

Università degli Studi di Napoli Federico II

Facoltà di Ingegneria



**Dipartimento di Ingegneria dei
Materiali e della Produzione**

**Dottorato di ricerca in
Ingegneria dei Materiali e delle Strutture
XXI° ciclo**

**STRATEGIA *BOTTOM-UPPER* LA PRODUZIONE DI
BIOIBRIDI TESSUTALI *IN VITRO***

Coordinatore
PROF. D. ACIERNO

Candidata
GIORGIA IMPARATO

Tutor
PROF. P.A. NETTI

ANNO ACCADEMICO 2007 - 2008

INDICE

Introduzione	1
Capitolo I	
Stato dell'Arte: gli approcci dell'Ingegneria dei Tessuti	
1.1 L'approccio classico dell'Ingegneria dei tessuti	7
1.1.1 Cellule e scaffold	7
1.1.2 Il ruolo del Bioreattore	11
1.1.2.1 Semina cellulare in scaffold 3D	12
1.1.2.2 Miglioramento del trasporto di massa	14
1.1.2.3 Il condizionamento meccanico	21
1.2 <i>Cell sheet engineering</i>	23
1.3 Microcarriers per l'ingegneria dei tessuti	33
Bibliografia	41
Capitolo II	
Ingegneria tessutale del derma	
2.1 Il derma	48
2.1.1 Le cellule	49
2.1.2 Le fibre	50
2.1.3 La sostanza fondamentale	51
2.2 Ingegnerizzazione del derma <i>in vitro</i>	52
2.2.1 derma artificiale	54
2.2.1.1 Collagene e glicosamminoglicani	54
2.2.1.2 Acido Poliglicolico (PGA)	57
2.2.1.3 Altri materiali	58
2.2.2 Derma allogenico e derma allogenico acellulare	59
2.3. Applicazioni della pelle ingegnerizzata	60
Bibliografia	62

Capitolo III

Formazione e caratterizzazione di precursori di tessuto micrometrici (μ TPs)

3.1 Introduzione	66
3.2 Materiali	67
3.2.1 Gelatina	67
3.2.2 Microbiglie di gelatina commerciali	68
3.2.3 Microbiglie di gelatina <i>home made</i> ottenute con il metodo della doppia emulsione	69
3.2.4 Fibroblasti bovini primari del derma	71
3.2.5 Sistema di coltura con Spinner flask	71
3.3 Metodi	72
3.3.1 Semina sulle microbiglie	72
3.3.2 Proliferazione cellulare	72
3.3.3 Vitalità cellulare: colorazione con MTT	73
3.3.4 Analisi delle immagini per valutare la deposizione del <i>layer</i> di <i>neo</i> -tessuto intorno alle microbiglie	74
3.3.5 Analisi istologiche	74
3.3.6 Analisi SEM	75
3.3.7 Analisi istochimica: Tricromica di Mallory	75
3.4 Risultati e Discussione	76
3.5 Conclusioni	85
Bibliografia	87

Capitolo IV

Realizzazione di costrutti tessutali 3D *disc-shape* in condizioni dinamiche

4.1 Introduzione	88
4.2 Assembling e coltura dei μ TPs nel bioreattore	88
4.2.1 Geometria interna del Bioreattore	88
4.2.2 Caricamento del bioreattore con i μ TPs e <i>flow loop</i> del sistema	91
4.2.3 Analisi fluidodinamica all'interno del camera di maturazione	93
4.2.4 Condizioni di coltura nel bioreattore	95
4.3 Caratterizzazione del costrutto tessutale 3D	96
4.3.1 Analisi Reologiche	97

4.3.2 Analisi SEM	98
4.3.3 Analisi istologiche	98
4.3.4 Analisi istochimica: Tricromica di Mallory	98
4.4 Risultati e discussione	99
4.5 Conclusioni	110
Bibliografia	112

Capitolo V

Realizzazione di costrutti tessutali 3D *disc-shape* e *fiber shape* in condizioni statiche

5.1 Introduzione	113
5.2. Caricamento dei mould con i μ TPs e condizioni di coltura	113
5.2.1 mould <i>fiber-shape</i>	113
5.2.2 mould <i>disc-shape</i>	115
5.3 Caratterizzazione dei costrutti	116
5.3.1 Analisi istologiche	116
5.3.2 Analisi TEM	116
5.3.3 Analisi SEM	117
5.3.4 Analisi istochimica: Tricromica di Mallory	117
5.4 Risultati e discussione	117
5.5 Conclusioni	123

Introduzione

Nel presente lavoro di Dottorato di Ricerca si propone una nuova strategia per realizzare un tessuto complesso *in vitro*, in diverse forme.

La strategia proposta viene denominata "*bottom up*" perché l'approccio seguito mira ad assemblare precursori di tessuto micrometrici (μ TPs) per generare bioibridi tessutali 3D in una forma predefinita.

I precursori di tessuto micrometrici sono rappresentati da microsfere di gelatina porose seminate in spinner flask con fibroblasti del derma bovino, che sotto determinate condizioni di coltura aderiscono, proliferano e sintetizzano le componenti fondamentali della matrice extracellulare (ECM).

Si genera, così, un *multilayer* di cellule ed ECM intorno e nelle porosità delle singole microsfere creando dei microtessuti (precursori micrometrici di tessuto), utilizzabili come *building blocks* per la costruzione di tessuti 3D spessi e vitali *in vitro*.

Tale progetto si inserisce nell'ambito dell'Ingegneria dei Tessuti il cui obiettivo è quello di ricreare sostituti tessutali *in vitro* combinando cellule e matrici sotto definite condizioni di laboratorio [1].

L'ingegneria dei Tessuti utilizza la proprietà delle cellule, che in adatte condizioni chimico-fisiche e di apporto di nutrienti, coltivate su un'impalcatura (scaffold) tridimensionale che rappresenta un supporto meccanico temporaneo per le stesse, sono in grado di ricostruire il loro tessuto tipico perché mantengono anche *in vitro* la capacità di produrre ECM [2], il materiale "cementante" in cui si trovano naturalmente immerse *in vivo*.

Pertanto l'approccio classico dell'ingegneria dei tessuti è quello di isolare le cellule dal paziente o da altra fonte, inserirle in uno scaffold e processare opportunamente il costruito o bio-ibrido, in modo tale che le cellule in esso seminate producano un tessuto funzionale in grado di essere impiantato al posto del tessuto danneggiato. In tale contesto, la comunità scientifica ha accumulato notevole esperienza nel comprendere i meccanismi che portano una cellula a produrre un particolare tessuto e i complessi fenomeni coinvolti nell'attività biosintetica.

Il processo di un tessuto *in vitro*, comunque, non è ancora stato completamente ottimizzato dal punto di vista di produzione in larga scala dello stesso, nel senso che non vi è ancora una produzione in condizioni controllate, per la quale, cioè, esistono delle teorie che descrivono il fenomeno fisico e che possono essere implementate in modelli matematici che a loro volta servono per dimensionare impianti e processi.

Per i tessuti esiste oggi "solo" una banca dati di informazioni dovute ad esperienze "trial and error". Esistono dei modelli che riescono a descrivere i fenomeni meccanici e biosintetici, ma sono ancora separati tra loro. Invece dalle esperienze che si hanno sulle risposte cellulari si intuisce che un tessuto o un costrutto deve essere visto come un sistema nel quale tutti i fenomeni sono accoppiati.

Il sistema di coltura, in cui il processo del costrutto tessutale è compiuto, diventa quindi anch'esso un componente essenziale dello schema classico dell'ingegneria dei tessuti, ed è nella maggior parte dei casi rappresentato dal bioreattore.

Il bioreattore definito come un dispositivo nel quale i processi biologici e/o biochimici hanno luogo sotto condizioni ambientali ed operative attentamente e strettamente controllate, assicura lo scambio di gas e l'apporto di nutrienti così come la rimozione dei prodotti di scarto del metabolismo cellulare, superando i principali fattori limitanti delle colture statiche di costrutti 3D *in vitro* [3].

Difatti l'ottimizzazione delle condizioni di processo, sono comunque rese difficili anche dal fatto che non sono ancora perfettamente noti i processi di assemblaggio e di rimodellamento dei tessuti *in vitro*.

Mentre i processi di biosintesi cellulare sono stati ampiamente studiati e discussi, poco noti sono, invece, i meccanismi che regolano e controllano l'assemblaggio delle componenti molecolari della matrice extracellulare che forma il tessuto. In particolare, poco conosciuti in letteratura sono i parametri e le cinetiche che regolano il complesso meccanismo dell'assemblaggio che ha luogo all'interno dello spazio extracellulare a partire dalle molecole della matrice neo-sintetizzate, e il possibile ruolo che le cellule hanno in questo contesto, rendendo non facile l'ottimizzazione delle condizioni di processo.

C'è da dire che sebbene siano stati fatti notevoli progressi nell'ingegnerizzazione di scaffold e nella progettazione dei bioreattori ad oggi la produzione di tessuti 3D funzionali è ancora limitata.

I maggiori ostacoli nell'ottenere tessuti più spessi di 2mm senza limitazioni di forma sono rappresentati dalle barriere al trasporto di nutrienti e ossigeno e dalla non omogenea distribuzione delle cellule nel tessuto.

Per superare queste limitazioni sono state proposte nuove strategie. Una delle più accreditate è probabilmente la "cell sheet engineering" [4,5] sviluppata da Okano et al. in cui l'utilizzo di particolari piastre termoresponsive per la coltura delle cellule permette che esse siano raccolte come fogli intatti, appunto "cell sheet", insieme alla matrice extracellulare da esse depositata.

In questo modo non si utilizzano i classici metodi di raccolta proteolitica che distruggono tutte le giunzioni cellula-cellula e cellula-ECM e i foglietti di cellule

collezionati, messi in contatto sono capaci di aderire l'uno all'altro grazie alla presenza della matrice extracellulare depositata, portando alla formazione di costrutti tessutali 3D in cui la comunicazione intercellulare è mantenuta.

La *cell sheet engineering* è stata utilizzata con successo per realizzare tessuti vitali, per la rigenerazione della cornea e del tessuto miocardico [6] attraverso la giustapposizione dei sottili strati di tessuti cellulari, ed è pertanto sotto sperimentazione clinica in Giappone. Il tessuto risultante dalla giustapposizione di diversi "cell sheet" è altamente cellularizzato (>90%) ed ha una bassa percentuale di matrice extracellulare. Essa, perciò, risulta essere molto efficace nel ricostruire tessuti caratterizzati da un elevato rapporto cellule/matrice extracellulare come il tessuto miocardico ma non può essere direttamente implementata per la produzione *in vitro* di un tessuto caratterizzato da un elevato ammontare di matrice extracellulare, come il derma, l'osso e la cartilagine.

In questo contesto, la strategia "bottom up" per la produzione di bioibridi tessutali *in vitro*, sviluppata in questo lavoro di dottorato, può essere vista come un ibrido tra i metodi classici dell'ingegneria dei tessuti (cellule, scaffold, bioreattore) e l'approccio di Okano.

L'obiettivo è quindi di ottenere costrutti tessutali spessi e vitali con una densa matrice extracellulare, costruiti attraverso l'assemblaggio di precursori micrometrici di tessuto.

La prima parte del lavoro, pertanto, è focalizzata sulla realizzazione dei precursori micrometrici di tessuto ottenuta attraverso la semina dinamica di fibroblasti bovini del derma su scaffold porosi micrometrici rappresentati da microsferi di gelatina porose.

La seconda parte è incentrata sull'assemblaggio dei precursori di tessuto micrometrici in un bioibrido tessutale 3D macroscopico la cui formazione-maturazione è ottenuta in un bioreattore a perfusione.

Questa strategia permette di superare le limitazioni presentate dall'approccio classico dell'ingegneria dei tessuti legate essenzialmente ai problemi di trasporto dei nutrienti all'interno di costrutti spessi e ai vincoli geometrici dettati dalla forma predefinita dello scaffold, e segue la filosofia dell'approccio di Okano di "costruire" un tessuto dalla giustapposizione di microtessuti (*cell sheet* nell'approccio di Okano) ottenendo tessuti spessi, ricchi di matrice extracellulare.

Diversi parametri e condizioni di coltura sono state esplorate in entrambe le fasi del processo.

La composizione, la grandezza, la porosità e la velocità di degradazione delle microsferi così come il tempo e la velocità di stirring della semina dinamica nella

prima fase del processo sono determinanti chiave per l'ottenimento dei precursori di tessuto micrometrici, mentre la procedura di riempimento della camera di maturazione del bioreattore a perfusione e le condizioni di flusso durante la coltura sono determinati chiave della seconda fase del processo (fase di maturazione del bioibrido).

Nel seguito pertanto verranno descritte in dettaglio entrambe le fasi che hanno portato all'ottenimento di bioibridi tessutali 3D, di forme diverse e in diverse condizioni di coltura..

1. R. Langer , J. Vacanti, "**Tissue Engineering**" Science 260:920, 1993.
2. K. Webb, W. Li, R. W. Hitchcock, R. M. Smeal, S. D. Gray, and Patrick A. Tresco. "**Comparison of human fibroblast ECM-related gene expression on elastic three-dimensional substrates relative to two-dimensional films of the same material.**" *Biomaterials*, 24:4681-90 (2003).
3. I. Martin, D. Wendt and M. Heberer "**The role of bioreactors in tissue engineering**" 2004 TRENDS in Biotechnology Vol.22 No.2
4. N. Matsuda et al. "**Tissue Engineering Based on Cell Sheet Technology**" 2007 Adv. Mater, 19, 3089-3099
5. J.Yang et al. "**Cell sheet engineering: Recreating tissues without biodegradable scaffolds**" (2005) *Biomaterials* 26 (6415-6422)
6. T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano, "**Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction**", *Biomaterials* 24 (13) (2003) 2309-2316.

Capitolo 1

Stato dell'arte

Gli approcci dell'Ingegneria dei Tessuti

L' Ingegneria dei Tessuti riguarda lo sviluppo *in vitro* di sostituti funzionali di tessuti ed organi viventi, utilizzabili laddove un tessuto o un organo risultando danneggiato non è più in grado di adempiere alle sue funzioni.

La richiesta crescente di organi artificiali e supporti protesici (dovuta soprattutto all'aumento dell'età media degli individui ed alla loro maggiore disponibilità economica) insieme con i progressi raggiunti sia nelle metodologie di colture cellulari che nella ricerca di nuovi biomateriali, hanno alimentato l'interesse del settore, in questi ultimi anni, alla possibilità di riparare i tessuti danneggiati favorendo la ricrescita delle stesse cellule, in modo da ripristinare il tessuto originale.

I tessuti e gli organi ingegnerizzati rappresentano un' alternativa ai donatori umani e la speranza per molti pazienti che aspettano di ricevere un trapianto.

Dal momento che c'è una cronica carenza di organi, l'ingegneria dei tessuti è un'area rapidamente in crescita e i tentativi da parte dei ricercatori di sviluppare modelli *in vitro* di sostituti di tessuti ingegnerizzati per tutte le parti del corpo sono costantemente in corso [1].

Lo schema dell' Ingegneria dei Tessuti si basa sul principio che uno specifico tessuto possa essere ricostruito *in vitro* attraverso una procedura di fabbricazione che consta di vari step. Essenzialmente l'approccio classico coinvolge la presenza di **cellule** (i veri e propri "ingegneri del tessuto"), l'utilizzo di **scaffold biomateriali** (progettati per fornire un supporto strutturale e logistico per lo sviluppo del tessuto e per degradare a velocità controllata) e di **bioreattori** (progettati per controllare il microambiente cellulare, facilitare il trasporto di massa alle cellule e provvedere i necessari segnali regolatori biochimici e fisici) [2].

Seguendo questo approccio l'Ingegneria dei Tessuti, negli ultimi 20 anni, ha raggiunto risultati incoraggianti nella ricreazione di alcuni tessuti come l'osso [3], le valvole cardiache [4] e la cartilagine [5]. Malgrado i notevoli successi ottenuti sembra però che l'Ingegneria dei Tessuti non sia cresciuta tanto velocemente

quanto ci si aspettava, e l'ottenimento di tessuti 3D *in vitro* funzionali e spessi oltre i 2mm appare ancora limitato.

Pertanto nuove idee e metodi sono stati proposti per superare i limiti dell'approccio classico, attualmente l'approccio più promettente e di successo in contesto clinico è probabilmente rappresentato dalla **Cell-Sheet Engineering** [6,7,8] proposta in Giappone dal Prof. Teruo Okano.

Questa tecnologia brevettata mira a realizzare tessuti 3D vitali e spessi ottenuti attraverso la sovrapposizione di sottili strati di foglietti cellulari.

Dal momento che come già spiegato nell'Introduzione l'approccio proposto in questo lavoro di dottorato di ricerca, è un ibrido tra l'approccio classico dell'Ingegneria dei Tessuti e la *Cell Sheet Engineering* in questo capitolo lo Stato dell'Arte di entrambi verrà analizzato.

1.1 L'approccio classico dell'Ingegneria dei Tessuti

Come già accennato l'approccio classico dell'Ingegneria dei Tessuti è basato sul seminare le cellule in uno scaffold polimerico biodegradabile o un gel, coltivare il costruito scaffold-cellule in un bioreattore per varie settimane, e infine impiantare il tessuto risultante nell'organismo che deve riceverlo e in cui la maturazione del nuovo organo avrà luogo [9].

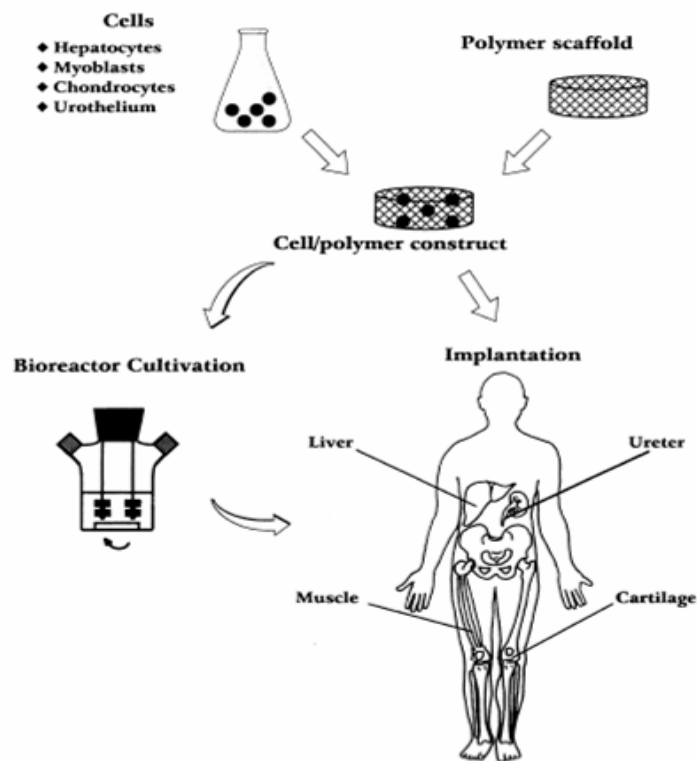


Figura 1: Rappresentazione schematica della tecnica di approccio classica dell'ingegneria dei tessuti. (figura Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration Vacanti).

1.1.1 Cellule e Scaffold

La sorgente da cui vengono prelevate le cellule ha un'enorme influenza sul successo dell'impianto. Le cellule possono essere classificate in autologhe, se provengono dal paziente stesso, allogeniche, se sono cellule umane che però non appartengono al paziente, e xenogeniche, se sono cellule di origine animale.

Le prime sono quelle che più si addicono all'ingegneria dei tessuti, infatti per ovvie ragioni, i primi trials clinici in molti casi le hanno utilizzate bypassando i problemi di immunogenecità. Un problema associato con l'uso di queste cellule è la difficoltà di raccoglierne una quantità sufficiente; problema che si presenta soprattutto se i tessuti hanno subito un danno rilevante o se il paziente si trova in età avanzata. Se l'ammontare di cellule non è sufficiente per l'uso clinico, queste devono essere espanse coltivandole in vitro; è una procedura che richiede tempo e condizioni sterili di coltura per evitare possibili infezioni virali.

Ci sono comunque altri problemi relativi alla fonte di cellule, non solo ci sono differenze associate con le specie, ma anche differenze associate con la posizione nel corpo. Ad esempio le cellule vascolari dell'endotelio al variare della posizione nei vasi possono avere caratteristiche fenotipiche e funzionali molto differenti. Ci possono essere anche differenze associate all'età e scarsa attenzione è stata posta a differenze nelle cellule allogeniche associate con l'età del donatore. Anche con le cellule autologhe ci possono essere problemi legati all'età, che includono la funzionalità e la disponibilità cellulare.

Una fonte di cellule molto attraente è quella delle cellule staminali adulte, quali le cellule progenitrici e le cellule staminali provenienti dal midollo osseo [10].

Queste sono cellule progenitrici che, sotto determinate condizioni, possono differenziarsi nei tipi di cellule che originano dallo stesso tessuto embrionale; ad esempio, hanno attratto l'attenzione dell'ingegneria dei tessuti per la loro capacità di trasformarsi in cellule caratteristiche di vari tessuti inclusi ossa, cartilagine, nervi, pelle, vasi sanguigni, ecc.

Il midollo osseo è un ricco deposito di cellule di una varietà di tipi, e negli studi riportati ad oggi, almeno in molti casi, la popolazione di cellule raccolta e poi utilizzata era poco caratterizzata. Inoltre, c'è la possibilità che in un futuro si possa essere capaci di reclutare cellule derivanti dal midollo osseo ad un impianto in vivo non cellularizzato, così creando un sostituto cellulare vivente.

In fine c'è l'enorme potenziale delle cellule staminali embrionali umane. Questa è un'area molto eccitante in cui progressi sono regolarmente riportati. In ogni caso c'è ancora tanto che noi non sappiamo. E ce ne si accorge ogni qual volta si viene a conoscenza dell'esistenza di segnali che guidano il differenziamento di un cellula staminale o progenitrice in uno specifico tipo di cellula differenziata, con un fenotipo molto specifico. Una volta che si è compreso la biologia di base e ci si muove dietro essa nell'andare verso una produzione su più larga scala, ci sono problemi sia con il concetto di prodotto autologo che allogenico. Per un impianto autologo, un protocollo che consistentemente e sufficientemente recluta solo le cellule

appropriate diventa necessario. Per un impianto allogenico, l'aumento progressivo e l'espansione cellulare mantenendo l' appropriato fenotipo è critico [10].

Una delle strategie usate nell'Ingegneria dei Tessuti è l'iniezione di una sospensione cellulare al tessuto danneggiato per mantenere e recuperare le funzioni native del tessuto stesso. L' iniezione di cellule del midollo osseo, ad esempio, in alcuni casi in cui è stata applicata ha fatto riscontrare buoni risultati clinici. In molti casi, però, le cellule iniettate non riescono ad essere trattenute intorno al tessuto che si vuole riparare causando difficoltà nel controllare la misura, la forma e la localizzazione delle cellule iniettate [6].

Per superare questi problemi, è stato introdotto l'utilizzo di scaffold polimerici biodegradabili che hanno la funzione di assistere la proliferazione e la differenziazione cellulare, e di guidare il processo di sviluppo del tessuto: una funzione simile a quella della naturale matrice extracellulare (ECM).

Molti tipi cellulari hanno bisogno di un ambiente 3D per formare strutture tissutali 3D *in vitro* fisiologicamente rilevanti. Coltivare le cellule in 3D piuttosto che in 2D fornisce un'ulteriore dimensione per gli inputs meccanici esterni e per l'adesione cellulare. Ad un livello strutturale di base i tessuti comprendono una popolazione di cellule che interagiscono l'una con l'altra e con la ECM. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro [11].

Innesti 3D di tessuti ingegnerizzati ottenuti dalla semina di cellule in scaffold sono stati applicati all'epidermide, all'osso, alla cartilagine, ai vasi sanguigni, e alle valvole cardiache. Numerose tipologie di materiali sono stati utilizzate sia materiali biologici che materiali sintetici; gel di collagene e gel di fibrina sono stati ad esempio utilizzate per creare innesti dell'epitelio per la rigenerazione dell'epidermide, dell'epitelio della mucosa orale, e dell'epitelio della cornea. Mentre ha luogo la degradazione del polimero le cellule proliferano e migrano per sostituire il polimero dello scaffold [6].

In alcuni casi l'ingegneria dei tessuti può essere vista come un problema di rimodellamento e lo stato della matrice detterà questo rimodellamento. Le proprietà della matrice quali la composizione, l'architettura e la biocompatibilità , controllano il rimodellamento, influenzando sia il tessuto e le cellule del donatore che quelli del ricevente. I progressi fatti nel campo dei biomateriali hanno reso possibile la progettazione di scaffold molto sofisticati alcuni funzionalizzati con fattori di crescita [12], o specifiche sequenze peptidiche [13], e altri progettati per supportare sistemi multicellulari [14], ciò ha permesso di avere maggiori possibilità di influenzare il microambiente cellulare e così il tipo e il tempo di rimodellamento.

