



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

“Utilizzo di stampa tridimensionale per la generazione di tessuto neuromuscolare ingegnerizzato”

Relatore: Dott.ssa Anna URCIUOLO

Laureando: Andrea PASINATO

ANNO ACCADEMICO 2020 – 2021

Data di laurea 24/09/2021

Indice

| | |
|-----------------|----------|
| Abstract | 4 |
|-----------------|----------|

Capitolo 1

| | |
|--|-----------|
| <i>1.1 Struttura e morfologia del sistema nervoso</i> | 5 |
| <i>1.2 Il tessuto muscolare scheletrico</i> | 7 |
| <i>1.3 Focus su Motoneuroni e Giunzione Neuromuscolare</i> | 8 |
| <i>1.4 Malattie che coinvolgono direttamente la Giunzione Neuromuscolare e i Motoneuroni</i> | 11 |

Capitolo 2

| | |
|---|-----------|
| <i>2.1 Che cos'è la stampa 3D?</i> | 17 |
| <i>2.2 La Produzione dello Scaffold</i> | 19 |
| <i>2.3 La Produzione degli Hydrogel</i> | 22 |
| <i>2.4 Il crosslinking</i> | 27 |

Capitolo 3

| | |
|--|-----------|
| <i>3.1 Il 3D Bioprinting: metodi di stampa</i> | 30 |
| <i>3.2 I Bioinchiostri e le Cellule Biostampate</i> | 35 |
| <i>3.3 La stampa tridimensionale di tessuto Neuromuscolare</i> | 37 |
| <i>3.4 Il collagene marino come coadiuvante per la stampa 3D di MN e NMJ</i> | 41 |

| | |
|---------------------|-----------|
| Bibliografia | 46 |
|---------------------|-----------|

ABSTRACT

Nella branca, sempre più in sviluppo, dell'ingegneria tissutale applicata alla medicina rigenerativa è sempre più di largo impiego il 3D bioprinting.

La stampa tridimensionale è un approccio che, previa creazione di inchiostri biologici o "bioinks" garantisce una totale automatizzazione nella fabbricazione di tessuti multicellulari con lo scopo di formare tessuti/organi artificiali del tutto funzionali e simili a quelli naturali.

Il bioprinting si basa sulla preparazione di un bio-inchiostro, ovvero una soluzione polimerica carica di cellule, che viene deposta, attraverso una stampante 3D, per creare un costrutto tridimensionale, composto da una componente strutturale extracellulare detto *scaffold* in grado di supportare la vitalità e funzionalità delle cellule in essa disperse. Nel primo capitolo della presente tesi, sono fornite rapide nozioni di fisiologia umana con un particolare focus su alcune delle malattie neuromuscolari.

Nel secondo capitolo, poi, ci si concentra sulla presentazione delle caratteristiche che portano alla fabbricazione degli *scaffold*, *sulla creazione degli Hydrogels e sulle procedure di crosslinking*.

Infine, nel terzo capitolo si tenta di approfondire, in seguito alla spiegazione delle varie metodiche di 3D bioprinting, quelli che sono i più recenti studi che riportano lo sviluppo di tessuti neuromuscolari ingegnerizzati, con lo scopo di sviluppare modelli sperimentali dove poter studiare condizioni sane e patologiche e quali sono le principali tecniche per generare tessuti trapiantati.

CAPITOLO 1

A molti di coloro che leggeranno questo elaborato la struttura e la morfologia del sistema neuromuscolare potrà sembrare un argomento ormai del tutto esaurito ma, a fini di completezza, è necessario un breve riepilogo dei concetti e delle strutture fondamentali che caratterizzano tessuto neuromuscolare umano.

Particolare attenzione verrà data al paragrafo “1.3” riguardo ai motoneuroni (**MN**) e alla Giunzione Neuromuscolare(**NMJ**).

Si tratteranno rapidamente, a fine capitolo, quelle che sono alcune delle malattie neuromuscolari che colpiscono l'uomo.

1.1 STRUTTURA E MORFOLOGIA DEL SISTEMA NERVOSO

Il sistema nervoso centrale (SNC) è composto da ENCEFALO, contenuto interamente nella scatola cranica, e MIDOLLO SPINALE, letteralmente un “prolungamento” del cervello a forma cilindrica che percorre la colonna vertebrale.

Ruolo fondamentale del SNC è quello di elaborare le informazioni degli stimoli provenienti dal Sistema Nervoso Periferico, procedendo alla distribuzione delle risposte (sia volontarie che involontarie) attraverso il medesimo SNP in tutto il resto del corpo¹.

La materia grigia dell'encefalo, ovvero quella contenente neuroni e fibre nervose, adempie a tutte le funzioni di controllo come i movimenti, il linguaggio, i sensi, il pensiero e la memoria; si possono quindi distinguere le parti di corteccia adibite a tali funzioni: si riconoscono le cortecce uditive/visive, somatosensoriale e motoria¹.

Il Midollo Spinale ricopre il ruolo di connessione tra ENCEFALO e resto del corpo. Esso è formato da materia bianca in cui si rilevano le estremità terminali dei neuroni, il cui corpo è insito nella materia grigia del midollo, e dai forami, piccole aperture che si collegano ai nervi della zona toracica, cervicale, lombare e sacrale.

Importante funzione del midollo spinale è quella di rendere possibile la percezione di sensazioni come il dolore o i repentini cambi di temperatura; è poi il mediatore principale del fenomeno dell'arco riflesso.

La funzione del sistema nervoso periferico è quella di collegare il SNC al resto dell'organismo inoltrando le informazioni direttamente a encefalo e midollo spinale.

La suddivisione del SNP è bipartita e vede la coesistenza del Sistema nervoso autonomo, che coordina ghiandole e muscolatura liscia degli organi, e del sistema nervoso somatico, che regola e riceve informazioni dagli organi di senso e controlla tutti i movimenti volontari¹.

Il sistema nervoso autonomo, poi, è diviso in tre parti fondamentali ovvero i sistemi simpatico/parasimpatico e il sistema enterico; questi sistemi sono caratterizzati dalla presenza di ammassi di modeste dimensioni di corpi neuronali chiamati gangli composti da fibre pre e post gangliari che si diramano dal SNC direttamente all'organo bersaglio¹.

Nell'area toracica e lombare, quindi, si identificano le aree di origine del sistema simpatico; i corpi del sistema parasimpatico invece sono situati nella zona sacrale del midollo spinale e nell' allungato del tronco encefalico.

Infine, le fibre che innervano il tratto gastrointestinale comprendendo pancreas e cistifellea danno origine al sistema nervoso enterico.

Il sistema nervoso somatico è composto dalle fibre nervose atte al trasferimento dei dati sensoriali al SNC e dalle fibre motorie verso i muscoli scheletrici.

Inoltre, si distinguono due classi di fibre ovvero quelle afferenti che partono dai neuroni localizzati a livello gangliare e dai motoneuroni efferenti che formano le fibre nervose motorie¹ (Fig. 1).

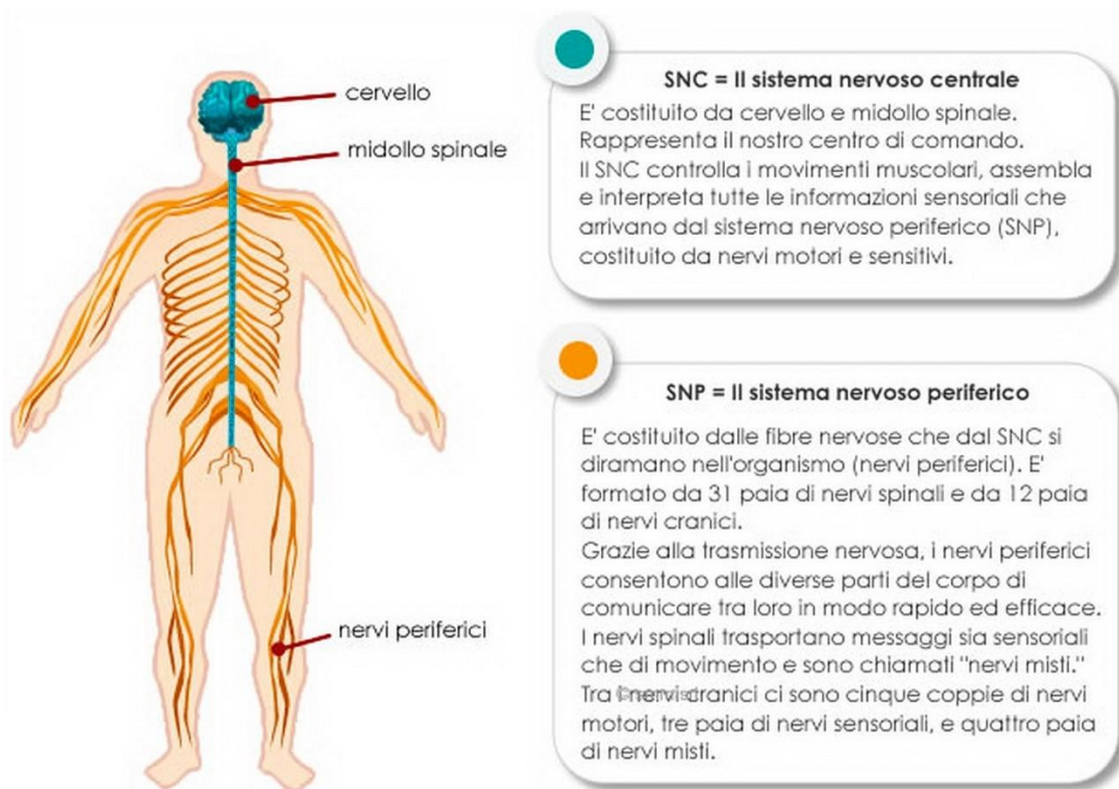


Figura 1 - Rapida Panoramica SNC e SNP da: MedicinaOnline.org

1.2 Il tessuto muscolare scheletrico

In questa sezione si intende dare descrizione anatomica e fisiologica del muscolo scheletrico ovvero il cosiddetto muscolo volontario con specifico riferimento al processo di contrazione muscolare.

Il tessuto muscolare striato scheletrico è formato da complessi di fascicoli muscolari al cui interno possono identificarsi le fibre muscolari, ricoperte dalla membrana chiamata endomisio. Tali fibre muscolari hanno una forma cilindrica di lunghezza tra 1mm a 20 cm. La membrana cellulare che le delimita prende il nome di sarcolemma e il loro citoplasma è denominato sarcoplasma il cui interno contiene numerosi nuclei e proprio per questa caratteristica la fibra muscolare viene definita sincizio ovvero "fusione" di più cellule. Il sincizio ha origine durante lo sviluppo embrionale per fusione di cellule mononucleate chiamate mioblasti. Inoltre, durante la vita fetale, alcuni precursori miogenici si annidano al di sotto del sarcolemma delle fibre muscolari originatesi, trasformandosi in una popolazione di cellule quiescenti che prendono il nome di cellule satelliti, le cellule staminali adulte del muscolo scheletrico. La funzione

delle cellule satelliti è quella di fondersi alle fibre preesistenti durante l'accrescimento e, nell'adulto, costituiscono gli elementi cellulari capaci di rigenerare le fibre muscolari danneggiate. All'interno del sarcoplasma sono presenti numerose formazioni cilindriche allungate, costituite da proteine del citoscheletro, responsabili della contrazione muscolare, le **miofibrille**. In seguito alla ricezione di un impulso nervoso il muscolo scheletrico è in grado di convertire l'energia chimica, fornita dall'ATP, in energia meccanica, agendo sul sistema di leve scheletriche con un buon rendimento e una piccola dispersione in calore. Il risultato di questa reazione endoergonica è la contrazione muscolare² (Fig. 2).

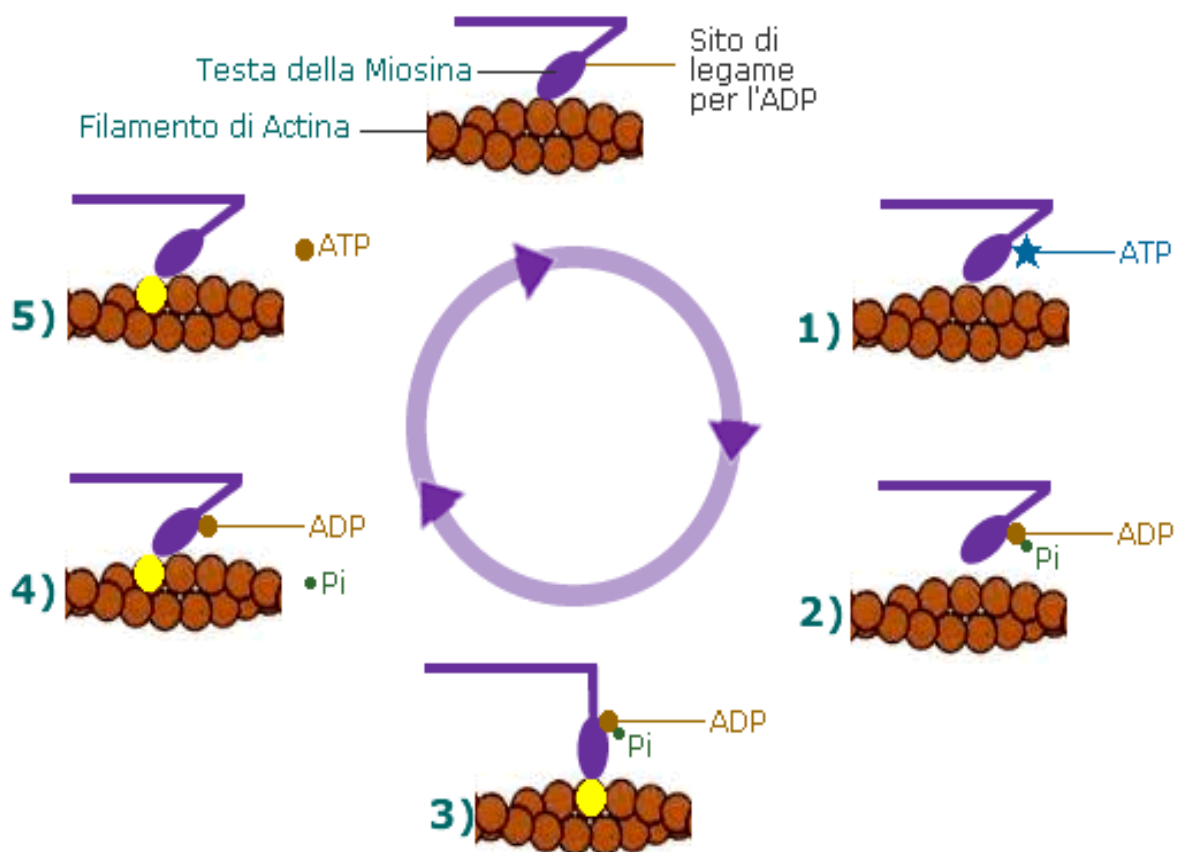


Figura 2 - Processo Contrazione Muscolare ATP dipendente Da: Mypersonaltrainer.it

1.3 Focus su Motoneuroni e Giunzione Neuromuscolare

Per gli argomenti e i fini preposti di questa tesi è necessario concentrarsi nella descrizione dei moto-neuroni e della loro giunzione neuromuscolare, ovvero la

giunzione che connette il motoneurone alla singola fibra muscolare dando origine all'unità motoria.

