



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

“LE SUPERFICI BIOMIMETICHE NELL'INGEGNERIA TISSUTALE”

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Laureando: Enrico Bressan

ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023

Data di laurea 18/07/2023

Indice

Abstract	pagina 4
Introduzione	pagina 5
Capitolo 1: Le superfici biomimetiche e le loro applicazioni	pagina 6
1.1 Proprietà superficiali	pagina 6
1.1.1 Bagnabilità	pagina 6
1.1.2 Struttura delle superfici superidrofobiche	pagina 7
1.2 Superfici speciali naturali	pagina 7
1.2.1 Esempi di superfici naturali	pagina 8
1.3 Applicazioni di superfici biomimetiche in campo medico	pagina 9
1.3.1 Anti-bioadesione	pagina 9
1.3.2 Isolamento delle cellule tumorali	pagina 10
1.3.3 Tessuti antibatterici	pagina 10
Capitolo 2: La produzione di superfici biomimetiche in ambito biomedico	pagina 12
2.1 Rivestimenti nanostrutturati	pagina 12
2.2 Rivestimenti antibatterici	pagina 13
2.3 Rivestimenti in polidopamina	pagina 15
2.4 Biomineralizzazione	pagina 17
2.5 Funzionalizzazione biochimica	pagina 18
Capitolo 3: Le superfici biomimetiche nell'ingegneria tissutale	pagina 19
3.1 La matrice extracellulare	pagina 20
3.2 Tipologie di superfici bioispirate per sostituti tessutali	pagina 21
3.2.1 Sistemi ibridi	pagina 22
Capitolo 4: La produzione di tessuti ingegnerizzati	pagina 23
4.1 Bioprinting 3D	pagina 23
4.1.1 Bioprinting mediante estrusione	pagina 24
4.1.2 Bioprinting mediante getto di inchiostro	pagina 25
4.1.3 Bioprinting laser-assistito	pagina 25
4.2 Elettrofilatura	pagina 26
4.2.1 Processo di elettrofilatura	pagina 27
4.3 Modifica superficiale	pagina 28
4.3.1 Impianto ionico	pagina 28
4.3.2 Trattamento al plasma	pagina 29

4.4 Biosintesi basata su virus	pagina 30
Capitolo 5: Problematiche nella produzione e nell'innesto di tessuti ingegnerizzati	p. 31
5.1 Biocompatibilità e risposta immunitaria	pagina 31
5.2 Vascolarizzazione dei tessuti ingegnerizzati	pagina 33
Capitolo 6: I sostituti cutanei	pagina 35
6.1 La pelle	pagina 35
6.2 Tipologie di innesti cutanei	pagina 36
Capitolo 7: Nuovi materiali	pagina 39
7.1 Nanobiomateriali	pagina 39
7.2 Materiali a base di elastina	pagina 40
7.3 Microbioelettronica	pagina 42
Conclusioni	pagina 44
Bibliografia	pagina 45

Abstract

Questa tesi esplora le applicazioni delle superfici biomimetiche nell'ingegneria tissutale. Le superfici biomimetiche imitano alcune delle strutture e delle funzioni biologiche naturali per migliorare le interazioni cellula-materiale e promuovere la rigenerazione dei tessuti desiderati. La ricerca mira a indagare il potenziale delle superfici biomimetiche, anche in contesti biomedici, esaminando i principi di progettazione, i metodi di produzione e l'impatto che queste hanno nel momento in cui interagiscono con l'organismo. Il presente elaborato esplora la produzione di varie tipologie di superfici che imitano le caratteristiche topografiche, meccaniche e chimiche di alcuni tessuti biologici, utilizzando biomateriali avanzati e approcci di ingegneria tissutale. La ricerca attuale deve affrontare la sfida legata alla progettazione, produzione e applicazione di questi prodotti in ambito clinico. Inoltre, la tesi discute il potenziale delle superfici biomimetiche nella medicina rigenerativa, nel trapianto di organi e nei sistemi di somministrazione dei farmaci. Infine, viene dedicato un breve riepilogo dei sostituti tissutali oggi in commercio, e le recenti scoperte che stanno portando alla produzione di nuovi materiali e all'applicazione di tecnologie avanzate.

In conclusione, questa tesina dimostra l'immenso potenziale delle superfici biomimetiche nel campo dell'ingegneria tissutale, contribuendo alla comprensione di come queste superfici possano essere progettate per promuovere il comportamento cellulare e guidare la formazione di tessuti funzionali a seconda delle tecniche di produzione utilizzate.

Introduzione

Fin dall'antichità l'uomo ha osservato le caratteristiche delle piante e degli animali cercando di adattare alle proprie esigenze. La biomimesi è la scienza che studia la natura con l'obiettivo di applicare le strategie di sviluppo e adattamento dei sistemi biologici alla generazione di nuovi prodotti. Inizialmente, e per molti decenni, le superfici biomimetiche sono state impiegate principalmente in ambito industriale, dei trasporti e del design. Negli ultimi venticinque anni del '900 però, la ricerca in campo medico ha conosciuto progressi sorprendenti, grazie anche alla necessità di operazioni chirurgiche meno invasive. Fin da subito le superfici biomimetiche hanno mostrato un notevole potenziale, offrendo soluzioni innovative per la rigenerazione dei tessuti e il miglioramento delle interazioni tra biomateriali e organismo. Uno dei primi sviluppi significativi è rappresentato dall'utilizzo di materiali con una morfologia superficiale controllata con lo scopo di imitare la struttura della matrice extracellulare. In seguito, i ricercatori si sono concentrati nella riproduzione dell'ambiente chimico della matrice extracellulare (ECM), con l'integrazione di gruppi funzionali bioattivi sulla superficie dei materiali. In questo modo sono stati in grado di promuovere l'adesione selettiva e stimolare la differenziazione cellulare. Col progredire della tecnologia, l'interesse si è spostato verso lo sviluppo di sostituti tissutali ingegnerizzati. Verso l'inizio degli anni '90 fu definito per la prima volta il concetto di ingegneria tissutale, il cui obiettivo principale era la rigenerazione di tessuti in sostituzione di quelli danneggiati e/o malati. Ad oggi, l'ingegneria tissutale è una area della ricerca in rapida crescita ed è strettamente legata all'innovazione tecnologica. Inizialmente i tessuti venivano prelevati da donatore ed utilizzati come copertura protettiva per le aree lesionate; con la scoperta di nuovi materiali e l'utilizzo di tecniche di produzione di avanguardia, ora è possibile generare biosostituti altamente funzionali in grado di sostituire quasi completamente i tessuti danneggiati. Esistono diversi metodi di produzione e ne viene scelto uno piuttosto che un altro a seconda delle specifiche da soddisfare. Tuttavia, come ogni nuova scoperta, l'ingegneria tissutale si trova ancora in una fase embrionale e vi sono numerosi limiti da oltrepassare per raggiungere dei risultati affidabili e replicabili in ogni contesto. I traguardi raggiunti fino ad ora hanno mostrato come questa nuova scienza prometta incredibili sviluppi per il futuro, che saranno certamente rivoluzionari per la medicina.

Capitolo 1: Le superfici biomimetiche e le loro applicazioni

La biomimetica è alla base di molte invenzioni ed innovazioni in una varietà di campi: dall'abbigliamento militare (giubbotti antiproiettili) a quello sportivo, dai dispositivi di trasporto al mondo del design. In molti di questi ambiti, l'essere umano si è ispirato a modelli presenti in natura, sia nel mondo vegetale che animale. Negli ultimi decenni, i fenomeni che si verificano nelle aree di contatto tra superfici biologiche e costrutti ingegnerizzati hanno guadagnato un notevole interesse tra i ricercatori, in particolar modo nei casi in cui c'è la possibilità di facilitare complesse procedure mediche come interventi chirurgici e trapianti. Il rapido sviluppo in questo campo ha portato alla scoperta di nuove applicazioni come il monitoraggio delle biomolecole, l'isolamento delle cellule tumorali e la produzione di tessuti antibatterici [1].

1.1 Proprietà superficiali

1.1.1 Bagnabilità

La bagnabilità superficiale caratterizza i fenomeni interfacciali tra un liquido e un supporto solido: il comportamento del liquido dipende infatti da questa proprietà [1]. Essa può essere misurata in base all'angolo di contatto tra i due mezzi ed è proprio questo valore che indica il grado di idrofobicità o idrofilicità della superficie studiata (Figura 1.1).

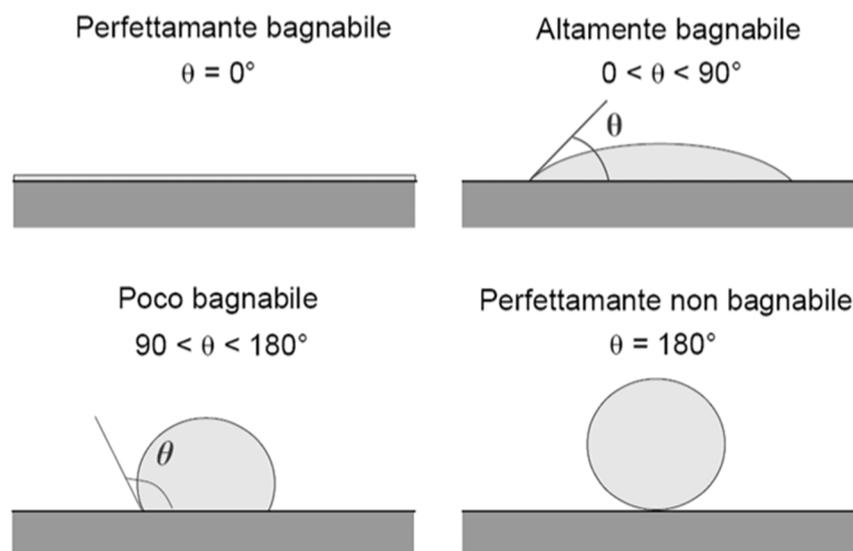


Figura 1.1: diversa bagnabilità di una superficie solida e relativo valore dell'angolo di contatto.

Recenti studi hanno portato alla luce come la superidrofobicità possa avere numerose applicazioni in molti ambiti: primo fra tutti, e di maggiore interesse per l'argomento trattato in questa ricerca, è lo sviluppo di superfici autopulenti e ad attrito ridotto. Queste, infatti, prevengono l'adesione dei batteri, la corrosione, e hanno una maggiore emocompatibilità.

1.1.2 Struttura delle superfici superidrofobiche

Affinché una superficie si possa definire “superidrofobica”, devono essere soddisfatte tre condizioni: elevato angolo di contatto apparente, bassa isteresi¹ dell'angolo di contatto ed elevata stabilità dello stato di bagnatura di Cassie² [1].

Le superfici superidrofobiche naturali presentano una rugosità gerarchica divisa in due intervalli di scala: micro e nano-rugosità: quest'ultima è fondamentale per aumentare la stabilità dello stato di Cassie ed abbassare l'isteresi.

Nella produzione di superfici artificiali è di fondamentale importanza evitare di arrecare danni, anche minimi, alla struttura superficiale, in quanto questi causerebbero una riduzione dell'idrofobicità con gravi conseguenze: stati di Cassie instabili, elevata isteresi, ma soprattutto, una maggiore probabilità di evocare fenomeni di degradazione del dispositivo protesico.

Andando oltre ai fenomeni di superficie ed osservando le interazioni molecolari, si è scoperto che la forza di repulsione idrofobica è influenzata dalla carica ionica. Una scelta accurata di ioni negativi da inserire sui siti di legame idrofobici in fase di produzione, può portare ad un miglioramento dell'idrofobicità del materiale [1].

1.2 Superfici speciali naturali

Nel corso della storia l'uomo è sempre rimasto affascinato dalla capacità delle piante di mantenersi pulite negli ambienti paludosi e di provvedere al proprio fabbisogno idrico nelle zone aride. Tuttavia, queste proprietà sono rimaste un mistero fino allo sviluppo delle tecniche di analisi al SEM³ che hanno permesso un'indagine dettagliata delle superfici.

Nel 2007 si è concluso che esistono due tipologie di microstrutture che conferiscono superidrofobicità [1]. La prima corrisponde al già citato sistema di strutture gerarchiche micro/nanometriche, la seconda è costituita da una struttura unitaria formata da una rete di fibre ordinate dal diametro di 1-2 μm .

¹ Caratteristica di un sistema di reagire in ritardo alle sollecitazioni applicate.

² Omogeneità della rugosità della superficie.

³ Microscopio Elettronico a Scansione.

1.2.1 Esempi di superfici naturali

L'esempio maggiormente riportato in letteratura di superficie superidrofobica è la foglia di loto. Sulla sua superficie si possono distinguere delle papille convesse a livello micrometrico, e degli aghi di cera a livello nanometrico. Quest'ultimi sono i responsabili della superidrofobicità che permette alle particelle di polvere di essere rimosse dalle gocce di pioggia (Figura 1.2).

Le caratteristiche superficiali delle piante consentono loro di sopravvivere anche quando sono sommerse. Un esempio è la felce acquatica, dotata di peli idrofobici con punte idrofiliche: questi peli trattengono uno strato d'aria consentendo la "respirazione".

Una struttura molto particolare si può osservare in una pianta chiamata Uccello del paradiso (*Strelitzia reginae*), le cui foglie presentano dei solchi paralleli: in presenza di una goccia d'acqua questa rimane ancorata se la foglia è inclinata nella direzione dei solchi, mentre scivola via se è inclinata in direzione perpendicolare. Questo tipo di superidrofobicità è detta anisotropa. Vi è infine il caso dei petali di rosa nei quali le gocce d'acqua aderiscono fortemente alla superficie superidrofobica costituita da micro-papille e pieghe cuticolari nanometriche [7].

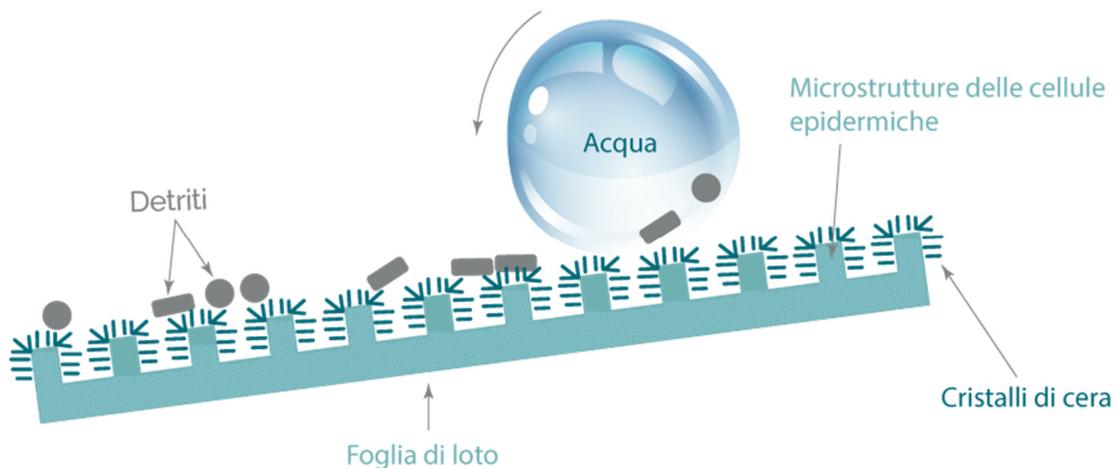


Figura 1.2: la superficie della foglia di loto con le relative papille (microstrutture) e gli aghi (cristalli di cera).

Anche nel mondo animale sono presenti vari esempi di superfici speciali. La lucertola gecko ha la capacità di arrampicarsi su superfici verticali grazie alle strutture presenti sulle sue dita. Tali strutture sono formate da dei peli allineati, suddivisi in formazioni nanometriche dette *setae*, che secernono sostanze adesive [1]. Inoltre, sul dorso e sull'addome sono state trovate delle squame a forma di cupola disposte con un motivo esagonale aventi proprietà antibatteriche [7].

Una delle superfici animali più studiate ed analizzate è la pelle di squalo, dotata di caratteristiche autopulenti e antivegetative⁴ conferite dalla forma e dalla disposizione dei denticoli⁵.