Molta attenzione della ricerca è stata focalizzata sulla matrice e i relativi problemi di crescita di tessuto e di integrazione del sostituto nel tessuto circostante. A causa delle implicazioni a lungo termine dell' impianto, molti ricercatori sottolineano il bisogno di passare dagli scaffold sintetici a scaffold più biologici. Alternativamente se c'è l'esigenza di usare scaffold sintetici essi dovrebbero avere una durata breve ma sufficiente perché le cellule riescano a sintetizzare la loro matrice naturale[10]. Gli scaffold utilizzati oggi nelle applicazioni dell'ingegneria dei tessuti non hanno un ruolo passivo ma sono progettati per comunicare attivamente con le cellule che li circondano. Invece di aggiungere i fattori di crescita al mezzo di coltura l'obiettivo di questa nuova tipologia di scaffold è di rilasciare essi stessi fattori multipli in maniera controllata sia dal punto di vista spaziale che temporale, creando dei segnali a cascata che ottimizzino i risultati del tessuto [15]. Gli scaffold devono stimolare l'adesione cellulare, la migrazione, la proliferazione e la sintesi di nuova matrice extracellulare [16].

Molti progressi sono comunque ancora necessari per creare delle strutture di supporto che presentino dei gradienti. Nuovi strumenti che vengono utilizzati comprendono polimeri complessi come hydrogel contenenti fattori di segnale, biopolimeri ibridi, copolimeri a blocchi, proteine geneticamente ingegnerizzate per incorporare domini che promuovono l'adesione cellulare, e considerazioni strutturali e meccaniche sulla progettazione. In generale gli scaffold monolitici sono stati sostituiti da forme che mimino al meglio le complesse strutture biologiche. Particolare enfasi è posta sull'interfaccia dei tessuti e sui gradienti intra-tessutali [17].

Una volta che si è selezionato lo scaffold e le cellule da utilizzare, il problema è qual è il miglior ambiente che promuove la crescita e/o il condizionamento del tessuto da ingegnerizzare.

I bioreattori possono provvedere sia ai segnali chimici che meccanici che permettono di ottimizzare lo sviluppo di un sostituto tissutale. Riconoscendo che il tessuto può essere rimodellato in vitro usando un bioreattore, bisogna anche tener conto che una volta impiantato un rimodellamento addizionale avverrà in vivo. Così, l'obiettivo potrebbe essere quello di non generare un impianto in vitro che mima il tessuto finale, ma uno che incontra i criteri necessari ad ottenere impianti che abbiano successo nel lungo periodo. Sfortunatamente in molti casi dell'ingegneria dei tessuti questi criteri non sono noti. Prendendo come esempio la cartilagine ingegnerizzata, un equivalente di tessuto in cui le proprietà meccaniche sono tutte importanti, la domanda che ci si pone è se la cartilagine prodotta in un bioreattore debba essere matura al punto in cui le sue proprietà meccaniche sono virtualmente

identiche a quelle della cartilagine adulta nativa. Alternativamente se l'integrazione con l'ospite e il rimodellamento in vivo sono più importanti, allora al momento dell'impianto in vivo la cartilagine ingegnerizzata dovrebbe avere caratteristiche simili a quella della cartilagine giovane che si sta sviluppando. E' chiaro quindi che c'è una questione aperta su quando nel processo di crescita il tessuto ingegnerizzato dovrebbe essere trasferito dal bioreattore *in vitro* al bioreattore *in vivo* (il corpo umano) [10].

1.1.2 Il ruolo del Bioreattore

Così come molti progressi sono stati fatti nella progettazione degli scaffold altrettanti progressi sono stati fatti in quella dei bioreattori soprattutto per creare dei dispositivi capaci di superare le limitazioni al trasporto di nutrienti ed ossigeno che ostacolano l'ottenimento di tessuti ingegnerizzati in vitro compatti e di spessore tale da permetterne l'applicazione clinica [16]. Come riportato da Martin et al. [18] in una review, i bioreattori possono essere definiti come "dispositivi nei quali i processi biologici e/o biochimici hanno luogo sotto condizioni ambientali ed operative attentamente e strettamente controllate (pH, temperatura, pressione, apporto di nutrienti, e rimozione dei prodotti di scarto)".

I tessuti dei mammiferi sono tra i più difficili tessuti da crescere *in vitro* in un bioreattore a causa del loro importante bisogno di nutrienti, la loro sensibilità ai prodotti di scarto nitrogenati e la loro alta fragilità agli sforzi di taglio [19].

La coltura in vitro di costrutti 3D in un bioreattore che supporta l'efficiente nutrimento delle cellule , possibilmente combinato con l'applicazione di stimoli meccanici per dirigere l'attività cellulare le loro funzioni e il loro differenziamento è uno step importante verso l'ottenimento di innesti funzionali. Inoltre il bioreattore fornisce condizioni di coltura ben determinate utili per studi sistematici e controllati del differenziamento cellulare e dello sviluppo del tessuto in risposta a stimoli meccanici e biochimici [20].

I bioreattori non vengono comunque utilizzati esclusivamente nella fase di maturazione del tessuto ma anche nella semina delle cellule negli scaffold 3D, per superare i limiti della semina statica che non permette una distribuzione omogenea ed uniforme lungo tutto lo spessore dello scaffold.

1.1.2.1 Semina cellulare in scaffold 3D

Le semina di uno scaffold che consiste nella disseminazione delle cellule isolate nello scaffold, è il primo step per una coltura 3D e può giocare un ruolo cruciale nella formazione del neotessuto che avverrà successivamente. La semina di cellule ad elevata densità in uno scaffold è stata associata con un' incrementata formazione di tessuto in costrutti 3D, sono state ottenute ad esempio più alte velocità di produzione di matrice cartilaginea, incrementi della mineralizzazione dell'osso, e anche un miglioramento delle strutture di tessuto miocardico [19].

In questo modo gli innesti autologhi ingegnerizzati per le applicazioni cliniche usando alte densità cellulari richiedono che le cellule siano seminate con la più elevata efficienza possibile.

Inoltre, l'iniziale distribuzione delle cellule nello scaffold dopo la semina è stata collegata alla distribuzione del tessuto che successivamente si formerà nel costrutto ingegnerizzato, suggerendo quindi che una semina cellulare uniforme potrebbe stabilire la base per un uniforme generazione del tessuto.

Anche per uno scaffold di dimensioni piccole (ad es. 5mm di diametro e 2mm di spessore), può essere una sfida significativa distribuire un'alta densità di cellule efficientemente ed uniformemente attraverso l'intero volume dello scaffold.

Malgrado la semina cellulare statica di uno scaffold sia di gran lunga il metodo di semina più comunemente utilizzato, vari studi hanno riportato che questo comporta una bassa efficienza di semina, ed una non uniforme distribuzione delle cellule nello scaffold, [20,21,22] dovuta in parte, alla natura manuale e dipendente dall'operatore del processo di semina statica.

Efficienze e uniformità di semina significativamente più elevate si ottenevano quando ad esempio scaffold di acido poliglicolico erano seminati in bioreattori stirred flask [23].

Il miscelamento della sospensione cellulare diluita intorno allo scaffold sospeso dal tappo della flask, consente il trasporto delle cellule nello scaffold per convezione.(fig. 2a).

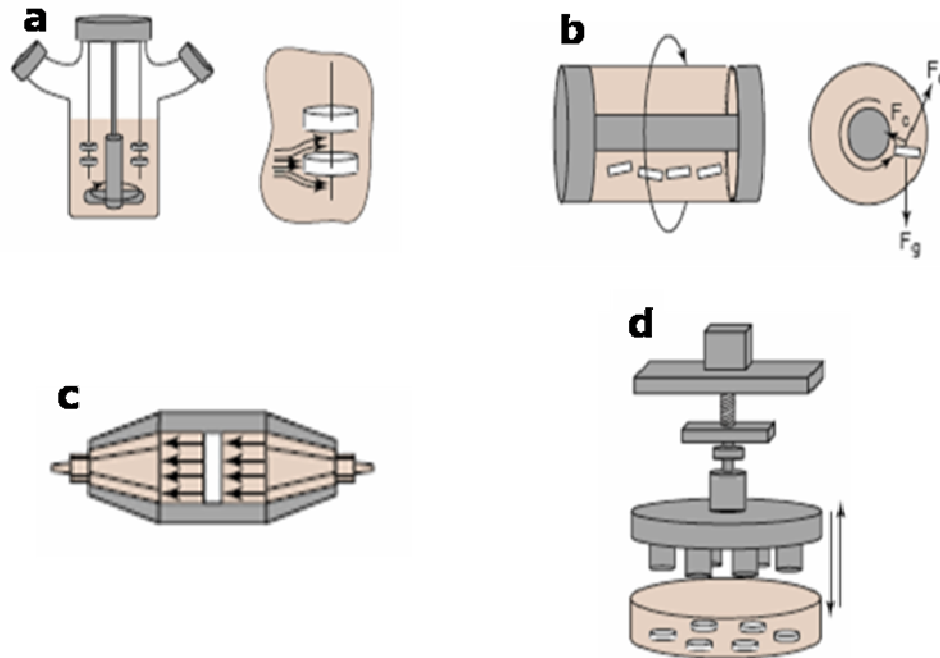


Figura 2: Alcuni bioreattori utilizzati per applicazioni nell'Ingegneria dei Tessuti: **a)** Bioreattore Spinner Flask è utilizzato sia per la semina di scaffold 3D sia per la successiva coltura; **b)** Rotating wall vessel fornisce un ambiente di coltura dinamico ai costrutti con bassi sforzi di taglio ed elevate velocità di trasferimento di massa; **c)** Bioreattore a perfusione diretta nel quale il mezzo fluisce direttamente attraverso i pori dello scaffold, può essere usato per la semina e/o la coltura di costrutti 3D; **d)** Bioreattori che applicano forze meccaniche controllate, quali compressioni dinamiche, a costrutti ingegnerizzati possono essere usati come sistemi modello dello sviluppo di tessuti sotto condizioni di carico fisiologico e per generare innesti tissutali funzionali.

In ogni caso anche la semina in stirred flask può causare una bassa efficienza di semina [24] ed una non uniforme distribuzione delle cellule [25] con un'alta densità di cellule che rimangono sulla superficie dello scaffold, tali problemi sono forse dovuti alla inefficiente convezione delle cellule nella regione interna dello scaffold [26].

Sfruttando il principio del trasporto convettivo per la semina di uno scaffold, con la tecnica di semina a filtrazione multi step il flusso di una sospensione cellulare è spinto direttamente attraverso i pori di uno scaffold 3D, producendo scaffold più uniformemente seminati comparati con la semina statica [27].

Quando la perfusione diretta è incorporata in un bioreattore automatizzato per la semina di uno scaffold 3D, efficienze di semina più elevate e una più uniforme distribuzione delle cellule erano ottenute comparato con quanto ottenuto sia con la semina statica che con la semina in stirred flask [28].

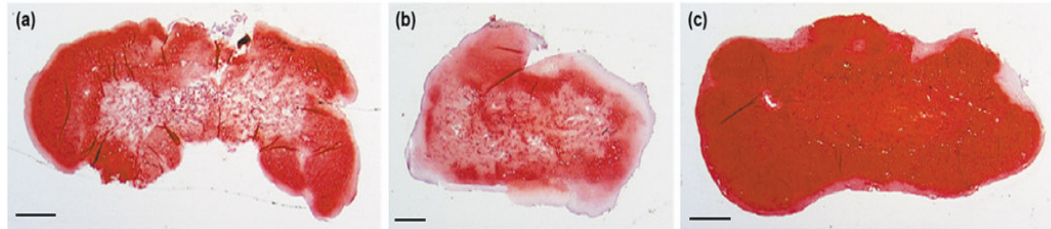
Una varietà di scaffold possono essere efficacemente e riproducibilmente seminati in un processo controllato ed automatizzato usando questo concetto diretto ed bioreattore semplicemente progettato.

Inoltre, la semina per perfusione può essere facilmente integrata in un sistema di bioreattore a perfusione capace di svolgere sia la semina dello scaffold che la successiva coltura del costruito [18]. Questi bioreattori per la semina e la coltura sono stati progettati per gli innesti vascolari [29], e sono stati recentemente usati anche nell'ingegnerizzazione della cartilagine [30] e del tessuto cardiaco [31] e nel mantenimento delle funzioni epatiche in scaffold 3D [32]. Questi sistemi non solo ottimizzano i processi dell'ingegneria ma anche riducono i rischi alla sicurezza associati con il trattamento manuale e il trasferimento dei costrutti tra diversi bioreattori.

1.1.2.2 Miglioramento del trasporto di massa

E' da tempo risaputo che l'apporto di ossigeno e nutrimenti solubili diventa criticamente limitante per le colture *in vitro* di tessuti 3D [18]. In *vivo*, le cellule beneficiano dalla prossimità dei capillari del sangue per la propria richiesta di trasferimento di massa; in molti tessuti, le cellule non distano più di 100 μ m da questi capillari. Inoltre il piccolo diametro dei capillari (tra 6 e 8 μ m) assicura un tempo di residenza lungo abbastanza nel tessuto da permettere la diffusione radiale della specie chimica [19].

La conseguenza delle limitazioni del trasporto *in vitro* era già nota da studi che mostravano che sferoidi cellulari più grandi di 1mm in diametro generalmente contenevano un centro necrotico ed ipotossico circondato da un bordo di cellule vitali [18]. Osservazioni simili erano riportate per differenti tipi cellulari coltivati su scaffold 3D sotto condizioni statiche. Per esempio, la deposizione di glicosamminoglicani (GAG) da parte di condrociti coltivati in scaffold di acido poliglicolico risultava ridotta nella parte centrale del costruito (a circa 400 μ m di distanza dalla superficie più esterna) [33] (Fig. 3a) , e la deposizione di matrice mineralizzata da osteoblasti stromali coltivati in schiume di acido polilattico poly(DL-lattico-glycolic acid) raggiungeva un massimo di profondità di penetrazione di 240 μ m dalla superficie superiore [34].



TRENDS in Biotechnology

Figura 3 Sezioni trasversali colorate con Safranin-O di tessuto cartilagineo dopo 6 settimane di coltura sotto differenti condizioni idrodinamiche (i GAG sono colorati di rosso). **a)** costrutti coltivati in condizioni statiche presentano una quantità di GAG trascurabile; **b)** Costrutti coltivati in spinner flask presentano una colorazione più intensa per i GAG nella regione centrale ma sono incapsulati da tessuti fibrosi alla periferia; **c)** costrutti coltivati in RWV si colorano intensivamente ed omogeneamente per la presenza di GAG attraverso la sezione trasversale.

Dal momento che i costrutti ingegnerizzati dovrebbero misurare almeno qualche mm per essere utilizzati effettivamente come innesti per la sostituzione di un tessuto, le limitazioni del trasferimento di massa rappresentano una delle sfide più importanti a cui indirizzare la ricerca.

Le limitazioni del trasferimento di massa dall'esterno possono essere ridotte coltivando i costrutti in uno stirred flask, (fig 2a) che induce il miscelamento di ossigeno e nutrienti attraverso il mezzo e riduce la concentrazione dello strato limite alla superficie del costrutto. E' stato osservato che la coltura di condrociti bovini su maglie di acido poliglicolico non-woven nello stirred flask induceva un incremento sia nella sintesi dei GAG che nella frazione di GAG accumulati nella regione centrale del costrutto [35].

Anche se, la media netta della frazione di GAG accumulata attraverso il costrutto risultava ridotta [33] e una capsula fibrosa spessa 400 μ m era formata alla superficie del costrutto [35] (fig 3b). Questo problema era probabilmente causato da vortici turbolenti generati nel bioreattore stirred flask, che aumentava la velocità di gag rilasciati nel mezzo di coltura ed erano associati con il dedifferenziamento dei condrociti.

Comunque, un flusso laminare generato da un ambiente a flusso rotante è un modo alternativo efficiente per ridurre le limitazioni della diffusione dei nutrienti e dei prodotti di scarto mantenendo allo stesso tempo bassi livelli di shear. L'efficacia del bioreattore rotating wall vessel (RWV) (fig.2b) per la generazioni di tessuti equivalenti è stata dimostrata usando come linea cellulare i condrociti; dopo poche settimane di coltivazione i costrutti cartilaginei avevano proprietà biomeccaniche e biochimiche superiori a quelle di colture statiche o in stirred flask e pertanto più vicine a quelle della cartilagine naturale [36] (Fig.3c).

Sulla base di questi studi il bioreattore RWV supportando l'ingegnerizzazione in vitro di tessuti ed organi può essere utilizzato come sistema modello in vitro per studiare lo sviluppo di un tessuto. In particolare colture cellulari 3D in tale bioreattore erano utilizzate per controllare e identificare vari fattori biochimici che influiscono sulla funzione delle cellule, la crescita del tessuto e la capacità d'integrazione, o anche per studiare l'instabilità del fenotipo, la resistenza alle radiazioni, e la risposta delle cellule cancerogene ai farmaci [18].

Un'altra tipologia di bioreattore che migliora il trasferimento di massa all'interno di scaffold tridimensionali è il bioreattore a flusso perfusivo. Questo bioreattore usa una pompa per perfondere il mezzo continuamente attraverso il network di pori interconnessi dello scaffold seminato. Il percorso del fluido deve essere confinato in maniera tale che il flusso attraversi lo scaffold piuttosto che passare per i suoi bordi [37] (fig. 2c, fig. 4).

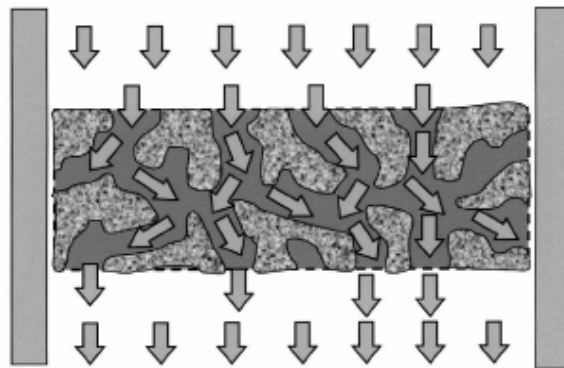


Figura 4: Coltura con flusso a perfusione. Nelle colture con flusso perfusione, il mezzo di coltura è forzato attraverso il network di pori interni dello scaffold. Questo può mitigare le limitazioni della diffusione all'interno di scaffold 3D e aumentare il rilascio di nutrienti e la rimozione dei prodotti di scarto dalla coltura cellulare.

Il flusso del mezzo attraverso le porosità dello scaffold giova al differenziamento cellulare aumentando il trasporto dei nutrienti all'interno dello scaffold e fornendo stimoli meccanici sotto forma di sforzi di tagli esercitati dal fluido [37].

I bioreattori a perfusione diretta hanno mostrato:

(i) aumentare la crescita, il differenziamento e la deposizione di matrice mineralizzata di cellule dell'osso [38];

- (ii) l'espressione dei marker cardiaci specifici dei cardiomiociti e la vitalità cellulare all'interno di costrutti 3D[39;40; 2] (fig 5);
- (iii) la sintesi e l'accumulo di GAG da parte dei condrociti [18, 41] (fig 6);
- (iv) la proliferazione di cheratinociti orali umani [42] (fig 7);
- (v) la velocità di sintesi di albumina da parte degli epatociti [32],

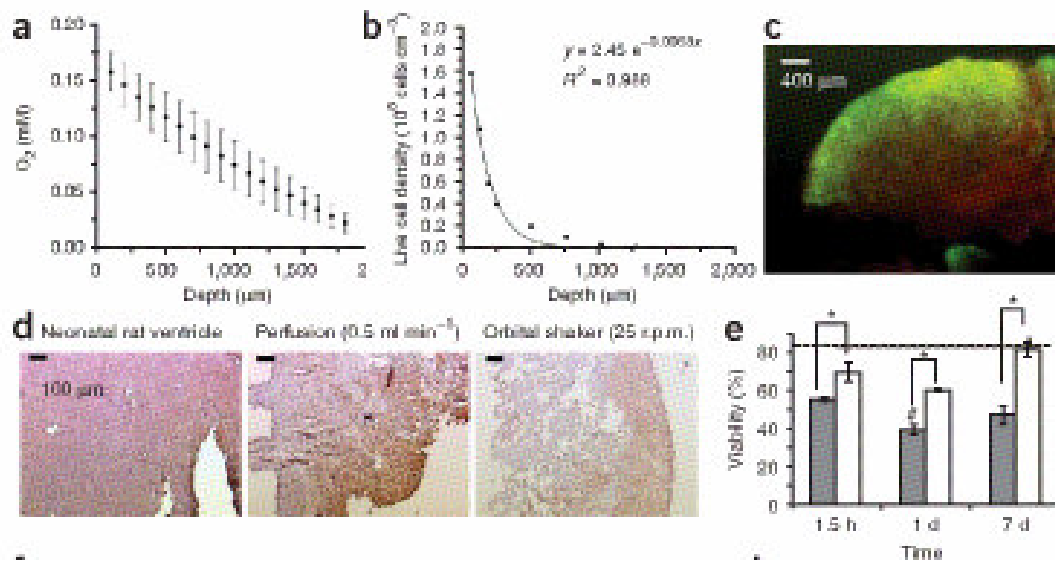


Figura 5: Coltura di costrutti di tessuto cardiaco. In (a-c) coltura statica in (d-e) coltura dinamica. I cardiomiociti di ratto neonatale erano seminati su scaffold costituiti da spugne di collagene. a) dovuto all'alta domanda metabolica per l'ossigeno e alla diffusione come principale strumento per il trasferimento di massa all'interno dello scaffold la concentrazione di ossigeno disciolto decresceva linearmente all'interno dello scaffold. b) la densità cellulare quando misurata dalle sezioni trasversali istologiche, esibiva un decadimento esponenziale nell'interno dello scaffold; c) colorazione per vitalità cellulare mostra che la maggior parte delle cellule nell'interno dello scaffold sono morte (colorate in rosso); d) la colorazione per la troponina cardiaca I dei cardiomiociti coltivati negli scaffold di collagene in perfusione mostra una densità cellulare levata ed uniforme attraverso tutto lo scaffold; e) la vitalità delle cellule coltivate in perfusione (barra bianca) era significativamente più elevata di quella coltivata sotto condizioni statiche (barra grigia) ad ogni tempo di coltura testato.

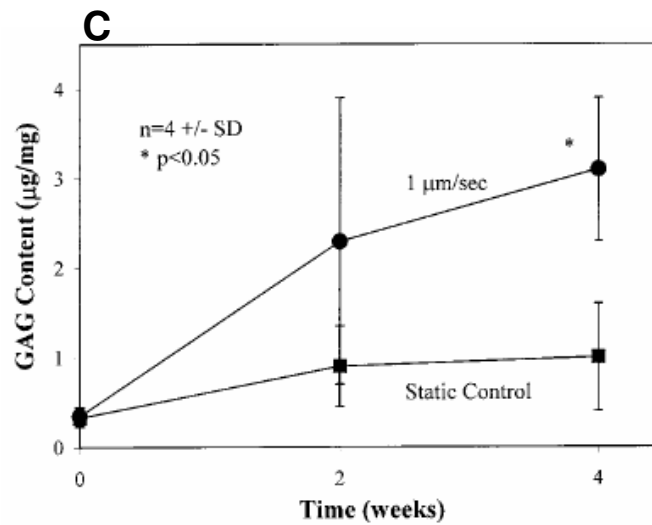
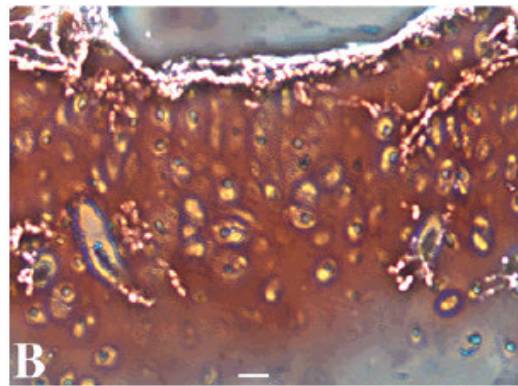
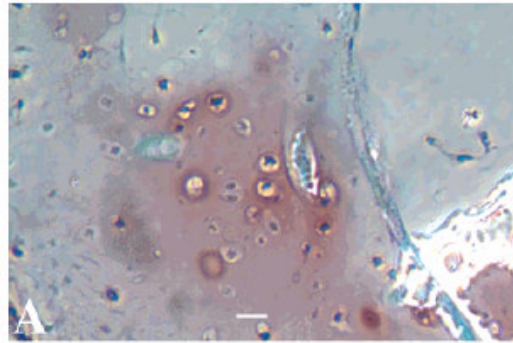


Figura 6: Condrociti coltivati in scaffold di PLLA/PGA A) campioni statici a 2 settimane di coltura colorati con safranin O/ fast green rivelavano una leggera colorazione e nessuna orientazione delle cellule barra=10µm; B) campioni coltivati nel bioreattore per 2 settimane colorati con Safranin-O e fast green si osserva un'intensa colorazione così come l'allineamento delle cellule nella direzione del flusso barra=10µm; C) analisi degli S-GAG fino a 4 settimane mostrano una quantità di SGAG prodotta del costrutto coltivato nel bioreattore 184% maggiore del costrutto coltivato in condizioni statiche.