Il motoneurone è un neurone il cui corpo cellulare è posizionato nella corteccia motoria, o nel sistema cerebrale o nella spina dorsale e il cui assone si proietta direttamente dal midollo spinale per controllare direttamente, o indirettamente, gli organi effettori principalmente ghiandole e muscoli (Fig. 3). I motoneuroni iniziano a svilupparsi inizialmente durante lo sviluppo embrionale, precisamente alla quarta settimana gestazionale, dalla regione ventrale dell'asse ventro-dorsale; le funzioni motorie continuano a svilupparsi durante l'infanzia.

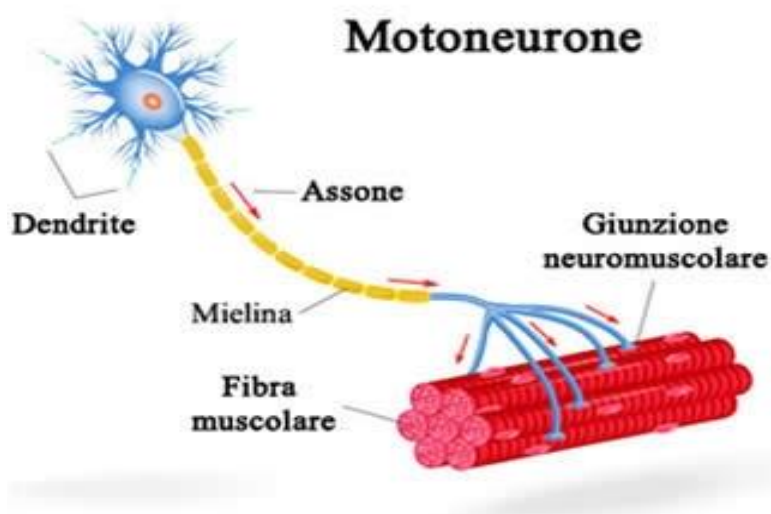


Figura 3- Semplificazione innervamento del Motoneurone da: Arisla.org

L'anatomia dei motoneuroni può essere facilmente descritta come segue:

- MOTONEURONI SUPERIORI: tali motoneuroni originano dalla corteccia motoria. Gli assoni di queste cellule scendono dalla corteccia fino al tratto corticospinale e si dirigono direttamente verso il corno centrale della spina dorsale. La sinapsi di questi neuroni si interfacciano sui motoneuroni spinali di più muscoli e sugli interneuroni³.

La loro caratteristica pare sia strettamente legata al controllo della mano come, ad esempio, il controllo indipendente di ogni singolo dito.

- MOTONEURONI INFERIORI: sono i motoneuroni che originano nella spina dorsale e innervano direttamente, o indirettamente, i bersagli effettori. Vi sono più categorie di motoneuroni inferiori: i motoneuroni somatici, viscerali generali e viscerali speciali. I primi gestiscono: le fibre muscolari extrafusali responsabili della maggior componente della forza di contrazione del muscolo e garantendone la tonicità (**Alfa MN**), i muscoli

intrafusali dei fusi muscolari (**Beta MN**) e la regolazione della sensibilità del fuso muscolare durante la contrazione (**Gamma MN**).

I **MN** viscerali generali innervano indirettamente il muscolo cardiaco e la muscolatura liscia delle arterie: la loro sinapsi è situata nei neuroni dei gangli del sistema nervoso autonomo localizzato del **SNP**.

I **MN** viscerali speciali, infine, sono coinvolti nella gestione delle espressioni facciali, nella masticazione, nella fonazione e nella deglutizione³.

- **TRATTI NERVOSI**: i tratti nervosi sono fasce di assoni che trasmettono potenziali d'azione ai loro effettori. Nella spina dorsale questi tratti discendenti trasmettono impulsi da sette regioni principali e danno infine origine ai motoneuroni inferiori³.

Un singolo motoneurone può innervare molte fibre muscolari, le quali possono essere sottoposte a una gran quantità di potenziali di azione nel tempo necessario a una singola contrazione muscolare⁴.

L'interfaccia tra un motoneurone e la fibra muscolare è una particolare sinapsi anche chiamata GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE (NMJ).

Per effetto di una adeguata sollecitazione, il motoneurone rilascia un flusso di neurotrasmettitore acetilcolina dalle vescicole legate alla membrana plasmatica delle terminazioni assonali, il quale interagisce, poi, coi recettori post-sinaptici situati nella porzione terminale della miofibrilla (Fig. 4).

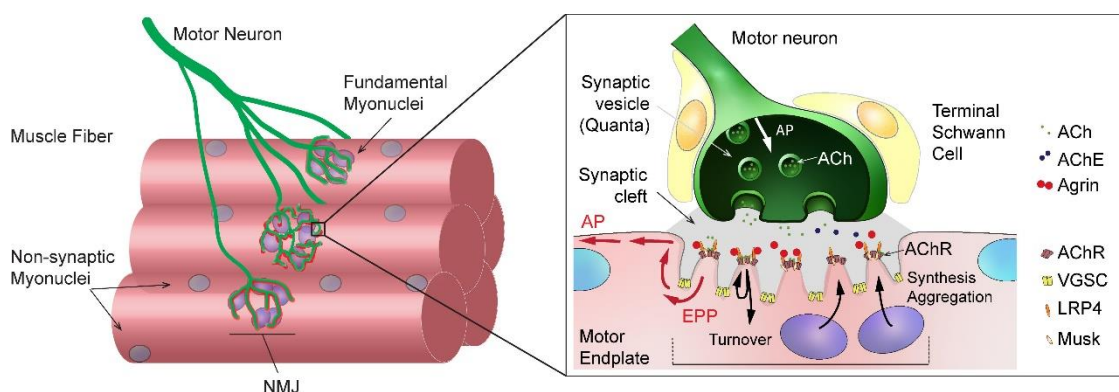


Figura 4 - Esempio di EJM. Da: The TOR Pathway at the Neuromuscular Junction: More Than a Metabolic Player?, Castets, Ham, Ruegg⁵

In seguito al legame con due recettori di acetilcolina vi è l'apertura del canale ionico che consente agli ioni sodio di fluire all'interno della cellula⁶.

Il flusso di sodio all'interno della cellula ne induce, di conseguenza, la depolarizzazione e attiva il potenziale d'azione del muscolo i cui tubuli a "T" del

sarcolemma rilasciano gli ioni calcio accumulati nel reticolo sarcoplasmatico; la combinazione di queste reazioni chimiche causa la contrazione del muscolo bersaglio.

1.4 Malattie che coinvolgono direttamente la Giunzione Neuromuscolare e i Motoneuroni

Prima di addentrarci nella descrizione dei processi di stampa 3D è importante comprendere quali siano le principali malattie per le quali si cerca una cura mediante l'utilizzo del tessuto ingegnerizzato.

Le seguenti patologie, infatti, hanno come tratto comune quello di coinvolgere direttamente la NMJ e motoneuroni. Esistono numerose patologie neuromuscolari spesso di origine genetica. Altre patologie che colpiscono il sistema neuromotorio possono invece essere dovute al risultato della combinazione genetica e dell'ambiente tipici dell'individuo⁷.

- Anche conosciuta come la malattia dei motoneuroni o Malattia di Lou Gehrig, la *SLA (Sclerosi Laterale Amiotrofica)* è una malattia neuromuscolare neurodegenerativa che comporta un progressivo danneggiamento o perdita dei motoneuroni, che controllano i muscoli volontari. Con la mancanza totale di nutrimento, quindi, si genera una degenerazione e quindi una cicatrizzazione o indurimento ("Sclerosi") del tessuto in zone definite "Laterali", ovvero nel midollo spinale in prossimità delle terminazioni nervose a ridosso dei muscoli. La peculiarità caratteristica della SLA è la morte sia dei motoneuroni superiori che inferiori e, nei casi della demenza frontotemporale indotta dalla stessa malattia, anche dei neuroni dei lobi temporale e frontale dell'encefalo.

Sebbene non sia ancora del tutto chiaro del perché della morte dei motoneuroni, la cosa che appare chiara è che la malattia scatena molti processi cellulari e molecolari diversi⁸ (Fig. 5).

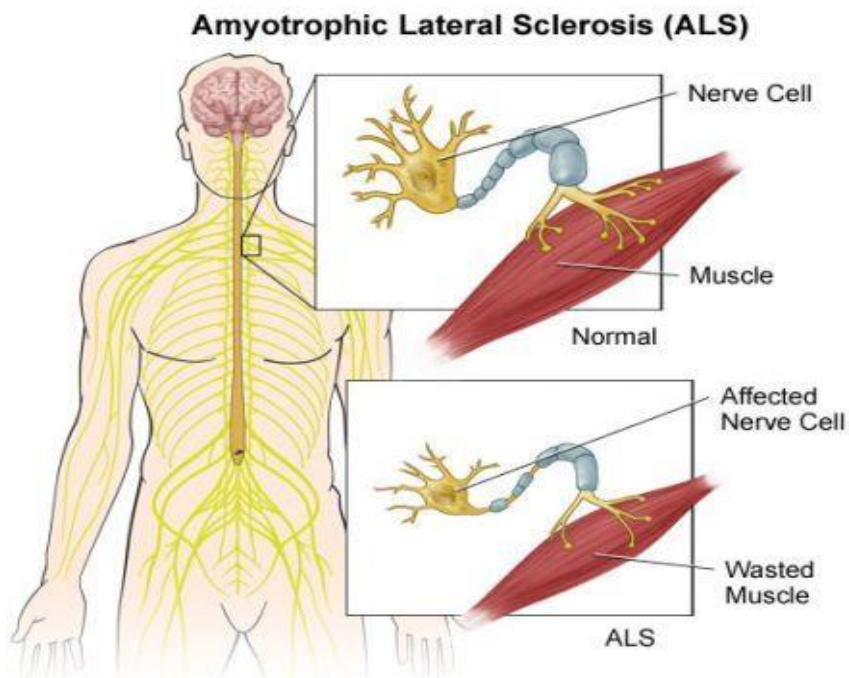


Figura 5 - Cellula Nervosa sana vs Affetta da SLA da: Istituto Guttmann

- Dal greco “sarx” carne e “penia” mancanza, la *sarcopenia* è una malattia contraddistinta dalla perdita di massa e tono muscolare tipica dell'invecchiamento. La sarcopenia è una malattia che procede per gradi i quali possono essere descritti semplicemente da: la quantità iniziale di massa muscolare del soggetto e il grado di perdita di massa muscolare, che varia molto in base a molteplici fattori legati all'ambiente e allo stile di vita del soggetto.⁹ Vi sono molteplici teorie riguardanti il meccanismo di modificazione del muscolo nella sarcopenia. Tali fattori possono essere legati a: anomala rigenerazione delle cellule satellite, modifiche nella trasmissione del segnale intercellulare attraverso la Giunzione Neuromuscolare, ossidazione delle proteine e infiammazione. In tutti i precedenti casi la conseguenza principale è la riduzione nella qualità del tessuto muscolare, come si evince dalla sostituzione di fibre muscolari con

grasso, al cambio di metabolismo muscolare e, soprattutto, a una degenerazione della giunzione neuromuscolare¹⁰ (Fig. 6).

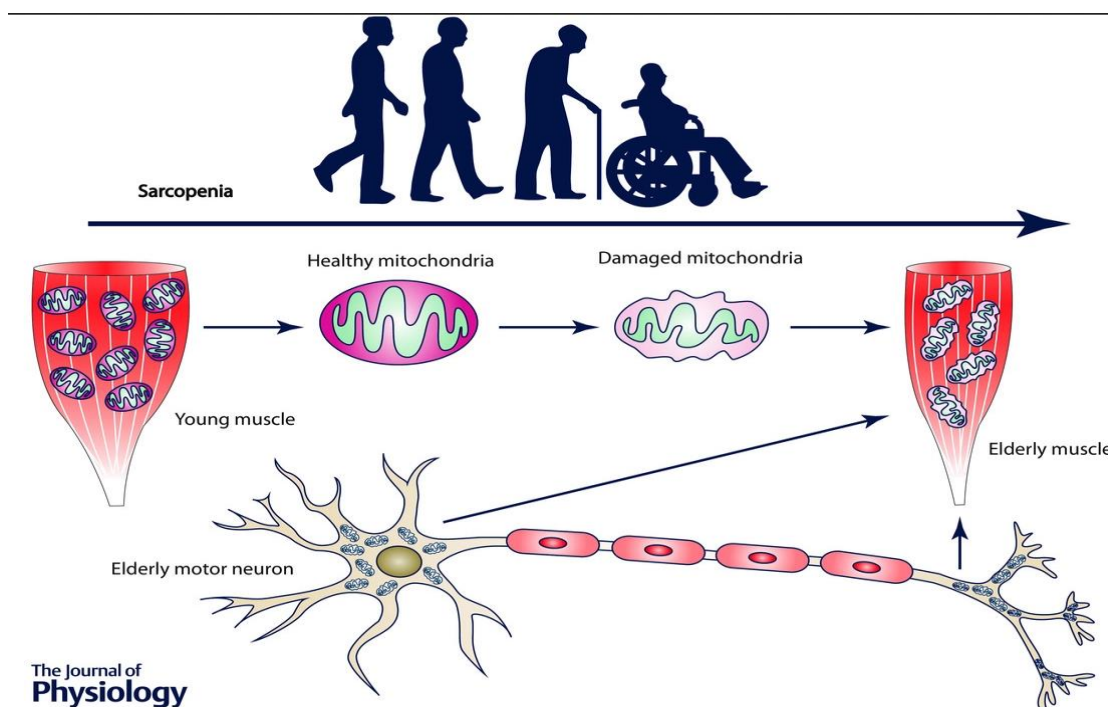


Figura 6-Panoramica sul moto-neurone nel soggetto anziano affetto da Sarcopenia¹¹ da: *The ageing neuromuscular system and sarcopenia: a mitochondrial perspective*. Rygiel, Karolina, A. Picard, Martin

