UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

APPLICAZIONI DELL'INGEGNERIA TISSUTALE NELLA RIGENERAZIONE DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE: SCAFFOLD, RICELLULARIZZAZIONE E STIMOLAZIONE MECCANICA IN VITRO

Relatore: Prof. PAVAN PIERO

Laureando: RIGOLON GIUSEPPE

ANNO ACCADEMICO 2024/2025

Data di laurea 26/09/2025

INDICE

SOMMARIO 1

I CAPITOLO: LA CARTILAGINE ARTICOLARE: FISIOLOGIA, PATOLOGIE E APPROCCI RIGENERATIVI 3

1.1 TESSUTO CARTILAGINEO: STRUTTURA, FUNZIONE E PROPRIETÀ 3

1.2 PATOLOGIE DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE: L'OSTEOARTRITE 6

1.3. NECESSITÀ DI NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE: L'INGEGNERIA TISSUTALE 8

1.3.1 Cellule *9*

1.3.2 Materiali (Scaffold) *10*

1.3.3 Fattori di crescita *10*

II CAPITOLO: SCAFFOLD PER L'INGEGNERIA TISSUTALE CARTILAGINEA 11

2.1. ARCHITTETTURA DEGLI SCAFFOLD 13

2.1.1 Tecniche per la fabbricazione delle impalcature *14*

2.2 *SCAFFOLD* NATURALI, SINTETICI E IBRIDI 15

2.2.1. Scaffold naturali *15*

2.2.2 Scaffold Sintetici *21*

2.2.3 Scaffold ibridi *22*

2.2.4. Idrogelo come forma di scaffold avanzata *24*

2.3 PROSPETTIVE FUTURE PER LA CREAZIONE DI SCAFFOLD, IL BIOPRINTING QUADRIDIMENSIONALE 25

III CAPITOLO: CELLULE PER LA RICELLULARIZZAZIONE DELLA CARTILAGINE 27

3.1. CONDROCITI: FONTI, POTENZIALITÀ, VANTAGGI E LIMITAZIONI 27

3.2. CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI 29

3.2.1 fonti *29*

3.2.2 Piattaforme di coltura per l'espansione delle MSC: I bioreattori *32*

3.2.3 Condrogenesi guidata in vitro: modulazione biochimica e meccanica delle MSC *33*

3.2.4 Limiti attuali e potenzialità future delle MSC nella rigenerazione cartilaginea *35*

3.3. CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI INDOTTE: FONTI E POTENZIALITÀ 36

3.3.1 Isolamento e ottenimento dei condroprogenitori per la rigenerazione cartilaginea *37*

3.3.2 Riparazione dei difetti cartilaginei: approcci in vitro e sfide immunologiche in vivo *38*

3.3.3 Approcci futuri: selezione genetica dei condroprogenitori mediante CRISPR-Cas9 ..... *39*

3.4. CONSIDERAZIONI FINALI 39

IV CAPITOLO: METODI E PROCESSI PER LA RICELLULARIZZAZIONE DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE 41

4.1. METODI DI RICELLULARIZZAZIONE 42

4.2 METODI PER L'ANALISI DELLA PROGRESSIONE DEL BIOIMPIANTO DURANTE LA RICELLULARIZZAZIONE 45

4.2.1 Saggio vivo/morto *46*

4.2.2 Prove Meccaniche *46*

4.2.3. Analisi biochimiche *48*

2.4. Analisi istologica *48*

DISCUSSIONE 49

CONCLUSIONI 53

BIBLIOGRAFIA 55

SOMMARIO

L'elaborato affronta il problema della rigenerazione della cartilagine articolare, danneggiata dall'osteoartrite, una patologia degenerativa che interessa sempre più individui. In particolare, il lavoro si concentra sull'impiego dei bioimpianti costituiti da scaffold e cellule per la ricostruzione della cartilagine.

L'obiettivo del lavoro è analizzare i principali componenti e i processi coinvolti per la progettazione di costrutti funzionali, con particolare attenzione alla fase di ricellularizzazione finale. La ricerca bibliografica nel presente studio di tesi è stata condotta attraverso la consultazione di banche dati specializzate come Pubmed, ScienceDirect e Google Scholar.

Inizialmente si introduce il lettore al contesto biologico e clinico, andando a descrivere la struttura e le funzioni della cartilagine e proseguendo con le alterazioni che subisce a causa dell'osteoartrite. Si prosegue con un approfondimento degli scaffold, classificando e descrivendo le diverse tipologie impiegate nell'ingegneria tissutale cartilaginea. Particolare attenzione è rivolta alla tecnica di decellularizzazione. Vengono esaminati i vantaggi e criticità di ciascuna tipologia, con riferimento agli studi recenti di scaffold di nuova generazione, come l'idrogelo.

La terza parte descrive le cellule impiegate per la rigenerazione del tessuto cartilagineo mediante la ricellularizzazione dello scaffold. Vengono esaminate le principali tipologie di cellule come condrociti, cellule staminali mesenchimali e cellule staminali pluripotenti indotte. Vengono discusse le strategie di isolamento, espansione e manipolazione cellulare presentando gli strumenti che sono utilizzati per la proliferazione *in vitro*.

Il capitolo finale analizza i processi di ricellularizzazione, descrivendo le strategie utilizzate per promuovere l'adesione e la proliferazione cellulare all'interno dello scaffold. In particolare, viene presentato uno studio sperimentale che ha condotto test specifici per valutare l'efficacia della ricellularizzazione, monitorando la progressione del processo.

Il lavoro si propone pertanto di offrire una panoramica sulle potenzialità dei bioimpianti nel campo della medicina rigenerativa, sottolineando il potenziale che possiedono nella cura dell'osteoartrite e le sfide ancora da affrontare per la loro applicazione clinica.

I CAPITOLO
LA CARTILAGINE ARTICOLARE: FISIOLOGIA, PATOLOGIE E APPROCCI RIGENERATIVI

Negli ultimi anni, l'ingegneria tissutale e il trapianto di cartilagine hanno assunto un ruolo di grande rilevanza per il trattamento e la gestione dell'osteoartrite (OA). Grazie ai recenti progressi nella scienza dei materiali, nella biomeccanica e nella biologia cellulare è oggi possibile realizzare innesti osteocondrali biomimetici tramite l'ingegneria tissutale per sostituire in modo efficace la cartilagine danneggiata. Questo processo si basa sulla generazione di cellule germinali che provengono da diverse fonti: condrociti autologhi o allogenici, cellule mesenchimali staminali (MSC) che sono destinate a specializzarsi in condrociti (1).

Comprendere i fenomeni teorici e applicativi di queste strategie è di particolare importanza per valutare il reale potenziale in ambito clinico. Risulta importante approfondire il ruolo degli scaffold nella rigenerazione cartilaginea e analizzare i più recenti sviluppi tecnologici nel settore, in modo particolare la tecnologia della decellularizzazione ci permette di sintetizzare scaffold immunogenici con promettenti proprietà biologiche e biomeccaniche. La riparazione del tessuto cartilagineo utilizzando questa tecnologia prevede in generale, tre fasi: la decellularizzazione del tessuto donatore, la successiva ricellularizzazione e, infine, la ricostruzione e conseguente riparazione della cartilagine danneggiata (1,2).

1.1 TESSUTO CARTILAGINEO: STRUTTURA, FUNZIONE E PROPRIETÀ

La cartilagine è un tessuto connettivo scheletrico. Nel corpo sono presenti tre tipi di cartilagine: ialina, elastica e fibrosa. La cartilagine articolare (CA) è un tipo specializzato di cartilagine ialina ed è la tipologia più abbondante di cartilagine presente nel corpo, si presenta come un tessuto duro ed elastico con un intervallo di spessore che varia all'incirca dai 2 ai 4 mm e forma un rivestimento sulle estremità delle ossa lunghe

e sulla superficie delle articolazioni mobili. La CA è un tessuto altamente organizzato contenente reti strutturali complesse ma è importante notare che è un tessuto avascolare; ciò comporta una bassa capacità rigenerativa del tessuto rendendo difficile la guarigione indipendente. È anche aneurico, dunque non presenta al suo interno il passaggio di nervi o vasi linfatici e infine possiede una bassa densità e attività cellulare.

Dal punto di vista strutturale la CA è un materiale viscoelastico, anisotropo e poroso. È composto da condrociti dispersi, cellule sferoidi o ovoidali con diametro di 10-13 μm che rappresentano il 5-10% del volume totale e sono i principali responsabili della produzione e mantenimento della matrice extracellulare (ECM), composta principalmente da collagene di tipo II (15-22% del peso in umido), proteoglicani (4-7%) e proteine della matrice (<1%). L'acqua che compone l'CA per un 60-85% del peso in umido, con valori riportati in letteratura variabili a seconda degli studi (3,4); a questa componente si associano inoltre ioni inorganici come Sodio (Na), Cloro (Cl) e Potassio (K) a cui corrisponde la parte minerale (<4%).

Dal punto di vista istologico la CA può essere suddivisa in quattro zone distinte: zona superficiale (o tangenziale), zona di transizione (media), zona profonda (radiale) e zona calcificata, ciascuna caratterizzata da una specifica organizzazione fibrillare e composizione biochimica. In ogni zona possiamo osservare tre differenti regioni: la matrice pericellulare (PCM) fondamentale per la funzione della cartilagine, la matrice territoriale (TM) e la matrice interterritoriale (ITM). Per comprendere al meglio le caratteristiche del tessuto è utile descrivere più nel dettaglio la sua organizzazione.

La zona superficiale rappresenta lo strato più sottile ed è caratterizzata da un'alta concentrazione di acqua. La sua composizione prevede fibre di collagene strettamente impacchettate, orientate parallelamente alla superficie articolare, questo dà origine a una superficie coerente e liscia adatta al movimento che allo stesso tempo conferisce resistenza agli sforzi di taglio e alla trazione. Lo strato, è caratterizzato dalla presenza di condrociti di forma ellissoidale appiattita che presentano un orientamento parallelo alla superficie articolare e sintetizzano un elevata quantità di collagene. In questa porzione risultano esserci una bassa presenza di proteoglicani e le ciglia cellulari sono orientate lontano dalla superficie articolare.

La zona intermedia è composta da fibre di collagene disposte in modo meno ordinato e aventi diametro maggiore rispetto a quelle della zona superficiale. In questo strato i condrociti assumono una forma sferoidale, sono meno numerosi e hanno la tendenza a disporsi obliquamente rispetto alla superficie articolare. Dal punto di vista biomeccanico questa zona offre resistenza alle forze di compressione.

La zona profonda presenta fibrille di collagene con un diametro maggiore e una ECM ricca di proteoglicani, che conferiscono una notevole resistenza alle forze di compressione. I condrociti di questo strato sono sferoidali, presenti in scarsa concentrazione, si dispongono in colonne perpendicolari alla superficie articolare e parallele alle fibre di collagene. Le ciglia cellulari vengono orientate lungo l'asse longitudinale dell'osso tra due cellule oppure sulla membrana cellulare mediale o laterale. È stato osservato che tra la zona profonda e la zona calcificata decorre uno strato definito *tidemark*, una linea basofila di 2-5 μm di spessore.

Infine, la zona calcificata svolge la funzione di ancoraggio della cartilagine con l'osso subcondrale fungendo da transizione meccanica tra i tessuti che presentano caratteristiche diverse. I condrociti in questa zona esibiscono un fenotipo ipertrofico sintetizzano collagene di tipo X e sono incorporati nella ECM mineralizzata (4).

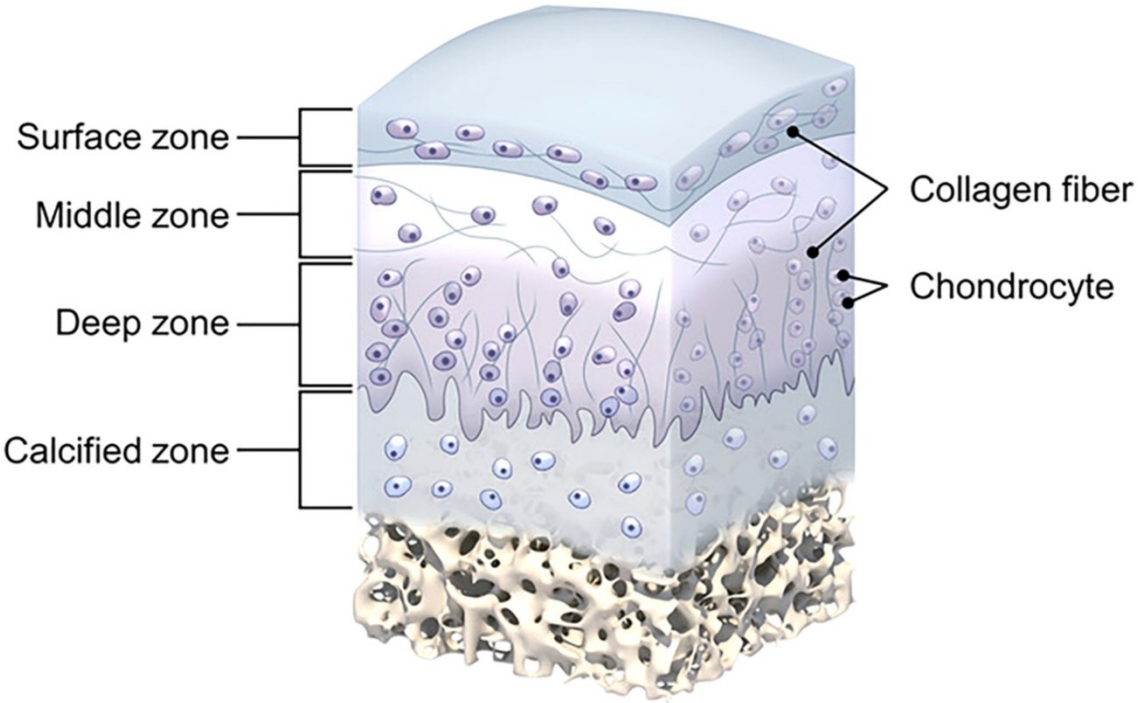

Fig 1.1 Struttura della CA. Tratta da (4)

Le caratteristiche meccaniche e fisiche della CA derivano dall'interazione tra la rete fibrillare di collagene, gli aggregati di proteoglicani intrappolati nell'ECM e le molecole d'acqua. Questa combinazione conferisce alla cartilagine una notevole resistenza sia ai carichi di trazione che di compressione, grazie ai fenomeni di repulsione elettrostatica che si instaurano tra le molecole cariche. (4)

Quando la cartilagine viene sottoposta a compressione, l'acqua e i soluti presenti nella matrice vengono momentaneamente espulsi verso l'esterno. Al termine del carico, la pressione osmotica favorisce nuovamente l'ingresso di acqua e i soluti all'interno della matrice, consentono alla cartilagine di recuperare il suo spessore originario e mantenere la propria funzione ammortizzante (3).

1.2 PATOLOGIE DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE: L'OSTEOARTRITE

L'OA è la principale malattia legata alla degenerazione progressiva della CA, può comportare anche il rimodellamento dell'osso subcondrale, fibrosi e l'infiammazione della membrana sinoviale. Lo sviluppo della patologia nel tempo porta a ridurre drasticamente la funzionalità articolare e di conseguenza, l'autonomia delle persone che ne sono affette. Spesso porta ad una condizione di disabilità, diminuendo significativamente le capacità fisiche, influenzando la qualità della vita. Dati recenti riportano che l'OA colpisce circa 528 milioni di persone nel mondo, ed è stato osservato che interessa più frequentemente le donne (18%) rispetto agli uomini (10%) di età superiore ai 60 anni. La sua prevalenza aumenta con l'età ma esistono altre ragioni che possono facilitarne la comparsa: l'obesità, la genetica, le lesioni articolari, il diabete, il sesso e l'invecchiamento (5).