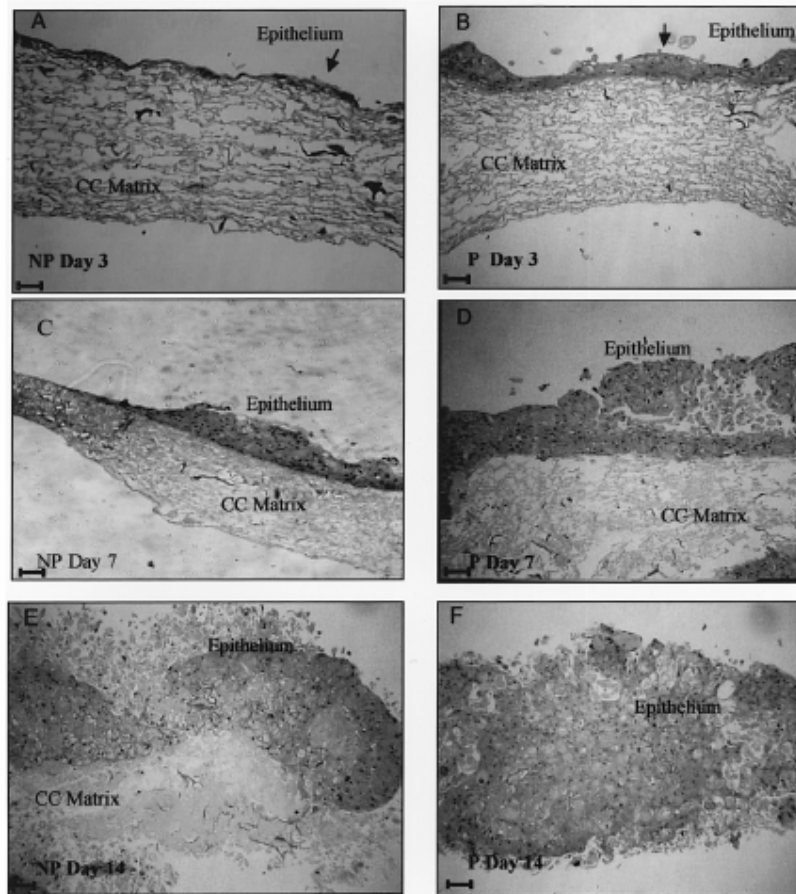


Figura 7: Fotomicrografie di fettine di spugne di collagene seminate con cheratinociti orali umani colorate con ematossilina/eosina mostrano che la perfusione stimola la proliferazione dei cheratinociti rispetto alla coltura statica. In perfusione, inoltre, la degradazione del materiale dello scaffold appare più veloce forse dovuta alla più veloce sintesi di neo tessuto.

A) al giorno 3, i costrutti coltivati in maniera statica presentano un sottilissimo strato di mucosa, (B) mentre quelli coltivati in perfusione mostrano un epitelio più spesso formato da 4 strati di cellule. (C) al giorno 7 i costrutti coltivati in condizioni statiche mostrano un epitelio di circa 5 strati cellulari, (D) mentre i costrutti coltivati in perfusione mostrano un epitelio più spesso formato da circa 9 strati cellulari e la matrice di collagene appare meno definita. (E) al giorno 14 i costrutti coltivati in maniera statica presentano un epitelio costituito da 13 strati cellulari, (F) mentre i costrutti coltivati in perfusione mostrano un agglomerato di cellule epiteliali più spesso con 20 strati cellulari e una completa assenza della matrice di collagene.

Pertanto la perfusione diretta può essere usata come utile strumento per migliorare la sopravvivenza, la crescita e le funzioni cellulari. Comunque gli effetti della perfusione diretta possono essere altamente dipendenti dalla velocità del flusso del

mezzo e dallo stadio di maturazione del costrutto come dimostrato per colture 3D di condrociti [43].

E' stato riscontrato, ad esempio, che la perfusione a definite velocità di flusso, non sempre risultava essere vantaggiosa per la condrogenesi dei condrociti della cartilagine articolare in costrutti 3D di spugne di collagene [44].

La perfusione del mezzo ad una portata di 0.33 ml/min risultava inibire la condrogenesi, nei costrutti 3D mostrando una minore deposizione di S-GAG nel costrutto mantenuto in perfusione rispetto a quello coltivato in maniera statica (Fig. 8).

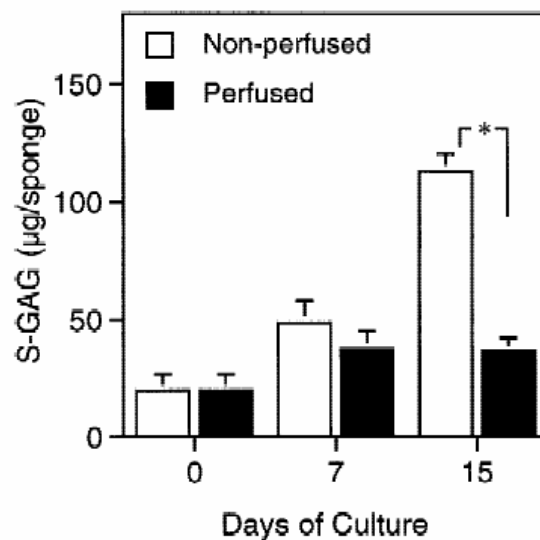


Figura 8: influenza della perfusione sul contenuto di S GAG accumulati da condrociti coltivati in spugne di collagene per 7 e 15 giorni.

La tipologia di materiale utilizzata per lo scaffold, il tipo di tessuto che si vuole ingegnerizzare e le condizioni di flusso influenzano notevolmente l'ottenimento di un tessuto ingegnerizzato *in vitro* in un bioreattore a perfusione.

Le condizioni di flusso ottimali per un bioreattore a perfusione per l'ingegnerizzazione di un tessuto 3D devono essere indirizzate ad un attento bilancio tra il trasferimento di massa dei nutrienti e i prodotti di scarto a e dalla cellula, devono tener conto della ritenzione dei componenti della matrice extra cellulare che si vanno via via sintetizzando nel costrutto, e degli stress di shear indotti dal flusso all'interno dei pori dello scaffold [18].

Le condizioni di flusso ottimali di un bioreattore non dovrebbero essere determinate attraverso un approccio "trial and error" ma piuttosto la scelta dovrebbe essere

supportata da metodi di simulazione. I pacchetti software CFD (fluido dinamico computazionale) sono stati notevolmente sviluppati negli ultimi anni e rappresentano un potente strumento per calcolare i campi di flusso, gli sforzi di taglio e il trasporto di massa in e intorno un costruito 3D. Un modello di fluido dinamica computazionale di perfusione diretta attraverso una maglia 3D dimostrava che l'architettura casuale delle fibre dello scaffold comporterebbero degli sforzi di taglio altamente variabili; uno scaffold con una distribuzione omogenea dei pori, perciò, comporterebbe un controllo più preciso più preciso sugli sforzi di taglio [18]. A tale proposito sta diventando sempre più chiaro che le considerazioni da fare nella progettazione di uno scaffold non dovrebbero essere limitate alla biocompatibilità e alle proprietà meccaniche, ma dovrebbero anche includere una valutazione critica della struttura dei pori e dell'interconnettività [45, 45] che deve essere regolata alle specifiche condizioni di flusso usate [47].

1.1.2.3 Il Condizionamento Meccanico

L'evidenza sperimentale suggerisce che le forze meccaniche, che sono note essere importanti modulatori della fisiologia cellulare, potrebbero favorire l'attività biosintetica delle cellule in matrici bioartificiali e così possibilmente migliorare o accelerare la rigenerazione in vitro [48].

Vari studi hanno dimostrato la validità di questo principio, particolarmente nel contesto di tessuti muscoscheletrici ingegnerizzati. Ad esempio, è stato dimostrato che sforzi meccanici ciclici :

(i) aumentano la proliferazione e l'organizzazione della matrice di cellule cardiache umane seminate su scaffold di gelatina [49],

(ii) migliorano le proprietà meccaniche del tessuto generato dalle cellule del muscolo scheletrico sospese in collagene o Matrigel [50] e incrementa l'organizzazione del tessuto e l'espressione dell'elastina da parte delle cellule del muscolo liscio seminate in scaffold polimerici [51].

Inoltre carichi deformazionali dinamici o di taglio di condrociti immersi in un ambiente 3D stimolava la sintesi di GAG [52, 53] e incrementava le proprietà meccaniche del tessuto risultante [53, 54].

Deformazioni rotazionali e traslazionali di cellule mesenchimali progenitrici seminate in gel di collagene inducevano l'allineamento cellulare, la formazione di fibre di fibre di collagene orientate e il sovracontrollo di geni specifici dei legamenti [55].

Appare evidente, quindi, che forze meccaniche specifiche applicate a costrutti cellulari 3D potrebbe non solo aumentare lo sviluppo di un tessuto ingegnerizzato ma anche dirigere il differenziamento di cellule multipotenti in linee cellulari specifiche

A dispetto dei numerosi studi a dimostrazione del principio mostranti che il condizionamento meccanico può migliorare le proprietà strutturali e funzionali di un tessuto ingegnerizzati, poco si sa sulle forze meccaniche specifiche o i regimi di applicazione (ampiezza, frequenza, continue o intermittenti, cicli di funzionamento) che sono stimolatori per un particolare tessuto.

Inoltre, i tessuti ingegnerizzati a differenti stadi di sviluppo potrebbero richiedere differenti regimi di condizionamento meccanico dovuto alla crescente deposizione di matrice extracellulare e allo sviluppo della sua organizzazione strutturale.

In questo campo altamente complesso una comprensione chiara può solo essere ottenuta attraverso esperimenti guidati da ipotesi che mirino ad elucidare i meccanismi dei processi a valle delle risposte cellulari a specifici stimoli meccanici. In questo contesto, i bioreattori possono avere un importante ruolo, provvedendo ambienti controllati per applicazioni accurate e riproducibili di regimi specifici di forze meccaniche a costrutti 3D [56] (fig. 2d).

Questo deve essere accoppiato con analisi quantitative e modellazione computazionale delle forze fisiche esercitate dalle cellule nei tessuti ingegnerizzati, includendo flussi di fluidi indotti meccanicamente e cambiamenti nel trasporto di massa. Il ruolo dei bioreattori nell'applicare forze meccaniche a costrutti 3D potrebbe essere allargato al di là dell'approccio convenzionale di aumentare il differenziamento cellulare e/o la deposizione di matrice nei tessuti ingegnerizzati. Per esempio essi potrebbero anche servire come modelli *in vitro* per studiare gli effetti patofisiologici delle forze fisiche sullo sviluppo di un tessuto e predire le risposte di un tessuto ingegnerizzati alle forze fisiologiche sull'impianto chirurgico.

Insieme con la caratterizzazione biomeccanica, i bioreattori potrebbero così aiutare nel definire quando un tessuto ingegnerizzato ha una integrità meccanica sufficiente e una composizione biologica idonea ad essere impiantato. Inoltre le analisi quantitative e la modellazione computazionale degli sforzi e delle deformazioni esercitate sia dai tessuti normali in vivo per una varietà di attività che dai tessuti nei bioreattori, potrebbero portare ad un più preciso confronto del condizionamento meccanico in vivo e *in vitro*, ed aiutare a determinare i regimi potenziali di riabilitazione fisica che sono più appropriati per i pazienti che ricevono il tessuto [48].

1.2 Cell sheet engineering

Per andare incontro all'esigenza di idee nuove con le quali approcciare il problema dell'ingegnerizzazione di un tessuto, il gruppo di Okano dell'università di Tokio, ha sviluppato un approccio innovativo che si basa sulla "cell sheet engineering" [6,7,8] ovvero sulla possibilità di costruire costrutti 3D di tessuti funzionali attraverso la giustapposizione di foglietti cellulari bidimensionali (cell sheets) senza il bisogno di utilizzare uno scaffold biodegradabile.

La "cell sheet technology" permette di raccogliere monostrati cellulari vitali e intatti attraverso l'utilizzo di piastre per coltura cellulare termoresponsive, create dall'innesto covalente del polimero termoresponsivo poli(N-isopropilacrilamide) (PIPAAm) in alternativa alle tradizionali piastre di coltura per tessuti [57,58].

Sotto le normali condizioni di coltura a 37°C, la superficie della piastra è relativamente idrofobica e le cellule si attaccano, diffondono, e proliferano così come sulle tradizionali piastre di coltura, ma quando la temperatura scende al di sotto della temperatura critica del polimero (LCST) di 32°C, la superficie della piastra con l'innesto del PIPAAm diventa idrofilica e rigonfia, formando uno strato di idratazione tra la superficie della piastra e le cellule coltivate, ciò permette il loro spontaneo distacco senza la necessità di utilizzare trattamenti enzimatici come la tripsinizzazione (fig 9).

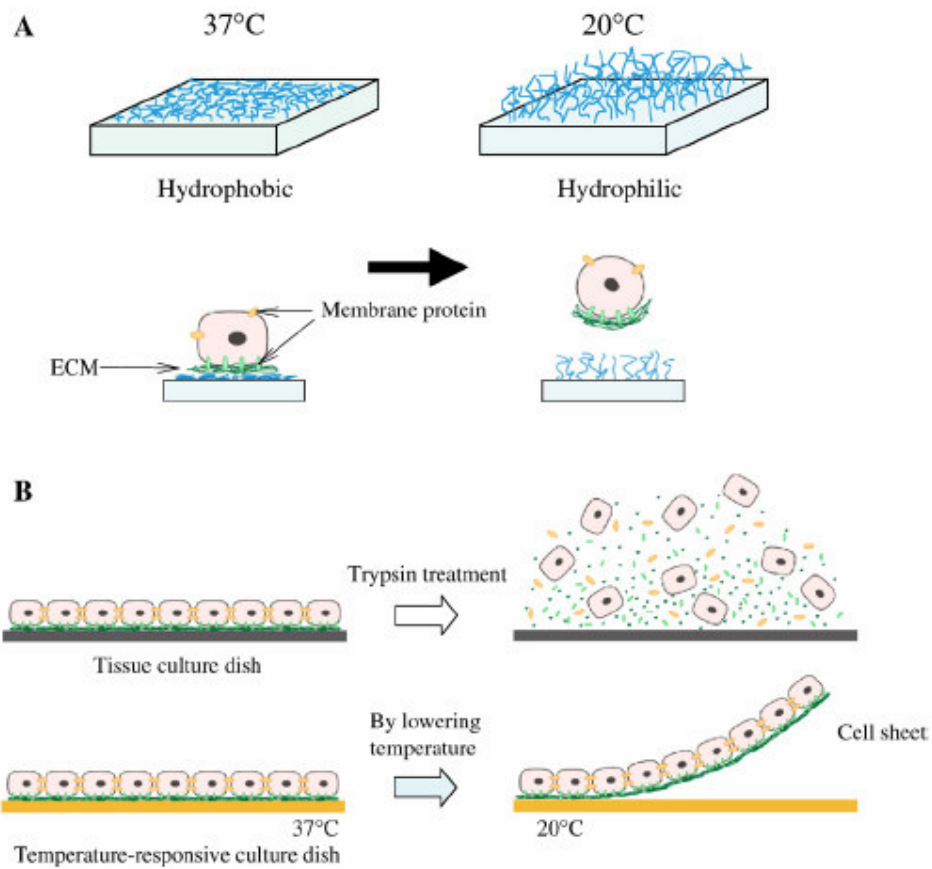


Figura 9: cellule raccolte dalla superficie delle piastre di coltura termoresponsive.

A) le cellule possono attaccare proliferare sulla superficie idrofobia delle piastre termoresponsive a 37°C. abbassando la temperatura sotto i 32°C, le superfici cambiano da idrofobiche a idrofilliche e diventano non adesive alle cellule dovuto alla rapida idratazione e rigonfiamento del PIPAAm. B) quando le cellule sono confluenti nella coltura, esse si connettono l'una all'altra attraverso le proteine di giunzione cellula -cellula e cellula-ECM. I tipici metodi di raccolta con enzimi proteolitici usando digestione enzimatica provocano la distruzione sia delle proteine adesive che dei ricettori di membrana. Utilizzando queste piastre termoresponsive invece le connessioni cellula-cellula e cellula-ECM sono preservate e le cellule possono essere raccolte come foglietti intatti insieme alla loro matrice extracellulare, la ECM che si mantiene sotto i foglietti cellulari funziona come un agente adesivo.

Evitando trattamenti proteolitici le proteine di superficie critiche delle cellule quali ad esempio i canali ionici, i recettori dei fattori di crescita e le proteine per le giunzioni cellula-cellula rimangono intatte, e le cellule possono essere raccolte in maniera non invasiva come foglietti intatti insieme alla loro matrice extracellulare (ECM) e utilizzati per applicazioni nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti [59] (fig 10).

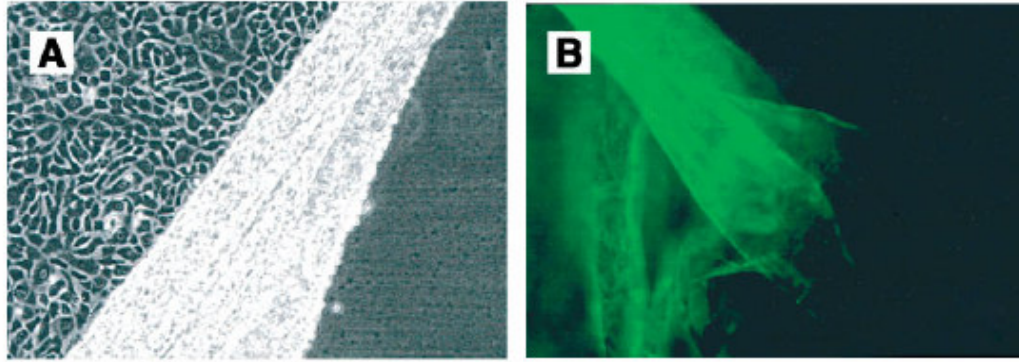


Figura 10: fogli di cellule endoteliali staccati da superfici di colture termoresponsive, abbassando la temperatura il monostrato di cellule può essere raccolto e osservato al microscopio a contrasto di fase. A) il foglietto di cellule è staccato come singolo foglio dalla periferia della piastra di coltura. B) la matrice di fibronectina è recuperata insieme al foglietto di cellule endoteliali e nessuna rimanenza era osservata sulla superficie dalla quale il foglietto era staccato.

Dal momento che la ECM rimane intatta sulla superficie dei fogli di cellule, essi possono essere direttamente trapiantati in un difetto del tessuto o anche giustapposti per creare strutture 3D equivalenti ad un tessuto le connessioni cellula-cellula saranno rapidamente ristabilite tra i foglietti giustapposti grazie alla presenza della ECM sulla superficie del foglietto [7] (fig.11).

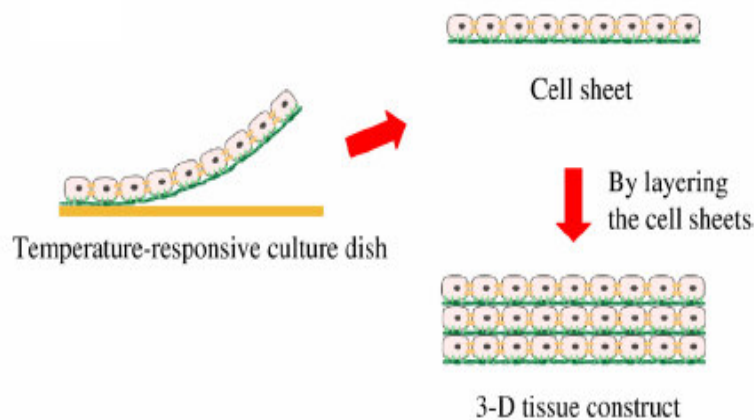


Figura 11: foglietti di cellule raccolte dalla superficie delle piastre di coltura termoresponsive possono essere giustapposte per creare tessuti 3D.

Con la *cell sheet engineering* si possono così ricostruire vari tessuti e organi usando essenzialmente 3 differenti metodi. Nei casi della pelle [60], dell'epitelio della cornea [61], dell'urotelio [62,63], e dei legamenti periodontali [64,65] singoli

foglietti di cellule possono essere trapiantati direttamente al tessuto ospite usando manipolazione bidimensionale (fig.12 a).

Con la giustapposizione di fogli di cellule omotipiche si possono ricreare strutture 3-D come il muscolo cardiaco [66,67] (fig. 12 b) e i muscoli lisci [7].

Inoltre usando la stratificazione di differenti fogli di cellule (stratificazione eterotipica), si possono ricreare strutture più complesse come i lobuli del fegato [68] e i glomeruli del rene (fig. 12 c). Infine un nuovo metodo recentemente sviluppato dà la possibilità di creare piastre con regioni termoresponsive duali che permettono di raccogliere cellule co-coltivate come fogli intatti [69]. Dal momento che le architetture dei tessuti spesso consistono di vari tipi cellulari questo metodo permette di ricreare tessuti con morfologie complesse (fig. 12 d).

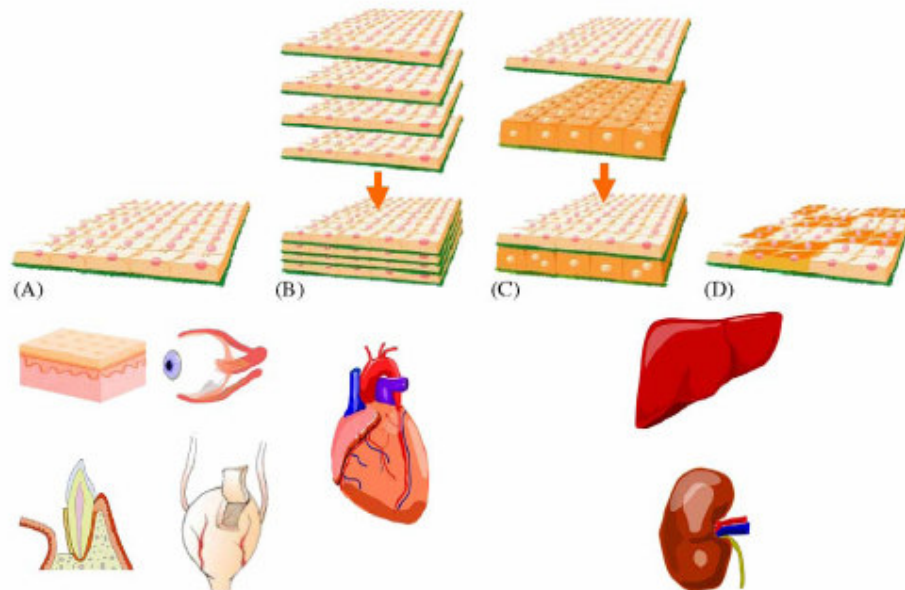


Figura 12. Terapie rigenerative basate sulle cellule usando fogli di cellule ingegnerizzati. A) attraverso il trapianto di singoli fogli di cellule possono essere ricreati l'epidermide della pelle, l'epitelio della cornea, la vescica dell'uroteliali i legamenti periodontali. B) attraverso la giustapposizione omotipica di fogli di cellule può essere ricreato il tessuto del miocardio. C) attraverso la stratificazione eterotipica di vari fogli di cellule possono essere ricreate strutture più complesse come i lobuli del fegato

Questo approccio, pertanto, fornisce vari vantaggi rispetto alle tradizionali terapie rigenerative di iniezione cellulare e ricostruzione di tessuti con scaffold biodegradabili.

Iniettando singole sospensioni cellulari si spera che le cellule iniettate possano integrarsi nel tessuto ospite danneggiato, favorendo il mantenimento e/o il recupero delle funzioni native. In molti casi che coinvolgono tessuti danneggiati, la

struttura locale non può adeguatamente supportare la semina di una sospensione cellulare, rendendo difficile controllare la misura la forma e la localizzazione delle cellule iniettate. Tutto questo comporta una significativa perdita di cellule, e solo una piccola percentuale di esse riescono a rimanere ancorate al sito di interesse.