- Con paraplegia si intende la paralisi di entrambi gli arti inferiori con eventuale interessamento del tronco dovute alle conseguenze delle sole lesioni del midollo spinale. ¹²La lesione comporta un taglio netto del midollo spinale. La sezione di sistema nervoso sotto-lesionale si priva di qualsivoglia attività nervosa, perciò, vengono meno tutti i movimenti volontari e attività riflesse somatiche e viscerali; si perde anche totalmente la sensibilità. La zona di danno nella spina dorsale che interessa la paraplegia pura è riscontrabile nell'area lombo sacrale. In quest'ultimo caso, a tutto ciò, possono coesistere segni di lesione anche del secondo motoneurone accanto al primo inducendo ampie aree di denervazione derivanti da danno delle corna anteriori o delle radici spinali.
- A differenza della paraplegia, che interessa gli arti inferiori, la tetra o quadri-plegia è la paralisi del torso e di tutti e quattro gli arti causata da una malattia o da un fenomeno traumatico. Vista la ampia diversificazione del tipo del danno e dalla differenziazione di tale sui sintomi la American Spinal Injury Association ha fornito una classificazione in base al danno:

lesione totale e lesione parziale del midollo spinale e di conseguente degenerazione di motoneuroni e giunzione neuromuscolare¹³ (Fig. 7).

| American Spinal Injury Association Impairment Scale | | |
|---|------------|---|
| A | Complete | No motor or sensory function is preserved in the sacral segments S4–S5. |
| B | Incomplete | Sensory function preserved but no motor function is preserved below the neurological level and includes the sacral segments S4–S5. |
| C | Incomplete | Motor function is preserved below the neurological level; more than half of key muscles below the neurological level have a muscle grade less than 3. |
| D | Incomplete | Motor function is preserved below the neurological level; at least half of key muscles below the neurological level have a muscle grade of 3 or more. |

Figura 7- Diversificazione del tipo del danno della tetraplegia da: A.S.I.A American Spinal Injury Assosiation

- La distrofia muscolare congenita è un insieme di condizioni patologiche la cui caratteristica comune è la debolezza muscolare ad insorgenza molto precoce. La diagnosi spesso si basa sulla la presenza di ipotonia muscolare già alla nascita. In generale, queste malattie hanno poco potenziale di progressione ma sono gravi sin dall'inizio, con una tendenza a manifestare contrazioni spontanee dei muscoli. La diagnosi viene effettuata in base all'osservazione delle tipiche manifestazioni cliniche e a esami diagnostici specifici in grado di evidenziare le alterazioni a carico del tessuto muscolare scheletrico, del sistema nervoso periferico e del sistema nervoso centrale. Questi esami possono variare in base alle manifestazioni cliniche e all'età del paziente e comprendono il dosaggio dell'enzima creatinichinasi nel sangue, la biopsia muscolare che mette in evidenza l'assenza della proteina merosina, l'elettromiografia che dimostra la presenza di una miopatia e di una neuropatia, la risonanza magnetica nucleare dell'encefalo che mostra anomalie cerebrali¹⁴.
- La miastenia gravis coinvolge selettivamente la muscolatura striata, causando debolezza muscolare, la cui gravità oscilla nel tempo e aumenta durante le attività fisiche⁷. Nella miastenia gravis, il sistema immunitario produce anticorpi che attaccano un tipo di recettore sul lato della giunzione neuromuscolare a contatto con il muscolo, il recettore che risponde al neurotrasmettitore acetilcolina. Di conseguenza, la comunicazione fra le cellule nervose e il muscolo viene interrotta¹⁵.

- Un ultimo esempio è la malattia di Charcot-Marie-Tooth (CMT), un gruppo di condizioni ereditarie che danneggiano i nervi periferici. È anche conosciuta come neuropatia ereditaria motoria e sensoriale o atrofia muscolare peroneale. È causata da mutazioni nei geni che sostengono o producono proteine coinvolte nella struttura e nella funzione dell'assone del nervo periferico o della guaina mielinica. Più di 40 geni sono stati identificati nella CMT ¹⁶.

CAPITOLO 2

2.1 Che cos'è la stampa 3D?

Con “Stampa tridimensionale 3D” si intende la realizzazione di oggetti tridimensionali mediante produzione additiva, partendo da un modello 3D digitale. Il modello digitale viene prodotto con software dedicati e successivamente elaborato per essere poi realizzato con diverse tecnologie, tra cui anche quella che costruisce prototipi strato dopo strato, attraverso una stampante 3D¹⁷.

Da ormai molti anni a questa parte le aziende di molteplici rami della scienza, dell'ingegneria e della produzione utilizzano i metodi di stampa tridimensionale per generare prodotti di grande qualità e ridurre il consumo di energia della tradizionale catena di montaggio. Nel settore sanitario, ad esempio, si utilizza la tecnologia di stampa 3D per creare articoli medicali come protesi e materiale organico per generare soluzioni ad hoc per pazienti specifici. La tecnologia di stampa 3D è la scelta perfetta per creare oggetti complessi utilizzando materiali e colorazioni diverse, come dettagliati modelli di cervello utilizzati per la formazione dei neurochirurghi. Per molti di questi settori, la stampa 3D significa un'accelerazione notevole nella generazione dei prototipi in questione, da molti giorni a poche ore. Questo riduce drasticamente la durata del ciclo di progettazione e facilita una più rapida immissione dei prodotti sul mercato e per la ricerca¹⁷.

Con i servizi di stampa 3D diretta, le aziende possono esternalizzare le proprie necessità di stampa semplicemente trasferendo il file della versione digitale del progetto le cui parti vengono stampate in 3D dall'azienda di servizi per essere poi rapidamente consegnate ai progettisti. I vantaggi della fabbricazione additiva rispetto alla manifattura tradizionale non possono essere ignorati.

Gli investimenti delle industrie in questa tecnologia rivoluzionaria crescono di anno in anno rivoluzionando il design e la produzione in quasi tutti i settori garantendo modelli ad altissima precisione, come quelli dedicati al campo biomedicale.

Un esempio virtuoso, ad esempio, è quello fornito dalla gomma sintetica Agilus30™ di Jacobs Foundation con la quale è possibile creare dei modelli con precisione pressoché uguale alla realtà di modelli complessi come quelli della vascolarizzazione intracranica. Questi prodotti vengono utilizzati dai neurochirurghi sia per far pratica, essendo anche le proprietà meccaniche identiche a quella del tessuto effettivo, o comunque per visualizzare nel dettaglio le varie problematiche derivanti da occlusioni o lacerazioni del tessuto¹⁸ (Fig. 8 e Fig. 9).



Figura 8- Esempio di occlusione in un modello intracranico stampato in 3D. Da: Agilus30 Improves Performance of Vascular Models. Application customer story: The Jacobs Institute

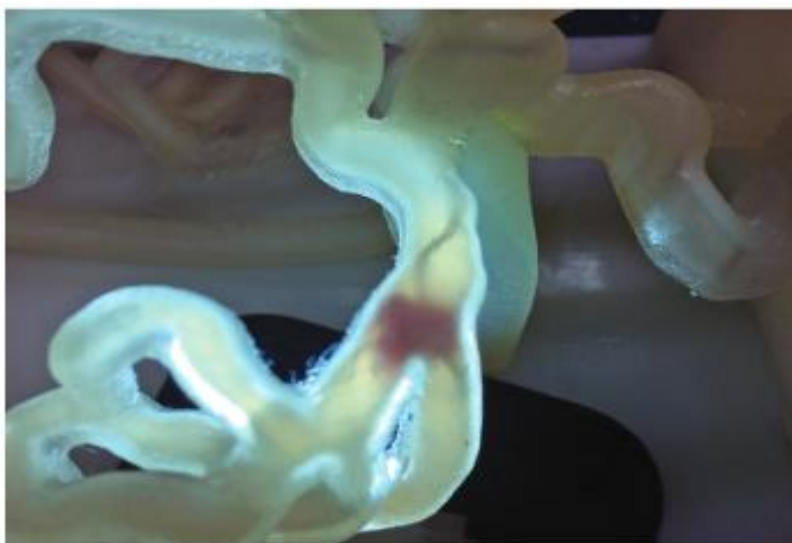


Figura 9- Modello 3D di tessuto vascolare con Agilus 30. Da: Agilus30 Improves Performance of Vascular Models. Application customer story: The Jacobs Institute

2.2 La produzione dello Scaffold

Una volta compreso cosa si intende per stampa 3D è ora d'obbligo focalizzarsi su cosa effettivamente sia importante creare per le applicazioni biomedicali argomento di questo elaborato.

Nella fattispecie ci si concentrerà sulla produzione degli "Scaffold" e degli "Hydrogel" prima di concentrarsi sull'effettivo utilizzo del 3D Bioprinting.

Gli scaffold sono composti da biomateriali tridimensionali il cui scopo è quello di sostenere la crescita delle cellule al loro interno. La combinazione di cellule e scaffold è detto costrutto. La generazione di un costrutto può avvenire sia in vitro prima dell'effettivo impianto dello stesso o, eventualmente, direttamente in vivo nel paziente¹⁶.

Per adempiere al suo scopo, gli scaffold devono quindi un ambiente favorevole a proliferazione, differenziamento e alla operatività cellulare, svolgendo svolge sia da supporto sia da guida per le cellule. Perciò nella scelta dello scaffold stesso bisognerà valutare alcune specifiche caratteristiche quali il grado di porosità per garantire sia l'integrazione sia la corretta vascolarizzazione del tessuto, l'utilizzo di materiali biodegradabili e bio-riassorbibili, nonché una superficie atta a garantire differenziamento e proliferazione cellulare¹⁹.

Le caratteristiche sopra citate rappresentano il requisito minimo per la produzione dei costrutti ingegnerizzati e, di conseguenza per la creazione di nuovo tessuto facendo ben riferimento a quale tipologia si intende andare a rigenerare, con l'accortezza di replicare il più possibile la matrice extracellulare nativa del tessuto d'interesse¹⁹ (Fig. 10).

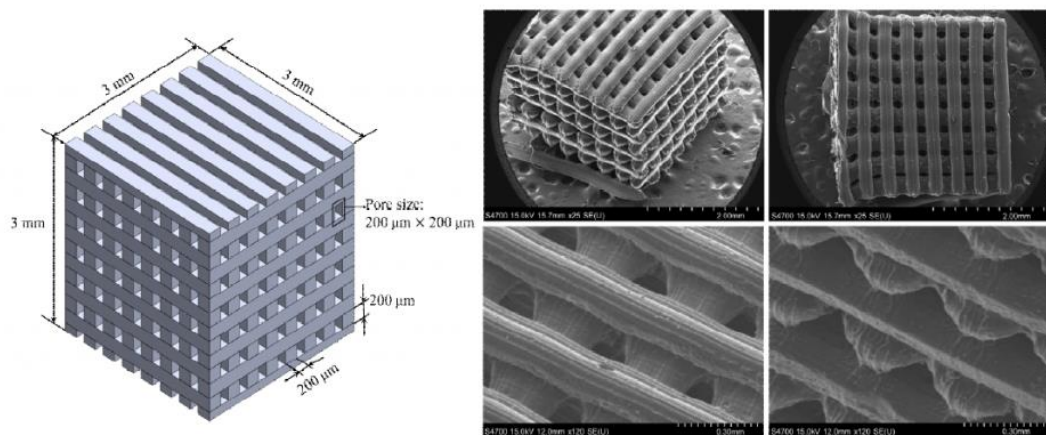


Figura 10- Esempio di scaffold tridimensionale. Nello specifico Design 3D dell'impalcatura cellulare (a sinistra) e immagini al microscopio elettronico a scansione (SEM) del prodotto stampato in 3D. Immagine via Kim, Lee & Yun

Gli *scaffold* utilizzati nell'ingegneria tissutale possono essere di natura e composizione diverse da cui, logicamente, derivano caratteristiche e impieghi differenti²⁰.

Ad esempio, i materiali sintetici permettono la creazione di *scaffold* incredibilmente differenziabile nelle loro caratteristiche meccaniche e fisiche, come la rigidità e la porosità, in base alle modifiche di natura chimica.

Va però sottolineato che, sebbene liberi da agenti patogeni, non godono di una spiccata biocompatibilità²¹.

Per la generazione di scaffold sintetici i componenti ad oggi più utilizzati ²⁰sono:

- L'acido Poli-Glicolico (PGA)
- L'acido Poli-Lattico (PLA)
- Una serie di co-polimeri

Tuttavia, vista la scarsa o comunque ridotta biocompatibilità, è di grande aiuto l'utilizzo di materiali naturali, i quali posseggono caratteristiche sicuramente più simili e più congeniali per la sopravvivenza e la replicazione cellulare delle cellule che saranno in seguito impiantate in essi.

Nell'ingegneria tissutale, infatti, è di largo utilizzo l'utilizzo della stessa matrice extracellulare assieme, ovviamente, al collagene naturale essendo il maggiore componente della stessa ECM²² assieme a fibrina, laminina e chitosano; ad oggi tali componenti si utilizzano per la rigenerazione di tessuto cutaneo di cartilagine e di tessuto cardiaco e in alcuni casi anche di tessuto osseo²³ (Fig. 11).

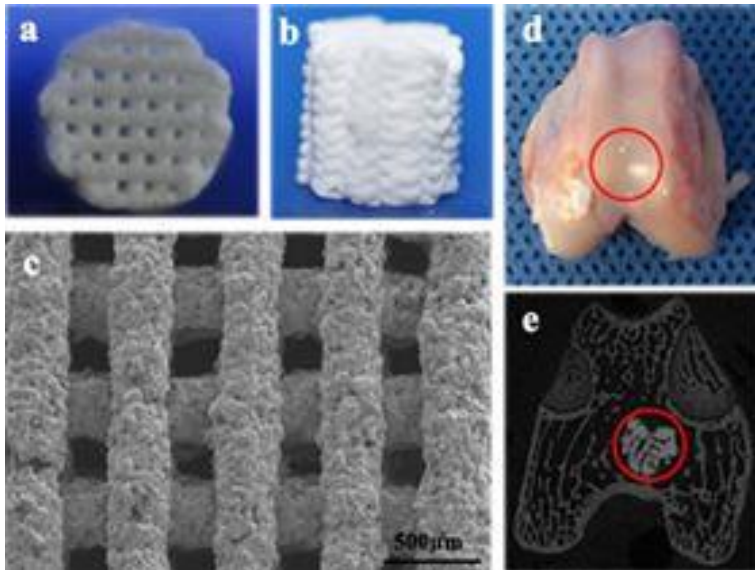


Figura 11- Cartilagine stampata in 3D sul proprio scaffold. Da: 3D-printed scaffolds support cartilage and bone growth

Infine, una menzione va fatta ai materiali decellularizzati.

Questi materiali sono tessuti espianati e trattati con agenti in grado di rimuovere la componente cellulare lasciando però intatta la ECM del tessuto nativo. Il grande vantaggio è quello di poter mantenere una struttura pressoché identica e quindi perfettamente biocompatibile.

Spesso a seconda dell'applicazione che lo *scaffold* deve avere, si sceglie di combinare più materiali insieme proprio per poter ottenere la miglior struttura possibile.

