



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**“INGEGNERIA TISSUTALE PER LA RIGENERAZIONE DEL
TESSUTO OSSEO”**

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Laureanda: Laura Russo

ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022

Data di laurea: 20 settembre 2022

Indice

Abstract	pagina 1
Capitolo 1: Clinical Need	pagina 3
1.1 Autorigenrazione del tessuto osseo	pagina 3
1.2 Innesti ossei	pagina 5
1.2.1 Innesti di osso spugnoso autologo	pagina 5
1.2.2 Innesti di osso corticale autologo	pagina 7
1.2.3 Innesti ossei allogenici	pagina 8
Capitolo 2: Ingegneria tissutale	pagina 11
2.1 Definizione	pagina 11
2.2 Componenti	pagina 12
2.3 Campi di applicazione	pagina 14
2.4 Bone Tissue Engineering (BTE)	pagina 15
Capitolo 3: Scaffold	pagina 17
3.1 Requisiti	pagina 17
3.2 Biomateriali	pagina 17
3.2.1 Polimeri naturali	pagina 17
3.2.2 Polimeri sintetici	pagina 20
3.2.3 Ceramiche	pagina 22
3.2.4 Compositi	pagina 24
3.3 Tecniche di fabbricazione	pagina 25
3.3.1 Tecniche convenzionali	pagina 25
3.3.2 Rapid Prototyping	pagina 33
Capitolo 4: Cellule	pagina 41
4.1 Cellule staminali	pagina 41
4.1.1 Cellule staminali mesenchimali (MSCs)	pagina 42
4.1.2 Cellule progenitrici endoteliali (EPCs)	pagina 42
4.1.3 Cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs)	pagina 43
4.2 Tecniche di stimolazione	pagina 43
Capitolo 5: Fattori di crescita	pagina 47
5.1 Classificazione	pagina 47
5.1.1 Transforming growth factors-beta (TGF- β s)	pagina 47
5.1.2 Bone morphogenetic proteins (BMPs)	pagina 48
5.1.3 Insulin-like growth factors (IGFs)	pagina 48
5.1.4 Fibroblast growth factors (FGF)	pagina 48

5.1.5 Vascular endothelial growth factors (VEGFs)	pagina 49
5.1.6 Platelet-derived growth factors (PDGFs)	pagina 49
5.2 Metodi di inclusione	pagina 49
5.2.1 Adsorbimento superficiale	pagina 50
5.2.2 Legame covalente	pagina 50
5.2.3 Rilascio da carrier	pagina 51
Capitolo 6: Clinical Trials	pagina 53
6.1 Clinical trial 1	pagina 53
6.1.1 Metodi e materiali	pagina 53
6.1.2 Risultati	pagina 54
6.1.3 Discussione	pagina 58
6.2 Clinical trial 2	pagina 58
6.2.1 Metodi e materiali	pagina 58
6.2.2 Risultati e discussione	pagina 59
Conclusioni	pagina 61
Bibliografia	pagina 63
Ringraziamenti	pagina 67

Abstract

Il tessuto osseo è caratterizzato da peculiari capacità di autorigenerazione, tuttavia diverse cause (come ad esempio fratture traumatiche o interventi di resezione) possono provocare la presenza di difetti di dimensioni rilevanti che ne impediscono l'autoriparazione. Ciò rende necessario un intervento esterno che consenta la completa guarigione. A tale scopo, e volendo superare le problematiche relative alle operazioni di innesto autologo e allogenico, si è fatto ricorso alle procedure di Tissue Engineering.

L'ingegneria tissutale è una tecnica interdisciplinare oggetto di grande interesse e in continua evoluzione. Essa si propone di promuovere la rigenerazione dei tessuti attraverso la combinazione di tre componenti: scaffolds, cellule e fattori biochimici.

La tesi si propone di illustrare i principali biomateriali e le tecniche di fabbricazione adoperate nella produzione di impalcature con riferimento alle loro specifiche proprietà. Verranno poi esaminate la componente cellulare e i fattori di crescita sfruttati con alcune considerazioni relative alle tecniche di applicazione. In conclusione, verranno proposti due esempi di trials clinici nei quali sono state implementate strategie di Bone Tissue Engineering.

Capitolo 1. Clinical Need

1.1 Autorigenerazione del tessuto osseo

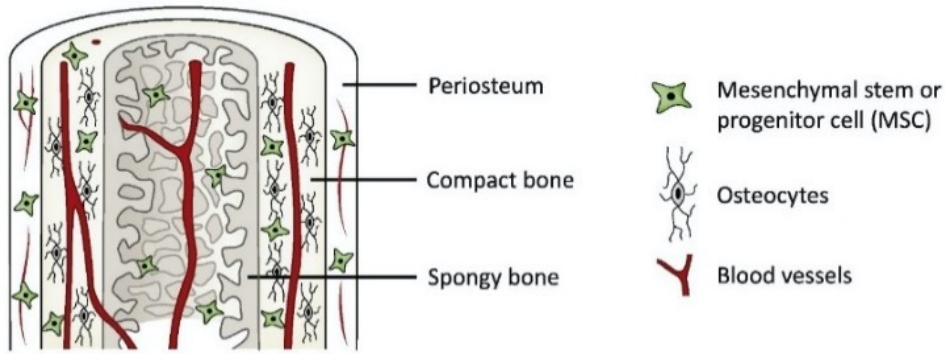
Il tessuto osseo è caratterizzato da peculiari capacità di autorigenerazione.

La guarigione di una frattura è un processo complesso che vede l'intervento coordinato di cellule, molecole e fattori di natura chimica, fisica e meccanica. Esso è costituito da diverse fasi. La prima fase è relativa a uno stadio di infiammazione acuta. Si ha la formazione di un ematoma dovuto alla rottura dei vasi sanguigni presenti e dei tessuti circostanti. Ciò comporta l'avvio del processo di coagulazione con conseguente formazione di una rete di fibrina. Le piastrine presenti nel sito rilasciano numerosi fattori di crescita e citochine grazie ai quali avviene il reclutamento delle prime cellule infiammatorie: i neutrofili. Essi danno inizio all'attività fagocitaria e secernono fattori chemiotattici che consentono il richiamo dei monociti, i quali si differenziano in macrofagi. In questo ambiente i macrofagi sono attivati in un fenotipo M1 (prevalentemente pro-infiammatorio) e hanno il compito di rimuovere la matrice provvisoria di fibrina e i materiali di scarto. Successivamente i macrofagi, assumendo un fenotipo M2 (anti-infiammatorio), rilasciano una vasta gamma di fattori per il reclutamento di cellule staminali dal midollo, dal periostio e dall'osso corticale. In questa fase le cellule staminali mesenchimali si differenziano in condrociti e in preosteoblasti. I primi depositano una matrice principalmente composta di collagene, dando vita ad un callo fibrocartilagineo. In esso si delineano numerosi vasi di neoformazione originati dall'attività angiogenica delle cellule endoteliali. Le cellule osteoprogenitrici si differenziano poi in osteoblasti, i quali mineralizzano la matrice cartilaginea dando vita al callo osseo. Intanto gli osteoclasti, giunti dal torrente circolatorio, si attivano. Nella fase finale il callo è sostituito con osso lamellare attraverso il tipico processo di rimodellamento coordinato tra osteoblasti e osteoclasti [1-3].

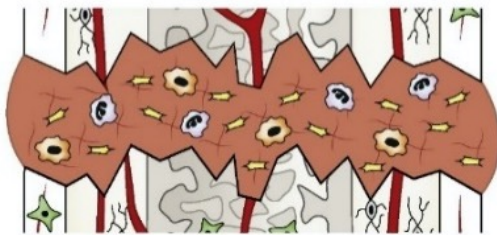
Il processo di rigenerazione del tessuto a seguito di una frattura ricalca in gran parte le fasi della formazione ossea che avviene durante lo sviluppo embrionale. Quello precedentemente descritto è relativo all'ossificazione endocondrale (o indiretta) che riguarda la maggior parte delle ossa del corpo. Le ossa piatte della volta cranica e della mandibola si sviluppano invece secondo un'ossificazione intramembranosa (o diretta). Questa prevede una differenziazione diretta delle MSCs in osteoblasti, evitando la fase condrogenica di produzione del callo cartilagineo [2].

La Figura 1.1 mostra il processo di guarigione di una frattura ossea con riferimento ai principali tipi cellulari e fattori biochimici coinvolti nelle diverse fasi.

Healthy bone



A Inflammatory phase



Inflammation

CCL-2 TGF- β
IL-1, -6 M-CSF

Fibrin clot

Platelet

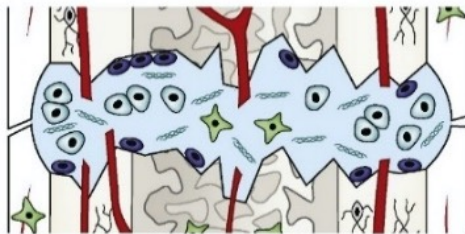
Recruitment of MSCs

PDGF-BB TNF- α
SDF-1
BMP-2, -4, -5, -6

Polymorphonuclear neutrophil

Macrophage

B Soft callus formation



Angiogenesis

Ang-1, -2 FGF-2
VEGF-A PIGFs
PDGFs BMPs

Soft callus

Chondrocyte

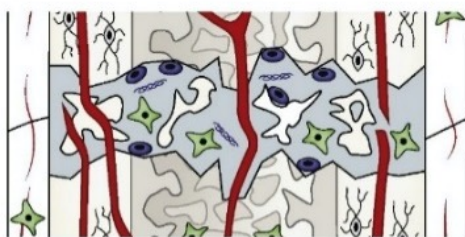
Osteoblast

Collagen fiber

Chondrogenesis and matrix production

TGF- β s IGF-1
PDGF-BB FGFs
GDF-5 BMPs

C Mineralization/resorption of the callus



Angiogenesis

VEGFs

Hard callus

Cartilage resorption

M-CSF RANKL
OPG TNF- α

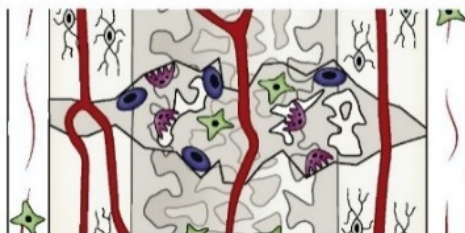
Osteoclast-like cells

Woven bone

MSCs differentiation and bone deposition

BMPs Wnt ligands

D Bone remodeling



Bone resorption

RANKL

Bone

New bone formation

BMP-2 PTH
IGF-1 Wnt ligands

Osteoclast

Figura 1.1: rappresentazione schematica del processo di rigenerazione dell'osso.

1.2 Innesti ossei

I processi osteogenici descritti sono estremamente efficaci nella riparazione del tessuto in seguito a traumi e lesioni, tuttavia particolari circostanze potrebbero impedirne la corretta evoluzione.

In generale è definito come ‘critico’ un difetto di dimensioni tali da non consentire la spontanea guarigione dell’osso. Difetti di questo tipo possono essere causati da fratture conseguenti ad eventi traumatici, dalla resezione di tumori, da infezioni o da malformazioni congenite [2].

Un caso rilevante è rappresentato dalle *non-union fractures* altrimenti denominate con il termine pseudoartrosi. Esse sono definite come il mancato consolidamento di una frattura a distanza di circa 6 mesi dal trauma, determinato dall’interruzione dei normali processi di guarigione. In questi casi, si rende quindi necessario un intervento esterno che permetta il ripristino di una condizione funzionale.

Esistono varie tecniche per favorire la guarigione di un difetto importante, la maggior parte delle quali fa ricorso ad innesti ossei. Questi possono essere di varie tipologie: autologhi (prelevati dal paziente stesso), allogenicici (provenienti da un individuo della stessa specie), xenogenicici (provenienti da soggetti appartenenti a un’altra specie) o sintetici [4].

L’innesto ideale dovrebbe possedere alcuni requisiti, come ad esempio:

- supporto strutturale: è necessario che un sostituto sia dotato di adeguate proprietà meccaniche per adempiere alla funzione di sostegno svolta dall’apparato scheletrico;
- osteointegrazione: è la capacità di instaurare una connessione strutturale e funzionale tra l’osso vivente e l’innesto;
- osteoconduzione: è relativa all’abilità di “guidare” la rigenerazione del tessuto fornendo una superficie adeguata;
- osteoinduzione: si riferisce al reclutamento, alla proliferazione e alla differenziazione delle cellule mediate da proteine e fattori di crescita presenti nel sostituto;
- osteogenesi: è la capacità di generare una neoformazione ossea per opera di cellule derivate dall’innesto stesso.

Ad oggi gli innesti più utilizzati nella pratica clinica sono gli auto e gli allo-innesti; l’autologo è considerato il *gold standard* per favorire la rigenerazione del tessuto [4,5].

1.2.1 Innesti di osso spugnoso autologo

Gli auto-innesti di osso spugnoso possono essere prelevati da varie porzioni ossee come cresta iliaca, tibia prossimale, radio distale, femore e olecrano. Essi sono dotati di proprietà osteointegrative, osteoconduttive, osteoinduttive e osteogenetiche: infatti sono corredati di

tutti gli elementi che rendono possibile la rigenerazione ossea. Essendo propri del paziente, gli innesti autologhi hanno il grande vantaggio di essere non-immunogenici e di non comportare il rischio di trasmissione di malattie [6,7].

Storicamente i più utilizzati sono quelli estratti dalla cresta iliaca anteriore e posteriore (Figura 1.2). Questi presentano però diverse limitazioni: innanzitutto, la quantità di osso che è possibile asportare è limitata e, inoltre, l'intervento comporta dolore (sia acuto che cronico) nel sito del prelievo e un rischio di complicanze non indifferente [6].

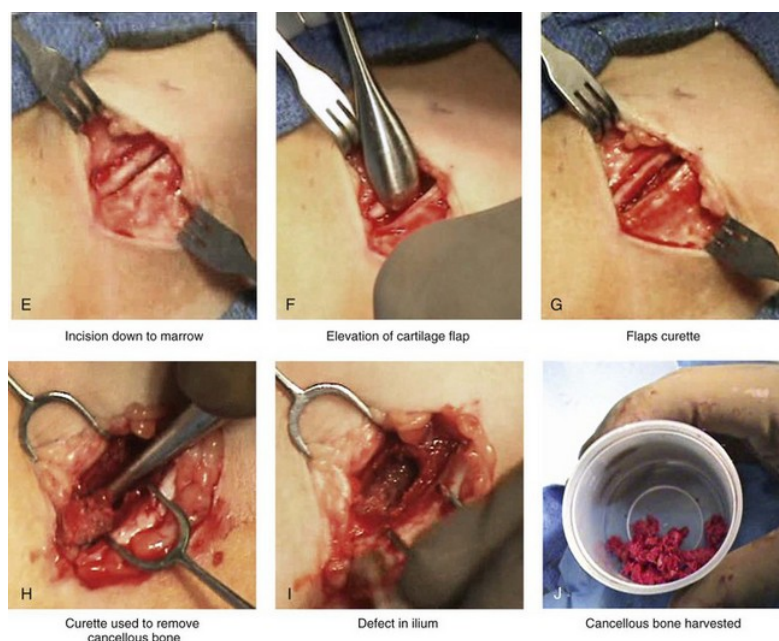


Figura 1.2: prelievo di un innesto di osso spugnoso dalla cresta iliaca.

Per tentare di superare i limiti dell'espianto dalla cresta iliaca, è stato introdotto l'utilizzo del Reamer/Irrigator/Aspirator (RIA). Esso consente di prelevare innesti dal canale midollare di ossa lunghe (come tibia e femore) (Figura 1.3). Il RIA è un dispositivo dotato di un alesatore che permette di raggiungere il canale midollare, di un irrigatore che riduce il calore e la pressione provocati dall'alesatura, e di un aspiratore che permette di prelevare il tessuto [6,7]. Gli innesti così ottenuti contengono cellule staminali multipotenti e alti livelli di fattori di crescita. Il volume di materiale estraibile tramite questa tecnica è maggiore (25-90 cm³) di quello consentito dalla raccolta dalla cresta iliaca anteriore (5-72 cm³) e paragonabile a quello della cresta posteriore (25-88 cm³) [7].

Il grande passo avanti è dato da una significativa riduzione del dolore nel sito donatore che però è comunque presente.

Il RIA utilizza una tecnica di estrazione piuttosto aggressiva per la quale devono essere prese attente precauzioni. Il tasso di complicanze, sebbene ridotto rispetto alle tecniche precedenti,

riguarda la possibilità di perforazione corticale, di penetrazione articolare e di fratture ossee intra- e peri-operatorie.

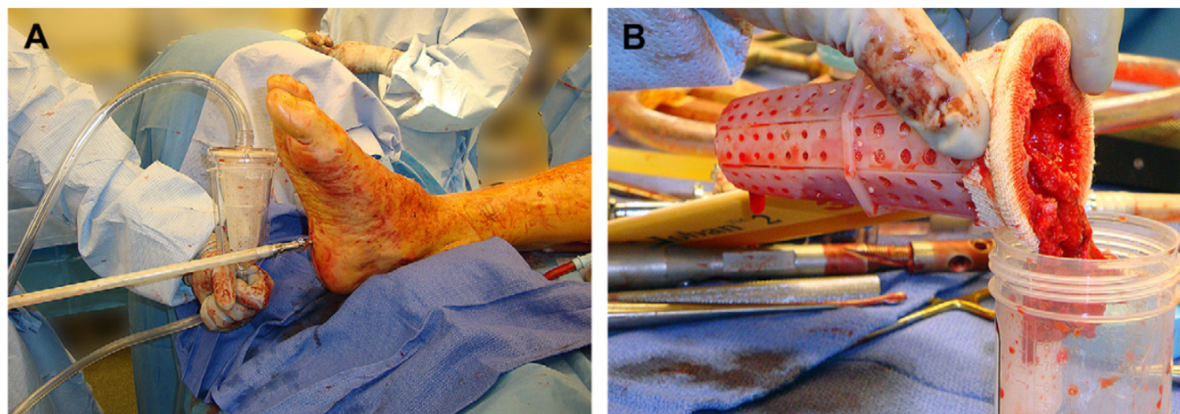


Figura 1.3: prelievo di un innesto osseo dalla tibia attraverso l'impiego del dispositivo RIA.

In entrambi i casi citati (estrazione dalla cresta iliaca o tramite il RIA) si tratta comunque di innesti ossei non-strutturali: essi fungono da eccellenti riempitivi ma non forniscono un supporto meccanico significativo, per cui sono solitamente associati ad articolati sistemi di fissaggio interni o esterni [6].

1.2.2 Innesti di osso corticale autologo

Gli auto-innesti di osso corticale sono sfruttati nel caso di difetti di grandi dimensioni (> 6 cm) e possono essere non vascolarizzati o vascolarizzati [6].

Nel primo caso vengono prevalentemente estratti dalla cresta iliaca e dal radio, sono dotati di osteoconduttività e forniscono un eccellente supporto meccanico.

Gli innesti vascolarizzati prevedono l'asportazione del complesso vascolare associato al tessuto estratto; i siti di raccolta più comuni riguardano il perone, la cresta iliaca, il radio distale e le costole. In particolare, gli innesti fibulari vascolarizzati (prelevati dal perone) sono indicati nel caso di resezione di tumori nelle ossa lunghe. Questa tecnica sfrutta il fatto che la rimozione di un segmento intercalare di perone (preservando il tratto prossimale e il malleolo laterale) ha un impatto minimo sulla stabilità del ginocchio e della caviglia e non compromette la funzione complessiva dell'arto inferiore. La fibula è infatti un osso che, in caso di resezione, presenta bassa morbilità e necessità riabilitative minime.

Essendo vascolarizzati, questi innesti consentono alle cellule presenti (comprese cellule staminali, osteoblasti e osteoclasti) di rimanere vitali, preservando quindi la capacità di rimodellamento osseo anche quando l'afflusso di sangue nel sito ricevente è inadeguato. La conservazione dell'apparato vascolare comporta una complessa e meticolosa procedura

microchirurgica che consenta un efficace trapianto. Questo metodo è spesso combinato con un alloinnesto: ciò permette di garantire la funzionalità biologica data dall'osso autologo e di ridurre la quantità di tessuto prelevato sfruttando la stabilità meccanica dell'allotrapianto [8].

La procedura di alloinnesto fibulare vascolarizzato è comunque molto complessa ed è associata a diverse complicanze. Gli svantaggi principali riguardano la morbidità del sito donatore, il rischio di frattura da affaticamento, la possibilità di mancato consolidamento e infezione, le lunghe tempistiche operatorie e la tecnica chirurgica impegnativa. Tuttavia, può ancora essere utile nei casi di perdita ossea segmentale negli arti [7,8].

Nella Figura 1.4 è possibile osservare delle radiografie relative a una paziente donna di 21 anni sottoposta ad un intervento di ricostruzione tibiale con innesto fibulare vascolarizzato. Nelle immagini relative al follow-up di due anni è possibile osservare la lacuna ossea dovuta all'asportazione della fibula e l'integrazione dell'autograft nella tibia.

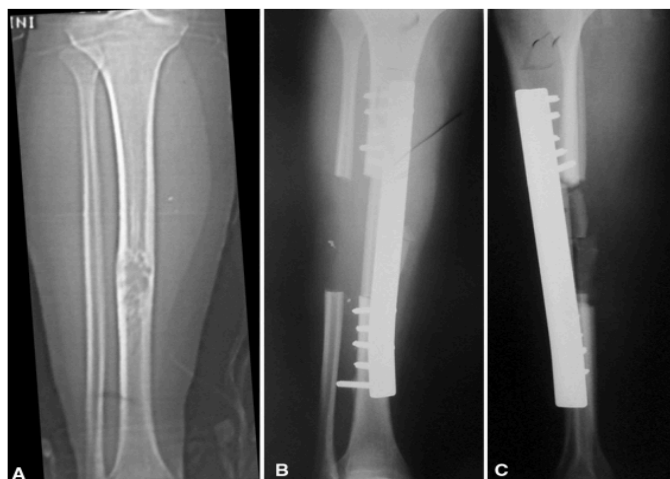


Figura 1.4: A) radiografia anteroposteriore della tibia destra di una donna di 21 anni con adamantinoma¹. B) C) Radiografie anteroposteriore e laterale 2 anni dopo ampia resezione e ricostruzione con autotrapianto fibulare vascolarizzato.