Inoltre in casi di tessuti danneggiati le cellule iniettate sono spesso incapaci di attaccare ai siti in cui l'architettura ospite è distrutta. Al contrario i "foglietti" di cellule attraverso l'ECM che hanno depositato possono essere attaccati al tessuto ospite e ai siti danneggiati con la minima perdita di cellule e senza il bisogno di utilizzare mediatori come colle di fibrina o suture, dal momento che sono mantenute le connessioni cellula-cellula e cellula-ECM necessarie per ricreare un tessuto funzionale [7].

Un buon esempio di vantaggio della *cell sheet engineering* rispetto all'iniezione di singole cellule è nella ricostruzione del muscolo liscio (Fig. 13).

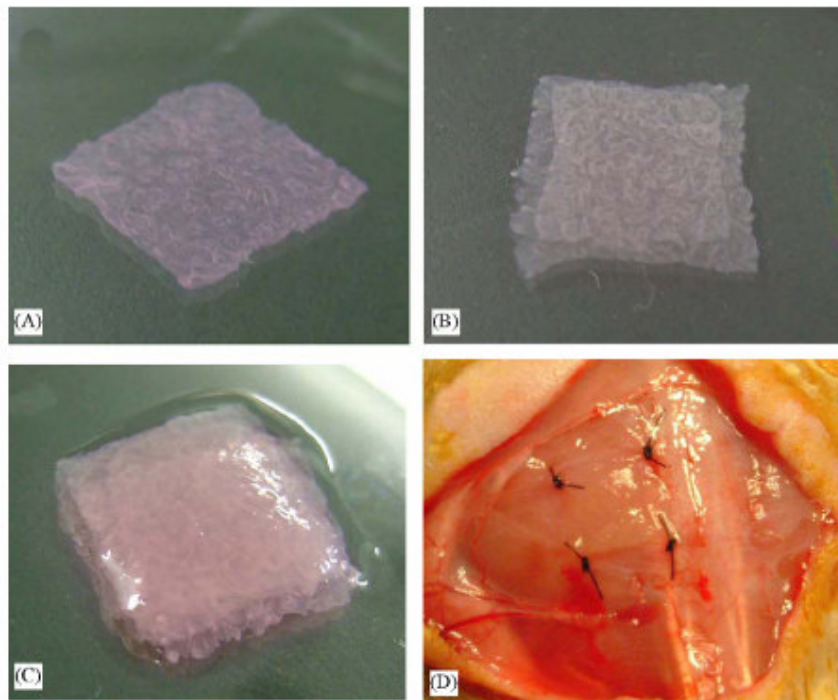


Figura 13: Foglietti di cellule del muscolo liscio. A) cellule del muscolo liscio coltivate sulle piastre termoresponsive possono essere raccolte come fogli intatti semplicemente riducendo la temperatura. B) 2 o C) 5 foglietti di cellule del muscolo liscio possono essere giustapposti in vitro. D) costruito formato da 5 strati di foglietti di cellule può essere trapiantato subcutaneamente e aderire dopo 5 min grazie alla presenza della ECM. Nel pannello D le suture sono usate solo per evidenziare la zona in cui è stato impiantato il costruito.

Dal momento che il muscolo liscio nativo ricopre gli organi cavi è molto importante che i costrutti ingegnerizzati siano formati da cellule che risultino intimamente connessi, formando un unico tessuto continuo. Usando le piastre termoresponsive per la coltura delle cellule del muscolo liscio esse possono essere raccolte come fogli intatti (fig. 13a) e giustapposte a formare costrutti costituiti d 2 (fig. 13b) o 5 strati (fig. 13c).

Successivamente all'impianto subcutaneo (fig. 13 d) questi costrutti formati da fogli di cellule si attaccavano stabilmente al sito di impianto in 5 minuti grazie alla presenza della ECM alla base del foglietto cellulare.

Una settimana dopo il trapianto il tessuto resecato mostra che i foglietti di cellule del muscolo liscio giustapposti sono presenti al sito di impianto formando un struttura densa di cellule vitali (fig. 14 A). Al contrario quando le cellule del muscolo liscio erano iniettate come una sospensione cellulare piccoli aggregati simili ad isole ed una significativa perdita di cellule era osservata (fig. 14 B).

Mentre il trapianto del foglietto di cellule rivelava un tessuto simile al tessuto del muscolo liscio con cellule interconnesse, l'iniezione della sospensione cellulare mostrava solo isole di cellule segregate come piccole masse con una visibile necrosi delle cellule iniettate.

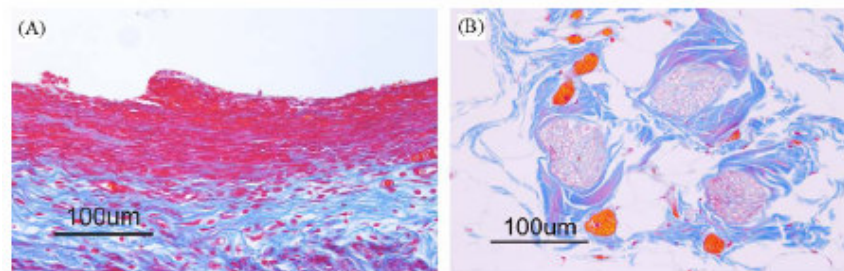


Figura 14. cellule del muscolo liscio trapiantate. A) una settimana dopo l'operazione la colorazione con l'azan rivela che il costrutto con i fogli di cellule giustapposti forma una struttura vitale densamente cellularizzata l sito d'impinto. B) al contrario l'iniezione di una sospensione di cellule risulta nella formazione di aggregati con visibile necrosi delle cellule iniettate.

Per quanto riguarda i vantaggi della cell sheet engineering rispetto all'utilizzo degli scaffold, esso concerne la possibilità di superare varie complicazioni, quali ad

esempio la reazione infiammatoria che avviene dopo l' impianto e la biodegradazione dello scaffold [21]. Infatti, la degradazione se da un lato corrisponde all'integrazione del costruito ingegnerizzato nel tessuto dall'altro canto può creare danni alle cellule in esso seminate.

Inoltre gli spazi precedentemente occupati dal polimero dello scaffold spesso diventano pieni di un elevato ammontare di ECM neo-depositata. Così nella ricreazione di strutture a cellule sparse come osso e cartilagine, le strutture fabbricate possono essere paragonate ai tessuti nativi con relativamente poche cellule e un significativo ammontare di ECM.

Per situazioni che richiedono strutture densamente cellularizzate come il cuore o il fegato, i costrutti ingegnerizzati con scaffold spesso non sono paragonabili ai tessuti nativi e potrebbero anche portare casi patologici di fibrosi.

Inoltre in casi che coinvolgono costrutti più grandi, le cellule alla periferia dello scaffold sono vitali e paragonabili a quelle dei tessuti nativi mentre quelle al centro del costruito sono necrotiche. Ciò è dovuto ai limiti della diffusione passiva già descritti nei paragrafi precedenti [7].

Nell'ambito dell'applicazioni oculari l'approccio di Okano et al. sembra essere ideale dal momento che evita l'utilizzo di scaffold, substrati e di punti di sutura che potrebbero danneggiare la vista [7].

Pertanto per la ricostruzione dell'epitelio della cornea, cellule staminali epiteliali limbal dopo essere state coltivate sulle piastre a superficie termoresponsiva a 37°C, sono state raccolte grazie alla riduzione della temperatura a 20°C per 20min, sottoforma di "fogli" di cellule insieme alla ECM da loro stesse depositata, ciò ne permette una facile manipolazione e adesione allo stroma della cornea senza il bisogno di sutura [61].

Le cellule sono così meno fragili rispetto a quanto avverrebbe raccogliendole con trattamenti enzimatici ed inoltre si mantengono le giunzioni cellula-cellula e le proteine della ECM che altrimenti verrebbero danneggiate.

In questo modo dopo 5 minuti dal trapianto i fogli di cellule si attaccano allo stroma della cornea senza il bisogno di punti di sutura.

In pazienti che hanno ricevuto tale tipo di trapianto nell'epitelio della cornea, la superficie della cornea rimane chiara con una significativamente aumentata attività visiva, più di un anno dopo l'operazione [70].

Mentre la rigenerazione della cornea dimostra i vantaggi della *cell sheet engineering* usando singoli foglietti di cellule, come già accennato strutture 3D possono essere create giustapponendo foglietti cellulari. Un esempio che chiaramente illustra i

benefici dell'utilizzo della *cell sheet engineering* è la giustapposizione di foglietti di cardiomiociti per la ricostruzione del tessuto miocardico 3D [66].

Nel muscolo cardiaco nativo le cellule sono considerabilmente dense con diffuse giunzioni gap che permettono la trasmissione elettrica responsabile della pulsione sincrona dell'intero muscolo cardiaco. Pertanto la creazione e il mantenimento di comunicazioni intercellulari attraverso le giunzioni di gap è estremamente importante, il che rende i cardiomiociti molto sensibili alla distruzione delle connessioni vitali cellule-cellula e cellula- ECM associati con i metodi di raccolta proteolitici.

Usando la *cell sheet engineering* il tessuto miocardico 3D può essere ricreato dalla stratificazione di fogli di cardiomiociti raccolti dalle piastre termo-responsive.

I fogli di cardiomiociti mostrano pulsazione spontanea in vitro e possono aderire l'uno all'altro grazie alla presenza della ECM. Dal momento che la raccolta proteolitica delle cellule è evitata, la vitalità delle proteine sulla superficie delle cellule, come le connessioni che sono necessarie per il battito sincrono osservato nei tessuti nativi, è mantenuta. Inoltre evitando l'uso degli scaffold i foglietti di cardiomiociti intatti possono essere giustapposti direttamente l'uno sull'altro, creando costrutti 3D con diffuse giunzioni gap presenti in tutto l'innesto.

Queste strutture densamente cellularizzate contengono meno ECM e assomigliano di più ai tessuti nativi comparati a costrutti creati usando scaffold biodegradabili.

La formazione delle giunzioni di gap sulla stratificazione dei foglietti cellulari inoltre permette la comunicazione elettrica, creando pulsazioni funzionali e sincrone di innesti 3D di tessuti miocardici che possono essere osservate macroscopicamente.

E' stato dimostrato che costrutti formati dalla giustapposizione di 4 strati cellulari trapiantati in tessuti subcutanei di ratti aderivano direttamente al tessuto ospite e dimostravano battito macroscopico in vivo. Innesti che erano resecati 4 settimane dopo l'impianto mostravano tessuti che assomigliavano al muscolo cardiaco nativo, così come la formazione di un network microvascolare attraverso il costrutto pulsatile, indicando che l'integrazione con l'animale ospite era avvenuta [66].

Inoltre il battito macroscopico del costrutto impiantato è stato osservato fino ad un anno dimostrandone l'efficacia anche nel lungo periodo.

Il trapianto di questi innesti creati dalla giustapposizione di foglietti cellulari ai cuori infartuati hanno anche mostrato comunicazione morfologica e funzionale attraverso collegamenti tra i cardiomiociti che migrano dall'innesto trapiantato al cuore [71]. Inoltre i fogli di cardiomiociti trapiantati miglioravano le funzioni del cuore danneggiate con significativo miglioramento nella frazione di rigetto dell'ospite [72].

E' stato anche osservato che monostrati di cellule staminali mesenchimali del tessuto adiposo potrebbero capovolgere il deterioramento del tessuto miocardico e migliorare la sopravvivenza nel modello animale dopo l'infarto miocardico [73].

L'uso di tali fogli permetteva di evitare l'assottigliamento della parete del muscolo cardiaco e migliorare la sopravvivenza dell'animale dopo il danno subito al miocardio [74].

Successivamente al trapianto si osservava una crescita cellulare nei fogli di cellule staminali mesenchimali trapiantati e differenziazione di alcune di esse in cardiomiociti maturi e vasi sanguigni.

Questi promettenti risultati mostravano che in addizione ai cardiomiociti, per i quali la fonte di cellule rimane un notevole problema, cellule staminali mesenchimali potrebbero essere una fonte di cellule alternativa per la fabbricazione di innesti per il riparo del miocardio.

Anche se con la *cell sheet engineering* è stato dimostrato possibile ricostruire il tessuto miocardico 3D attraverso la giustapposizione dei fogli di cardiomiociti [74] i limiti della diffusione passiva che riduce sia l'apporto di nutrienti che la rimozione dei prodotti di scarto metabolici limita lo spessore di costrutti vitali ingegnerizzati.

Pertanto anche attraverso la giustapposizione di più fogli di cellule il limite dello spessore di un tessuto è approssimativamente 100µm (circa 3 foglietti di cellule) che impedisce un illimitato impilaggio di fogli di cellule nella creazione di costrutti tissutali più spessi [75].

Anche se una rapida vascolarizzazione nei tessuti cardiaci trapiantati era comunque osservata [76,77].

Sfruttando questa rapida induzione di formazione di un network capillare, è stato sviluppato un metodo polichirurgico che applica l'uso dei trapianti ripetuti ad intervalli di tempo (1- 2 giorni) che permettano che la neovascolarizzazione avvenga (fig. 7) [75,77], ottenendo così tessuti miocardici spessi che battono sincronamente nello spazio subcutaneo.

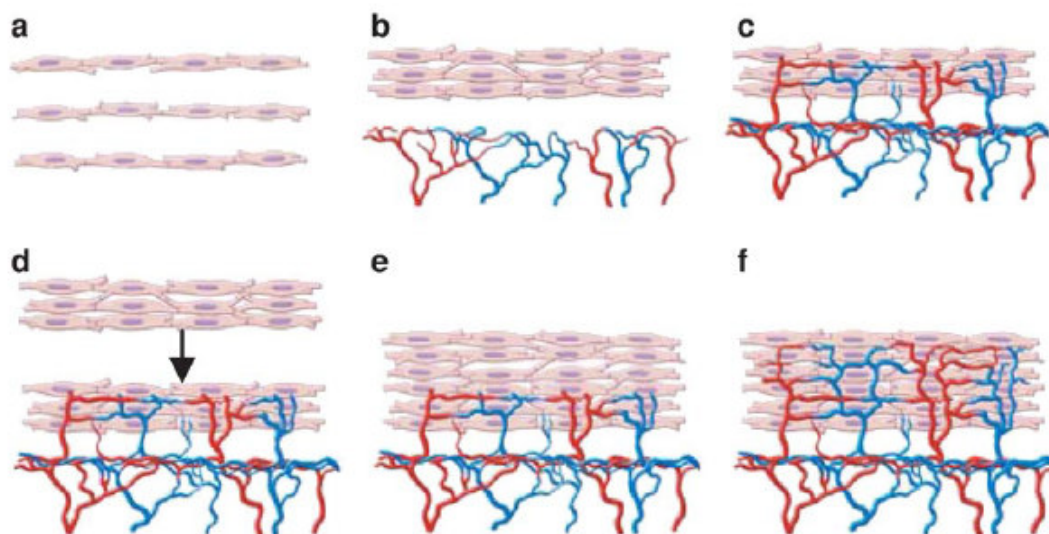


Figura 15: Polichirurgia per creare tessuti miocardici vascolarizzati spessi. A) singoli fogli di cardiomiociti sono raccolti dalle piastre di coltura termoresponsive e prelevati per creare costrutti stratificati. B) triplo strato di fogli di cardiomiociti sono impiantati subcutaneamente. C) dopo il trapianto avviene la neovascolarizzazione nel tessuto bioingegnerizzato. D) dopo che una sufficiente neovascolarizzazione è avvenuta, un secondo strato triplo di fogli di cardiomiociti è trapiantato direttamente sopra al primo costrutto. E) la neovascolarizzazione del secondo innesto avviene attraverso il primo costrutto, al fine di creare tessuti spessi che possano superare i limiti della diffusione passiva.

Usando questo metodo una tripla sovrapposizione di fogli di cardiomiociti erano trapiantati 10 volte ad intervalli di 1 giorno per poter produrre un tessuto miocardico altamente cellularizzato spesso 1mm composto di 30 foglietti di cellule (fig. 15).

Questi tessuti spessi mostravano pulsazioni sincrone e lo sviluppo di un network microvascolare ben organizzato [8,75,77].

Questo metodo di trapianti ripetuti ha un alto rischio di complicazioni se applicato direttamente al cuore ospite, per cui gli approcci che mirano ad una fabbricazione di tessuti spessi ectopicamente sono di maggiore interesse. Applicando il metodo della polichirurgia su un'ampia arteria e vena, costrutti di tessuti spessi con vasi collegati potrebbero essere creati e usati per trapianti ectopici, senza il bisogno di resettare chirurgicamente e riconnettere i numerosi microvasi. Quando gli innesti di tessuto spessi erano fabbricati sull'arteria caudale epigastrica e sulla vena, l'apporto di sangue al tessuto ingegnerizzato era garantito dai vasi sottostanti. Successivamente al trapianto ectopico e all'anastomosi all'arteria carotidea e alla vena giugulare nel collo di un altro ratto, l'innesto mostrava pulsazione continua e sopravvivenza per più di un mese.

L'uso della polichirurgia quindi permette di ricreare tessuti spessi, superando i limiti del trasporto di massa e può essere applicata a vari tipi di tessuto [8,75,77].

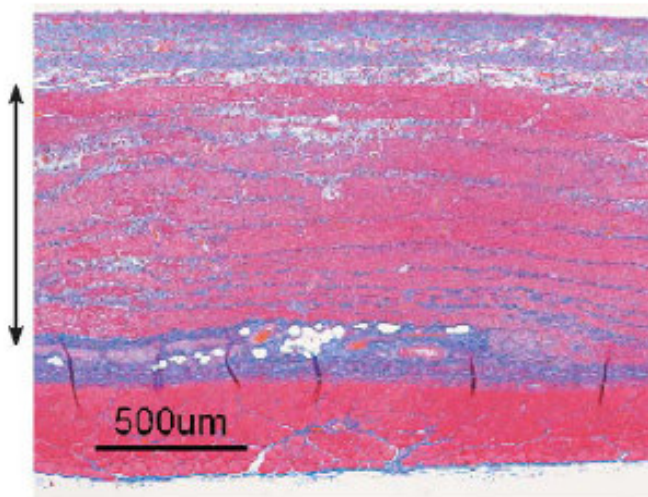


Figura 16: Ingegnerizzazione di un tessuto miocardico spesso 1mm utilizzando la tecnica della polichirurgia, un tessuto miocardico, con battito cardiaco sincrono, spesso approssimativamente 1 mm può essere ingegnerizzato in vivo.

1.3 Microcarriers per l'ingegneria dei tessuti

Le colture su microcarriers furono introdotte da Van Wezel nel 1967 [78] per produzioni di massa di vaccini virali e prodotti cellulari biologici usando le cellule dei mammiferi.

In seguito un' ampia scelta di microcarriers commercialmente disponibili è stata usata con successo per la produzione di una varietà di prodotti biologici su scala industriale [79].

Nelle colture di microcarriers, le cellule ad ancoraggio dipendente crescono su piccole microsferette tenute in sospensione in appositi sistemi di coltura denominati spinner flask.

Le cellule differenziate o non che crescono sulla superficie dei microcarriers possono essere poi raccolte in grande numero per successivi impianti e analisi. Un importante vantaggio di questa tecnologia è che le cellule seminate su questi microcarriers possono essere rilasciate direttamente al sito che deve essere riparato - aggregati di microcarriers possono essere iniettati o somministrate per via artroscopica, in maniera tale da eliminare la necessità di riseminare le cellule raccolte in uno scaffold.

I microcarriers offrono il vantaggio di mettere a disposizione un'elevata area superficiale per la crescita di monostrati di cellule durante la propagazione in un

sistema di coltura in sospensione; un grammo di microcarriers facilmente fornisce un'area superficiale comparabile a 15 flascche per coltura di 75cm².

Questo sistema di coltura, pertanto, offre un effettivo risparmio di spazio e costi rispetto all'uso di mezzo di coltura e costosi additivi come i fattori di crescita e il siero. Inoltre le tecniche di coltura con microcarriers facilitano un più efficiente trasferimento dell'ossigeno dal gas al liquido e il mantenimento dell'ambiente fisico, biologico e chimico. Inoltre questo sistema può essere regolato e monitorato per il pH e il pO₂ desiderato, i livelli di shear, l'agitazione e i nutrienti; di conseguenza, una regolazione rigorosa dei processi distinti di proliferazione cellulare e differenziazione può essere ottenuta. Analisi periodiche di piccoli campioni di cellule possono essere fatte con il minimo disturbo e senza sacrificare l'intera massa di microcarriers seminati [80].

Vari fattori sono cruciali perché l'applicazione dei microcarriers nell'ingegneria dei tessuti abbia successo.

Le cellule sui microcarriers crescono come monostrati sulla superficie di piccole sfere (fig. 17a e b) o come multistrati nei pori di strutture macroporose (fig. 18 A,B e C).

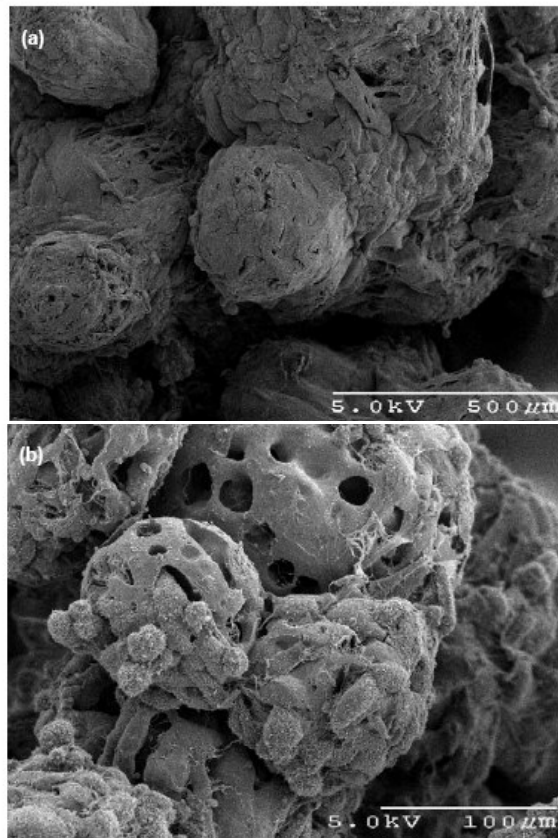


Figura 17. Immagini SEM di cellule staminali mesenchimali umane coltivate su microcarriers Culti-Spher dopo 3 settimane di coltura [80].

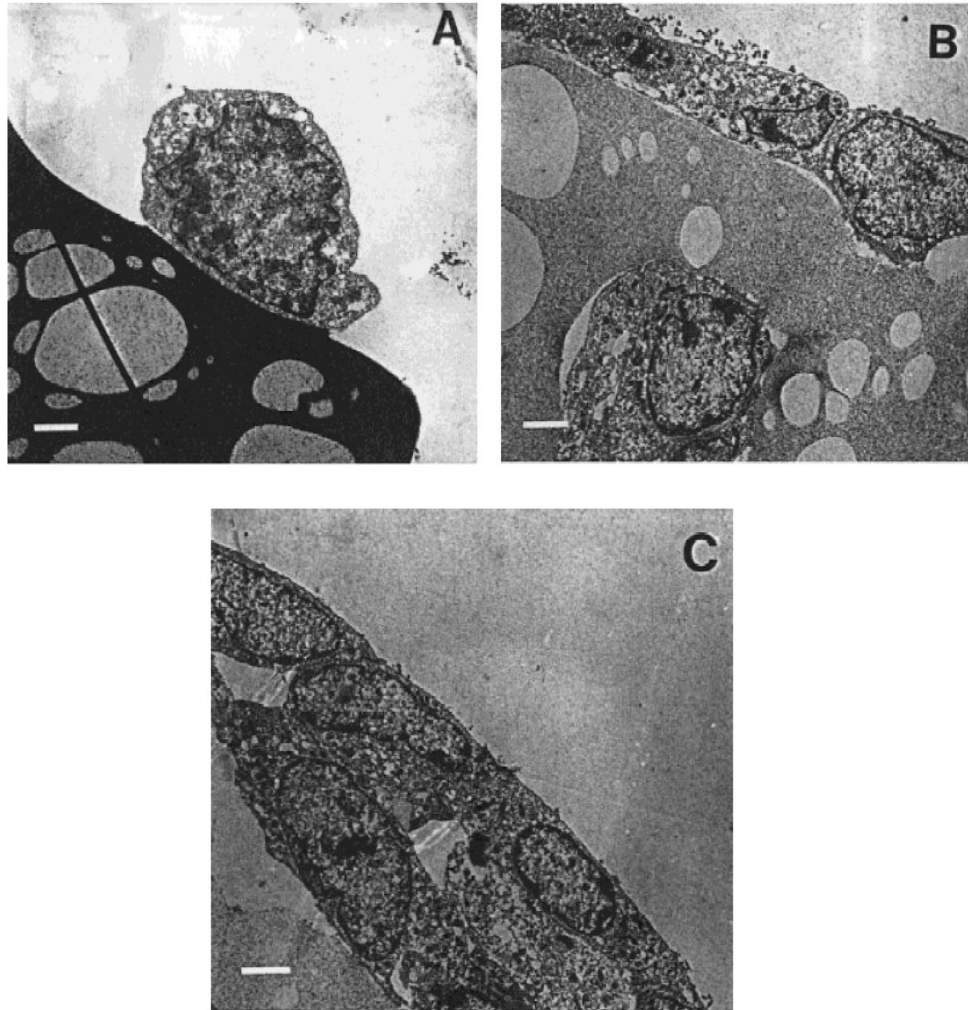


Figura 18: Immagini TEM di sezioni ultrasottili di microbiglie di gelatina Culti-Spher G seminate con cellule HepZ. A) cellula ancora di forma rotonda poco dopo la semina. B) dopo l'attaccamento le cellule cominciano ad appiattirsi e ad incrementare il volume del citoplasma. C) le cellule cresciute esponenzialmente esibiscono una morfologia stesa sulla superficie e una forma sferica nei macropori nell'ultima fase di crescita e nell'ultima fase di crescita formano dei multistrati [81].