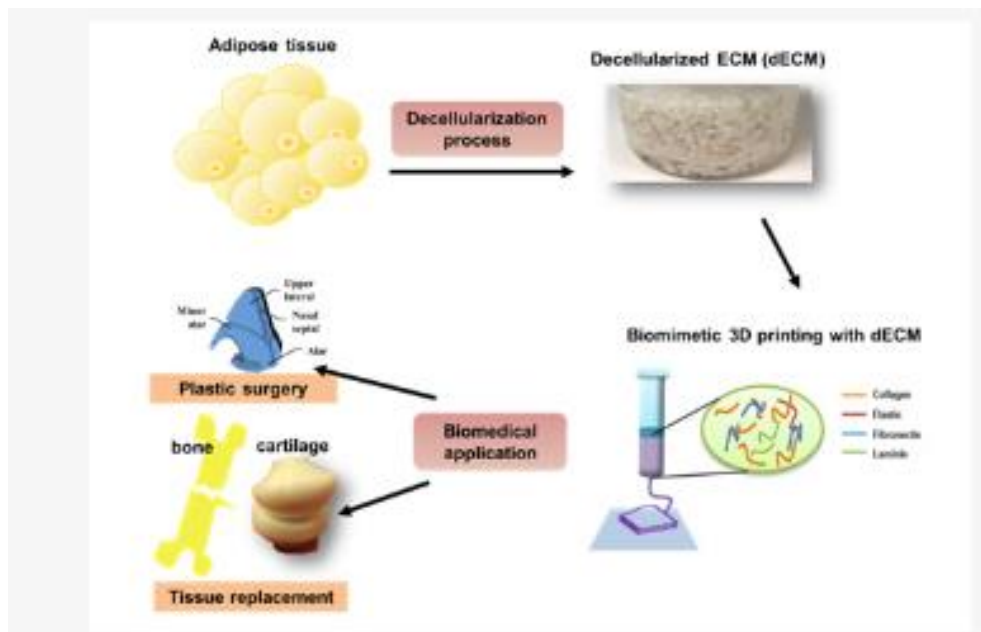


Figura 12- La stampa 3D mediante l'uso di ECM. Da: Extracellular Matrix and 3D printing N.Kim²²

2.3 La produzione degli Hydrogel

Gli *hydrogels* sono polimeri tridimensionali idrofili che sono in grado di assorbire grandi quantità di acqua o fluidi biologici. Essi vengono utilizzati principalmente come biosensori, trasportatori di farmaci o *scaffold* nell'ingegneria tissutale.

Per assumere la loro forma solida, i polimeri che andranno a comporre gli *hydrogels*, vanno incontro a un processo definito di cross-linking basato sulle caratteristiche chimiche intrinseche delle catene polimeriche ²⁴ (maggiori dettagli sul cross-linking saranno descritti nel paragrafo 2.4).

Tali gel possono essere classificati a seconda della natura dei polimeri che li compongono, alla carica degli ioni componenti, alla sintesi e alla tipologia di cross-linking utilizzato²⁵.

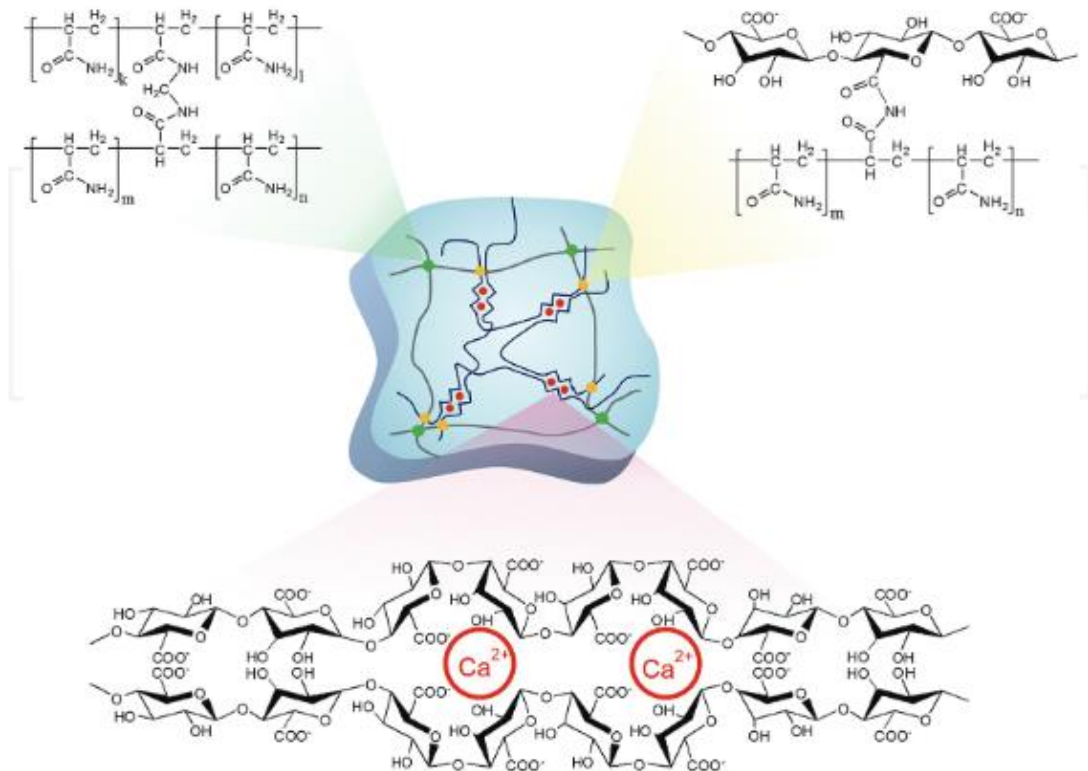


Figura 13- Formazione di idrogel in situ mediante reticolazione chimica e interazione ionica tra alginato e calcio ioni di calcio. Da: *An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications*.

Gli hydrogel derivanti da materiali naturali vengono utilizzati per la creazione di scaffold che garantiscono sia un'ottima biocompatibilità sia una buona biodegradabilità²⁶. Come polimeri si utilizzano prevalentemente quelli composti da proteine, come il collagene, gelatina e fibrina, ma anche da proteine geneticamente modificate come la proteina legata al calcio nota come calmodulina; talora anche mischiate a acido ialuronico (HA), l'agarosio e il chitosano²⁶.

Gli hydrogel sintetici, invece, grazie alla loro facilità e economicità di produzione sono candidati molto interessanti nell'ingegneria tissutale in quanto permettono la creazione di strutture molecolari e di morfologia microscopica in maniera precisa e veloce. Molti di essi sono di origine naturale, ad esempio, alginato e gelatine o sintetici come i polimeri policaprolattone (PCL), polietilenglicole (PEG), Pluronic (Fig.23). Per di più, garantiscono una quasi totale modificabilità della propria struttura e, perciò, si adattano a qualsiasi applicazione sperimentale del

materiale. Di contro, i polimeri sintetici mancano di porzioni bioattive, fondamentali per l'adesione cellulare alla membrana extracellulare²⁶.

Infine, gli hydrogel *ibridi*, combinano i vantaggi dei precedenti due gel sopracitati garantendo sia una buona biocompatibilità dai primi sia una spiccata versatilità dei secondi.

Per quanto riguarda la loro composizione elettro-chimica gli hydrogel, inoltre, possono essere distinti in Non ionici, ovvero privi di carica, Anionici e Cationici sulla base della presenza di carica elettrica situata sulle catene reticolate, e in omopolimerici, copolimerici e multipolimerici in base alla composizione polimerica.

I primi sono caratterizzati da una rete polimerica composta da un unico monomero, che ne definisce l'unità strutturale di qualsiasi conformazione reticolata.

I secondi sono composti da reti di più specie di monomeri caratterizzati da almeno una componente idrofila, disposte in una configurazione casuale, a blocchi o alternata lungo la catena della rete polimerica.

Infine gli ultimi, chiamati compenetranti multipolimero, sono costituiti da due polimeri indipendenti interlacciati almeno parzialmente, anche se non legati tra loro da alcun legame covalente²⁷ (Fig. 14).

Figura 14- Proprietà degli Hydrogels. Da *Hydrogel : classification , properties , preparation and technical features*.

| Physical properties | Materials | Approaches | Applications and performance | References |
|---------------------|---|--|---|--|
| Mechanical strength | GelMA | Chitin nanofibers, Nanoparticles blending | Strain-to-failure increased 200% after chitin nanofiber assembly; stiffness of collagen-based hydrogel increased 10-fold after addition of functionalized nanoparticles. | Jaiswal et al., 2015; Hassanzadeh et al., 2016 |
| | PAMPS/PDMAAm | Double network | High strength PAMPS/PDMAAm gel could induce spontaneous hyaline cartilage regeneration in the osteochondral defect. | Yasuda et al., 2009; Fukui et al., 2014 |
| Stiffness | RGD modified alginate, agarose, and PEGDA | Tuning of Ca ²⁺ or polymer concentration | Intermediate stiffness promoted the osteogenic differentiation of murine MSCs. | Huebsch et al., 2010 |
| | Four-arm maleimide-functionalized PEG and four-arm thiol-functionalized PEG | By using different PEG concentration | The proliferation, self-renewal and vascular differentiation of stem cells were enhanced in lower stiffness hydrogel. | Mahadevaiah et al., 2015 |
| | MeHA | Tuning of macromer concentration or UV exposure time | Low stiffness of HA hydrogel promoted chondrogenic differentiation of MSCs. Highly crosslinked HA hydrogel promoted hypertrophic conversion of encapsulated MSCs. | Bian et al., 2013 |
| | Gel-HPA | Altering macromer and/or H ₂ O ₂ concentration | Medium stiffness showed superior stimulus for maintaining of chondrogenic phenotype, high stiffness promoted collagen type II gene expression. | Wang et al., 2014 |
| | GelMA | Using the same macromer concentration with different methacryloyl substitution | High stiffness environment was beneficial for maintaining of chondrogenic gene expression. | Li et al., 2016 |
| Stress relaxation | RGD-alginate | Tuning of stress-relaxation by using alginate with different molecular weight or PEG spacer | Fast stress relaxation promoted MSC spreading and osteogenic differentiation. | Chaudhuri et al., 2016 |
| | Alginate | Same as above | Slow relaxing environment restricted cell volume expansion, up-regulated the gene related to matrix degradation and cell death. | Lee et al., 2017 |
| | HA, Collagen I | Dynamic crosslinking of HA-ALD and HA-BLD, combined with collagen | Fast relaxation promoted cell spreading and focal adhesion formation. | Lou et al., 2018 |
| Self-healing | Glycol chitosan, benzaldehyde functioned PEG | Reversible Schiff-base reaction | Self-healing hydrogel could increase proliferation and neural differentiation of neural stem cells, and enhanced capillary inducing capacity of vascular endothelial cells. | Tseng et al., 2015; Hsieh et al., 2017 |
| | | Dynamic acylhydrazone bond and DA click covalent crosslinking | Increasing the viability, decreasing apoptosis of MSCs and promoting bone regeneration | Lü et al., 2017 |
| Degradation | GelMA | Collagenase degradable photocrosslinked gelatin hydrogel | Valvular interstitial cells had more spreading morphology in collagenase treated GelMA hydrogel than untreated hydrogel. | Benton et al., 2009 |
| | Sulfated HA | Slowing the degradation of HA hydrogel by sulfated modification | The low degradation was beneficial for chondrogenesis of MSCs. | Feng et al., 2017 |
| | HA functionalized with both maleimide and methacrylate | Thiol-ene crosslinking via MMP degradable crosslinker and photocrosslinking | Differentiation of MSC was directed by degradation-mediated cellular traction. | Khetan et al., 2013 |
| | PEG-derivative | Hydrogel crosslinked by PEG derivative containing nitrobenzyl ether moieties could be degradable by photo exposure. | MSC spreading was enhanced after photodegradation. | Kloxin et al., 2010 |
| | PEG-derivative | Modification of ends of PEG with oligo (lactic acid) and acryloyl, hydrolysis of the ester bonds altered the degradation | The high degradation enhanced osteogenesis of MSCs. | Peng et al., 2018 |

Le applicazioni degli *hydrogel* in campo biomedico sono diverse e comunemente vengono usati come materiali per la medicazione delle ferite, per la rigenerazione muscolare e neuro-muscolare grazie soprattutto alla capacità di convertire stimoli elettrochimici in lavoro meccanico e alla loro risposta fisiologica di emulare le contrazioni e le secrezioni degli organi umani se sottoposti a modificazioni ambientali come cambi di temperatura e pH ²⁸.

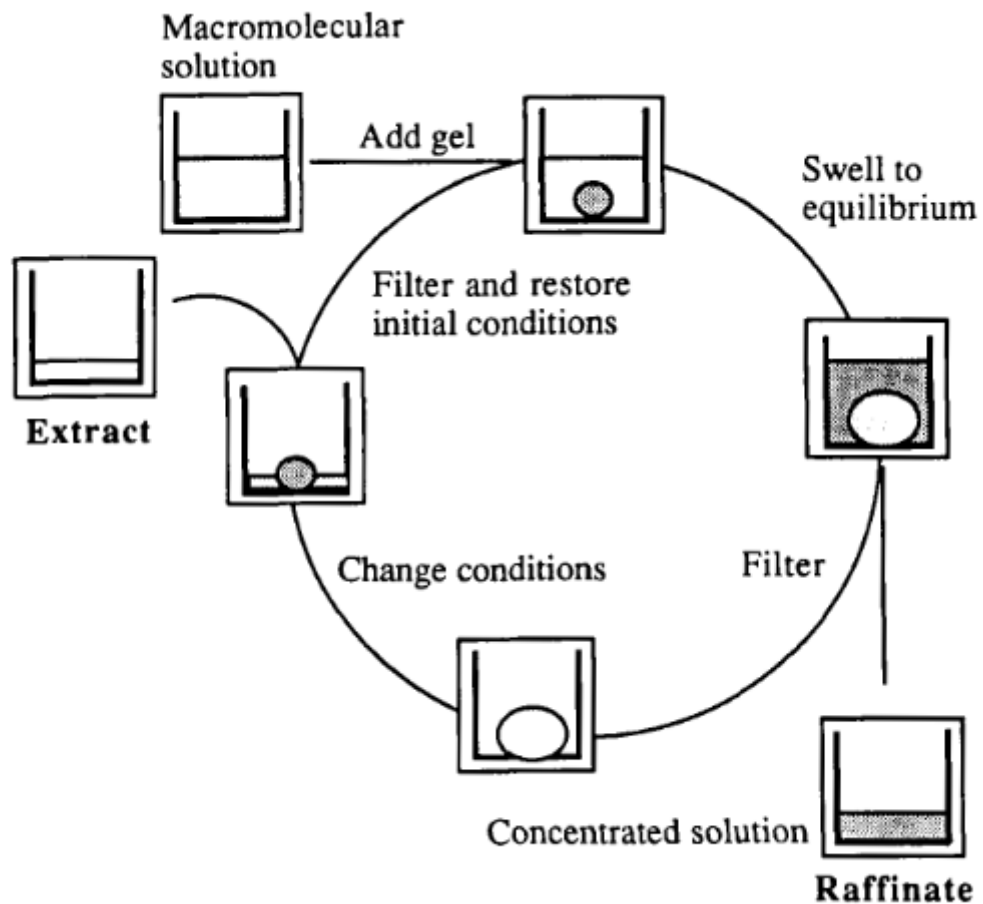


Figura 15-Estrazione e purificazione dell'Hydrogel²⁹ Da: Marchetti, M. & Cussler, E. L. *Hydrogels As Ultrafiltration Devices*. Sep. Purif. Rev. **18**, 177–192 (1989)

2.4 Il Crosslinking

Per completezza è importante menzionare il processo di crosslinking per la creazione degli hydrogels.