Dall'apparizione dell'OA, la CA subisce molteplici modifiche strutturali causate dai fattori legati agli sforzi meccanici che portano all'usura del tessuto. Durante lo sviluppo della malattia è stato osservato come i condrociti, che si trovano normalmente in uno stato di quiescenza, si attivano, aumentando la loro attività catabolica che si ipotizza essere legata sia da una predisposizione genetica, sia delle mutazioni di geni associati alla struttura dell'ECM, questa produzione anomala di enzimi causa la

degradazione della matrice minando la salute strutturale e funzionale del tessuto cartilagineo.

La degradazione della cartilagine rappresenta quindi una delle caratteristiche più tipiche dell'OA. Tale processo è dovuto ad uno squilibrio nell'omeostasi del tessuto, che evolve verso un predominio di attività cataboliche contribuendo così alla progressione dell'OA attraverso rilascio di citochine e chemiochine. Ne conseguono fenomeni complessi come la proliferazione anomala e l'ipertrofia dei condrociti, seguiti da fenomeni di apoptosi, accompagnati da processi di angiogenesi, calcificazione della matrice cartilaginea e moltiplicazione delle linee *tidemark*.

Nel dettaglio, la degenerazione dell'AC prevede due eventi principali, la fibrillazione e la degradazione dell'ECM secondaria che provoca l'inizio di una cascata proinfiammatoria, la diminuzione dell'elasticità, la denaturazione e degradazione del collagene di tipo II a carico degli enzimi metalloproteasi (MMP), la perdita dei proteoglicani e infine la formazione di crepe, tutti questi eventi portano ad una ECM indebolita.

L'ECM cambia, inizialmente dalla zona superficiale procedendo poi verso la zona media dalle crepe si formano fessure verticali nella matrice. Il cambio del fenotipo dei condrociti provoca un'alterazione dei meccanismi cellulari che regolano la sintesi dell'ECM, questo nuovo fenotipo porta ad una maggiore sintesi del collagene di tipo I tipico del tessuto fibroso a scapito del collagene di tipo II. L'AC si rompe scoprendo l'osso subcondrale, questo determina lo stato terminale dell'OA (3).

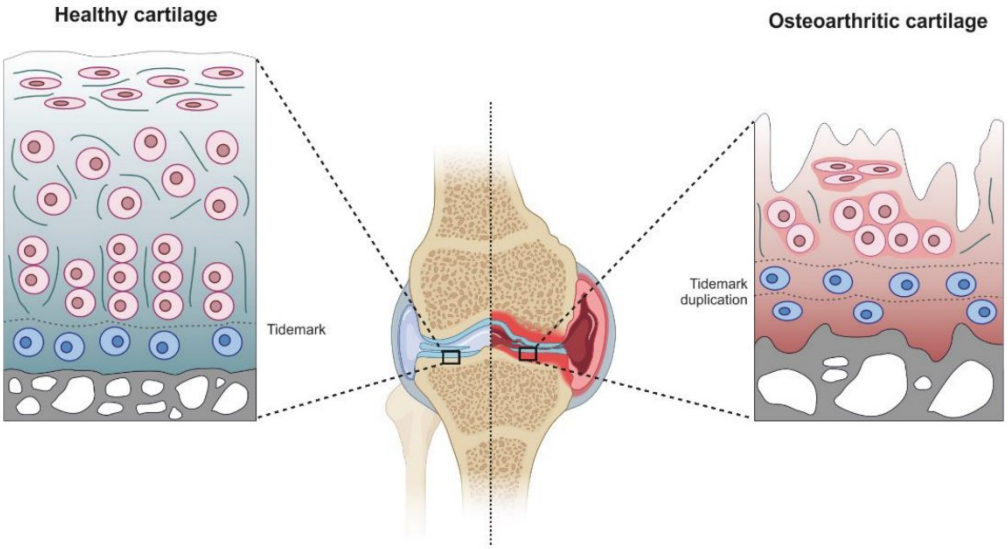

Fig. 1.2 Differenza tra la CA in salute (sinistra) e quella affetta da OA (destra)
Tratta da (3).

1.3. NECESSITÀ DI NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE: L'INGEGNERIA TISSUTALE

A causa delle limitazioni dei metodi tradizionali di riparazione e rigenerazione di tessuti è nata una branca specifica dell'ingegneria biomedica che prende il nome di ingegneria tissutale. Questa disciplina si concentra sulle procedure di rigenerazione dei tessuti del corpo umano attraverso la crescita di cellule su supporti specifici per generare nuovo tessuto (29).

Per far fronte al problema correlato allo sviluppo dell'OA sono tuttora in evoluzione studi legati agli approcci di rigenerazione e riparazione della cartilagine. Nonostante numerose ricerche sull'argomento, non esiste ad oggi una terapia definitiva efficace per trattare l'OA.

I metodi di trattamento per la rigenerazione della cartilagine si basano sul grado della classificazione del danno secondo la classificazione di Outerbridge, che considera le dimensioni e la profondità delle lesioni.

Tabella 1. Classificazione di Outerbridge dei gradi di alterazione dell'AC.

Grado del danno	Descrizione
Grado 0	AC normale, superficie liscia
Grado I	Cartilagine caratterizzata da un aumento del contenuto d'acqua, consistenza più soffice e ridotta presenza di proteoglicani.
Grado II	La superficie mostra una frattura che raggiunge circa la metà dello spessore cartilagineo, Alla risonanza magnetica (RM) si osservano rigonfiamenti o sfilacciamenti del tessuto. L'area danneggiata <50% della superficie, con un'estensione che non supera 1,25 cm^2,
Grado III	Il danno supera la metà dello spessore della cartilagine, può esporre l'osso subcondrale, la superficie del danno supera 1,25 cm^2. Il difetto profondo >50%
Grado IV	Difetto presente su tutto lo spessore. Distruzione con esposizione dell'osso subcondrale

Nota: la tabella rielabora i concetti espressi da (6)

Solitamente per i gradi I e II si è notato che si hanno buoni risultati se si procede con trattamenti farmacologici e dietetici. Gli interventi chirurgici sono invece raccomandati per un grado di danno di tipo III o IV. Per la trattazione di questo tipo di lesioni le nuove strategie terapeutiche si concentrano principalmente su tre pilastri, che verranno illustrati di seguito (6).

1.3.1 Cellule

Tra le terapie più studiate troviamo il trapianto osteocondrale autologo e l'impianto di condrociti autologhi. Danno buoni risultati nel trattamento delle lesioni cartilagine ma permangono delle complicanze riguardanti la disponibilità ristretta di tessuto donatore, il raggiungimento di numero di condrociti vitali sufficienti alla riparazione e la capacità di spostamento del sito donatore all'interno delle articolazioni. Queste complicazioni hanno portato la concentrazione dei ricercatori su altri approcci come lo sfruttamento della cartilagine ialina non articolare per ottenere una fornitura costante di condrociti di alta qualità impiegati poi per la riparazione della cartilagine danneggiata (7).

Attualmente è d'interesse anche l'uso di altri tipi di cellule, come le cellule staminali mesenchimali (MSC) che possono essere ottenute da diverse fonti con la capacità di differenziarsi in condrociti articolari (6).

1.3.2 Materiali (Scaffold)

Il metodo più promettente per la riparazione della CA è l'impiego di impalcature per supportare la crescita e la differenziazione cellulare, utilizzate come matrice di supporto per i condrociti autologhi che sono stati isolati da un'area sana e coltivati in vitro su scaffold. Questo consente di creare un bioimpianto che verrà poi trapiantato all'interno del difetto cartilagineo. Lo *scaffold* verrà poi degradato insieme alla progressiva formazione di cartilagine. Attualmente però tali procedure non hanno portato alla riparazione della CA in quanto l'impianto di condrociti autologhi non porta alla formazione di cartilagine ialina nativa ma, piuttosto, riscostruiscono la fibrocartilagine che è sensibile a nuovi possibili danni (6).

1.3.3 Fattori di crescita

Gli studi hanno ampliamente dimostrato come i fattori di crescita abbiano effetti sulla condrogenesi e sul mantenimento dei fenotipi corretti delle cellule. Tali fattori possono essere addizionati allo *scaffold* durante la coltura per stimolare la proliferazione delle cellule cartilaginee stabilizzandone la condrogenesi l'espressione fenotipica. Grazie a questi fattori il tessuto che viene a formarsi possiede sotto il punto di vista istologico proprietà biochimiche paragonabili a quelli della cartilagine ialina, accelerando la guarigione della lesione e aumentando il contenuto di collagene di tipo II rispetto al collagene di tipo I.

Combinando diversi approcci come *scaffold* avanzati, fattori di crescita e tipi di cellule alternative forniscono la possibilità di ottenere un metodo efficace per la riparazione della cartilagine (6).

II CAPITOLO
SCAFFOLD PER L'INGEGNERIA TISSUTALE CARTILAGINEA

Gli *scaffold* sono strumenti sempre più applicati nell'ingegneria tissutale per il trattamento dei tessuti, potendo essere utilizzati come base sulla quale seminare cellule da coltivare poi in vitro. Questa simbiosi *scaffold*-cellule, dopo un tempo necessario per lo sviluppo, crea il così detto bioimpianto che può essere trapiantato nell'organismo. Esistono vari tipi di *scaffold* che si differenziano tra loro in base all'origine da cui vengono ottenuti, si può fare in prima battuta una macro distinzione come *scaffold* naturali, sintetici o ibridi. Uno *scaffold* indipendentemente dall'origine, per essere utilizzato nella rigenerazione di un qualsiasi tessuto, deve essere biocompatibile, non deve quindi provocare reazioni indesiderate nel corpo e, inoltre, deve essere in grado di fornire un'adeguata stabilità meccanica e possedere le caratteristiche morfologiche appropriate per tollerare gli sforzi meccanici che possono sollecitarlo sia durante la fase di coltura che dopo l'inserimento nell'organismo. In aggiunta, ogni *scaffold* deve promuovere la proliferazione e l'adesione delle cellule che sono state messe in coltura e, infine, una volta che hanno fornito un periodo necessario per garantire il supporto efficace per la formazione del tessuto, è necessario che si degradino gradualmente. Un ruolo fondamentale è svolto anche dalle caratteristiche meccaniche dello *scaffold*, determinato dai biomateriali scelti. Per garantire un'adeguata integrazione è indispensabile che la resistenza meccanica sia quanto più possibile simile a quella del tessuto target che si desidera rigenerare (4,6).

Un altro aspetto rilevante nella generazione delle impalcature riguarda la porosità, che rappresenta uno degli aspetti critici della progettazione delle impalcature.

Per un tessuto con capacità rigenerativa limitata, com'è la cartilagine, l'impiego di *scaffold* si rivela il metodo più promettente ed efficace. Le impalcature impiegate si presentano generalmente come strutture tridimensionali caratterizzate da una rete di poli interconnessi con dimensioni variabili, definite in funzione del tipo di cellula da ospitare. Il design tridimensionale previene inoltre la dedifferenziazione dei condrociti in cellule simili, come fibroblasti. È stato rilevato che cellule come i condrociti se coltivati in

superfici piane perdono la loro capacità di produrre proteine particolari cruciali per la formazione della cartilagine ialina (6).

Affinché lo *scaffold* possa essere un valido supporto per la crescita cellulare è necessario che sia realizzato con dei materiali biocompatibili, tali materiali vengono chiamati in letteratura biomateriali.

I biomateriali sono sostanze di origine naturale o artificiale che trovano un ampio impiego nell'ambito biomedicale. La caratteristica di questi materiali è data dalle loro proprietà di biocompatibilità, biodegradabilità, assenza di tossicità e stabilità chimica. Pertanto, le impalcature costituite da biomateriali forniscono una buona base per quella che sarà la matrice di supporto in cui potranno proliferare le cellule. Tra le proprietà citate, la biodegradabilità è quella di maggior rilevanza perché è legata alla velocità di degradazione del biomateriale. Un profilo di degradazione ottimale è essenziale affinché un biomateriale stimoli efficacemente la formazione di neo-cartilagine. Se la degradazione risultasse troppo veloce l'impalcatura scomparirebbe ancor prima che il tessuto cartilagineo si sia formato; al contrario, una degradazione eccessivamente prolungata ostacolerebbe fisicamente la crescita del tessuto. Lo *scaffold* deve essere quindi costituito da un biomateriale che possieda un tasso di degradazione in linea con il tasso di guarigione del difetto. Uno studio condotto da Welsh e Sikder (4) ha evidenziato come i biomateriali utilizzati per la riparazione di difetti cartilaginei dovrebbero mantenere la loro integrità strutturale per almeno 3-6 mesi.

Questo capitolo illustra i vari tipi di *scaffold* prendendo in considerazione quelli che sono stati o sono ancora in fase di sviluppo per ricerca clinica. Sono evidenziati i requisiti e i materiali utilizzati nella creazione di *scaffold* nell'ingegneria cartilaginea, descrivendo dapprima gli scaffold naturali, sintetici e ibridi (o compositi) e le loro sostanziali differenze con un'attenzione particolare anche agli *scaffold* a base di idrogelo. Questi rappresentano una prospettiva innovativa e versatile, in quanto possono anch'essi essere sviluppati da biomateriali naturali, sintetici o ibridi. Nella descrizione delle impalcature naturali una parte del paragrafo è dedicata ai metodi di decellularizzazione. Tali metodiche possono trovare applicazione anche nella realizzazione di *scaffold* ibridi, in quanto questi ultimi combinano componenti di origine naturale e sintetica.

2.1. ARCHITTETTURA DEGLI SCAFFOLD

Per progettare al meglio gli *scaffold* è utile tenere presenti gli scopi di queste strutture: impalcature porose costituite da materiale biocompatibile sulle quali andranno a svilupparsi costrutti in grado di risanare i difetti cartilaginei. La porosità è fondamentale per la riuscita del bioimpianto. Generalmente viene detta gerarchica, in quanto si suddivide in macroporosità e microporosità. Una struttura macroporosa interconnessa può migliorare la semina, lo sviluppo e la migrazione cellulare, nonché la crescita, A livello di microporosità, invece, viene garantita la diffusione di nutrienti, ossigeno e prodotti metabolici. Una buona rete di pori interconnessi influenza direttamente la capacità di adesione cellulare, la proliferazione e la sintesi dell'ECM. Gli studi hanno dimostrato che una struttura porosa, oltre a garantire il passaggio di nutrienti e ossigeno, facilita la migrazione delle cellule e permette la formazione del tessuto neo cartilagineo uniforme. In letteratura, un metodo semplice e diffuso per il calcolo della porosità totale è quello gravimetrico, calcolato impiegando le seguenti equazioni:

$$\rho_{scaffold} = \frac{massa\ a\ secco\ dello\ scaffold\ (gr)}{Volume\ geometrico\ dello\ scaffold\ (cm^3)}$$

$$Porosità\ (\%) = 1 - \frac{\rho_{scaffold\ (\frac{gr}{cm^3})}}{\rho_{materiale\ (\frac{gr}{cm^3})}}$$

con

$\rho_{scaffold}$ densità apparente del campione poroso

$\rho_{materiale}$ densità del materiale compatto non poroso

Questo approccio consente di stimare la quantità di vuoti presenti all'interno delle impalcature ed è valido sia per *scaffold* naturali, sintetici e ibridi, purché si conosca o si possa stimare la densità del materiale compatto non poroso (8,9).

L'architettura degli *scaffold*, specialmente quelli derivati dalla decellularizzazione, risulta essere stocastica. In questi casi l'architettura riflette la complessità biologica del tessuto di origine e non consente quindi un controllo preciso sulla distribuzione dei pori. Di contro, scaffold sintetici o compositi consento di ottenere una struttura più controllata mediante i metodi di liofilizzazione, elettrofilatura o lo stampaggio a iniezione. Questa progettazione offre il vantaggio di indirizzare in maniera mirata il comportamento delle cellule, però perdendo l'intrinseca complessità biologica dei tessuti naturali.