L'adesione delle cellule alla superficie di coltura è fondamentale sia nelle tradizionali tecniche di coltura in 2D che nelle colture con microcarriers. Poiché la proliferazione delle cellule ad ancoraggio dipendente può avvenire solo dopo l'adesione ad una superficie di coltura idonea [82], è importante utilizzare superfici e procedure di coltura che favoriscono tutti gli step coinvolti nell'adesione.

L'adesione delle cellule può essere diviso in 4 fasi differenti. La prima fase consiste in un leggero attaccamento alla superficie. La seconda fase mostra cellule più appiattite ma ancora di forma sferoidale, dove la cellula è significativamente più adesa grazie all'incrementata area superficiale di contatto e alla densità del legame. Le cellule nella terza fase sono significativamente meno adesive rispetto alla seconda fase a causa del numero ridotto di legami. Le cellule nella quarta fase sono pienamente attaccate e estremamente appiattite (fig. 19) [83]. L'adesione delle cellule nelle colture è un processo multistep e coinvolge a) adsorbimento dei fattori di crescita alla superficie di coltura, b) contatto tra le cellule e la superficie, c) attaccamento delle cellule alla superficie rivestita, e infine d) le cellule attaccate si stendono[37] (fig. 19).

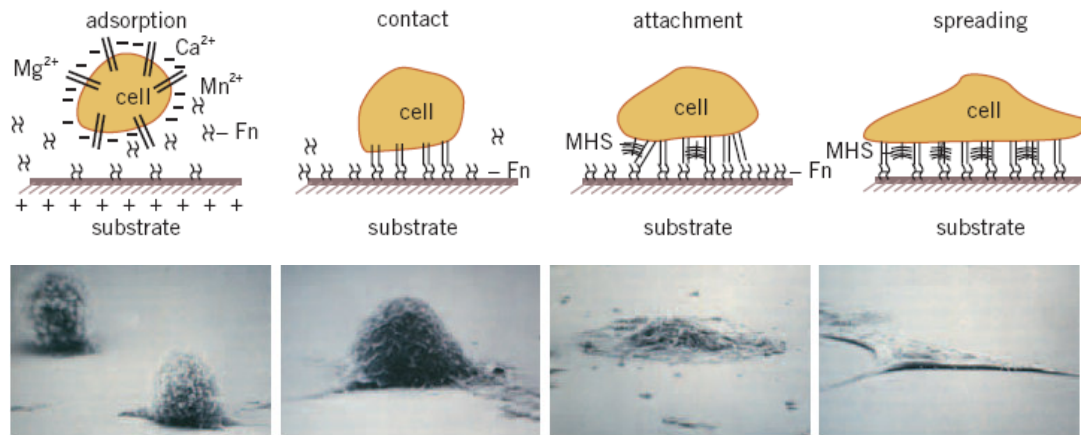


Figura 19. Sopra:disegno schematico del processo di adesione in 4 fasi (Fn - fibronettina, MHS - heparan solfato multivalente), Sotto: immagine microscopica delle 4 fasi

L'uso dei microcarriers nell'ingegneria dei tessuti è stato esplorato solo in maniera limitata, in tabella 1 sono riportate i microcarriers commercialmente disponibili che possono essere utilizzati nell'ingegneria dei tessuti. Vari fattori sono cruciali per il successo dell'applicazione dei microcarriers nell'ingegneria dei tessuti.

La facilità con la quale le cellule si attaccano alla superficie dei microcarriers dipende dalla composizione chimica, dalla topografia superficiale, dal grado di porosità e dalla densità di carica. Inoltre il numero di cellule che si attaccano sulla superficie dipende dal diametro dei microcarriers (generalmente tra i 100 e 400 μm) la distribuzione delle dimensioni dovrebbe essere più stretta possibile per assicurare una coltura omogenea, e la densità specifica dei microcarriers dovrebbe

essere leggermente più alta di quella del mezzo di coltura (generalmente tra 1.02 e 1.10) per far sì che esse siano mantenute in sospensione con una leggera agitazione.

Name	Manufacturer	Size (µm)	Surface area (cm ² g ⁻¹)	Beads (g ⁻¹)	Density (g ml ⁻¹)	Porous	Material	References
Dextran								
Cytodex 1	Amersham Biosciences, Sweden	147–248	4400	4.3 × 10 ⁶	1.03	–	Dextran matrix with substituted <i>N,N</i> -dimethylaminoethyl groups	[6,23,31,49]
Cytodex 2	Amersham Biosciences, Sweden	135–200	3300	4.1 × 10 ⁶	1.04	–	Dextran matrix with a surface layer of <i>N,N,N</i> -trimethyl-2-hydroxyaminopropyl groups	[6]
Hillex	SoloHill, USA	150–210	350	5.0 × 10 ⁵	1.10	–	Dextran matrix with treated surface	[6]
Plastic								
Plastic coated	SoloHill, USA	150–210	380	4.5 × 10 ⁵	1.02–1.04	–	Plastic coated with denaturated collagen	[6,25]
PlasticPlus coated	SoloHill, USA	150–210	380	4.5 × 10 ⁵	1.02–1.04	–	Plastic coated with denaturated collagen, promoting fast attachment	[6,24]
Biosilon [®]	Nunc, Denmark	160–300	255	5.1 × 10 ⁴	1.05	–	Polystyrene	[18]
Cytoline 2	Amersham Biosciences, Sweden	400–2500	> 1000	n/a	1.03	+	Polyethylene and silica	[38]
Glass								
Glass-coated	SoloHill, USA	150–210	380	4.5 × 10 ⁵	1.02–1.04	–	Plastic with glass coating	[6]
Cellulose								
Cytopore 1	Amersham Biosciences, Sweden	200–280	~ 1200	n/a	1.03	+	Cellulose	[50]
Gelatin								
Cultispher G	PerCell Biologica, Sweden	130–380	n/a	1.0 × 10 ⁶	1.04	+	Cross-linked porcine gelatin	[27,34,41]
Cultispher S	PerCell Biologica, Sweden	130–380	n/a	8.0 × 10 ⁵	1.04	+	Cross-linked porcine gelatin	[43]
Collagen								
Cytodex 3	Amersham Biosciences, Sweden	141–211	2700	3.0 × 10 ⁶	1.04	–	Dextran matrix with thin layer of denaturated pig skin-derived collagen	[6–8,22,35–37,50]
Cellagen	MP Biomedicals, USA	100–400	n/a	n/a	n/a	+	Highly cross-linked bovine collagen type I	[28,30,33]

Tabella 1: Selezione di microcarriers commercialmente disponibili e loro parametri fisico-chimici.

La composizione chimica dei microcarriers determina la facilità di raccolta delle cellule vitali. Enzimi come la tripsina e la collagenase, sono stati usati con successo ma l'efficienza del recupero delle cellule vitale varia a seconda della composizione chimica e del grado di porosità.

La composizione chimica determina la biodegradabilità e i microcarriers seminati con le cellule destinati al rilascio direttamente nel sito interessato nel tessuto necessitano di avere un'ottimale velocità di biodegradazione per assicurare una sufficiente longevità in vivo. Infine i microcarriers devono essere in grado di sostenere la sterilizzazione senza che sia compromessa l'integrità strutturale.

I microcarriers più comunemente usati sono composti di una matrice di destrano (Cytodex) che facilita l'attaccamento e la proliferazione di un'ampia gamma di cellule. L'adesione delle cellule può poi essere migliorata usando rivestimenti, il collagene è uno di questi.

L'utilizzo di microcarriers macroporosi, come le CultiSpher a base di collagene, garantisce una maggiore area superficiale a disposizione per l'adesione delle cellule il che incrementa l'attaccamento cellulare [80].

Inoltre le strutture macroporose creano un ambiente protetto per le cellule dal momento che sono protette dalle forze di shear nelle regioni interiori dei microcarriers (fig. 20).

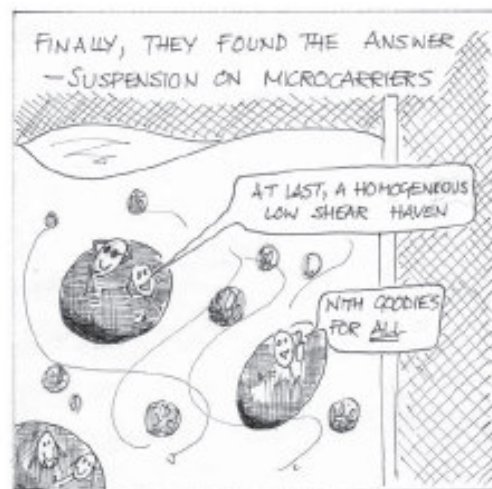


Figura 20 Disegno delle cellule dentro i pori dei microcarriers

Sotto determinate condizioni di coltura le cellule seminate sui microcarriers mostrano di produrre una matrice extracellulare che ha molte caratteristiche in comune con il tessuto di origine. Tali osservazioni hanno incoraggiato l'uso di un sistema di coltura su microcarrier in spinner flask come un modello in vitro per studiare la biologia di tessuti quali ad esempio la cartilagine e l'osso. Inoltre la scoperta che la produzione *de novo* di un materiale simile al tessuto può essere ottenuta con i microcarriers suggerisce il loro potenziale uso nell'ingegneria dei tessuti. I vantaggi che si ottengono con tale sistema di coltura potrebbero essere anche ricercati nei fattori biomeccanici che favoriscono l'interazione cellula-cellula e riproducono il loro ambiente tridimensionale naturale, le interazioni cellula-cellula possono essere aumentate con la formazione di aggregati di microcarriers seminati con le cellule [84-88]. La combinazione della composizione del materiale del

microcarrier e l'ambiente biomeccanicamente attivo potrebbe essere tra i motivi molecolari che stimolano sia la proliferazione che l'espressione del fenotipo [88].

E' stato dimostrato che aggregati di multibiglie formati da due o più microcarriers coperti con cellule vitali (fig 21 a) e contenenti notevoli quantità di cartilagine ialina di nuova formazione (fig 21 b) possono essere formati [84,85,87,88].

Microcarriers seminati con condrociti coltivati per meno di due settimane in una spinner flask potrebbero fornire costrutti idonei per l'iniezione. Quando il tempo di coltura è esteso si svilupperanno degli aggregati costituiti da un materiale simile al tessuto cartilagineo che potrebbero essere utili per riparare difetti della cartilagine.

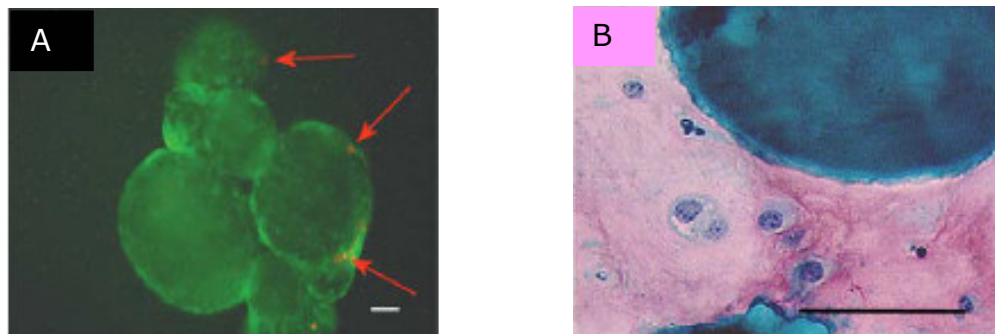


Figura 21 A) Condrociti nasali adulti umani seminati su Cultispher in spinner flask colorati con fluorescina diacetata e iodio propizio (le cellule vitali appaiono verdi e quelle morte rosse indicate dalle frecce) B) Sezione di un aggregato microbiglie e cellule colorato con Safranin-O.

Inoltre anche *in vivo*, microsfere di gelatina (Cultispher) sono state usate come substrato per la coltura, veicolo di trapianto, e scaffold biodegradabile per la rigenerazione guidata di tessuti soft.

Ad esempio è stato dimostrato che l'iniezione in topi di microsfere macroporose di gelatina presemiate con fibroblasti umani e preadipociti, mostrava, un rapido popolamento delle cellule attraverso il materiale con la formazione di un denso tessuto connettivo rispetto all'iniezione delle microsfere nude, dimostrando la loro capacità di sostenere la rigenerazione del tessuto *in vivo* (fig. 22)[89].

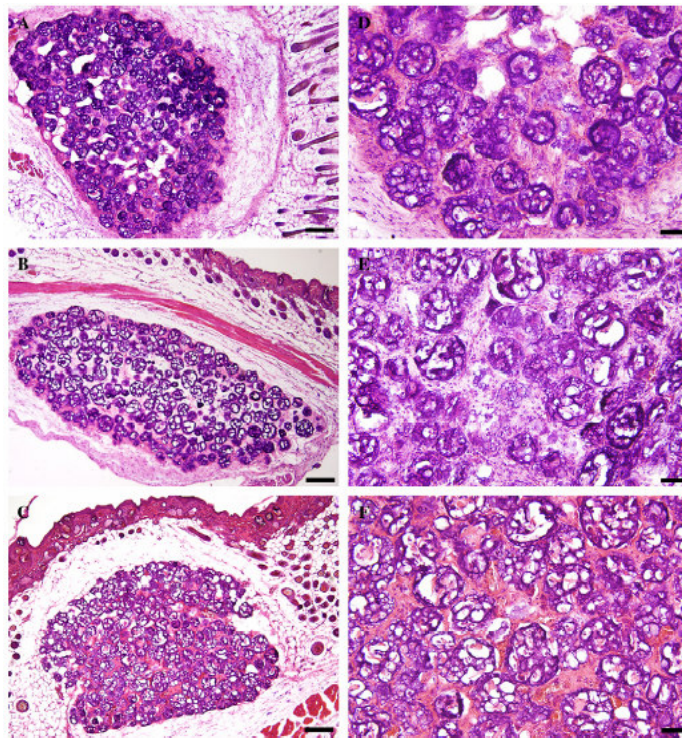


Figura 22: Sezione istologica colorata con ematossilina e eosina 21 giorni dopo l'iniezione nei ratti. A) sfere macroporose nude di gelatina. B) Sfere macroporose di gelatina preseminate con preadipociti umani. C) sfere macroporose di gelatina preseminate con fibroblasti umani. D) primo piano di A. E) primo piano di B. F) primo piano di C.

Dal momento che le cellule aderiscono e crescono sulla superficie di queste microparticelle questi substrati potrebbero essere usati per:

- a) come supporti non di carico o come parte di un costrutto 3D;
- b) per la coltura di cellule ad ancoraggio dipendente in un bioreattore dinamico,
- c) per incapsulare molecole bioattive nelle microparticelle e simultaneamente crescere le cellule sulle stesse microparticelle che rilascerebbero fattori di crescita per stimolare la differenziazione e la proliferazione delle cellule adese.

In tal modo la proliferazione cellulare e la differenziazione avverrebbe dando origine a un costrutto ibrido cellula-materiale. Dopo il posizionamento del costrutto in vivo, la natura biodegradabile delle microparticelle permetterebbe la loro sostituzione con nuovo tessuto formatosi [90].

Bibliografia

1. E. J. Suuronen, H. Sheardown, K. D. Newman, C. R. McLaughlin and M. Griffith. 2005 "**Building In Vitro Models of Organs**". International Review of Cytology Vol. 244.
2. M. Radisic, A. Marsano, R. Maidhof, Y. Wang and G.Vunjak Novakovic 2008. "**Cardiac tissue engineering using perfusion bioreactor systems**". Nature Protocols Vol.3 No4.
3. W. C. Puelacher, J.P. Vacanti, N. F. Ferraro, B. Schloo, C.A. Vacanti 1996. "**Femoral shaft reconstruction using tissue engineered growth of bone**". Int. J Oral Maxillofac Surg. 25 (3).
4. Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, Zund G, Miura T, Ma PX, et al. **Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model**. Ann Thorac Surg 1995;60(6 Suppl):S513-6.
5. Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP. **Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation**. Plast Reconstr Surg 1991;88(5):753-9.
6. N. Matsuda et al. "**Tissue Engineering Based on Cell Sheet Technology**" 2007 Adv. Mater, 19, 3089-3099
7. J.Yang et al. "**Cell sheet engineering: Recreating tissues without biodegradable scaffolds**" (2005) Biomaterials 26 (6415-6422)
8. J.Yang et al. "**Cell delivery in regenerative medicine: The cell sheet engineering approach**" 2006 Journal of Controlled Release
9. K. Jakab et al. "**Engineering biological structures of prescribed shape using self-assembling multicellular systems**" 2004 PNAS, vol. 101 no. 9 2864-2869
10. Ahsan T, Nerem RM: **Bioengineered tissues: the science, the technology, and the industry** Orthod Craniofacial Res 8, 2005; 134-140
11. Linda G. Griffith* and Melody A. Swartz **Capturing complex 3D physiology in vitro nature reviews molecular cell biology** volume 7 march 2006 211
12. Pratt AB, Weber FE, Schmoekel HG, Muller R, Hubbell JA. **Synthetic extracellular matrices for in situ tissue engineering**. Biotechnol Bioeng 2004;86:27-36
13. Bi J, Downs JC, Jacob JT. **Tethered protein/peptide-surface modified hydrogels**. J Biomater Sci Polym Ed 2004;15:905-16
14. Sherwood JK, Riley SL, Palazzolo R, Brown SC, Monkhouse DC, Coates Met al. **A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair**. Biomaterials 2002;23:4739-51

15. L.D Shea, E. Simeley, J. Bonaldio and D. J. Mooney Nature Biotechnol. 17, 551-554 (1999)
16. C.S. Chen et al. Science 276 1425-1428 (1997)
17. D.L. Kaplan, R.T. Moon and G.V. Novakovic **"It takes a villain to grow a tissue"** 2005 Nature Biotechnology Vol 23 No 10
18. I. Martin, D. Wendt and M. Heberer **"The role of bioreactors in tissue engineering"** 2004 TRENDS in Biotechnology Vol.22 No.2
19. Y. Martina, P. Vermette **"Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances"** (2005) Biomaterials 26 7481-7503
20. Huang-Chi Chen/ Yu Chen Hu **Bioreactor for tissue engineering** Biotechnol Lett (2006) 28:1415-1423
21. Holy, C.E. et al. **"Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period"**. (2000) J. Biomed. Mater. Res. 51, 376-382
22. Carrier, R.L. et al. **"Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization"** (1999). Biotechnol. Bioeng. 64, 580-589
23. Freed, L.E. et al. **Chondrogenesis in a cell-polymer bioreactor system.** (1998) Exp. Cell Res. 240, 58-65
24. Vunjak-Novakovic, G. et al. (1996) **Effects of mixing on the composition and morphology of tissue-engineered cartilage.** AIChE J. 42, 850-860
25. Kim, B.S. et al. (1998) **"Optimizing seeding and culture methods to engineer smooth muscle tissue on biodegradable polymer matrices"**. Biotechnol. Bioeng. 57, 46-54
26. Vunjak-Novakovic, G. et al. (1998) **Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering.** Biotechnol. Prog. 14, 193-202
27. Li, Y. et al. (2001) **Effects of filtration seeding on cell density, spatial distribution, and proliferation in nonwoven fibrous matrices.** Biotechnol. Prog. 17, 935-944
28. Wendt, D. et al. (2003) **Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity.** Biotechnol. Bioeng. 84, 205-214
29. Sodian, R. et al. (2002) **Tissue-engineering bioreactors: a new combined cell-seeding and perfusion system for vascular tissue engineering.** Tissue Eng. 8, 863-870
30. Davisson, T. et al. (2002) **Perfusion increases cell content and matrix synthesis in chondrocyte three-dimensional cultures.** Tissue Eng. 8, 807-816.

31. Radisic, M. et al. (2003) "**High-density seeding of myocyte cells for cardiac tissue engineering**". *Biotechnol. Bioeng.* 82, 403–414
32. Kim, S.S. et al. (2000) **Dynamic seeding and in vitro culture of hepatocytes in a flow perfusion system**. *Tissue Eng* 39–44
33. Martin, I. et al. (1999) **Method for quantitative analysis of glycosaminoglycan distribution in cultured natural and engineered cartilage**. *Ann. Biomed. Eng.* 27, 656–662
34. Ishaug, S.L. et al. (1997) **Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds**. *J. Biomed. Mater. Res.* 36, 17–28
35. Gooch, K.J. et al. (2001) **Effects of mixing intensity on tissue engineered cartilage**. *Biotechnol. Bioeng.* 72, 402–407
36. Vunjak-Novalic, G. et al. (1999) **Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue engineered cartilage**. *J. Orthop. Res.* 17, 130–138
37. Bancroft G. N. et al. (2003) **Design of a flow Bioreactor System for Bone tissue engineering applications** *Tissue Eng.* 9, No 3 549–554
38. Bancroft, G.N. et al. (2002) **Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12600–12605
39. T. Dvir et al. "**A Novel Perfusion Bioreactor Providing a Homogenous Milieu for tissue Regeneration**" *Tissue Engineering* Vol 12 No 10 2006;
40. Carrier, R.L. et al. (2002) **Perfusion improves tissue architecture of engineered cardiac muscle**. *Tissue Eng.* 8, 175–188,
41. Raimondi, M.T. et al. (2002) **Mechanobiology of engineered cartilage cultured under a quantified fluid-dynamic environment**. *Biomech. Model. Mechanobiol.* 1, 69–82
42. Navarro, F.A. et al. (2001) **Perfusion of medium improves growth of human oral neomucosal tissue constructs**. *Wound Repair Regen.* 9, 507–512
43. David Pazzano, Kathi A. Mercier, John M. Moran, Stephen S. Fong, David D. DiBiasio, Jill X. Rulfs, Sean S. Kohles, and Lawrence J. Bonassar **Comparison of Chondrogenesis in Static and Perfused Bioreactor Culture**, *Biotechnol. Prog.* 2000, 16, 893–896
44. Shuichi Mizuno, Florin Allemann, Julie Glowacki **Effects of medium perfusion on matrix production by bovine chondrocytes in three-dimensional collagen sponges**, *J. Biomed. Mater. Res.* 56 (2001) 368–375
45. Gomes, M.E. et al. (2003) **Effect of flow perfusion on the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured on starch-based three-dimensional scaffolds** *J. Biomed. Mater. Res.* 67A, 87–95

