



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**BIOMATERIALI CERAMICI
PER LA RIGENERAZIONE DEL TESSUTO OSSEO**

Relatore: Prof.ssa Todros Silvia

Laureanda: Mazzer Serena

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

Data di laurea 19 settembre 2022

INDICE

SOMMARIO.....	3
1. IL TESSUTO OSSEO	4
1.1 Generalita'	4
1.2 Matrice extra cellulare.....	4
1.3 Cellule	5
1.4 Tipologie di tessuto osseo	6
1.5 Patologie ossee e terapia convenzionale	7
2. INGEGNERIA DEL TESSUTO OSSEO.....	8
2.1 Ingegneria tissutale.....	8
2.2 Proprieta' dello scaffold	10
2.3 Tecnica di stampa 3D.....	12
2.4 Biomateriali ceramici	15
2.4.1 Fosfati di calcio.....	16
2.4.2 Silicati di calcio.....	22
2.4.3 Elementi dopanti	24
2.4.4 Effetti della macrostruttura	25
2.4.5 Microstruttura degli scaffold.....	28
2.5 Applicazioni	29
3. SVILUPPI FUTURI	33
CONCLUSIONI.....	36
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	38

SOMMARIO

La medicina rigenerativa si avvale dell'ingegneria dei tessuti per la realizzazione di tessuti artificiali mediante la coltivazione di cellule autologhe su appositi sostegni (scaffold), con il fine di riparare, rigenerare o sostituire tessuti e organi danneggiati a causa di patologie o disfunzioni. La realizzazione di un ottimo sostegno è alla base del successo di questo approccio e deve avere forma e caratteristiche tali da garantire compatibilità biologica col tessuto da sostituire. Uno scaffold per l'ingegneria tissutale dovrebbe fornire un ambiente che consenta la proliferazione delle cellule selezionate, che favorisca la rigenerazione dei tessuti operando su forma, struttura e funzioni che si vogliono ottenere. Ci concentreremo sul tessuto osseo, per il quale sono stati realizzati scaffold con biomateriali ceramici come l'idrossiapatite e i silicati di calcio, che hanno composizione simile a quella dell'osso. Questi materiali si prestano bene alla stampa 3D, tecnica innovativa con cui è possibile ottenere una struttura migliore, ovvero morfologicamente più simile a quella del tessuto osseo umano, rispetto a quella conseguita con altri metodi di fabbricazione. Concentrandoci quindi sui supporti ceramici ottenuti principalmente con la stampa 3D, analizzeremo gli effetti che diverse composizioni e strutture hanno sulle proprietà biologiche e meccaniche. Complessivamente sono stati riscontrati buoni risultati in campo di rigenerazione tissutale, ma non solo: l'uso di biomateriali ceramici sembrerebbe efficiente anche per la terapia del tumore osseo.

1. IL TESSUTO OSSEO

1.1 GENERALITA'

Il tessuto osseo è un tessuto connettivo caratterizzato da cellule immerse in una matrice extracellulare mineralizzata. La presenza di minerali, come pure l'abbondanza e la particolare distribuzione delle altre componenti all'interno della matrice, conferiscono a questo tessuto proprietà meccaniche di elevate durezza e resistenza a trazione e compressione. In virtù di queste proprietà, il tessuto osseo costituisce un materiale ideale per la formazione delle ossa dello scheletro, che costituiscono nel loro insieme l'impalcatura di sostegno dell'organismo. Inoltre, per la sua peculiare composizione in sali minerali, svolge un ruolo fondamentale nel controllo della concentrazione di calcio nei liquidi del corpo, ione necessario alle attività metaboliche dell'intero organismo. Infine, il tessuto osseo ha la funzione di proteggere gli organi molli e di consentire ai muscoli di generare i movimenti per la deambulazione. Il tessuto osseo è di norma rivestito da speciali tessuti connettivi: il periostio, disposto esternamente e l'endostio, che tappezza le cavità interne delle ossa, è riccamente vascolarizzato e riceve numerose terminazioni nervose di tipo sensitivo [2].

1.2 MATRICE EXTRA CELLULARE

La matrice extracellulare (ECM, *Extracellular Matrix*) costituisce la parte non cellulare di un tessuto e ha due principali componenti: proteine fibrose e matrice minerale amorfa. Le prime sono le principali responsabili della resistenza a trazione del tessuto osseo, cioè ad un carico che si distribuisce lungo l'asse longitudinale, e forniscono l'impalcatura tridimensionale che sostiene la matrice mineralizzata; quest'ultima è invece responsabile della durezza del tessuto. Nel complesso, la matrice extracellulare occupa circa il 20% del peso corporeo e svolge un ruolo fondamentale nel sostenimento del tessuto, in quanto funge da substrato su cui tutte le cellule possono aderire, proliferare e differenziare. I costituenti della ECM si distinguono in componente organica e inorganica [1].

- *Componente organica*: comprende diverse proteine come il collagene, l'elastina, i proteoglicani e le glicoproteine. La componente più abbondante è il collagene di tipo I, che rappresenta circa il 90% della parte organica. È costituito da filamenti elicoidali di tropocollagene, proteina formata da tre catene polipeptidiche che si organizzano in una

tripla elica destrorsa. I filamenti sono mantenuti insieme grazie a interazioni tra gli amminoacidi della catena che conferiscono alla proteina stabilità e resistenza a trazione.

- *Componente inorganica*: è costituita prevalentemente da cristalli di fosfato di calcio sottoforma di cristalli di apatite, che tendono a disporsi parallelamente tra sé e alle microfibrille di collagene, di cui ricoprono la superficie e permeano le porosità (Fig. 1.1). La formula chimica dell'apatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6^{++}$ prevede due cariche positive che vengono neutralizzate dal legame con ioni ossidrilici, portando alla formazione di cristalli di idrossiapatite. L'idrossiapatite è un minerale che il nostro organismo è in grado di costruire e cristallizzare da sé, usando sostanze assunte con l'alimentazione.

1.3 CELLULE

Le cellule proprie del tessuto osseo sono morfologicamente distinguibili in quattro tipologie: cellule osteoprogenitrici, osteoblasti, osteociti ed osteoclasti. Normalmente, nella formazione del tessuto osseo, le cellule mesenchimali (MSC, *Mesenchymal Stem Cells*) si differenziano in cellule osteoprogenitrici che proliferano attivamente e si trasformano in preosteoblasti e questi in osteoblasti; gli osteoblasti sono dotati di scarsa capacità proliferativa e dopo aver deposto la matrice ossea si trasformano in osteociti. Pertanto, cellule osteoprogenitrici, osteoblasti e osteociti sono considerate cellule di un'unica famiglia. Gli osteoclasti invece appartengono ad un'altra linea cellulare che discende dalla cellula staminale emopoietica, da cui hanno origine tutte le cellule del sangue e del sistema immunitario.

- Gli *osteoblasti* sono le cellule primariamente responsabili della sintesi della sostanza intercellulare dell'osso e della sua mineralizzazione; secernono le sostanze organiche e regolano la disposizione dei cristalli nella matrice minerale. Inoltre, producono fattori biochimici che favoriscono il metabolismo degli osteoblasti e modulano la proliferazione delle cellule osteoprogenitrici;
- Gli *osteoclasti* sono le cellule preposte al riassorbimento osseo, dissolvendo la parte minerale e digerendo grazie a specifici enzimi le componenti organiche del tessuto.

Insieme, osteoclasti ed osteoblasti sono responsabili del rimodellamento osseo, un'attività continua, spontanea e involontaria che permette di mantenere l'equilibrio di ioni calcio nel sangue (calcemia) e indurre la formazione di tessuto osseo secondario [1].

1.4 TIPOLOGIE DI TESSUTO OSSEO

Il tessuto osseo adulto è caratterizzato da una struttura lamellare: si compone di lamelle sottili, formate da cellule e da matrice extracellulare aggregate in strati paralleli. La disposizione spaziale delle lamelle può variare e in base a questa si distinguono due tipologie di tessuto:

- *Compatto*: appare come una massa dura, compatta e continua ed è privo di cavità macroscopicamente evidenti. Si trova sulla superficie di tutte le ossa, oltre a costituire la diafisi, ovvero la parte centrale delle ossa lunghe. Le unità strutturali dell'osso compatto sono gli osteoni: strutture concentriche formate da lamelle ossee e attraversate dal canale di Havers, nel quale scorrono i vasi sanguigni che trasportano le sostanze necessarie al metabolismo cellulare.
- *Spugnoso*: appare conformato come una spugna in quanto è costituito da travate ossee, dette trabecole, variamente orientate e intersecate tra loro e delimitanti delle cavità chiamate cavità midollari, ripiene di midollo osseo ematopoietico. Questo tessuto si trova nella parte più interna delle ossa, in zone che non sono sottoposte a forti sollecitazioni meccaniche.

Complessivamente, si può affermare che il tessuto osseo ha una struttura gerarchica: a partire dalle fibre di collagene e dai cristalli minerali si formano lamelle ordinate che vanno a disporsi in modo regolare nell'osteone, che è la struttura ripetitiva che costituisce il tessuto osseo compatto di cui sono fatte le ossa (Fig. 1.1).

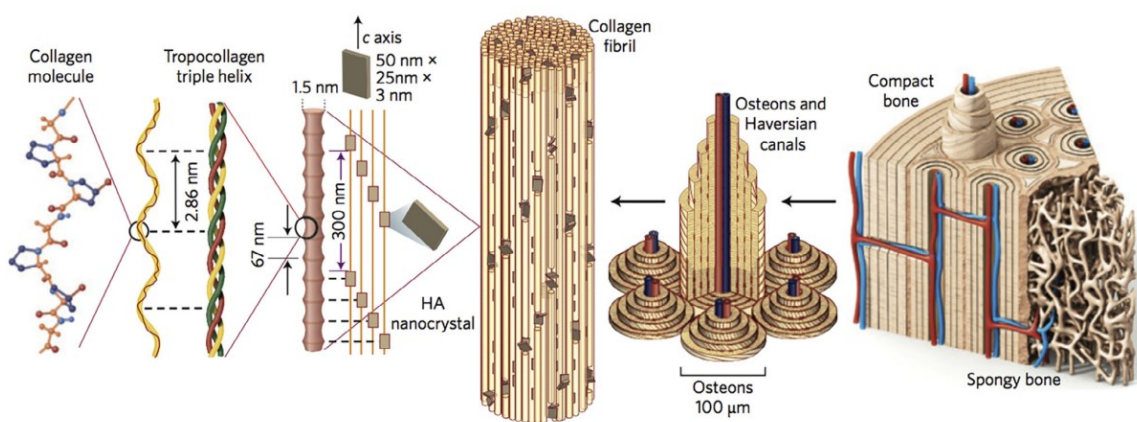


Fig. 1.1: Struttura gerarchica del tessuto osseo [6].

1.5 PATOLOGIE OSSEE E TERAPIA CONVENZIONALE

Le patologie del tessuto osseo comprendono una serie di disturbi del sistema scheletrico causati da fattori genetici o alterazioni dei processi di rimodellamento osseo, necessario per la guarigione delle fratture nonché per l'omeostasi del calcio. Possono essere provocati da eventi traumatici, vecchiaia o ipoplasia, ovvero lo sviluppo incompleto di un tessuto derivante da un numero di cellule insufficiente o inferiore alla normalità. Mantenere l'equilibrio tra la formazione e il riassorbimento osseo è necessario per conservare l'osso sano e quindi evitare l'insorgenza di malattie quali l'osteoporosi, che si sviluppa quando prevale l'assorbimento osseo rendendo di conseguenza le ossa più fragili e soggette a frattura. Un'altra patologia comune è il tumore alle ossa, che può ostacolare i normali movimenti o indebolire la struttura dell'osso a tal punto da provocare fratture. Quando la guarigione della frattura non avviene spontaneamente, condizione che si può stabilire se il ritardo nella rigenerazione ossea supera i 6-9 mesi, bisogna intervenire e dunque il ruolo del trattamento ortopedico diviene fondamentale. Nei casi con quadro clinico-radiologico più complesso si ricorre alla chirurgia, con impianto di placche, viti, chiodi o innesti ossei [1].

La terapia convenzionale si avvale di *autotrapianto*, quando il tessuto per la terapia trapiantologica viene prelevato dallo stesso paziente che deve essere trattato, *allograpianto*, se il tessuto viene fornito da un donatore esterno e *impianti protesici*. Queste tecniche però presentano diverse criticità: i limiti dell'autotrapianto sono la necessità di un ulteriore intervento per prelevare il tessuto e la difficoltà nel sopperire alla quantità di tessuto necessaria alla sostituzione; negli altri due approcci invece il problema fondamentale è il possibile rigetto dovuto ad una risposta immunitaria che si potrebbe innescare se l'organismo considera l'innesto come estraneo. Una soluzione alternativa a queste problematiche è l'ingegneria tissutale, le cui potenzialità hanno determinato un notevole impulso alla ricerca negli ultimi anni.