Per superare questi limiti entrambe le strategie possono essere combinate, per dare origine a quelli che in letteratura sono chiamati *scaffold* ibridi.

2.1.1 Tecniche per la fabbricazione delle impalcature

In letteratura sono presenti numerosi metodi per la creazione di *scaffold*. Le tecniche più convenzionali comprendono la liofilizzazione e l'elettrofilatura. Il metodo di liofilizzazione sfrutta il vuoto per rimuovere il solvente da una soluzione congelata, lasciando una struttura tridimensionale priva di acqua ed è comunemente utilizzato per ottenere *scaffold* di origine naturale. È impiegato, ad esempio, nel processo di decellularizzazione dell'ECM cartilaginea.

Il metodo dell'elettrofilatura consiste nella creazione di fibre polimeriche di diametro regolare ottenute da una soluzione polimerica processata attraverso un campo elettrostatico. Da questo processo vengono ottenute matrici fibrose che mimano la ECM.

Altri metodi prevedono lo stampaggio ad iniezione e la colata di solvente con lisciviazione di particelle. Il primo consiste nell'introduzione di un polimero fuso in uno stampo e raggiungerà la forma desiderata una volta raffreddato, la colata invece prevede la dissoluzione di in polimero in un solvente e l'aggiunta di porogeni.

Negli ultimi anni è emersa una nuova tecnica promettente per la fabbricazione di *scaffold*: la biostampa in 3D. La biostampa in 3D è una tecnologia innovativa che utilizza materiali biologici per creare strutture tridimensionali che imitano i tessuti del corpo umano. Il processo è simile alla tradizionale stampa in 3D, ma con la sostanziale differenza che al posto di materiali plastici viene utilizzato un bioinchiostro che deriva dalla miscelazione di cellule e sostanze di supporto come i polimeri.

La procedura di biostampa inizia con un disegno della geometria di stampa, si parte da una scansione del tessuto del paziente che fungerà da base per la creazione del modello digitale dettagliato con l'utilizzo di un software CAD. Una stampante 3D apposita deposita il bioinchiostro strato su strato per costruire la struttura designata. Infine, il costrutto viene spesso trattato per farlo solidificare e per fargli mantenere la forma utilizzando diverse tecniche di *cross linking* fisico o chimico. L'utilizzo di bioreattori svolge un ruolo importante per l'ottenimento di una rapida maturazione, vascolarizzazione e sopravvivenza del tessuto. Attualmente esistono tre principali tecniche di biostampa:

- A goccioline: offre un elevata risoluzione e migliora la vitalità delle cellule, riducendo le forze di taglio ma presentano dei problemi con i bioinchiostri ad alta viscosità.
- A estrusione: Permette di usare bioinchiostri a diverse consistenze e crea strutture moto robuste, ideali per i tessuti come la cartilagine, ma a scapito di velocità, risoluzione, produttività e vitalità cellulare.
- A luce: Offre una precisione eccellente ma la scelta dei materiali che possono essere utilizzati è limitata e i componenti chimici usati potrebbero rivelarsi tossici per le cellule (5).

2.2 *SCAFFOLD* NATURALI, SINTETICI E IBRIDI

I materiali che compongono gli *scaffold* devono sottostare a determinate condizioni, in primo luogo deve essere garantita la biocompatibilità del materiale con l'ambiente biologico dell'organismo, il materiale non deve degradarsi in composti tossici o infiammatori che possono alterarne l'equilibrio biologico. I biomateriali dovranno essere resistenti dal punto di vista chimico alla temperatura e al pH corporeo e, ovviamente, dovranno possedere adeguate proprietà fisiche per sopportare le sollecitazioni. Studi precedenti in ingegneria tissutale cartilaginea hanno individuato come i polimeri risultino essere dei buoni candidati per la realizzazione di impalcature

2.2.1. Scaffold naturali

Gli *scaffold* costituiti da biomateriali naturali sono molteplici, l'origine del materiale può essere di natura animale o vegetale e questo risulta essere particolarmente vantaggioso dal punto di vista della biocompatibilità e biodegradabilità. Nell'ambito dell'ingegneria tissutale la disponibilità di *scaffold* di origine naturale è vasta e diversificata. La loro applicazione è stata ampiamente investigata in numerosi studi precedenti, si può però affermare che i principali materiali impiegati ricadono nell'utilizzo di matrice extracellulare decellularizzata (dECM) e nei polimeri naturali.

La dECM è ottenuta mediante il metodo di decellularizzazione del tessuto, questa operazione prevede la rimozione del materiale genetico dalle cellule. Le impalcature ottenute promettono risultati significativi che portano ad una corretta rigenerazione

tissutale, il successo di questo approccio è dovuto all'ECM stessa, che imita l'ambiente tissutale naturale favorendo la condrogenesi e la crescita di tessuto neo-cartilagineo.

Il processo di decellularizzazione della CA xenogenica permette di preservare la struttura del collagene. I potenziali vantaggi di questo metodo consentono di ottenere dei campioni di *scaffold* costituiti dall'ossatura originale della cartilagine che conferisce integrità meccanica, architettura tridimensionale naturale, segnali biochimici e biomeccanici, riduzione del rigetto e sviluppo neo-cartilagineo. La rete di collagene è in grado di mantenere l'organizzazione anisotropa e porosa, conferendo resistenza alla trazione e stabilità strutturale al tessuto.

I protocolli di decellularizzazione sono molteplici. Per la decellularizzazione di tessuti come la CA la letteratura presenta molti contributi comuni.

Per ottenere *scaffold*, Luo et al. (10) sono inizialmente partiti da dischi osteocondrali (di diametro 6mm e spessore 10 mm) suini. I campioni sono stati inizialmente sottoposti a due cicli di congelamento e scongelamento in soluzione salina tamponata con fosfato (PSB) per rompere le membrane cellulari meccanicamente, favorendone la fuoriuscita del contenuto cellulare. Il congelamento prevedeva una durata di 3 ore a -85°C e lo scongelamento 1 ora a 37°C. È bene far notare che questa prima fase non elimina la totalità delle cellule e i loro residui ma rende la matrice più permeabile e facilita l'azione dei trattamenti successivi. In seguito, i campioni vengono trattati sia con tampone ipotonico per gonfiare e far scoppiare le cellule sia con additivi quali il ditiotreitolo (DTT), KCl e $MgCl_2$ per rompere i legami proteici della membrana cellulare e gli antigeni cellulari della matrice degradando i legami disolfuro. Successivamente i campioni vengono trattati con il detergente Sodio Dodecil Solfato (SDS) che rompe e solubilizza le membrane lipidiche delle cellule e le rimuove. Detergenti di questo tipo sono ampiamente utilizzati per i processi decellularizzanti; ad esempio, in altri studi consultati è comunemente usato in Triton X-100. Proseguendo con il processo, i campioni vengono trattati con l'enzima ialuronidasi per degradare l'acido ialuronico e i proteoglicani portando ad un aumento della porosità della matrice. Successivamente avviene il trattamento con DNasi e RNasi per rimuovere i residui genetici delle cellule originarie che, in caso non fossero rimossi, comprometterebbero l'immunogenicità dello *scaffold*. Verso la fine del processo viene eseguito un trattamento con NaOH per la digestione delle fibre di collagene più piccole e la sonificazione. Quest'ultimo processo

non è convenzionalmente utilizzato in letteratura e si basa sulla creazione di cavitazioni acustiche dovute alle onde ultrasonografiche ad alta frequenza: si formano e collassano rapidamente microbolle, generando forze meccaniche locali molto intense al fine di aumentare la porosità della matrice. Infine, i passaggi ultimi prevedono lavaggi in PBS e un altro ciclo di congelamento-scongelamento. I campioni vengono poi lasciti rigonfiare in acqua per 6 ore e, in seguito, liofilizzati a -45°C per produrre uno *scaffold* adatto alla conservazione a lungo termine (10).

Il protocollo appena illustrato rappresenta un esempio di decellularizzazione della cartilagine, che prevede fasi di processo ricorrenti in gran parte degli studi che trattano questo argomento. È importante ribadire che non esiste un protocollo unico, ma una varietà di metodi e strategie adatte alla fonte di partenza e all'obbiettivo dello studio. Per una panoramica più ampia dei principali approcci sviluppati negli ultimi anni si rimanda alla *review* di Xia et al. (2) e Nouri Barkestani et al. (11).

La verifica della riuscita del processo di decellularizzazione viene eseguita tramite test immunogenici sugli *scaffold* ottenuti. Solitamente è necessaria la colorazione con ematossilina ed eosina (H&E) per confermare l'eliminazione cellulare. Un ulteriore colorazione con DAPI viene eseguita per confermare l'assenza di residui nucleari.

Secondo quanto riportato da Xia et al. (2), affinché il biomateriale ottenuto possa essere considerato non immunogenico, è necessario che la quantità residua di DNA nella ECM non superi i 50 ng per mg di peso secco e che i frammenti presenti abbiano dimensioni inferiori a 200 coppie di basi. Questi valori vengono generalmente considerati come criteri di riferimento per garantire la completa rimozione del DNA e, di conseguenza, minimizzare il rischio di rigetto del bioimpianto.

Il processo di decellularizzazione include dunque metodi fisici, chimici ed enzimatici per rimuovere al meglio il contenuto cellulare originale. È stato dimostrato che l'impalcatura decellularizzata ideale dovrebbe preservare oltre alla struttura collagenica anche i componenti come i glicosamminoglicani (sGAG), collagene di tipo II (COL2), la laminina e collagene VI. Ad oggi non esiste un metodo selettivo al 100% e quindi i componendi importati come sGAG, COL2 etc., non si preservano completamente perché sono chimicamente e strutturalmente fragili, spesso associati o affini alle cellule stesse. Pertanto, vengono compromessi dai processi necessari per eliminare completamente il materiale cellulare.

In principio si pensava che la matrice decellularizzata del tessuto cartilagineo sarebbe stata la strategia vincente per riparare le lesioni derivate dall'OA. Tuttavia gli studi hanno dimostrato che il tessuto cartilagineo mostra molteplici ostacoli al processo di decellularizzazione. La cartilagine è un tessuto denso e compatto questo impedisce la corretta penetrazione dei reagenti utilizzati nella decellularizzazione, portando ad ottenere uno *scaffold* con pochi pori e causando una minore efficienza di semina delle cellule. Inoltre, permane un alto tasso di resti cellulari derivati dal tessuto per decellularizzato che compromettono l'immunogenicità dello.

Conoscendo queste limitazioni, uno studio prodotto da Nie et al. (12) ha messo a punto una strategia innovativa che unisce i punti di forza dell'ingegneria tissutale con le tecniche di decellularizzazione per creare uno *scaffold* biologico non ottenuto direttamente dalla cartilagine nativa, ma prodotto artificialmente in laboratorio e poi decellularizzato.

Un altro interessante esempio di *scaffold* ottenuto mediante decellularizzazione di ECM riguarda lo studio condotto da Ibsirlioglu et al. (13) che descrive i processi per la realizzazione di un'impalcatura prodotta da tessuto adiposo umano decellularizzato, evidenziando come gli scarti derivati da interventi chirurgici possano essere un importante fonte di cellule e tessuti impiegati nell'ingegneria tissutale. Tale tessuto si è dimostrato facilmente decellularizzabile preservando al massimo i componenti naturali, quindi, una valida alternativa agli *scaffold* in dECM.

In conclusione, i risultati mostrano come impalcature di ECM adiposa umana decellularizzata possieda un microambiente favorevole alla semina e proliferazione cellulare.

Tra i polimeri naturali che vengono impiegati per la realizzazione degli *scaffold* troviamo quelli indicati nella seguente tabella.

Polimero	**Descrizione**
Collagene	È una proteina naturale, principale componente della matrice extracellulare nei tessuti connettivi
Acido ialuronico	Polisaccaride naturale (GAG) presente nella ECM, soprattutto nei tessuti molli e nelle cartilagini
Chitosano	Polisaccaride naturale derivato dalla deacetilazione della chitina
Condroitin solfato	Polisaccaride naturale, presente nella cartilagine, dove contribuisce a resistenza e idratazione.
Fibrina	Proteina naturale che deriva dalla trasformazione del fibrogeno durante la coagulazione

Tab. 2, nella seguente tabella sono riassunti i principali polimeri naturali impiegati nella realizzazione di impalcature per l'ingegneria tissutale.

Questi biomateriali, grazie alla loro origine biologica, presentano caratteristiche particolarmente favorevoli in termini di biocompatibilità, bioattività e capacità di supportare l'adesione e la proliferazione cellulare. Al fine di fare chiarezza, nella letteratura si può individuare un'ulteriore distinzione all'interno degli *scaffold* naturali. Questi possono essere suddivisi in *scaffold* mono-componente, costituiti da un singolo polimero (ad esempio il collagene), e in *scaffold* multi-componente, detti anche naturali compositi, realizzati mediante l'associazione di più biomateriali. I polimeri naturali sono quindi impiegati singolarmente o in combinazione per ottenere strutture porose che imitino più da vicino l'ECM naturale. La scelta del tipo di polimero o della combinazione di polimeri, influenza in modo significativo le proprietà meccaniche, il grado di degradazione e la capacità di promuovere la rigenerazione del tessuto bersaglio.

Precedenti studi hanno esplorato i complessi chitosano-gelatina come potenziali impalcature naturali composite per la riparazione della cartilagine articolare. La gelatina viene ricavata dai peptidi denaturati del collagene, il chitosano viene impiegato in quanto è stato dimostrato che promuove la crescita della cartilagine, Uno studio condotto da Whu et al. (9) si è concentrato sull'analisi di questa tipologia di *scaffold*, proponendo interventi mirati per correggere i difetti riscontrati in studi precedenti. L'impalcatura è stata creata partendo da un film del complesso chitosano-gelatina, la miscela liquida è stata congelata molto rapidamente ed è poi stata posta a liofilizzazione. Dopo la creazione dello *scaffold* hanno utilizzato la carbodiimmide idrosolubile per promuovere la reticolazione della struttura, questo, in aggiunta con studi in vitro e in vivo e le analisi biochimiche e istologiche ha dimostrato come lo scaffold chitosano-gelatina potrebbe essere un potenziale candidato per la rigenerazione della cartilagine articolare.

Un ulteriore approccio è presentato da Nasiri e Mashayekhan (14) che partendo dal tessuto cartilagineo bovino decellularizzato hanno realizzato scaffold ibridi in chitosano-ECM. È stato dimostrato che l'introduzione dell'2% di ECM negli scaffold di chitosano ha portato ad una riduzione della dimensione dei pori, questo ha favorito il miglioramento delle proprietà meccaniche migliorando inoltre il rigonfiamento e il tasso di biodegradazione. Lo *scaffold* è stato fabbricato unendo stabilmente una soluzione omogenea di chitosano all'ECM decellularizzata ridotta in polvere e sottoposta a digestione enzimatica. A seguito della reticolazione, avvenuta con l'utilizzo di agenti reticolanti, la miscela chitosano/ECM è stata congelata e liofilizzata, questa fase è fondamentale poiché grazie al congelamento e alla successiva rimozione del ghiaccio si formano all'interno dello *scaffold* i pori che lo rendono tridimensionale e permeabile. Lo studio ha infine ha dimostrato a seguito delle analisi dei risultati che lo *scaffold* ibrido chitosano/ECM con il 2% di ECM possiede proprietà idonee per essere considerato uno *scaffold* utile per la rigenerazione della cartilagine articolare.