Il processo del crosslinking consiste nel far reagire fisicamente o chimicamente i gruppi funzionali delle catene polimeriche con gli agenti reticolanti e formare quindi una sorta di rete tridimensionali³⁰.

Il crosslinking non è solo definibile come una mera proprietà degli hydrogel, ma come ragione definente delle altre proprietà del materiale²⁷.

Le due principali procedure che caratterizzano il crosslinking sono quella fisica e quella chimica (Fig. 16); in base alla scelta della procedura è possibile modificare e ottimizzare le proprietà fisico-meccaniche del materiale modificandone il reticolo.

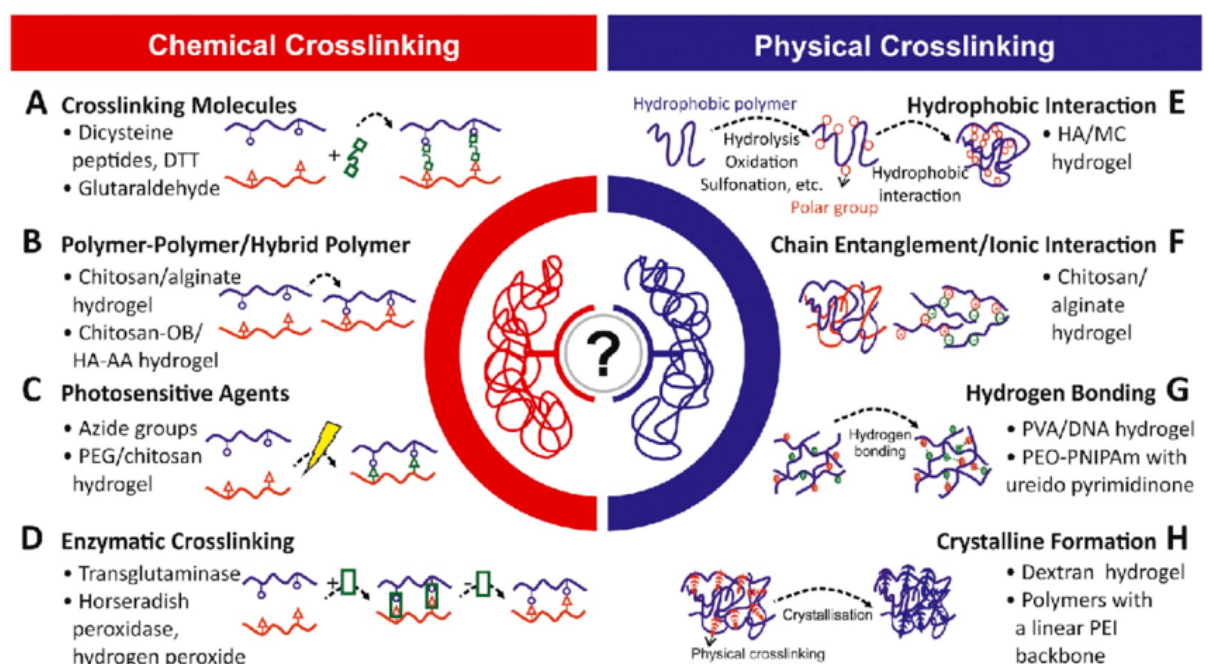


Figura 16- Tipologie di Crosslinking. Da: *Neural tissue engineering with structured hydrogels in CNS models and therapies*³¹

Gli hydrogel a crosslinking chimico sono caratterizzati dalla presenza di forti e permanenti legami covalenti tra i polimeri costituenti a differenza dei deboli legami del crosslinking fisico.

Al contrario il crosslinking fisico prevede interazioni deboli ionico/elettrostatiche, idrofiliche/fobiche che derminano la formazione di stereo-complessi.

Grazie all'assenza di agenti chimici, il crosslinking fisico riduce possibili problematiche associate alla citotossicità.

Le proprietà fisico-meccaniche dell'Hydrogel dipendono quindi dal peso molecolare oltre che dalla concentrazione da tempertatura della soluzione acquosa in relazione alla temperatura di congelamento e dal numero di cicli congelamento-scongelamento³².

Infatti, gli hydrogel possono essere prodotti utilizzando entrambi i metodi, promuovendo la transizione solido-gel in determinate condizioni di temperatura fabbricandoli trattandoli termicamente a una temperatura critica per la transizione di fase solido-gel³².

Vantaggi e svantaggi dei due metodi di crosslinking sono esemplificati sinteticamente nella seguente tabella (Fig. 17).

| <i>Metodi di crosslinking</i> | <i>Vantaggi</i> | <i>Svantaggi</i> |
|-------------------------------|--|--|
| <i>Fisico</i> | <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Sicuro</i> 2. <i>Poco tossico per le cellule</i> 3. <i>Basso costo</i> 4. <i>Minima reazione tissutale dopo il processo di crosslinking</i> | <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Crea legami deboli</i> 2. <i>Può comportare alterazioni al materiale</i> 3. <i>Lunghe tempistiche di reazione</i> 4. <i>Controllo minimo della cinetica di reazione</i> 5. <i>Scarso grado di crosslinking</i> |
| <i>Chimico</i> | <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Crea legami molto forti</i> | <ol style="list-style-type: none"> 2. <i>Può essere tossico per le cellule</i> 3. <i>Richiede lavaggi per rimuovere residui chimici</i> 4. <i>Costi elevati</i> |

Figura 17- Vantaggi e Svantaggi di Crosslinking fisico e Chimico da Oryan A e colleghi International journal of biological macromolecules ³³.

Infine, va fatta menzione di un ulteriore metodo inoltre ampiamente utilizzato per la formazione di hydrogel ovvero il photo-crosslinking.

Le reazioni di fotopolimerizzazione, da cui il nome, avvengono attraverso l'utilizzo della luce UV per cui le molecole fotosensibili dei materiali organici foto-iniziatori vengono esposte per la creazione di un sistema polimerico reticolato (Fig. 18).

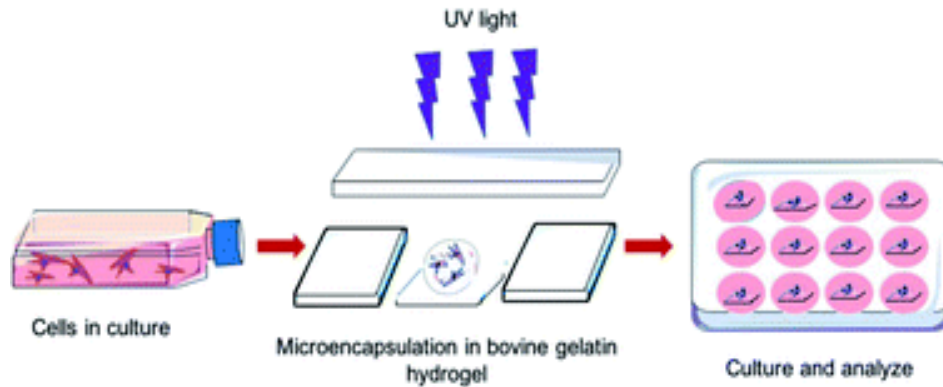


Figura 18- Sintesi e caratterizzazione di un Hydrogel Photocrosslinkabile ³⁴

Rispetto ai metodi di crosslinking fisico o chimico, il photo-crosslinking presenta i vantaggi di una maggiore velocità e controllo spaziale nel processo fabbricativo con la possibilità di modulare il calore per la creazione di gel a temperatura ambiente, decisamente più adatti per l'inserimento cellulare³⁵.

CAPITOLO 3

3.1 3D Bioprinting metodi di stampa

Una volta compresi Scaffold, Hydrogels e Crosslinking è d'obbligo menzionare quali tipologie effettive di stampa tridimensionale vengono ad oggi utilizzate per la creazione di tessuto tridimensionale ingegnerizzato.

Il bioprinting è una tecnologia di fabbricazione 3D mediata dal preciso utilizzo di biomateriali carichi di cellule per la costruzione di tessuti viventi complessi e funzionali o, anche, di interi organi artificiali. Nei tempi moderni, sebbene ancora nelle sue fasi iniziali, le strategie di stampa tridimensionale hanno dimostrato il loro fondamentale utilizzo nella medicina rigenerativa per generare un'ampia varietà di tessuti trapiantabili, tra cui pelle, cartilagine e osso. Tuttavia, gli attuali approcci di bioprinting incorrono ancora in sfide tecniche limitatamente a deposizione e distribuzione di cellule con alta precisione, nonché alla vascolarizzazione e innervazione all'interno di tessuti 3D complessi.

In combinazione con i recenti progressi nello studio delle cellule staminali pluripotenti umane, i modelli di tessuto tridimensionale ingegnerizzato potrebbero servire come piattaforma per lo screening di farmaci predittivi ad alta produttività e per terapie rigenerative più efficaci³⁶.

Per ora nessuna tecnica di bioprinting permette la risoluzione di tutte le problematiche e criticità riguardanti la complessità dei tessuti sintetici nel tentativo di mimare quelli naturali.

Le tre principali tecniche di bioprinting cioè a getto d'inchiostro, a laser, e ad estrusione hanno ciascuna specifici punti di forza, e specifiche limitazioni.

- Il bioprinting a getto d'inchiostro è stata la prima tecnologia di bioprinting ed è molto simile alla tradizionale stampa a getto d'inchiostro 2D. Una soluzione composta da un Hydrogel a base polimerica con cellule incapsulate al proprio interno viene inserita in quella che può essere considerata la "cartuccia". Essa è poi collegata alla testina di stampa della stampante 3D e adempie alla funzione di bioinchiostro; tale processo di stampa è interamente controllato

elettronicamente. Nel mezzo del processo di stampa, le testine della stampante, progettate per mezzo di un materiale piezoelettrico sono deformate per mezzo di variazioni di temperatura di un controllore termico e, quindi, sollecitate per generare gocce di dimensioni controllabili (Fig. 19). I vantaggi della stampa a getto d'inchiostro includono da una parte il basso costo di stampa e una velocità di stampa piuttosto elevata poiché le testine possono essere collocate in parallelo. A questo si aggiunge, come dimostrato dai dati sperimentali, un ottimo grado di vitalità cellulare, tra l'80% e il 90% delle cellule inserite nell'inchiostro. Gli utilizzi principali della stampa 3D a inkjet riguardano l'ingegnerizzazione dei tessuti come vasi sanguigni, ossa, cartilagini e neuroni³⁷.

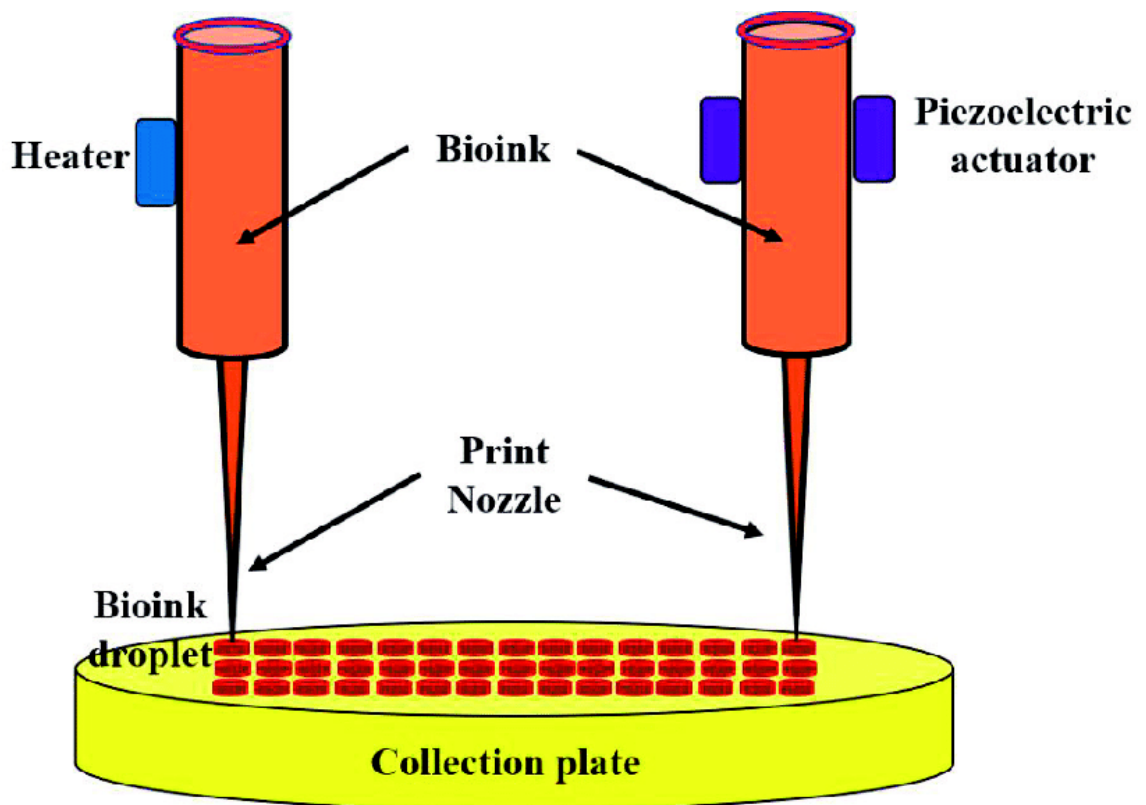


Figura 19- Processo di stampa 3D a inkjet. Da 3D Printed Bioscaffolds for Developing Tissue-Engineered Constructs Roy Chowdhury, Shiplu Lokanathan

- La stampa laserjet ha avuto origine dalle tecnologie di scrittura diretta del laser e di trasferimento indotto dal laser. La parte fondamentale della tecnologia laser-assistita è uno strato definito "donatore" che risponde alla stimolazione del fascio laser. Lo strato donatore comprende una struttura "a nastro" contenente uno strato di materiale metallico, generalmente titanio o

oro, che assorbe energia sulla parte superiore e uno strato di soluzione a bioinchiostro in una sospensione posizionata sul fondo. Durante il processo di stampa, un impulso laser focalizzato viene applicato per stimolare una piccola area dello strato adibito all'assorbimento energetico. Questo impulso laser vaporizza una parte dello strato donatore, creando una bolla ad alta pressione in prossimità dello strato di bioink e spingendo verso il basso il bioink sottostante. La goccia di bioink che cade viene raccolta sul substrato ricevente e successivamente viene crosslinkata. Rispetto alla stampa a getto d'inchiostro, la stampa laser può evitare il contatto diretto tra il dispenser e i bioinchiostri. Questo metodo di stampa senza contatto non causa alcun tipo di stress fisico/meccanico alle cellule, il che si traduce in un'elevata vitalità cellulare superiore al 95%. Inoltre, la stampa laser-assistita, a differenza della versione a getto, può anche stampare materiali altamente viscosi consentendo l'utilizzo di più tipi di bioinchiostri che nella stampa a getto d'inchiostro. Queste caratteristiche del bioprinting a laser sono promettenti, ma gli effetti collaterali dell'esposizione laser sulla cellula non sono ancora pienamente compresi e ciò rende questa modalità sicuramente molto efficiente piuttosto rischiosa³⁸.