2. INGEGNERIA DEL TESSUTO OSSEO

2.1 INGEGNERIA TISSUTALE

L'ingegneria tissutale (TE, *Tissue Engineering*) è un settore di ricerca multidisciplinare nato all'inizio degli anni '90, a partire dall'esigenza di trovare una valida alternativa terapeutica per sopperire ai limiti di alcuni approcci utilizzati in medicina per la cura di tessuti e organi danneggiati. L'ingegneria dei tessuti venne definita nel 1993 da Langer e Vacanti come “un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze della vita per la realizzazione di sostituti biologici che ripristinino, mantengano o migliorino le funzioni originali di tessuti o organi” [5]. L'obiettivo era dunque quello di realizzare dei sostituti che esplicassero la medesima funzione del tessuto o organo naturale, mediante l'identificazione delle esigenze meccaniche e strutturali. Ciò è stato possibile mediante l'utilizzo di cellule autologhe, ovvero prelevate direttamente dal paziente da curare, che vengono impiantate su un supporto realizzato in laboratorio in grado di svolgere appieno le funzionalità della naturale ECM. Grazie a questo nuovo approccio, è stato anche possibile sviluppare degli innesti che favoriscano la rigenerazione dei tessuti; il termine medicina rigenerativa è spesso usato come sinonimo di ingegneria tissutale, sebbene la medicina rigenerativa implichi l'utilizzo di cellule staminali come fonte cellulare. Le cellule staminali possiedono due proprietà che le rendono interessanti in questo campo: la loro elevata capacità proliferativa e la loro pluripotenza, cioè la capacità di differenziarsi in cellule di più lignaggi. Nello specifico, l'ingegneria del tessuto osseo mira a realizzare dei supporti che siano il più simile possibile alla complessa struttura del tessuto osseo, per consentire e supportare la crescita di tessuto nuovo e funzionale. L'obiettivo è quello di realizzare dei supporti che agiscano da temporanei sostituti della ECM, che siano poi degradati e assorbiti dopo che il nuovo tessuto si è formato [8]. Ci concentreremo ora sui tre elementi fondamentali da considerare quando si parla di ingegneria del tessuto, specificandone le caratteristiche nel caso di nostro interesse: il tessuto osseo.

- Lo *scaffold*, substrato tridimensionale che mima la matrice extracellulare (ECM) favorendo l'adesione, la proliferazione e il differenziamento cellulare; deve soddisfare determinate caratteristiche e può essere realizzato con diversi materiali. Gli scaffold stimolano la formazione di tessuto attraverso diversi meccanismi: possono fungere da

materiale acellulare che viene colonizzato dalle cellule del tessuto in cui è impiantato oppure possono essere combinati con cellule staminali in grado di differenziarsi verso la linea osteogenica, come nel caso della medicina rigenerativa [17].

- Le *cellule*, prelevate in piccolissime quantità dal paziente mediante biopsia, isolate e fatte espandere in appropriate condizioni. Generalmente sono utilizzate le cellule staminali adulte: quelle del compartimento osseo sono chiamate osteoprogenitrici e sono presenti nei tessuti midollari. Il midollo osseo adulto contiene cellule staminali emopoietiche e cellule staminali di tipo mesenchimale (*Bone Marrow Stromal Cells* o BMSC). Le BMSC rappresentano solo lo 0.001% delle cellule nucleate nel midollo osseo di un adulto sano e non sono facilmente accessibili in quanto per estrarle è necessario un intervento disagiata; tuttavia, sono una promettente fonte di cellule in ingegneria tissutale grazie alla loro pluripotenza;
- I *fattori di crescita*, molecole solubili presenti in natura nel sistema biologico che rendono lo scaffold biomimetico, ovvero in grado di simulare le attività del tessuto naturale. Una volta prelevate e isolate le cellule, vengono usati i fattori di crescita per indurre differenziazione ed espansione cellulare. Fra questi vi sono per esempio le TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*), proteine prodotte dagli osteoblasti e responsabili della stimolazione della loro stessa attività.

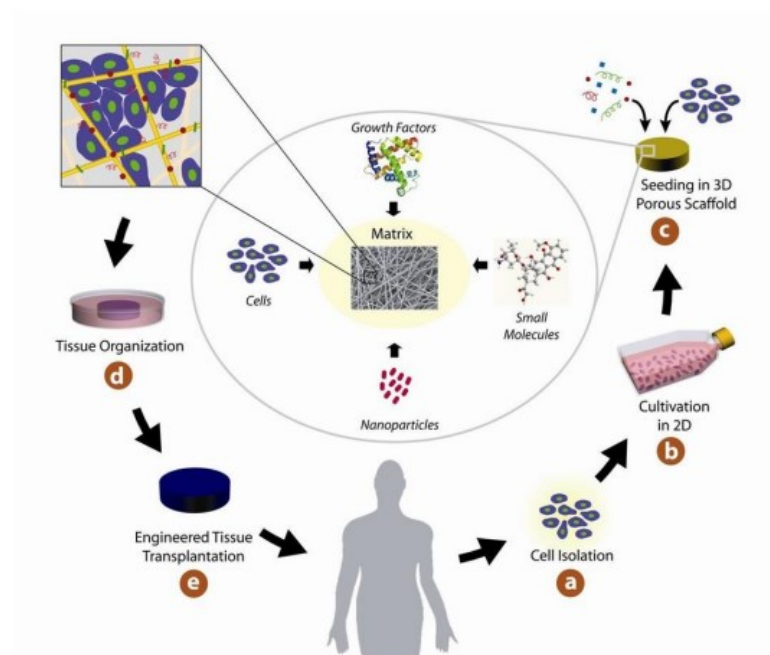


Fig. 2.1: Schema rappresentativo dei passaggi fondamentali in ingegneria tissutale [7].

L'ingegneria tissutale può adottare due differenti approcci: *in vitro* e *in vivo*. Nel primo caso, il tessuto ingegnerizzato viene realizzato seminando le cellule sulla matrice di supporto e applicando degli stimoli meccanici o biochimici affinché le cellule colonizzino lo scaffold. Questo approccio viene usato per la progettazione e la crescita di tessuti artificiali che verranno impiantati al paziente in sostituzione al tessuto danneggiato oppure per ottenere tessuti finalizzati alla creazione di modelli di organi. Si parla invece di ingegnerizzazione *in vivo* quando lo scaffold viene impiantato privo di cellule in modo tale che esse vengano reclutate direttamente in loco. Le cellule producono matrice extracellulare e, contemporaneamente, lo scaffold tende a biodegradarsi, fino ad essere progressivamente sostituito dal tessuto biologico che si viene a formare [4].

2.2 PROPRIETA' DELLO SCAFFOLD

Il punto focale in ingegneria tissutale è la progettazione dello scaffold, che include la scelta del biomateriale e della struttura più adeguate allo scopo da perseguire. Idealmente, il sostegno dovrebbe mimare la struttura e le funzioni biochimiche della matrice extracellulare naturale (ECM), inducendo l'adesione di cellule specifiche e favorendone la crescita. A tali fini, è importante che il supporto soddisfi alcune peculiari proprietà:

- *Biocompatibilità*: si riferisce alla capacità di un materiale di essere ben tollerato dall'organismo. Lo scaffold deve rappresentare un substrato favorevole per le cellule e garantirne una corretta attività cellulare senza innescare alcuna reazione immunitaria, locale o sistemica;
- *Biodegradabilità*: gli scaffold non sono degli impianti permanenti, pertanto devono essere biodegradabili, ovvero subire trasformazioni chimico-fisiche che li fanno scomparire nel tempo. Più precisamente, la cinetica di degradazione dello scaffold deve coincidere con la velocità di formazione del nuovo tessuto. Inoltre, i prodotti di degradazione non devono essere tossici per l'organismo e dovrebbero essere eliminati dal corpo senza interferire con gli altri organi;
- *Composizione chimica*: varia in base al biomateriale scelto per realizzare lo scaffold; la scelta del materiale è importante e deve garantire la capacità dello scaffold di interagire con i tessuti circostanti. Sono preferibili i materiali bioattivi, progettati per promuovere la

corretta migrazione e differenziazione cellulare, la neoformazione tissutale e la totale integrazione nel tessuto in cui sono impiantati;

- *Porosità*: il grado di porosità e la dimensione dei pori sono dei parametri fondamentali in uno scaffold, in quanto devono essere adeguati a supportare la migrazione e la crescita cellulare all'interno del tessuto, la diffusione dei nutrienti e l'eliminazione dei prodotti di scarto. Un'ampia superficie consente l'adesione e la proliferazione cellulare, mentre è necessario un grande volume dei pori per fornire una popolazione cellulare sufficiente per il processo di guarigione o rigenerazione. È stato dimostrato che pori con dimensioni superiori ai 200 μm hanno aumentato il livello di vascolarizzazione e hanno conseguito crescita cellulare, mentre per porosità inferiori a 100 μm non sono stati osservati buoni risultati [8]. In generale, una buona porosità dovrebbe variare dal 50% al 90%, facendo attenzione che, se eccessiva, riduce le proprietà meccaniche. Un altro aspetto molto importante è l'interconnessione dei pori: idealmente si vorrebbe progettare uno scaffold con la totalità dei pori interconnessi;

- *Proprietà meccaniche*: qualsiasi scaffold deve soddisfare compatibilità meccanica cioè fornire rigidità e resistenza meccanica simili a quelle del tessuto originale, in modo da garantire integrità; inoltre, deve essere abbastanza forte da consentire manipolazione chirurgica durante l'impianto e da mantenere struttura e funzione meccanica dopo essere stato impiantato. Per realizzare uno scaffold ottimale è necessario trovare il giusto equilibrio tra le proprietà meccaniche e la porosità, senza trascurare uno o l'altro aspetto; supporti con eccellenti proprietà meccaniche a discapito della porosità hanno dimostrato un buon potenziale *in vitro* ma hanno fallito *in vivo*, a causa della scarsa vascolarizzazione dovuta a mancata angiogenesi.

Oltre ad essere biodegradabili e biocompatibili, i biomateriali comunemente usati sono quelli in grado di formare strutture tridimensionali porose e solide e di mantenere la struttura dei tessuti pre-progettata. Negli ultimi anni è stata posta grande attenzione nello sviluppo di biomateriali intelligenti, ossia **osteoaduttivi** e **osteoaduttivi**: questi scaffold sono in grado di istruire il microambiente circostante alla formazione di nuovo tessuto osseo e fungono da supporto meccanico ai vasi sanguigni e alle cellule che andranno a colonizzare il sito di innesto [17].

2.3 TECNICA DI STAMPA 3D

Esistono varie tecniche di fabbricazione degli scaffold e vengono scelte in base al materiale utilizzato e alle proprietà che si vogliono conseguire. Inizialmente, la maggior parte dei supporti veniva preparata con metodi di fabbricazione convenzionali come la liofilizzazione (*freeze drying*), basata sulla rimozione di acqua o di solvente organico mediante sublimazione sottovuoto, a bassa pressione, da una soluzione precedentemente congelata; la schiumatura a gas (*gas foaming*), che sfrutta un gas inerte ad alta pressione in grado di favorire la crescita di bolle nel materiale e molte altre. Tuttavia, questi metodi non permettono il controllo della geometria dei pori, della percentuale di porosità e della loro interconnessione, di conseguenza gli scaffold così fabbricati sono spesso risultati inadatti a promuovere la crescita cellulare e la rigenerazione dei tessuti [9]. Nel 1986, è stata descritta per la prima volta una nuova tecnica di produzione in grado di superare i limiti di molti altri metodi: la stampa 3D. In campo biomedico prende il nome di 3D bioprinting o biostampa 3D, una cui definizione è stata fornita dal Servizio di ricerca del Parlamento Europeo (EPRS): “La biostampa 3D è definita come utilizzo di tecnologie di stampa in 3D per applicazioni correlate al corpo, indipendentemente dal fatto che i prodotti risultanti contengano o meno materiale biologico e che servano o meno a un fine medico. Questa definizione si riferisce a qualsiasi applicazione per la riabilitazione, il sostegno o il potenziamento di qualsiasi tipo di funzionalità biologica”. Nel nostro caso il materiale utilizzato è di tipo biologico e tale processo permette di generare scaffold tridimensionali, che costituiscono il supporto sul quale si strutturerà l'intero oggetto da riprodurre.

Il primo passo nella biostampa consiste nella creazione di un modello 3D digitale realizzato tramite software di modellazione come CAD (*Computer-Aided Design*); il modello dell'architettura biologica da fabbricare è prevalentemente ottenuto a partire da immagini CT e/o RMN provenienti dal paziente che necessita dello specifico tessuto o organo. Successivamente, si procede con la stampa: questo tipo di stampa è definito additivo in quanto avviene mediante sovrapposizione di strati di materiale [10]. La stampa 3D è un'ottima soluzione per la realizzazione degli scaffold poiché è in grado di produrre impalcature con architetture interne ed esterne esattamente predefinite; inoltre, sono facilmente configurabili affinché abbiano una forma ben precisa e possono essere personalizzate internamente per garantire attaccamento di precise cellule. Questo metodo non è adatto a tutti i materiali, ma viene ampiamente utilizzato con biomateriali ceramici, di cui successivamente analizzeremo le caratteristiche e i principali utilizzi. I ceramici si

sono dimostrati buoni biomateriali per creare degli scaffold in campo di rigenerazione del tessuto osseo, e questi possono essere ottenuti mediante diverse tecnologie di stampa 3D. Le tecniche sono classificabili sulla base del metodo di fabbricazione: stereolitografia (SLA), sinterizzazione laser selettiva (SLS), modellazione a deposizione fusa (FDM) e binder jetting (3DP) [9]. I processi di stampa 3D che caratterizzano ciascuna tecnica sono schematizzati in Fig. 2.2 e Fig. 2.3.