In aggiunta, è stato realizzato da Meng et al. (15) uno *scaffold* composito precedentemente decellularizzato utilizzando una tecnologia innovativa di *micro-pattering* laser (LMPT) per la formazione di pori adatta a modificare la superficie dello *scaffold*. lo studio ha creato un'impalcatura utilizzabile in aree dove le lesioni sono presenti sia a livello cartilagineo sia a livello osseo. La possibilità di modificare la porosità in porzioni diverse dello *scaffold* ha permesso di risolvere lo svantaggio derivato dal fatto

che le impalcature dei due tessuti erano diverse, avere quindi una diversa interfaccia funzionale può consentire selettivamente alle molecole nutritive e di segnalazione di lavorare in sinergia per la riparazione di entrambi i tessuti.

2.2.2 Scaffold Sintetici

Attualmente, sono in corso delle ricerche finalizzate all'ottenimento di *scaffold* derivati da materiali sintetici a causa degli svantaggi dei materiali naturali. Molti polimeri sintetici quali PLA (Poli-lattide), PCL (Policaprolattone) e copolimeri come PLGA (Poli-lattide-co-glicolide) e PLCA (Poli(L-lattide-co-caprolattone)) vengono impiegati comunemente per la produzione di *scaffold* per la rigenerazione della cartilagine. Questi materiarli sono caratterizzati da buone proprietà meccaniche, bidegradabilità e biocompatibilità e possono essere ottenuti più facilmente rispetto ai materiali naturali a causa della loro resistenza alle proprietà fisico-chimiche.

Lo studio di revisione condotto da Wasyłeczko et al. (6) riporta come uno scaffold sintetico nanostrutturato in policaprolattone poroso abbia mostrato migliori risultati in termini di formazione di cartilagine e un miglior punteggio istologico sulla rigenerazione della cartilagine di coniglio.

Un'innovazione sugli *scaffold* sintetici è rappresentata dagli *scaffold* in poliuretano e in poliestere Solfonato. I primi hanno mostrato un elevato carattere idrofilico, porosità e resistenza meccanica. Le impalcature costituite da questo materiale sono più efficaci rispetto alle comuni impalcature in PLA in termini di crescita di condrociti o MSC. Uno studio ha infatti dimostrato come gli *scaffold* in poliuretano consentano una maggiore capacità di differenziazione in cartilagine. Gli *scaffold* in poliestere solfonato (PES) sono un altro esempio di impalcature promettenti, poiché presentano un elevata elasticità, eccellenti proprietà meccaniche e una rete di pori interconnessi.

I polimeri sintetici usati come impalcature si possono modificare per ottenere la forza e la velocità di degradazione desiderate, ciò li porta a essere classificati come materiali facilmente controllabili. Inoltre, hanno un'ottima resistenza meccanica, il che li rende adatti a essere impiegati come *scaffold* per la rigenerazione di parti del corpo che sopportano peso quali le articolazioni. Nonostante i risultati positivi, i polimeri sintetici presentano degli svantaggi. Una delle problematiche più rilevanti riguardano la

degradazione delle impalcature nel corpo. La degradazione può rilasciare sostanze che possono provocare infiammazioni. In alcuni casi il materiale si degrada troppo rapidamente facendo perdere l'integrità strutturale ancor prima che il tessuto si sia formato completamente. Altre problematiche di maggiore rilevanza riscontrate nel coso degli studi rivelano che la mancanza di porosità, dei vari polimeri, ostacola l'attacco cellulare sull'impalcatura. Per ovviare a questo problema i ricercatori hanno cominciato a combinare i materiali sintetici con quelli naturali allo scopo di ottenere il meglio dei due mondi: la forza e il controllo del materiale sintetico, in aggiunta con i segnali biologici necessari per far crescere le cellule e farle diventare cartilagine (5).

2.2.3 Scaffold ibridi

Come anticipato, è possibile ottenere *scaffold* con buone proprietà meccaniche e biologiche combinando i vantaggi dei materiali sintetici con quelli naturali. Le impalcature ibride possono essere molteplici e la ricerca si basa sull'individuazione di quelle più adatte per la rigenerazione tissutale a seconda dell'idoneità del costrutto.

I polimeri sintetici mancano intrinsecamente di interazioni cellulari dirette che sono fondamentali per l'adesione cellulare, segnalazione intracellulare e rimodellamento dell'ECM. Allo scopo di superare questo ostacolo è necessario utilizzare additivi biologicamente attivi che favoriscano il contatto e la comunicazione con le cellule.

Sebbene attualmente, pochi scaffold ibridi sono stati sottoposti a studi clinici, recenti studi continuano ad esplorare varie combinazioni al fine di ottenere impalcature sempre più funzionali per la rigenerazione del tessuto cartilagineo. Ne è un esempio il recente studio di Shahbazi et al (16) Questo lavoro ha esplorato la sintesi, fabbricazione e caratterizzazione di *scaffold* ibridi/compositi in alginato di sodio, *nanoclay* e idrossiapatite.

L'alginato di sodio è un polimero naturale che ha già dimostrato, grazie a studi precedenti, un'eccellente compatibilità cellulare e un tasso di degradazione favorevole, coerente con la crescita dei condrociti. L'idrossiapatite viene utilizzata in quanto è stato dimostrato che aumenta la bioattività negli scaffold e migliora la differenziazione condrogenica delle MSC. Le *nanoclay* sono minerali alluminosilicati è stato dimostrato che sono ottimi materiali per il rilascio controllato di farmaci.

L'utilizzo di componenti inorganici come idrossiapatite e *nanoclay* è stato indagato come strategia per migliorare l'impalcatura in alginato di sodio a fase singola. Il protocollo impiegato per ottenere lo scaffold prevede la combinazione di tre preparazioni inizialmente distinte, dopo di che, alla soluzione polimerica di alginato di sodio è stata aggiunta la soluzione di dispersione di nanoclay (0,01-0,02 g. di *nanoclay*). Successivamente è stata aggiunta la dispersione di idrossiapatite (3,3 mL), la miscela è stata infine omogeneizzata. Per ottenere forma, la miscela è stata versata su stampi cilindrici (1x2 cm) a questo punto i campioni sono stati congelati (-20°C per 24 ore). Infine, i campioni congelati sono stati posti a liofilizzazione, ottenendo così *scaffold* tridimensionali porosi. Al termine dell'operazione le impalcature sono state lavate con acqua deionizzata per rimuovere il calcio in eccesso.

Nello studio è stata utilizzata come *nanoclay* la montmorillonite come rinforzo dell'impalcatura di alginato/idrossiapatite migliorandone le proprietà meccaniche e la rallentandone la degradazione. Inoltre, grazie alle interazioni elettrostatiche con la glucosamina, la presenza della *nanoclay* ha permesso di ottenere un rilascio controllato della molecola stimolando la produzione di sGAG e proteoglicani favorendo la rigenerazione cartilaginea.

I risultati di questo studio dimostrano che l'integrazione di alginato di sodio, idrossiapatite e *nanoclay* ha permesso di ottenere *scaffold* caratterizzati da proprietà meccaniche, biodegradabilità e biocompatibilità ottimali. La porosità rientrava in un intervallo accettabile per le applicazioni di coltura cellulare rendendo questo scaffold un buon candidato per la rigenerazione della cartilagine. Non sono state eseguite analisi sulla coltura cellulare né sull'adesione cellulare.

Oltre allo studio appena presentato, la letteratura riporta numerosi esempi di *scaffold* ibridi utilizzati per la rigenerazione cartilaginea. Principalmente queste impalcature in polimeri sintetici biodegradabili utilizzano membrane porose per ottenere le proprietà meccaniche necessarie per lo sviluppo della crescita tissutale. Gli additivi che vengono utilizzati sono spesso di origine naturale e producono dei segnali bioattivi che aiutano il processo di condrogenesi e mantengono i fenotipi dei condrociti. (6)

2.2.4. Idrogelo come forma di scaffold avanzata

Gli idrogeli iniettabili sono una tecnica innovativa comunemente già molto esplorata in letteratura, sono una classe specifica di *scaffold* ma si differenzia dalle impalcature già sopra citate per composizione, proprietà meccaniche e applicazioni. Gli idrogelo hanno la caratteristica distintiva di essere composti da acqua, trattenuta all'interno di catene polimeriche che li rende morbidi e flessibili. In base alla loro origine è possibile suddividere gli idrogeli in naturali o sintetici. Tra i vari biomateriali utilizzati per la preparazione di idrogeli iniettabili troviamo: chitosano, collagene, alginato, fibrina, PLGA, PMMA, PLC. condroitin solfato e acido ialuronico. Fondamentalmente gli idrogeli iniettabili rappresentano una classe avanzata di scaffold, caratterizzati dalla capacità di passare dallo stato libido ad uno stato solido, denominata gelificazione in situ, una volta iniettati nel sito della lesione. Secondo la revisione di Ghandforoushan et al. (17) vengono impiegati diversi metodi di gelificazione: modalità fisiche basate su forze secondarie e proprietà sensibili a stimoli come temperatura, pH e ioni. Il vantaggio dei sistemi iniettabili risiede nel fatto che sono minimamente invasivi e consentono una distribuzione omogenea di cellule staminali, fattori di crescita e molecole terapeutiche direttamente sulla sede del danno, promuovendo i processi di migrazione cellulare e condrogenesi. Inoltre grazie alla loro versatilità questi scaffold possono essere adattati in termini di proprietà biomeccaniche, degradabilità, citocompatibilità e rilascio controllato di agenti bioattivi. Nonostante i notevoli sviluppi al momento non esistono idrogeli iniettabili "ideali" e restano dei dubbi sulla sicurezza a lungo termine, alla regolazione precisa della formazione del gel in vivo e alla valida traduzione in applicazioni medico-cliniche. Ciò nonostante, gli idrogeli rappresentano un approccio multifunzionale per la rigenerazione cartilaginea, offrendo un ambiente adatto e potenzialmente più efficace rispetto agli interventi invasivi finora utilizzati. (5)

2.3 PROSPETTIVE FUTURE PER LA CREAZIONE DI SCAFFOLD, IL BIOPRINTING QUADRIDIMENSIONALE.

Recentemente è emersa come nuova tecnica di nuova generazione per l'ingegneria tissutale l'utilizzo del bioprinting in 4D. questa tecnica integra il concetto di tempo con il bioprinting in 3D. l'idea che sta alla base di questa tecnologia consiste nel creare strutture biologiche in grado di cambiare forma o funzione nel tempo in risposta a specifici stimoli ambientali quali: temperatura, umidità, sostanze chimiche e tensione elettrica. Quando una struttura stampata in 4D viene esposta ad uno di questi stimoli va incontro a una trasformazione, modificando la sua forma e la sua funzione. I principali vantaggi del bioprinting 4D includono: la creazione di strutture complesse che sarebbero difficili da realizzare con le sole tecniche 3D; modelli personalizzati, utili per la medicina rigenerativa per la realizzazione di supporti personalizzati sui pazienti; matrici dinamiche, rende possibile la stimolazione e la differenziazione di cellule staminali in tessuti specifici creando costrutti in grado di maturare nel tempo.

Allo stato attuale le sfide principali nel bioprinting 4D sono la scelta del materiale, generalmente idrogeli che devono essere contemporaneamente biocompatibili, biodegradabili e reattivi agli stimoli. Attualmente sono in fase di studio materiali come gelatina, alginato e acido ialuronico. Infine, l'ultimo ostacolo riguarda il controllo di stampa a livello microscopico e l'allineamento cellulare durante la maturazione del tessuto. (5)

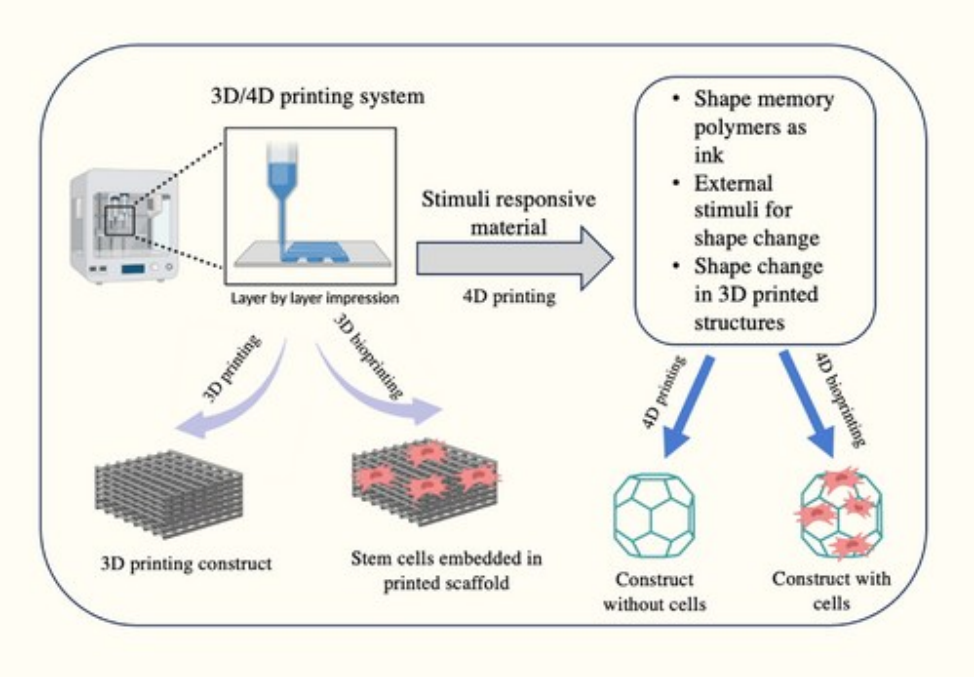

Fig. 2.1 Schema per la biostampa 3D e 4D impiegata nell'ingegneria tissutale. (riprodotto da (5). Con permesso di Jonh Wiley & Sons.)

III CAPITOLO:
CELLULE PER LA RICELLULARIZZAZIONE DELLA CARTILAGINE

Dopo aver analizzato nel dettaglio le diverse tipologie di scaffold utilizzati nella ricostruzione cartilaginea, risulta ora fondamentale approfondire un altro elemento chiave dell'ingegneria tissutale: le cellule destinate alla ricellularizzazione delle impalcature.
La procedura di ricellularizzazione prevede la semina e coltivazione in vitro di cellule con potenziale condrogenico, le quali possono già essere differenziate in condrociti o progenitrici capaci di differenziarsi o derivate da popolazioni di cellule staminali, con l'obiettivo di ottenere un bioimpianto trapiantabile in grado di risanare le lesioni dell'AC causate da OA. In base allo *scaffold*, alla sua morfologia e alla sua composizione variano i metodi di ricellularizzazione e il tipo di cellule impiegate.
Per la ricellularizzazione, in generale, è necessario un elevato quantitativo di cellule, e nell'ingegneria tissutale cartilaginea le cellule maggiormente studiate sono i condrociti, le cellule staminali mesenchimali (MSC) e le cellule staminali pluripotenti (iPCS).
In questo capitolo sono analizzate queste cellule secondo quanto riportato nella letteratura.

3.1. CONDROCITI: FONTI, POTENZIALITÀ, VANTAGGI E LIMITAZIONI

L'utilizzo di condrociti è stato ampiamente studiato per la rigenerazione dell'ingegneria tissutale cartilaginea. Queste cellule rappresentato la scelta fisiologica più diretta, poiché sono in grado di sintetizzare i principali componenti dell'ECM quali collagene di tipo II e proteoglicani. I condrociti posso essere isolati dalla cartilagine preleva dal paziente stesso e, in questo caso, si parla di condrociti autologhi.

L'utilizzo dei condrociti autologhi può essere usato fin dalle fasi iniziali dalla comparsa delle lesioni attribuite all'OA. Come riportato nel primo capitolo, le lesioni vengono classificate in gradi in base all'estensione e alla profondità, per lesioni focali di piccola o media dimensione uno studio condotto da Fares et al.(1), ha prodotto una

revisione sistematica degli studi clinici riguardanti il trapianto autologo di condrociti per il trattamento delle lesioni dovute all'OA. Il processo prevede la coltivazione in vitro dei condrociti sani prelevati dal paziente che vengono trapiantati nell'articolazione affetta da OA senza l'utilizzo dello *scaffold*.