Le ali degli insetti hanno suscitato particolare interesse nella comunità scientifica e questo ha portato alla scoperta di diverse strutture minuscole a forma di mantello, peli o squame a seconda della specie di appartenenza. Numerosi insetti presentano ali con strutture in scale nanometriche, in grado di consentire il volo ma non la contaminazione da polvere. Alcuni insetti, come ad esempio le cicale, possiedono ali in grado di eliminare selettivamente i batteri Gram-negativi. Questa caratteristica è dovuta alla topografia dell'ala che presenta una serie di micro-asperità chiamate nano-pilastri [7].

Il coleottero del deserto si è evoluto in modo tale che la superficie del suo esoscheletro possedesse sia proprietà superidrofobe che superidrofiliche. Questa associazione è in grado di garantire il fabbisogno idrico dell'insetto in un'ambiente ostile come il deserto. Il suo dorso è costituito da picchi idrofilici che catturano l'acqua dalle nebbie oceaniche. Quando le goccioline diventano troppo grandi, per effetto della gravità, scivolano sui bordi del dorso che, al contrario, sono idrofobici e cerosi, fino ad arrivare alla bocca del coleottero [1]. Questa particolare caratteristica ha portato allo sviluppo e alla progettazione di dispositivi in grado di raccogliere l'acqua dalle nebbie nelle zone aride.

1.3 Applicazioni di superfici biomimetiche in campo medico

In ambito medico è sempre più frequente l'utilizzo di superfici biomimetiche, che, negli ultimi due decenni, hanno reso possibili una serie di applicazioni fino a poco tempo fa irrealizzabili. L'argomento trattato in questa ricerca non ha radici profonde nella storia della medicina ed è dunque complesso e di difficile realizzazione analizzare e riportare i più recenti ed innovativi casi di applicazione; nel seguito se ne elencano tre tra i più importanti e consolidati.

1.3.1 Anti-bioadesione

La bagnabilità del supporto è in grado di influenzare fenomeni come l'adsorbimento proteico, l'adesione batterica e lo sviluppo di colture cellulari. Verso la fine degli anni '90, alcuni ricercatori hanno dimostrato sperimentalmente come l'adesione proteica su un determinato

⁴ Caratteristica di una superficie destinata a rimanere a contatto con l'acqua che la rende in grado di resistere all'attacco di microrganismi.

⁵ Scaglie a forma di diamante che ricoprono la superficie esterna dell'animale con lo scopo principale di aumentarne l'idrodinamicità.

materiale sia favorita dall'idrofobicità conferita da un rivestimento di polimetilmetacrilato (PMMA). In seguito, per tentare di ridurre al minimo l'attivazione e l'adesione delle piastrine sulla superficie di una protesi, è stato dimostrato come queste non aderiscono né si propagano su supporti ricoperti da nanotubi di biossido di titanio (TiO₂)⁶. Nel 2009 è stata sviluppata una superficie di polidimetilsilossano (PDMS) costituita da lastre con microstrutture di scale diverse sovrapposte [1]. Questa particolare morfologia è risultata essere molto efficace contro l'adesione delle piastrine in condizioni di flusso sanguigno biologico.

1.3.2 Isolamento delle cellule tumorali

Tutti i tipi di cellule, comprese quelle cancerose, presentano determinate sporgenze sulla superficie che permettono di interagire con l'ambiente circostante. Pertanto, qualunque materiale, o dispositivo medico, che entri in contatto con il corpo umano dev'essere progettato in modo da provocare una specifica interazione con le cellule. Con gli ultimi sviluppi, sono stati apportati dei miglioramenti sfruttando delle nanostrutture in grado di legare solamente le cellule malate presenti nel sangue del paziente. La rugosità nanometrica, responsabile della superidrofobicità del materiale, cattura solo le cellule cancerose e non consente l'adesione di quelle sane. Questa scoperta ha portato alla diagnosi precoce di cellule rare, non eseguibili con tecnologie esistenti come ad esempio la biopsia [1].

1.3.3 Tessuti antibatterici

Con l'evoluzione dei metodi di fabbricazione di superfici artificiali si è riusciti a produrre dei materiali in grado di esercitare un'azione antibatterica contro alcune tipologie di microrganismi. Un primo esempio è dato dalle fibre di cellulosa superoleofobiche ottenute modificando il silossano⁷ con nanoparticelle di argento mediante un legante che può essere sia organico che inorganico. Queste fibre si sono rivelate estremamente efficaci contro *Escherichia coli* con un tasso di soppressione del 100%. Un secondo esempio è rappresentato dal vetro che, se modificato con speciali trattamenti a base di fluoroalchil-silani, acquisisce un'attività antibatterica contro piccole concentrazioni di *Stafilococco aureo*⁸ [1]. Infine, vi è la modifica di superfici mediante topografia Sharklet⁹ che mira a riprodurre la struttura della pelle di squalo

⁶ Il titanio e le sue leghe sono tra i materiali metallici più utilizzati in campo medico per le buone proprietà meccaniche ma soprattutto per l'eccellente biocompatibilità.

⁷ Polimero in cui si ripete il gruppo funzionale R₂SiO con R idrogeno o gruppo alchilico.

⁸ Batterio Gram-positivo molto presente nel genere umano e responsabile di infezioni importanti.

⁹ Tecnologia di produzione appartenente alla Sharklet Technologies, Inc. il cui nome commerciale deriva dal termine in inglese shark (squalo).

(Figura 1.3). Questa tecnica è stata sfruttata per la fabbricazione di tubi endotracheali modificando il materiale poliuretanico termoplastico utilizzato per costruirli. In seguito, l'impianto è stato sottoposto a test di adesione batterica e confrontato con una superficie non trattata, dimostrando una riduzione della contaminazione di oltre il 70% [7].

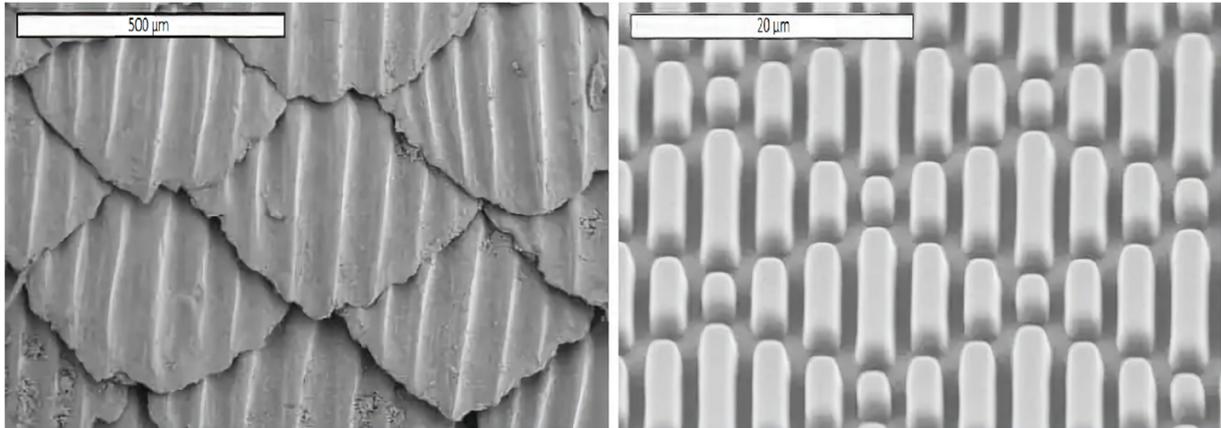


Figura 1.3: a sinistra la struttura a denticoli della pelle di squalo, a destra una superficie artificiale costruita utilizzando la tecnica Sharklet.

Capitolo 2: La produzione di superfici biomimetiche in ambito biomedico

La produzione di superfici biomimetiche in ambito biomedico è un campo in evoluzione che si concentra sulla creazione di materiali e superfici che imitano le proprietà delle strutture biologiche naturali. L'obiettivo principale di questo approccio è quello di migliorare l'interazione tra i materiali utilizzati e i tessuti biologici, aumentando l'efficacia dei dispositivi medici, la loro reattività e migliorandone la biocompatibilità.

La produzione di superfici biomimetiche richiede una conoscenza approfondita delle proprietà dei materiali e delle strutture biologiche, nonché delle tecnologie avanzate per la sintesi e la manipolazione dei materiali stessi. Questo campo di ricerca è fondamentale per lo sviluppo di nuovi dispositivi medici allo scopo di migliorare la qualità della vita dei pazienti. In seguito, verranno presentati una serie di metodi di produzione basati principalmente sul rivestimento di materiali con particolari composti in grado di fornire determinate proprietà.

2.1 Rivestimenti nanostrutturati

Con l'inizio del nuovo millennio, la ricerca, lo sviluppo e l'applicazione dei nanomateriali sono progrediti in modo esponenziale, riuscendo a rivoluzionare l'approccio alla produzione di superfici in svariati campi. Per definizione, un nanomateriale è un materiale avente almeno una delle tre dimensioni su scala nanometrica. Grazie alle loro dimensioni ridotte, i nanomateriali sono in grado di fornire proprietà non offerte da materiali di dimensioni micrometriche [2]. In ambito medico, la ricerca si sta concentrando nello sviluppo di vettori bioispirati. Un vettore è un elemento in grado di trasportare una determinata sostanza (un farmaco, ad esempio) in maniera mirata, così da massimizzarne l'azione. Tuttavia, il sistema immunitario tende a riconoscere e "catturare" i vettori artificiali, in quanto questi vengono riconosciuti come sostanze dannose. Grazie alla nanotecnologia, i ricercatori sono stati in grado di produrre dei vettori costituiti da un nucleo artificiale di nanoparticelle, contenenti la sostanza da trasportare, rivestito da una membrana ispirata a quella cellulare dell'essere umano. In questo modo il sistema immunitario non riconosce il vettore come un corpo estraneo e si è in grado di curare malattie gravi, come ad esempio il cancro, in modo più efficace. I materiali biologici più comunemente impiegati nella composizione della membrana includono, tra gli altri, proteine e vescicole di origine cellulare come ad esempio gli esosomi [3]. Come fonte di ispirazione per la costruzione del rivestimento ci sono: globuli rossi, piastrine, leucociti, cellule staminali e tumorali.

Per fare sì che l'organismo riconosca il vettore come particella non artificiale occorre riprodurre la composizione naturale della membrana nel modo più preciso possibile. Per esporre le proteine di superficie¹⁰ è necessario che la conformazione desiderata sia anche la più energeticamente favorevole; inoltre, è importante mantenere la fluidità tipica della membrana lipidica umana [3].

Esistono vari metodi per produrre un rivestimento efficace, tra questi il più semplice è la coostruzione fisica. Essa si basa sulla creazione di un unico composto, a partire da nanovesicole di membrana e nanomateriali abiotici¹¹ pressati più volte su di una base di policarbonato. La membrana così prodotta ha dimensioni ed omogeneità uniformi ma richiede troppo tempo per essere realizzata [3], e di conseguenza non può essere utilizzata per produzioni su larga scala.

Un secondo metodo si basa sulla sonicazione. Essa consiste nell'utilizzo di ultrasuoni a frequenza, ampiezza e periodo specifici per ottenere dei rivestimenti efficaci. In particolare, la sonicazione microfluidica si è dimostrata una tecnica in grado di produrre nanoparticelle rivestite di membrana esomotica o di cellule tumorali in un unico passaggio, fornendo complessi core-shell completi e molto stabili [6].

2.2 Rivestimenti antibatterici

Attualmente, una delle maggiori sfide della progettazione di superfici biomimetiche in ambito medico è rappresentata dalla necessità di inibire l'adesione batterica e, contemporaneamente, facilitare le interazioni tra materiale ed organismo. Negli ultimi decenni si è notato come la resistenza dei batteri agli antibiotici stia aumentando sempre più rapidamente: questo fenomeno è dovuto all'utilizzo continuativo di quest'ultimi. Di conseguenza, in medicina si è verificata una crescita nello sviluppo di un'ampia varietà di rivestimenti per molteplici contesti, in particolare per gli impianti endossei.

La principale causa di infezioni batteriche in un impianto è la formazione di un biofilm (Figura 2.1). Una volta formato, protegge esso stesso i batteri dalle difese immunitarie del paziente e da eventuali agenti battericidi. Due terzi delle infezioni negli impianti ortopedici sono causati da Stafilococchi, in particolare dallo Stafilococco aureo e dallo Stafilococco epidermidis [4].

Nonostante il progredire delle tecniche chirurgiche e dei controlli ambientali, il rischio di infezione non è ancora stato azzerato, e ci sono inoltre fattori che ne aumentano la probabilità,

¹⁰ Anche definite proteine target, hanno lo scopo di mediare l'adesione tra cellule o connettere la cellula alla matrice extra-cellulare.

¹¹ Materiali inorganici utilizzati per replicare funzioni organiche ma privi dei tipici difetti dei materiali biologici.

come ad esempio l'età avanzata, l'obesità e il diabete. Recentemente sono stati sviluppati diversi metodi per conferire funzioni antibatteriche agli impianti in alternativa alla somministrazione sistemica di antibiotici [4]. La soluzione si basa sul rivestire l'impianto con film polimerici con molteplici scopi: azione battericida, ancoraggio di antibiotici e diminuzione dell'adesione sulla superficie dei batteri.

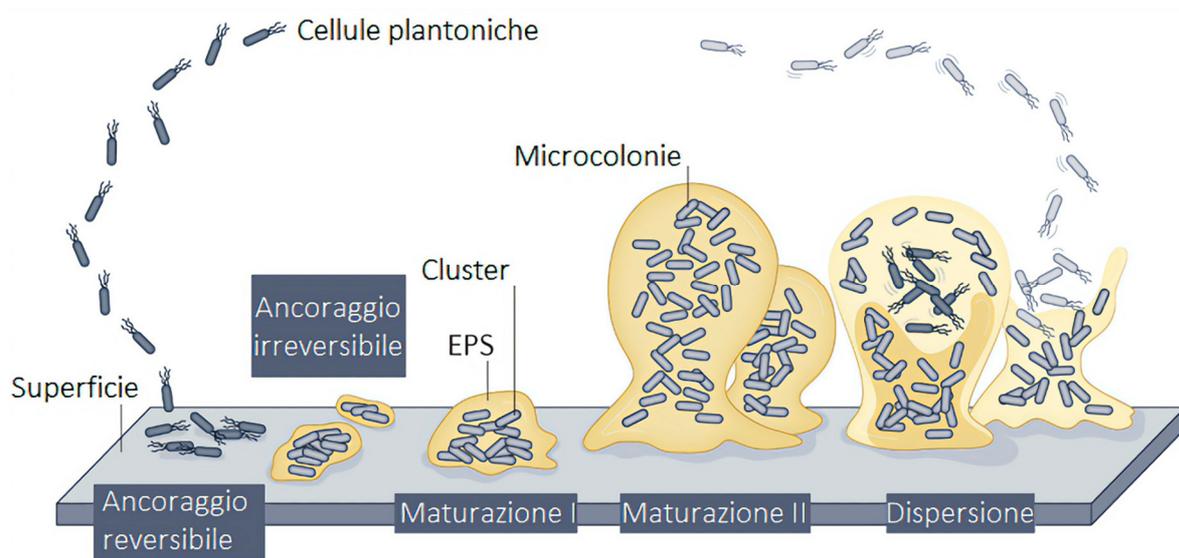


Figura 2.1: la formazione, la crescita e la rottura di un biofilm.

Oggigiorno uno dei materiali più utilizzati per gli impianti ossei è il titanio, che possiede un'ottima biocompatibilità ed un'eccellente resistenza alla corrosione. Tuttavia, le possibili deformazioni dello strato di ossido protettivo liberano ioni metallici che abbassano il pH nel sito di impianto favorendo l'infezione batterica [4]. Sono stati proposti una serie di metodi di rivestimento ognuno con i propri pregi e difetti, tra i più efficaci vi è la tecnica strato per strato (Layer by Layer, LbL). Questa tecnica ha la caratteristica di poter essere applicata ad una grande varietà di materiali, ed offre un'efficace prevenzione all'adesione batterica e alla formazione di biofilm. Si basa sulla fabbricazione di film multistrato prodotti mediante deposizione alternata, sopra superfici cariche, di polielettroliti carichi in modo opposto (Figura 2.2) [4]. Inizialmente fu sviluppata per elettroliti sintetici ma successivamente fu estesa a biopolielettroliti ed altri materiali. Con l'avanzare della tecnologia, alcuni ricercatori sono stati in grado di utilizzare i polielettroliti sotto forma di vernice a spruzzo, questa variante è stata definita LbL a base spray e ha l'enorme vantaggio di poter essere applicata su impianti con geometria variabile e complessa [4]. Una volta depositata questa struttura multistrato sulla protesi, risulta

estremamente difficile rimuoverla a meno di particolari condizioni che raramente si verificano nel corpo umano.