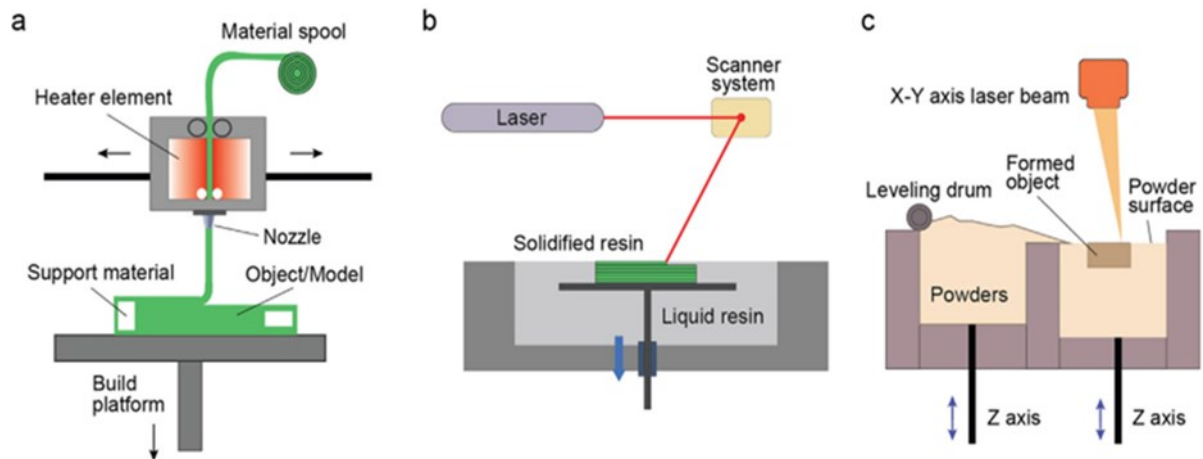


Fig. 2.2: Processi di fabbricazione di alcune tecniche di stampa 3D: (a) FDM, (b) SLA, (c) SLS [23].

- *SLA*: è stata la prima tecnologia di stampa 3D, inventata negli anni '80. Utilizza materiali fotosensibili in uno stato liquido o viscoso, generalmente ottenuti miscelando le fasi principali del materiale selezionato per lo scaffold insieme ad un polimero fotosensibile. Il composto viene poi depositato in strati sottili uno sopra l'altro e ciascuno esposto alla luce con una determinata lunghezza d'onda (UV) in modo da provocare fotopolimerizzazione: le catene molecolari polimerizzano formando geometrie solidificate. Nonostante l'alta risoluzione e precisione di questa tecnologia, il suo utilizzo nell'ingegneria del tessuto osseo non è stato approvato principalmente a causa delle limitazioni dovute alla disponibilità di fotopolimeri biocompatibili;
- *SLS*: è un metodo che utilizza un laser ad alta potenza per far avvenire la sinterizzazione di polveri di materiale: il processo avviene a temperature elevate per permettere alle particelle di polvere di fondere insieme fino a formare un oggetto solido tridimensionale, senza però innescare un vero e proprio scioglimento. L'assenza di

fusione gioca un ruolo importante nel preservare i microspazi tra le polveri a contatto; di conseguenza, è molto importante selezionare e ottimizzare le dimensioni dei grani;

- *FDM*: con questa tecnica, gli scaffold vengono fabbricati depositando sul piano di lavoro i filamenti di materiale strato dopo strato. Il filamento si ottiene per estrusione da un ugello caldo ed è solitamente composto da una miscela di materiale ceramico insieme ad un legante. Il processo di fabbricazione avviene ad alta temperatura, pertanto, come il metodo precedente, non è adatto a materiali in cui sono presenti molecole biologiche quali le proteine, poiché sono sensibili alle alte temperature e subiscono denaturazione;
- *3DP*: è una tecnologia che sfrutta particelle di polvere di materiale, le quali vengono fuse insieme grazie ad un agente legante liquido che viene spruzzato selettivamente. Una volta bagnato, il materiale è sottoposto ad alcuni trattamenti prima di raggiungere solidificazione della regione selezionata. Le polveri avanzate fungono da supporto per gli strati successivi che subiranno lo stesso processo finché l'intero oggetto 3D non sarà completamente formato. Alla fine della stampa, la polvere in eccesso viene rimossa per liberare il pezzo. I passaggi di stampa 3DP sono descritti in Fig. 2.3.

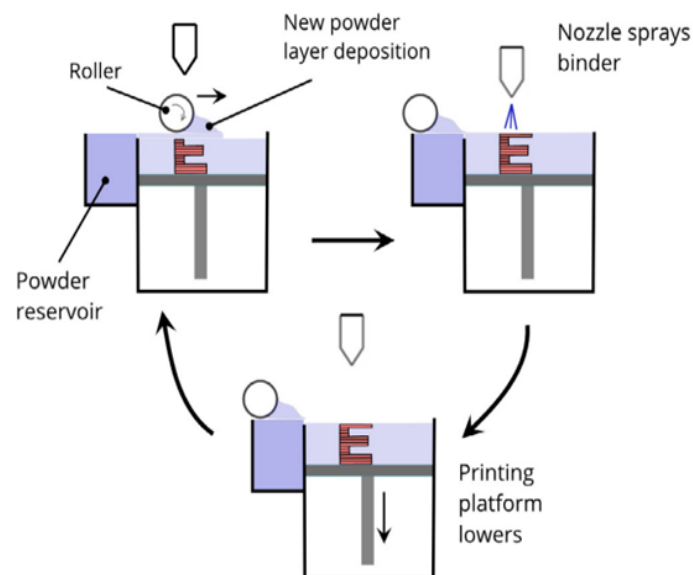


Fig. 2.3: Stadi nella tecnologia di stampa 3DP [9].

La precisione, la flessibilità e l' idoneità ad una ampia gamma di materiali e di leganti a basso costo, hanno fatto della 3DP una delle tecnologie più interessanti per l' ingegneria degli scaffold. Tuttavia, requisiti clinici come la biocompatibilità, la biodegradabilità, la tossicità e la resistenza meccanica hanno posto un limite al numero effettivo di combinazioni di materiali e leganti che possono essere utilizzate nella fabbricazione di scaffold ossei. Questa tecnologia viene ampiamente utilizzata con biomateriali ceramici, con i quali ha riscontrato alcuni vantaggi rispetto ad altre: permette una rapida fabbricazione mantenendo ridotti gli errori sperimentali e rende possibile il controllo dell' architettura dello scaffold, inclusa la forma dei pori e il livello di porosità, in modo tale da realizzare delle strutture specifiche che garantiscano crescita cellulare e rigenerazione del tessuto osseo.

2.4 BIOMATERIALI CERAMICI

La definizione di biomateriale attualmente utilizzata è quella di un materiale che opera a stretto contatto con i tessuti dell' organismo vivente minimizzando eventuali reazioni avverse o di rigetto. Un requisito fondamentale per l' utilizzo di biomateriali in dispositivi di uso medico è appunto la biocompatibilità, ovvero la capacità di un materiale di essere utilizzato per una specifica applicazione ottenendo una risposta idonea dal sistema ospite. Nella scelta del biomateriale più adatto ad una specifica applicazione è necessario valutare molti aspetti, tra cui l' interazione reciproca tra materiale e tessuto. Quando si parla di ingegneria del tessuto con finalità di creare sostegni che promuovano rigenerazione del tessuto stesso, è necessario che i biomateriali utilizzati siano bioattivi. Sulla base dell' azione del materiale sull' organismo, viene definito bioattivo quando favorisce integrazione del materiale stesso col tessuto e promuove la formazione di un' interfaccia connessa tra esso e il tessuto biologico. Più precisamente per il tessuto osseo, sono stati realizzati numerosi scaffold ed è stata utilizzata un' ampia gamma di biomateriali con l' intento di promuovere osteogenesi; questo termine indica il processo di formazione di nuovo tessuto osseo. I biomateriali sono distinguibili principalmente in polimeri naturali e sintetici, ceramici e compositi; ci concentreremo sui ceramici bioattivi, che sono essenzialmente composti a base di fosfato di calcio, silicato di calcio e biovetri. È definito ceramico un qualsiasi solido inorganico e non metallico ottenuto attraverso un processo ad alte temperature, generalmente caratterizzato da elevata rigidità (alto modulo elastico),

durezza ed elevata stabilità chimica. Circa la natura dei legami chimici, i ceramici si dividono tra materiali a legame prevalentemente ionico o covalente. Quando utilizzati per la riparazione o ricostruzione di parti malate o danneggiate del sistema scheletrico, sono chiamati bioceramici. I bioceramici hanno attirato particolarmente l'attenzione nel campo della rigenerazione dei tessuti duri per la loro capacità di favorire la formazione di nuovo osso. Questa classe di materiali ha complessivamente buona resistenza meccanica, eccellente osteoconduttività, elevata biodegradabilità e, nel caso dei fosfati di calcio, anche composizione chimica molto simile a quella dell'osso. Analizziamo le proprietà di questi materiali e le principali caratteristiche che sono emerse da alcuni studi, in cui gli scaffold sono stati ottenuti principalmente con tecnica di stampa 3D.

2.4.1 FOSFATI DI CALCIO

2.4.1.1 IDROSSIAPATITE (HA)

L'idrossiapatite è un fosfato di calcio con formula chimica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. È una delle bioceramiche più studiate in ingegneria del tessuto osseo poiché è contenuta anche nella componente inorganica della matrice extracellulare del tessuto osseo. Come si nota dalla Fig. 2.4, appare come un minerale costituito da cristalli prismatici solitamente di colore bianco. Inoltre, è meno tossica e più stabile rispetto ad altri fosfati di calcio, grazie al rapporto calcio/fosforo (Ca/P) pari a 1.67, quasi identico a quello del tessuto osseo naturale che vale 1.66. I principali vantaggi dell'idrossiapatite sono la biocompatibilità, biodegradabilità in condizioni fisiologiche e buone capacità osteoconduttive, ossia di supporto meccanico ai vasi e alle cellule che andranno a colonizzare il sito di innesto e osteoinduttive, cioè di stimolare formazione di nuovo tessuto osseo.

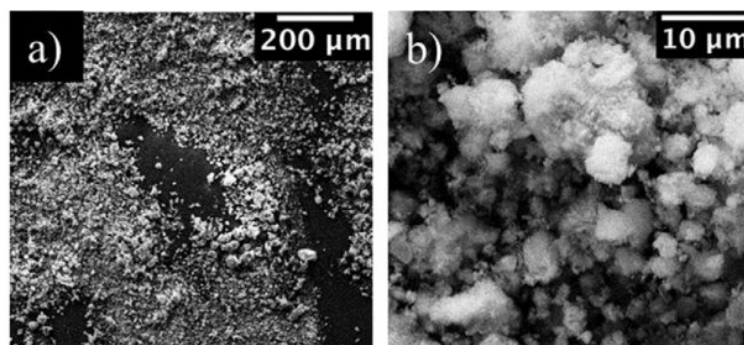


Fig. 2.4: (a), (b): Immagini al SEM (microscopio a scansione elettronica) di idrossiapatite su diversa scala [16].

Alcuni studi hanno dimostrato come questo biomateriale possa influenzare positivamente l'adesione e la proliferazione cellulare quando utilizzato per la realizzazione di tessuto ingegnerizzato. Ciò è possibile grazie alla buona porosità del composto che permette integrazione e fusione tra l'osso naturale e HA impiantato. Tuttavia, HA pura presenta alcuni limiti come il lento tasso di degradazione (20–30 $\mu\text{m}/\text{anno}$) e la scarsa resistenza meccanica, nonché la bassa resistenza a frattura che ostacola la completa formazione dell'osso e aumenta il rischio di infezioni. Per ovviare a queste problematiche è spesso combinata con altri fosfati o con composti come ossido di zinco (ZrO_2), fibre di carbonio e allumina (Al_2O_3), che migliorano le proprietà meccaniche e rendono più efficace l'uso di HA per la rigenerazione del tessuto osseo. In realtà, essendo materiali bioinerti, cioè stabili dal punto di vista chimico-fisico e con un'interazione minima col tessuto biologico, riducono significativamente la bioattività dell'idrossiapatite. Spesso è combinata anche con polimeri naturali, dotati di cinetica più veloce, ottenendo così scaffold compositi con un tasso di degradazione ottimale [6].