1.2.3 Innesti ossei allogenici

Gli innesti allogenici sono innesti prelevati da cadavere o, alternativamente, da pazienti sottoposti a interventi di artroplastica in cui vengono asportati determinati segmenti ossei (come ad esempio la testa del femore nel caso delle protesi d'anca).

Il grande vantaggio rispetto agli innesti autologhi riguarda la mancanza di limitazioni nella quantità di materiale estraibile e l'assenza di morbidità nel sito donatore. Anche questi innesti possono essere di tipo strutturale o non-strutturale. I primi sono più comunemente usati nel trattamento di resezione di tumori di grandi dimensioni. Essi prevedono l'espianto di segmenti ossei da donatore che vengono conservati nelle banche dell'osso congelati e

¹ Tumore che ha origine dai tessuti epiteliali dello smalto dentario; ha sede di elezione nella mandibola e nel mascellare, ma può svilupparsi anche in altri distretti ossei.

opportunamente trattati. Questi innesti forniscono eccellente supporto strutturale, tuttavia essendo non-vascularizzati hanno limitate capacità di integrazione con l'ospite e i tempi di guarigione sono significativamente più lunghi [7,8].

Gli alloinnesti non strutturali consistono nel trattamento di osso spugnoso prelevato da donatore. Questi non forniscono supporto meccanico, ma l'ampia disponibilità li rende interessanti per funzioni di riempitivo con proprietà osteo-induttive e conduttive. Non sono invece dotati di potenziale osteogenico a causa dell'assenza della componente cellulare.

Una forma di frequente utilizzo è data dalla DBM (Demineralized Bone Matrix): essa è ricavata dalla demineralizzazione per estrazione acida dell'osso allogenico e contiene collagene, proteine e fattori di crescita. In base al processo di produzione è disponibile in varie forme come ad esempio in gel o in polvere (Figura 1.5). La DBM è spesso utilizzata in combinazione con innesti autologhi con l'obiettivo di un aumento del volume dell'innesto [6]. In generale, gli svantaggi associati all'utilizzo di alloinnesti riguardano le ridotte capacità rigenerative, il rischio di immunogenicità del tessuto trapiantato e l'eventualità (anche se remota) di trasmissione di malattie virali e batteriche [7].



Figura 1.5: diverse forme di DBM (matrice ossea demineralizzata).

Capitolo 2. Ingegneria tissutale

2.1 Definizione

Ogni anno migliaia di persone affette da varie patologie muoiono a causa della mancanza di un donatore o di un surrogato adatto alla sostituzione di un organo [9]. L'innalzamento della durata media di vita fa sì che vi sia un numero sempre maggiore di pazienti in lista d'attesa per il trapianto di organo e un quantitativo insufficiente di donatori tale da sopperire al bisogno. Inoltre, l'età sempre più avanzata dei donatori provoca, in generale, la compromissione della qualità dell'organo donato. La sostituzione di organi e tessuti danneggiati da traumi e/o malattie rappresenta dunque un problema di fondamentale importanza nell'ambito della medicina moderna [10].

Per far fronte a ciò, dispositivi meccanici e organi artificiali sono stati creati nell'ottica di una medicina sostitutiva. Queste tecniche hanno senza dubbio contribuito a salvare numerose vite, tuttavia presentano delle limitazioni: i dispositivi meccanici, infatti, non sono in grado di svolgere tutte le funzioni proprie di quelli biologici e sono poco efficaci nel controllo del progressivo deterioramento delle condizioni del paziente. Questi, ad oggi, rappresentano prevalentemente una soluzione provvisoria e non una *destination therapy* [9,10].

L'ingegneria tissutale è una disciplina che intende far fronte a queste problematiche cambiando la prospettiva: da un approccio di tipo *sostitutivo* ad uno di tipo *rigenerativo*. Il principio fondamentale prevede l'utilizzo di tecniche che permettano la generazione di un tessuto o di un organo che vada a sostituire il tessuto o l'organo non più funzionante. Si cerca quindi di fornire una soluzione definitiva alla cura dello stato patologico che possa evitare la somministrazione di debilitanti trattamenti farmacologici che sarebbero invece necessari nel caso di un trapianto. Essendo proprio del paziente, poiché ottenuto con le cellule dello stesso individuo che lo riceverà, il tessuto/organo di nuova formazione è capace di crescere con esso e rinnovarsi, permettendo così l'estensione del trattamento alla popolazione pediatrica [10].

Nei primi anni '70 un chirurgo ortopedico presso il Children's Hospital di Chicago intraprese una serie di esperimenti con l'obiettivo di generare nuova cartilagine in topi nudi impiantandovi piccole ossee seminate con condrociti. Sebbene senza successo, concluse correttamente che, con l'avvento di biomateriali innovativi, sarebbe stato possibile indurre la neoformazione di tessuto applicando cellule su scaffolds opportunamente configurati.

Negli anni successivi si susseguirono vari tentativi di rigenerazione di tessuti cartilaginei e pelle, ma il punto di svolta per la creazione di una vera e propria disciplina si ebbe nella seconda metà degli anni Ottanta grazie al contributo di Joseph Vacanti e Robert Langer.

Nel 1988 la tissue engineering è stata definita come “l’applicazione dei principi e dei metodi dell’ingegneria e delle scienze della vita per comprendere a fondo la relazione che esiste tra struttura e funzione nei tessuti viventi normali e patologici, per lo sviluppo di sostituti biologici che possano ripristinare, mantenere e migliorare la funzione tissutale”. Essa è quindi una tecnica interdisciplinare in cui convergono i contributi di varie scienze quali bioingegneria, biotecnologie, biologia molecolare, scienza dei materiali e medicina rigenerativa [10,11].

2.2 Componenti

L’obiettivo fondamentale della tissue engineering è quello della neomorfogenesi, termine con cui si indica la formazione di nuovo tessuto *in vitro* e *in vivo* [10]. Perché ciò sia possibile, cellule in grado di avviare e sostenere il processo devono trovarsi immerse in un ambiente adatto che permetta, e anzi favorisca, la rigenerazione del tessuto. Tali cellule devono essere seminate su un supporto che ne guidi l’organizzazione da un punto di vista strutturale e, stimulate tramite segnali chimici che ne promuovano la proliferazione all’interno di un bioreattore o direttamente *in vivo* [9].

L’ingegneria tissutale si fonda perciò su tre elementi essenziali: una componente cellulare, uno scaffold e dei fattori biochimici (Figura 2.1). Questi devono essere opportunamente combinati per generare un costrutto ingegnerizzato che, una volta impiantato, venga completamente integrato dall’organismo.

Importanti parametri di processo sono dunque la fonte cellulare, la costruzione della matrice di supporto, l’ambiente di coltura e gli stimoli applicati [9].

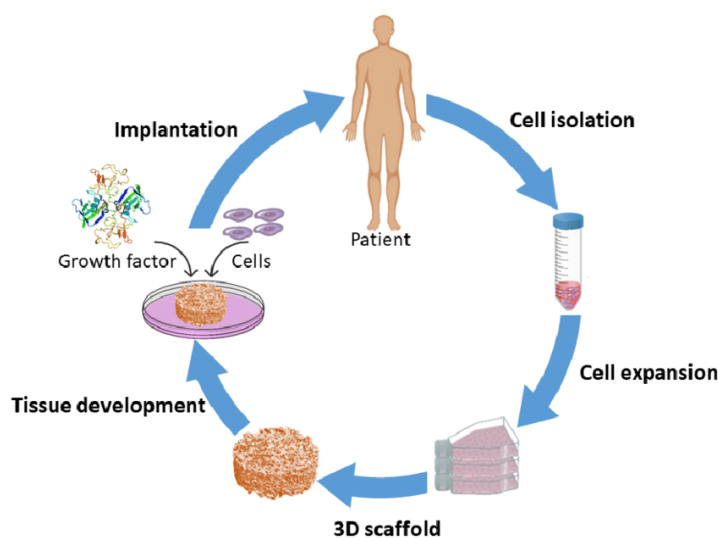


Figura 2.1: rappresentazione schematica del processo di ingegneria tissutale.

Per quanto riguarda la componente cellulare, in passato si era focalizzati sull'utilizzo di cellule specializzate provenienti da fonti autologhe, allogene o xenogene. Esse presentano però diverse limitazioni riguardanti scarsa disponibilità (nel caso delle autologhe) e problemi di rigetto o di trasmissione di infezioni virali (negli altri due casi). Per questo motivo l'interesse si è incentrato sull'utilizzo di cellule staminali. Esse possiedono due proprietà che le rendono particolarmente adatte allo scopo: un'elevata capacità proliferativa e l'abilità di differenziarsi in cellule di più lignaggi. Cellule staminali multi- o pluripotenti sono state isolate da varie regioni dell'organismo. Ad oggi sono frequentemente impiegate le staminali mesenchimali (MSC) derivate, ad esempio, dal midollo osseo, dal tessuto adiposo o dal cordone ombelicale, e le staminali pluripotenti indotte (iPSC) ottenute dalla riprogrammazione di cellule adulte [9, 12].

Riguardo alle condizioni di coltura, sono state implementate varie strategie al fine di ottimizzare l'efficacia e la produttività del sistema. I bioreattori sono dispositivi che consentono di ottenere un ambiente controllato in composizione e temperatura, e permettono inoltre di applicare sollecitazioni di carattere chimico, meccanico e/o elettrico al costruito in crescita [10]. Simulando le condizioni biologiche e regolando parametri come l'apporto di ossigeno, fattori biochimici presenti e stimoli, si può migliorare significativamente la risposta cellulare [9,10].

Per quanto concerne lo scaffold, esso deve possedere proprietà di biorisorbibilità e promozione dell'attività cellulare. Deve trattarsi di una struttura dotata di elevata porosità per consentire la penetrazione uniforme e la successiva proliferazione delle cellule, il passaggio di nutrienti e sostanze di rifiuto, e la vascolarizzazione del tessuto. Alcuni dei biomateriali principalmente impiegati nella fabbricazione di scaffold sono di origine naturale come i componenti della matrice extracellulare (ad esempio collagene, elastina, fibrina e acido ialuronico), alcune proteine (come la fibroina della seta) e alcuni polisaccaridi (come chitosano e alginato).

Una possibilità prevede l'utilizzo come scaffold di ECM derivate dalla decellularizzazione di tessuti provenienti da individui della stessa o di diversa specie. Questo tipo di approccio si è rivelato di successo in diversi casi, ma il rischio simultaneo di infezione e di immunogenicità avversa non ha escluso l'interesse verso l'impiego di biomateriali sintetici. Tra questi i maggiormente utilizzati sono alcuni poliesteri alifatici (p. es. PLA, PGA, PLGA e PCL), alcuni idrogeli (p. es., pHEMA) e alcuni ceramici (p. es., HA) [9, 10, 12].

Un tema di fondamentale importanza riguarda la presenza di vasi sanguigni nel tessuto ingegnerizzato. Nel caso delle procedure in vitro è impossibile aspettarsi una

vascolarizzazione del costrutto, al contrario, questa è resa possibile in vivo se si ricorre a condizioni e stimoli adeguati.

I metodi per la fabbricazione degli scaffolds sono numerosi e variano in base al materiale utilizzato e all'applicazione richiesta. Le nuove tecniche di stampa tridimensionale rappresentano un fattore di grande sviluppo nel settore della fabbricazione di strutture adatte alla TE [9].

Per quanto riguarda i fattori biochimici una vasta gamma di proteine e molecole segnale gioca un ruolo fondamentale nella crescita, differenziazione e proliferazione cellulare. I più comuni tra quelli sfruttati nelle applicazioni di ingegneria tissutale sono fattori di adesione e i fattori di crescita (GF).

I fattori di adesione sono le molecole di adesione cellulare (CAMs) e le proteine adesive dell'ECM. I fattori di crescita applicati più frequentemente sono invece le proteine morfogenetiche ossee (BMP), il fattore di crescita dei fibroblasti (bFGF o bFGF-2), il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), il fattore di crescita trasformante β (TGF- β) e i fattori di crescita insulino-simili (IGFs) [10,12].

Un aspetto critico relativo ai GFs è il controllo della loro distribuzione nel sito di interesse. Sebbene siano principalmente fattori solubili, essi possono essere incorporati nella matrice durante la fabbricazione dello scaffold. I metodi di applicazione utilizzati includono l'incapsulamento dei GFs in piccole particelle biodegradabili, il legame chimico con molecole della matrice e lo sfruttamento di cellule trasfettate che esprimano e rilascino i fattori di crescita (si ha quindi l'introduzione nella cellula di plasmidi di DNA codificanti per il gene del GF desiderato) [9,12].

È stato indagato anche il ruolo svolto dagli RNA non codificanti (ncRNA) nella regolazione molecolare dell'attività cellulare e della sintesi tissutale; essi sono risultati interessanti per la promozione della neomorfogenesi in vitro ed in vivo [9].

2.3 Campi di applicazione

Il settore della tissue engineering è oggetto di grande interesse nell'ambito della bioingegneria.

Da quando il concetto è stato introdotto, più di 30 anni fa, migliaia di studi e ricerche si sono susseguiti per cercare di applicare l'idea della TE ai reali bisogni clinici.

I possibili campi di applicazione esplorati riguardano tessuti appartenenti alla quasi totalità dei distretti corporei. Uno dei primi settori ad essere ampiamente studiato fu quello della rigenerazione della pelle: i sostituti cutanei costituiscono infatti i primi prodotti commercializzati dell'ingegneria tissutale [10]. Un altro fruttuoso ambito riguarda la

rigenerazione di tessuti cartilaginei destinati alla ricostruzione di naso, orecchio, trachea e cartilagine articolare.

Lo sfruttamento di matrici ECM decellularizzate ha poi ampliato lo sguardo verso il trapianto di interi organi ingegnerizzati quali, ad esempio, cuore, fegato, pancreas, polmoni e reni [12].

Negli ultimi anni sono stati raggiunti numerosi progressi anche nella rigenerazione di tessuti dell'apparato scheletrico, nervoso, cardio-vascolare e urogenitale.

Tuttavia, nonostante i promettenti risultati di laboratorio, la complessità del corpo umano, gli ostacoli scientifici e etici e la mancanza di finanziamenti a lungo termine, ostacolano ancora la traslazione delle tecniche TE verso applicazioni cliniche [9].

2.4 Bone Tissue Engineering (BTE)

L'applicazione della tissue engineering al tessuto osseo è un ambito enormemente studiato e in fase di grande sviluppo (Figura 2.2). L'obiettivo fondamentale è quello di consentire la rigenerazione delle ossa in presenza di difetti di dimensioni rilevanti che non ne permettano l'auto-riparazione. Le tecniche attualmente implementate, quali autotrapianti e allotrapianti, presentano alcune limitazioni esaminate nel capitolo precedente. Il concetto è quindi quello di realizzare un costrutto ingegnerizzato, combinando gli elementi tipici della TE, che funga da supporto per la neomorfogenesi e venga contestualmente riassorbito dall'organismo.

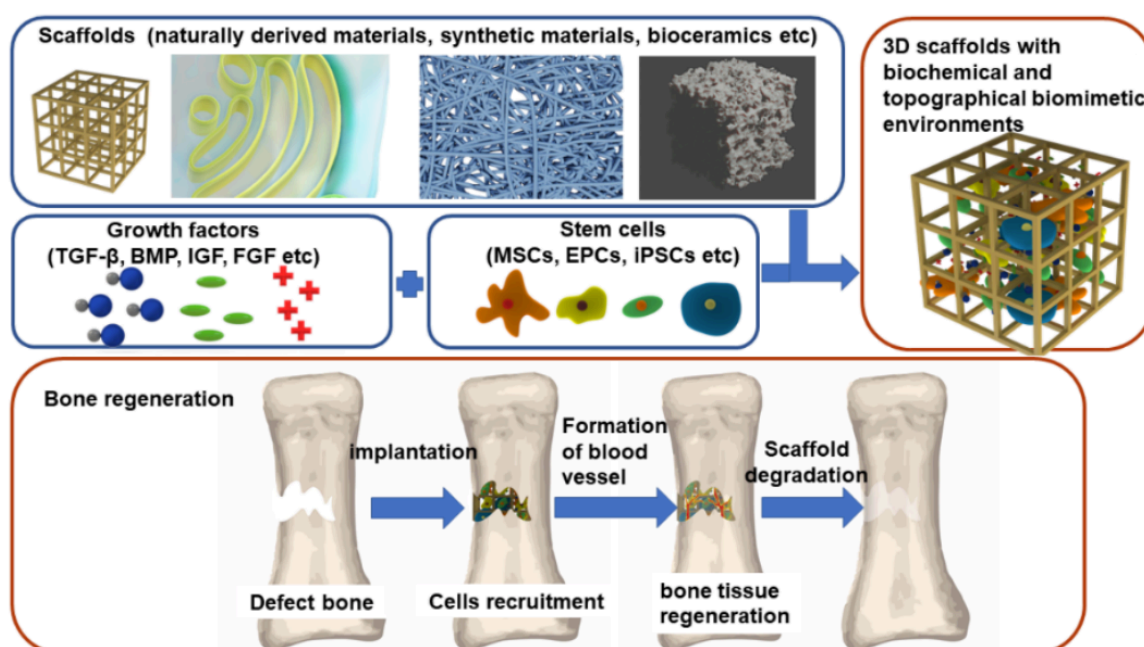


Figura 2.2: rappresentazione schematica del concetto di bone tissue engineering.

Data la complessità del processo di rigenerazione ossea, sono state studiate numerosissime combinazioni di scaffold, cellule e fattori di crescita che ne favoriscano lo sviluppo.

La scelta dei materiali e della configurazione dello scaffold è innanzitutto influenzata dall'applicazione di destinazione. È infatti necessario studiare le proprietà meccaniche della struttura ossea in esame al fine di produrre una matrice di supporto che possa riprodurle al meglio. Bisognerà effettuare uno studio sulla conformazione geometrica e sul ruolo strutturale che questa svolge. È inoltre essenziale tener conto dell'equilibrio necessario tra la competenza meccanica e la macro e micro-architettura che sono direttamente correlate alla funzionalità biologica. Per questi motivi, oltre al materiale utilizzato, anche il processo di produzione costituisce un aspetto fondamentale per la realizzazione di uno scaffold efficace.

Per quanto riguarda la componente cellulare e quella dei fattori biochimici, esse hanno il compito di attivare, stimolare e favorire il processo di rimodellamento. È quindi indispensabile individuare non solo i giusti elementi, ma anche la loro combinazione ottimale e i metodi di applicazione adeguati.

Ad oggi non sono definite procedure standard e l'applicazione clinica costituisce ancora una sfida per la BTE. Nei capitoli successivi saranno esaminati i componenti più rilevanti che si sono rivelati di successo nei molteplici studi effettuati in questo ambito.

L'ingegneria del tessuto osseo è un ambito in continua evoluzione che necessita di affrontare ancora numerosi ostacoli; tuttavia, le conoscenze finora acquisite e lo sviluppo di nuove tecnologie fanno di questa disciplina un campo promettente nel trattamento di questo tessuto [2].

Capitolo 3. Scaffold

3.1 Requisiti

Lo scaffold è una struttura tridimensionale progettata per simulare l'ECM del tessuto osseo, deve pertanto fornire un ambiente adatto al processo di rimodellamento [13].

Lo scaffold ideale deve favorire le fasi di osteointegrazione, osteoconduzione, osteoinduzione e osteogenesi [4], e perché ciò sia possibile sono necessari alcuni requisiti specifici.

Il materiale deve innanzitutto essere biocompatibile e biorisorbibile in modo che possa essere progressivamente sostituito da tessuto neofornito senza evocare reazioni sfavorevoli.

La velocità di degradazione della struttura di sostegno dovrebbe inoltre essere analoga a quella di formazione del nuovo tessuto per garantire il mantenimento della stabilità meccanica del supporto.

Una caratteristica importante è data dalla topografia della superficie: è stato dimostrato come la rugosità superficiale influenzi l'adesione e proliferazione cellulare. In particolare, l'interazione delle cellule con l'ambiente circostante avviene su scala nanometrica: a questo proposito biomateriali nano-strutturati con nanoparticelle, nanofibre o nanosuperfici hanno guadagnato un crescente interesse nelle applicazioni BTE [14].

Un altro parametro fondamentale è la porosità della struttura: essa deve essere interconnessa e di dimensioni tali da consentire la diffusione di nutrienti e ossigeno, la crescita cellulare, la rimozione dei prodotti di degradazione e la vascolarizzazione del tessuto. La dimensione dei pori non deve però inficiare le proprietà meccaniche dello scaffold, che devono essere paragonabili a quelle dell'osso. Ad oggi è riconosciuto come una distribuzione gerarchica della porosità dalla scala macro a quella nano-porosa sia efficace per lo sviluppo osseo. Una dimensione media dei pori compresa tra 200 e 350 μm si è rivelata ottimale a tale scopo. [4,13].

3.2 Biomateriali

Diversi biomateriali sono stati, e sono tutt'ora, studiati per la produzione di scaffold adatti alla rigenerazione del tessuto osseo. Di seguito sono riportati i principali materiali con approvazione FDA utilizzati singolarmente o in combinazione tra loro.

3.2.1 Polimeri naturali

I polimeri naturali sono biomateriali prodotti da organismi viventi e in quanto tali mostrano un'eccellente biocompatibilità e basso potenziale immunogenico [4]. Alcuni di essi sono i componenti della matrice extracellulare per cui risultano caratterizzati da una relativa

disponibilità e facilità di estrazione [15]. La proprietà che li contraddistingue è l'ottima riassorbibilità che si basa su processi di degradazione enzimatica e idrolitica [16]. La quasi totalità dei polimeri naturali può essere prodotta in forma di hydrogel: un colloide formato da una rete di catene polimeriche disperse in acqua, la quale risulta presente in percentuali molto elevate. Gli idrogeli sono in grado di imitare la topografia dell'ECM e fungere da carrier per molecole bioattive [17].

I principali svantaggi che caratterizzano questi materiali sono dati dalle scarse proprietà meccaniche e dalla variabilità da lotto a lotto che dipende fortemente dalle procedure di isolamento utilizzate [15].

Sono di seguito riportati i polimeri naturali più utilizzati nella fabbricazione degli scaffolds.

3.2.1.1 Collagene

Il collagene è una proteina fibrosa e costituisce il componente fondamentale della matrice extracellulare. Ne esistono 28 tipi che differiscono tra loro in base alla disposizione delle molecole di tropocollagene. Il tropocollagene ha la configurazione di una superelica destrorsa formata da 3 eliche sinistrorse di catene alfa polipeptidiche composte principalmente dalla ripetizione di triplete glicina, prolina, idrossiprolina. Tra i vari tipi il più abbondante è il collagene di tipo I in cui le catene formano delle fibre reticolando in una disposizione "fianco a fianco" [10].