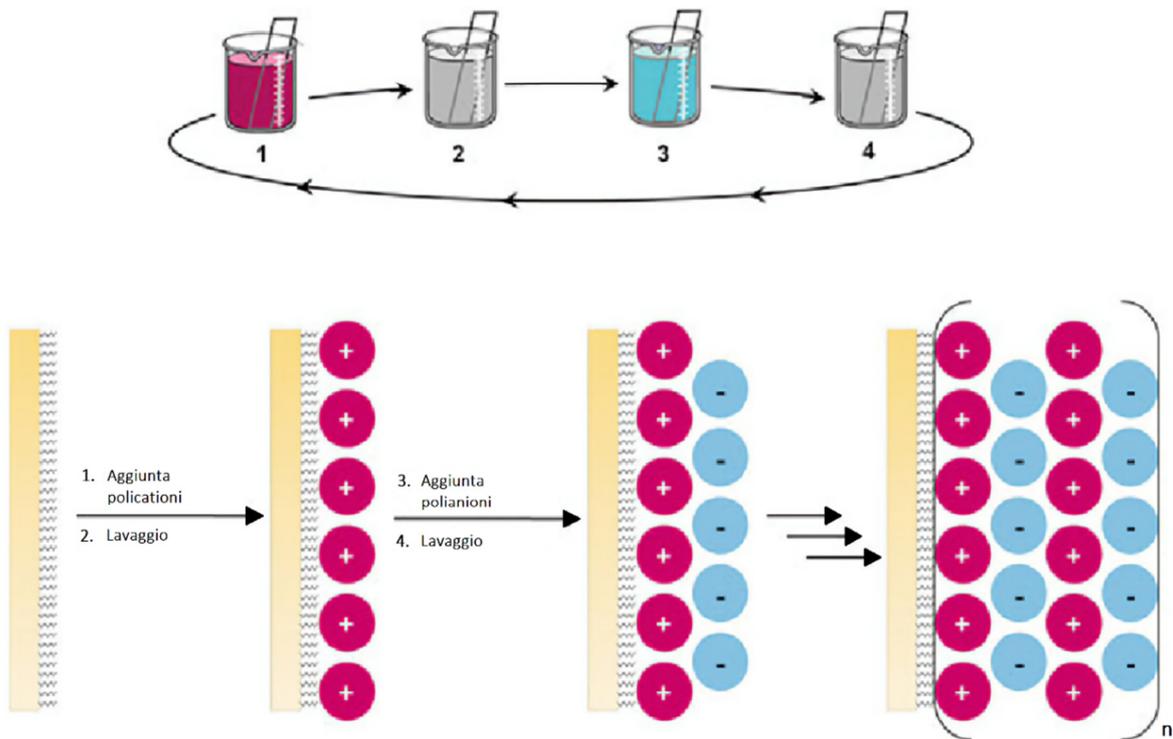


Figura 2.2: tecnica strato per strato, a seconda delle necessità il numero n di strati finali può variare sensibilmente.

2.3 Rivestimenti in polidopamina

La funzione adesiva della polidopamina deriva dallo studio delle proteine adesive secrete dai mitili marini¹², le quali hanno mostrato la capacità di formare dei “piedini” in grado di attaccarsi a diversi materiali in varie condizioni, anche di estrema umidità e consistente movimento [5]. Queste proteine contengono un’elevata percentuale di 3,4-diidrossi-L-fenilalanina (DOPA) che consente di fatto l’adesione alle superfici mediante legami covalenti e non covalenti. In ambito medico si è scoperto come la polidopamina (PDA) abbia caratteristiche adesive simili alle proteine dei mitili, ed inoltre è in grado di offrire funzioni di bioprotezione: fotoprotezione, eliminazione delle specie reattive all’ossigeno e il sequestro dei cationi metallici [5]. Nel corso degli anni sono stati sviluppati diversi metodi per la fabbricazione di rivestimenti in PDA e tutti consistono essenzialmente in due passaggi (Figura 2.3).

¹² Anche comunemente chiamati cozze, sono dei molluschi bivalvi presenti in varie regioni del globo ampiamente sfruttati come alimento.

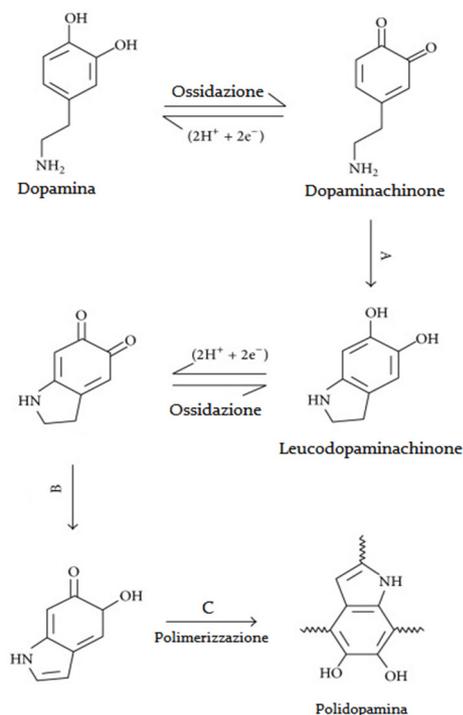


Figura 2.3: formazione dello strato di rivestimento in PDA.

Il primo passaggio prevede l'autossidazione dei monomeri di dopamina con la formazione di dopaminachinone in presenza di ossigeno disciolto. Questo viene sottoposto a ciclizzazione per formare leucodopaminachinone e ad una seconda ossidazione per arrivare al dopaminocromo. Segue un riarrangiamento intramolecolare ed una polimerizzazione che porta all'ottenimento della polidopamina [5].

Il secondo passaggio, ovvero quello che porta alla realizzazione del rivestimento finale, è ancora oggetto di studi in quanto esistono più modi per ottenerlo. Attualmente il più conosciuto e parzialmente dimostrato si basa sulla formazione di legami covalenti carbonio-carbonio tra gli anelli benzenici delle unità monomeriche [5].

Lo strato di rivestimento in PDA può essere applicato su varie superfici inclusi metalli nobili, ceramiche e polimeri. A seconda del materiale, lo spessore può variare dai 10 ai 100 nanometri, e fornisce proprietà superficiali favorevoli come elevata idrofilicità e resistenza alla corrosione a lungo termine.

Per massimizzare l'efficacia del rivestimento, molto spesso vengono addizionati dei composti, come ad esempio i gruppi funzionali catecolo o dichetone, che si legano ad agenti nucleofili conferendo migliori caratteristiche ai biosostituti [5]. Lo strato di PDA funge anche da "collante" per macromolecole come proteine, peptidi e DNA: queste formano un legame covalente irreversibile, favorendo l'interazione dell'impianto con l'ambiente circostante.

La maggior parte delle applicazioni che sfruttano questa modalità di rivestimento riguardano l'ingegneria dei tessuti ossei: i materiali utilizzati per le protesi, infatti, rispondono positivamente al trattamento con PDA. Uno tra i più utilizzati è certamente la lega Ti6AlV: se rivestito con polidopamina, tende a formare una forte interazione tra il rivestimento e gli atomi di titanio, conferendo all'impianto una elevata resistenza alla corrosione. Inoltre, questa tecnica fornisce una migliorata bioattività per quanto riguarda la possibilità di sopravvivenza, la proliferazione e la differenziazione delle cellule [5].

2.4 Biomineralizzazione

Per cercare di migliorare e rendere più resistenti gli impianti, i ricercatori hanno tentato di modificare la superficie mediante la formazione di composti apatitici come l'idrossiapatite. Lo scopo era quello di sfruttare questi fosfati di calcio per stimolare l'ambiente cellulare e rigenerare rapidamente l'osso a contatto con la protesi. Tuttavia, queste modifiche non diedero il risultato sperato in quanto a lungo termine la degradazione di questi rivestimenti non risultava omogenea e inoltre, in breve tempo, venivano a formarsi delle cricche che portavano a fratture del film. Di conseguenza, sono stati sviluppati dei nuovi trattamenti per ottenere superfici biomimetiche, evitando i problemi sopra citati. In particolare, la tecnica della biomineralizzazione è stata applicata a svariati materiali, tra cui biopolimeri, bioceramiche, ed altri materiali metallici, dimostrandosi un processo valido ed efficace [8]. Essa si basa su reazioni di natura chimica e termica. Il titanio a contatto con l'aria produce spontaneamente uno strato di ossido, che viene fatto reagire con una soluzione di idrossido di sodio formando un gel di titanato di sodio. In seguito, si applica un trattamento termico per stabilizzare la struttura ottenendo uno strato di titanato parzialmente cristallino. L'idrogel di titanato di sodio si ottiene dalla reazione tra ioni di sodio ed idrati carichi negativamente, a loro volta ottenuti dalla corrosione dello strato di ossido dovuta alla presenza dei gruppi idrossilici [8]. Nel momento in cui l'impianto così trattato viene inserito nell'organismo, ed entra in contatto con i fluidi corporei, vengono rilasciati rapidamente ioni Na^+ che reagiscono con il metallo: in questo modo viene a formarsi uno strato di titanato di calcio amorfo che rinforza la struttura, migliorandone la resistenza alla corrosione e ai carichi, ma soprattutto permette una migliore interazione con l'osso originale (Figura 2.4).

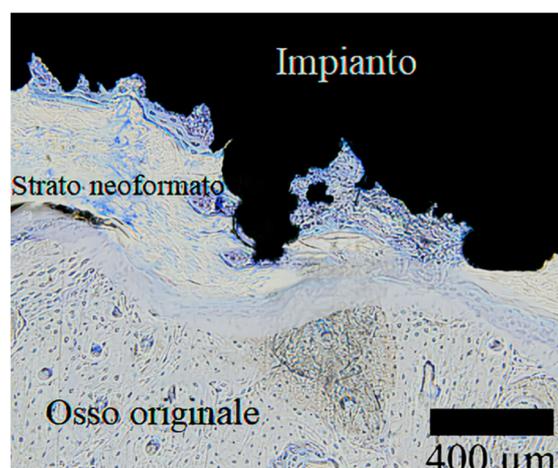


Figura 2.4: formazione ossea dopo due settimane: si vede chiaramente lo strato di osso formatosi per costituire un contatto tra impianto e osso.

2.5 Funzionalizzazione biochimica

La funzionalizzazione biochimica è un processo che consente di modificare specificamente le proprietà di un biomateriale, mediante l'aggiunta di molecole biologicamente attive come peptidi e proteine, in modo da favorire l'interazione con l'ambiente biologico. Questa tecnica porta ad un netto miglioramento delle caratteristiche del materiale, ampliando il numero di applicazioni possibili. Esistono vari metodi per funzionalizzare un biomateriale ma il più comune, poiché il più efficace, è quello di imitare la struttura del collagene, utilizzando peptidi a tripla elica¹³. In precedenza, si era tentato di utilizzare materiali completamente formati da collagene, tuttavia, i tentativi di sintesi in vitro non hanno fornito risultati paragonabili ai collageni derivati dai tessuti e, in ogni caso, anche quest'ultimi hanno mostrato scadenti proprietà meccaniche ed instabilità [26, 27].

Sono state scoperte numerose proteine collegenosimili, ma la loro sintesi chimica porta un difetto, ovvero l'assenza di modifiche post-trasduzionali che avvengono naturalmente negli organismi. Vengono in ogni caso utilizzate per la possibilità di controllare il numero e la posizione delle sequenze attive.

L'utilizzo di fibre di collagene naturali è certamente più economico ed accessibile ma la scarsa riproducibilità e i rischi dovuti al possibile trasferimento di agenti patogeni, rendono le molecole di sintesi preferibili [26].

¹³ La struttura del collagene è caratterizzata da catene polipeptidiche assemblate tra loro a formare una tripla elica destrorsa, che costituisce l'unità fondamentale chiamata tropocollagene.

Capitolo 3: Le superfici biomimetiche nell'ingegneria tissutale

L'ingegneria tissutale si occupa della produzione di tessuti ingegnerizzati che possano sostituire, riparare o migliorare le funzionalità di tessuti biologici danneggiati o persi a causa di malattie, traumi o per effetto dell'invecchiamento. Le superfici biomimetiche sono state ampiamente utilizzate nell'ingegneria tissutale per promuovere l'adesione, la proliferazione e la differenziazione cellulare su materiali sintetici impiegati per la costruzione di sostituti tissutali. Queste superfici sono progettate per imitare le proprietà fisiche e chimiche di quelle biologiche naturali, come la pelle, le ossa o i tessuti vascolari, allo scopo di migliorare l'interazione tra organismo ed impianto.

Le superfici biomimetiche utilizzate per i sostituti tissutali possono essere suddivise in quattro categorie principali: biomimesi morfologica, biomimesi chimica, biomimesi fisica e biomimesi funzionale [30]. La biomimesi morfologica riguarda la riproduzione di forme e strutture superficiali presenti in natura. Ad esempio, la superficie dell'occhio di una farfalla è costellata di piccole protuberanze che permettono di ridurre i riflessi e aumentare l'efficienza visiva. Questa struttura potrebbe essere replicata sulla superficie di un sostituto dell'occhio per migliorarne la funzionalità. La biomimesi chimica si riferisce alla riproduzione di composizioni chimiche specifiche trovate in natura. Ad esempio, alcune superfici di piante e animali producono composti chimici che impediscono la crescita di batteri e altri microorganismi. Questi composti potrebbero essere incorporati nella superficie di un sostituto tissutale per impedire l'infezione. La biomimesi fisica riguarda la riproduzione di proprietà fisiche presenti in natura, come la rugosità, la porosità e l'idrofobicità. Ad esempio, alcune foglie di piante hanno una struttura idrofobica che impedisce all'acqua di rimanere sulla superficie. Questa proprietà potrebbe essere utilizzata su di un sostituto tissutale per migliorare la sua biocompatibilità. La biomimesi funzionale si riferisce alla riproduzione di funzioni biologiche specifiche, come l'attivazione selettiva di cellule specifiche o la regolazione di processi biologici. Ad esempio, alcune proteine presenti nella matrice extracellulare possono interagire con le cellule per promuovere la crescita e la differenziazione. Queste proteine potrebbero essere incorporate sulla superficie di un sostituto tissutale per migliorare la rigenerazione dei tessuti. Questo approccio può portare a migliorare l'integrazione dei tessuti ingegnerizzati con il tessuto ospite e, di conseguenza, a una maggiore efficienza e durata.

Questi materiali biomimetici sono stati sviluppati per imitare le matrici extracellulari naturali che supportano la crescita dei tessuti biologici. Utilizzando approcci di ingegneria tissutale, i ricercatori stanno sviluppando nuove strategie per progettare superfici biomimetiche che

riproducono le proprietà compressive delle matrici extracellulari naturali per guidare la crescita e lo sviluppo di tessuti e organi artificiali altamente funzionali.

3.1 La matrice extracellulare

La matrice extracellulare (ECM) è una rete tridimensionale, complessa e ben organizzata, con ruoli strutturali e funzionali fondamentali nella strutturazione dei tessuti e nella regolazione dei processi cellulari. È costituita da un intreccio di eteropolisaccaridi e proteine fibrose¹⁴, nel quale vengono trattenute quantità rilevanti di liquido interstiziale [9]. La ECM ha una funzione di comunicazione e collegamento tra le cellule nei tessuti e negli organi (Figura 3.1).