La sintesi di idrossiapatite può avvenire mediante estrazione dalle squame di pesce oppure mediante precipitazione chimica umida, usando precisi agenti precipitanti. Nel primo caso, vengono raccolte le squame e sottoposte ad alcuni trattamenti chimici per rimuovere le proteine contenute, successivamente vengono lavate con acqua distillata ed essiccate in un forno ad una temperatura di 50 gradi per 6 ore. Infine, vengono calcinate per ottenere l'idrossiapatite. Gli scaffold realizzati con HA sintetizzata in questo modo, hanno porosità massima del 35% e proprietà meccaniche compatibili con quelle delle ossa (Tab. 2.1). I risultati ottenuti in merito a proprietà meccaniche, coltura cellulare e crescita ossea in sito sono stati positivi e hanno quindi confermato l'uso futuro di questa bioceramica per favorire rigenerazione del tessuto osseo [12].

Materiale	Modulo di Young (GPa)	Resistenza a compressione (MPa)	Resistenza a trazione (MPa)
Osso corticale	7-30	100-230	164-240
Osso spugnoso	0.01-3	2-12	-
HA	40-117	500	190

Tab. 2.1: Proprietà meccaniche del tessuto osseo corticale e spugnoso [20] e di HA [12].

La tecnologia SLA è stata identificata come una delle più efficaci e più frequentemente usate per realizzare strutture complesse con HA. Grazie a questo approccio è stato possibile realizzare scaffold a base di idrossiapatite con una porosità di 450 μm . La struttura finale è stata seminata da cellule mesenchimali e dopo 14 giorni è stata riscontrata ottima osteogenesi, come è riportato in Fig. 2.5.

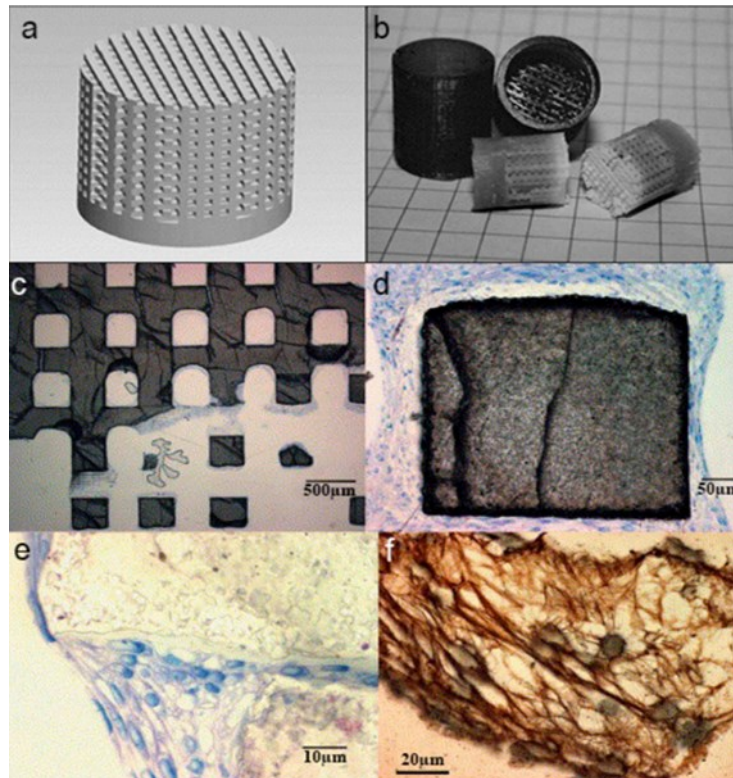


Fig. 2.5: (a) Configurazione strutturale dello scaffold, realizzata mediante software CAD; (b) Scaffold a base di HA realizzati mediante tecnologia SLA; (c) Immagine SEM dello scaffold in HA (grigio scuro) dopo due settimane dalla seminazione con cellule (blu); (d) Immagine SEM dello scaffold completamente attaccato dalle cellule; (e) Immagine SEM delle cellule (blu) che stanno generando nuova matrice (rosa); (f) Immagine SEM di fibre di collagene prodotte dalle cellule [11].

2.4.1.2 FOSFATO TRICALCICO (TCP)

Il trifosfato di calcio ha formula chimica $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ed è un altro biomateriale ceramico molto utilizzato in ingegneria del tessuto osseo; ha una struttura cristallina allo stato solido e un rapporto calcio/fosfato (Ca/P) pari a 1.5, vicino a quello del tessuto osseo naturale che

vale 1.66. Il fosfato tricalcico può assumere due strutture cristalline con diverse disposizioni atomiche: α -TCP (stabile a temperature >1125 °C) e β -TCP (stabile a temperature <1125 °C). La forma più comunemente usata nei sostituti ossei è il β -TCP poiché è la struttura che ha dimostrato migliore forza meccanica e stabilità chimica. Viene sintetizzato dalla reazione di neutralizzazione dell'idrossiapatite utilizzando acido ortofosforico (H_3PO_4); la sospensione viene poi agitata per 30 minuti ed essiccata a 65° per 24 ore [22]. È dotato di un tasso di degradazione molto elevato e forte capacità di formare legami col tessuto osseo circostante; inoltre, possiede biodegradabilità migliore di tutti gli altri fosfati, compresa HA. Alcuni esperimenti in un modello animale hanno dimostrato che gli scaffold a base di β -TCP sono stati quasi completamente riassorbiti (95%) ad un mese dall'impianto. In aggiunta, quasi tutti gli scaffold impiantati per riparare difetti ossei provocati da tumori sono stati assorbiti e rimpiazzati da nuovo tessuto osseo, mentre scaffold in HA non hanno mostrato segni di degradazione neanche dopo 130 mesi dall'operazione [23]. Il principale meccanismo di bioattività del TCP consiste nella parziale dissoluzione e rilascio di calcio e ioni fosfato sia *in vitro* che *in vivo*, che favoriscono la formazione di apatite biologica sulla superficie dello scaffold.

Un limite di questo biomateriale sono le scarse proprietà meccaniche: il valore di resistenza a compressione pari a 0.17-0.64 MPa è molto inferiore rispetto a quello dell'osso naturale, di conseguenza non possono essere utilizzati in impianti importanti, ma possono trovare applicazione come riempitivi ossei [15].

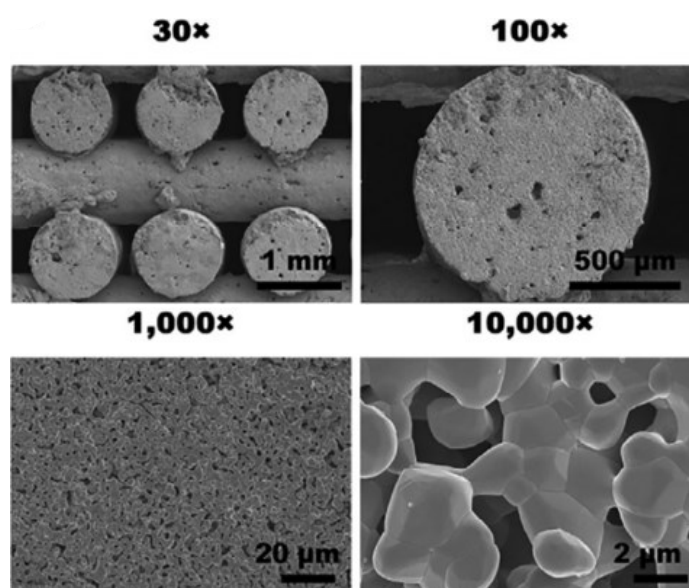


Fig. 2.6: Immagini SEM di scaffold realizzati in TCP [6].

Il β -TCP si presta bene alla stampa 3D e in particolare la risoluzione, la porosità e la resistenza degli scaffold ottenuti mediante questo approccio dipendono dalla dimensione delle polveri e delle particelle di legante oltre che dalla geometria che si è generata. Grazie a questa nuova tecnologia, sono stati stampati alcuni scaffold in TCP dotati di forma complessa, accuratezza dimensionale $>96,5\%$ e macropori della dimensione di $300\ \mu\text{m}$. Regolando il rapporto di TCP contenuto, la resistenza a compressione è aumentata significativamente fino ad un massimo di $1.81\ \text{MPa}$. Inoltre, lo studio *in vitro* ha confermato che questi scaffold possiedono ragionevoli citocompatibilità e capacità di indurre proliferazione cellulare [23].

2.4.1.3 FOSFATO DI CALCIO BIFASICO (BCP)

Il fosfato di calcio bifasico è costituito da due fasi: idrossiapatite (HA) e fosfato tricalcico (TCP). HA e TCP esibiscono rispettivamente inappropriate velocità di degradazione e resistenza meccanica, ma combinati insieme formano un biomateriale con un tasso di degradazione controllabile, buona biocompatibilità e maggiore capacità di rigenerazione del tessuto osseo. La capacità di formazione dell'apatite quando lo scaffold comincia a degradarsi e rilascia gli ioni è una caratteristica fondamentale per determinare la bioattività e l'osteointegrazione di un biomateriale, e negli scaffold in BCP può essere regolata adattando il rapporto HA/TCP.

Per fabbricare uno scaffold ideale in ambito di rigenerazione ossea, bisognerebbe soddisfare alcune proprietà come una struttura con circa il 50% di porosità e pori di dimensioni $200\text{-}800\ \mu\text{m}$ ben interconnessi. Ciò è possibile con la stampa 3D, che oltre a soddisfare questi requisiti comporta anche migliore precisione e possibilità di ottenere forme complesse. In particolare, per realizzare scaffold in BCP è frequentemente usata la tecnologia 3DP, in cui i leganti tipicamente coinvolti sono il PVA, l'acido fosforico e l'acido citrico. Permette di ottenere un range di porosità del $30\text{-}68\%$, macropori di dimensioni $300\text{-}1200\ \mu\text{m}$ e micropori pari a $2\text{-}30\ \mu\text{m}$ [24]. La regolazione della porosità, delle caratteristiche geometriche e della quantità delle due fasi è importante nel determinare le proprietà meccaniche del biomateriale. Da un lato, l'aggiunta di una fase stabile come l'HA al TCP rafforza il materiale: scaffold con un rapporto HA/TCP pari a $70/30$ possiedono resistenza meccanica di $18.35\ \text{MPa}$, contro $3.31\ \text{MPa}$ e $7.24\ \text{MPa}$ rispettivamente nelle monofasi di TCP e HA [24]. Dall'altro lato, la presenza di TCP è

importante per mantenere un giusto livello di porosità: aumentando la quantità di polvere di fosfato di calcio dal 10% al 30% in volume, la porosità degli scaffold diminuisce dal 72.5% al 31.4% con conseguente miglioramento della resistenza a compressione da un valore di circa 2.3 MPa a 36.4 MPa. Tuttavia, un eccessivo incremento di TCP provoca un calo delle proprietà meccaniche a causa della formazione di microfessure durante il processo di sinterizzazione; è dunque importante mantenere sempre bilanciate le due fasi per ottenere i migliori risultati meccanici. Anche la connessione tra i pori e la struttura degli scaffold sono dei fattori cruciali: è stato dimostrato che l'aggiunta di micro-nervature tra i pori ha migliorato la resistenza a compressione da 28.3 MPa a 45.6 MPa. Inoltre, le micro-nervature controllano il tasso di declino della resistenza meccanica quando lo scaffold inizia a degradarsi in ambiente fisiologico [24].

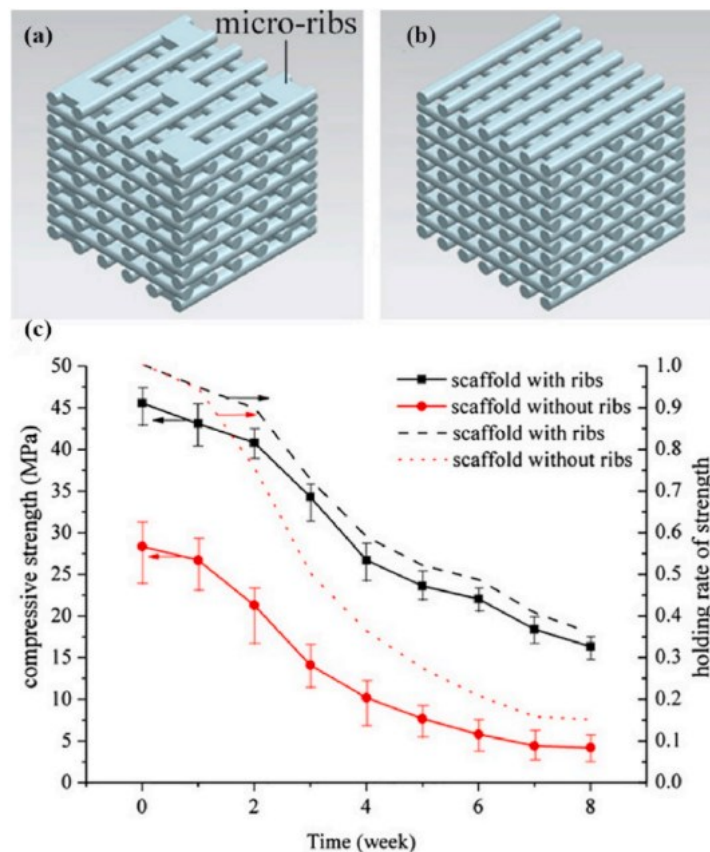


Fig. 2.7: (a) Scaffold con micro-nervature; (b) Scaffold originale; (c) Resistenza a compressione dello scaffold in BCP senza e con nervature vs. tempo di permanenza nell'ambiente fisiologico [24].