46. Zein, I. et al. (2002) **Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications.** *Biomaterials* 23, 1169–1185
47. Boland, T. et al. (2003) **Cell and organ printing 2: fusion of cell aggregates in three-dimensional gels.** *Anat. Rec.* 272A, 497–502
48. Butler, D.L. et al. (2000) **Functional tissue engineering: the role of biomechanics.** *J. Biomech. Eng.* 122, 570–575
49. Akhyari, P. et al. (2002) **Mechanical stretch regimen enhances the formation of bioengineered autologous cardiac muscle grafts.** *Circulation* 106, I137–I142
50. Powell, C.A. et al. (2002) **Mechanical stimulation improves tissue engineered human skeletal muscle.** *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283, C1557–C1565
51. Kim, B.S. et al. (1999) **Cyclic mechanical strain regulates the development of engineered smooth muscle tissue.** *Nat. Biotechnol.* 17, 979–983
52. Davisson, T. et al. (2002) **Static and dynamic compression modulate matrix metabolism in tissue engineered cartilage.** *J. Orthop. Res.* 20, 842–848 55
53. Waldman, S.D. et al. (2003) **Effect of biomechanical conditioning on cartilaginous tissue formation in vitro.** *J. Bone Jt Surg. Am.* 85A (Suppl. 2), 101–105.
54. Mauck, R.L. et al. (2000) **Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels.** *J. Biomech. Eng.* 122, 252–260
55. Altman, G.H. et al. (2002) **Cell differentiation by mechanical stress.** *FASEB J.* 16, 270–272
56. De´marteau, O. et al. (2003) **Development and validation of a bioreactor for physical stimulation of engineered cartilage.** *Biorheology* 40, 331–336
57. Yamada N, Okano T, Sakai H, Karikusa F, Sawasaki Y, Sakurai Y. **Thermo-responsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells.** *Makromol Chem Rapid Commun* 1990;11:571–6.
58. Okano T, Yamada N, Sakai H, Sakurai Y. **A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide).** *J Biomed Mater Res* 1993;27(10):1243–51.
59. Kushida A, Yamato M, Konno C, Kikuchi A, Sakurai Y, Okano T. **Decrease in culture temperature releases Monolayer Endothelial cell sheets together with deposited fibronectin matrix from temperature-responsive culture surfaces.** *J Biomed Mater Res* 1999;45(4):355–62.
60. M. Yamato, M. Utsumi, A. Kushida, C. Konno, A. Kikuchi, T. Okano, **Thermo-responsive culture dishes allow the intact harvest of multilayered**

- keratinocyte sheets without disperse by reducing temperature**, *Tissue Eng.* 7 (4) (2001) 473–480.
61. K. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida, K. Watanabe, N. Maeda, H. Watanabe, K. Yamamoto, S. Nagai, A. Kikuchi, Y. Tano, T. Okano, **Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal Stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface**, *Transplantation* 77 (3) (2004) 379–385.
 62. Y. Shiroyanagi, M. Yamato, Y. Yamazaki, H. Toma, T. Okano, **Transplantable urothelial cell sheets harvested non invasively from temperature-responsive culture surfaces by reducing temperature**, *Tissue Eng.* 9 (5) (2003) 1005–1012.
 63. Y. Shiroyanagi, M. Yamato, Y. Yamazaki, H. Toma, T. Okano, **Urothelium regeneration using viable cultured urothelial cell sheets grafted on demucosalized gastric flaps**, *BJU Int.* 93 (7) (2004) 1069–1075.
 64. M. Hasegawa, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano, I. Ishikawa, **Human periodontal ligament cell sheets can regenerate periodontal ligament tissue in an athymic rat model**, *Tissue Eng.* 11 (3–4) (2005) 469–478.
 65. T. Akizuki, S. Oda, M. Komaki, H. Tsuchioka, N. Kawakatsu, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano, I. Ishikawa, **Application of periodontal ligament cell sheet for periodontal regeneration: a pilot study in beagle dogs**, *J. Periodontal Res.* 40 (3) (2005) 245–251.
 66. T. Shimizu, M. Yamato, Y. Isoi, T. Akutsu, T. Setomaru, K. Abe, A. Kikuchi, M. Umezu, T. Okano, **Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces**, *Circ. Res.* 90 (3) (2002) e40.
 67. T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano, **Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction**, *Biomaterials* 24 (13) (2003) 2309–2316.
 68. M. Harimoto, M. Yamato, M. Hirose, C. Takahashi, Y. Isoi, A. Kikuchi, T. Okano, **Novel approach for achieving double-layered cell sheets coculture: overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes**, *J. Biomed. Mater. Res.* 62 (3) (2002) 464–470.
 69. Tsuda Y, Kikuchi A, Yamato M, Nakao A, Sakurai Y, Umezu M, et al. **The use of patterned dual thermoresponsive surfaces for the collective recovery as co-cultured cell sheets**. *Biomaterials* 2005;26(14):1885–93.
 70. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, et al. **Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium**. *N Engl J Med* 2004;351(12):1187–96.
 71. Sekine H, Shimizu T, Kosaka S, Kobayashi E, Okano T. **Cardiomyocyte bridging between hearts and bioengineered myocardial tissues with mesenchymal transition of mesothelial cells**. *J Heart Lung Transplant* 2006;25(3):324–32.

72. Miyagawa S, Sawa Y, Sakakida S, Taketani S, Kondoh H, Memon IA, et al. **Tissue cardiomyoplasty using Bioengineered contractile cardiomyocyte sheets to repair damaged myocardium: their integration with recipient myocardium.** *Transplantation* 2005; 80(11):1586–95.
73. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, et al. **Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction.** *Nat Med* 2006;12(4): 459–65.
74. Masuda S, Shimizu T., Yamato M., and Okano T. **Cell sheet engineering for heart repair.** *Adv. Drug Del. Rev.* 2008; 60 277-285
75. T. Shimizu, H. Sekine, J. Yang, Y. Isoi, M. Yamato, A. Kikuchi, E. Kobayashi, T. Okano, **Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues,** *FASEB J.* 20 (6) (2006) 708–710.
76. Sekiya S, Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. **Bioengineered cardiac cell sheet grafts have intrinsic angiogenic potential.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006;341(2):573–82
77. Yang J. et al. **Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering.** *Biomaterials* 2007; 28 5033-5043
78. vanWezel, A. (1967) **Growth of cell strains and primary cells on microcarriers in homogeneous culture.** *Nature* 216, 64–65
79. Tree, J.A. et al. (2001) **Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains.** *Vaccine* 19, 3444–3450
80. J Malda, C Frondoza **Microcarriers in the Engineering of cartilage and bone, Trends in Biotechnology** Vol. 24No.7 July 2006
81. A Werner, S Duvar, J Muthing, H Bunttemeyer, H Lunsdorf, M Strauss, J Lehmann **Cultivation of immortalized Human Hepatocytes HepZ on Macroporous CultiSpher G Microcarriers**
82. Liu, J.Y. et al. (2004) **Autologous cultured keratinocytes on porcine gelatin microbeads effectively heal chronic venous leg ulcers.** *Wound Repair Regen.* 12, 148–156
83. Kang, S.W. et al. (2005) **Poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres as an injectable scaffold for cartilage tissue engineering.** *Tissue Eng.* 11, 438–447
84. Malda, J. et al. (2003) **Expansion of bovine chondrocytes on microcarriers enhances redifferentiation.** *Tissue Eng.* 9, 939–948
85. Freed, L. et al. (1993) **Cultivation of cell–polymer cartilage implants in bioreactors.** *J. Cell. Biochem.* 51, 257–264
86. Baker, T. and Goodwin, T. (1997) **Three-dimensional culture of bovine chondrocytes in rotating-wall vessels.** *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 33, 358–365

87. Frondoza, C. et al. (1996) **Human chondrocytes proliferate and produce matrix components in microcarrier suspension culture.** *Biomaterials* 17, 879–888
88. Shikani, A.H. et al. (2004) **Propagation of human nasal chondrocytes in microcarrier spinner culture.** *Am. J. Rhinol.* 18, 105–112
89. F.R.M. Huss, J.P.E. Junker, h. Johnson, G. Kratz (2005) **Macroporous gelatine spheres as culture substrate, transplantation vehicle, and biodegradable scaffold for guided regeneration of soft tissue.** *In vivo Study in nude mice. JPRAS* 60, 543-555
90. GA Silva, OP Coutinho, P Ducheyne, IM Shapiro, RL Reis, **The effect of starch and starch-bioactive glass composite microparticles on the adhesion and expression of the osteoblastic phenotype of a bona cell line.** *Biomaterials* 2006.

Capitolo 2

Ingegneria tessutale del derma

2.1 Il Derma

La pelle comprende alcuni differenti tipi cellulari. I *cheratinociti* sono il tipo cellulare più comune nell'epidermide e formano lo strato superficiale di barriera. I *melanociti* si trovano nello strato più basso dell'epidermide e provvedono al colore della pelle. I *fibroblasti* formano lo strato dermico inferiore e provvedono alla forza e alla resilienza. (fig. 1)

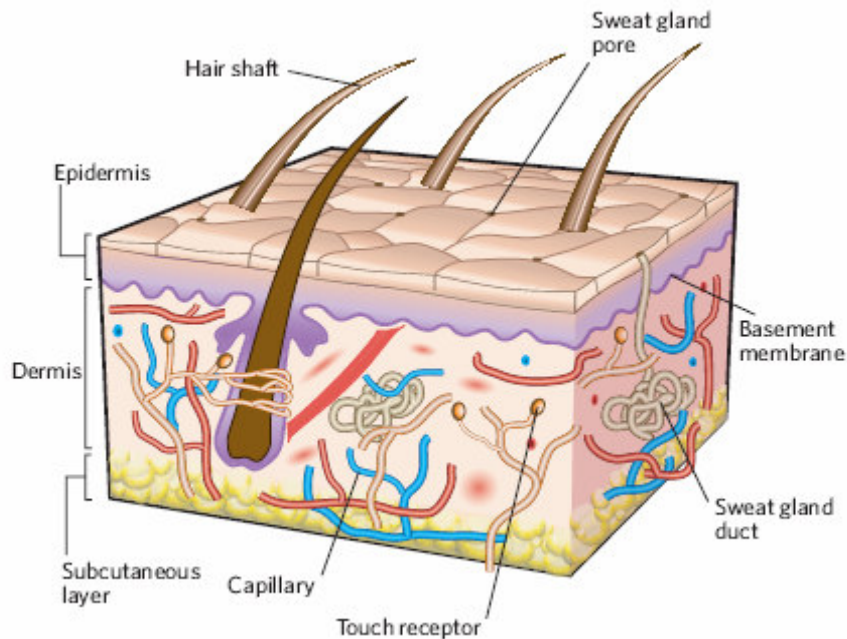


Figura 1 Struttura della pelle umana. Questo schema della pelle umana mostra i due strati principali della pelle la barriera epidermica superiore e lo strato inferiore, molto più spesso, rappresentato dal derma. Lo strato della barriera epidermica è relativamente sottile (0.1-0.1 mm di spessore) e attaccato al derma sottostante da una specializzata membrana basale. Questo consiste di vari differenti tipi di fibre di collagene, che attaccano le cellule al sottostante derma, ed è visibile con un microscopio elettronico. Il derma varia in spessore in maniera dipendente dalla sua posizione nel corpo ed è composto principalmente da collagene I, con inclusioni dermiche di bulbi di capelli e ghiandole di sudorazione, che sono allineati con i cheratinociti epidermici. Il derma è ben vascolarizzato e contiene recettori per il tatto, la temperatura e il dolore. I cheratinociti nell'epidermide dipendono unicamente dalla diffusione dall'adiacente network di capillari del derma. Queste cellule progressivamente differenziano da cellule nello strato di base, che è localizzato sulla membrana basale e dà crescita ai cheratinociti figli che sono spinti sopra. Questi stratificano, perdono i loro nuclei e diventano un foglio integrato di cheratina, che è successivamente persa. Lo strato epidermico superiore cheratinizzato funge da strato barriera, che resiste all'ingresso dei batteri, e previene la perdita di fluidi ed elettroliti [1].

Il **derma** è, quindi, lo strato intermedio della cute, compreso tra l'ipoderma e l'epidermide. A differenza di quest'ultima, da cui è separato dalla membrana basale, il derma è riccamente vascolarizzato ed innervato.

Il derma svolge funzioni di supporto meccanico e metabolico nei confronti dell'epidermide, alla quale trasferisce nutrienti e sebo, una sostanza oleaginosa che protegge lo strato superficiale della pelle da batteri e disidratazione. Ha una forma ondulata per la presenza di papille dermiche, estroflessioni che hanno lo scopo di inserirsi nelle creste presenti nello strato epidermico sovrastante. Questa particolare conformazione anatomica ha lo scopo di aumentare l'aderenza tra i due strati e di favorire gli scambi metabolici.

Dal punto di vista istologico, il derma è un connettivo formato da glicoproteine fibrose immerse in una sostanza fondamentale. Al suo interno sono presenti diversi tipi di cellule, follicoli piliferi e le ghiandole tipiche della cute.

Il derma può essere distinto in due porzioni. Lo strato più superficiale, detto avventiziale, è ricco di cellule; in quello più profondo, detto reticolare, prevalgono invece le fibre.

Nel derma si possono distinguere tre componenti: *le cellule, le fibre e la sostanza fondamentale* (o amorfa) che riempie gli spazi lasciati liberi dalle fibre e dalle cellule dermiche.

2.1.1 Le cellule

I fibroblasti sono le cellule più abbondanti del derma e sono responsabili della sintesi delle fibre e dei componenti della sostanza fondamentale.

Oltre ai fibroblasti sono presenti anche mastociti, cellule che racchiudono molti granuli ricchi di eparina (agente anticoagulante) ed istamina (mediatore delle reazioni infiammatorie).

Il derma è popolato anche da cellule provenienti dal sangue come i macrofagi, i granulociti ed i linfociti. La presenza di queste cellule a livello del derma aumenta durante gli stati infiammatori. In particolare i macrofagi derivano dai monociti ematici che, dopo essere usciti dai capillari, assumono un aspetto simile ai fibroblasti e prendono il nome di istiociti. Quando è in atto un processo infiammatorio gli istiociti aumentano di dimensioni ed acquisiscono la capacità di inglobare particelle estranee e materiale necrotico (fagocitare). In tal caso gli istiociti prendono il nome di macrofagi,

che appartengono alla famiglia di cellule presentanti gli antigeni e ricoprono un ruolo di primo piano nella risposta immunitaria.

Il derma svolge importanti funzioni metaboliche, immunologiche, termoregolatorie e sensitive, oltre che di sostegno. A questo livello troviamo infatti importanti strutture, come le ghiandole sudoripare e sebacee, le radici ed i bulbi piliferi, i muscoli erettori del pelo ed una fitta rete di capillari.

2.1.2 Le fibre

Le fibre principali sono quelle di collagene. Il collagene è una glicoproteina estremamente complessa organizzata in grossi fasci fibrosi e, oltre ad essere la proteina più abbondante dell'organismo, nella pelle rappresenta da sola il 70% delle proteine.

Il collagene ha funzione di sostegno e conferisce una notevole resistenza meccanica al derma. Nello strato più superficiale, detto avventiziale, sono presenti anche fibre di collagene più sottili, dette reticolari.

Oltre alle fibre di collagene, nel derma è presente una piccola quota di fibre elastiche che, nel loro insieme, rappresentano soltanto il 2% delle proteine cutanee. Sono costituite da elastina che conferisce alla pelle un certo grado di elasticità, indispensabile sia per consentire la mimica facciale, sia per seguire le numerose variazioni delle dimensioni corporee che avvengono nel corso della vita.

Le molecole di elastina sono unite da ponti trasversali, grazie ai quali formano un'ampia rete che conferisce alla pelle un discreto grado di elasticità. La distensione cutanea è però limitata dalla presenza di fibre di collagene frammiste a quelle elastiche. Esistono tuttavia dei casi in cui la distensione della pelle è talmente pronunciata da causare la rottura delle fibre di collagene: un classico esempio è dato dalle smagliature gravidiche.

2.1.3 La sostanza fondamentale

La sostanza fondamentale è costituita da glicosamminoglicani (GAG). Si tratta di polisaccaridi costituiti da lunghe catene di disaccaridi, nei quali almeno una delle due unità è un amminozucchero (glucosammina o galattosammina).

I più noti glicosamminoglicani sono l'acido ialuronico e l'eparina. Queste ed altre sostanze appartenenti a tale famiglia, hanno la capacità di trattenere molta acqua, formando un gel.

Un gel è uno stato in cui coesistono una fase dispersa ed una fase disperdente. Nel caso specifico le molecole di glicosamminoglicani (fase dispersa) formano una sorta di reticolo tra le cui maglie è contenuta acqua (fase disperdente).

A livello del derma, questo gel occupa la maggior parte dello spazio extracellulare ed è responsabile del turgore cutaneo. I glicosamminoglicani sono molecole piuttosto rigide che non si ripiegano, di conseguenza assumono conformazioni piuttosto distese (dette a spire casuali) e occupano un volume esagerato rispetto alla loro massa.

Nel derma tutti i glicosamminoglicani presenti, eccetto l'acido ialuronico, si legano in gran numero ad un'unica proteina filamentosa (del nocciolo o core proteico), formando i proteoglicani.

Moltissimi proteoglicani si legano su un core di acido ialuronico formando aggregati di enormi dimensioni:

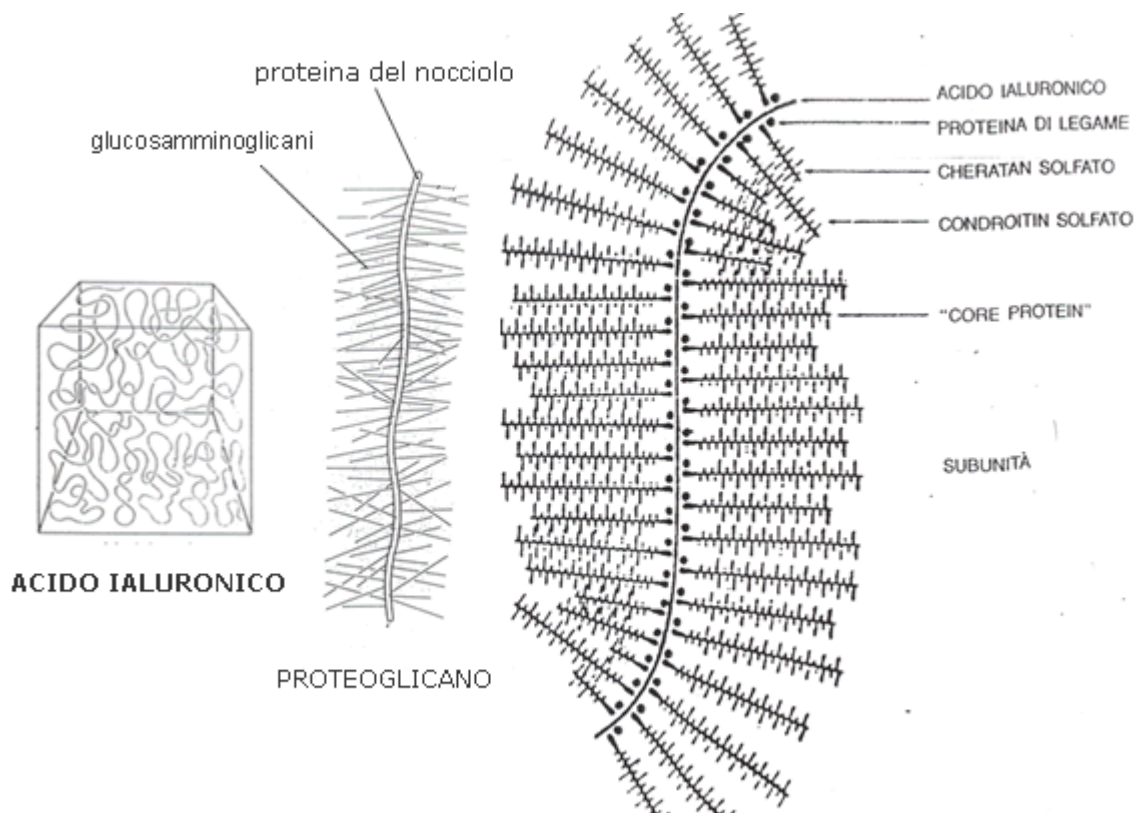


Figura 2 Sostanza fondamentale costituente il derma

2.2 Ingegnerizzazione del Derma *in vitro*

Il derma svolge diversi ruoli biologici e funzionali nella pelle. I più importanti dei quali sono:

- 1) supporto meccanico per le cellule coinvolte nella formazione della struttura della pelle;
- 2) la capacità di provvedere all'elasticità della pelle e alla resistenza a trazione;
- 3) funziona come un' ancora per le ghiandole epiteliali e per le strutture appendici dei cheratinociti della pelle (come capelli e unghie).

Inoltre durante la cicatrizzazione della pelle, la presenza del derma supporta più velocemente la ripitelizzazione, inibisce la contrazione della ferita, e migliora il risultato estetico [2,3,4]. La chiusura di una ferita con sostituti della pelle contenenti derma è limitata. Se non vengono usati lembi di pelle, sostituti dermici artificiali o derma allogenico, bisogna dipendere da innesti fatti di epidermide e un po' di derma (Split thickness skin graft **STSGs**). Il posizionamento dell' *STGS* specialmente nel caso di ferite spesse dà risultati poco funzionali e antiestetici caratterizzati da un disegno a maglia della pelle, spesso accoppiato con eccessiva cicatrizzazione del tessuto, povera conformità con la pelle, contrazione e prolungata, ripetuta rottura dell'area della ferita ripitelizzata. Per superare questi problemi, molti ricercatori si sono focalizzati sulla sostituzione del derma attraverso lo sviluppo di sostituti dermici spesso chiamati "pelle artificiale". Un altro metodo riportato che ha dato risultati incoraggianti nel trattamento dei difetti della pelle è l'utilizzo di un gel di fibrina sotto la sospensione di cheratinociti [2,5].

Sebbene gli *STSGs* rimangano il trattamento standard per molte condizioni cliniche, essi non sempre sono disponibili in sufficiente quantità, facendo nascere quindi l'esigenza clinica di tessuti ingegnerizzati alternativi.

Prodotti commerciali stanno cominciando ad emergere per incontrare questo bisogno, ma ci sono ancora considerevoli sfide da incontrare. Quando i cheratociti sono rilasciati ad ustioni profonde, il problema chiave risulta essere la stabilità di adesione dei cheratinociti al derma sottostante.

E' molto difficile, infatti, per queste cellule, attaccarsi bene a meno che il letto della ferita non sia stato ben preparato per ottenere un derma vascolarizzato o un derma equivalente. Un migliore approccio è sintetizzare una pelle ricostruita in laboratorio nel quale l'attaccamento tra cheratinociti e derma può essere assicurato [1] (fig. 3.)

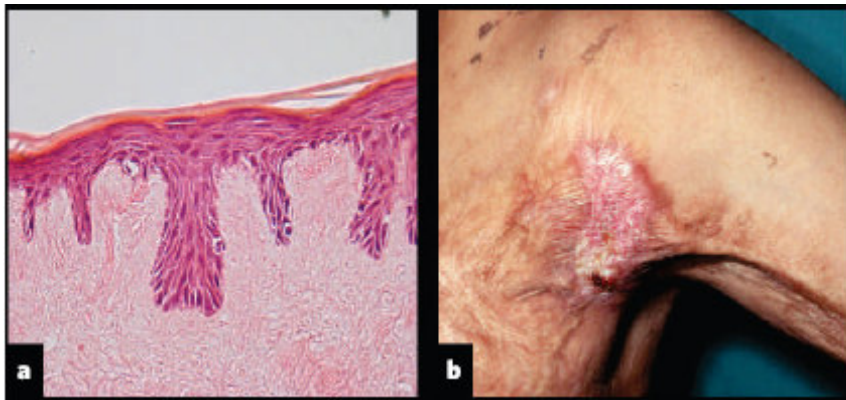


Figura 3 : un esempio dell'uso clinico della pelle ingegnerizzata. **a)** come appare pelle umana ingegnerizzata basata su derma acellulare de-epidermizzato al quale sono stati aggiunti i cheratinociti stesso del paziente espansi in laboratorio e i fibroblasti. **b)** aspetto di questa pelle ricostruita 2 mesi dopo il suo utilizzo in chirurgia per correggere la contrazione in un paziente che aveva sofferto per severe contrazioni della pelle come primo risultato di un ustione. L'innesto di pelle ingegnerizzata era posto nell'ascella per permettere i movimenti al paziente [1,6].

Anche l'angiogenesi può essere un problema. Lo spessore massimo del materiale sostitutivo della pelle che può facilmente essere vascolarizzato è 0.4mm, e non prendere questo problema in considerazione quando si usa un' alloderma umano basato sulla pelle ricostruita potrebbe risultare in un ritardo dell'angiogenesi e quindi nel fallimento dell'innesto [1,6].

In innesti più spessi di 0.4mm i vasi sanguigni non possono penetrare facilmente abbastanza da nutrire lo strato epidermico.

Quindi la pelle ricostruita se posizionata sul grasso o su una ferita poco vascolarizzata fallirà.

Il gruppo di Boyce ha trovato che la pelle equivalente più affidabile è ottenuta se il letto della ferita è pretrattato con un prodotto denominato Integra [7] per ottenere una buona vascolarizzazione del derma prima dell'innesto [8].

In ogni caso anche dopo il ripristino con successo della funzione di barriera (obiettivo immediato del trattamento di un'ustione) l'aspetto estetico è lontano da quello ideale, per esempio la contrazione dell'innesto [6] e la pigmentazione anormale [9,10].