I condrociti utilizzati nell'impianto di condrociti autologhi (ACI) vengono inizialmente prelevati dal paziente da una zona non portante dell'articolazione e isolati dalla matrice circostante preservando la placca subcondrale, successivamente vengono espansi in coltura bidimensionale per aumentare il numero di cellule e, infine, vengono trapiantati nella lesione.

Quest'ultima operazione consente di avere un numero sufficiente di condrociti che possono essere seminati su uno *scaffold* tridimensionale, il quale viene mantenuto in coltura tridimensionale per favorire la distribuzione uniforme delle cellule nell'impalcatura, stimolare la produzione di ECM al fine di ottenere un bioimpianto trapiantabile sul sito del difetto, nell'ingegneria tissutale questa procedura prende il nome di *matrix-induced autologous chondrocyte impiantation* (MACI). (18)

Tuttavia è stato rivelato che l'impianto di condrociti autologhi aumenta il rischio di morbilità sul sito donatore da cui i condrociti vengono prelevati, alterando la biomeccanica dell'articolazione con il conseguente rischio che si sviluppi l'OA. Inoltre, per il riempimento del difetto è necessario un elevato numero di cellule (10^6 cellule/cm^2 di difetto), ma la cartilagine nativa prelevata dai pazienti presenta una bassa concentrazione di condrociti (12-16 milioni di cellule/g di tessuto). Questo problema non può considerarsi risolto con l'espansione con coltura 2D poiché presenta una criticità ben documentata. Durante la fase di espansione in monostrato *in vitro*, i condrociti tendono ad assumere una morfologia affusolata che li porta a dedifferenziazione, questo fenomeno verte su una perdita progressiva da parte dei condrociti di produrre ECM tipica della cartilagine articolare, ricca di collagene di tipo II e proteoglicani, e porta invece alla sintesi prevalente di collagene di tipo I con la conseguente formazione di tessuto fibrocartilagineo, meccanicamente e biologicamente inferiore rispetto alla cartilagine ialina desiderata.

L'impianto di condrociti autologhi (ACI) non è una procedura inefficace. Secondo una revisione di Huang et al. (7) diverse soluzioni cliniche si basano sull'integrazione di condrociti autologhi espansi, *scaffold* biocompatibili stimoli biochimici e biomeccanici

mirati. Il processo tipico prevede in principio l'isolamento e la limitata espansione in coltura 2D dei condrociti autologhi con successiva semina si *scaffold* tridimensionali. I passaggi successivi prevedono la maturazione in ambiente 3D e l'ulteriore differenziazione dei condrociti con la ripresa della sintesi di collagene di tipo II.

Negli studi clinici riportati, questi bioimpianti hanno dimostrato maggiori risultati rispetto alle tecniche tradizionali in termini di produzione di tessuto ialino e integrazione con il tessuto nativo, sottolineando così la possibilità di utilizzare bioimpianti a base di condrociti autologhi. Ciononostante persistono alcune criticità legate alla dedifferenziazione cellulare e alla limitata disponibilità del tessuto donatore. L'esperienza sviluppata con l'ingegneria tissutale basata sui condrociti ha però permesso di comprendere meglio l'importanza dell'ambiente 3D degli *scaffold* e degli stimoli meccanici per mantenere il fenotipo condrogenico. Su queste basi, l'attenzione dei ricercatori si è spostata negli ultimi anni verso l'utilizzo delle cellule staminali considerate una risorsa più versatile e promettente per la rigenerazione della cartilagine.

3.2. CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

Tra le cellule staminali che sono all'attenzione dei ricercatori vi sono le cellule staminali mesenchimali (MSC), dotate di un elevato potenziale proliferativo e in grado di subire la condrogenesi, un processo biologico attraverso il quale le cellule staminali si differenziano in condroblasti. Queste cellule sono attualmente considerate come una promettente fonte cellulare.

3.2.1 fonti

Le MSC umane prima di essere impiegate per la creazione e riparazione del tessuto cartilagineo devono seguire una serie di procedure. Uno studio di Lam et al.(19) fornisce una revisione che descrive nel dettaglio questi processi. Inizialmente per ottenere le MSC è necessario isolarle dai tessuti che in origine le contengo quali: midollo osseo, sangue del cordone ombelicale o tessuto adiposo provenienti da scarti chirurgici. (13)

I criteri utilizzati in laboratorio per identificare e isolare le MSC è tuttora oggetto di sviluppo, poiché è difficile identificarle in modo unico a causa della mancanza di marcatori specifici e morfologici dovuti dai passaggi e dalle condizioni di coltura delle

cellule. L'International Society for Cellular Therapy (ISCT), nel 2006, ha dunque posto rimedio al problema indicando dei requisiti minimi per l'identificazione delle MSC.(20)

Il primo requisito è dato dalla presenza dei marcatori, cioè antigeni di superficie cellulare che fungono da "etichette" molecolari se questi marcatori sono presenti si dicono marcatori positivi quindi le MSC presenteranno questo tipo di marcatori mentre saranno sprovviste di altri antigeni tipici di cellule diverse (marcatori negativi). Secondo ISCT e Lam et al. è necessario che le MSC siano caratterizzate dall'espressione degli antigeni di CD73, CD90, CD105, CD 29 e CD44. Per ottenere MSC dal midollo osseo si procede in primo luogo con una centrifugazione a gradiente di densità sull'aspirato di midollo osseo che consente di ottenere un campione centrifugato al cui interno led cellule si presentano in strati separati in base alla loro densità. Ciò consente di ottenere la frazione mononucleare che contiene al suo interno le MSC d'interesse. Come secondo passaggio si procede al risciacquo con l'applicazione di PBS sterile per lavare via il più possibile le cellule emopoietiche contaminanti e i residui della soluzione gradiente, infine le cellule vengono seminate in una piastra di plastica aderente, che rappresenta una capsula di coltura, per ottenere la crescita delle cellule MSC e rimuovere le cellule non aderenti con ulteriori lavaggi. Il terreno di coltura dovrà emulare alcune proprietà di adesione della matrice extracellulare per consentire alle integrine contenute nella membrana cellulare delle MSC di aderire alla superficie plastica sfruttando il secondo criterio minimo stabilito dall'ISCT dell'aderenza plastica delle MSC (19)

Il metodo per ricavare le cellule staminali appena descritto non è universale; infatti, esso funziona esclusivamente per l'isolamento delle MSC da midollo osseo e risulta necessario cambiare l'approccio di isolamento a seconda del tessuto utilizzato.

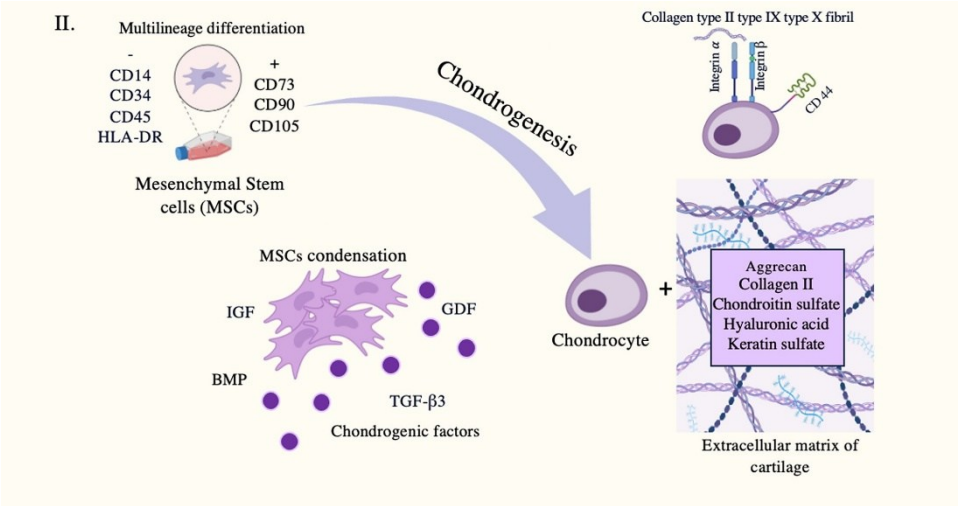

fig. 3.1. processo di condrogenesi delle MSCs, incluso il coinvolgimento di diversi fattori di crescita. (riprodotto da (5) Con permesso di Jonh Wiley & Sons.)

Uno studio condotto da Isbsirlioglu et al.(13), descrive l'isolamento delle MSC dal tessuto adiposo umano proveniente da normali scarti derivati dalle operazioni chirurgiche. Inizialmente il tessuto estratto è stato trattato lavandolo con abbondante PBS sterile al fine di rimuovere i componenti fibrosi e il sangue. Successivamente il tessuto è stato sezionato in porzioni più piccole per poi essere digerito enzimaticamente in collagenasi di tipo I per liberare le cellule dalla matrice extracellulare. La digestione viene poi fermata e le sospensioni tissutali vengono centrifugate a gradiente di densità per poi rimuovere lo strato di olio e grasso e lo strato di soluzione collagenasi tramite l'ausilio di una micropipetta. Il materiale rimanente nella provetta si nota presentarsi in due strati, lo strato superiore contenente materiale di matrice non digerito e nello strato inferiore troviamo il pallet cellulare dal quale otteniamo le cellule di nostro interesse.

Il pallet cellulare contiene diverse popolazioni di cellule; è utile quindi procedere alla rimozione delle unità biologiche che possono provocare interferenze nelle fasi successive. Il pallet viene inizialmente trattato con un tampone di lisi, una tecnica di laboratorio che consente rompere selettivamente gli eritrociti senza arrecare danno alle altre cellule presenti. La miscela viene poi centrifugata per permettere la separazione delle cellule intatte (più pesanti) dai residui degli eritrociti. Infine gli ultimi passaggi prevedono la risospensione delle cellule in terreno di coltura specifico e la filtrazione delle stesse per rimuovere gli eventuali frammenti di tessuto non digerito che potrebbero essere presenti. Il passaggio finale prevede il piastramento delle cellule, vale a dire la semina delle stesse

in fiasche di coltura, da questo momento i passaggi per l'ottenimento delle MSC è analogo a quello descritto per il tessuto del midollo osseo.

3.2.2 Piattaforme di coltura per l'espansione delle MSC: I bioreattori

Come detto in precedenza, una volta isolate, le MSC dovranno essere fatte proliferare per ottenerne in numero sufficiente affinché possano essere impiegate per la terapia di rigenerazione della cartilagine. Uno dei metodi per la produzione in larga scala delle MSC prevede l'utilizzo di bioreattori dinamici, sistemi progettati per fornire un ambiente dinamico e ottimizzato. I reattori più utilizzati sono di due tipi: i bioreattori a ricircolo del mezzo e i bioreattori basati su *microcarrier* sospesi.

I bioreattori a ricircolo si basano sul principio di far circolare continuamente il terreno di coltura attraverso un substrato di cellule fissate a dei supporti. In particolare il termine ricircolo si riferisce al processo in cui il mezzo di coltura viene costantemente prelevato da una sezione del bioreattore che può essere parzialmente o totalmente rinnovato e reintrodotto creando un flusso continuo. Vengono poi combinate per la proliferazione sia le funzionalità di un sistema 2D che quelle del 3D. In questo sistema il terreno di coltura è in movimento con temperatura, pH e ossigeno disciolto tenuti sotto controllo, rendendoli favorevoli per la proliferazione delle cellule e simili all'ambiente biologico. Lo sviluppo cellulare inizialmente è monostratificato e allo svilupparsi dell'espansione si genera una coltura tridimensionale multistrato. Comunemente tra i bioreattori a ricircolo più utilizzati troviamo quelli indicati nella seguente tabella.

Tabella 3.1. Tipi di bioreattori per l'espansione delle MSC

Tipo di Bioreattore dinamico a ricircolo	**Resa cellulare per ciclo**
Bioreattore a multipiastra	$\sim 5 \times 10^{8}$
Bioreattore a letto fisso	$100–1000 \times 10^{9}$
Bioreattore a fibra cava	$1–4 \times 10^{8}$

Nota: adattata da i concetti espressi da (19)

Come seconda tipologia di bioreattori maggiormente impiegati per l'espansione delle cellule staminali mesenchimali troviamo i bioreattori sospesi, anche noti come

sistemi agitati basati su *microcarrier*. Le MSC essendo cellule aderenti si attaccano a piccole sfere o particelle chiamate microcarrier che sono progettate per fornire una vasta superficie di adesione per le cellule. Per permettere la sospensione all'interno del bioreattore microcarrier sono mantenuti in sospensione tramite l'agitazione controllata del terreno di coltura.

L'adesione cellulare è promossa da elementi come biomateriali biocompatibili, generalmente polimeri ai quali vengono applicati dei materiali di rivestimento superficiale, ad esempio proteine e peptidi dell'ECM che promuovono ulteriormente l'adesione e la crescita cellulare. Le cellule isolate vengono seminate a una densità di 4 cellule ogni microcarrier per poi svilupparsi creando uno monostrato di matrice extracellulare in grado di raggiungere una densità di 30-50 cellule per biglia in pochi giorni. Tra i vantaggi che offrono questo tipo di bioreattori troviamo i bassi costi di lavoro, la regolazione della superficie della coltura cellulare andando a modificare il quantitativo di microcarrier e il fatto che sia l'espansione che la differenziazione cellulare avviene nello stesso vaso. Questo sistema porta ad una produzione che si basa su un range di 500-5000 $\times 10^9$ cellule per un bioreattore da 1000 L.

La capacità di proliferazione dei bioreattori a *microcarrier* in sospensione presenta una notevole fonte di cellule per l'ingegneria tissutale. Tuttavia, sono state riscontrate delle problematiche riguardanti la raccolta e la rimozione dei *microcarrier* dai prodotti cellulari. Studi recenti suggeriscono la possibilità di utilizzare *carrier* in poli-caprolattone così da permettere la proliferazione cellulare su *microcarrier* biodegradabili e sfruttare la capacita di espansione e differenziazione all'interno dei bioreattori di sospensione per ottenere fin da subito un bioimpianto da trapiantare direttamente nel sito del difetto. (19) (5)

3.2.3 Condrogenesi guidata in vitro: modulazione biochimica e meccanica delle MSC

Dopo l'espansione le MSC non possono essere in grado di riparare e generare tessuto neo-cartilagineo. Il processo della differenziazione condrogenica delle MSC è un passaggio cruciale attraverso il quale le MSC si specializzano in condrociti attraverso l'esposizione delle cellule ad un ambiente specifico, sia biochimico che meccanico. Come accennato in precedenza, l'utilizzo di bioreattori con *microcarrier* in sospensione

permette sia l'espansione delle MSC sia la loro differenziazione in condrociti, garantendo una resa più elevata di cellule grazie allo sviluppo controllato della differenziazione.