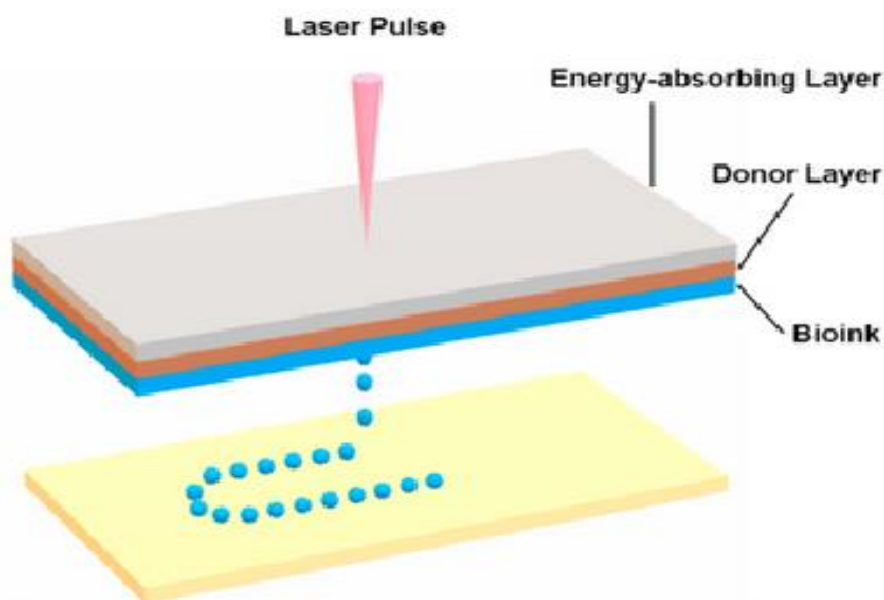


Figura 20- Processo di stampa 3D a Laser Da: *Bioprinting 3D nell'ingegneria tissutale per applicazioni mediche: Il classico e l'ibrido Xie*.³⁹

- La stampa tridimensionale a estrusione è una modifica diretta della stampa a getto d'inchiostro il cui fine è quello di riuscire a stampare i materiali più

viscosi, che le stampanti a getto d'inchiostro non possono utilizzare. La stampa a estrusione, quindi, utilizza una pompa ad aria compressa o uno stantuffo meccanico a vite per erogare i bioinchiostri applicando una forza continua che permette una stampa basata su linee cilindriche ininterrotte piuttosto che una singola goccia di bioink.⁴⁰ Quasi tutti i tipi di soluzioni di prepolimeri di idrogel di varia viscosità così come gli aggregati ad alta densità sono i principali biomateriali con i quali si può lavorare grazie alla stampa ad estrusione. Principale svantaggio, tuttavia, delle stampanti a estrusione è la sollecitazione fisica e meccanica a cui sono sottoposte le cellule dei bioinchiostri (Fig. 21).

Un confronto esaustivo di questi approcci è fornito nella tabella a pagina seguente (Fig. 22).

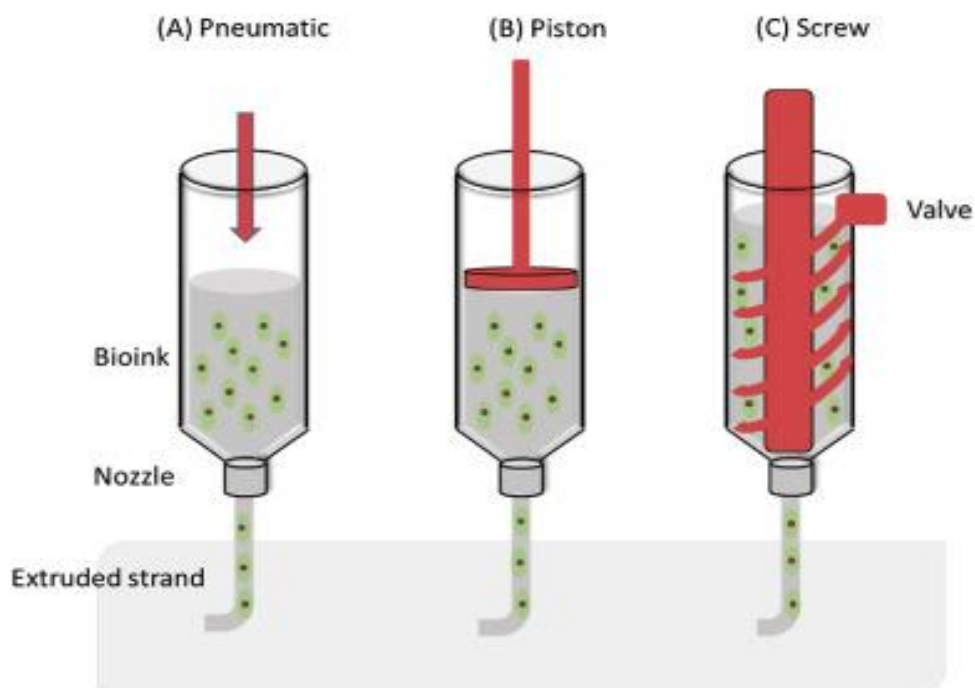


Figura 21- Processo di stampa 3D per estrusione. Da: An overview of extrusion-based bioprinting with a focus on induced shear stress and its effect on cell viability. Hussein, Boularoui.⁴¹

Figura 22- Tabella esemplificativa dei Pro e dei Contro di ogni tipologia di stampa 3D. Da: 3D bioprinting for engineering complex tissues³⁵

| Parameters | Inkjet | Laser-assisted | Extrusion |
|--------------------------------------|---|--|--|
| Cost | Low | High | Moderate |
| Cell viability | > 85% | > 95% | 40% – 80% |
| Print speed | Fast | Medium | Slow |
| Supported viscosities | 3.5 to 12 mPa/s | 1 to 300 mPa/s | 30 mPa/s to above 6×10^7 mPa/s |
| Resolution | High | High | Moderate |
| Quality of vertical structure | Poor | Medium | Good |
| Cell density | Low $< 10^6$ cells/mL | Medium $< 10^8$ cells/mL | High (Cell spheroids) |
| Representative materials for bioinks | Alginate, PEGDMA, Collagen | Collagen, Matrigel | Alginate, GelMA, Collagen |
| Reported applications | Tissue Engineering Blood Vessel, Bone, Cartilage | Tissue Engineering Blood Vessel, Bone, Skin | Tissue Engineering (Blood Vessel, Bone, Cartilage, Neuron, Muscle, Tumor) |

3.2 I Bioinchiostri e le Cellule Biostampate

Il 3D Bioprinting, con i metodi prima spiegati, è una strategia estremamente promettente per progettare strutture di tessuto tridimensionali con strutture e geometrie definite con precisione utilizzando cellule viventi e biomateriali.

I bioink sono una componente essenziale della stampa tridimensionale in questo ambito e consistono tipicamente di biomateriali (come gli Hydrogel, cellule, o aggregati cellulari, o loro combinazioni).

Nonostante i numerosi sforzi compiuti per progredire nella tecnologia della bio-stampa, lo sviluppo di bio-inchiostri appropriati che colmino in modo soddisfacente le esigenze della bio-stampa, per quanto riguarda le proprietà meccaniche, reologiche e biologiche è stato finora limitato.

In compenso, sta diventando sempre più comune l'utilizzo di aggregati cellulari per preparare i bio-inchiostri con il target di effettuare la fabbricazione di tessuti privi di scaffold⁴².

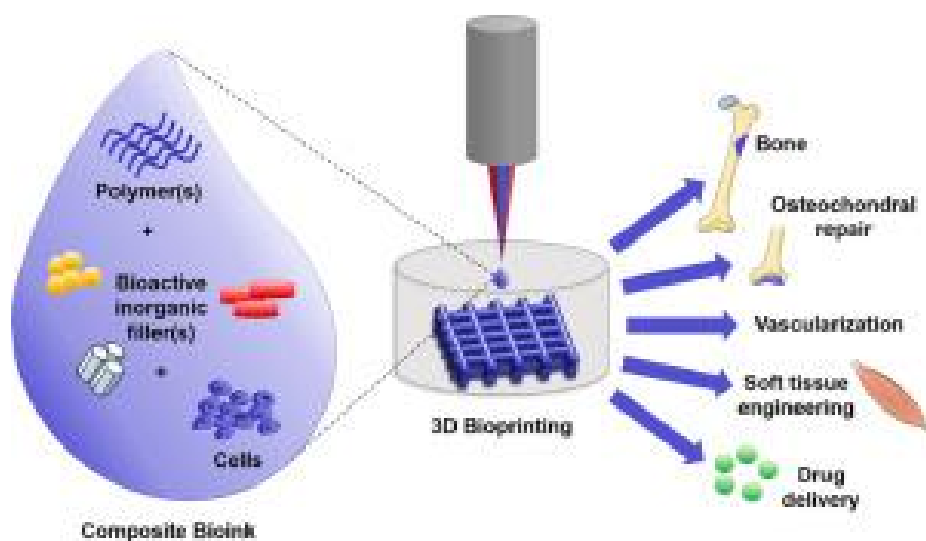


Figura 23- Utilizzo dei Bioinks compositi. Da: *Advancing bioinks for 3D bioprinting using reactive fillers: A review*⁴³

Una seconda importante considerazione va poi fatta sulla possibilità di generare cellule cosiddette "Biostampate".

Per formare le repliche di un tessuto o di un organo su scala macroscopica, le cellule dei bioinchiostri devono poter proliferare.

Due fattori principali sono considerati quando si selezionano le cellule per il bioprinting:(1) quanto le cellule biostampate possano aver caratteristiche

fisiologiche simili alle cellule in vivo, e (2) fino a che punto le cellule biostampate possono mantenere o sviluppare le loro funzioni in vivo sotto microambienti ottimizzati. I tessuti artificiali sono “seminati” usando cellule primarie funzionali con cellule di supporto o cellule staminali, preventivamente coltivate in vitro, per un'ulteriore differenziazione ⁴³.

La stampa diretta di cellule primarie può aumentare rapidamente la complessità del bioprinting. Dal momento che più tipi di cellule incorporate all'interno dello stesso, o di diversi, Hydrogels devono essere stampate in parallelo, è necessario l'utilizzo di diverse tipologie di bioinchiostri anche per una singola stampa. Ciò comporta che l'allineamento in tempo reale e il controllo delle fasi di stampa siano piuttosto complicati, poiché ogni cambio tra i bioinchiostri ha la possibilità di introdurre errori nel processo di bioprinting. La stampa con cellule staminali di solito riduce il numero totale di bioinchiostri usati per una data stampa, ma non esclude complicazioni. Formulazioni aggiuntive di bioink con diversi fattori di crescita e piccoli segnali possono essere desiderabili per tentare di guidare la differenziazione sito-specifica (Fig. 24).

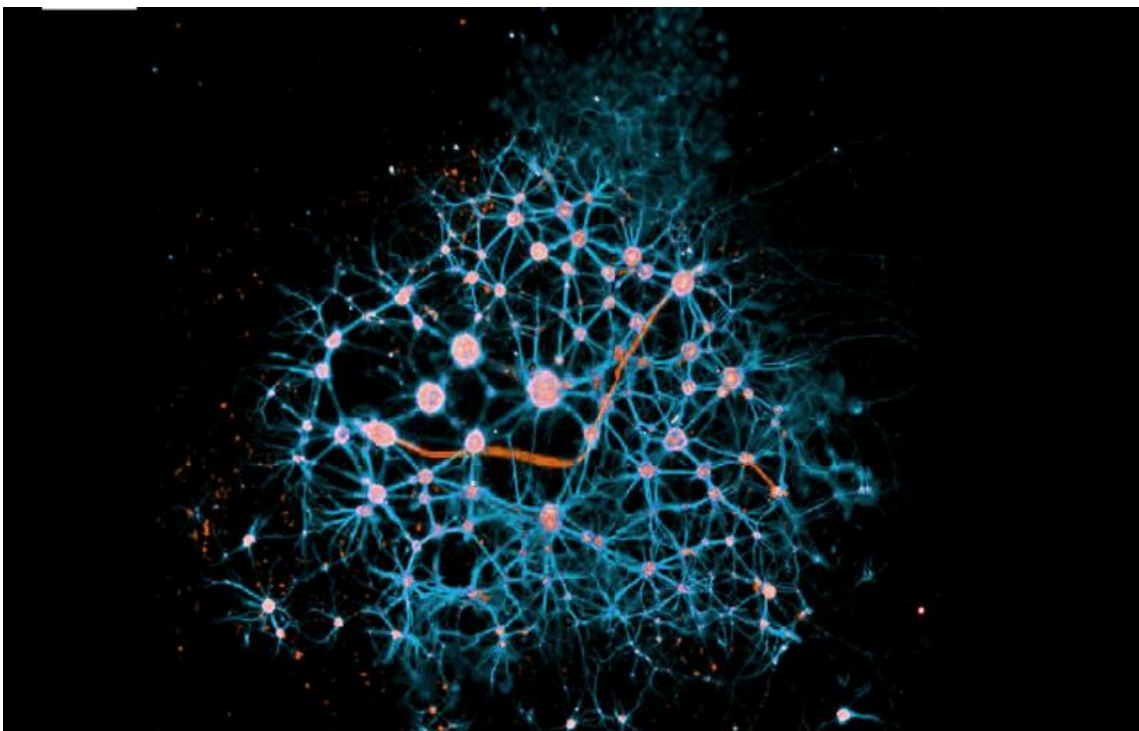


Figura 24-Neuroni primari bio-stampati dopo l'incubazione per 14 giorni. Le cellule hanno sviluppato proiezioni assionali e hanno formato reti interconnesse. Da: 3D printing media network

3.3 La stampa tridimensionale di tessuto neuromuscolare

È arrivato ora il momento di chiederci, una volta compresi i metodi di stampa tridimensionale e come vengono preparati e utilizzati i bio-inchiostri, come sia possibile procedere per cercare di produrre un tessuto neuromuscolare ingegnerizzato adatto alla cura delle malattie neurodegenerative.