I clinici e i ricercatori potrebbero considerare la cicatrizzazione della ferita e il recupero della funzione di barriera con piena mobilità essere un grande risultato, e l' anormale pigmentazione e la contrazione essere un problema di minore importanza.

Per il paziente questi problemi sono comunque importanti e quindi molto ancora deve essere fatto per migliorare la qualità del prodotto finale.

Qualsiasi pelle 3D ricostruita necessita di uno scaffold che funga da derma. Lo sviluppo di biomateriali per uso clinico è un campo che si sta espandendo rapidamente.

La crescente comprensione della struttura e della composizione del derma ha guidato lo sviluppo di sostituti dermali. La struttura, comunque, è solo una delle proprietà del materiale richieste. Per essere clinicamente applicabile il derma bioingegnerizzato dovrebbe essere flessibile, emocompatibile, minimamente immunogenico, eventualmente degradabile, e deve minimizzare la perdita di fluidi e ridurre la contrazione e la cicatrizzazione [2].

Inoltre dovrebbe essere riparabile, prontamente disponibile e capace di essere preparato e conservato a lunga durata.

Attualmente sono in uso sia materiali naturali (come collagene bovino approvato dal FDA o acido ialuronico, o matrici porcine o umane naturali acellulari) e scaffold sintetici biodegradabili approvati dal FDA (come i polilattici usati nelle suture dissolvibili e i relativi polimeri).

2.2.1 Derma artificiale

I sostituti dermali da soli non sarebbero utili senza l'epidermide, in quanto il derma artificiale non induce la crescita dei cheratinociti [11,12].

Pertanto per ottenere innesti di pelle funzionali lo sviluppo di sostituti dermali ed epidermici deve andare di pari passo. In accordo con la sequenza di applicazione di epidermide e/o derma alcuni autori distinguono tra modelli cherato-dermali che applicano sia sostituti dermici che cheratinociti in una volta sola e modelli a 2 stage che applicano una copertura di cheratinociti dopo che il sostituto dermico è stato posizionato. Il modello a due stage è probabilmente quello più comune.

2.2.1.1 Materiali composti di collagene e glicosamminoglicani

I primi impianti composti erano costituiti da colture *in vitro* di cheratinociti dispersi su un lattice di collagene contratto dai fibroblasti [13]. In seguito si sono ottenuti equivalenti del derma dalla semina di fibroblasti in varie matrici sintetiche. Yannas e Burke [11,12] hanno messo a punto il sofisticato modello a 2 stage. La loro pelle artificiale ha uno strato superficiale superiore di un elastomero siliconico e uno strato

inferiore di un network poroso di collagene crosslinkato e glicosamminoglicani. Il fondamento logico dell'utilizzo di un elastomero siliconico come superficie superiore è per il controllo dell'ingresso di batteri e per l'evaporazione dell'acqua, e per fornire un supporto meccanico addizionale. Lo strato inferiore è progettato per assicurare rapida aderenza alla ferita. La porosità ottimale di questo equivalente dermico permette la sua lenta biodegradazione e l'induzione della crescita interna cellulare e vascolare che eventualmente andrà a sostituire la matrice dermica con neo derma [14,15].

Varie settimane dopo, quando la crescita interna fibrovascolare dell'analogo del derma è avvenuta, lo strato di silicone epidermico deve essere rimosso in sala operatoria e la ferita chiusa con un sottile strato di pelle autologa. Una prima modifica è stata quella di seminare lo strato inferiore con un piccolo numero di cheratinociti basali autologhi prima dell'innesto. Queste cellule formavano nuova epidermide dopo l'innesto mentre le cellule staminali provenienti dal letto della ferita sintetizzavano nuovo tessuto dermico [16].

In sperimentazioni cliniche, ferite trattate con derma artificiale sono state paragonate a ferite trattate con STSGs, allograft, xenograft, o rivestimenti sintetici.

Il derma artificiale era suturato in loco e seguendo la crescita vascolare interna, che avveniva di solito in 14 giorni, era impiantato con l'epidermide producendo un innesto traslucido, con la minima adesione del derma [17].

Di seguito sono riportati i maggiori vantaggi di questa pelle artificiale con sottile innesto epiteliale comparata con gli STSG e gli allograft:

- 1) La pelle artificiale dà un migliore aspetto alla ferita rispetto agli STSG autologhi.
- 2) Comparati con gli allograft la pelle artificiale è più facile da usare, ha una buona "presa" e non corre il rischio di infezione virale, non rigetta e non ha bisogno di essere rimossa.
- 3) I siti del donatore per gli innesti sottili di epitelio guariscono più velocemente dei siti per STGS.

I principali svantaggi della pelle artificiale, come gli stessi autori hanno riportato sono:

- 1) Il derma artificiale ha meno presa che gli autograft
- 2) L'infezione che si sviluppa sotto il derma artificiale non è evidente fino a quando essa non è completamente diffusa.

Una modifica meno antigenica di questa pelle artificiale bi-strato, composta di una superficie più esterna di silicone e uno strato più interno spugnoso di collagene e

condroitin solfato è stata usata in 10 pazienti per l'innesto in difetti della pelle dopo la rimozione di nevus o emangioma, per coprire l'area ustionata o i lembi di pelle del donatore [18].

Boyce e Hansbrough (1988) hanno utilizzato membrane di collagene e condroitin solfato dermale sia immerse nel mezzo che elevate all'interfaccia aria-liquido su supporti di acciaio. I cheratinociti umani erano poi inoculati sulle membrane. Dopo 5-11 giorni di incubazione erano fissati e osservati al microscopio. I migliori risultati in termini di adesione dei cheratinociti, di mitosi, e di copertura delle membrane erano ottenuti con i cheratinociti subconfluenti seminati in una matrice sommersa.

Hansbrough e i suoi collaboratori successivamente hanno modificato innesti composti di cheratinociti coltivati adesi ad un substrato impiantabile di C-GAG seminato anticipatamente con i fibroblasti dermali [19].

I fibroblasti e i cheratinociti erano isolati enzimaticamente e poi posti in tessuti di coltura paralleli. Dopo 2 settimane di espansione in coltura, i fibroblasti erano posizionati sul lato aperto della membrana di collagene e GAG. Due giorni dopo, l'innesto era girato, e i cheratinociti erano posti sui lati laminati opposti del collagene-GAG che era tenuto in coltura per ulteriori 4 giorni per permettere l'adesione, l'espansione e la differenziazione delle cellule. Il materiale composito aveva discreti comportamenti dermici ed epidermici, con l'intero spessore paragonabile con quello degli innesti dell'STSG. Questa preparazione è stata pertanto applicata ai pazienti gravemente ustionati. Anche se 4 dei 13 innesti impiantati hanno fallito, probabilmente a causa di infezioni sottostanti, i risultati istologici e quelli al microscopio elettronico rilevavano la formazione di fibrille ancoranti, membrane basali e emidesmosomi negli innesti sopravvissuti. Successivi esperimenti in ratti hanno caratterizzato la preparazione di questa pelle artificiale.

Nel modello animale gli innesti di C-GAG contenenti cheratinociti, melanociti e fibroblasti possono rigenerare un'epidermide che inibisce la contrazione della ferita e re-pigmenta nel tempo [20,21,22]. Studi che comparavano il riparo di una ferita spessa con innesti di pelle costituiti da collagene e GAG appariva essere superiore ai fogli di epidermide nella velocità di presa, sebbene, diversamente dai fogli epidermali in studi nel breve periodo (massimo 42 giorni), innesti di pelle composita formavano buone giunzioni dermo-epidermali [23]. Studi dettagliati sequenziali per tre mesi in tre pazienti mostravano una buona incorporazione della matrice nella ferita, con una ben

formata membrana basale, fibrille di ancoraggio dall'apparenza normale, e l'espressione di antigeni della pelle [22].

Cosa succede alla matrice e alle cellule innestate *in vivo*? Un gruppo di ricercatori francesi ha trovato un modo elegante di rispondere alla domanda. Matrici di collagene bovino erano seminate con cellule umane ed innestate in ratti. Marcando le cellule bovine, umane e del ratto e le matrici extracellulari con anticorpi specifici, gli autori sarebbero riusciti a distinguere le origini dei componenti dell'innesto. Il lavoro ha portato ad interessanti conclusioni:

- 1) Quando i fibroblasti sono presenti nella pelle innestata sopravvivono e sintetizzano la loro stessa matrice.
- 2) Quando la pelle innestata contiene un substrato dermale acellulare esso è completamente invaso dalle cellule ospiti che lo rimodellano.
- 3) La presenza dei fibroblasti in un sostituto dermale sintetico inibisce la crescita interna delle stesse cellule ospiti [24].

Numerose sostanze bioattive sono state sviluppate e aggiunte al derma bioingegnerizzato e i benefici da loro apportati al riparo delle ferite sono stati sostenuti. L'acido ialuronico ad esempio potrebbe essere un buon esempio di risultati di ricerca controversi. Usando la pelle artificiale immersa in acido ialuronico 0.3% per tre giorni prima dell'innesto nel ratto, Murashita et al. [25] hanno riportato una migliorata crescita interna di capillari rispetto ai controlli. Lo stesso anno, un altro gruppo di ricercatori ha riportato l'effetto negativo dell'acido ialuronico sulla riepitelizzazione di una ferita [26].

2.2.1.2 Poliglicoli e Poliglattina

Una chiara differenza è stata osservata tra la presa del derma C-GAG nel riparo delle ustioni animali e umane del 90% e del 50% rispettivamente. La disparità appare essere dovuta alla rapida divisione enzimatica del C-GAG nelle ferite cliniche, seguita dalla distruzione dell'impianto in 3 o 4 giorni.

Materiali alternativi come ma+trici riassorbibili, quali acidi poliglicolici usati nelle suture riassorbibili sono più resistenti alla degradazione enzimatica e ritardano la dissoluzione idrolitica per 15 giorni. Una maggiore crescita fibrovascolare è perciò possibile prima dell'assorbimento [27]. Uno dei sostituti dermali commercialmente disponibili è Dermagraft (Advanced Tissue Sciences, La Jolla, CA, USA).

Esso è composto di acido polilattico contenente fibroblasti neonati del prepuzio ed è stata utilizzata in 17 pazienti ustionati. La presa del Dermagraft era minore di quella delle maglie di STSG sul sito di controllo, ma le differenze non erano significative. Nessun rigetto dei fibroblasti allogenici e la formazione di piccole risposte infiammatorie alle fibre del materiale e alla base della membrana erano osservate. La formazione di fibre elastiche era osservata dopo 1 anno [28].

L'anno successivo, lo stesso gruppo ha introdotto una nuova modifica di questo innesto dermo-epidermale [29]. Maglie di acido poliglicolico erano seminate con fibroblasti umani e coperte da cheratinociti umani coltivati. Solo la metà degli innesti avevano successo nei ratti dopo 20 giorni, ma una ridotta contrazione della ferita era osservata.

2.2.1.3 Altri materiali

Tra gli altri materiali testati ci sono il PLLA, e il PEO/PBT, un copolimero biodegradabile [30], ed una matrice artificiale contenente un peptide di arginina glicina dell'acido aspartico [31]. Una più veloce riepitelizzazione delle ferite è stata osservata ma ulteriori studi di conferma sono necessari. Alcuni risultati sull'utilizzo del derma bioingegnerizzato *in vitro* sono stati incoraggianti, ma nel complesso essi sono stati deludenti. Nessun tipo di materiale è pienamente soddisfacente o chiaramente superiore agli altri. L'infezione dell'impianto con successivo fallimento è probabilmente la maggiore limitazione e pertanto richiede successivi esperimenti. Alcuni dati ottenuti da test con suture di PGA/PGL mostrano un'inibizione della crescita batterica, probabilmente dovuta al cambiamento nel pH della ferita durante la loro degradazione idrolitica [32,33].

Recenti esperienze mostrano che la presenza dei fibroblasti aiuta l'espansione e l'organizzazione dei cheratinociti in matrici 3D di polistirene ottenute con l'elettrospinning [34] (fig. 4).

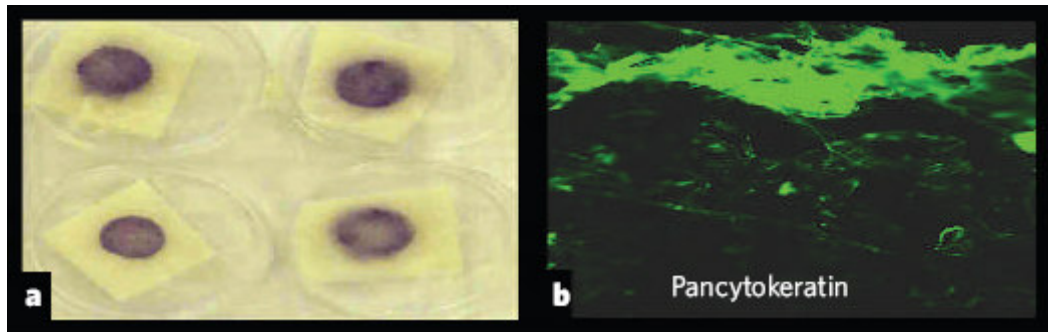


Fig. 4: ricostruzione della pelle ingegnerizzata usando uno scaffold sintetico.

E' mostrata la ricostruzione di un pelle ingegnerizzata 3D per scopi *in vitro* uno scaffold di polistirene ottenuto con l'elettrospinning. Lo scaffold di polistirene contiene fibre di circa 10µm di spessore e aveva una frazione di impacchettamento di 0.1. **a)** la presenza delle cellule della pelle (cheratinociti, fibroblasti, e cellule endoteliali) coltivate in scaffold per 10 giorni e la cui vitalità è stata valutata con l'MTT. **b)** una sezione trasversale di questo scaffold, che è stata seminata con cheratinociti, fibroblasti e cellule endoteliali, nei quali i cheratinociti sono stati specificamente identificati da immunostaining con pancitocheratina.

2.2.1 Derma allogenico e Derma allogenico acellulare

Gli allograft dermali raccolti da donatori viventi o cadaveri sono un altro possibile sostituto del derma. Diversamente dalle cellule allogeniche epidermiche, gli allograft del derma appaiono essere trapiantabili senza rigetto significativo dovuto alla bassa immunogenicità dei componenti dermali [35].

Se avviene il rigetto è diretto principalmente contro le cellule endoteliali del derma [36]. Molti autori hanno descritto le loro esperienze con questo sostituto dermico. La maggior parte dei reports riguarda ferite da ustioni trattate con allograft della pelle split o full.

Successivamente, l'epidermide è abrasa dal derma lasciando le componenti dermali come un letto vitale per i cheratinociti umani liberi, le cellule epidermali individuali coltivate, o fogli di cellule [37,38,39].

L'uso di derma de-epidermizzato e de-cellularizzato (fig. 5), inoltre, diminuisce l'immunogenicità dell'allograft. Il derma acellulare, allogenico preparato in questo modo ritiene l'architettura strutturale della matrice dermale rimanente. La sua applicazione alle ferite spesse nei maiali [41] o nei ratti [42] rivelava che esso potrebbe supportare la crescita interna dei fibroblasti, la neovascolarizzazione, e la migrazione dei cheratinociti dall'STSG o dai cheratinociti coltivati.

Gli autograft epiteliali coltivati (CEA) da soli erano comparati con i CEA e con il derma allograftato nei pazienti con ustioni. Il CEA innestato all' alloderma esibiva una presa affidabile (95%) e una buona curabilità.

Risultati clinici nel lungo periodo con derma acellulare allograftato sono stati pubblicati da Wainwright et al. [43]. In 67 pazienti, la presa dell'innesto e i risultati istologici erano comparabili con quelli degli STSG.

2.3 Utilizzi della pelle ingegnerizzata

In aggiunta agli usi clinici della pelle ingegnerizzata ci sono molte applicazioni di ricerca non cliniche per la pelle ricostruita specialmente il modello in 3D. La pelle ingegnerizzata attualmente sta acquistando valore in diversi aspetti della ricerca: come utile alternativa alla pelle naturale dando così la possibilità di ridurre la sperimentazione animale, nell'indagine sull'interazione cellula-cellula, cellula-matrice, nella penetrazione della barriera della pelle, nella cicatrizzazione delle ferite, nell'angiogenesi, nella regolazione della pigmentazione (fig. 5a,5b), nella contrazione della pelle (fig. 5d) e nell'indagine delle malattie della pelle come il melanoma (fig. 5c) e la psoriasi.

Nei prossimi anni si vedrà un crescente utilizzo dei modelli 3D nei quali sono possibili le interazioni fisiologiche tra le diverse cellule della pelle che non possono, invece, avvenire nelle colture standard in monostrato.

Molto della conoscenza attuale è basata sulle colture 2D e questo necessita di essere rivalidato.

Per l'uso in 3D, i criteri di progettazione per gli scaffold 3D sono meno eccitanti che per l'uso *in vivo*. Gli scaffold dovrebbero essere fatti apposta per lo scopo di permettere alle cellule della pelle di formare un epitelio, di comunicare con ciascun altra e di mimare al meglio la risposta delle cellule della pelle normale quando esposte ad una gamma di agenti biologici.

Per esempio per gli studi di tossicità *in vitro* scaffold fatti di materiale non biodegradabile potrebbero essere adeguati. Questi scaffold mancano di qualsiasi funzione vascolare o di sistema immunitario, pertanto non possono essere usati come sostituto completo per gli studi animali e umani *in vivo*, ma essi hanno un significativo vantaggio nella capacità di aggiungere o cancellare i differenti tipi cellulari per valutare all'aspetto della biologia della pelle sotto indagine.

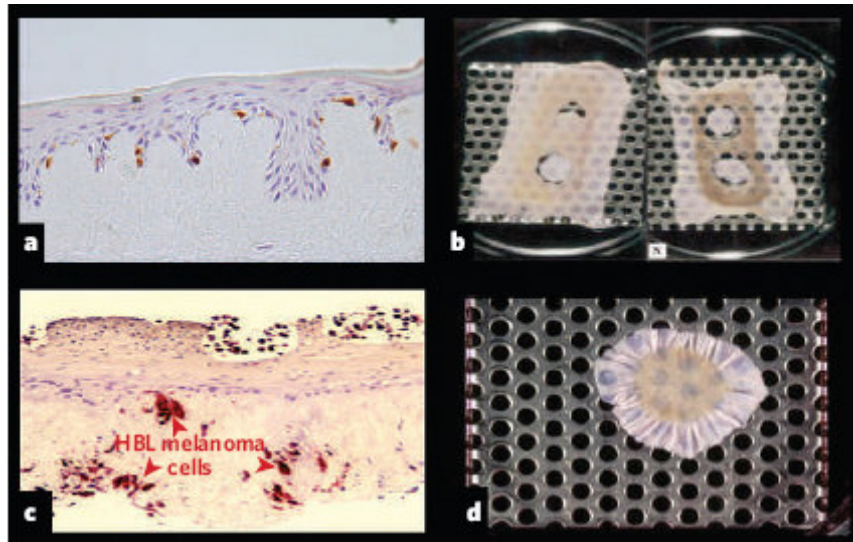


Figura 5: Pelle umana ricostruita utilizzando derma acellulare de-epidermizzato.

a) Studi della pigmentazione della pelle, i melanociti erano aggiunti alla pelle ricostruita contenente cheratinociti e fibroblasti, coltivati per 10 giorni e poi sezionati e colorati con ematossilina/eosina per evidenziarne la loro morfologia generale. I melanociti sono evidenziati da immunohistochemica per S100, e sono distribuiti nello strato di base dei cheratinociti. In questo studio, i cheratinociti hanno formato un epitelio ben attaccato con getti simili alle unghie nel derma conosciuto come sporgenza a rete. **b)** indagine del contributo dei fibroblasti alla pigmentazione della pelle. Il rapporto melanociti/cheratinociti era di 5/95. I fibroblasti erano inoculati nel modello mano sinistra e omessi dal modello mano destra. I modelli di pelle ricostruita erano coltivati per 10 giorni, con due dischi di 8mm di diametro e rimossi dopo 5 giorni e sostituiti con materiale senza melanociti addizionali per confronto. Come si può vedere l'omissione dei fibroblasti porta alla spontanea pigmentazione in questo modello di pelle ricostruita. **c)** Per studiare l'invasione del melanoma, la linea cellulare di melanoma umano era aggiunta alla pelle umana ricostruita contenente cheratinociti e fibroblasti, e un sezione di questa pelle ricostruita era colorata con ematossilina/eosina per osservarne la morfologia. Le cellule del melanoma erano specificamente identificate attraverso colorazione con l'anticorpo HMB-45 usando il colore rosso (freccie). La penetrazione delle cellule del melanoma attraverso l'epidermide nel derma possono essere viste chiaramente. **d)** Dimostrazione dell'uso di questo modello per studiare la contrazione degli innesti della pelle. Il derma umano acellulare de-epidermizzato, al quale solo i cheratinociti erano stati aggiunti in un interfaccia aria-liquido per 10 giorni. L'abilità dei cheratinociti a riunirsi nel derma sottostante è evidente.

Bibliografia

1. Sheila MacNeil (2007) **Progress and Opportunities for Tissue-engineered skin.** Nature Vol 445; 874-880
2. B. Pomahac T. Svensio F. Yao H. Brown E. Eriksson* (1998). **Tissue Engineering of the skin.** Crit. Rev. Oral. Med. 9 (3) 333-344
3. Kangesu T, Navsaria HA, Manek S, Fryer PR, Leigh IM, Green C) (1993a). **Kerato-dermal grafts: The importance of dermis for the in vivo growth of cultured keratinocytes.** Br I Plast Surg 46:401-409.
4. Navsaria HA, Kangesu T, Manek S, Green CI, Leigh IM (1994). **An animal model to study the significance of dermis for grafting cultured keratinocytes on full thickness wounds.** Burns 20(Suppl 1):S57-S60.
5. Hafemann B, Hettich R, Ensslen S, Kowol B, Zuhlke A, Ebert R, et al. (1994). **Treatment of skin defects using suspensions of in vitro cultured keratinocytes.** Burns 20:168-172.
6. Sahota, P. S. et al. **Development of a reconstructed human skin model for angiogenesis.** Wound Repair Regen. 11, 275–284 (2003).
7. Stern, R., McPherson, M. & Longaker, M. T. **Histologic study of artificial skin used in the treatment of full thickness thermal injury.** J. Burn Care Rehabil. 11, 7–13 (1990).
8. Boyce, S. T. et al. **Comparative assessment of cultured skin substitutes and native skin autograft for treatment of full-thickness burns.** Ann. Surg. 222, 743–752 (1995).
9. Medalie, D. A. et al. **Differences in dermal analogs influence subsequent pigmentation, epidermal differentiation, basement membrane and rete ridge formation of transplanted composite skin grafts.** Transplantation 64, 454–465 (1997).
10. Swope, V. B., Supp, A. P., Schwemberger, S., Babcock, G. & Boyce, S. **Increased expression of integrins and decreased apoptosis correlate with increased melanocyte retention in cultured skin substitutes.** Pigment Cell Res. 19, 424–433 (2006).
11. Yannas IV, Burke IF (1980 a). **Design of an artificial skin. I. Basic design principles.** I Biomed Mater Res 14:65-81.
12. Yannas IV, Burke IF (1980 b). **Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition.** I Biomed Mater Res 14:107-131.