Le cellule staminali sono caratterizzate da un basso livello di differenziamento e possiedono la capacità di generare diversi tipi cellulari. Tale proprietà deriva dalla plasticità del loro genoma ed è influenzata dall'ambiente circostante, definito "nicchia staminale", che ne modula il comportamento. (30)

Dal punto di vista biochimico i fattori di differenziazione che vengono aggiunti al terreno di coltura sono tipicamente: l'induttore TGF-β che induce la condrogenesi, BMP proteine morfologiche ossee insieme al DEX (ormone steroideo desametasone) supportano la sintesi dell'ECM e promuovono la condrogenesi , il fattore di crescita dei fibroblasti 2 e 18 (FGF-2, FGF-18) che modula la proliferazione e la differenziazione nello sviluppo dei progenitori mesenchimali e infine il IGF-1 (fattore di crescita insulino-simile 1). Per mantenere la condrogenesi si utilizzano fattori di trascrizione SOX in particolare SOX-9 essenziale per mantenere la condrogenesi. Il SOX-9 è marker chiave per monitorare la corretta condrogenesi delle MSC poiché attiva i geni dell'ECM come il COL2A1 (collagene di tipo II) o ACAN (aggrecano) e per il mantenimento del fenotipo condrocitico, stabilizzandolo. In contemporanea impedisce l'ipertrofia condrocitaria e la transizione verso la differenziazione in osteoblasti attraverso la soppressione dell'espressione di geni ipertrofici quali COL10A1 (collagene di tipo X), MMP13 (enzima metalloproteinasi 13) e RUNX2 (proteina fattore di trascrizione per il differenziamento in osteoblasti). Com'è dimostrato l'utilizzo del TGF-β svolge un ruolo essenziale nel mantenimento del fenotipo condrogenico stabile, inibendo la maturazione ipertrofica dei condrociti e contrastando i marcatori come COL10A1. Al contrario, la segnalazione BMP, anche se inizialmente favorisce l'attivazione condrogenica, successivamente promuove la transizione verso l'ipertrofia, sostenendo l'attività della RUNX2 e la progressione verso la differenziazione in osteoblasti. Pertanto, l'effetto dei delle vie di TFG-β e BMP sulla così detta maturazione dei condrociti dipende dal contesto biologico. (20) (21)

L'utilizzo di bioreattori a sospensione con *microcarrier* possono in parte risolvere questo ostacolo grazie al continuo controllo dei fattori di crescita, modulando finemente TGF-β e BMP si è in grado di favorire una condrogenesi stabile. (19)

Oltre ai fattori biochimici, anche i fattori meccanici forniscono un importante contributo per il mantenimento e la progressione della condrogenesi. Generalmente tali stimoli si applicano quasi esclusivamente su modelli 3D, in particolare su *scaffold* tridimensionali seminati con cellule MSC. Uno studio condotto da O'Conor et al.(22) ha dimostrato che una sollecitazione di compressione applicata sui modelli 3D promuove la condrogenesi e permette di sintetizzare tessuto neo-cartilagineo. Lo studio esplora anche come i bioreattori avanzati, come quelli a *microcarrier* in sospensione o multifattoriali, rappresentano una strategia avanzata per l'applicazione degli stimoli meccanici usati per la differenziazione condrogenica delle MSC. Tale strumentazione consente l'applicazione controllata di stimoli dinamici affini all'ambiente articolare fisiologico, tra cui le forze di taglio, che se applicata a bassa intensità promuove l'espressione del SOX-9 e la sintesi di ECM. Altri stimoli sono rappresentati dalla compressione dinamica indotta delle collisioni da agitazione ciclica oppure dalle collisioni tra i *microcarrier*. Combinando tra loro questi stimoli si è dimostrato che aumenta ulteriormente la sintetizzazione di COL2A1 e ACAN, promuovendo il contenuto di GAG e portando ad una distribuzione più uniforme delle proprietà tensili nello *scaffold*.

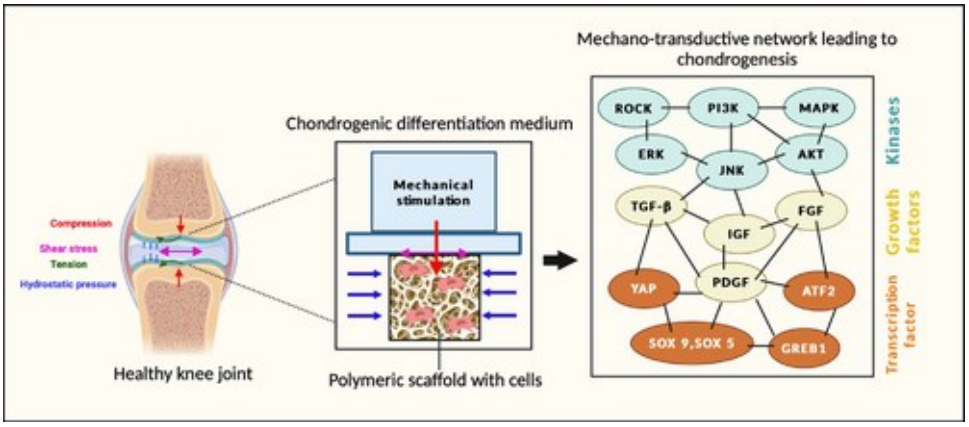

fig. 3.2. Rappresentazione schematica dei percorsi di meccano-trasduzione coinvolti nella rigenerazione della cartilagine articolare. (riprodotto da (5). Con permesso di Jonh Wiley & Sons.)

3.2.4 Limiti attuali e potenzialità future delle MSC nella rigenerazione cartilaginea

Sebbene le cellule staminali mesenchimali rappresentano una promettente risorsa per la rigenerazione della cartilagine articolare, il loro impiego clinico su larga scala è ancora oggetto di studio. I problemi che vengono osservati generalmente riguardano un

differenziamento non sempre stabile, che può portare al rischio che le cellule progrediscano verso un fenotipo ipertrofico, che può provocare mineralizzazione e degradazione del tessuto. Un ulteriore problema sussiste nella fonte a cui si attinge per isolare le MSC progenitrici che verranno successivamente espanse. È stato verificato che le MSC provenienti dal midollo osseo sono le migliori candidate da utilizzare nella terapia di riparazione cartilaginea. Tuttavia, altri fattori quali l'età, il metabolismo e le condizioni cliniche del donatore, possono influire negativamente sulle proprietà proliferative e differenziative. Studi clinici e preclinici sono tuttora contrastanti tra loro; in alcuni casi si nota un miglioramento sull'articolazione trattata, ma i casi che riportano la formazione di cartilagine ialina stabile sono rari e nella maggior parte dei casi prevale la rigenerazione di tessuto fibrocartilagineo anche se la combinazione simbiotica scaffold/MSC sta sempre più portando risultati promettenti. (19) (20) (23)

3.3. CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI INDOTTE: FONTI E POTENZIALITÀ

In continuità con gli sforzi volti a identificare cellule capaci di rigenerare efficacemente la cartilagine, gli studi hanno preso in considerazione l'impiego delle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) scoperte nel 2006 da un gruppo di ricercatori giapponesi diretto da Shinya Yamanaka (Nobel per la Medicina nel 2012). Queste cellule si comportano in modo simile alle cellule staminali embrionali (ESC) ed è stato dimostrato che possono differenziarsi in tutti e tre i tipi di foglietto embrionale, cioè si intende che possono generare qualsiasi tipo di cellula del corpo umano, perché hanno una pluripotenza simile alle ESC. Questa scoperta ha permesso di incentivare la differenziazione delle iPSC umane in condrociti, e di studiarne la capacità di sostituzione per la riparazione della cartilagine articolare.

Negli ultimi anni numerose ricerche hanno esaminato le potenzialità delle cellule PSC (cellule staminali pluripotenti) come le iPSC per generare cellule progenitrici cartilaginee. La differenziazione delle PSC verso fenotipi mesenchimali simili alle MSC è stata avviata passando attraverso una transizione epitelio-mesenchimale e stimolata con fattori di crescita seguendo le stesse indicazioni descritte in precedenza. Tuttavia le MSC ottenute da PSC hanno portato a risultati poco soddisfacenti riguardo la generazione dei condrociti. Ulteriori ricerche hanno portato allo studio delle MSC derivate da iPSC con

l'idea di ottenere MSC simili a quelle isolate dai tessuti. È stato evidenziato come le MSC derivate da iPSC risultano essere meno sensibili ai protocolli condrogenici standard. I ricercatori hanno quindi messo in discussione il fatto che seguire solo i criteri stabiliti dall'ISCT per la definizione delle MSC basti per dire che le MSC derivate da iPSC siano davvero equivalenti a quelle naturali. Nonostante ciò emergono indicazioni promettenti secondo cui le iPSC sembrano possedere un vantaggio epigenico, riducendo la propensione all'ipertrofia consentendo quindi di risolvere uno dei principali problemi che affliggevano l'utilizzo delle MSC per la rigenerazione della cartilagine ialina discusso nei paragrafi precedenti. Il motivo, secondo i ricercatori è stato attribuito a un diverso profilo di metilazione del DNA, in particolare sul gene COL10A1, meno attivo nelle cellule da iPSC. Tuttavia, resta incerto se queste proprietà si traducano in una maggiore rigenerazione *in vivo*. In ultima analisi, tali caratteristiche rendono le iPSC una fonte più accessibile, in linea teorica, alle MSC adulte derivate da tessuti, risulta necessario però lo sviluppo di protocolli più sofisticati per ottenere progenitori efficaci e validati clinicamente. (21)

3.3.1 Isolamento e ottenimento dei condroprogenitori per la rigenerazione cartilaginea

Il processo finalizzato per ottenere condroprogenitori umani è complesso. In uno studio pubblicato da Adkar et al. (23)viene presentato un protocollo graduale di differenziazione con protagonisti tre linee cellulari di hiPSC (cellule staminali pluripotenti indotte umane) derivate da fibroblasti. Il processo di differenziazione prevede la messa in coltura delle hiPSC all'interno di un terreno di differenziazione mesodermica. Il processo prevede un arco di tempo pari a 21 giorni per ottenere le cellule di condroprogenitori. Una volta ottenuti il terreno di coltura è stato diluito per dissociarlo dalle cellule che sono state a loro volta raccolte e centrifugate seguendo un processo simile a quello descritto in precedenza sulla differenziazione delle MSC. A seguito della centrifugazione le cellule condroprogenitrici sono state nuovamente risospese in terreno condrogenico con l'aggiunta di stimolanti quali il TGF-β3 e BMP-2 che come per le MSC, favoriscono l'espansione cellulare e attivano elementi come SOX-9, COL2A1 e ACAN fondamentali per la formazione e il mantenimento di ECM cartilaginea. Le cellule sono state poi pallettizzate per la maturazione tridimensionale per rafforzare il fenotipo

condrocitico contrastando i marcatori ipertrofici del COL10A1 e RUNX2. A sostegno di questo processo l'analisi condotta dai ricercatori ha evidenziato come dopo la differenziazione le hiPSC iniziali non esprimevano più i marcatori di pluripotenza tipici delle iPSC ma presentavano, seppur non totalmente, altri marcatori più vicini a quelli delle cellule mesenchimali associati alle cellule progenitrici della cartilagine. Dalla coltura in pallet 3D è stato osservato come il SOX-9 e il COL2A1 siano molti aumentati sin dalle fasi iniziali suggerendo che il COL2A1 è un buon marcatore precoce per identificare se le cellule si stanno differenziando correttamente; inoltre, l'analisi dell'espressione genica al 14esimo giorno ha evidenziato la comparsa dell'ACAN. Tuttavia, l'analisi del 28esimo giorno ha rilevato la presenza di COL10A1 e COL1A1 indicando la necessità di maggior controllo della maturazione. Dal 28esimo giorno l'analisi istologica ha mostrato un elevata produzione di proteoglicani e la presenza di condrociti nella matrice.

3.3.2 Riparazione dei difetti cartilaginei: approcci in vitro e sfide immunologiche in vivo

La riparazione del danno dell'OA con CA mediata da cellule staminali pluripotenti utilizza complessi di cellule-*scaffold* oppure approcci senza *scaffold*. Come riportato dalla revisione redatta da Guzzo & O'Sullivan (21) studi recenti, condotti su cavie da laboratorio, hanno promosso l'utilizzo di *scaffold* in idrogeli di alginato seminati con cellule di iPSC condro-indotte mediate dal fattore di crescita trasformante TGF-β3 per la riparazione di difetti focali derivati dall'OA. È stata testata una tecnica sperimentale che ha portato al ripristino superficiale della CA il 12 settimane, fornendo una buona base di partenza in vista di studi su una rigenerazione completa.

Cellule iPSC condro-indotte sono state trapiantate *in vivo* all'interno di difetti cartilaginei mostrando dopo 12 settimane una forte espressione di COL2A1 e un mantenimento del fenotipo della struttura della cartilagine ialina. In particolare le hiPSC hanno potato a risultati promettenti nella riparazione dei difetti cartilaginei su maialini nani a 4 settimane dall'impianto. Tuttavia, la revisione ribadisce la necessità di ulteriori studi atti ad esplorare questi approcci innovativi; questo perché è stato osservato che l'impianto di iPSC differenziate in condrociti pur mostrando una certa capacità di rigenerazione possono comportare rischi importanti come la formazione di teratomi e di

conseguenza, lo sviluppo di tumori. Il motivo è causato da cellule iPSC non differenziate correttamente. Questo succede con più probabilità in un impianto *in vivo*, poiché *in vitro* il bioimpianto può essere mantenuto sotto stretto controllo, riducendo il rischio di proliferazione incontrollata di cellule non completamente differenziate (21) (23).

3.3.3 Approcci futuri: selezione genetica dei condroprogenitori mediante CRISPR-Cas9

Uno degli approcci più promettenti per migliorare la sicurezza e l'efficacia delle iPSC viene proposto nel lavoro di Adkar et al. (23). Tale studio prevede la purificazione selettiva dei condroprogenitori mediante tecniche di *editing* del genoma CRISPR-Cas9. Gli autori hanno sviluppato un sistema innovativo che combina un protocollo *step-wise* per introdurre la condrogenesi delle hiPSC con l'integrazione di un gene *reporter* fluorescente definito eGFP nel sito genico responsabile dell'espressione di COL2A1 specifico della cartilagine. Questo ha permesso di isolare in maniera efficiente le cellule che avevano attivato il programma condrogenico, migliorando la purezza della popolazione finale. È stato riportato che l'inserimento del *reporter* non ha influenzato la funzionalità del gene *target* e ha consentito ai ricercatori di monitorare in tempo reale l'espressione genica durante la differenziazione cellulare. Questa strategia ridurrebbe dunque il rischio di contaminazione da cellule non differenziate pluripotenti e non solo, potrebbe dare inizio a dei protocolli standard e riproducibili che attualmente mancano. Combinare quindi l'*editing* genetico con le già precedenti stimolazioni biochimiche e meccaniche potrebbe rivelarsi un ulteriore passo avanti per la maturazione e la funzionalità dei condrociti ottenuti da iPSC.

3.4. CONSIDERAZIONI FINALI

Le cellule staminali mesenchimali (MSC) e le cellule pluripotenti indotte (iPSC) rappresentano due tra le principali famiglie cellulari investigate nel contesto della rigenerazione cartilaginea e del trattamento dei difetti articolari, come l'OA. Entrambe le linee cellulari hanno mostrato potenzialità rilevanti nel differenziarsi in condrociti. Tuttavia, come evidenziato nei paragrafi precedenti, si tratta di approcci che presentano caratteristiche biologiche, limiti applicativi e potenzialità terapeutiche differenti.

Le MSC sono da tempo considerate una risorsa accessibile e relativamente sicura grazie alla loro immunomodulazione naturale e alla facilità di isolamento da diversi tessuti adulti. Le iPSC, d'altro canto, offrono un grado di plasticità superiore e un potenziale teoricamente illimitato, ma sono ancora oggetto di studio per quanto riguarda la sicurezza e la standardizzazione dei protocolli di differenziazione.

Visti i numerosi elementi in gioco appare evidente la necessità di un confronto critico tra queste due strategie. Tale confronto verrà approfondito nel capitolo dedicato alla discussione, con l'obbiettivo di individuare, ad oggi, quale linea cellulare offra le prospettive future più concrete per l'applicazione clinica nella cura della cartilagine articolare.

IV CAPITOLO: METODI E PROCESSI PER LA RICELLULARIZZAZIONE DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE

Quanto è stato descritto nei capitoli precedenti ci fornisce gli strumenti con cui trattare il processo della ricellularizzazione. Esso rappresenta una fase cruciale che trasforma uno *scaffold* inizialmente privo di funzioni biologiche, in una matrice capace di sostenere la formazione di nuova cartilagine articolare. Definire il metodo della ricellularizzazione significa comprendere le migliori strategie che possono essere utilizzate per seminare e mantenere le cellule sulle impalcature favorendone l'adesione, proliferazione e differenziazione.