Ad oggi, manca un modello affidabile in vitro di NMJ per studiarne la fisiologia e la patogenesi, nonché per fornire una piattaforma adeguata allo studio dei trattamenti delle malattie. Il target principale è quello di far sì che i tessuti sintetici riescano a integrarsi con il sistema nervoso dell'ospite, e il bioprinting è il miglior mezzo a disposizione per generare nuovo tessuto nervoso o per garantire l'innervazione del tessuto dei costrutti ingegnerizzati. Ad esempio, è riportato il caso della stampa di un innesto nervoso sintetico usando cellule staminali di midollo osseo e cellule di Schwann di topo che sono state fuse in tubi di 500 μm di diametro e poi caricati in una stampante 3D che ha formato un denso condotto nervoso tubulare di cellule di Schwann circondato da cellule staminali del midollo osseo⁴⁴. Già da queste prime fasi, come ci si aspettava, si è riusciti a stampare innesti eseguiti in modo simile ai tessuti di controllo che risultano essere alquanto promettenti.

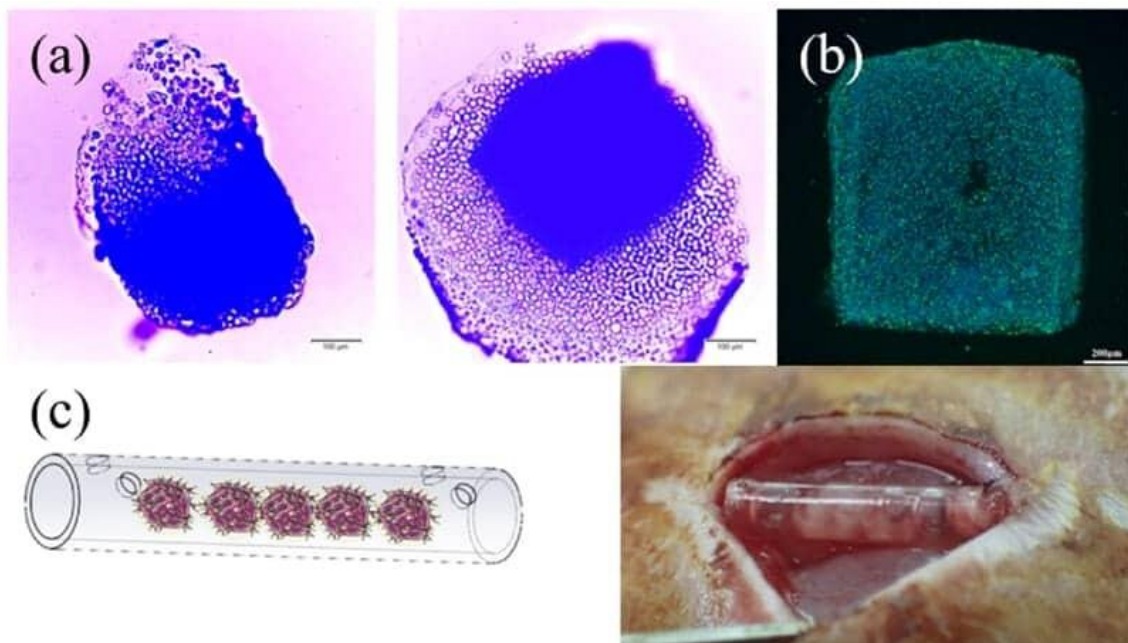


Figura 25- (a) Blocchi di cellule di Schwann 3D ; (b) Vita/Morte delle cellule di Schwann in 3D dopo 3 giorni di coltura; (c) schema dei blocchi di cellule di Schwann nei condotti in PU stampati in 3D e l'impianto nell'animale. Da: Dr. YiWen Chen - 3D Printing for Peripheral Nerve Regeneration⁴⁵

Gli esperimenti forniti da B. Lorber hanno fornito un'ulteriore importante convalida sulla fattibilità della stampa di cellule del sistema nervoso, mostrando che le cellule gangliari e gliari della retina di ratto possono essere replicate in sistemi di stampa a getto d'inchiostro⁴⁶. Pateman e Harding hanno, invece, utilizzato una tecnica a microsterolitografica per stampare condotti di guida del nervo a base di PEG per studi di riparazione del nervo ottenendo stampati con una risoluzione più fine rispetto a quelli fatti attraverso i metodi precedentemente utilizzati⁴⁷ (Fig. 26).

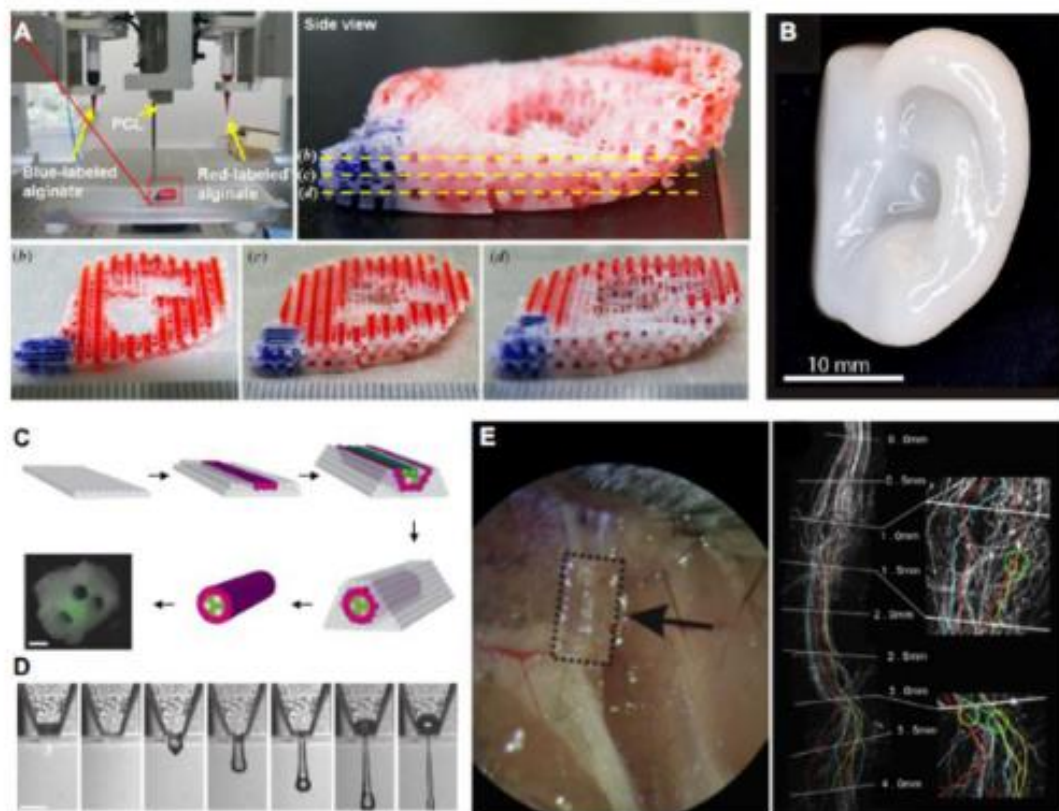


Figura 26- (A) Stampa a forma di orecchio in PCL e impalcature di alginato con bioinks localizzato a determinati tessuti regioni (Lee et al. 2014). (B) Scaffolds cartilaginei per orecchie stampati usando un nuovo bioink in nanocellulosa-alginato supportato condrociti umani (Markstedt et al. 2015). (C) Fabbricazione di un innesto nervoso sintetico stampando tubi densi di cellule di Schwann e BSMC (Owens et al. 2013). (D) Dimostrazione della fattibilità della stampa del ganglio e cellule gliali del topo (Lorber et al. 2014). (E) Stampato in PEG di condotti di guida per il nervo per studi di riparazione nervosi, mostrando la loro biocompatibilità ed efficacia (Pateman et al. 2015). Figura adattata da (Owens et al. 2013; Lee et al. 2014; Lorber et al. 2014; Markstedt et al. 2015; Pateman et al. 2015).

Di seguito presentiamo un metodo per superare alcune delle sfide in relazione all' innevamento dei muscoli bioingegnerizzati. Alcune ricerche hanno già confermato in precedenza che i MN derivanti da cellule staminali embrionali (ESC) hanno raggiunto proprietà elettrofisiologiche identiche a quelle dei MN spinali originali.

Ciò, quindi, apre le porte alla possibilità di integrare MN in un sistema cellulare e ottenere all' uscita strutture pressoché identiche a una funzionale NMJ. Un design di tessuto prodotto con un compattatore a forma ad anello ha permesso la formazione di una co-cultura fisiologica neurone-muscolo con un maggior potenziale di innervazione in 3D, mentre un sistema di fabbricazione a stereolitografia ha fornito spunto fisico e supporto strutturale per la maturazione e la sinergia di entrambi i neuroni e i muscoli in un sistema tissutale ingegnerizzato⁴⁸ (Fig. 27). Permettendo ai due principali tipi di cellule di differenziarsi in parallelo prima di combinarli in un sistema di co-cultura, si è stati in grado di creare una piattaforma flessibile in cui cellule e tessuti possono essere combinati con impalcature stampate in 3D in modo intuitivo e facile da usare per i ricercatori.

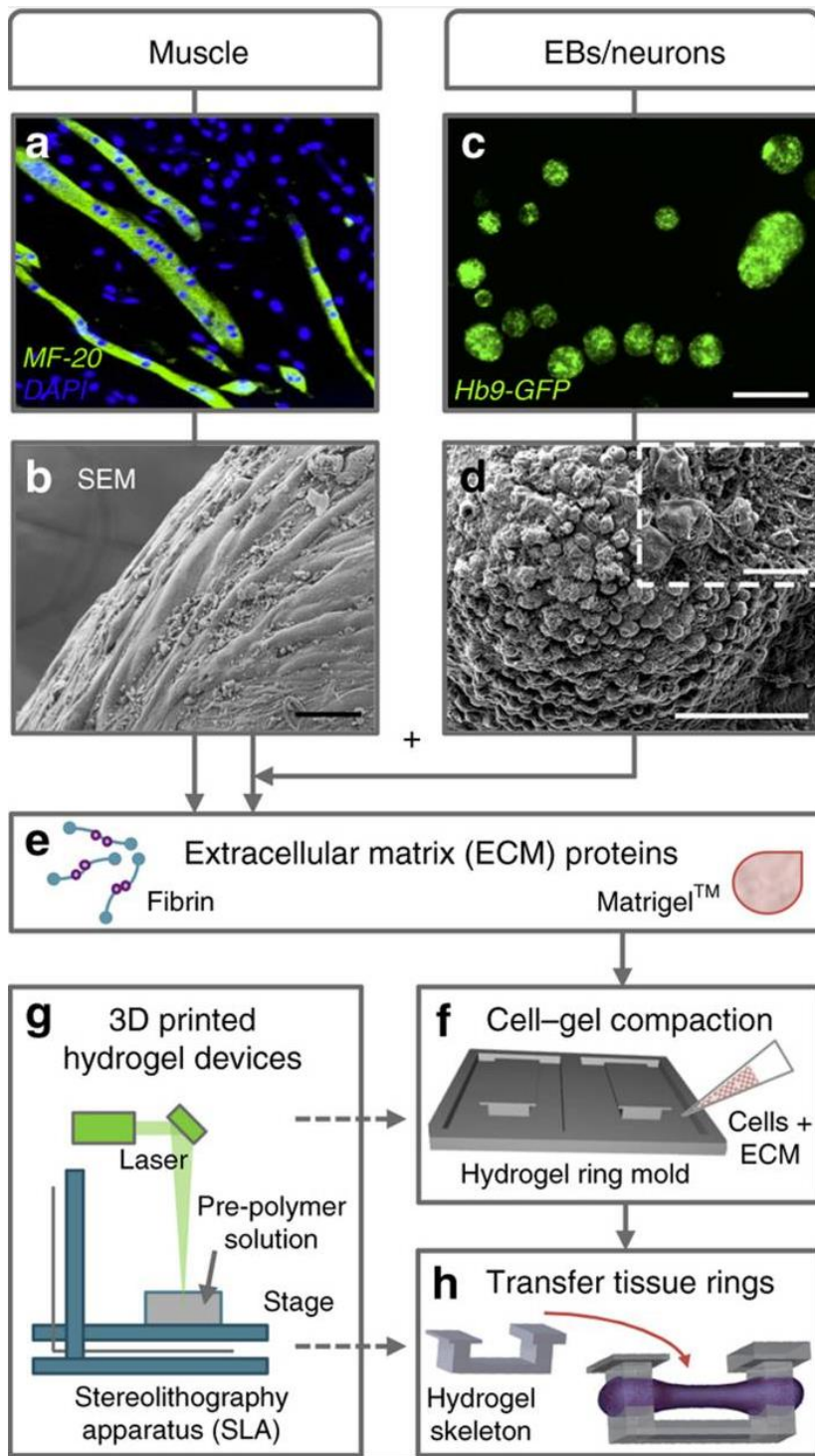


Figura 27- Le cellule del muscolo scheletrico e i motoneuroni sono stati combinati in un sistema di co-cultura 3D. I mioblasti C2C12 sono stati differenziati in miotubi multinucleati (a) e combinati con proteine della matrice extracellulare (ECM) per creare un tessuto ad anello muscolare ingegnerizzato (b). In parallelo, le cellule staminali embrionali di topo (HBG3 mESCs) sono state differenziate in motoneuroni (MNs) attraverso la formazione di corpi embrionali (EBs) (c e d) e poi combinati con il tessuto muscolare ingegnerizzato e proteine ECM (e) su dispositivi idrogel stampato in 3D (f e g). Una volta che gli anelli multistrato sequenzialmente compattato e fuso insieme, sono stati poi posti su uno scheletro idrogel stazionario (h). Barre di scala, 50 μm (b e d), 500 μm (c), e 10 μm (d, inserto). Da: ⁴⁸

3.4 Il collagene marino come coadiuvante per la stampa 3D di MN e NMJ

Abbiamo capito che la tecnologia della stampa tridimensionale offre l'opportunità ideale per la fabbricazione di tessuti in vitro molto efficienti. Tutto ciò grazie a modelli ad alta precisione con il posizionamento di biomateriali e cellule per la creazione di modelli permanenti di tessuto ideali per lo screening dei farmaci e la modellizzazione delle malattie⁴⁹.