Il collagene può essere ricavato da tessuti animali come ad esempio dalla coda di ratto o dalla pelle di maiale; il processo di estrazione più comune è il trattamento proteolitico con pepsina che dissolve i legami incrociati del collagene e i peptidi terminali, rendendolo non immunogenico [18].

La catena proteica del collagene possiede sequenze di aminoacidi che possono essere utilizzate per la bio-identificazione cellulare negli scaffolds: in particolare, le sequenze RGD influenzano le integrine che mediano le interazioni cellula-cellula e cellula-ECM migliorando quindi l'adesione cellulare [4].

A causa della sua elevata idrofilicità, il collagene ha scarse proprietà meccaniche e può presentare fenomeni rigonfiamento dopo l'impianto [18]. La sua resistenza meccanica può comunque essere aumentata mediante trattamenti chimici di reticolazione [15].

Il collagene è ampiamente sfruttato in forma di *gelatina*. Essa è ottenuta per idrolisi del collagene attraverso un processo termico che ne provoca la denaturazione. La gelatina viene solitamente combinata con altri polimeri o materiali ceramici per un miglioramento delle proprietà meccaniche [4].

3.2.1.2 Fibrina

La fibrina è una proteina coinvolta nella coagulazione del sangue e in quanto tale può avviare l'emostasi e fornire un substrato iniziale per la proliferazione, differenziazione, adesione e migrazione cellulare [18]. Essa assume la forma di un gel insolubile ottenuto a partire dal fibrinogeno (dimero solubile e inattivo) e dalla trombina (enzima). Questi possono essere estratti dal sangue dei pazienti, consentendo la costruzione di uno scaffold autologo. Quando i due componenti vengono miscelati la trombina converte il fibrinogeno in frammenti che polimerizzano per formare lunghi filamenti di fibrina, i quali si aggregano in coaguli articolati. La struttura dei substrati può essere facilmente controllata regolando le concentrazioni di fibrinogeno e trombina. Sebbene la fibrina si degradi rapidamente e abbia scarse proprietà meccaniche, la sua combinazione con altri materiali permette di superare queste limitazioni [15,18].

3.2.1.3 Acido ialuronico

L'acido ialuronico è un glicosaminoglicano non solfato costituito da residui di N-acetilglucosammina e di acido D-glucuronico [10]. Si trova nella maggior parte dei tessuti connettivi del corpo tra cui i tendini, la cartilagine e l'umor vitreo. Svolge importanti funzioni fisiologiche e fornisce idratazione e sostegno nei processi cellulari. Tuttavia, l'acido ialuronico è caratterizzato da alcuni svantaggi: esso è solubile in ambiente acquoso, presenta velocità di riassorbimento elevate, ha ridotte proprietà viscoelastiche e non è processabile. Per questo motivo si ricorre a un polimero semisintetico ottenuto per esterificazione dei gruppi carbossilici dell'acido glucuronico con alcol benzilico (HYAFF). Esso supera i limiti tipici dell'acido ialuronico e consente di realizzare una grande varietà di prodotti.

Grazie alle sue proprietà viscoelastiche può essere impiegato per realizzare scaffold con funzioni strutturali e di riempitivo [15].

3.2.1.4 Fibroina della seta

La seta è un polipeptide prodotto da ragni, larve di *Bombyx mori*, acari e alcuni insetti. Essa è composta principalmente da fibroina di seta (SF) e sericina. La prima è una proteina fibrosa biocompatibile, mentre la seconda potrebbe evocare reazioni allergiche. Il primo passo nell'estrazione della SF è quindi la rimozione della sericina attraverso un processo detto degumming. In questa fase, la seta viene posta in acqua bollente in presenza di sali o detergenti. La fibroina è costituita da due catene collegate da legami disolfuro, che si dispongono in una configurazione a foglietto- β . I legami ad idrogeno tra i β -sheets determinano la rigidità della proteina che caratterizza la resistenza tipica delle fibre di seta. La

SF è altamente biocompatibile, ha elevate proprietà meccaniche e consente l'adesione e proliferazione cellulare. La resistenza a trazione è in un intervallo tra 360-530 MPa e il modulo elastico tra 10-15 GPa, parametri ottimali nell'ambito dell'ingegneria del tessuto osseo. La SF può essere realizzata in film, idrogel, strutture porose e impiegata nella costruzione di matrici composite [19].

3.2.1.5 Chitosano

Il chitosano è un polisaccaride lineare i cui elementi costitutivi sono la glucosamina e la N-acetil glucosamina. È derivato da gusci di crostacei mediante la deacetilazione totale o parziale della chitina attraverso idrolisi alcalina. Strutturalmente simile ai GAGs, il chitosano, è coinvolto nell'adesione, nella differenziazione e nella morfogenesi degli osteoblasti, promuovendo la formazione di matrice ossea [18]. È stato inoltre dimostrato come possieda attività antimicrobica contro alcuni batteri e funghi [19]. Sebbene l'insolubilità in acqua, la rapida degradazione e l'associazione a reazioni allergiche limitino il potenziale del chitosano, le sue proprietà possono essere migliorate combinandolo con altri materiali ceramici e polimerici [18]. Con il chitosano è possibile realizzare strutture porose interconnesse principalmente attraverso tecniche di congelamento e liofilizzazione di soluzione. I gruppi amminici cationici sulle catene chitosaniche possono interagire elettrostaticamente con gruppi anionici o possono essere funzionalizzati con metodi chimici e fisici per aumentare la resistenza meccanica di questi scaffolds [15].

3.2.1.6 Alginato

L'alginato è un polisaccaride anionico derivato dalle alghe brune ampiamente utilizzato in campo biomedico. È un polimero composto da residui di acido d-mannuronico (M) e acido glucuronico (G). Oltre ad essere biodegradabile e atossico, è economico e facile da manipolare. L'alginato è noto per la sua grande capacità di assorbire acqua: fino a 300 volte il proprio peso. In particolare, è stato studiato per le sue proprietà di gelificazione reversibile attraverso l'interazione con cationi bivalenti come Ca^{2+} , Sr^{2+} e Ba^{2+} , consentendo lo sviluppo di gel combinati con altri tipi di materiali come collagene, ceramici e biovetri [15,16]. Può essere utilizzato anche nella realizzazione di scaffold rigidi: miscelato con altri materiali aumenta l'integrità e la resistenza meccanica dell'impalcatura [19].

3.2.2 Polimeri sintetici

I polimeri sintetici rappresentano una soluzione interessante per le loro proprietà fisico-chimiche e meccaniche [16].

I poliesteri alifatici come acido poliglicolico (PGA), acido polilattico (PLA), policaprolattone (PCL) e i rispettivi copolimeri sono i più comunemente utilizzati nell'ingegneria dei tessuti ossei. Sono biodegradabili, biorisorbibili e, in generale, consentono l'adesione cellulare [20].

Trattandosi di poliesteri la degradazione avviene per idrolisi: si ha la formazione di molecole naturali che non risultano quindi tossiche per l'organismo.

I polimeri sintetici possono essere facilmente fabbricati in diverse forme e permettono un maggiore controllo sulle caratteristiche fisico-chimiche degli scaffold come porosità, solubilità e velocità di degradazione. A differenza dei biomateriali di derivazione naturale essi non presentano variabilità da lotto a lotto, consentono produzione su larga scala e possono essere utilizzati per creare forme geometriche precise con un'ampia gamma di proprietà meccaniche prevedibili [4,15]. Tuttavia, essi presentano una ridotta capacità di interazione con la componente cellulare e una maggiore possibilità di reazioni avverse causate dalla produzione di sottoprodotti acidi derivanti dalla degradazione [21].

3.2.2.1 Acido poliglicolico (PGA)

Si ottiene attraverso polimerizzazione per condensazione dell'acido glicolico (Figura 3.1). In ambiente biologico presenta un periodo di degradazione piuttosto breve (da 4 a 12 mesi) [4].

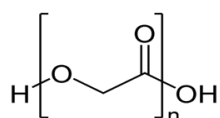


Figura 3.1: unità monomerica dell'acido glicolico.

3.2.2.2 Acido polilattico (PLA)

È ottenuto per condensazione di monomeri di acido lattico (Figura 3.2). Rispetto all'acido poli-glicolico, è dotato di una maggiore idrofobicità a causa della presenza di un gruppo metilico in più [10]. Il PLA ha un tasso di degradazione compreso tra 12 mesi e 2 anni [4].

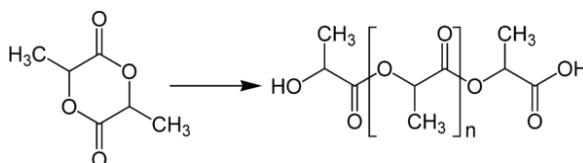


Figura 3.2: la molecola dell'acido lattico e il corrispondente polimero.

3.2.2.3 Copolimero di acido poliglicolico e acido polilattico (PLGA)

Grazie alla combinazione dei due monomeri, acido lattico e glicolico, è possibile ottenere un copolimero (PLGA) del quale si regola la velocità di degradazione variando il rapporto tra i monomeri (Figura 3.3) [10]. Il PLGA presenta un più elevato modulo elastico rispetto ai singoli componenti [4].

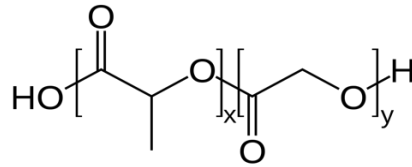


Figura 3.3: unità monomerica del copolimero PLGA.

3.2.2.4 Policaprolattone (PCL)

Si tratta di un polimero dotato di elevata cristallinità e ottime proprietà meccaniche (Figura 3.4) [21]. Il tasso di degradazione del PCL è più lento di quello di PGA, PLA o PLGA ed è pertanto ideale per applicazioni di impianti a lungo termine [15].

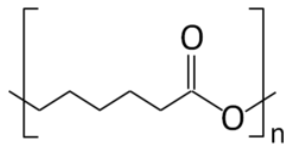


Figura 3.4: unità monomerica del policaprolattone.

3.2.3 Ceramiche

I materiali ceramici sono composti inorganici refrattari. Dato che circa il 65% del tessuto osseo è costituito da matrice inorganica, [10] materiali bioattivi come fosfati di calcio e vetri biologici sono stati da tempo impiegati come sostituti ossei. I ceramici più utilizzati nella realizzazione di scaffolds sono l'idrossiapatite (HA), il beta-fosfato tricalcico (β -TCP) e varie tipologie di biovetri. La bioattività di questi materiali deriva dalla capacità di mimetizzazione con la fase minerale dell'osso fornendo la possibilità di riassorbimento del materiale impiantato e formazione di nuovo tessuto [16].

Le proprietà meccaniche dei ceramici sintetici dipendono dalla struttura policristallina che, a sua volta, è legata al processo di formazione del composto [10].

Un fattore che limita l'applicazione di questi materiali in forma pura è dato, in generale, dalla loro estrema fragilità che non consente la costruzione di strutture portanti per zone sottoposte a particolare carico meccanico [18,22]. A causa delle suddette caratteristiche i materiali ceramici sono più frequentemente utilizzati come additivi (fillers).

3.2.3.1 Idrossiapatite (HA)

Il termine idrossifosfato di calcio o idrossiapatite indica un composto ben definito dato dalla formula $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, con un rapporto ideale Ca/P di 10:6 [10]. L'HA costituisce circa l'85% della fase inorganica del tessuto osseo, per cui è il fosfato di calcio più studiato per la produzione di scaffold ossei. Può essere ottenuta da fonti naturali o essere sintetizzata mediante vari processi. Ad esempio, può essere preparata per precipitazione acquosa di una soluzione contenente quantità adeguate di Ca^{2+} e PO_4^{3-} a un pH superiore a 9, seguita poi da fasi di filtrazione, essiccazione e sinterizzazione [4,15].

Le idrossiapatiti sintetiche sono spesso difettive presentando ioni vicarianti, lacune e difetti reticolari; inoltre sono dotate di proprietà meccaniche leggermente inferiori rispetto all'HA naturale tra cui una ridotta resistenza e più elevata fragilità. La stabilità chimico-fisica dei fosfati di calcio dipende particolarmente da pH e temperatura [10]. L'HA è una delle fasi più stabili in condizioni fisiologiche: ha una bassa solubilità e, di conseguenza, un tasso di riassorbimento più lento [15].

3.2.3.2 Beta-fosfato tricalcico (β -TCP)

Il β -TCP ha formula chimica $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e presenta dunque un rapporto Ca/P di 3:2. La sintesi di questo materiale si ottiene in ambiente secco a temperature superiori ai 900°C [10]. Rispetto all'idrossiapatite, il fosfato tricalcico ha una minore stabilità meccanica e una maggiore solubilità; questi fattori gli conferiscono una più rapida degradazione in ambiente biologico. Pertanto, un equilibrio ottimale si ottiene spesso combinando una fase HA e una fase β -TCP per ricavare il fosfato di calcio bifasico (BCP). Questo accoppiamento porta a materiali con un equilibrio più appropriato tra riassorbimento e solubilizzazione, che garantisce la stabilità del composto promuovendo al contempo la crescita ossea [4].

La struttura cristallina dei fosfati di calcio consente l'incorporazione al loro interno di ioni che ne incrementano la bioattività. È riconosciuto che il dopaggio di questi materiali con ioni metallici come stronzio (Sr^{2+}), magnesio (Mg^{2+}), manganese (Mn^{2+}) e zinco (Zn^{2+}), in modo singolo o combinato, svolge ruoli fondamentali nello sviluppo osseo.

Lo stronzio è presente nel tessuto osseo in quantità considerevoli, in particolare in regioni con elevato turnover metabolico. La sua presenza è associata all'aumento dell'apoptosi degli osteoclasti, al potenziamento della proliferazione degli osteoblasti e alla sintesi di collagene. Tutto ciò promuove la formazione ossea e ne inibisce il riassorbimento.

Il magnesio è correlato alla mineralizzazione del tessuto calcificato, la sua concentrazione inizialmente incrementa e poi diminuisce durante il processo di calcificazione.

Il manganese promuove l'adesione cellulare grazie ad un aumento dell'affinità legante-ligando delle integrine che mediano l'interazione tra le cellule e l'ECM.

Lo zinco, in modo simile al Mg, promuove la formazione ossea e la sua carenza è associata a una diminuzione della densità ossea. Inoltre, Zn influenza la cristallinità e la morfologia dei cristalli biologici di apatite [4,22].

3.2.3.3 Biovetri

I biovetri o vetri biologici (BGs) sono materiali ceramici policristallini appartenenti al gruppo delle vetroceramiche. Si ottengono per cristallizzazione localizzata dei vetri attraverso la precipitazione di piccole quantità di metalli (come Cu, Au e Ag) [10].

I principali componenti dei biovetri sono Na_2O , CaO , SiO_2 e P_2O_5 ; la prima formula realizzata, inventata dal professore Larry Hench, è composta dal 45% di SiO_2 , 24.5% di Na_2O , 24.5% di CaO , e 6% di P_2O_5 ed è stata denominata 45S5 Bioglass [23].

I BG presentano ottime proprietà osteoconduttive e osteointegrative: una volta impiantati, gli ioni mobili presenti nel biovetro reagiscono con la matrice extracellulare, con conseguente produzione, sulla superficie dello scaffold, di uno strato di gel ricco di silice altamente poroso. Successivamente, gli ioni calcio e fosfato, reagiscono e precipitano sul gel di silice formando una patina di idrossiapatite su cui verranno adsorbite proteine, fattori di crescita e collagene. Lo strato di HA neoformata attrae i macrofagi per avviare la guarigione, nonché gli osteoblasti e le cellule osteoprogenitrici per la generazione di nuovo tessuto [24].

Nelle applicazioni di BTE i biovetri sono spesso utilizzati in forma mesoporosa che presenta pori di diametro compreso all'incirca tra 2 e 100 nm. Questi sono dotati di una maggiore area specifica superficiale che si riflette in una più spiccata bioattività [22].

In generale, l'assorbimento dei BG nei tessuti circostanti richiede spesso anni per essere completato, limitando l'uso di scaffold interamente composti di biovetro [18].

3.2.4 Compositi

I vari materiali elencati, presi singolarmente, presentano relativi vantaggi e svantaggi. I materiali compositi sono dati dalla combinazione di due o più materiali con l'obiettivo di abbinare le caratteristiche ottimali dei singoli e creare così una struttura che meglio si adatti al ruolo di scaffold. I compositi principali sono del tipo: polimero/polimero o polimero/ceramico [17].

I polimeri naturali possiedono eccellente biocompatibilità e caratteristiche di degradazione ottimali, ma sono carenti dal punto di vista meccanico. Al contrario, i polimeri sintetici mostrano versatilità nei processi di fabbricazione e buone proprietà meccaniche, ma hanno

inferiori capacità di interazione con le cellule. Ciò ha indotto alla realizzazione di strutture, ottenute tramite vari metodi di fabbricazione, date dalla combinazione delle due categorie: accoppiamenti come PLA/collagene, PCL/gelatina o PCL/chitosano hanno riportato risultati soddisfacenti [13].

Nell'ambito dei compositi l'accostamento polimero-ceramico è sicuramente quello di maggior successo. Gli scaffolds risultanti possono, in generale, essere ottenuti mescolando polveri ceramiche a soluzioni polimeriche e utilizzando diverse tecniche di produzione, depositando una componente ceramica in una matrice polimerica o depositando una fase polimerica su una struttura ceramica [4]. I ceramici bioattivi sono ampiamente sfruttati in forma di nanoparticoli additivi in substrati polimerici.

La presenza dei ceramici in generale migliora la resistenza alla compressione, il tasso di degradabilità e la capacità osteogenica dello scaffold, mentre la fase polimerica ha il compito di mantenere una buona deformabilità e fornire meccanismi di reticolazione. Compositi di β -TCP/bioglass, HA/gelatina e PCL/HA sono frequentemente riportati in uso [13].

3.3 Tecniche di fabbricazione

Le tecnologie di fabbricazione ad oggi utilizzate per la produzione di scaffolds sono numerose e possono essere sostanzialmente divise in due categorie: tecniche convenzionali e tecniche di Rapid Prototyping (RP). La maggior parte delle tecniche convenzionali sfruttano metodi sottrattivi in cui parti del materiale vengono rimosse da un blocco iniziale per raggiungere la forma desiderata. Le tecniche RP sono state più recentemente introdotte con l'obiettivo di superare i limiti di quelle standard [17]. Sono di seguito riportate le principali tecniche di fabbricazione con una valutazione dei relativi pro e contro.

3.3.1 Tecniche convenzionali

Le tecniche convenzionali hanno il vantaggio di essere metodologie ben consolidate nella pratica e di essere, in generale, processi meno costosi rispetto a quelli RP. Ciò è dovuto anche al fatto che si tratta di metodi meno sofisticati che prevedono una definizione meno accurata della struttura dello scaffold [13].

3.3.1.1 Solvent casting and Particulate leaching

Questa tecnologia prevede la dissoluzione di una matrice polimerica in un opportuno solvente contenente una distribuzione uniforme di particolato di un agente porogeno (solitamente sale, cera o zuccheri). Segue poi l'evaporazione del solvente che genera una matrice incorporata in

particelle di sale; questa viene immersa in acqua dove l'agente porogeno si discioglie per produrre una struttura altamente porosa (Figura 3.5).

Questa tecnica consente di realizzare scaffolds in polimeri sintetici (PLA, PGA, PLC e relativi copolimeri) e materiali compositi (PGA/ β -TCP) con elevata porosità e dimensione dei pori regolabile intorno ai 500 μm circa [17,23]. Il processo è relativamente facile da eseguire e i costi delle attrezzature sono contenuti. Lo svantaggio principale è rappresentato dal fatto che, tramite questa tecnica, è possibile realizzare solo strutture di spessore ridotto (fogli e tubi) per assicurare la rimozione dell'agente porogeno. Eventuali residui, infatti, potrebbero risultare tossici per l'organismo [17].

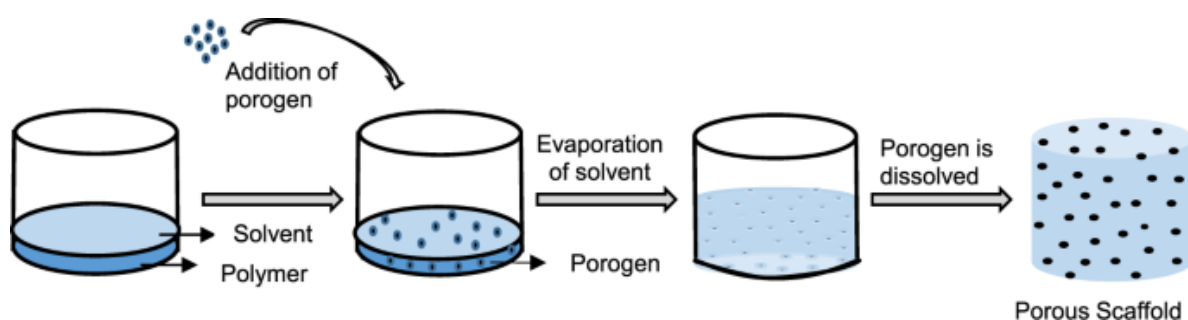


Figura 3.5: rappresentazione schematica della tecnica di Solvent casting and Particulate leaching.

3.3.1.2 Freeze drying

La tecnica di Freeze drying è nota anche come liofilizzazione o crioessiccamento. Innanzitutto, si ha la dissoluzione di un polimero in un solvente adatto, la soluzione polimerica viene poi raffreddata al di sotto del suo punto di congelamento portando alla solidificazione del solvente. Quest'ultimo è rimosso tramite un processo di sublimazione sottovuoto, restituendo una struttura "asciutta" e porosa (Figura 3.6).

Un vantaggio della tecnica è dato dalla possibilità di incorporare nello scaffold eventuali fattori biologici grazie all'impiego di temperature non elevate. Gli svantaggi sono i lunghi tempi di fabbricazione, l'elevato consumo di energia, l'uso di solventi potenzialmente citotossici e la produzione di pori irregolari e di piccole dimensioni (tipicamente compresi tra 15 e 35 μm). Per superare quest'ultimo problema, sono state testate modifiche tecniche come la variazione della temperatura di congelamento (-10°C ÷ -70°C) e l'introduzione di un ulteriore passaggio di annealing. L'annealing prevede il riscaldamento controllato della soluzione congelata ad una temperatura ben precisa, al di sopra di quella di transizione vetrosa, ma al di sotto di quella di fusione del ghiaccio.