Gli studi dei ricercatori hanno esplorato la possibilità di ricellularizzare i tessuti più semplici, come la cartilagine articolare. Trattandosi di un tessuto avascolare, aneuro e privo di una componente cellulare complessa il metodo della ricellularizzazione ha mostrato risultati incoraggianti sia *in vitro* che *in vivo*. Gli studi hanno evidenziato una buona adesione, proliferazione e differenziazione con potenziale applicativo per la riparazione dei difetti cartilaginei derivanti dall'OA. Grazie a queste caratteristiche i risultati suggeriscono che, sebbene la strada verso la ricellularizzazione completa di un organo sia ancora lunga, per tessuti più semplici rappresenta una strategia applicabile già da oggi.

Infine, il metodo di ricellularizzazione non ha un protocollo standard a causa dei metodi che variano in funzione del tipo di *scaffold* e delle cellule usate. I protocolli che sono descritti nella letteratura scientifica sono spesso influenzati da queste differenze portando all'impossibilità di stabilire un protocollo unico e specifico. In generale per gli *scaffold* impiegati per la ricostruzione della cartilagine ialina si utilizzano principalmente le cellule già descritte nel terzo capitolo di questo elaborato con lo scopo di individuare quali tra queste cellule possano essere la fonte più propensa in termini di meccanica stabile e biologia compatibile per produrre la cartilagine.

4.1. METODI DI RICELLULARIZZAZIONE

Diversi studi si sono concentrati sulla ricellularizzazione di *scaffold* derivati dalla ECM cartilaginea decellularizzata. A seguito dei processi di isolamento ed espansione precedentemente descritti si passa ora ad analizzare la fase di ricellularizzazione delle impalcature. Dai pallet le cellule isolate espanse, vengono inizialmente staccate dal loro supporto originale da cui hanno proliferato utilizzando una soluzione a base di tripsina in grado di degradare i legami proteici che le tengono attaccate. La semina consiste nella successiva azione di distribuzione delle cellule sugli *scaffold*.

Negli anni sono stati sperimentati vari metodi al fine di trovare l'approccio con la percentuale di rendimento più alta.

Un esempio è lo studio condotto da Luo et al. (10).

È stato possibile infatti osservare in ambito sperimentale due ripopolamenti di *scaffold* di ECM decellularizzata suina con l'utilizzo di cellule condroprogenitrici umane. In questo studio vengono utilizzate due impalcature simili, costituite dallo stesso materiale. I due gruppi di impalcature in dECM, ottenuti dallo stesso tessuto decellularizzato e aventi forma cilindrica[1], differivano tra loro per la presenza di canali artificiali: nel primo gruppo gli scaffold non erano stati modificati, mentre nel secondo gruppo i ricercatori avevano praticato fori passanti nella sezione circolare, utilizzando aghi a punta piatta di circa 400 μm di diametro, creando così canali cilindrici interni allo scaffold. L'obiettivo era valutare se la presenza di tali canali potesse favorire la migrazione e la distribuzione delle cellule all'interno dello scaffold.

Successivamente le cellule sono state seminate su entrambi i tipi di scaffold e coltivate dei pozzetti di coltura. Qui, per favorire l'attecchimento cellulare, i ricercatori hanno aggiunto un gel denominato anello di agarosio (O-ring) intorno allo *scaffold*, con lo scopo di creare una barriera che confina le cellule sull'area designata evitandone la dispersione. Il terreno di coltura per la proliferazione cellulare è il medesimo di quello descritto al terzo capitolo di questo elaborato, vale a dire un mezzo di coltura specifico che promuove la condrogenesi grazie ai fattori di crescita contenuti in esso, quali il TFG-β3.

Per entrambi i gruppi di cellule seminate sia non canalizzate che canalizzate metà dei campioni sono stati coltivati in condizioni statiche mentre l'altra metà utilizzando una

[1] Cfr. supra Cap II, §2.2.1

piattaforma rotante. L'importanza di queste condizioni per la ricellularizzazione richiede un approfondimento nella loro descrizione per comprendere al meglio i meccanismi che ne guidano il processo.

La coltura cellulare statica è il metodo più semplice. Tale metodo prevede che le cellule vengono semplicemente depositate sulla superficie dello *scaffold*, spesso tramite gocce di sospensione cellulare, e lasciate aderire. Ad adesione avvenuta lo *scaffold* viene immerso nel mezzo di coltura. Questo sistema tecnicamente poco complesso risulta essere anche economico. Tuttavia, presenta alcuni limiti e complicanze. Le cellule tendono a concentrarsi sulla superficie esterna dell'impalcatura limitando la proliferazione negli spazi più profondi questo giustifica il perché Lou et al. hanno pensato di creare dei canali su alcuni *scaffold*. La coltura cellulare dinamica, invece, nasce dall'esigenza di migliorare la distribuzione cellulare all'interno dello *scaffold*. Con questo metodo l'impalcatura viene sottoposta a flussi di mezzo di coltura così da creare sforzi di taglio e stimoli meccanici che favoriscono l'ingresso delle cellule nelle zone più profonde. Per questo metodo vengono ampiamente utilizzati bioreattori come i bioreattori a ricircolo[2] (10).

A partire da questo quadro metodologico, lo studio di Monzavi et al. (24) propone un ulteriore approfondimento, analizzando come lo stesso approccio possa essere modulato in funzione della fonte cellulare utilizzata. In particolare, viene confrontato l'impiego dei condrociti autologhi e delle MSC per la ricellularizzazione di *scaffold* di ECM decellularizzata. Lo studio adotta il solo metodo di coltura cellulare statica.

Se la fonte cellulare sono i condrociti autologhi, allora una volta ottenuta l'espansione i pallet cellulari subiscono un lavaggio con una soluzione contenente tripsina. Successivamente, viene addizionato del terreno di coltura basico per inibire l'effetto della tripsina. La sospensione cellulare viene centrifugata all'interno di una provetta scartando il surnatante e sospendendo il pallet cellulare in un mezzo basico. Prima della semina i condrociti vengono colorati per permettere l'identificazione della locazione cellulare, la distribuzione e la morfologia e servono per rivelare dei marker biologici (24).

La colorazione delle cellule è un passaggio fondamentale per il metodo di ricellularizzazione in quanto consente di tenere traccia degli sviluppi del ripopolamento cellulare sullo *scaffold*. Attraverso l'utilizzo di coloranti istochimici e immunochimici è

[2] Cfr. supra, cap III, §2.2

inoltre possibile valutare la quantità di matrice extracellulare neoformata. In particolare questi test istologici consentono di valutare se il tessuto ricostruito presenta le caratteristiche tipiche della cartilagine ialina, oppure se tende verso una cartilagine fibrosa, qualitativamente inferiore rispetto alle proprietà biologiche e meccaniche richieste.

Tabella 4.1. Tipi di coloranti utilizzati nell'analisi istologica dei bioimpianti di cartilagine articolare

Colorante	Colore	Cosa evidenzia
Ematossilina-eosina (H&E)	Nuclei blu, citoplasma rosa	Impiegato per valutare il contenuto cellulare generale e l'organizzazione del tessuto
Alcian Blue	Blu	Impiegato per identificare i proteoglicani solfati, conferma la presenza di matrice cartilaginea
Sifranin-O	Rosso	Impiegato per la valutazione dei sGAG
Tricromia	Collagene in blu/verde e citoplasma rosso	Evidenzia il collagene fibrillare; viene impiegato per valutare se la cartilagine è di tipo ialino o fibroso
Picrosirius Red	Collagene	Impiegato per la valutazione della struttura della rete di collagene

Nota: I dati riportati nella Tabella 4.1 rappresentano un raggruppamento realizzato dall'autore sulla base di più studi presenti in letteratura, allo scopo di fornire una panoramica dei principali coloranti utilizzati nella caratterizzazione dei condrociti e della matrice cartilaginea.

A seguito dei processi di espansione e differenziazione di MSC[3] si procede alla fase di ricellularizzazione, processo che risulta essere uguale sia per condrociti autologhi che MSC. Gli *scaffold* vengono seminati con 20×10^3 cellule/mm^3 e vengono incubati per 3-4 ore per consentire alle cellule di attaccarsi sull'impalcatura. In seguito, i bioimpianti vengono incubati per 3 settimane a 37 °C in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO2 su un terreno di coltura dei condrociti che viene cambiato ogni 3 giorni. (24)

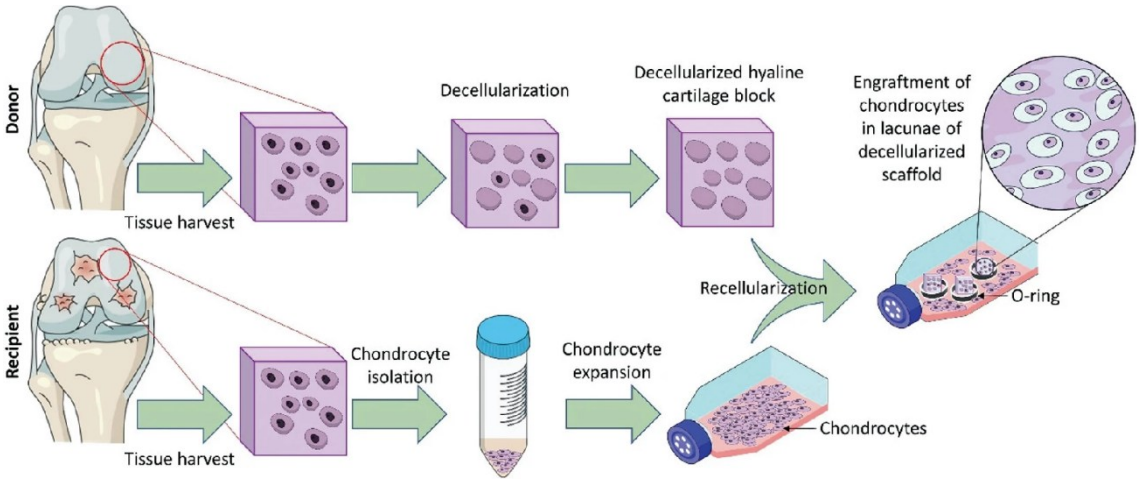

Fig. 4.1 Schema dei processi di ricellularizzazione della cartilagine ialina. Immagine adattata(24), disponibile su Mindthegraph.com, con licenza Creative Commons CC BY-SA 4.0.

4.2 METODI PER L'ANALISI DELLA PROGRESSIONE DEL BIOIMPIANTO DURANTE LA RICELLULARIZZAZIONE

Durante l'intero processo di ricellularizzazione, al fine di assicurarsi il corretto svolgimento della procedura, vengono utilizzati alcuni metodi per analizzare la progressione del bioimpianto. In questo paragrafo vengono descritti i test e i risultati riportati da Luo et al (10). È importante sottolineare che i test descritti non rappresentano procedure standardizzate per valutare la ricellularizzazione, in quanto nella letteratura non è ancora stato definito un protocollo standard universalmente riconosciuto. Tuttavia, le analisi adottate dagli autori coincidono con gli strumenti comunemente utilizzati per monitorare la progressione della ricellularizzazione. Alcuni di questi test qui descritti sono stati utilizzati anche da altri autori: ad esempio, Ibsirlioglu et al.(13) hanno adottato

[3] Cfr. supra, cap III, p 30

analisi biochimiche per valutare la ricellularizzazione degli scaffold da loro creati, mentre Nie et al. (12) si sono concentrati sulle analisi istologiche per identificare i componenti tipici della cartilagine ialina. Per questo motivo tali metodiche risultano coerenti con gli obiettivi di questa tesi. Lo studio di Luo et al, si distingue perché integra in maniera sistematica queste analisi, offrendo una valutazione complessiva dell'andamento della ricellularizzazione

4.2.1 Saggio vivo/morto

Questo metodo è un test comune in biologia cellulare e consente di valutare la vitalità delle cellule all'interno dei costrutti. Ha come scopo determinare quante cellule sono vive e morte all'interno dell'impalcatura per capire se il processo di coltura sta funzionando. I passaggi generali riportati da Lou et al.(10) prevedono una prima preparazione dei campioni in cui i costrutti vengono tagliati a metà e lavati in modo tale da eliminare il terreno di coltura residuo.

Successivamente i campioni vengono immersi in una soluzione contenente due coloranti fluorescenti: la calceina e l'etidio omodimero-1. La calceina entra solamente nelle cellule vive che hanno la membrana intatta e una volta attivato rende le cellule di colore verde. Di contro, se le cellule sono morte la membrana risulterà essere danneggiata e saranno accessibili all'etidio omodimero-1 che si lega al DNA del nucleo rendendolo le cellule di colore rosso.

Per un'analisi completa dell'andamento della vitalità vengono scattate e sovrapposte diverse immagini acquisite attraverso un microscopio confocale fino ad una profondità di 200 µm. Questo permette di capire se il processo di ricellularizzazione sta progredendo anche all'interno dello scaffold.

4.2.2 Prove Meccaniche

Per valutare le proprietà meccaniche degli scaffold, Luo et al. (10) hanno utilizzato dischi di cartilagine articolare suina. Sebbene in questo lavoro tali analisi sono state condotte prima della ricellularizzazione, è importante sottolineare che gli stessi protocolli vengono impiegati anche in seguito per valutare l'efficacia della ricellularizzazione. La ripetizione delle prove meccaniche consente di verificare se la deposizione di nuova ECM da parte delle cellule abbia determinato un recupero almeno

parziale delle proprietà meccaniche originali. Il set up sperimentale è già stato descritto precedentemente[4] [5].

Il protocollo prevede due test: il test di compressione e rilassamento delle tensioni e il test dinamico.

Il test di rilassamento delle tensioni a compressione non confinata prevede inizialmente l'applicazione di un precarico, una forza di carico piccola per assicurare che il campione sia uniformemente a contatto con la macchina del test, dopo di che la sollecitazione viene terminata e si permette al materiale di rilassarsi e a ritornare nello stato iniziale. L'effettivo inizio del test si ha con l'applicazione di una compressione a rampa dove il campione viene compresso velocemente fino a una deformazione del 20% del suo spessore iniziale. La deformazione è mantenuta per un tempo pari a 2000 secondi, sufficienti affinché il campione si rilassi e la forza necessaria per mantenere la deformazione diminuisca fino a stabilizzarsi. Dalla forza finale di equilibrio viene calcolata la compressione di equilibrio che fornisce una misura della rigidità che esprime il materiale.

Il test dinamico viene eseguito in successione al primo test. Esso prevede una compressione ciclica con una deformazione dell'1% ad una frequenza di 1 Hz. Lo scopo principe di questo test è di stabilire il modulo dinamico che misura la rigidità del materiale quando è soggetto a carichi ripetuti.

I test meccanici qui descritti non sono univoci per l'analisi della CA ma risultano essere quelli più utilizzati. In letteratura sono riportati infatti altri test meccanici, come espresso dalla revisione di Patel et al. (25). Sebbene Luo et al.(10) abbiano applicato queste prove meccaniche prima della ricellularizzazione è importante sottolineare che gli stessi protocolli vengono impiegati anche dopo la colonizzazione cellulare. I risultati ottenuti con questi test vengono confrontati con i caratteristici valori della CA nativa, in particolare modulo istantaneo e ad equilibrio nelle prove compressive, o di resistenza a trazione. Tuttavia, diversi contributi in termini di revisione hanno evidenziato come i costrutti ricellularizzati presentino, nella maggior parte dei casi, capacità meccaniche inferiori rispetto alla CA nativa (26)

[4] Cfr. supra Cap II, §2.2.1
[5] Cfr. supra Cap IV §4.1

4.2.3. Analisi biochimiche

Per quantificare gli effetti delle decellularizzazione Luo et al. (10) hanno eseguito diverse analisi biochimiche qualitative che servono per monitorare la composizione dei bioimpianti, così da quantificare i componenti del tessuto cartilagineo quali DNA, sGAG e collagene per poi confrontarli con la cartilagine nativa.