È stato inoltre scoperto che l'aggiunta di nano-fibre di HA agli scaffold in TCP migliora notevolmente il comportamento meccanico per tre motivi principali: comporta rafforzamento dei bordi di grano, fenomeno di crack pinning e propagazione delle cricche lungo un percorso più tortuoso, che richiede maggiore energia e quindi rende il materiale meno fragile. Per quanto concerne la capacità di osteogenesi, è stata dimostrata in tutti gli scaffold in BCP, indipendentemente dalla percentuale di porosità e dal rapporto HA/TCP; tuttavia, i migliori risultati sono stati ottenuti con elevata porosità, piccole dimensioni dei pori (0.8 mm) ed un rapporto tra le fasi pari a 20 HA/80 TCP [24].

In conclusione, ottimizzando il rapporto HA/TCP e la geometria degli scaffold si possono ottenere massima formazione ossea e migliori proprietà meccaniche. Questo biomateriale è stato utilizzato nel trattamento del seno mascellare umano, provocando formazione di nuovo osso pari al 28% dopo 6 mesi. Inoltre, il successo conseguito dall'applicazioni di scaffold in BCP per la cura di difetti ossei in diversi animali, ha suggerito il grande potenziale in ambito della rigenerazione ossea anche in altri siti [24].

2.4.2 SILICATI DI CALCIO

I silicati di calcio (formula chimica CaSiO_3) appartengono ad un nuovo gruppo di materiali ceramici bioattivi che è stato recentemente studiato nell'ambito dell'ingegneria del tessuto osseo. Sono in grado di indurre la formazione di uno strato di HA carbonato sulla superficie quando immersi in un fluido che simula quello corporeo, grazie alla formazione di stretti legami chimici tra il tessuto osseo e il materiale [6]. Per ottenere uno scaffold a base di silicato di calcio omogeneo, con struttura porosa controllata ed eccellenti proprietà meccaniche, è stata utilizzata ancora una volta la tecnologia 3DP. I risultati hanno mostrato che gli scaffold possono essere prodotti abbastanza facilmente, garantendo soddisfacente capacità di mineralizzazione dell'apatite nel liquido corporeo, alta guarigione di difetti ossei e un'eccellente resistenza a compressione.

Il silicato tricalcico Ca_3SiO_5 è uno dei silicati più comunemente utilizzati: ha proprietà idrauliche e consolida spontaneamente in ambiente acquoso. Un altro esempio è la Wollastonite, che rappresenta il ceramico silicatico più semplice che esista, con rapporto molare tra CaO e SiO_2 pari a 1:1. È stato utilizzato insieme al β -TCP nella realizzazione di scaffold per la riparazione di difetto osseo tibiale in un coniglio. La forma dei due materiali è abbastanza diversa: la Wollastonite ha una forma aghiforme con grandi aggregati

piastrinici mentre le polveri di β -TCP hanno dimensioni minori e formano degli agglomerati sferici. Pertanto, le polveri sono state macinate prima di realizzare lo scaffold, per ottenere particelle più uniformi e migliore controllo del processo. Lo scaffold ha mostrato elevate porosità e interconnessione dei pori, favorendo la permeazione di cellule, nutrienti e residui (Fig. 2.8). Inoltre, ha un'elevata biocompatibilità ed un carattere bioattivo ed osteoconduttivo, grazie al silicato di calcio che ha stimolato velocemente il processo di riparazione ossea. I risultati dopo 60 giorni sono stati buoni e sono riportati in Fig. 2.9: oltre alla formazione di nuovo tessuto osseo è stato osservato un avanzato grado di assorbimento dell'impianto, che ha suggerito che il silicato di calcio possiede un tasso di degradazione relativamente più veloce di altre bioceramiche.

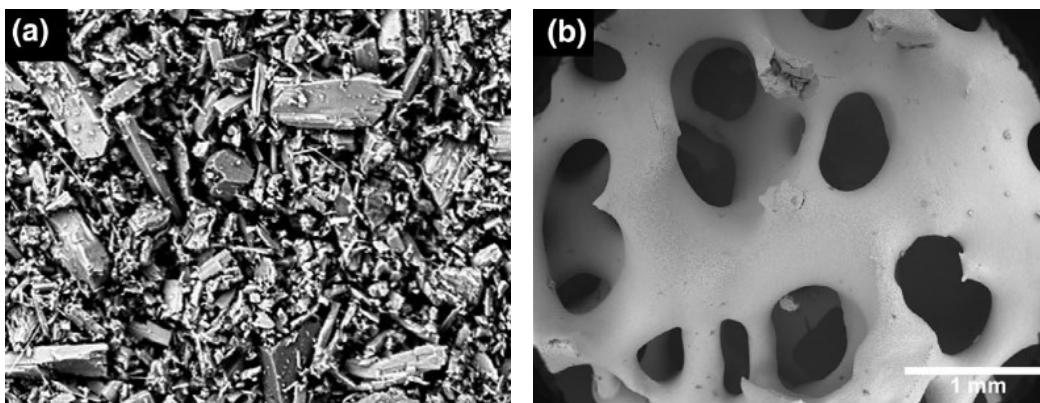


Fig. 2.8: (a) Micrografia SEM di polveri grezze di Wollastonite; (b) Immagine SEM della superficie dello scaffold realizzato in Wollastonite e β -TCP [22].

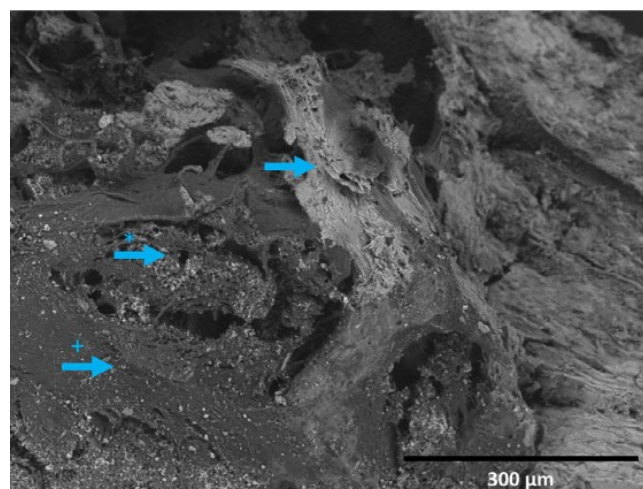


Fig. 2.9: Immagine SEM dopo 60 giorni dall'impianto dello scaffold nel coniglio: l'area in grigio chiaro mostra il vecchio tessuto osseo, mentre quella in grigio scuro corrisponde all'osso neoformato che circonda l'impianto [22].

Uno dei principali svantaggi delle ceramiche CaSiO_3 è l'elevata velocità di dissoluzione e degradazione: questi processi aumentano il pH nell'ambiente circostante, con il rischio di sfavorire la crescita cellulare e compromettere la capacità di osteointegrazione. Inoltre, l'alto tasso di degradazione può compromettere le proprietà meccaniche e non concedere abbastanza tempo per la formazione di nuovo tessuto osseo [6]. In conclusione, le proprietà dei silicati sono lontane dall'ottimale per la rigenerazione del tessuto osseo nell'uomo, anche se l'aggiunta di altri elementi è un approccio promettente per migliorarle al fine di giungere ad applicazioni tissutali ossee.

2.4.3 ELEMENTI DOPANTI

Spesso nei materiali bioceramici vengono introdotti elementi metallici col fine di cambiare la struttura cristallina e migliorare alcune proprietà, come nel caso dei silicati di calcio e dell'idrossiapatite. Quest'ultima in particolare presenta molti limiti allo stato puro, quindi vengono usate bioceramiche contenenti quantità significative di impurità sostituzionali come ioni zinco (Zn^{2+}), stronzio (Sr^{2+}), manganese (Mn^{2+}) e magnesio (Mg^{2+}) [6].

- Lo *zinco* migliora la dissoluzione di HA, promuove la differenziazione degli osteoblasti a partire dalle cellule staminali in vivo e stimola la formazione di nuovo tessuto osseo in vivo, favorendo l'attività degli osteoblasti e inibendo gli osteoclasti.
- Il *manganese* è uno ione dopante che viene usato in ingegneria del tessuto osseo in quanto promuove l'adesione e la proliferazione cellulare, migliora la bioattività del biomateriale ceramico e stimola l'attività osteogenica in vitro. Inoltre, gli ioni Mn aumentano il numero di riserve di alcune cellule staminali nell'osso (BMSC), in grado di differenziarsi in diversi tipi cellulari. Come si può notare dalla Fig. 2.10, l'aggiunta di Mn ha migliorato le proprietà fisico-chimiche degli scaffold realizzati in TCP.
- Il *magnesio* infine ha dimostrato buone capacità nel miglioramento della vascolarizzazione nel tessuto osseo, portando alla formazione di nuovi vasi sanguigni nelle aree interne degli scaffold impiantati.

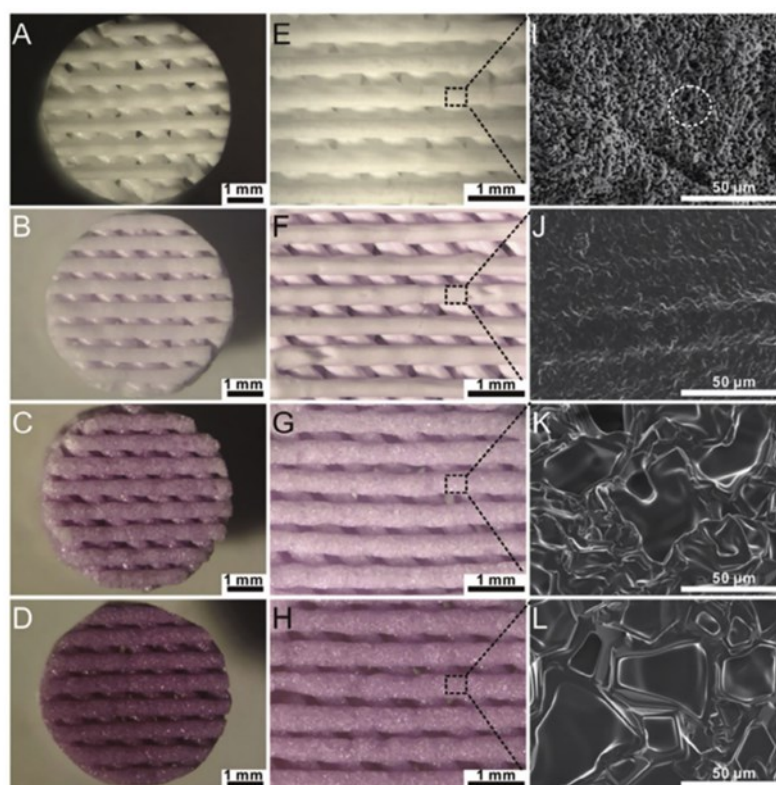


Fig. 2.10: Morfologia e microstruttura di scaffold in TCP con ioni manganese, ottenuti mediante 3DP; (A, E, I) TCP puro con micropori sulla superficie entro il cerchio bianco tratteggiato, (B, F, J) 2.5 Mn-TCP, (C, G, K) 5 Mn-TCP, (D, H, L) 10 Mn-TCP [6].

2.4.4 EFFETTI DELLA MACROSTRUTTURA

Una delle sfide principali nel campo dell'ingegneria del tessuto osseo è lo sviluppo di scaffold porosi che imitino la struttura gerarchica e le proprietà dell'osso naturale. La progettazione a livello macro, micro e nano è importante per determinare le proprietà, rendere possibile il trasporto di nutrienti e le interazioni tra cellule e matrice. In particolare, la macrostruttura ha un ruolo cruciale perché strettamente legata al grado di crescita ossea: dimensione, interconnessione e geometria dei macropori influiscono significativamente sulle prestazioni degli scaffold e sull'adesione cellulare. Sono stati realizzati scaffold in materiale ceramico (biovetro) con diverse geometrie (esagonali, curve, rettangolari, a zig-zag) e varia porosità (50%, 55%, 60%, 70%); le diverse geometrie dei pori possono essere progettate utilizzando un software come CAD. Il design esagonale è l'unico ad avere un'area di contatto massima alle intersezioni e allo stesso tempo mantenere elevata

porosità. Grazie a queste caratteristiche, gli scaffold con macropori esagonali possiedono un'architettura altamente anisotropa e migliore trasferimento del carico, mostrando più alta resistenza a compressione rispetto a scaffold con porosità a geometria non controllata. Inoltre, confrontando scaffold con la stessa forma dei pori, la resistenza a compressione diminuisce con l'aumento della dimensione di pori; sono quindi preferibili macropori con dimensioni più contenute [6]. In Fig. 2.11 si nota come la geometria dei macropori sia capace di regolare la formazione di una rete cellulare e la crescita del tessuto, prendendo in esame geometrie triangolari, quadrate, esagonali e circolari.