Gli scaffolds prodotti con queste modificazioni hanno mostrato un sostanziale miglioramento della dimensione dei pori (85-325 μm) (Figura 3.7) [17].

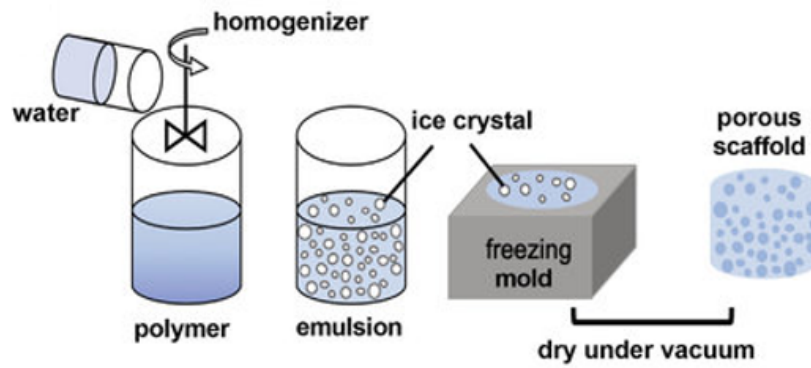


Figura 3.6: rappresentazione schematica della tecnica di freeze drying.

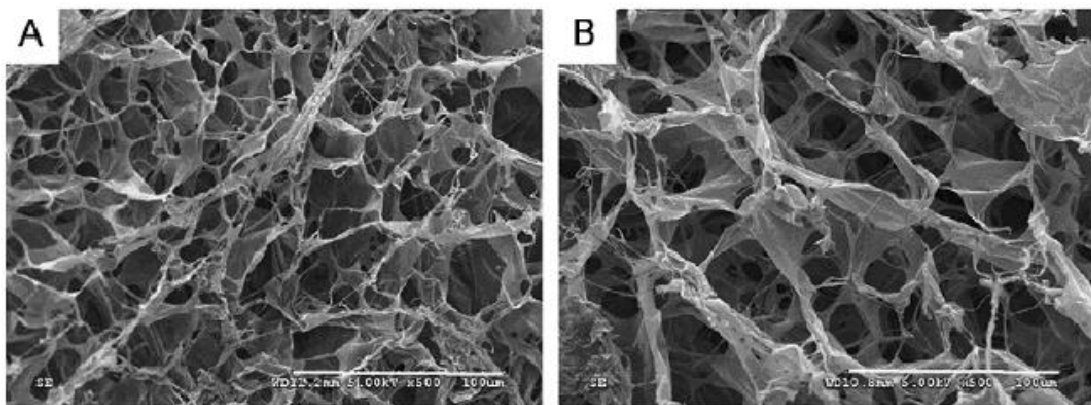


Figura 3.7: immagine SEM di uno scaffold in collagene ottenuto tramite freeze-drying.

3.3.1.3 Cryotropic gelation

Un processo simile al freeze drying è rappresentato dalla cryotropic gelation o cryogelation (Figura 3.8). Una soluzione polimerica sospesa in acqua (o in altri solventi) è portata a una temperatura di sub-congelamento con una separazione di fase tra solvente e soluzione precursore. A questa temperatura, l'acqua cristallizza e il precursore attraversa una fase di polimerizzazione che comporta una reticolazione permanente tra le molecole polimeriche. La struttura porosa si crea quando i cristalli di ghiaccio intrappolati all'interno del gel polimerizzato vengono eliminati tramite scongelamento.

I principali vantaggi della criogelazione sono: la possibilità di controllo della dimensione media dei pori (attraverso un'attenta selezione del rapporto tra solvente e precursore e di altri parametri di processo) e la possibilità di integrare fattori di crescita nel gel. Inoltre, la porosità e le proprietà meccaniche del materiale possono essere migliorate aggiungendo riempitivi compositi, fibre e altri polimeri nella miscela di soluzioni. Un esempio è dato dall'inserimento di fibre in PCL elettrofilate all'interno di una soluzione di hydrogel di gelatina che ha aumentato notevolmente il modulo di Young del costrutto risultante.

Con la tecnica di cryotropic gelation le interconnessioni dei pori non sono sempre garantite poiché la porosità viene creata casualmente come sottoprodotto dell'interazione chimica tra le molecole delle soluzioni precursori. Questo fatto può essere migliorato inserendo diversi additivi e aumentando i tempi di reticolazione. L'altra limitazione geometrica di questo metodo è data dal fatto che richiede l'impiego di procedure e metodi aggiuntivi per creare la forma esterna della struttura finale.

Esempi di materiale utilizzati per la produzione di scaffolds con questa tecnica sono la fibroina di seta e compositi come gelatina/HA e gelatina/PCL [13].

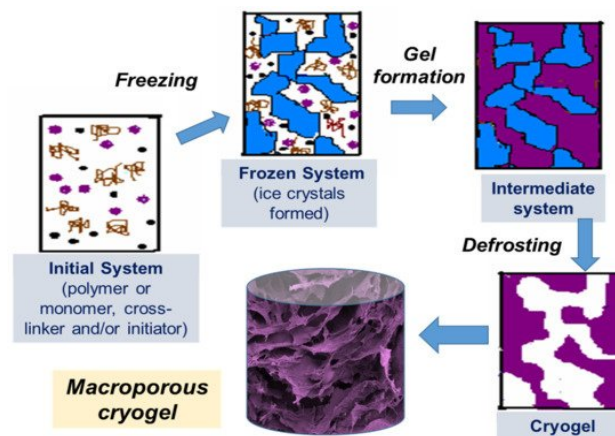


Figura 3.8: rappresentazione schematica della tecnica di cryotropic gelation.

3.3.1.4 Gas Foaming

La tecnica del Gas Foaming (GF) utilizza gas per generare porosità nello scaffold e può essere realizzata in diversi modi.

In un primo caso il processo inizia con la miscelazione di un polimero, di un agente schiumogeno e di un legante, in una gelatina o matrice amorfa. La miscela viene modellata nella forma del futuro scaffold, lasciata solidificare parzialmente e poi immersa in un bagno di soluzione chimicamente reattiva. La reazione chimica tra l'agente schiumogeno e il solvente crea come sottoprodotti dei gas che, fuoriuscendo dalla matrice preformata, ne causano l'erosione producendo i pori (Figura 3.9) [13].

Per evitare l'utilizzo del solvente reattivo, un secondo metodo prevede la pressurizzazione ad alta temperatura di una miscela del polimero con un gas inerte (CO₂ o N₂). Si ha poi l'induzione di un'instabilità termodinamica attraverso una rapida caduta di pressione che provoca la diffusione del gas con conseguente formazione della porosità (Figura 3.10).

La struttura dello scaffold può essere controllata regolando la quantità di gas presente nella soluzione polimerica [23].

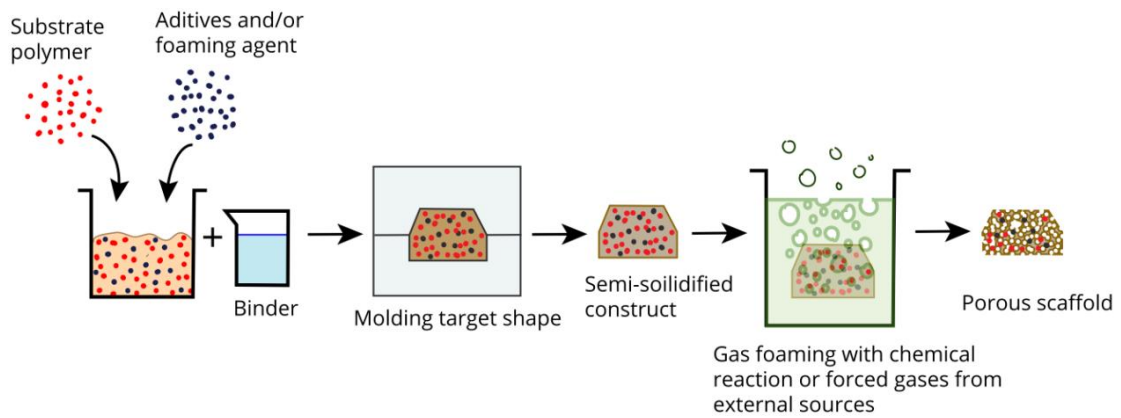


Figura 3.9: rappresentazione schematica della tecnica di Gas Foaming con solvente.

Questi processi producono tipicamente strutture spugnose con una dimensione dei pori nell'intervallo di 30-700 μm e una porosità fino all'85 % [17]. Entrambi i metodi presentano però il difetto dell'incapacità di realizzare porosità completamente interconnesse. Diversi sistemi sono stati proposti per superare questo problema. Uno di questi è la combinazione di procedure di GF e di particulate-leaching: aggiungendo fasi idrosolubili come NaCl e gelatina nel substrato, è stato riscontrato un aumento efficace della porosità e delle interconnessioni all'interno dello scaffold [13,17].

Polimeri puri come PLA, PGA e PCL hanno proprietà reologiche che li rendono eccezionalmente adatti a procedure di Gas Foaming, ma risultano compatibili anche polimeri naturali come chitosano, alginato e gelatina, copolimeri sintetici come PLGA, e materiali compositi come PLA/HA, chitosano/HA e PLGA/HA [13].

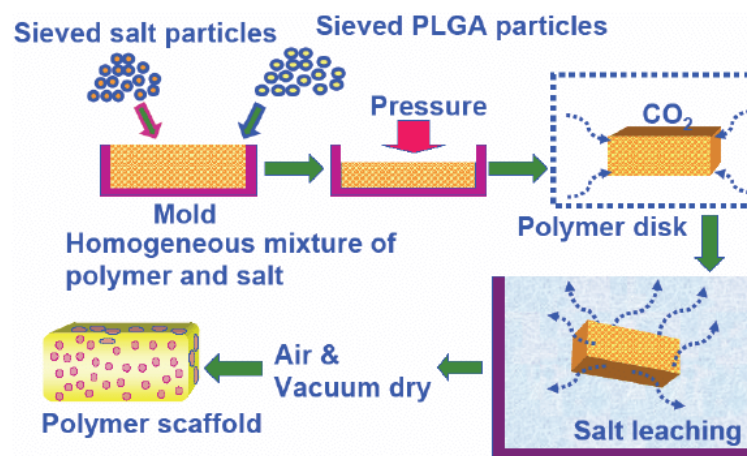


Figura 3.10: rappresentazione schematica della combinazione delle tecniche di Gas Foaming e Particulate-leaching.

3.3.1.5 Powder forming

Il powder forming è il metodo per la produzione di strutture ceramiche porose. Le polveri di materiale ceramico vengono messe in sospensione in acqua o etanolo formando un impasto liquido detto “slurry”. Questo impasto viene utilizzato per produrre un ‘corpo verde’, ossia una struttura non definitivamente coesa, attraverso processi di tipo “dry” o “wet”. Tra questi, la tecnica di replicazione detta “polymer-sponge method” è particolarmente adatta per la realizzazione degli scaffolds. Essa prevede la costruzione di un template in materiale polimerico all’interno del quale è versato lo slurry; in tal modo è possibile realizzare un corpo verde con elevata porosità e dimensione dei pori regolabile (Figura 3.11). Si andrà poi incontro a processi di asciugatura e sinterizzazione che restituiranno una struttura ceramica grazie all’eliminazione del template [17].

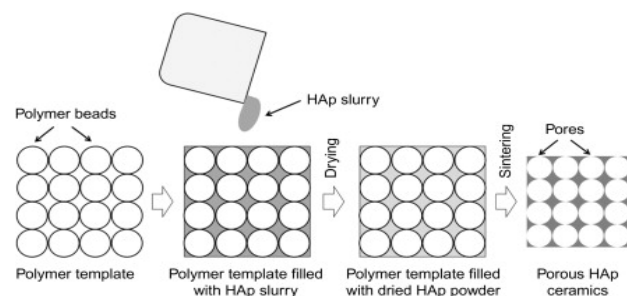


Figura 3.11: rappresentazione schematica della tecnica di powder-forming.

3.3.1.6 Sol-gel

Il processo sol-gel è un altro dei principali metodi per la fabbricazione di prodotti ceramici (Figura 3.12). La tecnica si basa sulla polimerizzazione inorganica di alcossidi metallici. Essa prevede la sintesi di una soluzione colloidale con l’aggiunta di un surfattante (*sol*) che costituisce il precursore per la formazione di un *gel* attraverso reazioni di condensazione e gelificazione. In base ai trattamenti chimici, termici e meccanici a cui andrà incontro il sol, è possibile ottenere prodotti diversi: si possono realizzare materiali ceramici e vetrosi sotto forma di monoliti, polveri ultrafini a particelle sferiche, coatings a film sottile, membrane microporose, fibre e aerogel altamente porosi [17]. Il metodo sol-gel è ampiamente applicato per la produzione dei biovetri attraverso sinterizzazione di un gel di silice a una temperatura di circa 600 °C. Il vantaggio di questa tecnica rispetto ai metodi di fusione tradizionali riguarda l’impiego di temperature relativamente basse: ciò permette una maggiore variabilità nella scelta della composizione, una più elevata purezza raggiungibile e una riduzione dei costi di produzione [23].

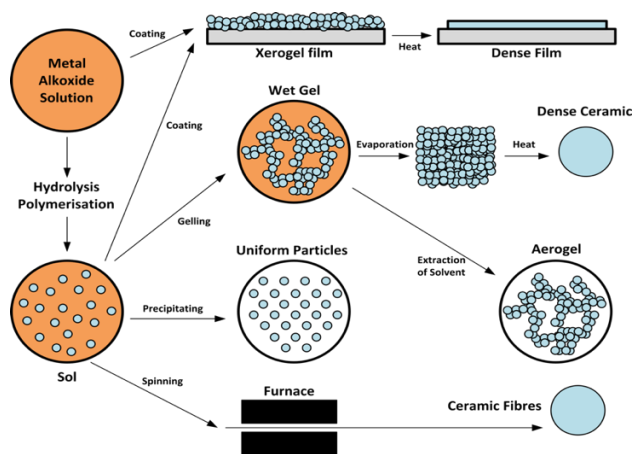


Figura 3.12: rappresentazione schematica della tecnica sol-gel.

3.3.1.7 Elettrospinning

L'elettrospinning è un processo che consente la produzione di fibre polimeriche mediante l'utilizzo di una forza elettrostatica. A differenza delle convenzionali tecniche di filatura, capaci di realizzare fibre con diametro dell'ordine dei micron, l'elettrospinning è in grado di produrre fibre di dimensioni nanometriche. Un'apparecchiatura standard prevede quattro componenti principali: uno spinner a siringa con un ago metallico, una pompa connessa al pistone della siringa, un alimentatore di alta tensione e un collettore metallico, fisso o mobile, con messa a terra. All'interno della siringa è contenuto il polimero in forma liquida (fuso o in soluzione), che viene alimentato grazie alla pressione generata dalla pompa. Viene quindi applicata una differenza di potenziale tra lo spinner e il collettore (generalmente nell'intervallo tra i 5 e i 30 kV); l'intensità del campo elettrico così prodotto supera la tensione superficiale delle gocce di fluido presenti all'estremità dell'ago. Queste si allungano in una forma conica (detta cono di Taylor) fino a che non si genera un getto carico prolungato continuamente dalla repulsione elettrostatica. Il filamento va incontro a un moto curvilineo caotico fino alla sua deposizione sul collettore [13,17,23]. Regolando parametri come potenziale elettrico, concentrazione del polimero, distanza tra ago e collettore e moto del collettore, è possibile variare il diametro e la disposizione delle fibre.

Esistono due versioni di questa procedura in base alla natura del fluido polimerico (Figura 3.13): nel *Solution Elettrospinning* il polimero è disciolto in un solvente che evaporerà entrando in contatto con l'aria prima dell'impatto sul collettore. L'impiego del solvente ha un effetto generale di riduzione della tensione superficiale nel materiale polimerico. Ciò comporta una maggiore facilità nella filatura delle fibre, riuscendo ad ottenere diametri ottimali, ma anche un moto caotico del filamento che comporterà una disposizione casuale di quest'ultimo sul collettore. Un vantaggio è rappresentato dalla possibilità di funzionalizzare ulteriormente le fibre incorporandovi molecole bioattive: i fattori di crescita possono essere

inseriti nella matrice polimerica incapsulati all'interno di nano-particelle per conservarne la bioattività [17]. Tuttavia, l'utilizzo di solventi organici costituisce un ostacolo a causa della possibile tossicità [13]. Per tentare di superare questo ostacolo, è stato introdotto il Melt Elettrospinning. In questo caso il polimero è utilizzato allo stato fuso e andrà incontro a solidificazione prima della deposizione sul collettore. L'assenza del solvente rappresenta un vantaggio da un punto di vista di biocompatibilità e permette inoltre una disposizione delle fibre più ordinata e un migliore legame tra strati. Tuttavia, l'utilizzo del fuso è accompagnato da un incremento della tensione superficiale con conseguente aumento nel diametro delle fibre ottenibili [13].

In generale le tecniche di elettrospinning consentono di fabbricare strutture altamente porose che imitano l'ECM e che presentano una rugosità superficiale adatta all'adesione cellulare. Sono molto versatili e permettono di lavorare una vasta gamma di materiali polimerici (p. es., PLA, PCL, PGA, PLLA, PLGA) e compositi (come PLA/collagene, PLA/collagene/HA, acido ialuronico/collagene, PCL/PGA, PCL/HA, PCL/HA/collagene, PCL/PLA/HA) [13,17,23].

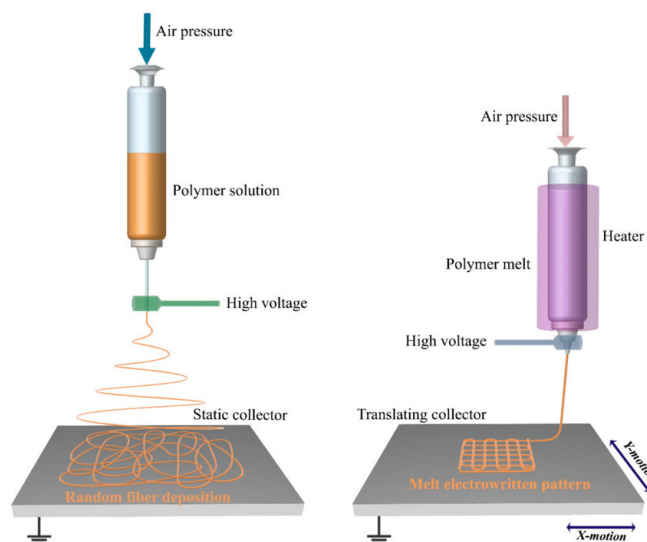


Figura 3.13: rappresentazione schematica delle tecniche di Solution Elettrospinning e Melt Elettrospinning.

Nella Figura 3.14 è possibile osservare alcune immagini ottenute al microscopio elettronico raffiguranti le fibre in collagene e in compositi di collagene e idrossiapatite realizzate tramite elettrospinning.

La Figura 3.15 riporta invece immagini ottenute da scaffolds realizzati con diverse tecniche convenzionali con l'obiettivo di evidenziare le differenze nella morfologia della porosità.

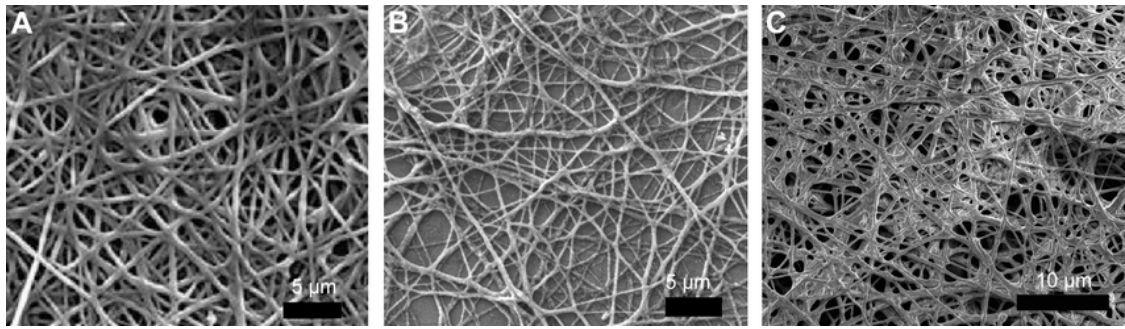


Figura 3.14: immagine SEM di fibre ottenute tramite elettrospinning: A) fibre di collagene; B) fibre collagene/10% HA; C) collagene/30% HA.