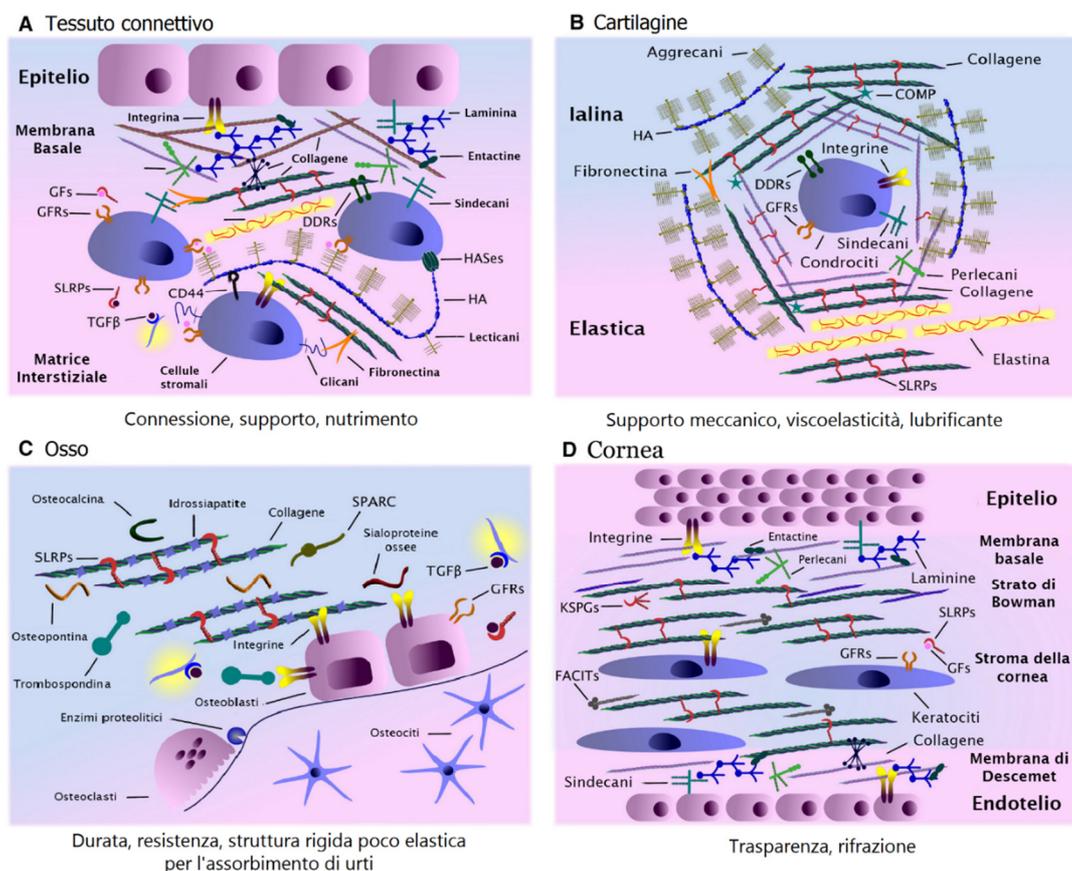


Figura 3.1: rappresentazione schematica della composizione e della struttura di alcuni tessuti.

Grazie ad una organizzazione strutturale ben definita, il sistema extracellulare presenta viscosità, consistenza e resistenza meccanica, oltre a buone proprietà come collante ed ammortizzatore. Funziona anche come filtro così da permettere l'accesso alle sostanze in

¹⁴ Gli eteropolisaccaridi sono rappresentati in particolare da glicosamminoglicani e proteoglicani; le proteine fibrose sono rappresentate da collagene ed elastina.

maniera controllata, ed esercita un'azione tampone che mantiene l'omeostasi e la ritenzione idrica [11].

In molti tessuti, il processo di composizione della ECM viene gestito dalle stesse cellule che la popolano, come ad esempio i fibroblasti e i fibroblasti specializzati (condroblasti, osteoblasti). Il componente principale della matrice extracellulare è il collagene, che si organizza in fibre dotate di grande flessibilità e resistenza alla trazione ma non di elasticità. Dipendentemente dalla quantità e dal tipo di collagene presente, si distinguono i vari tessuti: una quantità maggiore renderà la matrice più compatta e dunque ideale per il tessuto osseo, mentre una quantità minore darà luogo ad una matrice gelatinosa necessaria per la sclera¹⁵ degli occhi. La struttura della matrice extracellulare è in costante mutazione in base ai segnali biochimici o meccanici che riceve [10]. A seconda del tipo di tessuto (epiteliale, connettivo, osseo, ecc.), la matrice extracellulare presenta una diversa morfologia e composizione.

3.2 Tipologie di superfici bioispirate per sostituti tessutali

Negli ultimi decenni, l'ingegneria tessutale ha fatto progressi significativi nella produzione di sostituti tessutali, che possono essere utilizzati per riparare, rigenerare o sostituire i tessuti danneggiati. Un aspetto importante nella progettazione di questi sostituti è la scelta del materiale di cui sono composti, compresa la superficie del materiale stesso. Oggigiorno, i ricercatori stanno impiegando ingenti risorse nella progettazione di scaffold biodegradabili. Gli scaffold rappresentano il principale strumento dell'ingegneria tessutale: possono essere strutture artificiali, con una morfologia in scala nanometrica, progettate per emulare la matrice extracellulare. Il loro scopo è quello di ricreare un ambiente che agevoli l'adesione, la migrazione e la proliferazione delle cellule, ne guidi il comportamento e veicoli il trasporto di nutrimenti [12].

I requisiti richiesti per la produzione di sostituti ingegnerizzati sono molto complessi e ancora oggi si è alla ricerca di un sistema ideale per soddisfarli. Queste caratteristiche comprendono ad esempio: un tasso di degradazione regolabile con prodotti di scarto non tossici, l'immunogenicità, la capacità di regolare l'adesione cellulare, la proliferazione e la differenziazione. I principali sforzi sono dunque rivolti allo sviluppo di nuove tecnologie di lavorazione per produrre micro e nano-architetture tridimensionali.

Recentemente è risultato fondamentale l'utilizzo di cellule staminali, che vengono incorporate negli scaffold per la rigenerazione dei tessuti. Sono stati testati inoltre sistemi ibridi in grado di

¹⁵ Nota come bianco dell'occhio, è la membrana fibrosa che riveste il bulbo oculare formando un vero e proprio guscio che stabilizza la forma dell'occhio e ne protegge il contenuto.

fornire strutture multifasiche che replicano in maniera più efficace la complessità dei tessuti biologici [11]. Oltre agli scaffold sono di fondamentale importanza anche le molecole di segnalazione e le cellule in coltura. Le molecole di segnalazione sono indispensabili a controllare le funzioni cellulari anche allo scopo di mantenere l'omeostasi dei tessuti, garantendone la corretta funzionalità [13].

3.2.1 Sistemi ibridi

Tra i materiali più utilizzati ed efficaci nel campo biomedico vi sono gli idrogel, sistemi chiamati colloidali costituiti da una fase dispersa, un polimero, che ingloba l'acqua, la fase disperdente, in grandi quantità. La famiglia di polimeri più rilevante è rappresentata dai polisaccaridi per la loro elevata idrofilicità, la biocompatibilità e la capacità di conferire agli idrogel proprietà simili alla matrice extracellulare. Gli scaffold realizzati a partire da idrogel si sono rivelati ideali per la produzione di ECM per tessuti ingegnerizzati, tuttavia, per ottenere risultati migliori, è risultato necessario miscelare direttamente i polisaccaridi ottenendo così dei sistemi ibridi. Ad esempio, per la cura di lesioni della cartilagine, viene utilizzata una miscela di cellulosa, gelatina e alginato. La cellulosa, sotto forma di nanocristalli, viene utilizzata per rinforzare la rete formata da gelatina ed alginato co-estrusi tra loro. La gelatina viene utilizzata anche in unione con l'agar¹⁶, per il controllo della struttura porosa dello scaffold, e con polimeri sintetici, per creare impalcature utili per sostituti di tessuto osseo [11]. Utilizzando polimeri naturali al posto di quelli sintetici si possono evitare problemi comuni come reazioni immunologiche croniche, tossicità e mancanza di riconoscimento cellulare; inoltre, i primi, contengono gruppi funzionali che consentono la coniugazione chimica con altre molecole come i fattori di crescita [14].

Come già illustrato, gran parte della matrice extra cellulare è costituita da collagene organizzato in specifiche strutture; pertanto, il principale obiettivo dei ricercatori è quello di sviluppare scaffold a base di collagene per imitare l'ambiente nativo. Attraverso un processo di co-elettrofilatura sono stati in grado di ottenere una matrice artificiale con una morfologia stratificata, derivata dall'unione di collagene di tipo IV e polilaminina¹⁷. Il collagene viene utilizzato in miscela anche con i proteoglicani per produrre scaffold sotto forma di spugne o fibre molto efficaci per la cura di lesioni tendinee [11].

¹⁶ Polisaccaride naturale ricavato dalle alghe rosse, costituito principalmente da D-galattosio.

¹⁷ Polimero biomimetico a base di laminina assemblato mediante acidificazione del pH.

Capitolo 4: La produzione di tessuti ingegnerizzati

In generale, la produzione di tessuti ingegnerizzati richiede una combinazione di tecnologie avanzate e conoscenze approfondite della biologia umana. Sebbene questi biosostituti siano ancora in fase di sviluppo, si prevede che diventeranno sempre più importanti per la medicina del futuro, fornendo soluzioni innovative per le malattie e le lesioni che attualmente non hanno cure efficaci. Esistono vari metodi di produzione di tessuti ingegnerizzati, uno dei più recenti è la biostampa 3D. Questo processo prevede l'impiego di una stampante 3D per creare un modello tridimensionale del tessuto utilizzando inchiostri biologici, in seguito vengono addizionate cellule e sostanze nutritive per permettere la stabilizzazione e la maturazione del tessuto. Questo approccio è utile per la creazione di tessuti complessi, come vasi sanguigni e organi artificiali. Vi è poi la tecnica dell'elettrofilatura che permette di formare fibre a partire da numerosi materiali, ed assemblarle per formare strutture complesse. Un terzo metodo è la modifica delle superfici di strutture costituite da polimeri con cui vengono alterate le proprietà di quest'ultimi per creare tessuti con funzioni specifiche. Ad esempio, i polimeri possono essere modificati per migliorare la resistenza alla trazione, la flessibilità o la biocompatibilità. Un ultimo metodo è la creazione di tessuti utilizzando la biologia sintetica. In questo approccio, i tessuti sono prodotti utilizzando batteri o altri microrganismi che sono stati modificati geneticamente per produrre proteine o altre sostanze che possono essere utilizzate per la produzione di tessuti.

4.1 Bioprinting 3D

La biostampa 3D è una branca della stampa tridimensionale, la principale differenza sta nel tipo di materiale utilizzato. Rispetto alle tradizionali tecniche di stampa 3D dove si utilizzano materiali come polimeri, resine o metalli, le biostampanti fanno uso di sostanze biologicamente attive, i principali materiali sono: collagene, fibrina, seta, gelatina ed altri [15]. Questi materiali prendono il nome di Bio-Ink e possono anche essere miscelati con elementi sintetici per migliorarne le prestazioni. L'obiettivo è quello di produrre tessuti biologici in grado di sostituire quelli naturali. Questo tessuti biostampati devono avere la capacità di rigenerarsi e differenziarsi autonomamente una volta innestati [17].

Con i recenti sviluppi tecnologici si è stati in grado di stampare strutture con matrici liquide o pastose molto efficaci per la crescita cellulare.

Esistono vari tipi di tecnologie di bioprinting 3D, la più utilizzata è quella basata sull'estrusione. Se invece è necessario riprodurre con precisione specifiche zone, esiste la biostampa a getto di

inchiostro, una tecnica rivelatasi più economica delle altre in quanto è possibile utilizzare le classiche stampanti 3D e convertirle in biostampanti [16].

Il bioprinting non è un processo circoscritto ad un'unica fase (Figura 4.1); ha inizio dalla scansione tramite raggi X, risonanza magnetica o TAC del paziente, per la realizzazione del modello 3D digitale, segue poi la scelta dei materiali: questa è una fase fondamentale in quanto una scelta non corretta potrebbe portare ad effetti molto negativi nel paziente. Segue poi la stampa vera e propria e la fase di post-stampa, in cui si studiano i metodi di conservazione adeguati, l'eventuale maturazione del tessuto, se necessaria, e la risposta temporale [16, 17]. Di recente, si è provato ad affiancare il machine learning¹⁸ a queste tre fasi di produzione, sfruttando la sua capacità di eseguire un numero elevatissimo di test teorici correggendo autonomamente i propri errori. I risultati hanno evidenziato come l'utilizzo di questa tecnologia permette un incremento sostanziale dell'efficienza di produzione, diminuendo contemporaneamente la percentuale di errore [16].

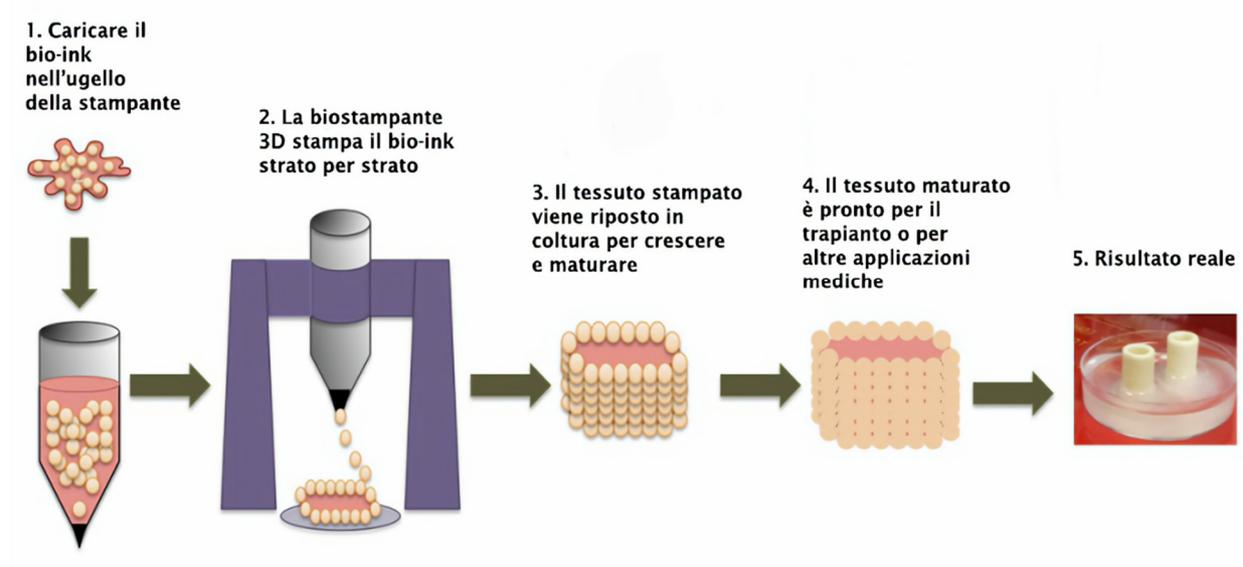


Figura 4.1: rappresentazione delle fasi di produzione mediante bioprinting 3D. L'immagine 5 rappresenta un risultato reale di osso biostampato ottenuto da ricercatori dell'Università di Swansea.

4.1.1 Bioprinting mediante estrusione

La tecnica di bioprinting basata sull'estrusione ha la peculiarità di combinare un sistema di erogazione di fluidi per l'estrusione e un sistema automatizzato per il movimento degli ugelli. Per azionare il sistema di erogazione viene fatto uso di una sorgente meccanica o pneumatica,

¹⁸ È una branca dell'intelligenza artificiale che si occupa di creare sistemi che apprendono o migliorano le performance in base ai dati che utilizzano.

utilizzando una pressione continua il bio-ink viene rilasciato da un ugello come filamenti e non come gocce. In seguito, il sistema robotico assembla i filamenti con elevata precisione per formare la struttura desiderata. Il vantaggio principale di questa tecnica è la possibilità di poter stampare una ampia varietà di biomateriali. Uno dei problemi riscontrabili utilizzando inchiostro biologico a gocce riguarda la viscosità del materiale: se è elevata, la tensione che si viene a formare tra i vari strati è tale da destabilizzare l'intera struttura finale. Estrudendo il materiale in filamenti però, questa tensione diminuisce e il prodotto finale risulta stabile [18]. Per questo motivo, e per il fatto che risulta essere un processo relativamente economico rispetto ad altri, il bioprinting basato sull'estrusione è uno dei metodi più utilizzati in commercio [19].