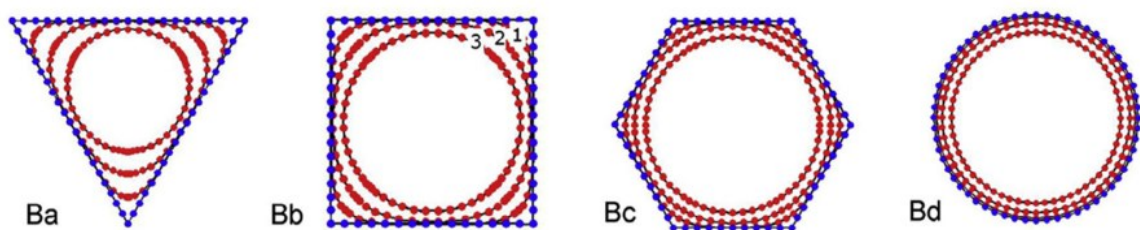


Fig. 2.11: Simulazione computazionale della crescita tissutale (in rosso) per varie geometrie [6].

Oltre alle proprietà meccaniche, la macrostruttura può influenzare la cinetica di degradazione: scaffold bioceramici con una struttura a canale cavo hanno dimostrato un tasso di degradazione più veloce a causa dell'ampia superficie ed elevata porosità, con rilascio di molti più ioni Si^{4+} e Ca^{2+} rispetto a strutture con canali pieni. Inoltre, una struttura interna complessa aumenta la capacità degli scaffold di assorbire l'acqua, che può essere utile nel prevenire perdita di liquidi corporei e sostanze nutritive in vivo. La geometria dei macropori ha anche la capacità di regolare la formazione della rete di cellule attorno allo scaffold; alcuni studi hanno dimostrato che l'adesione cellulare è migliore se il raggio di curvatura è molto più grande di quello delle cellule stesse. Un esperimento con cellule simili agli osteoblasti murini ha mostrato migrazione, proliferazione e differenziazione cellulare a partire dalla curvatura [6]. In parte, ciò può essere giustificato dal fatto che un'elevata curvatura induce una sollecitazione meccanica delle cellule, evidenziata dalla formazione di *fibre di stress* di actina all'interfaccia tessuto-fluido, che migliorano ulteriormente la crescita tissutale. I filamenti di actina sono costituiti da fasci paralleli detti *fibre di stress*, che si estendono per tutta la lunghezza della cellula.

Una particolare struttura è stata ottenuta ispirandosi alla radice naturale della pianta di loto, di forma cilindrica con alcuni fori interni di diverse dimensioni (Fig. 2.12). Il materiale risultante, realizzato con tecnica 3DP, ha una struttura con canali multipli e paralleli, utile per il trasporto dei nutrienti e per la distribuzione omogenea dell'ossigeno internamente. In aggiunta, questa struttura a radice di loto permette la crescita di vasi sanguigni e di nuovo tessuto osseo nella parte più interna del materiale, rendendo efficace la guarigione di difetti ossei. Complessivamente, i materiali con questa architettura hanno dimostrato migliore capacità di stimolazione osteogenica e angiogenica rispetto ai tradizionali materiali con pori cavi e semplici [6].

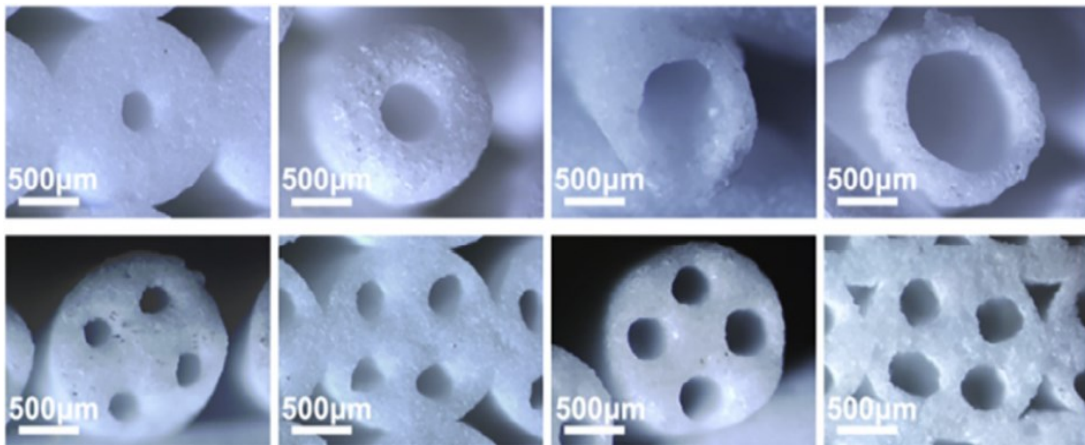


Fig. 2.12: Strutture costituite da singolo canale (sopra) e multicanale o a radice di loto (sotto), con diametro dei canali crescente verso destra [6].

Ad ogni modo, scaffold con canali cavi multipli hanno mostrato miglioramenti nella rigenerazione ossea. Per primo, i canali cavi permettono un rapido rilascio di ioni Si^{4+} a partire dagli scaffold, con conseguente formazione di silicati; gli ioni bioattivi rilasciati possono promuovere sia osteogenesi che angiogenesi. Inoltre, la rapida cinetica di degradazione offre più spazio per il nuovo tessuto che si viene a creare. In aggiunta, la cavità funge da canale per il trasporto di ossigeno e nutrienti e per la migrazione cellulare, oltre a facilitare l'infiltrazione dei vasi sanguigni del tessuto adiacente.

2.4.5 MICROSTRUTTURA DEGLI SCAFFOLD

Quando vengono realizzati scaffold per la rigenerazione ossea, è fondamentale prestare attenzione sia alla macro che alla microstruttura ottenute, che devono essere il più possibile simili a quella dell'osso nativo per conseguire buoni risultati. La struttura gerarchicamente porosa dell'osso può essere riprodotta con la tecnica di stampa 3D negli scaffold, permettendo alle cellule di diffondersi e invadere il biomateriale. Spesso il risultato non è ottimale, pertanto sono stati sperimentati vari metodi in combinazione con la stampa 3D che impiegano altre sostanze oltre ai biomateriali ceramici. Un esempio di applicazione sono gli scaffold compositi a base di ceramici e fibre di seta, che sono stati ottenuti mediante liofilizzazione (*freeze-drying*) delle fibre e tecnica 3DP. Questi supporti presentano una struttura gerarchica dei pori: un primo livello (1 mm) è costituito da macropori ordinati dovuti ai ceramici, seguiti da un secondo livello (50–100 μm) di micropori tra le reti di fibre di seta, come in Fig. 2.13 [6].

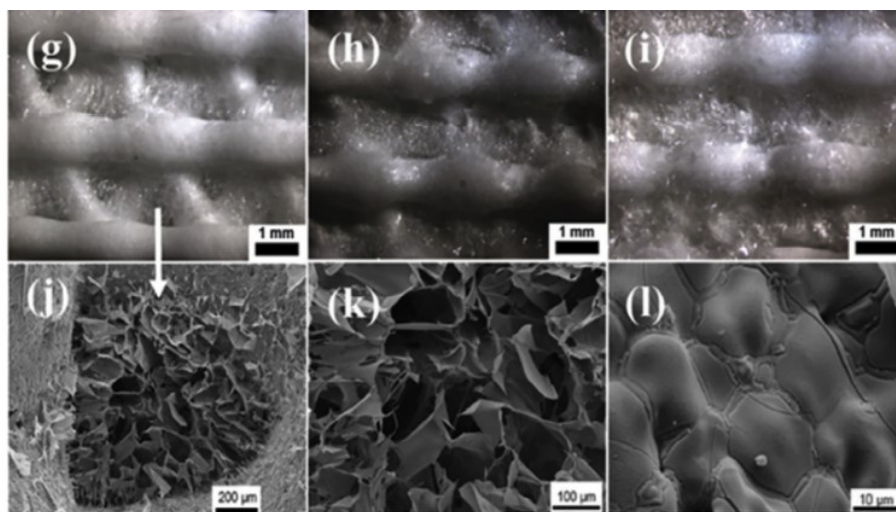


Fig. 2.13: (g-i) Micrografie di scaffold a base di ceramici e seta con struttura triangolare dei pori a diverse concentrazioni di seta: (g) 0.625%, (h) 1.25%, (i) 2.5%; (j) Immagini SEM del medesimo scaffold; (k) microstruttura delle fibre di seta e (l) dei pori nelle pareti di biomateriale ceramico [6].

Oltre ad una struttura gerarchica dei pori, questo composito ha mostrato eccellente capacità di mineralizzazione dell'apatite e buone proprietà meccaniche, come resistenza alla compressione pari a 25 MPa. Come si può notare dalla Fig. 2.13, la fibroina di seta ha una struttura costituita da fogli che si organizzano in reti dando origine a micropori; le

microreti formate dalla fibroina di seta hanno conseguito un migliore attaccamento cellulare e la struttura porosa funge da sacca a rete che previene la fuoriuscita di cellule dai macropori del materiale ceramico durante la coltura cellulare. Tale intervallo più elevato di densità cellulare può promuovere i contatti cellulari e la segnalazione paracrina, che è benefica per la crescita, la proliferazione e la differenziazione cellulare. Con paracrina si intende il messaggero chimico secreto da una cellula che viene lasciato diffondere nell'area locale con il fine di modificare la fisiologia di cellule che la circondano, anche di tipo differente.

2.5 APPLICAZIONI

Sono stati realizzati e testati diversi scaffold con biomateriali ceramici per la rigenerazione del tessuto osseo, ciascuno con particolari caratteristiche. Tra questi, ne analizzeremo due tipologie, riportandone le proprietà e la capacità osteoinduttiva dimostrata in un modello murino eterotopico, cioè in un ratto in cui l'innesto trapiantato contiene cellule di natura diversa da quella naturale. Gli scaffold sono stati infatti caricati con cellule stromali mesenchimali (MSC) prelevate da donatori ed espanse in laboratorio per essere successivamente seminate sui supporti. Il costrutto ottenuto è stato impiantato nella sottocute di una precisa categoria di topi, la cui caratteristica è l'assenza di timo che li rende totalmente immunodeficienti; ciò ha reso possibile l'impianto di scaffold e cellule eterologhe, come quelle umane o di pecora, senza lo sviluppo di alcun tipo di reazione di rigetto da parte dell'organismo murino. Ad uno e due mesi dall'impianto, gli scaffold sono stati prelevati ed analizzati. Lo scopo principale di questo studio è la quantificazione delle potenzialità rigenerative dei singoli biomateriali impiegati, fornendo informazioni utili al prosieguo degli studi in tale ambito [13].

- Il *Bio-Oss*[®] (Geistlich Pharma AG-Wolhusen, Svizzera) è un materiale naturale derivante dalla parte minerale di ossa bovine (HA). Le caratteristiche di questo biomateriale si compendiano in una completa biocompatibilità, composizione chimica a base di fosfato di calcio con struttura granulare (0,25-1 mm), elevata porosità totale (80 ± 2) con macropori attorno al valore di 100 μm e micropori con un valore medio di 10 μm ; inoltre, ha mostrato un lento processo di riassorbimento e degradazione non completa (valore massimo di 86,7% a 10 anni) [13].

- Lo *Skelite*TM (Millenium Biologics Kingston-Ontario, Canada) è un biomateriale multifasico a base di fosfato di calcio totalmente sintetico, costituito per il 67% da fosfato tricalcico stabilizzato con silicio (Si-TCP) e, per il restante 33%, da un composto di idrossiapatite e β -fosfato tricalcico (HA/ β -TCP). Il ruolo dell'HA è principalmente quello di fornire sostegno meccanico, mentre il TCP drogato con silicio fornisce stimoli osteoinduttivi, favorisce la formazione di uno strato di silicati sulla superficie e riduce la degradazione del composto quando questo si trova a contatto con i fluidi biologici. Inoltre, questo biomateriale ha completa biocompatibilità, permette di realizzare una struttura cilindrica con pori sia liberi che interconnessi che ricorda quella dell'osso trabecolare, una porosità totale attorno al 60%, dimensione dei pori compresa tra 200 e 500 μ m e un pressoché completo riassorbimento a 2 anni [13].

Caratteristiche	BIO-OSS®	Skelite™
Classificazione	Seconda generazione	Terza generazione
Biocompatibilità	Si	Si
Origine	Naturale	Sintetica
Composizione Chimica	100% Fosfato tricalcico idrato (Idrossiapatite di origine bovina)	67% Fosfato tricalcico stabilizzato con Silicio (Si-TCP) 33% composto di Idrossiapatite e β -Fosfato tricalcico
Porosità	Porosità totale: ~80% Macropori: ~100 micron Micropori: valore medio di 10 micron	Porosità totale: ~60% Macropori: tra 200 e 500 micron Micropori: valore medio di 10 micron
Riassorbimento	Non totale	Quasi totale
Osteointegrazione	Si	Si

Tab 2.2: Tabella riportante le caratteristiche di due biomateriali ceramici testati per la rigenerazione del tessuto osseo [13].