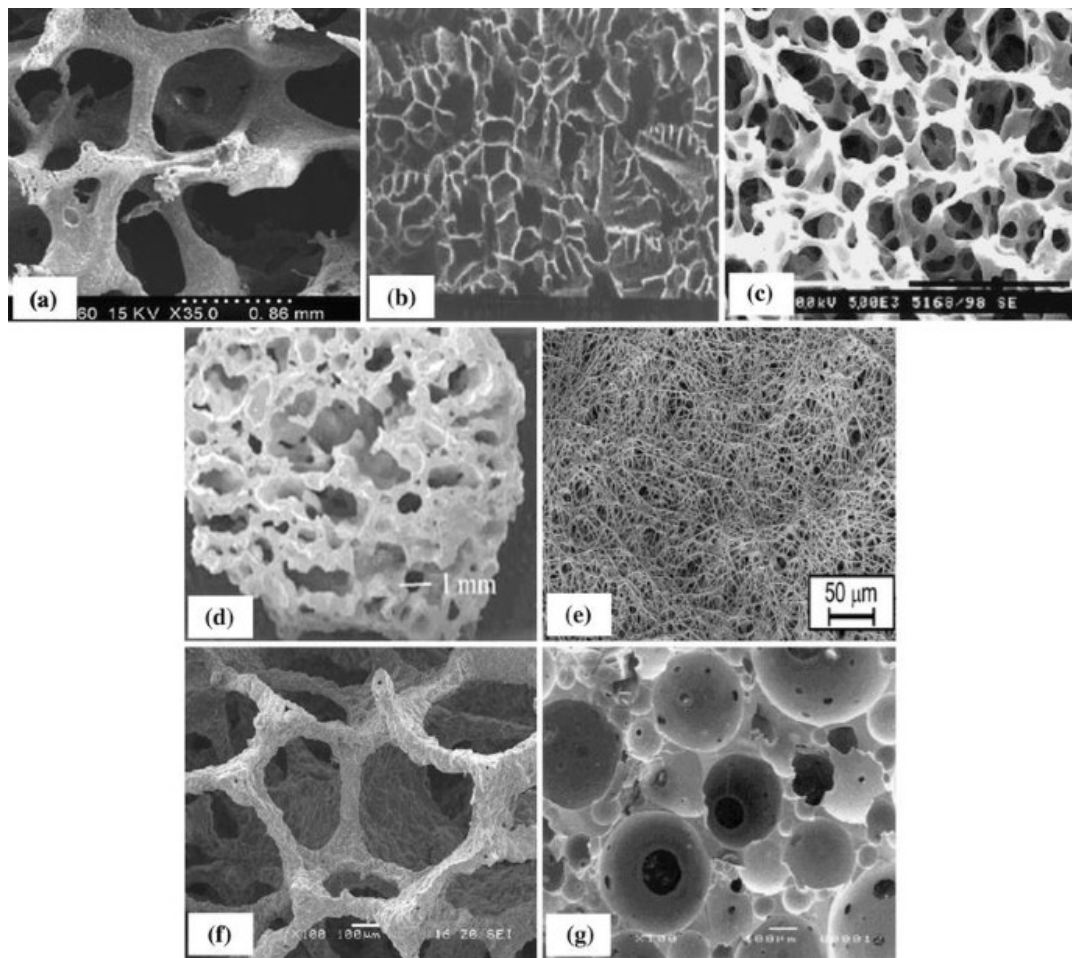


Figura 3.15: tipica morfologia della porosità in base alla tecnica convenzionale utilizzata: a) Solvent casting and Particulate leaching; b) freeze-drying; c) cryotropic gelation; d) Gas Foaming; e) elettrospinning; f) polymer-sponge method; g) sol-gel technique.

3.3.2 Rapid Prototyping

Le tecniche di Rapid Prototyping sono processi di fabbricazione additiva definiti anche "Additive Manufacturing" (AM) o "Solid Free form Fabrication" (SFF). Esse consentono la produzione di oggetti tridimensionali attraverso la deposizione di strati successivi.

Questi metodi si basano sulla rappresentazione digitale del tessuto bersaglio mediante un modello digitale 3D (CAD) ottenuto a partire da immagini biomediche come risonanza magnetica (MRI) e tomografia computerizzata (TC) [13,17]. Tali sistemi sono dotati quindi di tre componenti essenziali: uno strumento di digitalizzazione che trasforma la geometria in dati elaborabili da un computer; un software che produce un set di dati leggibile da una macchina di fabbricazione; una tecnica di produzione che realizza fisicamente il prodotto desiderato.

Le tecniche AM presentano l'abilità unica di poter definire con precisione l'architettura dello scaffold sia a livello esterno che interno. La struttura oltre ad essere progettata per adattarsi esattamente alla forma macroscopica richiesta, può essere funzionalizzata a livello microscopico per conferire capacità di adesione e guida cellulare [23].

La lavorazione a strati inoltre consente di incorporare all'interno di una stessa struttura fasi che fungano da supporto per diversi tessuti come quello vascolare o cartilagineo.

Nonostante tutti questi vantaggi, è necessario prendere in considerazione fattori come la compatibilità dei materiali con la strumentazione, i costi e i tempi di elaborazione che spesso rappresentano svantaggi nell'impiego di tecniche RP [13].

3.3.2.1 Binder Jetting (powder-based 3D printing)

Inventata al Massachusetts Institute of Technology nel 1993, la powder-based 3D printing è una tecnica che prevede la deposizione a getto di inchiostro di strati successivi sfruttando un letto di polvere e una soluzione legante (Figura 3.16). Il processo ha inizio con la preparazione, da parte di una macchina binder jetting, di uno strato di polvere su una piattaforma. Un sistema di erogazione a testine di stampa è controllato con precisione per rilasciare selettivamente gocce di legante sulle regioni in cui è richiesta la coesione. Il materiale, quando bagnato dal legante liquido, passa attraverso una serie di fasi che portano alla solidificazione delle regioni attivate. Quando uno strato è terminato, la piattaforma di stampa viene abbassata e si procede alla deposizione di un nuovo letto di polvere. Questi passaggi vengono ripetuti fino a quando l'intero oggetto 3D non è completamente formato, dopo di che si ha il processo di depowdering per la rimozione della polvere libera residua [13,17].

Il Binder jetting è uno dei metodi RP più ampiamente studiati per l'ingegneria del tessuto osseo: la sua precisione, versatilità e idoneità per una vasta gamma di materiali e leganti relativamente economici, hanno reso la 3DP una delle tecnologie più interessanti per la produzione di scaffolds [13]. In particolare, la capacità di realizzare forme complesse con morfologia microscopica accurata e regolare è ottimale per la realizzazione di progetti su misura per specifici casi clinici [23].

La possibilità di operare a temperatura ambiente poi consente l'incorporazione di una varietà di agenti biologici come proteine (ad esempio, fibrinogeno, collagene), polisaccaridi (ad esempio, ialuronato, alginato), e diversi fattori biochimici [17]. Tuttavia, spesso le strutture che derivano direttamente dai processi 3DP mancano del livello di resistenza meccanica richiesto dalle applicazioni finali. Per ottenere prestazioni migliori, le strutture vengono solitamente sinterizzate ad alte temperature. Questa fase, sebbene permetta di migliorare le proprietà meccaniche del costruito, degraderebbe eventuali fattori di crescita, perciò sarebbero auspicabili trattamenti a bassa temperatura per preservare la bioattività degli additivi [13]. Una caratteristica particolarmente positiva è data dalla possibilità di realizzare canali interni alla struttura, questi non devono però essere troppo piccoli o tortuosi per consentire un efficace rimozione nella fase di depowdering [17].

Alcuni svantaggi sono rappresentati dai lunghi tempi di fabbricazione e dalla potenziale citotossicità della soluzione legante.

Tramite questa tecnica si possono realizzare scaffolds con una risoluzione dai 10-30 μm con materiali come ceramici (HA, TCP, BCP; bioglass) e compositi (HA o TCP / PLC o PLA o PLGA o gelatina o chitosano o collagene) [13].

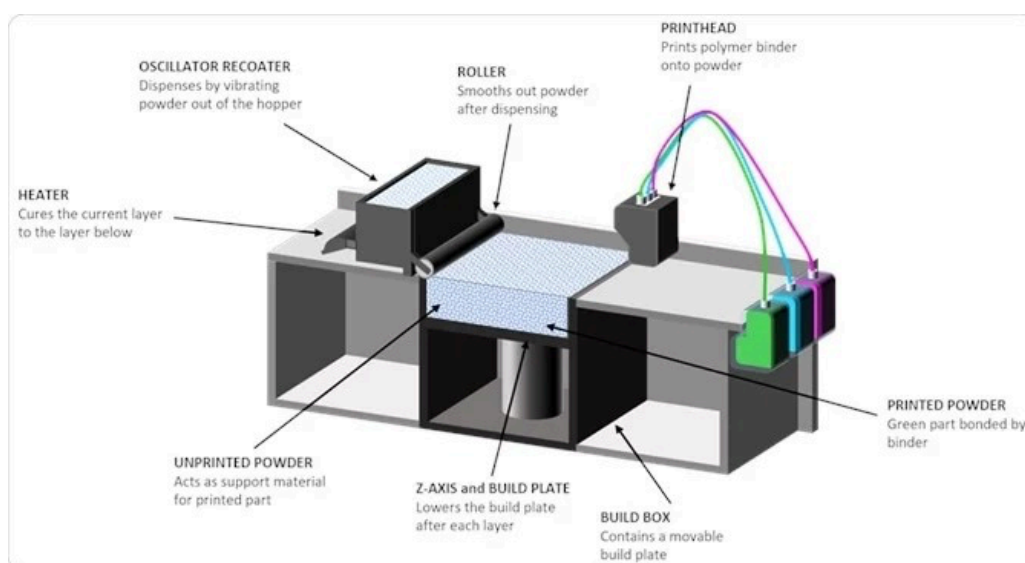


Figura 3.16: rappresentazione schematica della tecnologia Binder Jetting.

3.3.2.2 Selective Laser Sintering (SLS)

La tecnica di Selective Laser Sintering è stata sviluppata ad Austin nel 1986 dai ricercatori dell'Università del Texas (Figura 3.17) [17]. Questa tecnica prevede la realizzazione di strati successivi attraverso l'impiego di un laser ad alta potenza (laser a CO_2) che sinterizza, in modo selettivo, porzioni di un letto di polvere del materiale [23]. Il raggio provoca un incremento della temperatura a un livello appena sufficiente per permettere la coesione delle

particelle di materiale senza innescare un'effettiva fusione. L'assenza della fusione gioca un ruolo fondamentale nel preservare i microspazi presenti tra le particelle a contatto che andranno a formare la struttura alla porosità interconnessa richiesta. Poiché la creazione dei pori si basa su questi vuoti interparticellari, è necessaria un'attenta selezione granulometrica [13].

Generalmente, il processo è in grado di produrre costrutti con una risoluzione media dei macropori di 400 μm e spaziatura tra particelle di 50 μm . A causa del livello relativamente alto delle temperature necessarie, la SLS è più adatta alla lavorazione di polimeri con basso punto di fusione. Materiali metallici, ceramici e riempitivi compositi possono essere aggiunti alla base polimerica per migliorare le caratteristiche dello scaffold. In particolare, i modificatori ceramici sono importanti per un miglioramento dell'osteoadesione e osteoconduzione poiché la maggior parte dei polimeri compatibili con l'SLS non sono noti per tali proprietà [13,17].

Questa tecnica è stata utilizzata per testare un certo numero di polimeri biodegradabili come PCL, PLLA, alcool polivinilico (PVA), poliammide (PA), polietere etere chetone (PEEK) [13]. Gli scaffolds basati su PCL e una combinazione di PEEK e HA hanno mostrato interessanti proprietà meccaniche che li rendono adatti ad applicazioni in cui sono necessarie elevata tenacità e resistenza meccanica [17].

Il grande vantaggio di questa tecnica è che non utilizza solventi tossici; si tratta inoltre di un processo più rapido rispetto al binder jetting. Gli svantaggi principali della includono la fase di post-elaborazione necessaria per rimuovere la polvere residua e l'alta temperatura di esercizio [17].

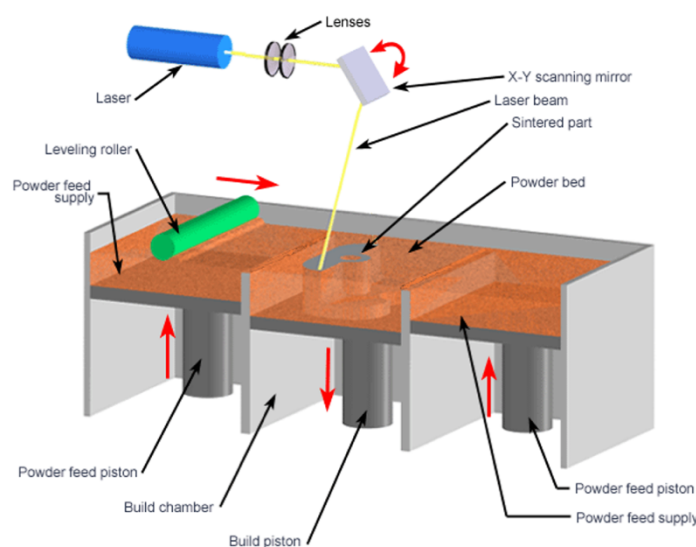


Figura 3.17: rappresentazione schematica della tecnologia Selective Laser Sintering.

3.3.2.3 Material Extrusion

L'estrusione di materiali è definibile come una categoria che comprende in sé diverse tecniche. Tutte si basano sull'emissione sotto pressione di un filamento in fase liquida da parte di un ugello. L'estrusore segue un percorso controllato definito dal modello CAD e il filamento viene depositato su una piattaforma mobile. In base alla natura della fase liquida, si possono avere tecniche di Fused Filament Fabrication (FFF), di Wet-Spinning o di Direct Writing [13] (Figura 3.18).

Nel metodo FFF, anche noto come Fused Deposition Modeling (FDM), il materiale estruso dall'ugello è parzialmente fuso. Il legame che si instaura tra strati successivi è meno forte rispetto a quello che si genera in un materiale totalmente fuso, per cui le strutture realizzate con questa tecnica presenteranno caratteristiche di anisotropia [13]. A causa della fusione termica questa tecnica è più adatta per la lavorazione di polimeri (come PGA, PLA e PLGA) e non è invece in grado di gestire ceramici in forma pura. Per aggirare il problema, particelle di materiali ceramici e di biovetro vengono solitamente aggiunti in una piccola percentuale alla base polimerica. Questo metodo utilizza alte temperature per cui gli agenti bioattivi devono essere aggiunti nella fase post-fabbricazione. Un vantaggio di questa tecnica è dato dal fatto che non prevede l'utilizzo di solventi [17,23].

Nell'estrusione basata su wet-spinning il materiale è disciolto in soluzione. Questa è estrusa all'interno di un secondo solvente rispetto al quale il polimero non è solubile. Anche in questo caso i materiali principalmente utilizzati sono polimeri, ai quali è possibile aggiungere riempitivi ceramici e biovetri per un miglioramento delle proprietà meccaniche e biologiche. Grazie all'utilizzo di basse temperature, nel wet-spinning è resa possibile l'incorporazione di fattori di crescita all'interno della matrice polimerica [13].

La tecnica di Direct Writing, anche nota come Robocasting, è invece relativa a materiali ceramici. Un impasto del materiale è preparato sospendendo polveri in soluzioni acquose. La composizione dell'impasto deve essere selezionata accuratamente, in particolare il solvente utilizzato deve avere sia la funzione di conferire fluidità al composto, sia quella di permettere il legame tra le particelle durante la deposizione. Per ceramici come HA e TCP, il solvente impiegato è l'acqua mentre i biovetri richiedono additivi più complessi (nel caso del 45S5 Bioglass® si utilizza carbossimetilcellulosa). Come nel caso del wet-spinning, le basse temperature di lavorazione consentono l'inclusione di fattori bioattivi all'interno del composto. Inoltre, l'uso dell'acqua come solvente esclude il problema di tossicità dei residui [13].

Tutte le metodologie di Material Extrusion, a differenza di quelle che utilizzano polveri, presentano il grande vantaggio di non necessitare di una fase di depowdering. Esse consentono la fabbricazione di scaffold dotati di elevata porosità e buona resistenza meccanica [17]. Spesso queste tecniche sono usate in combinazione con altri metodi (ad esempio, l'elettrospinning) per la produzione di composti fibrosi che migliorino le proprietà bioattive dello scaffold [13].

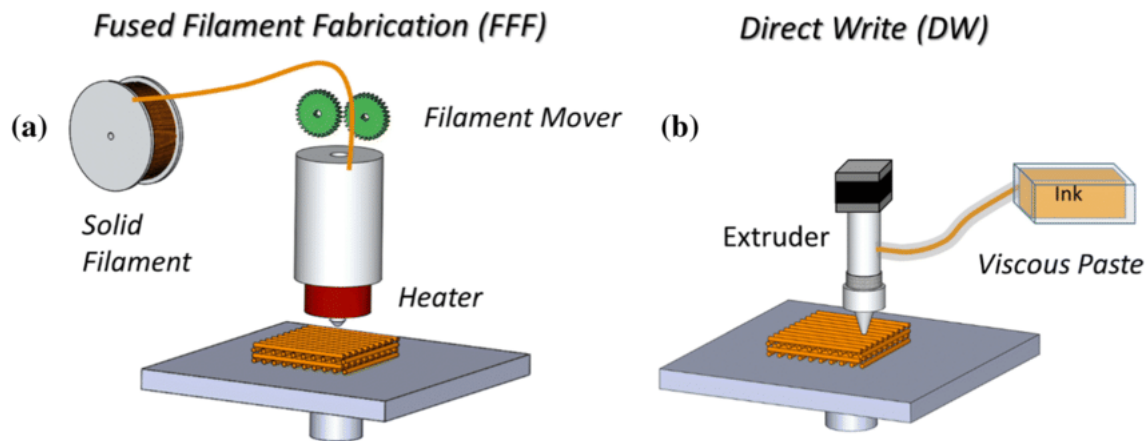


Figura 3.18: rappresentazione schematica delle tecnologie Fused Filament Fabrication e Direct Write.

3.3.2.4 Stereolithography (SL)

Il termine stereolitografia è stato coniato nel 1986 da Charles Hull che ha brevettato la tecnica negli Stati Uniti (Figura 3.19). In questa tecnica la realizzazione della struttura avviene per indurimento di materiali fotosensibili tramite l'esposizione a raggi ultravioletti. Schematicamente, un sistema SL è costituito da una vasca di resina liquida fotosensibile, una piastra mobile perforata immersa nel serbatoio, un laser UV e un sistema dinamico di specchi. La stampa inizia posizionando il letto di stampa appena sotto la superficie del liquido. Il laser irradia la resina seguendo un percorso dettato dal CAD: in tali punti il materiale va incontro a fotopolimerizzazione. Una volta che lo strato è completamente solidificato, la piastra viene abbassata di una misura pari allo spessore dello strato successivo e si procede con una nuova scansione. Questi passaggi sono ripetuti sino alla creazione di una struttura 3D che viene poi esposta a luce UV per completarne l'indurimento [17]. Perché avvenga la polimerizzazione, è necessario che nella resina siano presenti polimeri fotosensibili e fotoiniziatori che possono essere miscelati a materiali ceramici come HA e TCP.

Una tecnica alternativa alla SL è rappresentata dalla DLP (Digital Light Processing). La differenza sta nella sorgente luminosa: al posto del laser, la DLP utilizza uno schermo di proiezione digitale per indurire un intero strato alla volta. Il sistema DLP presenta un'ottima

risoluzione e velocità di elaborazione significativamente elevate [13]. Vi sono alcuni svantaggi che impediscono la piena diffusione della stereolitografia in ambito clinico: la maggior parte di questi deriva dalla mancanza di materiali che soddisfino i requisiti chimici, biologici e meccanici del processo di fabbricazione. I fotopolimeri, i fotoiniziatori, e i solventi sono in generale caratterizzati da rischi di citotossicità non trascurabili, restringendo il numero di composti disponibili. Inoltre, anche utilizzando sostanze biocompatibili, i requisiti di degradazione della struttura non sono sempre soddisfatti. Pochissimi sono quindi i materiali applicabili: il polipropilene fumarato (PPF) si è imposto come prodotto di punta per la fabbricazione DLP di scaffolds ossei. In generale, nonostante la tecnologia sia in grado di produrre strutture geometricamente adatte in tempi ottimali, le limitazioni nella disponibilità dei materiali stanno rallentando il suo progresso e impiego clinico [13].

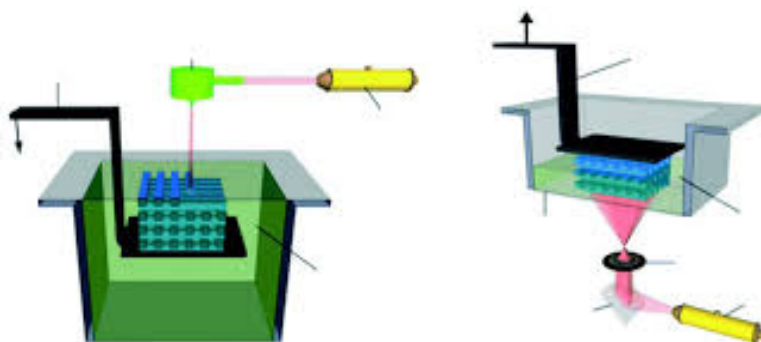


Figura 3.19: rappresentazione schematica delle tecnologie di stereolitografia e Digital Light Processing.

Nella Figura 3.20 si possono osservare alcune tipologie di scaffolds ottenute da diverse tecniche di Rapid Prototyping.

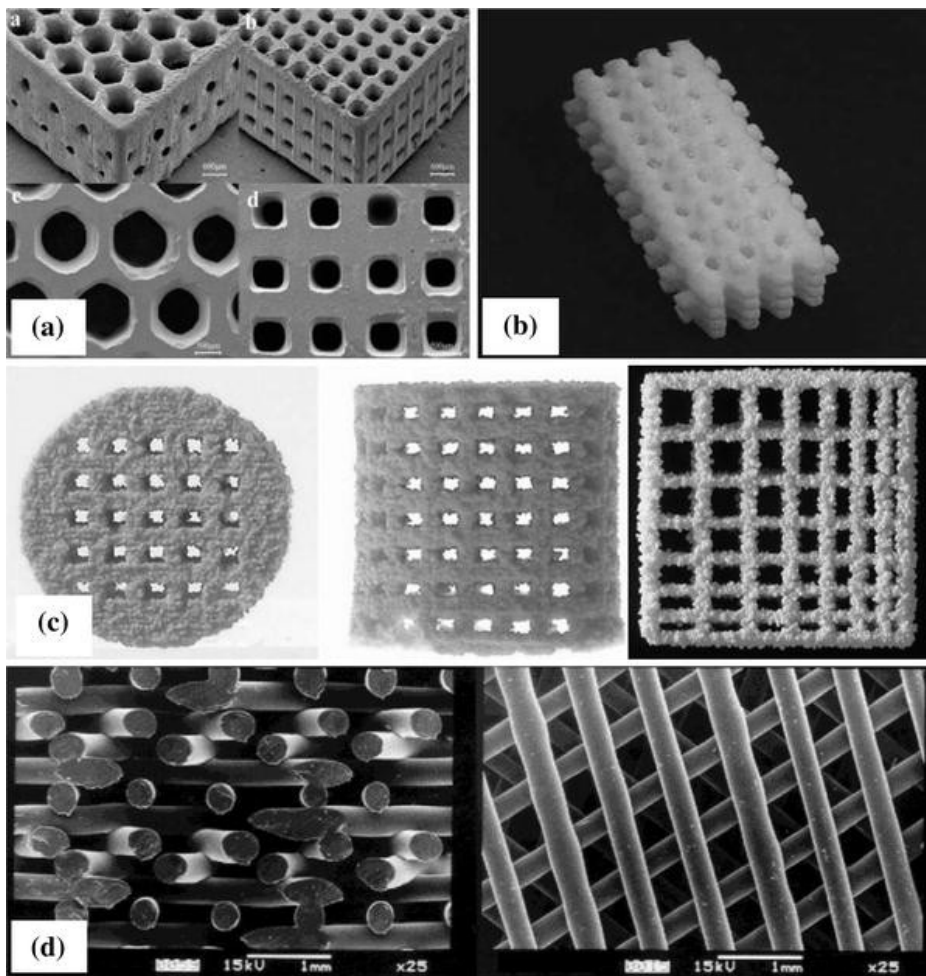


Figura 3.20: foto di scaffolds ottenuti da varie tecniche di RP: a) SL; b) SLS; c) 3DP; d) FDM.