Questi modelli in vitro hanno ampie applicazioni nella ricerca clinica, ad esempio nello sviluppo di terapie personalizzate per contrastare i neurodegeneratori di malattie attive, inclusa la sclerosi laterale amiotrofica (SLA)⁵⁰, grazie alla possibilità di condurre indagini sul ruolo della sinaptogenesi nella degenerazione neurale e come piattaforma per i test farmacologici.

Nel lavoro di Sanz e colleghi, vi è la stampa 3D coassiale dei mioblasti scheletrici e delle cellule dei motoneuroni per formare un modello di NMJ strutturato in vitro. Nel procedimento viene utilizzato come "shell" un bioink contenente collagene di pesce⁵¹.

Considerando che i mioblasti e i motoneuroni sono circondati da microambienti differenti in situ, questa organizzazione specifica è stata utilizzata per supportare l'adattamento di ciascun bioink a ciascun particolare tipo di cellula incorporata, combinandoli in un'unica struttura ben organizzata.

Si è perciò ipotizzato che le cellule dei motoneuroni estendessero i propri neuriti dallo strato della "shell" verso la periferia dello strato centrale, dove sono localizzati i mioblasti scheletrici stabilendo contatti muscolo-neurone motorio formando nuove NMJs⁵².

È stata inoltre dimostrata la capacità del collagene animale estratto dalla pelle di pesce di sostenere la sopravvivenza e la differenziazione delle cellule neurali, grazie soprattutto a lavori preliminari che hanno mostrato una proliferazione migliore delle cellule nei composti di collagene (Fig. 28). Tale processo di ingegnerizzazione ha infatti provato che il tessuto neurale in strutture collagene-

fibrina sostiene correttamente le cellule di Schwann e promuove la crescita di neuriti in vitro⁵³.

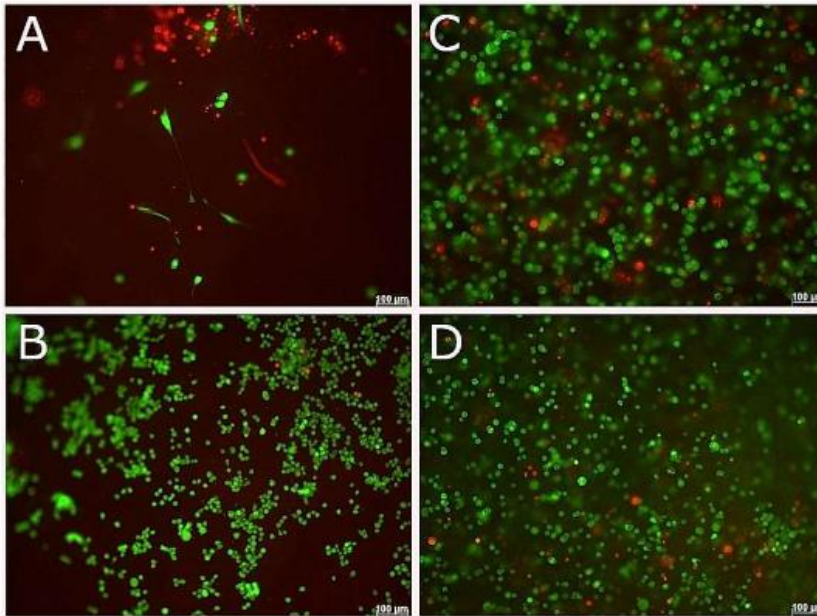


Figura 28- Immagini Vita/Morte di cellule neuronali incapsulate o seminate in superficie su collagene di pesce 2,5/mL reticolato UV per 12 s a 12mW/cm². Immagini dal vita/morte sulla superficie seminata al collagene di pesce metacrilato al giorno 7 (A, B) e incapsulato in collagene di pesce metacrilato al giorno 21 (C, D). Le righe in alto e in basso corrispondono alle cellule coltivate con mezzi di differenziazione e mezzi di crescita, rispettivamente. Le barre della scala rappresentano 100 µm.

Nel futuro prossimo, grazie a ulteriori studi e applicazioni per l'uso biomateriali per la coltura di cellule neurali tridimensionali, si apriranno nuove strade all'incorporazione del collagene di pesce in sistemi di incapsulamento più complessi. I collagene marini offrono un'alternativa interessante ai materiali animali terrestri di uso comune ma essendo un prodotto naturale di origine animale, la variazione da un lotto di produzione all'altro è inevitabile.

Il collagene geneticamente modificato può costituire un'alternativa che supera tale limite⁵¹.

I biomateriali ingegnerizzati ideali dovrebbero imitare le proprietà dei tessuti naturali. L'ECM del cervello contiene un'alta percentuale di glicosaminoglicani e una quantità minore di collagene e altre proteine fibrose rispetto ad altri tessuti. Ciò premesso, i compositi di collagene che incorporano collagene marino con altri materiali possono fornire ambienti più adatti per la modellazione neuronale. È evidente la necessità di apportare modifiche per migliorare le caratteristiche fisiche degli Hydrogel di collagene al fine di ottimizzare la stampa delle

impalcature cercando di incrementare le proprietà meccaniche del collagene di pesce.

Tutto ciò porterebbe alla stampa tridimensionale di soli gel carichi di cellule neurali come impalcature coassiali che imitano i sistemi fisiologici, mettendo in connessione cellule simil-neuroni motori a cellule muscolari scheletriche contenuti in un materiale ottimizzato per consentire la formazione di miofibrille di muscolo scheletrico.

La maggiore differenziazione delle cellule dei motoneuroni in prossimità delle miofibre scheletriche negli scaffold coassiali ha un netto e definito parallelismo nella biologia dello sviluppo, per cui la presenza di mioblasti è nota per aumentare lo sviluppo delle giunzioni neuromuscolari.

Oltre alla sua composizione, le proprietà meccaniche di un biomateriale influenzano la proliferazione cellulare, garantendone la sopravvivenza, la migrazione e la differenziazione. I biomateriali per la coltura di cellule neurali dovrebbero mirare ad imitare la rigidità del tessuto cerebrale naturale, relativamente bassa, compresa tra 100 e 1500 Pa. Il collagene di pesce metacrilato rientra in questo intervallo con un modulo di stoccaggio di 250 Pa per il gel da 2,5 mg/mL consentendo di imitare, post stampa tridimensionale, una rigidità uguale a quella dei tessuti neuronali ⁵¹.

BIBLIOGRAFIA

1. Catala, M. & Kubis, N. *Gross anatomy and development of the peripheral nervous system. Handbook of Clinical Neurology* vol. 115 (Elsevier B.V., 2013).
2. Frontera, W. R. & Ochala, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Behav. Genet.* **45**, 183–195 (2015).
3. Zagrean, L. Principles of Neural Science. *Acta Endocrinol.* **10**, 529–529 (2014).
4. Russell, P. Biology-Exploring the Diversity of Life.
5. Castets, P., Ham, D. J. & Rüegg, M. A. The TOR Pathway at the Neuromuscular Junction: More Than a Metabolic Player? *Front. Mol. Neurosci.* **13**, (2020).
6. Tortora, G. J., Derrickson, B. Muscular Tissue. *Princ. Anat. Physiol.* (2011).
7. Mary, P., Servais, L. & Vialle, R. Neuromuscular diseases: Diagnosis and management. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* **104**, S89–S95 (2018).
8. Brown RH, A.-C. A. 'Amyotrophic Lateral Sclerosis'. *N. Engl. J. Med.* (2017).
9. TJ, M. 'Sarcopenia: causes, consequences, and preventions'. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* (2003).
10. Ryall JG, Schertzer JD, L. G. 'Cellular and molecular mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and weakness'. *Biogerontology* (2008).
11. Rygiel, K. A., Picard, M. & Turnbull, D. M. The ageing neuromuscular system and sarcopenia: a mitochondrial perspective. *J. Physiol.* **594**, 4499–4512 (2016).
12. Scelsi, R., Poggi, P. & Pavia, U. Patologia muscolare da lesione del primo motoneurone. **1**, 17–24 (2010).
13. Roberts, T.T.; Leonard, G. R. . 'Classifications in Brief: American Spinal Injury Association (ASIA) Impairment Scale'. (2017).
14. Oliveira, J., Freixo, J. P., Santos, M. & Coelho, T. LAMA2 Muscular

- Dystrophy. *GeneReviews*® (2020).
15. MIMOMOLINA, I. Miastenia Gravis. *Rev. Neuropsiquiatr.* **27**, 16–27 (1964).
 16. Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M. & Rybak, Z. Stem cells: Past, present, and future. *Stem Cell Res. Ther.* **10**, (2019).
 17. Ford, S. & Minshall, T. Invited review article: Where and how 3D printing is used in teaching and education. *Addit. Manuf.* **25**, 131–150 (2019).
 18. Siddiqui, A. Agilus30 Improves Performance of Vascular Models. Application customer story: The Jacobs Institute. 2.
 19. Sachlos, E., Czernuszka, J. T., Gogolewski, S. & Dalby, M. Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur. Cells Mater.* **5**, 29–40 (2003).
 20. Costa, A., Naranjo, J. D., Londono, R. & Badylak, S. F. Biologic scaffolds. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **7**, 1–23 (2017).
 21. Lavik, E. & Langer, R. Tissue engineering: Current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 1–8 (2004).
 22. Kim, N.-S. Extracellular Matrix and 3D printing. *Curr. Trends Biomed. Eng. Biosci.* **2**, 75–77 (2017).
 23. Sealy, C. 3D-printed scaffolds support cartilage and bone growth. (2018).
 24. Chai, Q., Jiao, Y. & Yu, X. Hydrogels for biomedical applications: Their characteristics and the mechanisms behind them. *Gels* **3**, (2017).
 25. Bahram, M., Mohseni, N. & Moghtader, M. An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications. *Emerg. Concepts Anal. Appl. Hydrogels* (2016) doi:10.5772/64301.
 26. Zhu, J. & Marchant, R. E. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Rev. Med. Devices* **8**, 607–626 (2011).
 27. Garg, S. & Garg, A. Hydrogel : classification , properties , preparation and technical features. *Asian J. Biomater. Res.* **2**, 163–170 (2016).
 28. Gehrke, S. H., Andrews, G. P. & Cussler, E. L. Chemical aspects of gel extraction. *Chem. Eng. Sci.* **41**, 2153–2160 (1986).
 29. Marchetti, M. & Cussler, E. L. Hydrogels As Ultrafiltration Devices. *Sep. Purif. Rev.* **18**, 177–192 (1989).
 30. Oryan, A., K. Current knowledge and future directions of crosslinked

engineered.

31. George, J., Hsu, C. C., Nguyen, L. T. B., Ye, H. & Cui, Z. Neural tissue engineering with structured hydrogels in CNS models and therapies. *Biotechnol. Adv.* **42**, (2020).
32. Hu, W., Wang, Z., Xiao, Y., Zhang, S. & Wang, J. Biomaterials Science MINIREVIEW Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels. *Cite this Biomater. Sci* **7**, 843 (2019).
33. Oryan, A., Kamali, A., Moshiri, A., Baharvand, H. & Daemi, H. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. *Int. J. Biol. Macromol.* **107**, 678–688 (2018).
34. Suvarnapathaki, S., Nguyen, M. A., Wu, X., Nukavarapu, S. P. & Camci-Unal, G. Synthesis and characterization of photocrosslinkable hydrogels from bovine skin gelatin. *RSC Adv.* **9**, 13016–13025 (2019).
35. Williams, J. L. R. Photopolymerization and photocrosslinking of polymers. *Photochemistry* 227–250 (2006) doi:10.1007/bfb0051134.
36. Mandrycky, C., Wang, Z., Kim, K. & Kim, D. H. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnol. Adv.* **34**, 422–434 (2016).
37. Chang, R., Emami, K., Wu, H. & Sun, W. Biofabrication of a three-dimensional liver micro-organ as an in vitro drug metabolism model. *Biofabrication* **2**, (2010).
38. Nahmias, Y., Schwartz, R. E., Verfaillie, C. M. & Odde, D. J. Laser-guided direct writing for three-dimensional tissue engineering. *Biotechnol. Bioeng.* **92**, 129–136 (2005).
39. Xie, Z., Gao, M., Lobo, A. O. & Webster, T. J. 3D bioprinting in tissue engineering for medical applications: The classic and the hybrid. *Polymers (Basel)*. **12**, (2020).
40. Khalil, S. & Sun, W. Biopolymer deposition for freeform fabrication of hydrogel tissue constructs. *Mater. Sci. Eng. C* **27**, 469–478 (2007).
41. Boularaoui, S., Al Hussein, G., Khan, K. A., Christoforou, N. & Stefanini, C. An overview of extrusion-based bioprinting with a focus on induced shear stress and its effect on cell viability. *Bioprinting* **20**, (2020).
42. Jakab K, Damon B, Neagu A, K. A. and F. G. Biorheology.
43. Heid, S. & Boccaccini, A. R. Advancing bioinks for 3D bioprinting using

- reactive fillers: A review. *Acta Biomater.* **113**, 1–22 (2020).
44. Owens, C. M., Marga, F., Forgacs, G. & Heesch, C. M. Biofabrication and testing of a fully cellular nerve graft. *Biofabrication* **5**, (2013).
 45. Dr. YiWen Chen. 3D Printing for Peripheral Nerve Regeneration.
 46. Barbara, L., Wen-Kai, H., Ian, M. & Keith, R. Adult Rat Retinal Ganglion Cells and Glia Can Be Printed by Piezoelectric Inkjet Printing. *Biofabrication* **6**, (2014).
 47. Pateman, C. J. *et al.* Nerve guides manufactured from photocurable polymers to aid peripheral nerve repair. *Biomaterials* **49**, 77–89 (2015).
 48. Cvetkovic, C., Rich, M. H., Raman, R., Kong, H. & Bashir, R. A 3D-printed platform for modular neuromuscular motor units. *Microsystems Nanoeng.* **3**, (2017).
 49. Ma, X. *et al.* 3D bioprinting of functional tissue models for personalized drug screening and in vitro disease modeling. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **132**, 235–251 (2018).
 50. Guo, X. *et al.* A Human-Based Functional NMJ System for Personalized ALS Modeling and Drug Testing. *Adv. Ther.* **3**, 2000133 (2020).
 51. Sanz, B. *et al.* Light cross-linkable marine collagen for coaxial printing of a 3D model of neuromuscular junction formation. *Biomedicines* **9**, 1–19 (2021).
 52. Ngan, C. *et al.* 3D Bioprinting and Differentiation of Primary Skeletal Muscle Progenitor Cells. *Methods Mol. Biol.* **2140**, 229–242 (2020).
 53. Schuh, C. M. A. P., Day, A. G. E., Redl, H. & Phillips, J. An Optimized Collagen-Fibrin Blend Engineered Neural Tissue Promotes Peripheral Nerve Repair. *Tissue Eng. - Part A* **24**, 1332–1340 (2018).