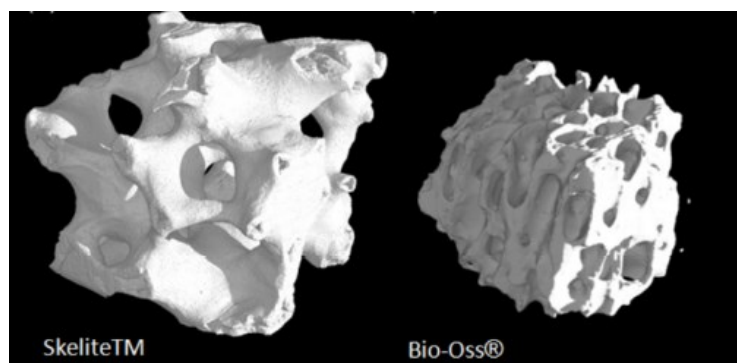


Fig. 2.14: Immagini 3D di due tipologie di scaffold prima dell'impianto [18].

I risultati ottenuti sono stati positivi: tutti gli animali sono sopravvissuti alla procedura sperimentale e non sono state notate infezioni o altri processi patologici a carico del sito di impianto. Analizzando le sezioni istologiche relative al Bio-Oss® (Fig. 2.15) è possibile osservare come il biomateriale caricato con BMSC umane presenti, a un mese, un discreto quantitativo di tessuto osseo immaturo. Esso si caratterizza da un maggior numero di cellule per unità di volume rispetto a quello maturo e da una disposizione pressoché casuale delle sue componenti cellulare e minerale. A due mesi, si nota un aumento quantitativo della deposizione di tessuto osseo che rimane, comunque, di tipo immaturo. Negli scaffold caricati con cellule di pecora, è stata visualizzata la produzione di osso maturo in vivo già al primo mese, e ancor più evidente nella sezione prelevata a due mesi. Il confronto con lo scaffold vuoto è soddisfacente in quanto non evidenzia alcuna produzione di osso e permette l'apprezzamento di sole cellule murine di probabile origine infiammatoria e fibroblastica. Prendendo in considerazione il grado di riassorbimento del biomateriale, in tutte le sezioni considerate è stato parzialmente degradato e alcuni residui sono visibili solo in piccole porzioni.

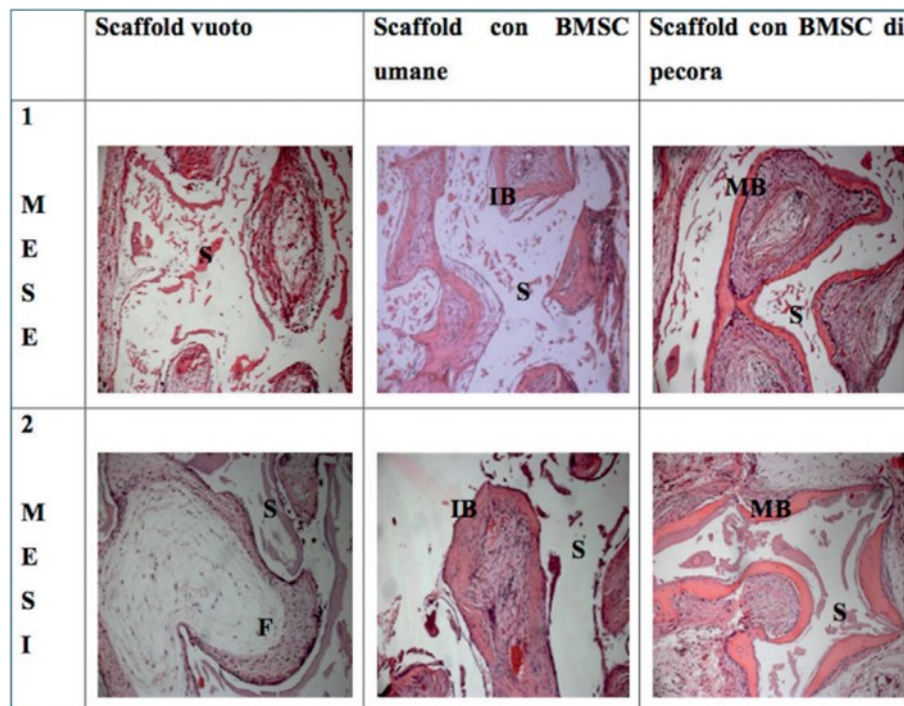


Fig. 2.15: Valutazione istologica dell'ossificazione del Bio-Oss®, ingrandimento 10x; S: scaffold, F: tessuto fibroso, IB: osso immaturo, MB: osso maturo [13].

Dagli esiti dello studio relativo allo scaffold Skelite™ non c'è stata un'abbondante deposizione di osso ad un mese, osservando esclusivamente alcune zone di tessuto osseo che presenta caratteristiche tipiche un tessuto maturo (Fig. 2.16). Le cellule mesenchimali sono disposte in filiere organizzate soprattutto nelle sedi dove l'osso è già presente facendo presupporre attività di tipo osteogenico. Le sezioni degli scaffold prelevati al secondo mese hanno mostrato come la produzione di nuovo osso maturo sia aumentata, sia quantitativamente che qualitativamente, rispetto al primo mese evidenziando, oltretutto, un'organizzazione ancora maggiore delle BMSC prodromo di nuova deposizione ossea. Il controllo positivo con BMSC di pecora ha offerto un ottimo esempio di come il biomateriale testato sia fortemente bioattivo. Al primo mese si notano ampie lacune di deposizione ossea che si rilevano, ancor più estese, al secondo mese; tutto ciò è accompagnato dalla formazione di tessuto midollare al centro dell'osso maturo. Il biomateriale vuoto, utilizzato come controllo negativo, permette di rilevare la mancata deposizione ossea in assenza di componente cellulare essendo visibili solo cellule connettivali murine che hanno colonizzato la struttura impiantata.

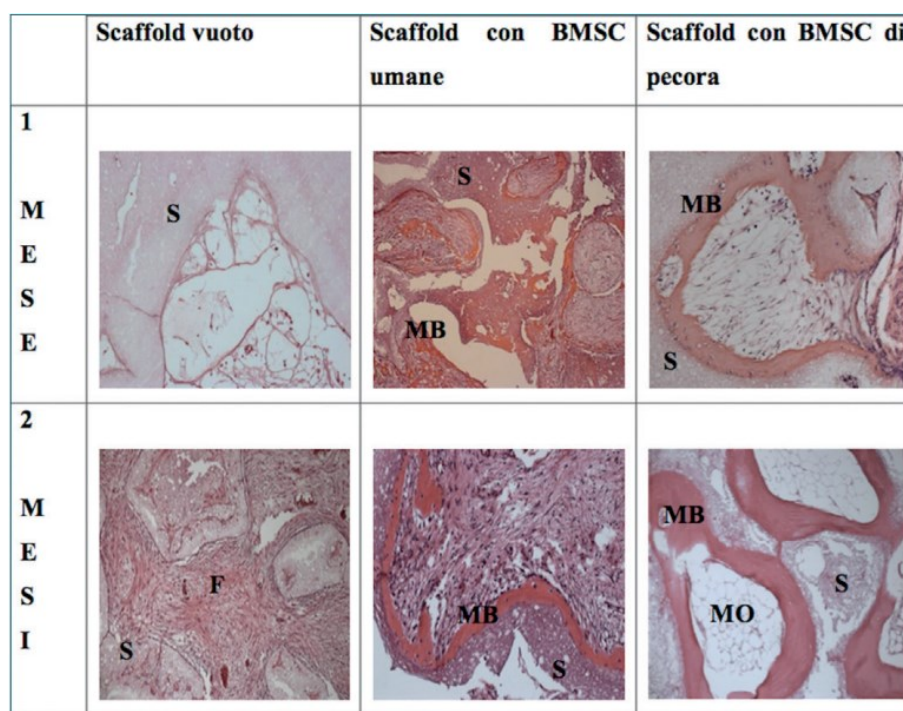


Fig. 2.16: Valutazione istologica dell'ossificazione di Skelite™, ingrandimento 10x; S: scaffold, F: tessuto fibroso, IB: osso immaturo, MB: osso maturo, MO: midollo osseo [13].

Per ciò che concerne la degradazione del materiale, i vetrini analizzati al primo mese dimostrano la presenza di aree in cui il supporto è ancora presente. A due mesi il composto non è ancora riassorbito completamente ma il processo di degradazione è ben avviato sia nelle sezioni con BMSC umane che in quelle con cellule ovine. Il degrado degli scaffold Skelite™ è dovuto principalmente al riassorbimento del TCP ed è stato confermato che la crescita ossea non si è verificata limitatamente nella regione dello scaffold in cui è avvenuto il riassorbimento, ma ha continuato verso l'interno rispetto alla superficie dei pori.

3. SVILUPPI FUTURI

Alcuni studi recenti hanno riposto moltissima speranza negli scaffold realizzati con biomateriali ceramici, in quanto sembrerebbe che abbiano un altissimo potenziale anche nella terapia del tumore osseo, distruggendo eventuali residui di cellule tumorali. Al contempo, questi scaffold bioceramici sono in grado di promuovere osteogenesi quindi formazione di nuovo tessuto osseo con cellule sane. Rispetto alle tradizionali terapie quali chemio, radio, fototermica o magnetotermale, non ha effetti collaterali e può eliminare le cellule tumorali selettivamente ed efficacemente senza danneggiare il tessuto sano circostante. Inoltre, questi scaffold funzionali in materiale ceramico mostrano una soddisfacente biocompatibilità, stimolano la migrazione, l'attaccamento e la differenziazione delle cellule staminali mesenchimali e promuovono la formazione di nuovo osso in vivo.

Di recente, alcuni ricercatori si sono concentrati sulla progettazione di scaffold funzionali stampati in 3D per la terapia del tumore osseo. Tali scaffold hanno la particolarità di essere stati modificati con ossido di grafene (GO) o ossido di grafene ridotto (rGO); GO è ottenuto per ossidazione dai cristalli di grafite nella sua forma ridotta non presenta gruppi funzionali contenente ossigeno. In particolare, ne sono stati realizzati alcuni in TCP-GO ed altri in nano-idrossiapatite con particelle di rGO. I nuovi supporti hanno un ottimo effetto fototermico, cioè sono in grado di indurre una temperatura molto elevata in seguito ad irraggiamento con sorgente laser. Questa proprietà è stata testata nella terapia del tumore in modello animale, in cui l'alta temperatura ha notevolmente soppresso la proliferazione di cellule maligne e ne ha promosso l'apoptosi.

In Fig. 3.1, si nota come la presenza di GO induca un aumento della temperatura nel sito dell'impianto fino a circa 50 °C. In vitro, questi scaffold hanno ucciso quasi completamente le cellule di osteosarcoma (escluso l'8%) in seguito ad irradiazione laser di 808 nm per 20 minuti [25]. Nel caso di xenotrapianto, ovvero effettuato utilizzando tessuto prelevato ad esseri viventi appartenente ad una specie diversa da quella del ricevente, i tumori hanno interrotto la crescita o addirittura diminuito le dimensioni dopo la terapia fototermica. Inoltre, promuovono rigenerazione tissutale, confermato dai valori di densità minerale ossea misurati in sito e pari a $284.58 \pm 20.78 \text{ mg/cm}^3$. In conclusione, gli scaffold contenente GO possono essere un trattamento efficace per i difetti ossei provocati da tumori, grazie alle proprietà fototermica ed osteogenica.

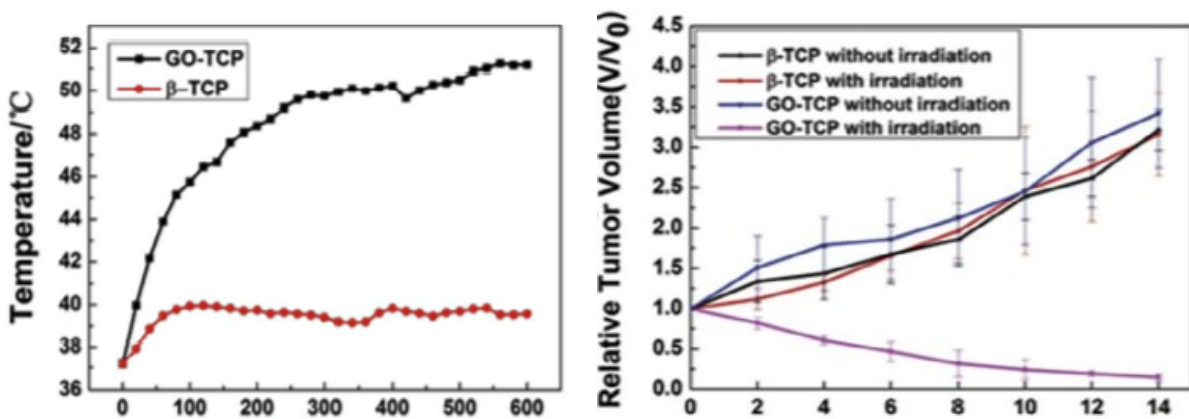


Fig. 3.1: Curve tempo (in secondi) -temperatura e tempo (in giorni) -volume relativo del tumore a confronto per GO-TCP e β -TCP con e senza irradiazione [6].