Capitolo 4. Cellule

La componente cellulare ha un ruolo fondamentale nelle applicazioni di tissue engineering. Nel caso della BTE le cellule sono responsabili della funzione osteogenica del costrutto ingegnerizzato: la loro presenza è infatti essenziale per permettere la generazione di tessuto. Perché ciò sia reso possibile è necessario individuare un adeguato lignaggio cellulare e opportuni metodi di semina e stimolazione.

4.1 Cellule staminali

Nell'ambito della scelta della linea cellulare, i candidati ideali per le applicazioni di ingegneria tissutale dovrebbero soddisfare i seguenti criteri:

- derivare da una fonte conveniente: in quantità elevate e con semplicità di isolamento;
- mostrare elevata adattabilità all'ambiente biologico del sito ricevente;
- sostituire le cellule mancanti e ripristinare la funzione tissutale;
- garantire un'applicazione clinica sicura [1].

L'utilizzo di osteoblasti autologhi prelevati tramite biopsia ossea si è rivelato da tempo come una scelta poco efficiente: essi sono infatti presenti in scarsa quantità e mostrano basso potenziale proliferativo [16].

I risultati più rilevanti in questo ambito hanno visto l'impiego di cellule staminali. Esse sono cellule non specializzate dotate della capacità di differenziarsi in diversi tipi cellulari e in grado di dividersi in coltura per periodi indefiniti di tempo.

Le cellule staminali possono essere classificate in base al numero di tipi cellulari in cui possono differenziarsi in: unipotenti (un unico tipo cellulare), multipotenti (più tipi cellulari), pluripotenti (tutti i tipi cellulari, ma non possono dare origine all'embrione), totipotenti (tutti i tipi cellulari e possono formare l'embrione) [10].

Le cellule staminali embrionali (ESCs) sono particolarmente interessanti a causa della loro pluripotenza. Esse sono derivate dalla massa interna della blastocisti (una fase dello sviluppo embrionale che si origina circa quattro giorni dopo la fecondazione). Tuttavia, l'applicazione delle ESCs è ancora dibattuta a causa di preoccupazioni di carattere etico e del rischio di incompatibilità immunologica e sviluppo di teratoma (tumore dei tessuti embrionali) [16,25]. Per questo motivo ci si è orientati verso l'utilizzo di cellule staminali adulte: quelle più comunemente impiegate nell'ingegneria del tessuto osseo sono le cellule staminali mesenchimali (MSCs), le cellule progenitrici endoteliali (EPCs) e le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) [18].

4.1.1 Cellule staminali mesenchimali (MSCs)

Le cellule staminali mesenchimali sono considerate ideali per le applicazioni BTE a causa della loro grande disponibilità e rapidità di proliferazione. Esse sono dotate di multipotenza e sono presenti in diverse regioni dell'organismo: si trovano ad esempio nel midollo osseo, nel tessuto adiposo, nei muscoli, nel cordone ombelicale e nella placenta.

Le MSCs sono fondamentali in molti processi fisiologici, oltre ad avere un ruolo primario nella rigenerazione ossea, sono coinvolte in processi immunomodulatori e angiogenici. Due proprietà rilevanti sono date dalla plasticità, ossia la capacità di modificazioni sia da un punto di vista morfologico che funzionale, e dal tropismo che le rende in grado di migrare e localizzarsi in siti danneggiati in risposta a segnali specifici. Le MSCs partecipano a processi immunitari sia innati che adattativi; esse possono sopprimere la risposta dei linfociti B e T e modulare l'attività dei linfociti NK (natural killer), dei neutrofili, dei macrofagi e dei monociti [16]. L'isolamento delle MSCs da tessuti quali placenta, amnio e cordone ombelicale consente di ottenere cellule con un tasso proliferativo e un potenziale di differenziazione più elevati rispetto a quelle derivate da altre fonti; esse mostrano inoltre un rischio minimo di evocazione di risposte immunitarie allogeniche. Tuttavia, quando possibile, si opta per una fonte cellulare autologa. Tradizionalmente l'estrazione può essere effettuata dal midollo osseo: le *bone marrow mesenchymal stem cells* (BMSCs) sono dotate di ottime proprietà antinfiammatorie e angiogeniche, ma l'invasività del prelievo ne limita l'applicazione clinica. A questo proposito, hanno trovato sempre più spazio le ADSCs (Adipose-derived stem cells). Le cellule staminali di derivazione adiposa rappresentano una fonte autologa abbondante e facilmente accessibile. L'aspirato di midollo osseo produce circa 6×10^6 di cellule nucleate per ml, di cui dallo 0,001 allo 0,01% sono staminali, mentre da 1 grammo di tessuto adiposo ne possono essere isolate 2×10^6 di cui circa il 10% sono cellule staminali [16,18,26]. Le ADSCs sono ottenute attraverso liposuzione e isolate tramite procedure di digestione enzimatica. Esse sono più indicate rispetto alle BMSCs per trattamenti allogenici e mostrano proprietà immunomodulatorie più avanzate [1].

Ad oggi le cellule staminali mesenchimali sono sfruttate in diverse terapie relative alla riparazione di difetti ossei.

4.1.2 Cellule progenitrici endoteliali (EPCs)

Le cellule progenitrici endoteliali sono state identificate a livello del sangue periferico per la prima volta nel 1997. Si tratta di precursori derivati dal midollo osseo con la capacità di differenziarsi in cellule endoteliali specializzate e di partecipare alla formazione di nuovi vasi sanguigni.

L'angiogenesi è di fondamentale importanza per il successo della rigenerazione ossea: un'adeguata vascolarizzazione è un prerequisito essenziale che consente alle cellule staminali di raggiungere il sito danneggiato e permette inoltre il passaggio di ossigeno e sostanze nutritive. Il ruolo principale delle EPCs nella generazione di nuovi vasi e la capacità di proliferare e differenziarsi in cellule endoteliali, le rendono ideali per il risanamento dell'ambiente ischemico che caratterizza un difetto osseo di dimensioni critiche [26]. Il ruolo svolto dalle EPCs è stato ampiamente indagato in studi preclinici: È stato scoperto che secernono fattori osteogenici come BMP-1, 2, 3, 6, 7, 8 e TGF- β s che migliorano significativamente l'attività delle cellule staminali mesenchimali. Esse mostrano infatti prestazioni più significative se usate in combinazione con altri tipi cellulari [18].

4.1.3 Cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs)

Le iPSCs sono state create per superare le preoccupazioni menzionate riguardo all'utilizzo di cellule staminali embrionali. Nel 2006 il medico Shin'ya Yamanaka propose per la prima volta che la pluripotenza potesse essere indotta attraverso la riprogrammazione genica di cellule somatiche. La capacità di generare cellule pluripotenti tramite manipolazione genica gli valse il premio Nobel per la medicina nel 2012 [16,26].

Le iPSCs sono ottenute per trasduzione di fibroblasti adulti mediante l'impiego di quattro fattori (Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc).

Le staminali mesenchimali derivate da cellule pluripotenti indotte (iPSC-MS) possono differenziarsi in condroblasti, osteoblasti e adipociti, e sono quindi una fonte promettente di staminali autologhe con un grande potenziale rigenerativo. Nell'ambito della BTE, alcuni studi hanno rilevato migliori prestazioni di tali cellule in termini di adesione e di sopravvivenza in seguito all'impianto se confrontate con altri tipi cellulari. Inoltre, data la caratteristica pluripotenza, le iPSCs possono rappresentare una risposta efficace al crescente interesse riguardo all'interazione tra osteogenesi e angiogenesi [26].

Mentre l'indagine preclinica vede notevole slancio nello studio delle staminali pluripotenti indotte, la traslazione clinica è attualmente in ritardo: le iPSC mostrano proprietà interessanti e promettenti nel campo dell'ingegneria tissutale, ma è necessario superare alcune problematiche relative all'instabilità genomica e al rischio di tumorigenesi [18,26].

4.2 Tecniche di stimolazione

Una volta identificata la classe cellulare adeguata, le cellule (autologhe o allogene) vengono isolate ed espanse in vitro per garantire una popolazione sufficiente. Successivamente, possono essere stimulate al fine di indurre la differenziazione e poi

seminate sullo scaffold, oppure, possono essere poste direttamente sulla matrice di sostegno assieme a fattori di crescita. Il costrutto ingegnerizzato è poi generalmente inserito all'interno di un bioreattore, dove è opportunamente stimolato per raggiungere uno stadio più maturo [1]. È necessario ricordare che la *bone tissue engineering*, per sopperire al bisogno clinico, si propone di realizzare scaffolds di dimensioni rilevanti. Ciò rappresenta una limitazione in quanto la grandezza del costrutto potrebbe ostacolare la corretta evoluzione delle sue regioni più interne. La coltura statica consente solo una bassa velocità di diffusione di ossigeno e sostanze nutritive nella parte centrale: le cellule staminali lì situate sono quindi più a rischio di subire apoptosi a causa di insufficienti forniture di nutrienti. La mancanza di cellule vitali e funzionali porterebbe di conseguenza a una maturazione inadeguata della matrice ossea e a una scarsa resistenza meccanica degli innesti [27,28].

Per queste ragioni la BTE opta per l'utilizzo di bioreattori che consentano una coltura dinamica sottoponendo lo scaffold a stimoli meccanici e idraulici di vario tipo. Un bioreattore è un dispositivo che mira a riprodurre un ambiente simile a quello biologico con l'obiettivo di condizionare la componente cellulare e di indurire lo sviluppo. Esso consente di garantire un ambiente sterile e controllato in parametri quali temperatura, pressione, pH e concentrazione di ossigeno [25].

Numerosi dispositivi sono stati creati per ottenere una coltura efficace: un apparato ampiamente utilizzato è costituito dal bioreattore a perfusione. Esso è stato introdotto per superare le limitazioni relative a sistemi più semplici come lo *spinner flask bioreactor* e il *rotating bioreactor* che sono adatti al trattamento di scaffold di piccole dimensioni poiché non consentono un adeguato trasporto di fluido nelle zone più interne (Figura 4.1) [25,27].

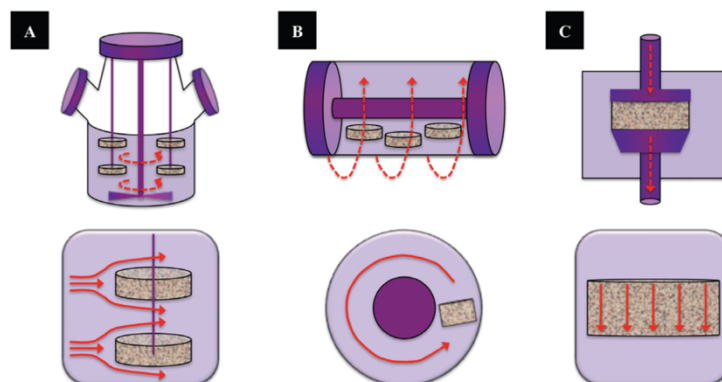


Figura 4.1: rappresentazione schematica dei dispositivi di spinner flask bioreactor (A), rotating bioreactor (B) e perfusion bioreactor (C) con un confronto tra le linee di flusso generate dai diversi sistemi.

Esistono varie configurazioni di bioreattori a perfusione, ma tutte sono accomunate dalla presenza di un sistema di tubi, un serbatoio contenente il mezzo di coltura, una pompa e una camera di perfusione in cui è inserito lo scaffold (Figura 4.2).

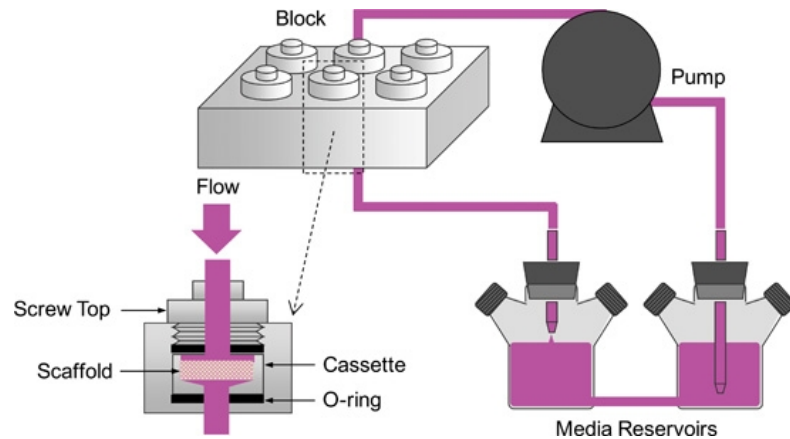


Figura 4.2: rappresentazione schematica di un bioreattore a perfusione.

Il mezzo di coltura pompato nella camera di perfusione permea la struttura e, grazie alla pressione esercitata e alla presenza di una porosità interconnessa, riesce a raggiungere anche le porzioni più profonde del costrutto. Il moto del liquido può avvenire attraverso un flusso sia continuo che pulsatile e la perfusione può essere indiretta o diretta a seconda del fatto che il fluido scorra anche ai lati del costrutto o sia invece forzato a passarvi attraverso (Figura 4.3) [27,29].

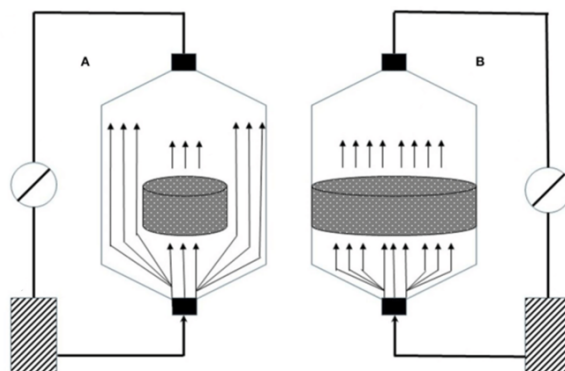


Figura 4.3: differenza tra perfusione indiretta (A) e diretta (B).

Negli ultimi anni l'attenzione si è spostata sulle proprietà di meccanotrasduzione che caratterizzano il tessuto osseo. L'osso nativo è costantemente sottoposto a carichi e questi svolgono un ruolo cruciale a livello biologico attivando specifiche vie metaboliche che

modulano l'attività cellulare: la stimolazione meccanica è dunque una componente chiave nell'ingegneria del tessuto osseo.

Queste considerazioni hanno portato alla realizzazione di bioreattori che, oltre a permettere una corretta perfusione, sottopongono il costrutto a sollecitazioni che ne potenziano la capacità osteogenica. Vari dispositivi sono studiati per il raggiungimento di un condizionamento ideale come bioreattori vibrazionali, bioreattori a compressione o dispositivi a trazione. Diverse analisi, attraverso la quantificazione di parametri come la concentrazione di marcatori osteogenici e calcio, hanno evidenziato che strutture seminate con MSCs sottoposte a sollecitazioni meccaniche (vibrazione, trazione e compressione) esibiscono proprietà più avanzate in termini di osteogenesi e mineralizzazione.

Nonostante i risultati promettenti, gli innesti ossei ottenuti tramite queste tecniche non sono stati ben caratterizzati meccanicamente e vi è una carenza in test effettuati in vivo. Perciò è necessario effettuare ulteriori studi che confermino l'effettiva efficacia clinica di questi possibili trattamenti terapeutici [28].

Capitolo 5. Fattori di crescita

Nella formazione e rigenerazione dei tessuti numerose molecole segnale giocano un ruolo essenziale nella regolazione delle complesse cascate di eventi che caratterizzano tali processi.

I fattori di crescita sono proteine che si legano a specifici recettori sulla membrana cellulare e, attraverso meccanismi di segnalazione autocrini, paracrini ed endocrini, attivano i processi di proliferazione e/o differenziamento cellulare [10]. Risulta quindi conveniente l'inserimento di tali fattori all'interno del costrutto ingegnerizzato per indurre e favorire il processo di neomorfogenesi.

Il funzionamento di questi sistemi è molto complesso per cui è richiesto uno studio approfondito dei meccanismi che coinvolgono le molecole segnale al fine di poterle sfruttare in modo efficace e sicuro.

5.1 Classificazione

Diversi *growth factors* (GFs) sono coinvolti nel processo di guarigione di una frattura e sono perciò adoperati nell'ambito della BTE. Tra questi vi sono: transforming growth factors-beta (TGF- β s), bone morphogenetic proteins (BMPs), insulin-like growth factors (IGFs), fibroblast growth factors (FGFs), vascular endothelial growth factors (VEGFs) e platelet-derived growth factors (PDGFs) [3,18]. Essi possono essere sfruttati singolarmente o combinati tra loro per ottenere una fusione dei diversi effetti.

5.1.1 Transforming growth factors-beta (TGF- β s)

Quella dei fattori di trasformazione beta costituisce una superfamiglia numerosa alla quale appartengono diverse categorie di fattori di crescita. Questi sono rilasciati da varie cellule quali osteoblasti, piastrine, condrociti, cellule endoteliali, fibroblasti, macrofagi e cellule staminali mesenchimali. Tra le varie famiglie appartenenti alla superclasse, quelle di interesse per gli scopi di BTE sono la (TGF- β)-family e la (BMP)-family [30].

Alla prima appartiene il fattore di trasformazione beta che, nei mammiferi, esiste nelle tre isoforme TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 [18]. Il TGF- β ha un ruolo fondamentale nella proliferazione e differenziazione cellulare. Nell'osso esso è prodotto dagli osteoblasti ed è poi immagazzinato nella matrice extracellulare; la conservazione e l'espressione di questo fattore di crescita dipendono dalle quantità di collagene di tipo I e II presenti nell'ECM.

Il TGF- β partecipa attivamente alla regolazione del rimodellamento osseo: esso stimola la migrazione delle cellule osteoprogenitrici, induce la specializzazione dei preosteoblasti,

promuove la sintesi di proteine dell'ECM e contrasta la produzione dell'attivatore degli osteoclasti (RANKL) [3].

5.1.2 Bone morphogenetic proteins (BMPs)

Quella delle BMPs è una famiglia comprendente una ventina di proteine prodotte da cellule staminali mesenchimali, osteoblasti, condrociti e cellule endoteliali. Tra tutte BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 e BMP-9 sono oggi utilizzate in numerosi studi clinici in combinazione con cellule staminali. Particolarmente rilevanti sono BMP-2 e BMP-7 che hanno ricevuto approvazione FDA per il loro utilizzo in applicazioni relative alla rigenerazione ossea [3,30]. Queste proteine sono essenziali nei processi di formazione e riparazione dei tessuti osseo e cartilagineo. Esse presentano un forte potenziale osteoinduttivo permettendo la migrazione delle MSCs e la loro differenziazione delle in osteoblasti [3].

5.1.3 Insulin-like growth factors (IGFs)

I fattori di crescita insulino-simili sono secreti da osteoblasti, condrociti, epatociti, cellule endoteliali e piastrine [18]. Essi rappresentano i fattori di crescita più abbondanti prodotti degli osteoblasti e immagazzinati nella matrice ossea. Fra i membri principali di questa famiglia compaiono l'IGF-I e l'IGF-II. IGF-II pare sia perlopiù coinvolto in processi embrionali mentre IGF-I induce attività legate in particolare alla crescita dell'osso. Quest'ultimo è un piccolo peptide prodotto principalmente dal fegato in risposta all'ormone della crescita (GH). La dicitura "insulino-simile" deriva dal fatto che la sequenza primaria dell'IGF-I è uguale per il 60% alla molecola della proinsulina [10,3]. IGF-I influenza la rigenerazione del tessuto osseo promuovendo la sintesi di osteocalcina e collagene di tipo I da parte delle cellule ossee specializzate. Esso inoltre regola l'attività dei condrociti che costituisce un elemento essenziale nel processo di guarigione. Dato il suo contributo nel rimodellamento, disturbi che comportano bassi di livelli di IGF-I (come nel caso dell'osteoporosi) causano ingenti perdite di massa ossea [3].

5.1.4 Fibroblast growth factors (FGFs)

Il gruppo dei fattori di crescita dei fibroblasti comprende 22 membri, divisi in sette famiglie, che intervengono in diverse funzioni biologiche. Essi sono coinvolti nello sviluppo embrionale e nel controllo metabolico di vari tessuti tra cui quello osseo.

I FGFs possono derivare da cellule staminali mesenchimali, osteoblasti, condrociti e cellule endoteliali; essi modulano la proliferazione e differenziazione delle cellule osteoprogenitrici portando alla maturazione del tessuto osseo nello sviluppo endocondrale.

L'FGF di base (bFGF) è un potente mitogeno e agente chemioattrattore sintetizzato dalle MSCs; bFGF stimola il movimento delle cellule derivate dal mesoderma, promuove l'accrescimento dell'ECM, regola l'apoptosi degli osteoblasti e modula l'attività delle cellule endoteliali, dei fibroblasti e dei cheratinociti [3].

Tra i vari componenti della classe, FGF-2, FGF-9 e FGF-18 sono stati identificati come i migliori candidati per le applicazioni BTE in quanto favoriscono la crescita del tessuto osseo e la neovascolarizzazione [2].

5.1.5 Vascular endothelial growth factors (VEGFs)

I fattori di crescita dell'endotelio vascolare sono una classe di fattori coinvolti nella vasculogenesi e angiogenesi. Essi derivano da piastrine, osteoblasti e condrociti e mostrano capacità osteoinduttive e chemiotattiche. I VEGFs innescano l'attività dell'enzima fosfatasi alcalina (ALP) negli osteoblasti primari, inducono l'attivazione degli osteoclasti e il loro trasferimento verso i siti di rigenerazione ossea. Inoltre, regolano la migrazione, proliferazione e sopravvivenza delle cellule endoteliali promuovendo la formazione di nuovi vasi all'interno del callo fibro-cartilagineo [3].

