall'altro queste mancano della necessaria risoluzione spaziale, requisito che è possibile ottenere tramite stampa inkjet o laser, le quali hanno però limitazioni in termini di area di stampa e tempo di fabbricazione.

Sono quindi ancora molti i limiti da superare per raggiungere gli obiettivi prefissati: dai problemi legati alla vascolarizzazione a quelli riguardanti la riproducibilità di strutture con geometrie e organizzazioni complesse, ma l'idea di poter realizzare organi interi tramite stampa 3D non rappresenta più una prospettiva utopistica.

## **BIBLIOGRAFIA**

[1] “*Biomateriali - Introduzione allo studio dei materiali per uso biomedico*” Di Bello C.; Pàtron Editore, Bologna (2004);

[2] “*Approccio integrato per la medicina rigenerativa*”; Maria Cristina Tanzi, Annamaria Bianchi, Silvia Farè, Sara Mantero, Manuela Teresa Raimondi, Livia Visai; Pàtron Editore, Bologna (2013);

[3] “*Biomateriali per protesi e organi artificiali*”; Riccardo Pietrabissa; Pàtron Editore, Bologna (2005);

[4] “*Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa*”; Sara Mantero, Andrea Remuzzi, Manuela T. Raimondi, Arti Ahluwalia; Pàtron Editore, Bologna (2009);

[5] “*3D Bioprinting and Nanotechnology in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*”; Lijie Grace Zhang, John P. Fisher, Kam W. Leong; Elsevier, AP (2015).

## **PUBBLICAZIONI**

[6] “*Bioprinting is coming of age: report from the International Conference on Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux (3B'09)*”; Fabien Guillemot, Vladimir Mironov, Makoto Nakamura; Biofabrication Vol. 2 (2010) Editorial

[7] “*Microengineered hydrogels for tissue engineering*”; Ali Khademhosseini, Robert Langer; Biomaterials Vol. 28 (2007) 5087 – 5092

- [8] “*Organ printing: Tissue spheroids as building blocks*”; Vladimir Mironov, Richard P. Visconti, Vladimir Kasyanov, Gabor Forgacs, Christopher J. Drake, Roger R. Markwald; *Biomaterials* Vol. 30 (2009) 2164 – 2174
- [9] “*Cell Damage Evaluation of Thermal Inkjet Printed Chinese Hamster Ovary Cells*”; Xiaofeng Cui, Delphine Dean, Zaverio M. Ruggeri, Thomas Boland; *Biotechnology and Bioengineering* Vol. 106 (2010) 963 – 969
- [10] “*A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids*”; Foty R., J. Vis. Exp. (51), e2720, doi:10.3791/2720 (2011).
- [11] “*Scaffold-Free Vascular Tissue Engineering Using Bioprinting*”; Cyrille Norotte, Françoise Marga, Laura Niklason, Gabor Forgacs ; *Biomaterials* Vol. 30 (2009)
- [12] “*Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology*”; Xiaofeng Cui, Thomas Boland; *Biomaterials* Vol. 30 (2009) 6221 – 6227
- [13] “*Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential*”; Wai-Yee Yeong , Chee-Kai Chua , Kah-Fai Leong and Margam Chandrasekaran; *TRENDS in Biotechnology* Vol.22 No.12 (2004)
- [14] “*Direct Human Cartilage Repair Using Three-Dimensional Bioprinting Technology*”; Xiaofeng Cui, Ph.D., Kurt Breitenkamp, Ph.D., M.G. Finn, Ph.D., Martin Lotz, M.D., Darryl D. D’Lima, M.D.; (2012)
- [15] “*Tissue engineering of osteochondral construct in vitro using bioreactors*”; Haasper C., Zeichen J., Meister R., Krettek C., Jagodzinski M.; *Injury* (2008);



[16] “*Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes*”; Schulz R. M., Bader A.; Eur Biophys (2007);

[17] “*Design and Fabrication of Human Skin by Three-Dimensional Bioprinting*”; Vivian Lee, Gurtej Singh, John P. Trasatti, Chris Bjornsson, Xiawei Xu, Thanh Nga Tran, Seung-Schik Yoo, Guohao Dai, Pankaj Karande; TISSUE ENGINEERING: Part C (2014).

## **SITOGRAFIA**

[18] [<http://www.teal.u-bordeaux2.fr/research-axes/laser-assisted-bioprinting/study-on-lab-mechanism.html?lang=en>]

[19] [<http://www.stampa3d-forum.it/loreal-e-organovo/>]

[20] [<http://www.oggisalute.it/2015/06/impiantate-prime-protesi-di-ossa-stampate-su-misura-in-3d/>]