Oltre alla terapia fototermica, la ricerca si sta concentrando anche sulla progettazione di scaffold dotati di proprietà magnetiche in grado di uccidere le cellule tumorali. Il successo di scaffold con queste caratteristiche rende possibile l'uso di un campo magnetico nella terapia tumorale, trovando una via alternativa e più accessibile contro tale patologia. L'esperimento è stato condotto utilizzando uno scaffold ceramico contenente alcuni strati sovrapposti di ossido di ferro e ossido di grafene: GO-Fe₃O₄-GO (Fig. 3.2) [6]. Poche particelle di ossido di ferro sulla superficie dello scaffold sono sufficienti a indurre effetto magnetotermico, mentre la presenza di GO è benefica per la formazione di nuovo osso e per la diffusione del calore nel materiale, grazie all'eccellente conducibilità termica.

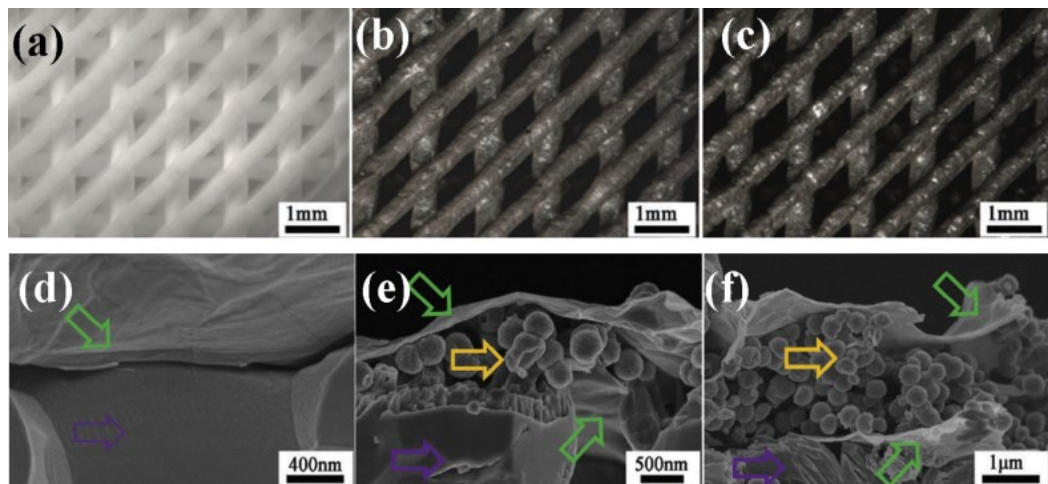


Fig. 3.2: Micrografie ottiche di scaffold realizzati in (a) β -TCP, (b) β -TCP-4Fe-GO, (c) β -TCP-8Fe-GO; Superfici di frattura di scaffold magnetici mostrano strati sovrapposti di ossido di ferro: (d) β -TCP-GO, (e) β -TCP-4Fe-GO, (f) β -TCP-8Fe-GO [6].

L'impianto di materiali ceramici o compositi può provocare infezioni batteriche nei pazienti, comportando rischi elevati. Per ovviare a questa problematica, sono stati progettati degli scaffold in β -TCP modificati con particelle d'argento e di ossido di grafene, denominate particelle Ag-GO. Questi costrutti hanno dimostrato un'attività antibatterica grazie alla presenza degli ioni argento, mentre GO conferisce conducibilità, biocompatibilità e buone proprietà meccaniche [6]. Alcuni scaffold realizzati con questi materiali sono stati cosparsi di cellule stromali del midollo osseo (BMSC, *Bone Marrow Stromal Cells*) di coniglio e successivamente sono stati analizzati; il risultato ottenuto è stato buona differenziazione delle cellule BMSC. Inoltre, colonie di batteri formate da cellule di *Escherichia coli* sono state coltivate su scaffold in diversi materiali e successivamente sono stati analizzati i risultati. *Escherichia coli* è un batterio comunemente presente nella flora batterica intestinale, ma alcuni ceppi sono rischiosi per la salute umana e se sviluppati provocano gravi infezioni. È emerso che la presenza di ioni argento sulla superficie dello scaffold ha diminuito di molto il numero di colonie batteriche [6].

CONCLUSIONI

Negli ultimi anni i biomateriali ceramici sono stati ampiamente utilizzati nell'ingegneria del tessuto osseo; i requisiti principali per la loro applicazione sono biocompatibilità, buona porosità e tasso di degradazione pari a quello di formazione di nuovo tessuto osseo. Uno dei vantaggi di questi biomateriali è la somiglianza con i cristalli di apatite presenti nella matrice extra cellulare e numerosi studi ed esperimenti condotti in campo di rigenerazione del tessuto osseo hanno dimostrato buoni risultati in termini di osteogenesi ed integrazione col tessuto circostante. L'HA naturale o sintetica costituisce un promettente biomateriale per gli scaffold: ha buona capacità di osteogenesi, possiede una composizione chimica quasi identica a quella della ECM ed è facilmente reperibile. È stata utilizzata nella realizzazione del Bio-Oss[®], un materiale naturale testato nella rigenerazione ossea. Tuttavia, il lento processo di biodegradazione ne costituisce il suo limite principale. Al contrario, il TCP ha un elevato tasso di degradazione e migliore biocompatibilità degli altri fosfati, però esibisce scarsa resistenza a trazione e compressione. I limiti dimostrati dai due precedenti materiali sono stati superati con gli scaffold in BCP: essi sono una promettente alternativa alle monofasi, con una velocità di degradazione intermedia tra quella rapida e lenta rispettivamente possedute da TCP e HA. Un tasso di degradazione ottimale dovrebbe coincidere con quello di formazione di nuovo tessuto, ma dipende da molti fattori come la dimensione e la posizione del difetto osseo e le caratteristiche fisiche del paziente. Per esempio, il tempo necessario al processo di rimodellamento osseo nella fusione spinale è di 9 mesi, per applicazioni cranio-maxillofacciali 3-6 mesi e per gravi fratture ossee fino a 24 mesi. Uno scaffold in BCP può essere degradato tra 3 e 24 mesi, che è coerente con il tempo di rimodellamento di diverse ossa [24]. Inoltre, possiede proprietà meccaniche più simili all'osso rispetto ad altri biomateriali.

Vi sono ancora alcuni limiti da superare prima di raggiungere una consueta applicazione clinica e sarà importante continuare la sperimentazione *in vitro* e *in vivo* in modo da ottenere degli innesti sempre più precisi sia dal punto di vista macroscopico che microscopico. La stampa 3D è una tecnologia molto utile in campo medico, in quanto riesce a produrre strutture avanzate e sempre più simili alla struttura gerarchica dell'osso. Un esempio è l'architettura a radice di loto, formata da canali multipli e cavi che favoriscono il trasporto di sostanze nutritive e il rapido rilascio di ioni che andranno a formare nuovi strati di apatite. Nonostante i grandi risultati raggiunti grazie alla stampa 3D, ci sono alcune sfide ancora da superare come

la stampa di biomateriali che includano cellule vive e il miglioramento della vascolarizzazione negli scaffold. È molto importante che alle cellule arrivi una quantità sufficiente di ossigeno e nutrienti attraverso i vasi sanguigni, però è tuttora un problema difficile soprattutto per il trattamento di grandi difetti ossei, dal momento che l'ossigeno è accessibile alle cellule distanti 100-200 μm dai vasi, quindi scaffold più spessi di 400 μm affrontano problemi di scarsa ossigenazione [11]. Le sfide future della stampa 3D saranno il controllo della precisione degli scaffold sulla base delle esigenze individuali e la possibilità di riparare difetti ossei di grandi dimensioni. Grazie ad una ricerca multidisciplinare il potenziale del bioprinting verrà completamente sfruttato, ma un problema potrebbe essere l'elevato costo di produzione di stampanti 3D con tali prestazioni e precisione. In conclusione, il settore dell'ingegneria del tessuto osseo è in rapido sviluppo verso la risoluzione dei limiti odierni e tra i prossimi traguardi vi potrebbe essere anche la concretizzazione di una terapia per il tumore osseo mediante l'uso di scaffold bioceramici.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- [1] S. Adamo, M. De Felici, A. Dolfi, A. Filippini, M. Grano, A. Musarò, C. Nervi, G. Papaccio, A. Salustri, E. Ziparo, *Istologia di Monesi*, 2018, VII Ed, Piccin, Padova
- [2] D. Bani, *Il tessuto osseo*, Università di Firenze
- [3] [Online] Fondazione Onlus Tes: <https://www.fondazionetes.it/>
- [4] F. Berthiaume, T. J. Maguire, M. L. Yarmush, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress and Challenges*, Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, 2011, 2 403-430
- [5] R. Langer, J. P. Vacanti, *Tissue engineering*, 1993, Science, 920-926
- [6] H. Ma, C. Feng, J. Chang, C. Wu, *3D-printed bioceramic scaffolds: From bone tissue engineering to tumor therapy*, Acta Biomaterialia, 2018, 79 37-59
- [7] [Online] Google immagini: https://it.wikipedia.org/wiki/Ingegneria_tissutale
- [8] F. R. Maia, A. R. Bastos, J. M. Oliveira, V. M. Correlo, R. L. Reis, *Recent approaches towards bone tissue engineering*, Bone, 2022
- [9] A. Wubneh, E. K. Tsekoura, C. Ayranci, H. Uludag, *Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering*, Acta Biomaterialia, 2018
- [10] J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, G. A. Rodan, *Principles of Bone Biology*, 2002, II Ed, Academic Press, USA
- [11] M. J. Zafar, D. Zhu, Z. Zhang, *3D Printing of Bioceramics for Bone Tissue Engineering*, Materials, 2019, 12 3361
- [12] S. Mondal, U. Pal, A. Dey, *Natural origin hydroxyapatite scaffold as potential bone tissue engineering substitute*, Ceramics International, 2016, 42 18338-18346
- [13] L. Cavagnaro, M. Formica, L. Felli, *Osteoconduttività a confronto di tre diversi scaffold caricati con cellule staminali*, Giornale Italiano di Ortopedia e Traumatologia, 2018, 44 133-145

- [14] Y. Wen, S. Xun, M. Haoye, S. Baichuan, C. Peng, L. Xuejian, Z. Kaihong, Y. Xuan, P. Jiang, L. Shibi, *3D printed porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering*, *Biomaterials Science*, 2017, 5 1690
- [15] C. Wang, W. Huang, Y. Zhou, L. He, Z. He, Z. Chen, X. He, S. Tian, J. Liao, B. Lu, Y. Wei, M. Wang, *3D printing of bone tissue engineering scaffolds*, *Bioactive Materials*, 2020, 5 82-91
- [16] S. C. Cox, J. A. Thornby, G. J. Gibbons, M. A. Williams, K. K. Mallick, *3D printing of porous hydroxyapatite scaffolds intended for use in bone tissue engineering applications*, *Materials Science and Engineering C*, 2015, 47 237-247
- [17] G. F. Trinchese, E. Calabrese, G. Calabrò, F. Lisanti, *Gli scaffold in medicina rigenerativa*, *Lo Scalpello*, 2019, 33 230-236
- [18] V. S. Komlev, M. Mastrogiacomo, R. C. Pereira, F. Peyrin, F. Rustichelli, R. Cancedda, *Biodegradation of porous calcium phosphate scaffolds in an ectopic bone formation model studied by X-ray computed microtomography*; *European Cells and Materials*, 2010, 136-146
- [19] M. A. Velasco, C. A. Narvaez-Tovar, D. A. Garzon-Alvarado, *Design, materials, and mechanobiology of biodegradable scaffolds for bone tissue engineering*, *BioMed Research International*, 2015
- [20] K. Prasad, O. Bazaka, M. Chua, M. Rochford, L. Fedrick, J. Spoor, R. Symes, M. Tieppo, C. Collins, A. Cao, D. Markwell, K. Ostrikov, K. Bazaka, *Metallic Biomaterials: Current Challenges and Opportunities*, *Materials*, 2017, 10 884
- [21] [Online] Galeno: <https://www.cassagaleno.eu/3dbioprinting-lutilizzo-delle-stampanti-3d-nella-medicina-rigenerativa/>
- [22] W. T. Barbosa, K. V. de Almeida, G. G. de Lima, M. A. Rodriguez, M. V. Lia Fook, R. Garcia-Carrodeguas, V. A. da Silva Junior, F. A. de Sousa Segundo, M. J. C. de Sà, *Synthesis and in vivo evaluation of a scaffold containing wollastonite/ β -TCP for bone repair in a rabbit tibial defect model*, *Biomed Mater Res.*, 2020, 108 1107-1116
- [23] L. Zhang, G. Yang, B. N. Johnson, X. Jia, *Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair*, *Acta Biomaterialia*, 2019, 84 16-33
- [24] M. M. Zerankeshi, S. Mofakhami, E. Salahinejad, *3D porous HA/TCP composite scaffolds for bone tissue engineering*, *Ceramics International*, 2022, 48 22647-22663

[25] L. Dejian, N. Wei, C. Liang, M. David, L. Dinghua, Z. Xu, J. Ying, Y. Baoqing, H. Chuanglong, *Self-Assembled Hydroxyapatite-Graphene Scaffold for Photothermal Cancer Therapy and Bone Regeneration*, Journal of Biomedical Nanotechnology, 2018, 15 2003-2017