4.1.2 Bioprinting mediante getto di inchiostro

La biostampa a getto d'inchiostro può essere suddivisa in molteplici varianti, ognuna di esse con delle applicazioni specifiche. Tuttavia, questi diversi approcci possono generalmente essere rappresentati da due fasi: la formazione di gocce, posizionate in una zona specifica del substrato, e l'interazione tra le gocce e il substrato. La differenza risiede nella tecnologia utilizzata per produrre le gocce e nella loro dimensione [19].

Una soluzione biologica carica di cellule viene posta nella cartuccia della biostampante, un controllo elettronico impone il ritmo e la forza di emissione del bio-ink attraverso l'ugello, mentre un programma si occupa di spostare l'ugello in modo tale da depositare il materiale biologico sul substrato e riprodurre il modello progettato in precedenza [18]. In seguito, se necessario, il substrato e il materiale biostampato vengono tenuti in ambiente controllato per maturare prima di essere utilizzati per l'innesto. I principali vantaggi di questa tecnologia risiedono nella velocità di applicazione, nel costo ridotto e nella capacità di garantire un'elevata vitalità cellulare. Inoltre, è possibile sfruttare più testine di stampa per realizzare costrutti multicellulari complessi, con colorazioni differenti, utili per verificare la presenza di difetti nel prodotto finale. Tuttavia, questa tecnica impone necessariamente l'utilizzo di materiali con viscosità non elevate poiché a causa del diametro ridotto dell'ugello questo si bloccherebbe frequentemente, rendendo inefficiente l'intero processo [17, 18, 19].

4.1.3 Bioprinting laser-assistito

Una biostampante laser è costituita da 5 elementi: un emettitore che produce un raggio laser pulsato, un sistema di messa a fuoco, un nastro con uno strato donatore che assorbe energia e viene stimolato dal laser, uno strato di bio-ink ed un substrato su cui modellare il materiale [18]. Il laser colpisce lo strato donatore creando una bolla ad alta pressione, che interagisce con il

bioinchiostro portandolo a formare delle goccioline che si possono così depositare sul substrato [20]. Questa tecnologia non viene utilizzata frequentemente a causa dei considerevoli svantaggi che può portare. Le biostampanti laser-assistite sono molto complesse da costruire e da installare e di conseguenza hanno un costo elevato, il processo di realizzazione risulta molto lento e laborioso e inoltre l'energia scaturita dal raggio laser tende ad aumentare il danno cellulare [21]. Tuttavia, in alcuni casi viene preferita ad altre tecniche per la possibilità di raggiungere livelli di risoluzione molto dettagliati, e di utilizzare materiali ad elevata viscosità, dato che l'assenza di ugelli non causa il problema di intasamento tipico del getto d'inchiostro e dell'estrusione (Figura 4.2).

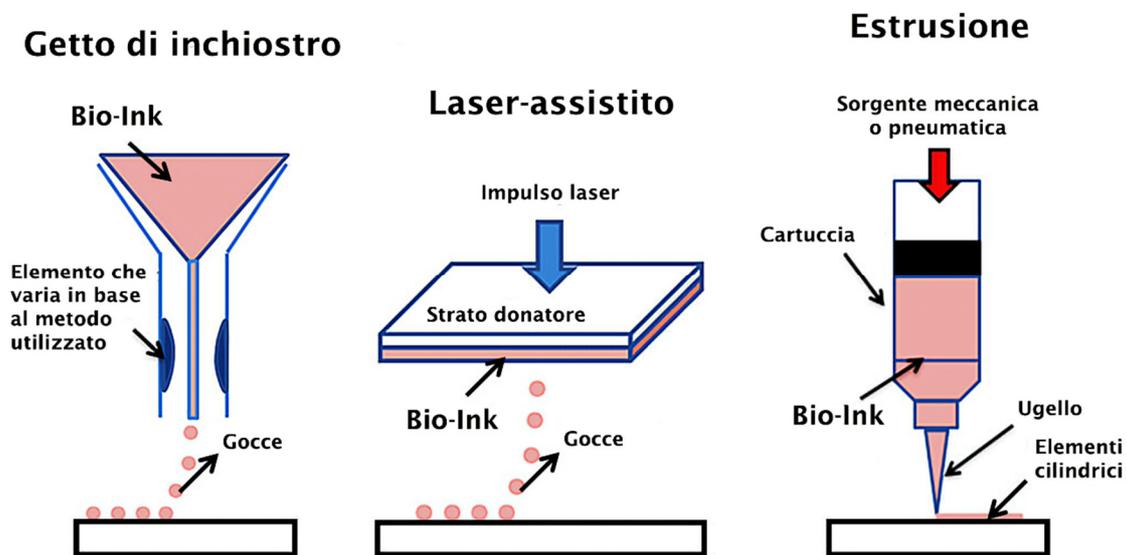


Figura 4.2: rappresentazione schematica delle tre tecniche di bioprinting.

4.2 Elettrofilatura

L'elettrofilatura nasce dall'idea di calcolare la massima carica elettrica che una goccia di liquido può trattenere prima che le forze prodotte superino la tensione superficiale rompendo la struttura. Risalgono agli inizi degli anni '30 i primi brevetti che rappresentavano degli apparati di elettrofilatura con la descrizione del processo; tuttavia, è solo negli ultimi decenni che questa tecnica ha suscitato notevole interesse per la capacità di produrre elementi applicabili in molti campi, in particolar modo in quello biomedico, grazie alla capacità di realizzare fibre di dimensione submicrometrica [22]. I materiali più utilizzati sono certamente i polimeri, sia naturali che sintetici; più di cento tipi diversi infatti sono stati utilizzati con successo e tra questi, di particolare interesse biomedico, vi sono: acido polilattico e acido polilattico-co-glicolico (polimeri sintetici biodegradabili e con un elevato grado di biocompatibilità), e biopolimeri

naturali come il DNA, il collagene, l'alginato e la gelatina. Vengono utilizzate inoltre particelle colloidali e piccole molecole come la lecitina e i derivati della ciclodestrina¹⁹, che, durante l'assemblaggio, tendono a formare forti legami tra le fibre che stabilizzano la struttura finale. Le applicazioni in campo medico sono molteplici, grazie al processo di elettrofilatura si è in grado, ad esempio: di favorire la rigenerazione dei tessuti a seguito di lesioni progettando delle strutture fibrose simili a quelle formate dal collagene; incrementare la differenziazione delle cellule staminali; prevenire i tumori guidando la migrazione cellulare e velocizzare la rigenerazione del tessuto osseo [23].

4.2.1 Processo di elettrofilatura

Il processo di elettrofilatura utilizza un'apparecchiatura chiamata elettrofilatore, che consiste in una sorgente di corrente elettrica, un recipiente contenente la soluzione polimerica e un'unità di raccolta delle fibre. La soluzione polimerica viene erogata attraverso una siringa a velocità costante e sottoposta ad un potenziale elettrico. Questo viene aumentato fino a raggiungere un valore critico che provoca delle tensioni, nella soluzione, superiori a quella superficiale, ottenendo così un getto carico. Il getto viene quindi fatto depositare su un supporto rotante o in un recipiente di raccolta, caricati in modo opposto, dove viene asciugato e poi riscaldato per consolidarne la struttura. La dimensione della fibra prodotta dipende dal diametro della punta dell'elettrofilatore, dalla velocità di alimentazione della soluzione polimerica e dalla differenza di potenziale applicata alla soluzione [22, 23].

Il processo di elettrofilatura è ampiamente utilizzato per produrre svariati di materiali fibrosi, tra cui membrane, tessuti, filtri, impianti medici e materiali compositi. La tecnica offre numerosi vantaggi, tra cui la possibilità di produrre fibre di dimensioni molto ridotte, ad alta uniformità, elevata area superficiale e migliorate proprietà meccaniche e chimiche. Tuttavia, il processo di elettrofilatura presenta anche alcune limitazioni, come la necessità di utilizzare soluzioni polimeriche con un grado di viscosità né troppo basso né troppo elevato, e la difficoltà nel controllare la morfologia e la struttura delle fibre prodotte [23]. Nonostante queste limitazioni, l'elettrofilatura rimane una tecnica di produzione di materiali fibrosi altamente promettente con numerose applicazioni commerciali e industriali.

¹⁹ La lecitina è una miscela naturale di fosfolipidi e lipidi neutri in grado di assemblarsi per formare delle micelle. Le ciclodestrine sono degli oligosaccaridi con un trascurabile effetto citotossico e la capacità di formare complessi stabili.

4.3 Modifica superficiale

I polimeri hanno suscitato fin da subito un notevole interesse per le loro svariate proprietà e la relativa facilità di modellazione. Vengono utilizzati in numerosi campi sia industriali che scientifici, e lo studio delle loro applicazioni è in costante evoluzione. Tuttavia, per quanto concerne l'utilizzo dei polimeri in area biomedica, questi raramente vengono impiegati nella loro forma originaria poiché risultano essere biologicamente inerti [24]. Si rendono dunque necessari dei trattamenti superficiali al fine di ottenere dei materiali più avanzati, in grado di indurre determinate risposte nelle cellule con cui interagiscono. La modifica delle proprietà fisiche può migliorare la funzionalità del polimero, ad esempio attraverso l'aggiunta di cariche elettriche o la modifica della tensione superficiale. In generale, le modifiche superficiali dei polimeri possono migliorare la biocompatibilità e la funzionalità dei biomateriali. Esistono vari metodi di modifica superficiale, ognuno di questi viene utilizzato a seconda dei requisiti da soddisfare [24].

4.3.1 Impianto ionico

Questa tecnica ha la capacità di aumentare la biocompatibilità della superficie, la bagnabilità e l'adesione cellulare. Degli ioni ad alta energia, generalmente appartenenti a gas nobili²⁰ o ad elementi come ossigeno o azoto, vengono separati ed accelerati da un campo elettromagnetico e poi impiantati nella superficie (Figura 4.3); in questo modo, l'elevata energia acquisita si dissipa velocemente nell'urto con il substrato provocando cambiamenti nella struttura del polimero.

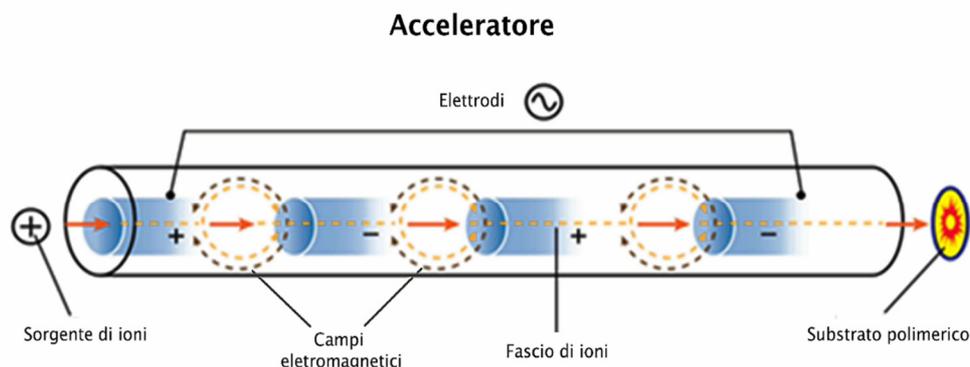


Figura 4.3: rappresentazione schematica di un acceleratore di ioni.

²⁰ I gas nobili sono considerati sostanzialmente inerti e dunque ampiamente utilizzati in medicina per non alterare la biocompatibilità dei materiali.

Per gestire il grado di alterazione della superficie bisogna considerare dei parametri quali: quantità di ioni, tipologia, velocità di impatto; atomi come il fluoro non vengono incorporati nel polimero perché troppo piccoli e vengono dispersi come sottoprodotti gassosi, mentre atomi più grandi come lo iodio rimangono ancorati stabilmente sul substrato [24]. Una velocità d'impatto troppo elevata non è necessaria in quanto si suppone che l'organismo interagisca solo con gli strati più superficiali dell'impianto, è perciò fondamentale progettare adeguatamente la superficie del materiale così che la reazione con gli ioni sia il più efficiente possibile. La quantità di ioni utilizzata è fondamentale nel definire la rugosità finale del prodotto, tuttavia, un numero troppo elevato può avere effetti negativi aumentando il grado di levigatezza compromettendo così l'adesione cellulare. I principali vantaggi di questa tecnologia sono rappresentati dalla relativa facilità di impiego e dall'ottima resa che fornisce, tuttavia, richiede l'utilizzo di polimeri specifici poiché in alcuni casi la reazione con gli ioni causa la produzione di elementi citotossici dannosi per l'organismo [24].

4.3.2 Trattamento al plasma

Il trattamento al plasma è una tecnica molto utilizzata per modificare superfici polimeriche. Il plasma viene comunemente considerato come il quarto stato della materia, si può ottenere applicando energia, fornita ad esempio da un campo elettrico, ad un gas e i gas impiegati maggiormente sono quelli nobili, come argon ed elio, o altri, come azoto ed ossigeno [25]. Il trattamento al plasma può essere utilizzato per varie modifiche superficiali, tra cui la rimozione della contaminazione superficiale, l'alterazione della bagnabilità e l'aumento della biocompatibilità.

La contaminazione superficiale in ambito biomedico è causata principalmente dalla formazione di biofilm: questa può essere rimossa mediante trattamento al plasma. A seconda del gas utilizzato la reazione con lo strato microbico cambia, ma in ogni caso il processo di decontaminazione è di breve durata e non produce temperature elevate [25].

Il trattamento al plasma può essere sfruttato per modificare il comportamento delle superficie al contatto con un liquido: a seconda infatti del tipo di gas, dalla potenza e dalla quantità si può modificare il grado di bagnabilità. Tuttavia, questo trattamento è temporaneo poiché con l'invecchiamento, i gruppi polari che erano stati modificati, tendono a orientarsi come in origine [24].

Infine, questa tecnica viene utilizzata per migliorare la biocompatibilità, modificando la rugosità della superficie. In questo caso i parametri fondamentali sono la durata del trattamento

e la tipologia di polimero. In alcuni casi infatti, può accadere che, nonostante il tempo d'azione prolungato, non si osservino risultati a causa della struttura del polimero (monofasico) [24].

Il principale vantaggio di questa tecnica è rappresentato dalla capacità di migliorare notevolmente le proprietà superficiali senza perdita di materiale. Tuttavia, risulta ancora costosa e complessa, richiede il controllo di molti parametri ed è di difficile impiego su scala industriale.

4.4 Biosintesi basata su virus

Recentemente si è osservato un impiego sempre maggiore di virus, generalmente delle piante, per scopi biomedici, ed in particolare nell'ambito dell'ingegneria tissutale. Questi virus non risultano dannosi per l'essere umano poiché non contengono nel loro nucleo sequenze capaci di provocare risposte immunitarie. I fagi monodispersi sono in grado di autoassemblarsi per formare dei filamenti utilizzabili come scaffold [28]. Una delle applicazioni principali di particelle virali a base di fagi è la rigenerazione dei tessuti: il processo ha inizio con la modifica genetica o chimica del virus accoppiandolo con un tripeptide come RGD (arginina, glicina, acido aspartico) o altri: in questo modo si ottiene una particella polivalente in cui vengono a combinarsi le proprietà di resistenza del virus, a quelle di adesione cellulare dei peptidi. A questo punto le molecole ottenute vengono innestate nelle matrici artificiali [29] (Figura 4.4). Un sostituto tissutale così ottenuto accelera notevolmente il processo di rigenerazione e con ulteriori sviluppi potrebbe portare a miglioramenti anche da un punto di vista estetico, nel caso in cui il tessuto da innestare sia un sostituto cutaneo.

Questa tecnica si trova ancora nelle fasi iniziali del suo sviluppo e nonostante abbia già mostrato notevoli vantaggi in svariate applicazioni: l'utilizzo di virus per la cura di lesioni e malattie rimane ancora oggi un tema delicato da affrontare per i ricercatori, e di conseguenza sono necessarie ulteriori verifiche per un utilizzo sicuro.