5.1.6 Platelet-derived growth factors (PDGFs)

I fattori di crescita derivati dalle piastrine sono citochine che partecipano attivamente al processo di coagulazione. Oltre che dalle piastrine sono prodotti anche dagli osteoblasti e dalle cellule endoteliali; essi sono regolatori chiave nei processi di guarigione delle ferite e di riparazione dei tessuti. A livello dell'osso, i PDGFs stimolano la proliferazione delle cellule ossee e connettivali e promuovono la vascolarizzazione del tessuto [30]. La somministrazione combinata di BMPs, VEGFs e PDGFs è uno strumento utile per la bone tissue engineering: il loro effetto sinergico consente la coniugazione tra angiogenesi e osteogenesi [3].

5.2 Metodi di inclusione

I fattori di crescita hanno mostrato un grande potenziale per le applicazioni di rigenerazione ossea, tuttavia l'applicazione clinica è ancora contenuta a causa di limitazioni relative a costi elevati e possibili effetti collaterali. Sono stati riportati casi di crescita ossea eccessiva, osteolisi, reazioni immunitarie avverse, problematiche a livello respiratorio e neurologico e insorgenza di tumori. Ciò è dovuto al fatto che gli effetti generati da queste molecole segnale sono dose-dipendenti. È quindi necessario individuare precisi metodi di inserimento che consentano un'adeguata distribuzione nel sito di interesse e cinetiche di rilascio controllate al

fine di evitare situazioni di sovradosaggio. Di seguito sono presentate alcune delle principali strategie per l'inclusione dei fattori di crescita nel costrutto ingegnerizzato [3].

5.2.1 Adsorbimento superficiale

Da un punto di vista tecnico l'adsorbimento chimico-fisico dei fattori di crescita può essere considerato come il metodo più semplice. Esso si può ottenere immergendo uno scaffold preformato in una soluzione contenente i fattori di crescita. L'adsorbimento avviene grazie ad interazioni di tipo elettrostatico come legami ad idrogeno, forze di Van der Waals o interazioni idrofobiche. Il successivo rilascio delle proteine dipende quindi da fattori come la temperatura, il pH la concentrazione di soluti e dalla relazione instaurata tra fattore di crescita e scaffold. Inoltre, caratteristiche superficiali della matrice quali bagnabilità, rugosità e carica superficiale influenzano la qualità dell'adsorbimento [3].

La superficie dello scaffold può essere modificata per migliorarne l'affinità con le proteine: a questo scopo l'eparina è spesso utilizzata per perfezionare l'interazione di materiali polimerici con BMPs, PDGFs, VEGFs e altri fattori (Figura 5.1) [31].

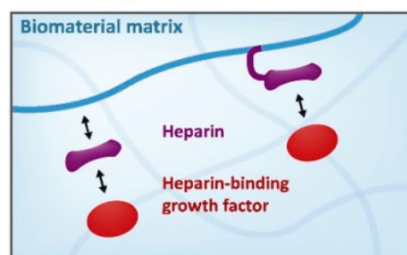


Figura 5.1: rappresentazione dell'impiego di eparina per incrementare l'affinità dei GFs con la matrice dello scaffold.

I vantaggi dell'adsorbimento sono la semplicità di esecuzione, il costo contenuto e l'efficacia nella conservazione della bioattività delle molecole; questi lo rendono la tecnica più comunemente utilizzata per l'inclusione dei GFs nelle matrici. Tuttavia, il metodo presenta alcune limitazioni riguardo al controllo della cinetica di rilascio e della distribuzione spaziale dei fattori che spesso subiscono un rilascio repentino subito dopo l'impianto in vivo [3,31].

5.2.2 Legame covalente

Questo metodo richiede la formazione di un legame covalente (forte) tra i fattori di crescita e la matrice dello scaffold; essa offre una permanenza più stabile e prolungata delle proteine rispetto all'adsorbimento fisico. In questo processo la superficie dello scaffold deve quindi essere adattata con gruppi funzionali che possano legarsi con le molecole di interesse attraverso specifiche reazioni chimiche. Un problema rilevante in questo ambito è dato dal

fatto che i GFs, formando legami covalenti, potrebbero subire delle modificazioni strutturali che ne inficiano la bioattività. Per far fronte alla questione spesso si ricorre alla peptidomimetica (GF peptide-mimicry): con questo approccio si producono e si utilizzano sequenze peptidiche ridotte e/o selettivamente modificate rispetto alla proteina nativa, in grado però di riprodurre il medesimo effetto biologico. Diverse reazioni sono sfruttate per consentire la realizzazione dei legami covalenti, tra queste si hanno ad esempio reazioni di esterificazione e formazione di legami glicosidici e ponti disolfuro [3,10,31].

5.2.3 Rilascio da carrier

Le tecniche fino ad ora presentate prevedono una distribuzione superficiale dei fattori di crescita, che potrebbe tradursi in una disponibilità limitata di tali fattori a livello temporale. Le tecniche di rilascio controllato prevedono invece l'incorporazione dei fattori all'interno della matrice dello scaffold con l'obiettivo di conseguire una concentrazione adeguata dei GFs nel sito di rigenerazione per un tempo prolungato. L'"intrappolamento" dei fattori può avvenire direttamente all'interno di una matrice polimerica o tramite micro/nano-particelle e liposomi che fungano da veicoli di consegna [3] (Figura 5.2).

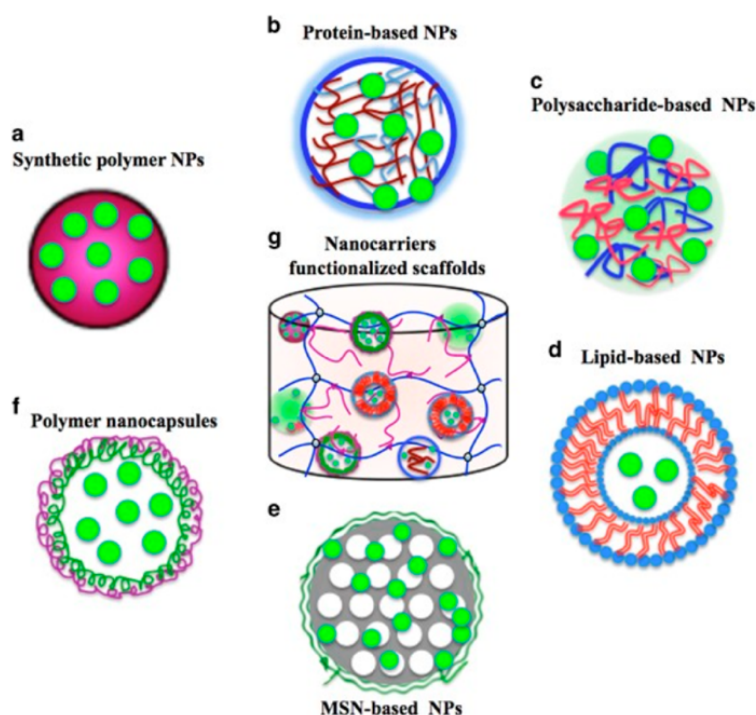


Figura 5.2: rappresentazione schematica di (a-f) diverse nanoparticelle impiegate per l'incapsulamento dei fattori di crescita; (g) incorporazione dei nano-carriers nello scaffold.

Il caricamento diretto dei fattori all'interno dalla matrice è la via più semplice per ottenere un rilascio prolungato; questo metodo è compatibile con diverse tecniche di fabbricazione degli scaffold come ad esempio solvent casting, gas foaming, cryogelation ed elettrospinning.

La sfida più grande, relativamente a questa strategia, riguarda il mantenimento della bioattività delle molecole; inoltre, il controllo sulla cinetica di rilascio di quest'ultime è limitato.

Incapsulare i fattori di crescita all'interno di micro/nano-carriers costituisce una valida alternativa per garantirne la conservazione delle proprietà dei GFs [31].

Queste strategie hanno permesso di dare risposta ad un crescente interesse riguardo alla realizzazione di un rilascio *programmato*. La guarigione di una ferita è un processo composto da varie fasi nelle quali, in diversi momenti, intervengono diversi fattori di crescita. L'obiettivo sarebbe quindi quello di effettuare un controllo spazio-temporale sulla distribuzione dei fattori in modo da riprodurre la sequenza di eventi che si sviluppano durante il processo di rigenerazione. In questo modo è possibile fornire dosi relativamente basse di fattori diversi in maniera sequenziale, migliorando l'efficienza del sistema. Un approccio per ottenere un rilascio programmato prevede la realizzazione di scaffolds dotati di compartimenti costituiti da materiali differenti con velocità di degradazione caratteristiche; il caricamento delle biomolecole nei vari compartimenti permette di ottenere una regolazione della cinetica di rilascio [3,31]. Un'altra strategia propone invece di creare dei gradienti nella distribuzione della concentrazione dei fattori all'interno dello stesso materiale (Figura 5.3).

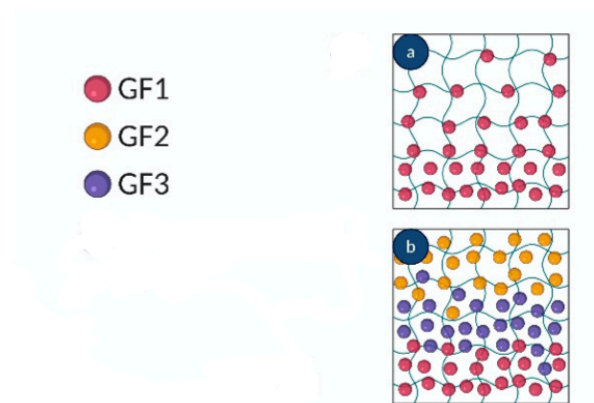


Figura 5.3: rappresentazione schematica di possibili configurazioni del gradiente di concentrazione dei fattori di crescita.

Ciò può essere ottenuto mediante diverse tecniche: ad esempio impiegando le nuove tecnologie di rapid-prototyping ed effettuando quindi una deposizione strato-per-strato della matrice con differenti concentrazioni di biomolecole. Oppure ingegnerizzando i micro/nano-carriers in modo tale che rispondano a specifici stimoli di natura elettrica e/o magnetica che ne guidino la distribuzione [3].

Capitolo 6. Clinical Trials

6.1 Clinical trial 1

Un'applicazione clinica delle metodologie di BTE a difetti ossei di grandi dimensioni è data dallo studio effettuato da M. Marcacci et al. agli inizi degli anni duemila. I risultati riportati furono i primi a supportare il successo clinico a lungo termine dell'approccio di ingegneria del tessuto osseo [32].

6.1.1 Metodi e materiali

Per lo studio furono selezionati quattro pazienti (Tabella 6.1) che presentavano perdite ossee significative con impossibilità di autorigenerazione, alcune delle quali trattate fallimentarmente con tecniche di ricostruzione convenzionali. La tecnica di tissue engineering applicata prevede l'utilizzo di scaffolds porosi realizzati in idrossiapatite (HA) seminati con cellule staminali mesenchimali autologhe prelevate dal midollo osseo.

Caso	Sesso (F/M)	Età [anni]	Localizzazione del difetto	Dimensione [cm]	Causa
1	F	41	Tibia	4	Frattura traumatica della caviglia aggravata da un processo osteomielitico trattata con insuccesso tramite tecniche di distrazione
2	F	16	Ulna	4	Sequestrectomia dell'ulna a causa di osteomielite in seguito a frattura traumatica esposta dell'ulna e del radio
3	M	22	Omero	7	Frattura esposta pluriframmentaria dell'omero e del gomito stabilizzata con fissatore esterno
4	F	29	Ulna	6	Pseudoartrosi ulnare a seguito di una frattura traumatica

Tabella 6.1: dati dei pazienti selezionati per lo studio.

Per la componente cellulare, campioni da 20 ml di midollo sono stati aspirati dalla cresta iliaca dei pazienti e lavati con un tampone fosfato salino (pH 7.2). Le cellule nucleate sono state poi sospese nel mezzo di coltura F12 modificato secondo Coon integrato con 10% di siero fetale bovino e 1 ng/mL di fattore di crescita dei fibroblasti umano (FGF-2). I dischi di coltura sono stati incubati a 37°C in atmosfera umidificata contenente 95% di aria e 5% di CO₂. Una volta che le cellule sono diventate confluenti, le BMSCs sono state staccate con 0.05% di tripsina e 0.01% di EDTA, contate, centrifugate e sospese in un piccolo volume di mezzo di coltura.

Nei primi tre casi, il materiale selezionato per lo scaffold è Finblock (FinCeramica Srl, Faenza, Italia) una bioceramica composta al 100% di HA con densità media di 1.26 (± 0.16)

g/cm³ e porosità del 60±5 vol.%. Nel caso 4 invece è stato scelto Engipore, con stessa composizione, ma con densità media di 0.72 (±0.09) g/cm³ e porosità del 80±3 vol.%.

Le matrici consistono in cilindri con dimensioni basate sulle rispettive lacune ossee (Tabella 6.2). Dopo la fabbricazione essi sono stati sterilizzati a secco per 4 ore a 200°C.

Caso	Altezza [cm]	Diametro esterno [cm]	Diametro canale centrale [cm]
1	4	3	0,5
2	4	1	0,2
3	7	2,5	0,5
4	6	1	0,3

Tabella 6.2: dimensioni dei cilindri utilizzati come scaffolds.

Le BMSCs espanse sono state sospese in Tissucol (Baxter AG, Vienna, Austria) con una densità di 2.0×10^7 cellule/mL. la sospensione cellulare è stata seminata sulle matrici poi incubate a 37°C per 60 minuti. Successivamente è stata aggiunta trombina per consentire la polimerizzazione del fibrinogeno ed eseguita un'altra incubazione a 37°C per 30 minuti. I costrutti così generati sono stati posti in contenitori sterili riempiti di un mezzo nutritivo integrato con un 5% di siero autologo. Per la procedura chirurgica, a tutti i pazienti è stata somministrata anestesia totale e profilassi antibiotica. I costrutti ingegnerizzati sono stati posizionati nei difetti ossei e gli arti stabilizzati con diversi impianti. Nei casi 2 e 4, durante la sessione chirurgica, sono stati posti sull'avambraccio rispettivamente un apparato di Lizarov e un fissatore esterno. Nel caso 1 un apparato di Lizarov era già stato posizionato sulla tibia durante il precedente intervento. Nel caso 3 era già presente un fissatore esterno monoassiale che, durante la procedura, è stato regolato per migliorare la stabilità meccanica dell'impianto. Dopo l'intervento chirurgico, i pazienti sono stati ricoverati in ospedale per 1 settimana

6.1.2 Risultati

Né nel periodo postoperatorio precoce, né in quello tardivo, si sono verificate complicazioni importanti in nessuno dei pazienti. Non sono stati osservati segni significativi di dolore, gonfiore o infezione nel sito di impianto. La formazione del callo all'interfaccia tra osso e scaffold è stata osservata mediante radiografia dopo 1-2 mesi dell'intervento. Nei mesi successivi è stato possibile rilevare neoformazione ossea perimplantare e una progressiva scomparsa della linea di raccordo tra costrutto e osso ospite. Il consolidamento è stato completato da 5 a 7 mesi dopo l'intervento chirurgico.

6.1.2.1 Caso 1

Nel caso 1, a seguito del consolidamento tra la tibia e l'impianto, il fissatore esterno è stato rimosso. Dopo 6 mesi dall'intervento chirurgico, il paziente è stato in grado di camminare senza supporto e con pieno carico sulla gamba coinvolta. La Figura 6.1 mostra le immagini relative all'evoluzione del trattamento nel paziente.

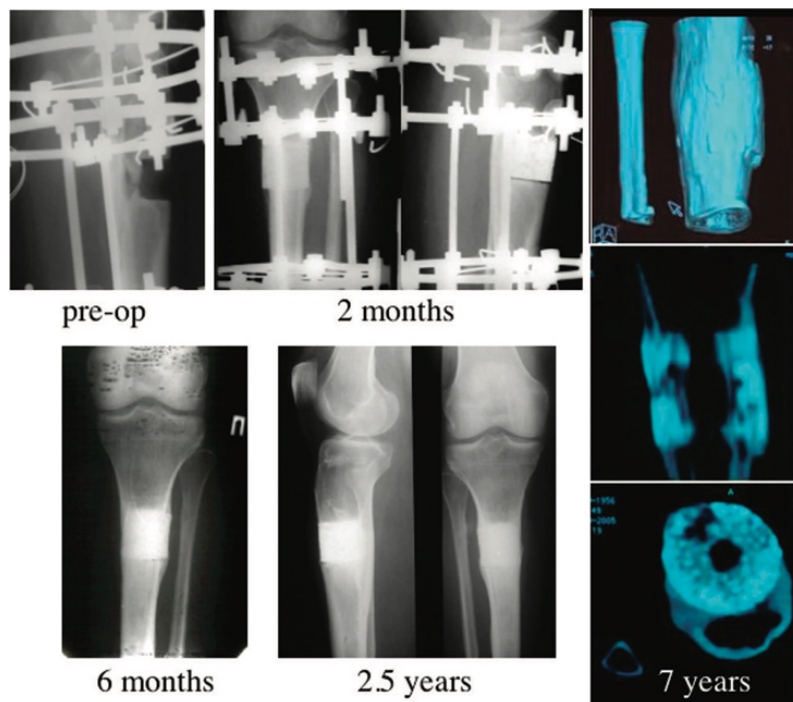


Figura 6.1: caso 1. Nella radiografia preoperatoria è visibile la lacuna ossea di 4 cm della tibia prossimale. A 2 mesi dall'intervento, è evidente la formazione del callo osseo, ma la linea dell'interfaccia osso-impianto è ancora rilevabile. A 6 mesi, sono presenti un callo esteso e tessuto neoformato perimplantare con una buona integrazione tra costruito e tibia. A 2 anni e mezzo dall'intervento, è visibile un'integrazione completa dell'impianto senza evidenza di fratture implantari. L'analisi della TAC (ricostruzioni 3D e 2D) a 7 anni mostra la completa guarigione del gap, la presenza di un canale midollare all'interno dell'impianto e la persistenza di una crescita ossea all'interno dei pori della matrice bioceramica.

6.1.2.2 Caso 2

Nel caso 2, dopo 7 mesi dall'intervento è stata raggiunta la completa integrazione tra impianto e osso, l'apparato di Lizarov è stato rimosso e il paziente ha potuto gradualmente recuperare la funzionalità dell'arto. La Figura 6.2 riporta le bioimmagini relative allo sviluppo del trattamento.

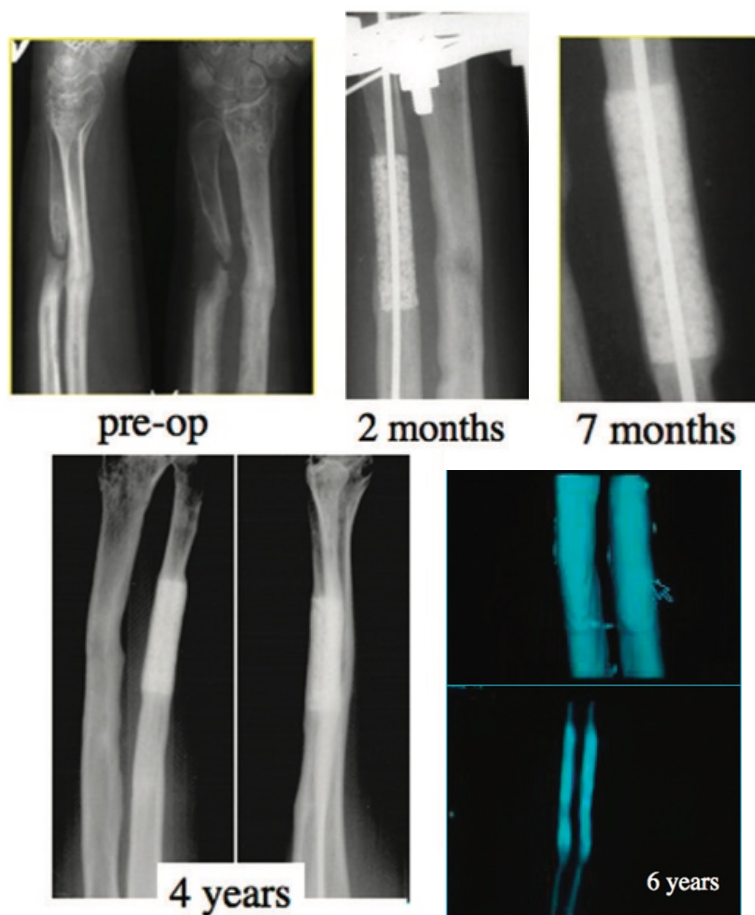


Figura 6.2: caso 2. Nella radiografia preoperatoria è ben visibile una perdita ossea di 4 cm a livello dell'ulna prossimale. A 2 mesi dall'intervento, si osserva il costruito impiantato, stabilizzato attraverso l'inserimento di un filo K; è visibile la formazione del callo all'interfaccia tra l'osso ospite e il cilindro in HA. A 7 mesi dall'intervento chirurgico, è evidente una completa integrazione dell'impianto e un'estesa neoformazione ossea in tutto il materiale; il filo K è ancora posizionato all'interno del canale midollare. A 4 anni, l'integrazione osso-impianto è mantenuta e non ci sono prove di fratture implantari. La TAC (ricostruzioni 3D e 2D) a 6 anni dimostra una ricostruzione completa dell'ulna con la presenza di un canale midollare all'interno dell'impianto. Non sono stati rilevati segni radiografici di riassorbimento bioceramico.

6.1.2.3 Caso 3

Il caso 3 è il più complicato da un punto di vista meccanico. L'apparato di Lizarov è stato rimosso a 8 mesi dall'impianto e dopo 16 mesi è stata raggiunta una completa integrazione con l'omero. Dopo 24 mesi, il paziente ha potuto recuperare la funzionalità dell'arto (considerando le limitazioni imposte dall'artrodesi del gomito necessaria per la riduzione della frattura). A circa 7 anni dall'intervento, il paziente si è detto soddisfatto del risultato del trattamento e privo di dolore. La Figura 6.3 riporta le radiografie fino a 16 mesi dall'intervento; la Figura 6.4 mostra le bioimmagini ottenute a distanza di 6 anni e 6 anni e mezzo.