All'inizio i campioni vengono trattati con l'enzima papaina e incubati per 18 ore al fine di scomporre il tessuto in componenti molecolari. Per quantificare il contenuto di DNA viene utilizzato il test Hoechst. In un bioimpianto in ricellularizzazione questo test indica il numero di cellule presenti nel tessuto. Più test nell'arco del processo forniranno i risultati sul possibile andamento, positivo o negativo, della ripopolazione dello *scaffold*.

Per la misurazione del contenuto di glicosamminoglicani (sGAG) viene impiegato il test Blyscan, mentre per il quantitativo di collagene viene misurato un suo precursore, l'idrossiprolina, con un calcolo standardizzato utilizzando un rapporto idrossiprolina-collagene di 1:7,69.

2.4. Analisi istologica

L'analisi istologica eseguita da Luo et al. (10) fornisce una fotografia della composizione e distribuzione dei componenti del tessuto neo-cartilagineo.

Il campione dopo il procedimento di preparazione subisce la colorazione istologica con i coloranti già descritti in precedenza. Quando il campione viene colorato, successivamente viene osservato al microscopio a luce polarizzata. In queste condizioni le fibre di collagene mostrano diversi colori a seconda del loro spessore verdi se sottili, dal giallo al rosso via via che aumentano di spessore. Questo consente di valutare non solo la qualità di collagene ma anche la sua disposizione all'interno della matrice.

DISCUSSIONE

Sebbene il processo di ricellularizzazione di impalcature decellularizzate venga trattato in molteplici studi di letteratura scientifica, non è esente da limitazioni o rischi che possono compromettere la riuscita del metodo. A causa di queste problematiche, la comunità scientifica ad oggi non è riuscita a determinare un protocollo standardizzato che possa andare bene per la ricellularizzazione di tutti i tessuti. Come riportato su svariati articoli di letteratura, una limitazione importante è data dalla tipologia di impalcatura impiegata. È stato dimostrato come l'utilizzo di *scaffold* in dECM non sempre garantisce la creazione di un bioimpianto simile alla cartilagine ialina. Inizialmente era facile pensare che l'utilizzo di impalcature in dECM potessero essere facilmente ripopolate grazie alla loro struttura simile a quella della cartilagine nativa e alla presenta di alloggiamenti cellulari già presenti su tale struttura. Gli studi hanno evidenziato come le procedure di decellularizzazione possano distruggere parzialmente l'ECM riducendo la porosità della struttura e portando alla riduzione del modulo elastico del bioimpianto ricellularizzato.

Il modulo elastico della cartilagine, comunemente valutato a breve termine come modulo istantaneo o a lungo termine come modulo di equilibrio, rappresenta la capacità del tessuto di opporsi alla deformazione meccanica in condizioni di rilassamento o creep. I valori riportati in letteratura per la cartilagine ialina sana umana (3) mostrano un'ampia variabilità a seconda del sito anatomico di prelievo. Ad esempio, i valori del modulo istantaneo nella testa femorale riportati oscillano tra 1,2 e 1,7 MPa mentre a livello del piatto tibiale possono raggiungere valori medi tra 3,4 e 6,9 MPa. Per quanto riguarda il modulo di equilibrio i valori risultano significativamente più bassi con valori medi di 0,2 e 1,2 MPa nella cartilagine del piatto tibiale.

Questi dati evidenziano come le proprietà meccaniche della CA siano dipendenti dal sito anatomico da cui i campioni vengono estratti e dalle condizioni sperimentati utilizzate per ottenere i dati (compressione confinata o non confinata).

La criticità che si riscontra con i valori misurati dai bioimpianti sperimentali è dovuta non solo dal materiale di partenza e dal grado di ricellularizzazione che il costrutto possiede ma deve tenere conto anche della geometria (27). Un campione cilindrico come quelli presentati da Luo et al. (10), ad esempio, può mostrare proprietà meccaniche

diverse rispetto ad uno scaffold di forma e volume maggiori, pur essendo costituito dallo stesso materiale. La sfida che emerge indica che la creazione di un bioimpianto deve per quanto possibile risultare personalizzata al paziento o almeno "standardizzata" in base al sito del difetto

Un'altra principale criticità riguarda l'omogeneità del ripopolamento cellulare all'interno dello *scaffold*. Nelle condizioni statiche c'è una tendenza di colonizzazione cellulare circoscritta ai soli strati superficiali, con una conseguente scarsa ripopolazione al centro dell'impalcatura. Anche le condizioni dinamiche, pur garantendo una migliore distribuzione, non sempre riescono a far raggiungere un'adesione cellulare in tutto lo *scaffold*. Lo studio condotto da Lou et al.,(10)ha cercato di porre rimedio a tali limitazioni, andando ad introdurre artificialmente dei canali sugli *scaffold* di ECM decellularizzati perpendicolarmente rispetto alla sezione trasversale[6] l'esperimento ha riportato l'osservazione della generazione di ECM da parte di cellule condroprogenitrici umane. L'esperimento ha avuto una durata di 10 giorni dopo la semina delle cellule. I test vivo/morto hanno evidenziato che dopo 10 giorni i canali sugli *scaffold* erano quasi completamente popolati da cellule, ma le regioni tra un canale e l'altro risultavano prive di colorazione. Ciò fa dedurre che in quelle aree di impalcatura non fosse ancora avvenuto un ripopolamento. Si evince che 10 giorni non è un tempo sufficiente per confermare se il bioimpianto ha effettivamente successo oppure no, ma bisognerebbe attendere ulteriori giorni per poter verificare se l'intuizione di aggiungere dei canali sugli *scaffold* possa favorire il ripopolamento cellulare.

A seguito di queste restrizioni si aggiunge la difficoltà di mantenere il fenotipo condrocitario stabile affinché i condrociti espansi *in vitro* non vadano incontro a una dedifferenziazione che porti alla formazione di una cartilagine di tipo fibroso. Analogamente le MSC possono presentare vari inconvenienti. Ad oggi è sconosciuta la quantità ottimale di MSC allogeniche che possono essere trapiantate in sicurezza. Si aggiunge anche la difficolta di estrazione di MSC autologhe dai soggetti più affetti da l'OA, gli anziani, a causa delle ridotte fonti di midollo osseo o pazienti con poco tessuto adiposo. Infine, un'importante complicanza legata all'uso delle MSC è data dalla possibilità delle stesse di differenziarsi in diverse cellule associate a tumori o, addirittura, aumentare l'azione delle cellule tumorali vicine, in caso queste fossero presenti. L'utilizzo

[6] Cfr. supra, Cap IV, §4.1

di MSC anche se per la ricellularizzazione della cartilagine è da evitare per pazienti che hanno o tendono a presentare forme tumorali. (28)

Dal punto di vista meccanico, difficilmente si riescono ad ottenere costrutti simili al tessuto nativo. Solitamente risultano più deboli e meno resistenti alle sollecitazioni articolari.

Infine, permangono problematiche legate alla standardizzazione dei protocolli e la sicurezza clinica dei prodotti.

CONCLUSIONI

Il lavoro eseguito sul presente elaborato mira a fornire una visione d'insieme della ricerca scientifica nella riparazione della cartilagine articolare affetta da OA. In particolare, l'attenzione è stata posta sui bioimpianti che vengono utilizzati per la rigenerazione tissutale, analizzando i metodi e i materiali che portano alla formazione di questi ultimi. Dagli articoli consultati di letteratura è emerso che la ricellularizzazione di *scaffold* rappresenta una strategia promettente, in grado di avvicinare la medicina rigenerativa a soluzioni cliniche innovative per una patologia, quale l'OA, che attualmente è priva di cure risolutive durature nel tempo.

Tuttavia, nonostante i progressi compiuti in laboratorio, questa tecnica presenta ancora delle limitazioni. Tra queste emergono la difficoltà di ottenere un ripopolamento omogeneo, il mantenimento del fenotipo condrocitario, i rischi legati dall'impiego di cellule staminali mesenchimali e le proprietà biomeccaniche dei costrutti che risultano spesso inferiori rispetto al tessuto cartilagineo nativo.

Queste problematiche a seguito della mancanza di protocolli standardizzati e all'assenza di dati clinici consolidati spiegano perché la ricellularizzazione non sia ancora una pratica applicabile nella quotidianità medica. Risulta evidente la necessità di ulteriori studi allo scopo di affrontare le sfide che attualmente limitano questa promettente strategia di riparazione, con l'obiettivo di sviluppare bioimpianti più sicuri, efficaci e stabili nel tempo.

BIBLIOGRAFIA

1. Fares MY, Daher M, Boufadel P, Haikal E, Haj Shehade T, Koa J, et al. The use of autologous chondrocyte transplantation for the treatment of osteoarthritis: a systematic review of clinical trials. Cell Tissue Bank. marzo 2025;26(1):5.
2. Xia C, Mei S, Gu C, Zheng L, Fang C, Shi Y, et al. Decellularized cartilage as a prospective scaffold for cartilage repair. Mater Sci Eng C. agosto 2019;101:588–95.
3. Belluzzi E, Todros S, Pozzuoli A, Ruggieri P, Carniel EL, Berardo A. Human Cartilage Biomechanics: Experimental and Theoretical Approaches towards the Identification of Mechanical Properties in Healthy and Osteoarthritic Conditions. Processes. 27 marzo 2023;11(4):1014.
4. Welsh BL, Sikder P. Advancements in Cartilage Tissue Engineering: A Focused Review. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. gennaio 2025;113(1):e35520.
5. Mukherjee A, Sarkar S, Poundarik A, Das B. The Role of Cartilage Tissue Engineering in Osteoarthritis Treatment: The Bench to Bedside Translation. J Polym Sci. 15 gennaio 2025;63(2):324–41.
6. Wasyłeczko M, Sikorska W, Chwojnowski A. Review of Synthetic and Hybrid Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering. Membranes. 17 novembre 2020;10(11):348.
7. Huang BJ, Hu JC, Athanasiou KA. Cell-based tissue engineering strategies used in the clinical repair of articular cartilage. Biomaterials. agosto 2016;98:1–22.
8. Jahani A, Nourbakhsh MS, Moradi A, Mohammadi M, Tayebi L. Incorporating insulin into alginate-chitosan 3D-printed scaffolds: A comprehensive study on

structure, mechanics, and biocompatibility for cartilage tissue engineering. Carbohydr Polym Technol Appl. marzo 2025;9:100696.

9. Whu SW, Hung KC, Hsieh KH, Chen CH, Tsai CL, Hsu S hui. In vitro and in vivo evaluation of chitosan–gelatin scaffolds for cartilage tissue engineering. Mater Sci Eng C. luglio 2013;33(5):2855–63.

10. Luo L, Eswaramoorthy R, Mulhall KJ, Kelly DJ. Decellularization of porcine articular cartilage explants and their subsequent repopulation with human chondroprogenitor cells. J Mech Behav Biomed Mater. marzo 2016;55:21–31.

11. Nouri Barkestani M, Naserian S, Uzan G, Shamdani S. Post-decellularization techniques ameliorate cartilage decellularization process for tissue engineering applications. J Tissue Eng. gennaio 2021;12:2041731420983562.

12. Nie X, Chuah YJ, Zhu W, He P, Peck Y, Wang DA. Decellularized tissue engineered hyaline cartilage graft for articular cartilage repair. Biomaterials. marzo 2020;235:119821.

13. Ibsirlioglu T, Elçin AE, Elçin YM. Decellularized biological scaffold and stem cells from autologous human adipose tissue for cartilage tissue engineering. Methods. gennaio 2020;171:97–107.

14. Nasiri B, Mashayekhan S. Fabrication of porous scaffolds with decellularized cartilage matrix for tissue engineering application. Biologicals. luglio 2017;48:39–46.

15. Meng H, Liu X, Liu R, Zheng Y, Hou A, Liu S, et al. Decellularized laser micro-patterned osteochondral implants exhibit zonal recellularization and self-fixing for osteochondral regeneration in a goat model. J Orthop Transl. maggio 2024;46:18–32.

16. Shahbazi P, Abdouss M, Naeimi M, Darbemamieh G, Jafari-Nodoushan M. Synthesis, fabrication and characterization of composite scaffolds employing sodium alginate, nanoclay and hydroxyapatite for articular cartilage tissue engineering. Carbohydr Polym Technol Appl. giugno 2025;10:100771.
17. Ghandforoushan P, Alehosseini M, Golafshan N, Castilho M, Dolatshahi-Pirouz A, Hanaee J, et al. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue regeneration: A review. Int J Biol Macromol. agosto 2023;246:125674.
18. Nordberg RC, Bielajew BJ, Takahashi T, Dai S, Hu JC, Athanasiou KA. Recent advancements in cartilage tissue engineering innovation and translation. Nat Rev Rheumatol. giugno 2024;20(6):323–46.
19. Lam ATL, Reuveny S, Oh SKW. Human mesenchymal stem cell therapy for cartilage repair: Review on isolation, expansion, and constructs. Stem Cell Res. aprile 2020;44:101738.
20. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315–7.
21. Guzzo RM, O'Sullivan MB. Human Pluripotent Stem Cells: Advances in Chondrogenic Differentiation and Articular Cartilage Regeneration. Curr Mol Biol Rep. settembre 2016;2(3):113–22.
22. O'Conor CJ, Case N, Guilak F. Mechanical regulation of chondrogenesis. Stem Cell Res Ther. dicembre 2013;4(4):61.
23. Adkar SS, Wu CL, Willard VP, Dicks A, Ettyreddy A, Steward N, et al. Step-Wise Chondrogenesis of Human Induced Pluripotent Stem Cells and Purification

Via a Reporter Allele Generated by CRISPR-Cas9 Genome Editing. Stem Cells. 1 gennaio 2019;37(1):65–76.

24. Monzavi SM, Kajbafzadeh AM, Sabetkish S, Seifalian A. Extracellular Matrix Scaffold Using Decellularized Cartilage for Hyaline Cartilage Regeneration. In: Kajbafzadeh AM, curatore. Decellularization Methods of Tissue and Whole Organ in Tissue Engineering [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2021 [citato 19 agosto 2025]. p. 209–23. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1345). Disponibile su: https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-82735-9_17

25. Patel JM, Wise BC, Bonnevie ED, Mauck RL. A Systematic Review and Guide to Mechanical Testing for Articular Cartilage Tissue Engineering. Tissue Eng Part C Methods. 1 ottobre 2019;25(10):593–608.

26. Ngadimin KD, Stokes A, Gentile P, Ferreira AM. Biomimetic hydrogels designed for cartilage tissue engineering. Biomater Sci. 2021;9(12):4246–59.

27. Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. Nat Mater. 1 luglio 2005;4(7):518–24.

28. Ahmed E, Saleh T, Xu M. Recellularization of Native Tissue Derived Acellular Scaffolds with Mesenchymal Stem Cells. Cells. 15 luglio 2021;10(7):1787.

29. Treccani. Ingegneria tissutale. In: Dizionario di medicina [Internet]. Roma: Istituto dell'Enciclopedia Italiana; 2010 [citato 2025 set 7]. Disponibile da: https://www.treccani.it/enciclopedia/ingegneria-tissutale_(Dizionario-di-Medicina)/

30. De Felici, M.,Boitani, C.,Bouché, M., Canipari, R., Dolfi, A., Filippini, A. Musarò, A., Papaccio, G., & Salustri, A. (2016). *Embriologia umana. Morfogenesi, processi molecolari, aspetti clinici* (2ª ed.,p.55). Padova: Piccin-Nuova Libraria.