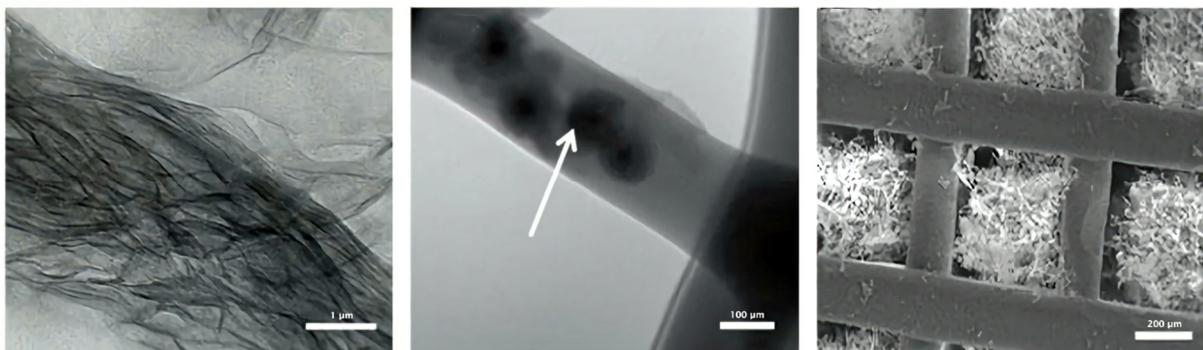


Figura 4.4: a sinistra l'immagine di un fascio di filamenti fagici, al centro una nanofibra elettrofilata contenente un batteriofago e a destra uno scaffold bioceramico ottenuto mediante biostampa 3D i cui pori sono riempiti con chitosano e un fago RGD.

Capitolo 5: Problematiche nella produzione e nell'innesto di tessuti ingegnerizzati

Dai primi tentativi di realizzare tessuti artificiali ai giorni nostri, l'ingegneria tissutale ha compiuto enormi passi in avanti. Oggi si è in grado di produrre strutture complesse, multifunzione ed altamente biocompatibili. Tuttavia, nonostante i notevoli progressi compiuti, ci sono ancora molte problematiche da affrontare per renderli efficaci e sicuri per l'uso umano. Sia nella fase di produzione che in quella post-trapianto, vi sono degli ostacoli che rendono l'intero processo complesso e a volte rischioso. Quando si parla di protesi, innesti o dispositivi medici, ci sono dei requisiti da soddisfare e tra questi uno dei più importanti è la biocompatibilità, ovvero la capacità del materiale innestato di non evocare reazioni avverse nell'organismo ospite, che potrebbero portare a conseguenze anche fatali. Inoltre, nel momento in cui i ricercatori si sono posti l'obiettivo di realizzare costrutti complessi multifunzionali, si sono imbattuti in un requisito tanto fondamentale quanto difficile da soddisfare: la vascolarizzazione. Se il biosostituto da produrre possiede dimensioni importanti ed una struttura altamente organizzata, la semplice diffusione di gas respiratori e metaboliti/cataboliti non è più sufficiente per assicurarne la vitalità. Infine, come precedentemente descritto, ogni metodo di produzione presenta pregi e difetti. In particolare, la produzione a livello industriale è inevitabilmente dispendiosa e richiede tecnologie non ancora mature. Inoltre, la necessità di controllare e garantire la sicurezza dei tessuti ingegnerizzati, prima dell'utilizzo in vivo, comporta ulteriori costi e sfide. Ci vorrà dunque del tempo prima della reale traslazione clinica dei risultati finora ottenuti che si sono rivelati estremamente promettenti.

5.1 Biocompatibilità e risposta immunitaria

Come già accennato, la biocompatibilità è il requisito fondamentale che un impianto, una protesi o un dispositivo medico devono soddisfare. I tessuti biologici nel corpo umano sono molto complessi e la loro struttura è fatta di una varietà di cellule, proteine, e altre molecole. I tessuti ingegnerizzati devono essere progettati in modo da riprodurre questa complessità, ma anche in modo da essere compatibili con l'organismo umano. Principalmente per questo motivo i progressi nell'ingegneria tissutale stanno procedendo lentamente e saranno necessari ancora molti anni per trovare materiali biocompatibili e che, al tempo stesso, abbiano proprietà meccaniche e fisiche adeguate. Gran parte del lavoro, dunque, si concentra nella scelta degli elementi con cui si andrà a costruire l'innesto. Per quanto riguarda i tessuti ingegnerizzati si è più volte tentato di utilizzare cellule animali per le colture, ma in molti casi si sono verificati

episodi di infezione dovuti ad un prelievo non corretto. Inoltre, la biocompatibilità tra cellule animali ed organismi umani non sempre è concretizzabile e questo provoca il rigetto degli innesti impiantati a breve e lungo termine. Di conseguenza, l'interesse si è spostato verso l'utilizzo di cellule staminali per la coltura: le cellule staminali autologhe hanno però una disponibilità limitata e perciò la ricerca si sta concentrando nello sviluppo di sistemi di coltura adeguati per sopperire a questa limitazione [35].

La causa della mancata compatibilità tra innesti e ricevente è principalmente dovuta alla risposta immunitaria. Il corpo umano è infatti dotato di meccanismi di difesa contro tutto ciò che riconosce come esterno. Il sistema immunitario è un insieme di cellule specializzate, organi linfatici, principali e secondari, e proteine specializzate; tutti comunicano tra loro mediante interconnessioni chiamate vasi linfatici. A seguito dell'impianto, la risposta immunitaria può essere classificata in tre fasi: la risposta innata, la risposta adattativa e la risoluzione. Ognuna si realizza in un lasso di tempo differente: la prima è dell'ordine dei giorni, la seconda delle settimane e la terza dei mesi [36]. Ad oggi, non è ancora possibile prescindere totalmente dall'utilizzo di farmaci immunosoppressori, questo perché non si è ancora arrivati alla produzione di materiali completamente bioinerti. Questi farmaci sono generalmente efficaci, ma presentano un problema fondamentale: gli effetti collaterali. Nel caso dei farmaci immunosoppressori gli effetti indesiderati sono molto evidenti, infatti possono causare: tremori, gonfiori, aumento della pressione, disturbi ormonali, nausea e dolori articolari. D'altra parte, non si può prescindere dal loro utilizzo per impedire al sistema immunitario di scatenare potenti reazioni di rigetto. Se utilizzati per un lungo periodo però, possono aumentare la sensibilità alle infezioni e la frequenza di sviluppo di tumori [38]. Per diminuirne l'utilizzo si può far uso di biomateriali immunomodulatori che hanno la capacità di localizzare l'immunosoppressione nel sito della ferita. Tuttavia, lo sviluppo di questi materiali risulta molto complesso e realizzarne di nuovi, con migliorate proprietà, è costoso e richiede tempistiche importanti. Di conseguenza, si tende a preferire biomateriali già approvati, ma in questo modo si rallentano notevolmente i progressi della medicina [36].

Di recente, sta aumentando l'interesse per i farmaci immunosoppressori mirati. Questi presentano enormi vantaggi rispetto ai classici farmaci immunosoppressori, migliorano parzialmente la sopravvivenza del trapianto, prevengono eventuali complicanze e al tempo stesso riducono notevolmente la tossicità fuori bersaglio, l'intensità e la frequenza di rigetto acuto, e il rischio di rigetto cronico. Attualmente, però, questi farmaci sono stati testati con successo solo su modello animale (roditore) ed è necessario che vengano convalidati anche su animali di grandi dimensioni: il loro potenziale in ogni caso è molto promettente [37].

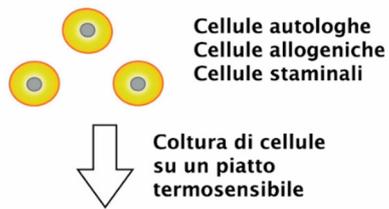
5.2 Vascolarizzazione dei tessuti ingegnerizzati

Man mano che il tessuto cresce, sia in vitro che in vivo, l'apporto di sostanze nutritive e l'eliminazione dei prodotti di scarto non possono più essere soddisfatti sulla base della sola diffusione. Per un costrutto ingegnerizzato con spessore maggiore di 100-250 μm , in assenza di una rete vascolare, si verificherà una necrosi centrale [31]. Pertanto, un processo di prevascolarizzazione risulta fondamentale per impianti di questa grandezza. Nel corso degli anni, i ricercatori hanno sviluppato e testato numerose tecniche per ottenere risultati efficaci e duraturi, ma è solo recentemente che si è arrivati a delle soluzioni applicabili. Di fatto, fino ad ora, sono stati utilizzati per lo più innesti autologhi per poter sfruttare una rete vascolare già sviluppata, tuttavia questa procedura richiede ulteriori interventi chirurgici per il prelievo e di conseguenza un notevole disagio per il paziente. Si è tentato anche di fare affidamento sulla neovascolarizzazione naturale del ricevente, ma anche questo approccio è scadente in quanto dipende da molti fattori non regolabili, primo fra tutti il tempo necessario affinché si formi una rete funzionale, che nel caso di costrutti di grandi dimensioni potrebbe essere così elevato da causare ipossia e necrosi [33].

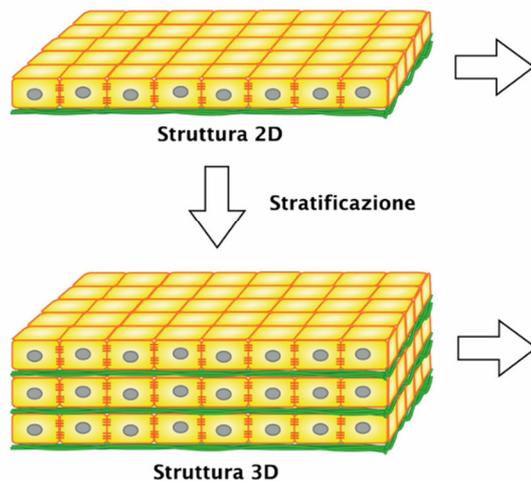
Esistono altre tecniche che si basano sullo sviluppo in vitro o sull'utilizzo di fattori angiogenici. Uno degli approcci più diretti prevede l'impiego di sistemi di co-coltura di cellule progenitrici o staminali, in grado di portare alla formazione di strutture vascolari, tuttavia sono limitati ad ambienti di coltura 2D. Un'altra tecnica prevede l'utilizzo di scaffold con porosità specifiche che permettono la crescita di vasi sanguigni al loro interno: rimangono però presenti i limiti già citati legati alla fabbricazione degli scaffold stessi. Si è cercato anche di non far uso di una matrice 3D sfruttando i fogli cellulari²¹: i fogli vengono impilati uno sopra l'altro ottenendo così un innesto di tessuto (Figura 5.1). Queste strutture possono anche essere vascolarizzate inserendo fogli di cellule endoteliali, tuttavia si verifica un aumento dello spessore che potrebbe ostacolare la diffusione di ossigeno e, in ogni caso, non è certo che gli strati endoteliali siano in grado di formare dei vasi. Per ovviare a questi problemi si può combinare la tecnologia dei fogli cellulari con quella dei bioreattori di perfusione, andando a realizzare strutture con strati meno compressi tra loro, garantendo così il flusso delle sostanze necessarie. Anche questa alternativa però presenta un limite che risiede nel numero massimo di strati impilabili, fattore che limita le dimensioni dell'innesto [32, 33].

²¹ Sono strutture in cui le cellule in coltura vengono raccolte come fossero dei fogli, ed insieme a loro rimane ancorata la matrice extracellulare.

(A) Preparazione del foglio cellulare



(B) Raccolta e manipolazione del foglio cellulare



(C) Trapianto dei fogli cellulari

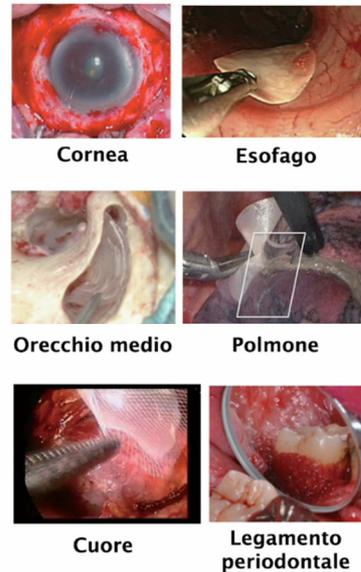


Figura 5.1: rappresentazione schematica della formazione di innesti tramite la tecnica dei fogli cellulari, e le loro possibili applicazioni in campo medico-chirurgico.

Sono stati eseguiti con successo alcuni tentativi di pre-vascularizzazione in vivo, sfruttando il corpo dell'ospite come "bioreattore". L'innesto di tessuto viene impiantato nel paziente in una posizione secondaria altamente vascolarizzata; sarà l'organismo ad occuparsi della vascolarizzazione dell'impianto. Questo approccio è oggettivamente molto invasivo e richiede un gran numero di interventi chirurgici e tempi che possono prolungarsi; tuttavia, è molto promettente e con uno sviluppo adeguato potrebbe diventare uno dei metodi più utilizzati [31, 32].

Capitolo 6: I sostituti cutanei

I sostituti cutanei vengono sviluppati con l'obiettivo di ripristinare la funzione e l'estetica della pelle danneggiata o persa a causa di ustioni, lesioni o condizioni dermatologiche particolari. Grazie agli avanzamenti nella ricerca scientifica e alla tecnologia medica avanzata, i sostituti cutanei sono diventati una realtà promettente nel campo della rigenerazione dei tessuti.

Le possibili applicazioni dei sostituti cutanei sono molteplici e si estendono a diversi campi della medicina. L'esempio più ricorrente è la ricostruzione dei tessuti dopo gravi ustioni. Le ustioni possono causare danni significativi alla pelle e richiedere interventi complessi per ripristinare la funzionalità e l'aspetto estetico. I sostituti cutanei forniscono una barriera protettiva temporanea e promuovono la rigenerazione dei tessuti, facilitandone la guarigione e riducendo il rischio di infezioni. Oltre alle ustioni, i sostituti cutanei possono essere utilizzati nella chirurgia di ricostruzione per trattare lesioni cutanee complesse, tra cui l'asportazione di tumori della pelle. Questi sostituti possono essere utilizzati per coprire l'area di prelievo dopo la rimozione del tumore, riducendo la necessità di prelievi cutanei aggiuntivi e minimizzando le cicatrici. Un'altra possibile applicazione dei sostituti cutanei è la gestione delle lesioni croniche della pelle come le ulcere da pressione. Le ulcere da pressione sono ferite che si sviluppano a causa della pressione costante su specifiche aree del corpo, spesso vengono diagnosticate a persone con ridotta mobilità. I sostituti cutanei possono favorire la guarigione delle ulcere da pressione, fornendo un ambiente idoneo alla rigenerazione dei tessuti e riducendo il rischio di infezione.

Oltre alle applicazioni mediche, i sostituti cutanei sono stati studiati anche per l'utilizzo nell'industria cosmetica. Questi prodotti possono essere impiegati per migliorare l'aspetto estetico della pelle, come nel caso delle creme antirughe o dei trattamenti per la pelle danneggiata dal sole. Sono in corso ricerche per sviluppare sostituti cutanei avanzati che possano rigenerare il collagene e l'elastina della pelle, migliorando la sua compattezza e riducendo i segni dell'invecchiamento.

6.1 La pelle

La pelle è l'organo più grande del corpo in termini di superficie, ed è anche la parte più esposta a lesioni. La cute è composta da uno strato superficiale, denominato epidermide con funzioni di protezione, da uno strato intermedio, derma, con funzioni di sostegno, e da uno strato profondo detto ipoderma [9] (Figura 6.1). Lo strato più esterno dell'epidermide è chiamato strato corneo, è più impermeabile di altri strati, ed ha il compito di inibire l'ingresso di agenti

patogeni ed altre sostanze, oltre ad assorbire gli stress meccanici che il corpo subisce. Il derma è lo strato della pelle con maggiore spessore e fornisce importanti proprietà fisiche come: flessibilità, elasticità e resistenza alla trazione. All'interno si possono trovare numerose strutture come le terminazioni sensoriali, i vasi linfatici e i capillari sanguigni. L'ipoderma è uno strato sottocutaneo costituito da cellule adipose, non presente in tutte le regioni del corpo, come ad esempio nelle palpebre, con le funzioni principali di isolamento e supporto meccanico [39, 40].