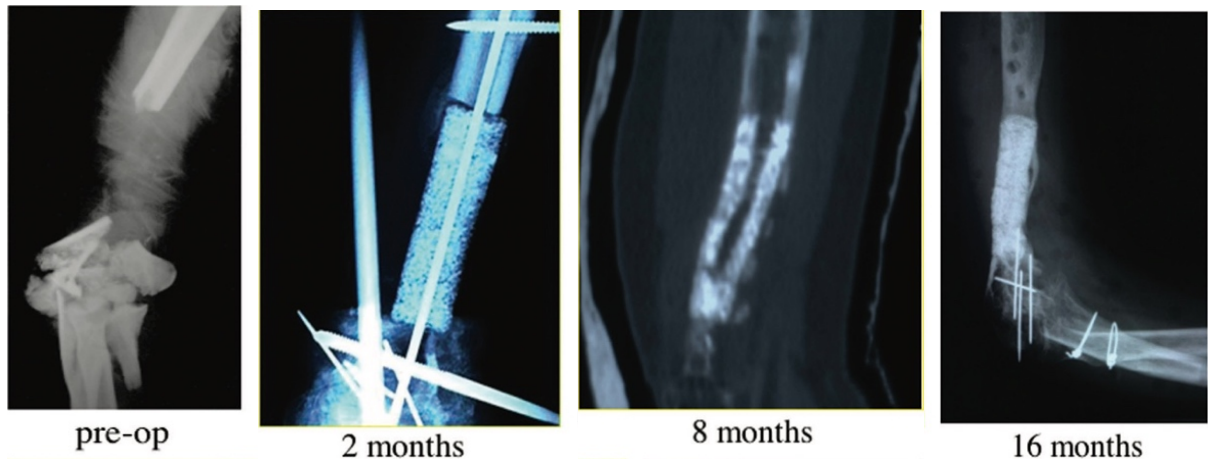


Figura 6.3: caso 3. La radiografia preoperatoria mostra una complessa frattura pluriframmentaria del gomito e dell'omero con perdita ossea di 7 cm nella parte distale. A 2 mesi dall'intervento, è visibile una formazione iniziale di callo all'interfaccia osso-impianto. A 8 mesi, dalla TAC 2D si rileva una crescita ossea lungo il cilindro in HA. Si ha la presenza di tessuto neoformato all'interno della ceramica porosa ed una completa guarigione del sito dell'impianto. A 16 mesi, le radiografie mostrano un'ottima incorporazione dell'innesto all'interno dell'omero.



Figura 6.4: caso 3. A) La valutazione radiografica a 6 anni dall'intervento mostra una buona integrazione dell'impianto all'interno dell'osso ospite. B) C) le scansioni TAC 3D e 2D a 6 anni confermano il risultato della radiografia. Non è presente alcuna evidenza di riassorbimento della bioceramica. D) E) La valutazione angiografica eseguita a 6,5 anni di distanza ha mostrato la completa vascolarizzazione dell'area dell'impianto.

6.1.2.4 Caso 4

Nel caso 4, 7 mesi dopo l'intervento chirurgico, è stato notato un allentamento del fissatore esterno sull'ulna prossimale. Pertanto, il fissatore è stato rimosso ed è stato posizionato un allotrapianto corticale con una piastra metallica per migliorare la stabilità meccanica dell'impianto. Durante questa seconda operazione, è stato possibile osservare una neoformazione ossea perimplantare. Otto mesi dopo il primo intervento, la paziente ha riacquisito la funzionalità dell'arto. La Figura 6.5 mostra immagini relative all'evoluzione del trattamento.

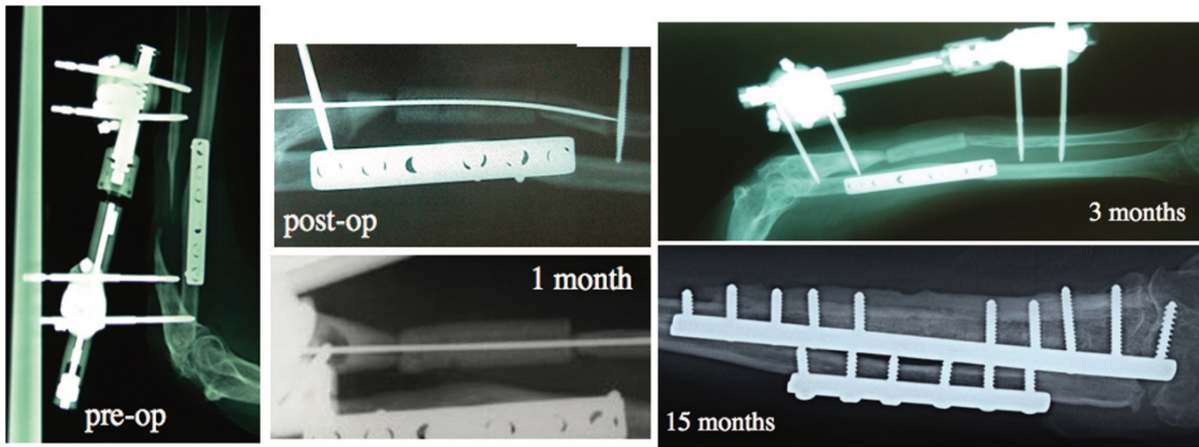


Figura 6.5: caso 4. La radiografia preoperatoria mostra la perdita ossea di 6 cm nell'ulna distale. Nel post-operatorio è visibile il costrutto ingegnerizzato mantenuto in posizione da un fissatore esterno e da un filo K posto all'interno del canale midollare. Rispetto agli altri casi, la matrice impiantata è meno lucente a causa della maggiore porosità del biomateriale. A 1 mese dall'intervento, è evidente un principio di integrazione tra osso e costrutto. Dopo 3 mesi, si osservano la formazione iniziale del callo e l'integrazione dell'impianto, ma è ancora presente la linea radiolucida all'interfaccia osso-impianto. La valutazione radiografica a 15 mesi risulta complicata a causa della presenza degli inserti metallici utilizzati per l'osteosintesi dell'alloinnesto corticale. Tuttavia, si possono notare una completa integrazione dell'impianto e neoformazione ossea in tutto il materiale.

6.1.3 Discussionione

Lo studio ha analizzato gli effetti a lungo termine dell'impianto di scaffolds ceramici seminati con BMSCs. I pazienti hanno recuperato la funzionalità degli arti in un tempo ragionevole e non sono state osservate reazioni avverse. I costrutti hanno mostrato una buona osteoconduttività: si sono verificate una progressiva integrazione con l'osso ospite, la formazione di tessuto neoformato e la vascolarizzazione del sito. Tuttavia, gli impianti non sono stati riassorbiti a più di 7 anni dell'intervento. Un innesto ideale dovrebbe fornire un supporto iniziale per le cellule ed essere poi lentamente dissolto dall'organismo. Negli anni successivi gli sforzi nell'ambito dell'ingegneria tissutale si sono incentrati sulla realizzazione di strutture riassorbibili [32].

6.2 Clinical trial 2

Un'applicazione più avanzata delle tecniche BTE è presente nello studio effettuato da George K. Sándor et al. presso l'Università di Tampere in Finlandia nel 2013. L'applicazione clinica riguarda l'impiego di cellule staminali di derivazione adiposa per la ricostruzione di difetti ossei cranio-maxillofacciali [33].

6.2.1 Metodi e materiali

All'interno dello studio sono stati selezionati tre pazienti (Tabella 6.3) soggetti ad asportazioni di segmenti ossei mandibolari di grandi dimensioni causate dalla resezione di ameloblastomi.

Caso	Sesso (F/M)	Età [anni]	Localizzazione del difetto	Dimensione [cm]
1	M	55	mento	10
2	F	50	ramo e corpo mandibolare	8.5
3	M	43	corpo mandibolare	6

Tabella 6.3: dati dei pazienti selezionati per lo studio.

La tecnica di ricostruzione prevede la combinazione di uno scaffold costituito da granuli di β -TCP ChronOS, cellule ADSCs autologhe e il fattore di crescita rhBMP-2. Per la componente cellulare, sono stati prelevati 50-200 ml di tessuto adiposo sottocutaneo, tritato con forbici e poi trattato con collagenasi ricombinante NB-6. Le ADSCs sono state poi isolate ed espanse per tre settimane nel mezzo di coltura DMEM con un 10-15% di siero autologo. Per la realizzazione dei costrutti ingegnerizzati, i granuli di β -TCP sono stati incubati per 48 ore in un mezzo basale contenente 12 mg di rhBMP-2; il fluido è poi stato scartato e le cellule sono state aggiunte agli scaffolds. I costrutti sono stati successivamente incubati per 24-48 ore in una miscela contenente traccianti utili a testare la vitalità e l'adesione cellulare. Sono stati sfruttati dei software per la progettazione e realizzazione di piastre e reti contenitive in titanio. L'operazione chirurgica ha previsto la resezione del tessuto canceroso e l'impianto del costrutto ingegnerizzato stabilizzato attraverso l'applicazione delle strutture metalliche. Nella fase post-operatoria i tre pazienti sono stati seguiti tramite valutazioni cliniche effettuate a distanza di una settimana, uno, sei e dodici mesi dopo l'intervento; e in seguito annualmente.

6.2.2 Risultati e discussione

In tutti e tre i pazienti, la rete in titanio ha mostrato problematiche richiedendone la resezione dei bordi superiori. Gli autori avrebbero quindi preferito l'utilizzo di una rete in materiale biorisorbibile della quale però, al momento in cui i casi sono stati trattati, non era ancora disponibile un track record per grandi ricostruzioni mandibolari; inoltre, essi temevano un'eventuale reazione avversa causata dall'abbassamento del pH generato dalla degradazione di una rete polimerica.

Il follow-up, nei tre casi, ha avuto una durata di 51, 29 e 27 mesi rispettivamente. Il costrutto è stato correttamente integrato e la rigenerazione del tessuto è avvenuta con successo senza segnalazioni di complicazioni. Due dei tre pazienti hanno successivamente subito l'innesto di impianti dentali: su un totale di sette impianti, sei hanno riportato un'efficace osteointegrazione con recupero della funzione masticatoria. Ciò costituisce un'ulteriore dimostrazione del successo della ricostruzione mandibolare [33].

La Figura 6.6 mostra una sequenza di immagini relative all'evoluzione dell'applicazione di BTE nel paziente 2.

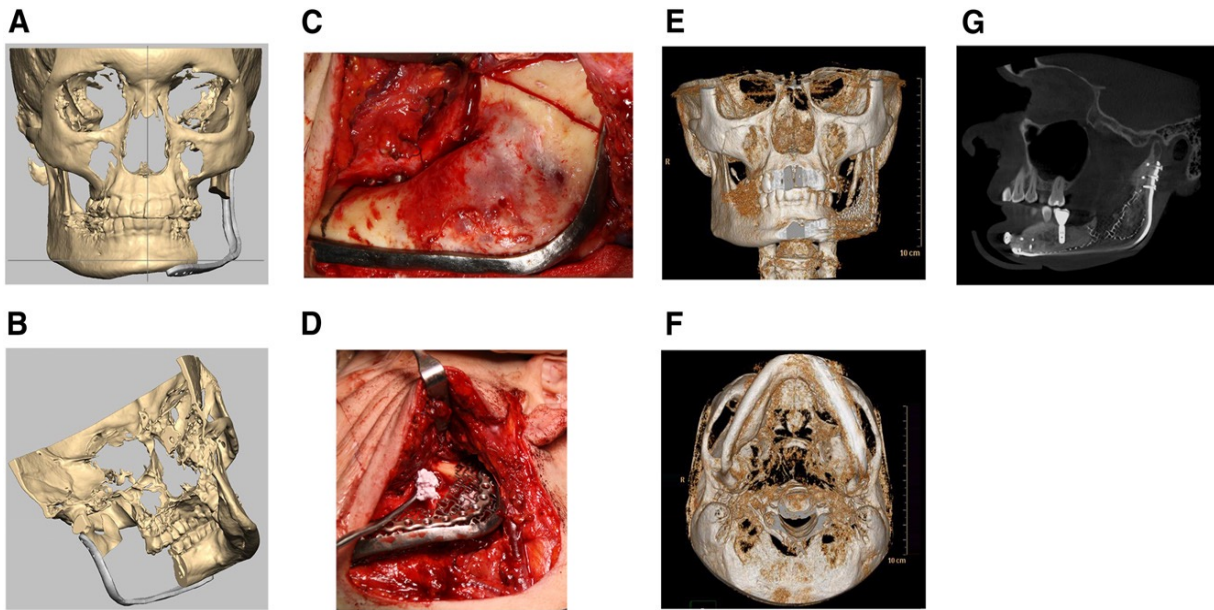


Figura 6.6: immagini relative al caso 2. A) B) Immagini generate al computer utilizzando il software Romexis per la pianificazione preoperatoria virtuale: mostrano la piastra di ricostruzione posta sull'area prevista per la resezione da una visuale anteriore (A) e mediale (B). C) Fotografia intraoperatoria che mostra la piastra di ricostruzione in posizione e le linee di resezione mandibolare. D) Fotografia intraoperatoria con costruito ingegnerizzato posto sotto la rete di contenimento in titanio nel sito di resezione mandibolare. E) F) Tomografie computerizzate tridimensionali (TC 3D) postoperatorie mostrano il ramo mandibolare rigenerato 12 mesi dopo l'intervento da una vista anteriore (E) e basilare (F). G) Scansione TC cone beam che mostra la presenza di un impianto dentale efficacemente inserito nell'osso mandibolare rigenerato.

Conclusioni

La *tissue engineering* rappresenta un ambito di grande interesse nel campo biomedicale. La neomorfogenesi di tessuti biologici attraverso strategie ingegneristiche costituisce un elemento essenziale per un radicale cambio di prospettiva: da un approccio terapeutico di tipo sostitutivo ad uno di tipo rigenerativo.

Nell'ambito del tessuto osseo, l'ingegneria tissutale (BTE, bone tissue engineering) trova particolare utilità nel trattamento di difetti di dimensioni critiche che non consentono lo sviluppo del naturale processo di autoriparazione. La combinazione di scaffolds realizzati in materiali biorisorbibili, cellule staminali e fattori di crescita rappresenta una promettente alternativa alle tradizionali tecniche di innesto osseo che possiedono alcune imitazioni.

Ad oggi non esiste una procedura di *tissue engineering* standardizzata per il trattamento di difetti ossei rilevanti. Numerosi sono gli studi svolti in questo campo con l'obiettivo di realizzare un impianto che permetta la rigenerazione del tessuto e conferisca, allo stesso tempo, un efficace supporto meccanico. Alcune delle principali preoccupazioni nell'ambito della BTE, riguardano la regolazione della velocità di degradazione della struttura e l'adeguata applicazione di cellule e fattori di crescita che consenta un impianto sicuro, un'intensa attività osteogenica e una vascolarizzazione del sito. Per queste ragioni è fondamentale la scelta di biomateriali opportuni che posseggano buone proprietà meccaniche e un tasso di riassorbimento controllato; un'altra decisione essenziale è quella riguardante la tecnica di produzione dello scaffold per garantire la realizzazione di strutture con specifici parametri in termini di porosità e topografia superficiale. È poi necessario considerare attentamente la fonte di cellule staminali e i metodi di coltura sfruttati per assicurarne l'espansione, la preservazione della vitalità e un'efficiente attività. Per ultimo, riveste un ruolo importante la componente dei fattori di crescita, per i quali oltre all'individuazione dell'opportuna classe di molecole, è indispensabile selezionare tecniche di incorporazione e rilascio mirate, che favoriscano la promozione dei processi di rigenerazione.

L'avvento di nuove tecnologie come quelle di rapid prototyping per la fabbricazione delle matrici, bioreattori avanzati per la coltura cellulare e sistemi innovativi per il rilascio controllato dei fattori biochimici, costituisce uno strumento favorevole all'ottenimento di costrutti sempre più sofisticati che riproducano al meglio i processi fisiologici di riparazione del tessuto.

La sfida fondamentale relativa alla *bone tissue engineering* concerne la traslazione clinica delle tecniche fino ad oggi elaborate: mentre è disponibile un elevatissimo numero di ricerche e studi preclinici, i trial clinici a disposizione sono limitati e riguardano in gran parte trattamenti di lacune ossee di dimensioni ridotte. Ciò è una testimonianza della rilevanza e

dell'ampio interesse che caratterizzano l'ingegneria tissutale del tessuto osseo, ma anche dei numerosi ostacoli presenti per l'effettiva applicabilità clinica di queste tecniche.

Bibliografia

- [1] Ho-Shui-Ling A, Bolander J, Rustom LE, Johnson AW, Luyten FP, Picart C. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. *Biomaterials*. 2018 Oct;180:143-162
- [2] Perić Kačarević Ž, Rider P, Alkildani S, Retnasingh S, Pejakić M, Schnettler R, Gosau M, Smeets R, Jung O, Barbeck M. An introduction to bone tissue engineering. *Int J Artif Organs*. 2020 Feb;43(2):69-86
- [3] Oliveira ÉR, Nie L, Podstawczyk D, Allahbakhsh A, Ratnayake J, Brasil DL, Shavandi A. Advances in Growth Factor Delivery for Bone Tissue Engineering. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 18;22(2):903
- [4] Neto AS, Ferreira JMF. Synthetic and Marine-Derived Porous Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials (Basel)*. 2018 Sep 13;11(9):1702
- [5] Schmidt AH. Autologous bone graft: Is it still the gold standard? *Injury*. 2021 Jun;52 Suppl 2:S18-S22
- [6] Baldwin P, Li DJ, Auston DA, Mir HS, Yoon RS, Koval KJ. Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. *J Orthop Trauma*. 2019 Apr;33(4):203-213
- [7] Roddy E, DeBaun MR, Daoud-Gray A, Yang YP, Gardner MJ. Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2018 Apr;28(3):351-362
- [8] Panagopoulos GN, Mavrogenis AF, Mauffrey C, Lesenský J, Angelini A, Megaloikonomos PD, Igoumenou VG, Papanastassiou J, Savvidou O, Ruggieri P, Papagelopoulou PJ. Intercalary reconstructions after bone tumor resections: a review of treatments. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2017 Aug;27(6):737-746
- [9] Sharma P, Kumar P, Sharma R, Bhatt VD, Dhot PS. Tissue Engineering; Current Status & Futuristic Scope. *J Med Life*. 2019 Jul-Sep;12(3):225-229
- [10] Di Bello C, Bagno A, *Biomateriali dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche*, Pàtron Editore, 2016
- [11] Vacanti CA. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med*. 2006 Jul-Sep;10(3):569-76
- [12] Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng*. 2011;2:403-30

- [13] Wubneh A, Tsekoura EK, Ayranci C, Uludağ H. Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 2018 Oct 15;80:1-30
- [14] Quarto R, Giannoni P. Bone Tissue Engineering: Past-Present-Future. *Methods Mol Biol.* 2016;1416:21-33
- [15] Park JY, Park SH, Kim MG, Park SH, Yoo TH, Kim MS. Biomimetic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1064:109-121
- [16] Battafarano G, Rossi M, De Martino V, Marampon F, Borro L, Secinaro A, Del Fattore A. Strategies for Bone Regeneration: From Graft to Tissue Engineering. *Int J Mol Sci.* 2021 Jan 23;22(3):1128
- [17] Roseti L, Parisi V, Petretta M, Cavallo C, Desando G, Bartolotti I, Grigolo B. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017 Sep 1;78:1246-1262
- [18] Qi J, Yu T, Hu B, Wu H, Ouyang H. Current Biomaterial-Based Bone Tissue Engineering and Translational Medicine. *Int J Mol Sci.* 2021 Sep 23;22(19):10233
- [19] Guo L, Liang Z, Yang L, Du W, Yu T, Tang H, Li C, Qiu H. The role of natural polymers in bone tissue engineering. *J Control Release.* 2021 Oct 10;338:571-582. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.08.055
- [20] Ghassemi T, Shahroodi A, Ebrahimzadeh MH, Mousavian A, Movaffagh J, Moradi A. Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering. *Arch Bone Jt Surg.* 2018 Mar;6(2):90-99
- [21] Qu H, Fu H, Han Z, Sun Y. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review. *RSC Adv.* 2019 Aug 21;9(45):26252-26262
- [22] Ma H, Feng C, Chang J, Wu C. 3D-printed bioceramic scaffolds: From bone tissue engineering to tumor therapy. *Acta Biomater.* 2018 Oct 1;79:37-59
- [23] Kim HD, Amirthalingam S, Kim SL, Lee SS, Rangasamy J, Hwang NS. Biomimetic Materials and Fabrication Approaches for Bone Tissue Engineering. *Adv Healthc Mater.* 2017 Dec;6(23)
- [24] Archunan MW, Petronis S. Bone Grafts in Trauma and Orthopaedics. *Cureus.* 2021 Sep 4;13(9):e17705
- [25] Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 2012;40(5):363-408
- [26] Tevlin R, Walmsley GG, Marecic O, Hu MS, Wan DC, Longaker MT. Stem and progenitor cells: advancing bone tissue engineering. *Drug Deliv Transl Res.* 2016 Apr;6(2):159-73

- [27] Ng J, Spiller K, Bernhard J, Vunjak-Novakovic G. Biomimetic Approaches for Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 2017 Oct;23(5):480-493
- [28] Yong KW, Choi JR, Choi JY, Cowie AC. Recent Advances in Mechanically Loaded Human Mesenchymal Stem Cells for Bone Tissue Engineering. *Int J Mol Sci.* 2020 Aug 13;21(16):5816
- [29] Sladkova, M.; De Peppo, G.M. Bioreactor Systems for Human Bone Tissue Engineering. *Processes* 2014, 2, 494-525
- [30] Manzini BM, Machado LMR, Noritomi PY, DA Silva JVL. Advances in Bone tissue engineering: A fundamental review. *J Biosci.* 2021;46:17
- [31] Dang M, Saunders L, Niu X, Fan Y, Ma PX. Biomimetic delivery of signals for bone tissue engineering. *Bone Res.* 2018 Aug 29;6:25
- [32] Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng.* 2007 May;13(5):947-55
- [33] Sándor GK, Numminen J, Wolff J, Thesleff T, Miettinen A, Tuovinen VJ, Mannerström B, Patrikoski M, Seppänen R, Miettinen S, Rautiainen M, Öhman J. Adipose stem cells used to reconstruct 13 cases with cranio-maxillofacial hard-tissue defects. *Stem Cells Transl Med.* 2014 Apr;3(4):530-40

Ringraziamenti

A conclusione di questo elaborato vorrei ringraziare il mio relatore prof. Andrea Bagno per la disponibilità e il sostegno offerto nella stesura della tesi.

Ringrazio inoltre il prof. Stefano Masiero per i chiarimenti forniti relativamente all'interpretazione della radiografia presente in Figura 1.4.