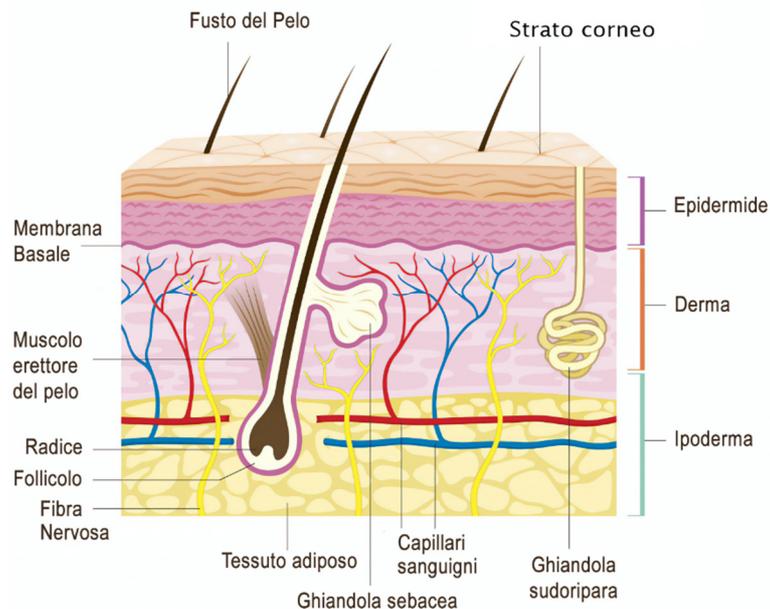


Figura 6.1: la struttura della cute.

6.2 Tipologie di innesti cutanei

I modelli mimetici più semplici della cute vengono progettati ispirandosi allo strato corneo, essendo questo, come già descritto, il primo punto di contatto tra i composti esterni e la pelle. Ad oggi, la tecnica di trapianto più utilizzata prevede ancora l'autoinnesto: il lembo di pelle viene prelevato dal paziente stesso, e innestato nella zona interessata. Con questo metodo non vi è il rischio di rigetto e dal punto di vista estetico vi è una maggiore probabilità che la differenza tra la cute trapiantata e quella originale sia meno evidente. Tuttavia, questo tipo di operazione è inevitabilmente invasiva e non sempre è possibile prelevare una quantità di cute sufficiente per coprire l'intera area lesionata [40, 41]. Un metodo per superare il limite del tessuto donatore si basa sugli alloinnesti: il tessuto viene prelevato da un cadavere o da un donatore vivente e trapiantato nel paziente. Un alloinnesto può essere utilizzato anche per fornire una copertura temporanea per proteggere il tessuto sottostante in via di formazione [41]. Esiste poi una tecnica che prevede il prelievo dell'aminio, un annesso embrionale che forma

una sacca membranosa a protezione dell'embrione, dalle placente di donatori. L'utilizzo dell'amnio viene impiegato per la medicazione delle ustioni poiché riduce la perdita di proteine, diminuisce il dolore e il rischio di infezione e accelera la guarigione. La membrana amniotica è ricca di collagene e questo fattore riduce la formazione di cicatrici.

Col progredire della medicina e della tecnologia, vengono sviluppate nuove tipologie di innesto per trovare una soluzione ai problemi etici e normativi sollevati dal prelievo di cute dai cadaveri. Sono stati progettati dei sostituti cutanei ingegnerizzati a partire da colture cellulari o matrici extracellulari che forniscono numerose proprietà. In linea di principio, un sostituto cutaneo ingegnerizzato deve essere sterile, provocare una bassa/nulla risposta infiammatoria, subire una degradazione controllata e avere dei requisiti di conservazione facilmente soddisfabili. Questi innesti forniscono componenti sia epidermici che dermici; sono stati utilizzati con successo per la cura di ustioni a tutto spessore e questo grazie alla presenza di numerose cellule staminali che consentono la rigenerazione della pelle nativa nel paziente [41].

Ad oggi la ricerca si concentra sullo sviluppo di modelli di pelle il più realistici possibile. Per produrli, vengono impiegate diverse tecniche di biostampa 3D, utilizzando materiali compositi contenenti fibroblasti, cheratinociti e idrogel a base di collagene per costruire modelli multistrato incredibilmente simili, sia per aspetto che per funzionalità, alla cute umana. La Tabella 6.1 elenca alcuni dei prodotti attualmente in commercio e la loro origine.

Tipologia	Prodotto	Azienda	Componenti
Epidermico			
Autologo	EpiDex	Modex Therapeutiques, Losanna, Svizzera	Cheratinociti in coltura prelevati dalla guaina della radice esterna dei follicoli piliferi del cuoio capelluto
	CellSpray	Clinica della coltura cellulare, Australia	Cheratinociti sia in coltura che non
	TransDerm	XCELLentis NV, Belgio	Cheratinociti in coltura
Dermico			
Autologo	Ialoinnesto 3D	Fidia Advanced Biopolymers, Italia	Membrana di acido ialuronico ottenuta da fibroblasti in coltura (HAM)
Xenogenico	Matriderm	Dott. Suwelack Skin and HealthCare AG, Germania	Derma liofilizzato bovino non reticolato, rivestito con α -elastina idrolizzata
Sintetico	Microfibre di poliuretano biodegradabili	Università del Delaware, USA	Microfibre di poliuretano biodegradabili
Composito (epidermico/dermico)			
Autologo	Permaderm™	Regeninic Inc., USA	Fibroblasti e cheratinociti autologhi in coltura con substrati di collagene bovino e GAG
Allogeneico	StrataGraft™	Stratatech Corporation, USA	Sostituto cutaneo a tutto spessore con strati dermici ed epidermici completamente differenziati
Xenogenico	Oasi®	Healthpoint Biotherapeutics, USA	Matrice intatta prelevata dalla sottomucosa dell'intestino tenue suino

Tabella 6.1: sostituti della pelle disponibili in commercio.

Capitolo 7: Nuovi materiali

Le scoperte e i traguardi raggiunti nel campo dell'ingegneria tissutale sono sensazionali, ma persistono ancora numerosi limiti da superare per raggiungere uno stato di affidabilità e stabilità che permetta ai biosostituti di essere applicati con facilità in ogni contesto. Con il progredire della ricerca, delle tecnologie e dei metodi di produzione, vengono scoperti di continuo nuovi materiali in grado di ampliare il ventaglio di applicazioni e fornire migliorate proprietà. Se inizialmente il problema principale era rappresentato dal limite di tessuto prelevabile, in quanto la sintesi in vitro non era ancora sufficientemente sviluppata per poter essere applicata in ambito chirurgico; ora la ricerca si è spostata sull'affinamento dei materiali e sulle risposte immunitarie che questi provocano. L'avvento della nanotecnologia ha permesso di replicare con maggiore precisione i tessuti biologici e le loro strutture. Grazie alla microelettronica è ora possibile costruire degli impianti estremamente sottili e flessibili utilizzati per il controllo di numerose funzioni corporee. Infine, con i recenti sviluppi chimici si possono produrre materiali a base di elastina in grado di subire deformazioni senza rompersi fornendo supporto meccanico e flessibilità ai tessuti generati [47, 44].

7.1 Nanobiomateriali

Come già detto, un nanomateriale è definito tale se presenta almeno una delle tre dimensioni in scala nanometrica (10^{-9} m). Per nanobiomateriale non necessariamente si intende un oggetto, nel suo intero, con dimensioni nanometriche, bensì un biomateriale nel quale siano stati incorporati degli elementi nanometrici (Figura 7.1).

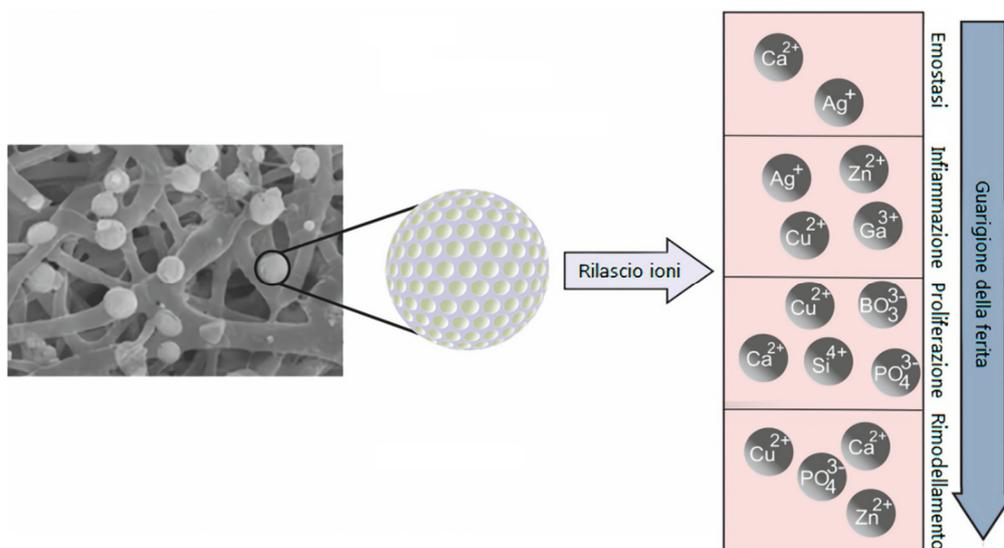


Figura 7.1: immagine al microscopio elettronico di elementi nanometrici bioattivi incorporati in una matrice biopolimerica e loro applicazione nella cura delle ferite.

Questi elementi sono dei nanoriempitivi bioattivi che hanno lo scopo di aumentare l'area superficiale, migliorare l'adesione cellulare, la proliferazione e la differenziazione. Generalmente questi materiali sono costituiti da una matrice biopolimerica e vengono classificati in base al polimero utilizzato [42].

Fino ad ora la maggior parte delle applicazioni di nanoparticelle si sono concentrate sui sistemi di somministrazione di farmaci. I recenti sviluppi hanno visto l'impiego di nanomateriali per la fabbricazione di sonde controllabili a distanza da utilizzare su pazienti affetti da tumori: il dispositivo viene inserito nel corpo e direzionato verso la zona interessata dove, con precisione estremamente elevata, può rilasciare sostanze chemioterapiche oppure effettuare un trattamento termico mirato a distruggere le cellule cancerose. L'obiettivo futuro è quello di sviluppare nanobiomateriali che hanno la capacità di essere controllati da segnali esterni con lo scopo di produrre dispositivi medici, come protesi o innesti, che possono essere modificati nel tempo a seconda delle variazioni dell'ambiente in cui si trovano.

Le sfide da superare sono ancora molte e riguardano, oltre all'ambito strettamente scientifico, soprattutto l'ambito normativo per il quale questi nuovi materiali devono superare complessi requisiti, imposti per la salvaguardia della salute e della sicurezza dei pazienti [43].

7.2 Materiali a base di elastina

L'elastina è una proteina elastomerica, insolubile e fibrosa, facente parte dei componenti principali della matrice extracellulare, che si trova principalmente in quei tessuti soggetti ad elevate deformazioni [45]. Si ottiene a partire dal suo precursore, la tropoelastina (solubile), mediante un processo di elastogenesi che negli esseri umani si verifica durante il tardo periodo fetale e il primo periodo neonatale. Negli adulti il turnover dell'elastina è molto lento ed è per questo motivo, e per l'importanza di questa proteina nei tessuti cardiaci, che la ricerca si sta concentrando nello sviluppo di biomateriali a base di elastina. In particolare, l'interesse è rivolto all'ambito cardiovascolare dato che le malattie che colpiscono direttamente il cuore sono tra le principali cause di morte nel mondo occidentale [44]. L'obiettivo è quello di produrre dei biomateriali in grado di replicare, ad esempio, i vasi sanguigni, sfruttando le caratteristiche dell'elastina, per produrre innesti vascolari multicomponenti con buone proprietà meccaniche in termini di pressione di scoppio e forza di ritenzione della sutura, pur consentendo un'efficiente trasmissione del flusso pulsatile.

Tra gli elementi del cuore di estrema importanza, e spesso soggetti a patologie, vi sono le valvole cardiache e in particolare la valvola aortica. La malattia più comune è chiamata stenosi aortica ed è caratterizzata da una calcificazione della valvola, che, nei casi più gravi, causa

l'ostruzione del flusso sanguigno. Per trattare questa patologia si può far uso di farmaci, che tuttavia non risolvono il problema della degradazione calcifica, bensì hanno lo scopo di fluidificare il sangue per rendere più facile il passaggio attraverso la stessa. Di conseguenza il trattamento più utilizzato si basa sulla sostituzione, la riparazione o la ricostruzione della valvola. Ad oggi, in commercio, le valvole cardiache protesiche si dividono essenzialmente tra meccaniche e biologiche. Entrambi i tipi di dispositivo però presentano degli inconvenienti: il primo richiede l'assunzione costante di farmaci anticoagulanti, mentre nel secondo persistono i difetti di natura biologica come la calcificazione, la lacerazione dei lembi e la formazione di pannus²². Tra le ricerche più recenti spicca il tentativo di costruire una valvola combinando un biomateriale degradabile con delle cellule autologhe, ottenendo così un innesto vitale [44]. Il concetto si basa sulla produzione di un'impalcatura artificiale e biodegradabile a forma di valvola, in grado di evolversi in un tessuto vivente a seguito di una risposta infiammatoria acuta. Questa risposta si verifica in seguito all'impianto della protesi e alla colonizzazione da parte delle cellule immunitarie provenienti dal flusso sanguigno. Infine, l'impalcatura viene completamente degradata dalle cellule, mentre, contemporaneamente, viene sintetizzata nuova matrice extracellulare endogena²³ che produrrà una valvola cardiaca biologica completamente funzionale (Figura 7.2) [44].

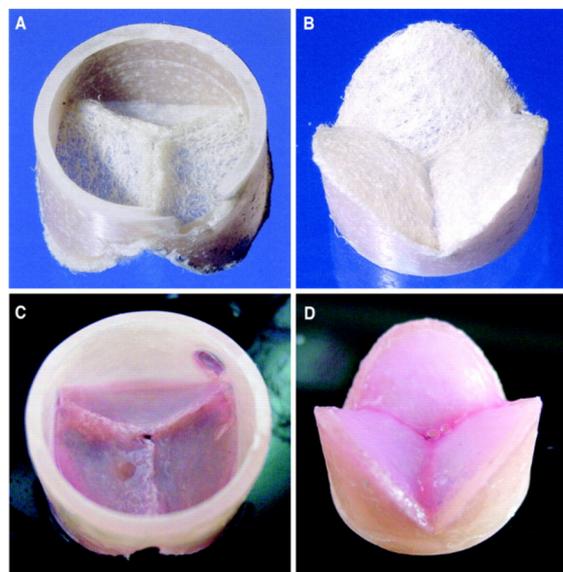


Figura 7.2: nelle immagini a, b: vista dal lato aortico e ventricolare rispettivamente, di un'impalcatura biodegradabile per valvole cardiache. Nelle immagini c, d: la valvola dopo 4 settimane di coltura in vitro, i 3 lembi risultano completi ed intatti.

²² Ispessimento anomalo del tessuto valvolare.

²³ Matrice extracellulare derivante da fattori interni dell'organismo

Il problema principale di questa tecnica risiede nella scelta del materiale con cui costruire l'impalcatura. Sono stati fatti numerosi tentativi sfruttando fibre di collagene o fibrina ma i risultati forniti erano insoddisfacenti. Una soluzione parziale è stata trovata utilizzando un materiale ibrido a base di collagene nel quale sono state inserite delle fibre di elastina. In questo modo le proprietà meccaniche della valvola artificiale sono risultate molto simili alle valvole cardiache umane; tuttavia, un'ulteriore sfida è rappresentata dal posizionamento di queste fibre: da esso, infatti, dipende il moto del flusso sanguigno attraverso la valvola e la degradabilità della struttura [44].

Questo approccio fornisce dunque la possibilità di ottenere delle valvole con proprietà molto simili a quelle di valvole già utilizzate (ad esempio le valvole suine), ma quasi del tutto prive dei difetti tipici come il rigetto o la calcificazione in tempi brevi. Rimangono ancora numerosi studi da fare per trovare i materiali più adatti e, inoltre, sarà necessario trovare un metodo di produzione che renda vantaggioso l'utilizzo di questa tecnica rispetto alle altre.

7.3 Microbioelettronica

Negli ultimi cinquant'anni il mondo dell'elettronica ha vissuto uno sviluppo impressionante. Con la miniaturizzazione progressiva dei componenti, elettronica e medicina si sono legate sempre più. La ricerca in medicina si è sempre avvalsa dell'utilizzo di specie animali per testare nuovi approcci, tuttavia, nonostante il numero elevatissimo di modelli animali impiegati, i risultati ottenuti non sempre sono stati utilizzati per applicazioni sull'uomo. Negli ultimi anni la microelettronica ha suscitato un maggiore interesse per la possibilità di ridurre il ricorso al modello animale e, contemporaneamente, ottenere risultati migliori. L'unione di elettronica, ingegneria tissutale e della tecnologia lab-on-a-chip (LOC)²⁴, ha dato origine alla tecnica dell'organ-on-a-chip (OOAC). Questo approccio si basa sull'utilizzo di camere miniaturizzate e microcanali stampati su un materiale biocompatibile per replicare l'ambiente naturale delle cellule umane [46]. La tecnologia OOAC è modulare e può integrare diversi sensori e attuatori per analisi molto specifiche; inoltre può ospitare più strati cellulari in modo da emulare le complesse interazioni che si verificano nei tessuti. Gli organi analizzati fino ad ora su chip comprendono: cuore, polmoni, fegato e reni. La pandemia COVID-19 ha dato un'ulteriore

²⁴ Dispositivo che integra svariate funzioni, solitamente svolte in laboratorio, delle dimensioni che vanno da pochi millimetri a qualche centimetro. Inizialmente erano a base di silicio poiché venivano sfruttate le tecniche di produzione dei microprocessori; successivamente, per un maggior impiego in ambito medico, vennero utilizzati materiali più biocompatibili.

spinta allo sviluppo di questa tecnologia che ha visto il suo impiego anche per lo studio di tessuti cutanei e ossei [46].

I vantaggi che porta OOAC sono fondamentali per un futuro in cui si potranno avere cure mediche totalmente personalizzate. Lo sviluppo di questa tecnica permetterà di produrre tessuti ingegnerizzati privi del rischio di rigetto, grazie ai numerosissimi test che si potranno fare su chip prima del trapianto. Inoltre, il costo in termini di vite animali verrà pressoché azzerato grazie alla possibilità di testare le nuove cure sperimentali, milioni di volte, su un dispositivo elettronico, eliminando il fattore variabilità interindividuale.

Un'altra tecnologia che promette di replicare le funzionalità di un tessuto è chiamata pelle elettronica (in inglese e-skin), e si basa sull'utilizzo di materiali meccanicamente flessibili ed estensibili, simili all'epidermide umana. Questi materiali devono consentire un contatto intimo tra gli oggetti e la cute senza causare irritazione o sudorazione locale. La e-skin è costituita essenzialmente da due parti: un substrato privo di componenti elettronici, a contatto diretto con la pelle, e da uno strato conduttivo con numerose interconnessioni. Per il substrato, i materiali testati con successo sono rappresentati da gomme siliconiche, PET e seta, un materiale biocompatibile, flessibile e confortevole. Per lo strato conduttivo, invece, i classici materiali conduttori come oro, rame e argento non sono utilizzabili per la loro natura fragile, in special modo per spessori estremamente ridotti. Attualmente la ricerca è concentrata sullo sviluppo di polimeri conduttivi, come aerogel, idrogel, e materiali compositi; tuttavia non si è ancora in grado di replicare la conducibilità dei materiali metallici sopra citati [47]. Per quanto riguarda la parte elettronica, l'obiettivo è quello di rimpiazzare i classici semiconduttori inorganici con quelli organici per produrre transistor organici in grado di resistere alle sollecitazioni e garantire elasticità al dispositivo. Per aggirare il problema della fragilità di un elemento elettronico vulnerabile ad acqua, ossigeno e calore, è in via di sviluppo una tecnica di incapsulamento mediante materiali idrofobici così da garantire una maggiore durata del dispositivo [47]. La sfida principale che questa tecnologia deve affrontare è la ricerca dei materiali adatti per poter sviluppare un dispositivo utilizzabile in ogni contesto. Il campo di applicazione della pelle elettronica non è ancora perfettamente delineato, e fino ad ora è stata utilizzata principalmente come dispositivo indossabile per il monitoraggio delle condizioni mediche di un individuo. In futuro si prevede che possa essere impiegata anche come sostituto della cute o come protesi estensiva per una percezione aumentata della realtà.

Conclusioni

Le superfici biomimetiche nell'ingegneria tissutale si sono dimostrate fondamentali per conferire a questa branca dell'ingegneria un ruolo da protagonista nella medicina attuale e futura. I progressi avvenuti fino ad ora in questo campo sono stati significativi e gli sviluppi futuri sono altrettanto promettenti. Tuttavia, gli ostacoli da affrontare sono ancora molti. I problemi non riguardano solamente l'interazione tra costruito ingegnerizzato e organismo; essendo una scienza relativamente giovane, è necessario prima di tutto affrontare la sfida rappresentata dalla scala di produzione. Come descritto all'interno di questa tesi, l'obiettivo attuale e futuro è quello sintetizzare nuovi materiali per produrre superfici in grado di replicare l'ambiente cellulare, e il metodo migliore è sfruttare ciò che la natura può offrire. Le superfici biomimetiche devono però essere prodotte in modo efficiente e scalabile per poter essere utilizzate in ambito clinico. La produzione su larga scala richiede la standardizzazione dei processi di fabbricazione e la valutazione dei costi, garantendo al contempo la qualità e la riproducibilità delle superfici prodotte. È nell'interesse di ogni Paese sviluppare metodi di produzione in linea con gli obiettivi climatici globali. Governi ed enti no-profit si stanno attivando per finanziare le tecnologie necessarie a superare questi limiti e rispettare questi obiettivi perché l'importanza delle superfici biomimetiche nell'ingegneria tissutale e nella medicina in generale non può essere sottovalutata.

Il potenziale futuro di queste tecnologie indica che quasi certamente potranno giocare un ruolo cruciale nel miglioramento della salute e nella cura di numerose patologie e condizioni mediche. Saranno necessari ancora degli anni, se non qualche decennio, per ottenere risultati tangibili: accelerare il processo di sviluppo potrebbe essere controproducente e rallentare il progresso di una tecnologia che, un domani, potrà migliorare le condizioni di milioni di vite umane.

Bibliografia

- [1] Avrămescu RE, Ghica MV, Dinu-Pîrvu C, Prisada R, Popa L. Superhydrophobic Natural and Artificial Surfaces - A Structural Approach. *Materials*, 2018; 11(5): 866.

- [2] Farooq SA, Raina A, Mohan S, Singh RA, Jayalakshmi S, UI Haq MI. Nanostructured Coatings – Review on Processing Techniques, Corrosion Behaviour and Tribological Performance. *Nanomaterials*, 2022; 12(8): 1323.

- [3] Ferreira- Faria I, Yousefiasl S, Macário-Soares A, Pereira-Silva M, Peixoto D, Zafar H, Raza F, Faneca H, Veiga F, Hamblin MR, Tay FR, Gao J, Sharifi E, Makvandi P, Paiva-Santos AC. Stem cell membrane-coated abiotic nanomaterials for biomedical applications. *Journal of controlled release*, 2022; 351: 174-197

- [4] Escobar A, Muzzio N, Moya SE. Antibacterial Layer-by-Layer Coatings for Medical Implants. *Pharmaceutics*, 2021; 13(1): 16.

- [5] Huang S, Liang N, Hu Y, Zhou X, Abidi N. Polydopamine-assisted surface modification for bone biosubstitutes. *BioMed Research International*, 2016.

- [6] Zhang Y, Chen Q, Zhu Y, Pei M, Wang K, Qu X, Zhang Y, Gao J, Qin H. Targeting inorganic nanoparticles to tumours using biological membrane-coated technology. *MedComm*, 2022; 3(4): 192.

- [7] Arango-Santander S. Bioinspired topographic surface modification of biomaterials. *Materials*, 2022; 15(7):2383.

- [8] Gil J, Manero JM, Ruperez E, Velasco-Ortega E, Jiménez-Guerra A, Ortiz-García I, Monsalve-Guil L. Mineralization of titanium surfaces: Biomimetic implants. *Materials*, 2021; 14(11): 2879.

- [9] Di Bello C, Bagno A. Biomateriali: dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche. *Collana di ingegneria biomedica*, 2016; 9(5): 118.

- [10] Karamanos NK, Theocharis AD, Piperigku Z, Manou D, Passi A, Skandalis SS, Vynios DH, Orian-Rousseau V, Ricard-Blum S, Schmelzer C EH, Duca L, Durbeej M, Afratis NA, Troberg L, Franchi M, Massola V, Onisto M. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *The febs journal*, 2021; 288(24): 6850-6912.
- [11] Yousefzade O, Katsarava R, Puiggali J. Biomimetic hybrid system for tissue engineering. *Biomimetics*, 2020; 5(4): 49.
- [12] Scaffold. (n.d.). Wikipedia. Consultato il giorno aprile 9, 2023, da <https://it.wikipedia.org/w/index.php?title=Scaffold&oldid=131687246>.
- [13] He W, Reaume M, Hennenfent M, Lee BP, Rajachar R. Biomimetic hydrogels with spatial- and temporal-controlled chemical cues for tissue engineering. *Biomater Sci*, 2021; 8(12): 3248-3269.
- [14] Silva M, Ferreira FN, Alves NM, Paiva MC. Biodegradable polymer nanocomposites for ligament/tendon tissue engineering. *J Nanobiotechnology*, 2020; 18: 23.
- [15] Fu B, Shen J, Chen Y, Wu Y, Zhang H, Liu H, Huang W. Narrative review of gene modification: applications in three-dimensional (3D) bioprinting. *Ann Transl Med*, 2021; 9(19): 1502.
- [16] Shin J, Lee Y, Li Z, Hu J, Park SS, Kim K. Optimized 3D Bioprinting Technology Based on Machine Learning: A Review of Recent Trends and Advances. *Micromachines*, 2022; 13(3): 363.
- [17] Sachdev A, Acharya S, Gadodia T, Shukla S, Harshita J, Akre C, Khare M, Huse S. A Review on Techniques and Biomaterials Used in 3D Bioprinting. *Cureus*, 2022; 14(8): e28463.
- [18] Zhang J, Wehrle E, Rubert M, Müller R. 3D Bioprinting of Human Tissues: Biofabrication, Bioinks, and Bioreactors. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021; 22(8): 3971.

- [19] Gu Z, Fu J, Lin H, Hea Y. Development of 3D bioprinting: From printing methods to biomedical applications. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2020; 15(5): 529-557.
- [20] Yu J, Park SA, Kim WD, Ha T, Xin YZ, Lee J, Lee D. Current Advances in 3D Bioprinting Technology and Its Applications for Tissue Engineering. *Polymers*, 2020; 12(2): 2958
- [21] Kačarević ZP, Rider PM, Alkildani S, Retnasingh S, Smeets R, Jung O, Ivanišević Z, Barbeck M. An Introduction to 3D Bioprinting: Possibilities, Challenges and Future Aspects. *Materials*, 2018; 11(11): 2199.
- [22] Law JX, Liao LL, Saim A, Yang Y, Idrus R. Electrospun Collagen Nanofibers and Their Applications in Skin Tissue Engineering. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2017; 14(6): 699-718.
- [23] Xue J, Wu T, Dai Y, Xia Y. Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications. *Author manuscript*, 2019; 119(8): 5298-5415.
- [24] Neděla O, Slepíčka P, Švorčík V. Surface Modification of Polymer Substrates for Biomedical Applications. *Materials*, 2017; 10(10): 1115.
- [25] Sasmazel HT, Alazzawi M, Abid Alsaheb NK. Atmospheric Pressure Plasma Surface Treatment of Polymers and Influence on Cell Cultivation. *Molecules*, 2021; 26(6): 1665.
- [26] Malcor JD, Mallein-Gerin F. Biomaterial functionalization with triple-helical peptides for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 2022; 148: 1-21.
- [27] Bierbaum S, Hintze V, Scharnweber D. Functionalization of biomaterial surfaces using artificial extracellular matrices. *Biomatter*, 2012; 2(3): 132-141.
- [28] Oh JW, Han DW. Virus-Based Nanomaterials and Nanostructures. *Nanomaterials*, 2020; 10(3): 567.

- [29] Raja IS, Kim C, Song SJ, Shin YC, Kang MS, Hyon SH, Oh JW, Han DW. Virus-Incorporated Biomimetic Nanocomposites for Tissue Regeneration. *Nanomaterials*, 2019; 9(7): 1014.
- [30] Pietroni L. Biomimesi: Definizione, Principi e Strumenti. *Genitronsviluppo*, 2011; 141.
- [31] Shafiee S, Shariatzadeh S, Zafari A, Majd A, Niknejad H. Recent Advances on Cell-Based Co-Culture Strategies for Prevascularization in Tissue Engineering. *Frontier in bioengineering and biotechnology*, 2021; 9: 745314.
- [32] Rademakers T, Horvath JM, van Blitterswijk CA, LaPointe V L.S. Oxygen and nutrient delivery in tissue engineering: Approaches to graft vascularization. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2019; 13(10): 1815-1829.
- [33] Masson-Meyers DS, Tayebi L. Vascularization strategies in tissue engineering approaches for soft tissue repair. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2021; 15(9): 747-762.
- [34] Gracioso Martins AM, Biehl A, Sze D, Freytes DO. Bioreactors for Vocal Fold Tissue Engineering. *Tissue engineering. Part B, reviews*, 2022; 28(1): 182-205.
- [35] Sharma P, Kumar P, Sharma R, Bhatt VD, Dhot PS. Tissue Engineering; Current Status & Futuristic Scope. *Journal of medicine and life*, 2019; 12(3): 225-229.
- [36] Savoji H, Godau B, Hassani MS, Akbari M. Skin Tissue Substitutes and Biomaterial Risk Assessment and Testing. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 2018; 6: 86.
- [37] Taddeo A, Tsaia C, Vogelimb E, Riebena R. Novel targeted drug delivery systems to minimize systemic immunosuppression in vascularized composite allotransplantation. *Current opinion in organ transplantation*, 2018; 23(5): 568-576.
- [38] Farmaci immunosoppressori. Istituto superiore di sanità, 2020.

- [39] Sheikholeslam M, Wright M EE, Jeschke MG, Amini-Nik S. Biomaterials for Skin Substitutes. Author manuscript, 2017; 7(5): 10.1002
- [40] Moniz T, Costa Lima SA, Reis S. Human skin models: From healthy to disease-mimetic systems; characteristics and applications. *British journal of pharmacology*, 2020; 177(19): 4314-4329.
- [41] Vig K, Chaudhari A, Tripathi S, Dixit S, Sahu R, Pillai S, Dennis VA, Singh SR. Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering. *International journal of molecular sciences*, 2017; 18(4): 789.
- [42] Bharadwaza A, C. Jayasuriyaa A. Recent Trends in the Application of Widely Used Natural and Synthetic Polymer Nanocomposites in Bone Tissue Regeneration. Author manuscript, 2020;110: 110698.
- [43] Sinha A , Simnani FZ, Singh D, Nandi A, Choudhury A, Patel P, Jha E, Singh RC, Kaushik NK, Mishra YK, Panda PK, Suar M, Verma SK. The translational paradigm of nanobiomaterials: Biological chemistry to modern applications. *Materials today bio*, 2022; 17: 100463.
- [44] de Torre IG, Alonso M, Rodriguez-Cabello JC. Elastin-Based Materials: Promising Candidates for Cardiac Tissue Regeneration. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 2020; 8: 657.
- [45] Del Prado Audelo ML, Mendoza-Muñoz N, Escutia-Guadarrama L, Giraldo-Gomez D, González-Torres M, Florán B, Cortés H, Leyva-Gomez G. Recent Advances in Elastin-Based Biomaterial. *Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 2020; 23: 314-332.
- [46] Koyilot MC, Natarajan P, Hunt CR, Sivarajkumar S, Roy R, Joglekar S, Pandita S, Tong CW, Marakkar S, Subramanian L, Yadav SS, Cherian AV, Pandita TK, Shameer K, Yadav KK. Breakthroughs and Applications of Organ-on-a-Chip Technology. *Cells*, 2022; 11(11): 1828.

- [47] Bunea AC, Dediu V, Laszlo EA, Pistrîu F, Carp M, Iliescu FS, Ionescu ON, Iliescu C. E-Skin: The Dawn of a New Era of On-Body Monitoring Systems. *Micromachines*, 2021; 12(9):1091.