13. Bell E, Ivarsson B, Merrill C (1979). **Production of a tissue like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro.** Proc Natl Acad Sci USA 76:1274-1278.
14. Burke IF, Yannas IC, Quinby WC Jr, Bondoc CC, Jung WK (1981). **Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury.** Ann Surg 194:413-428.
15. Yannas IV, Hansbrough JF, Ehrlich HP (1984). **What criteria should be used for designing artificial skin replacements and how well do the current grafting materials meet these criteria?** I Trauma 24(9 Suppl) :S29-S39.
16. Yannas IV, Burke JF, Orgill DP, Skrabut EM (1982). **Wound tissue can utilize a polymeric template to synthesize a functional extension of skin.** Science 215:174-176.
17. Heimbach D, Luterman A, Burke 1, Cram A, Herndon D, Hunt J, et al. (1988). **Artificial dermis for major burns; a multi-center randomized clinical trial.** Ann Surg 208:313-320.
18. Suzuki S, Matsuda K, Isshiki N, Tamada Y, Yoshioka K, Ikada Y (1990). **Clinical evaluation of a new bilayer "artificial skin" composed of collagen sponge and silicone layer.** Br J Plast Surg 43:47-54.
19. Hansbrough IF, Boyce ST, Cooper ML, Foreman TL (1989). **Burn wound closure with cultured autologous keratinocytes and fibroblasts attached to a collagen-glycosaminoglycan substrate.** I Am Med Assoc 262:2125- 2130.
20. Harriger MD, Warden GD, Greenhalgh DG, Kagan RJ, Boyce ST (1995). **Pigmentation and microanatomy of skin regenerated from composite grafts of cultured cells and biopolymers applied to full-thickness burn wounds.** Transplantation 59:702-707.
21. Boyce ST, Medrano EE, Abdel-Malek Z, Supp AP, Dodick JM, Nordlund II, et al. (1993a). **Pigmentation and inhibition of wound contraction by cultured skin substitutes with adult melanocytes after transplantation to athymic mice.** J Invest Dermatol 100:360-365.
22. Boyce ST, Greenhalgh DG, Kagan RI, Housinger T, Sorell JM, Childress CP, et al. (1993b). **Skin anatomy and antigen expression after burn wound closure with composite grafts of cultured skin cells and biopolymers.** Plast Reconstr Surg 91:632-641.
23. Cooper ML, Andree C, Hansbrough JF, Zapata-Sirvent LR, Spielvogel RL (1993). **Direct comparison of a cultured composite skin substitute containing human keratinocytes and fibroblasts to an epidermal sheet graft containing human keratinocytes on athymic mice.** I Invest Dermatol 101:811-819.
24. Demarchez M, Hartmann DJ, Regnier M, Asselineau D (1992). **The role of fibroblasts in dermal vascularization and remodelling of reconstructed**

- human skin after transplantation onto the nude mouse.** Transplantation 54:317-326.
25. Murashita T, Nakayama Y, Hirano T, Ohashi S (1996). **Acceleration of granulation tissue ingrowth by hyaluronic acid in artificial skin.** Br J Plast Surg 49:58-63.
26. Bettinger DA, Mast B, Gore D (1996). **Hyaluronic acid impedes reepithelialization of skin graft donor sites.** J Burn Care Rehabil 17:302-304.
27. Cooper ML, Hansbrough JF (1991). **Use of a composite skin graft composed of cultured human keratinocytes and fibroblasts and a collagen-GAG matrix to cover full-thickness wounds on athymic mice.** Surgery 109:198-207.
28. Hansbrough JF, Dore C, Hansbrough WB (1992). **Clinical trials of a living dermal tissue replacement placed beneath meshed split-thickness skin grafts on excised burn wounds.** J Burn Care Rehabil 13:519-529.
29. Hansbrough JF, Morgan IL, Greenleaf GE, Bartel R (1993). **Composite grafts of human keratinocytes grown on a polyglactin mesh-cultured fibroblast dermal substitute function as a bilayer skin replacement in fullthickness wounds on athymic mice.** J Burn Care Rehabil 14:485-494.
30. Beumer GI, van Blitterswijk CA, Bakker D, Ponc M (1993). **Cell-seeding and in vitro biocompatibility evaluation of polymeric matrices of PEO/PBT copolymers and PLLA.** Biomaterials 14:598-604.
31. Mertz PM, Davis SC, Franzen L, Uchima FD, Pickett MP, Pierschbacher MD, et al. (1996). **Effects of an arginine-glycine-aspartic acid peptide-containing artificial matrix on epithelial migration in vitro and experimental second-degree burn wound healing in vivo.** J Burn Care Rehabil 17:199-206.
32. Lilly GE, Cutcher IL, Iones IC, Armstrong JH (1972). **Reaction of oral tissues to suture material.** IV. Oral Surg 33:152-157.
33. Edlich RF, Panek PH, Rodeheaver GT, Turnbull VG, Kurtz LD, Edgerton MT (1973). **Physical and chemical configuration of sutures in the development of surgical infection.** Ann Surg 177:679-688.
34. Sun, T. et al. **Self-organisation of skin cells in three-dimensional electrospun polystyrene scaffolds.** Tissue Eng. 11, 1023-1033 (2005).
35. Gibson T, Medawar PB (1943). **The fate of skin homografts in man.** I Anat 77:299-310.
36. Sedmak DD, Orosz CG (1991). **The role of vascular endothelial cells in transplantation.** Arch Pathol Lab Med 115:260-265.

37. Heck EL, Bergstrasser PR, Baxter CR (1985). **Composite skin graft: Frozen dermal allografts support the engraftment and expansion of autologous epidermis.** J Trauma 25:106-112.
38. Cuono C, Langdon R, McGuire J (1986). **Use of cultured autografts and dermal allografts as skin replacement after burn injury.** Lancet 1:1123-1124.
39. Hickerson WL, Compton C, Fletchall S, Smith LR (1994). **Cultured epidermal autografts and allodermis combination for permanent wound coverage.** Burns 20 (Suppl 1):S52-S55.
40. Langdon R, Cuono C, Birchall N, Madri JA, Kuklinska E, McGuire J, et al. (1988). **Reconstitution of structure and cell function in human skin grafts derived from cryopreserved allogenic dermis and autologous cultured keratinocytes.** J Invest Dermatol 91:478-485.
41. Livesey SA, Herndon DN, Hollyoak MA, Atkinson YH, Nag A (1995). **Transplanted acellular allograft dermal matrix.** Transplantation 60:1-9.
42. Medalie DA, Eming SA, Tompkins RG, Yarmush ML, Krueger GG, Morgan JR (1996). **Evaluation of human skin reconstituted from composite grafts of cultured keratinocytes and human acellular dermis transplanted to athymic mice. I** Invest Dermatol 107:121-127.
43. Wainwright D, Madden M, Luterman A, Hunt J, Monafó W, Heimbach D, et al. (1996). **Clinical evaluation of an acellular allograft dermal matrix in full-thickness burns.** J Burn Care Rehabil 17:124-136.

Capitolo 3

Formazione e caratterizzazione di precursori di tessuto micrometrici (μ TPs)

3.1 Introduzione

Come già spiegato nell'introduzione alla tesi il processo per la produzione *in vitro* di costrutti tessutali 3D, sviluppato in questo lavoro di dottorato di ricerca, si divide in due stadi:

- La semina dinamica di fibroblasti su microsferi di gelatina per la produzione di *precursori micrometrici di tessuto (μ TPs)*.
- L'assemblaggio dei precursori micrometrici di tessuto in un costrutto 3D di forma predefinita

In figura 1 è riportata una rappresentazione schematica del processo

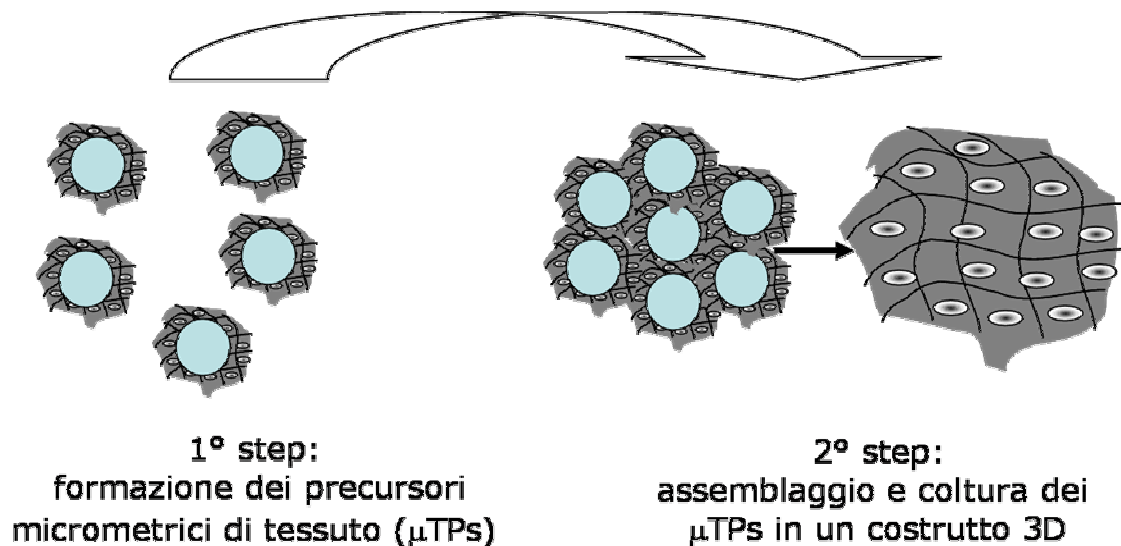


Figura 1: rappresentazione schematica del processo a due step

In questo capitolo verranno descritti i materiali, i metodi e i risultati ottenuti riguardanti la prima fase del processo, ovvero la formazione dei precursori micrometrici di tessuto.

3.2 Materiali

3.2.1 Gelatina

La gelatina è una proteina ottenuta mediante denaturazione termica o degradazione chimica o fisica del collagene. Questo processo determina la rottura della struttura a tripla elica del collagene con conseguente ottenimento di una sostanza con conformazione casuale, random coil, tipica della gelatina.

Il materiale di partenza è il tessuto connettivo di maiali, bovini, pollame o pesce. Le proteine collagene contenute nella pelle e nelle ossa dei maiali e dei bovini vengono trasformate in gelatina.

Le materie prime vengono dapprima sgrassate e demineralizzate. Successivamente si adottano due diversi metodi di pretrattamento che variano in funzione della materia prima e dello scopo d'impiego della gelatina: procedimento alcalino e procedimento acido.

Dopo il lavaggio la gelatina può essere estratta sciogliendola con acqua calda e separandola dalla restante materia prima. A questo punto le soluzioni estratte vengono purificate dalle tracce di grasso e dalle fibre fini in separatori ad alto rendimento. Appositi filtri eliminano anche le impurità più infime. Nell'ambito di un ultimo passo di depurazione la gelatina è depurata anche dal calcio, dal sodio nonché da residui acidi e da altri sali.

A questo punto la soluzione di gelatina viene concentrata in impianti di evaporazione sottovuoto e resa spessa formando una massa simile al miele che viene macinata in granelli.

Vasti controlli qualitativi nell'arco dell'intero processo di fabbricazione assicurano la qualità e la purezza della gelatina.

A seconda del tipo di pretrattamento effettuato sulle materie prime si possono ottenere due differenti tipologie di gelatina (fig. 2).

1. Type B: si ottiene mediante la denaturazione termica del collagene presente nel tessuto connettivo dei bovini.

Essendo quest'ultimo fortemente reticolato è necessario pretrattarlo per diverse settimane con soluzioni alcaline che causano l'idrolisi dei gruppi ammidici del collagene.

La gelatina ottenuta in questo modo presenta un'elevata densità di gruppi carbossilici e, quindi, sarà caricata negativamente.

Questo comporta una riduzione del suo punto isoelettrico (IEP) a circa 5, per cui si tratta di gelatina acida [1];

2. Type A: si ottiene mediante denaturazione termica del collagene presente nel tessuto connettivo della cotenna di maiale. In questo caso è applicato un trattamento di un giorno a base di acidi con successiva neutralizzazione e lavaggio intenso dei sali, prima che la gelatina possa essere estratta sciogliendola con acqua calda.

La natura elettrostatica del collagene difficilmente può essere modificata da un trattamento acido a causa di una reazione meno invasiva dei suoi gruppi ammidici.

Per questo motivo, il punto isoelettrico della gelatina di tipo A rimane simile a quello del collagene che è circa 9 [1].

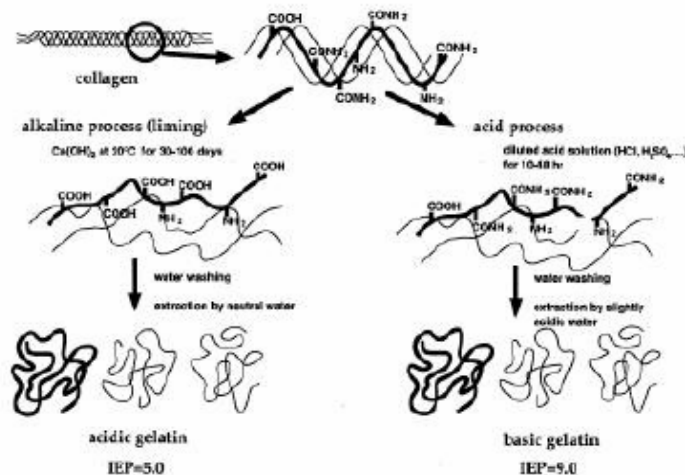


Figura 2: schematizzazione pretrattamenti acidi e basici del collagene

3.2.2 Microbiglie di gelatina commerciali

Per gli esperimenti sono state utilizzate microbiglie di gelatina porose commerciali (CultiSpher G, Percell Biolitica) con diametro 130-380 μm (fig. 3).

Come indicato dalle istruzioni della casa produttrice prima dell'utilizzo le microbiglie secche sono state idratate in PBS per circa un'ora a temperatura ambiente.

Successivamente senza rimuovere il PBS sono state sterilizzate in autoclave (15 min. a 121°C) e conservate a 4°C fin al momento del loro utilizzo.

Prima di essere usate il PBS è aspirato e sostituito con mezzo di coltura (Modified eagles's medium [MEM ad alta concentrazione di glucosio (4,5 g/L)], 20% heat-inactivated FBS, 100µg/ml glutamina and 100U/ml penicillina/streptomicina, 50 µg/ml acido ascorbico).

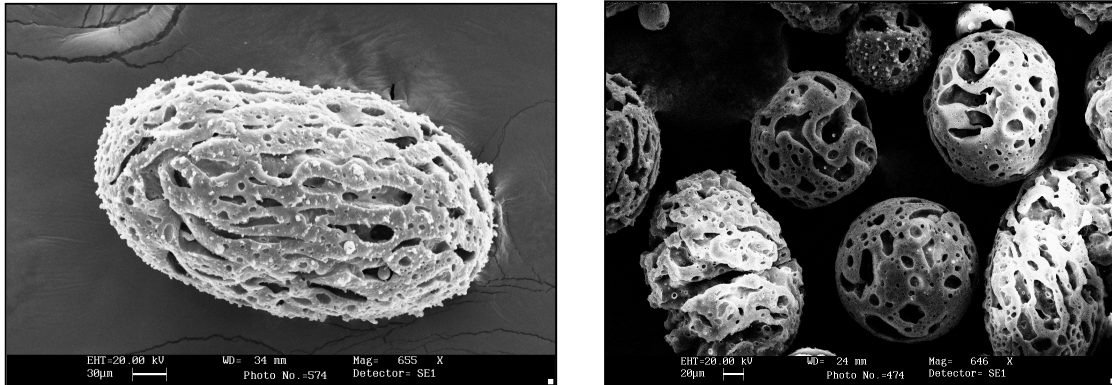


Figura 3: immagini SEM di microbiglie commerciali Percell

3.2.3 Microbiglie *home made* ottenute con il metodo della doppia emulsione

Oltre alle microbiglie commerciali per gli esperimenti sono state utilizzate microbiglie di gelatina realizzate in laboratorio con la tecnica della doppia emulsione (fig. 4).

La tipologia di gelatina utilizzata è la gelatina Tipo B Sigma Aldrich Chemical Company, Bloom 225, Mw=176654 Dalton). L'emulsione multipla O/W/O consiste in un sistema trifase in cui le goccioline di fase acquosa, contenenti una fase oleosa interna, vengono disperse in una fase oleosa esterna. Nel caso specifico, il metodo di preparazione consiste in una singola emulsione effettuata come se fosse una doppia emulsione. Inizialmente la fase oil costituita da 10 ml di toluene (Sigma Aldrich Chemical Company, 99%) con un'opportuna percentuale di surfattante, SPAN 85 (Sigma Aldrich Chemical Company), viene dispersa sotto forma di goccioline mediante agitazione magnetica nella fase acquosa contenente gelatina al 8% (w/v) e surfattante TWEEN 85 (Sigma Aldrich Chemical Company) al 6% (w/v).

All'aumentare della quantità di oil aggiunto, fino ad un volume finale di 40 ml, la fase acquosa diventerà la fase dispersa e quella oil la fase disperdente.

Successivamente il sistema viene rapidamente raffreddato mediante immersione in un bagno di ghiaccio fino alla temperatura di circa 5°C, in modo da solidificare le microsfele. La fase successiva consiste nel deidratare le microsfele mediante l'aggiunta di 60 ml di acetone preraffreddato a 5°C.

Le microsfele così ottenute vengono filtrate e lavate con acetone preraffreddato a 5°C in modo da eliminare la fase oil e determinare la formazione di pori sulla superficie e internamente alle microsfele di gelatina.

Le microsfele di gelatina ottenute vengono crosslinkate con differenti concentrazioni di agente crosslinkante (gliceraldeide) mediante agitazione magnetica a 800 rpm a 5°C per 24 h. Infine, le microsfele crosslinkate vengono filtrate e lavate con acetone preraffreddato a 5°C.

Per la sterilizzazione e il condizionamento prima di iniziare la coltura è stata eseguita la stessa procedura utilizzata per le biglie commerciali (paragrafo 2.1.2.1), per le microbiglie *home made* crosslinkate al 20% di gliceraldeide.

Per le microbiglie crosslinkate al 10% è stato utilizzato per la sterilizzazione etanolo 100% per 48h, e successivamente il condizionamento con il mezzo di coltura come riportato nel paragrafo 2.1.2.1.

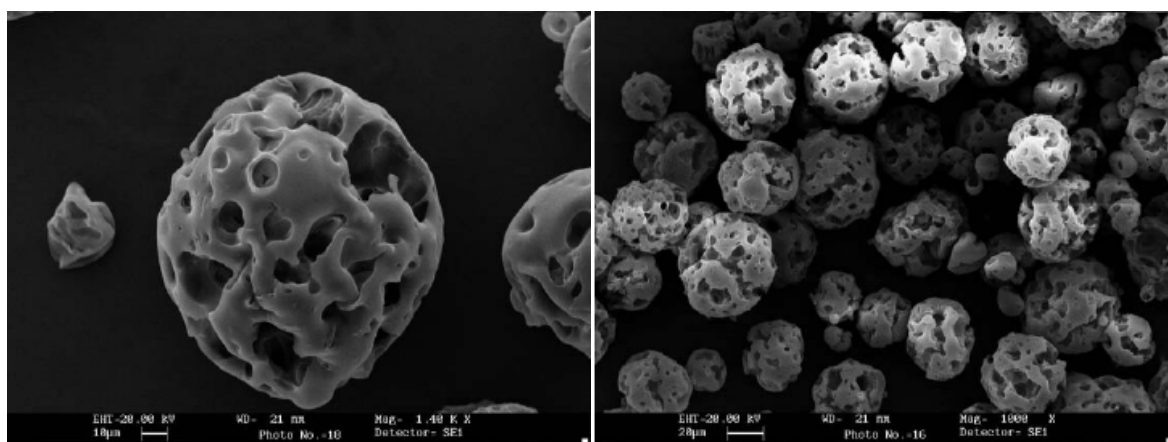


Figura 4: immagini SEM delle microbiglie di gelatina *home made*.

3.2.4 Fibroblasti bovini primari del derma

Fibroblasti bovini primari del derma (BF- AG10385 Coriell) sono stati espansi in piastre di coltura Petri dish da 150mm con una popolazione cellulare di $4.89 \times 10^3 \text{ cm}^{-2}$ a 37°C in 5% CO_2 . Il mezzo di coltura era cambiato ogni 2 giorni.

3.2.5 Sistema di coltura con Spinner flask

Il dispositivo di coltura in Spinner comprende spinner flask (500ml) con 2 bracci rotanti di vetro contenenti un magnete e un'unità con 4 piatti elettromagnetici (Integra Biosciences, Fernwald, Germania) (fig. 5) e viene posizionata nell'incubatore. L'unità è controllata da un computer che permette di regolare l'angolo di rotazione dei bracci e la velocità di rotazione.



Figura 5: Spinner flask Integra Biosciences

3.3 Metodi

3.3.1 Semina sulle microbiglie

Per verificare l'adesione dei fibroblasti alle microbiglie di gelatina e per valutare il giusto rapporto cellule/microbiglia da utilizzare nella spinner flask, prima di passare alla semina dinamica sono stati effettuati degli esperimenti preliminari in piastra utilizzando 10^5 cellule per mg di microsferi (PerCell).

Le piastre sono state incubate a 37°C su di una piastra agitante a 50 rpm. Ogni 2 giorni il mezzo di cultura veniva sostituito con del mezzo fresco.

Successivamente si è passata alla semina dinamica, per la quale le cellule sono state inoculate con le microbiglie in mezzo di coltura MEM per 4 giorni nelle spinner flask.

Le microbiglie sono state seminate con le cellule (10^5 cell/ml) in 250 ml di mezzo usando un regime di stirring intermittente (30 min at 0 rpm, 5 at 30 rpm) per le prime 6 ore di semina.

Successivamente la velocità è stata mantenuta a 30 rpm continuamente. Tutte le colture erano mantenute in incubatore a 37°C ad umidità controllata 5% CO_2 .

3.3.2 Proliferazione cellulare

Durante la semina aliquote di 1 ml sono state collezionate dalla spinner ogni giorno per contare le cellule libere presenti in sospensione e quelle aderite alle microbiglie.

Dopo aver contato le cellule libere in sospensione con un ematocimetro, è stato valutato il numero di cellule adese alla microbiglia. Per far ciò, 200 μl di aliquote dello stesso campione sono state trasferite in una piastra per coltura avente una griglia (Nunc w/2) che permette di contare le microbiglie.

Dopo la conta la sospensione è stata collezionata in un tubo Eppendorf e sciacquata con PBS.

Successivamente il PBS è sostituito con 500 μl di tripsina e messo in incubatore per 20min per dissolvere le microbiglie.

Infine è stato addizionato mezzo di coltura fino ad un volume finale di 1 ml e le cellule sono state contate con un ematocimetro.

3.3.3 Vitalità cellulare: colorazione con MTT

3-(4, 5_dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) è stato utilizzato per monitorare la vitalità cellulare sulle microbiglie.

Ad 1ml di sospensione prelevato dalla spinner flask viene aggiunto 100µl di MTT (Sigma-Aldrich) 1 mg/ml in DMEM senza rosso fenolo (Gibco-BRL).

Quindi la soluzione è incubata per 30 min a 37°C per far sì che l'MTT agisca colorando le cellule vitali. Successivamente i campioni vengono osservati e fotografati al microscopio ottico.

Principio di funzionamento dell' MTT

Il test MTT è un saggio colorimetrico quantitativo per la vitalità e proliferazione cellulare e si basa sulla riduzione enzimatica del sale di tetrazolio da parte di cellule vive e metabolicamente attive. Il sale di tetrazolio, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), viene assorbito dalle cellule e ridotto da parte dell'enzima succinato deidrogenasi che appartiene alla catena respiratoria dei mitocondri per produrre formazano.

L'abilità delle cellule di ridurre l'MTT fornisce un'indicazione dell'integrità e dell'attività mitocondriale che, di riflesso, può essere interpretata come una misura del numero delle cellule presenti nel materiale e della loro vitalità. Valutando, quindi, la concentrazione di formazano si ha un'indicazione quantitativa della vitalità cellulare. Come tutte le indagini biochimiche che fruttano reazioni enzimatiche, l'MTT è un test molto semplice, preciso e sicuro.

Agli scaffold cellularizzati dopo 72h di incubazione viene aggiunta una soluzione di MTT in DMEM al 10% che viene lasciato per 3 ore. I cristalli di formazano, impermeabili alle membrane cellulari e insolubili in acqua, vengono rilasciati utilizzando un opportuno solvente (0.1N HCl in isopropanolo).

La concentrazione di formazano in soluzione, dal colore molto acceso (porpora), può essere misurata utilizzando uno spettrofotometro (Perkin-Elmer) a 570nm.

3.3.4 Analisi delle immagini per valutare la deposizione del layer di neo-tessuto intorno alle microbiglie

Per valutare la deposizione di cellule e matrice extracellulare intorno alla microbiglie durante la coltura in spinner, è stato monitorato l'incremento della misura del diametro delle microbiglie utilizzando "image J" un programma di analisi di immagini.

Per queste analisi, le microbiglie prelevate dalle spinner a diversi giorni di coltura, e le microbiglie tal quali non seminate con le cellule, sono state fotografate con un microscopio ottico, e le fotografie sono state poi elaborate con Image J.

ImageJ è un software open source, programmato in Java, che nasce con l'obiettivo di emulare le funzionalità dei più comuni software commerciali per l'immagine processing. ImageJ consente di visualizzare, modificare, analizzare, processare, salvare e stampare immagini a 8-bit, 16-bit e 32-bit. ImageJ offre la possibilità di calcolare l'area e le statistiche sui valori dei pixel relativamente a delle regioni (ROI= Region Of Interest) selezionate dall'utente.

Le immagini acquisite mediante microscopio ottico vengono trasformate in immagini 8-bit. In seguito viene effettuato un threshold dell'immagine per ottenere un contrasto di colori in modo da poter calcolare l'area delle immagini selezionate e da questa il diametro delle microsferiche, eliminando dall'analisi dimensionale tutte le microbiglie che si trovano ai bordi dell'immagine, e che altrimenti avrebbero falsato la misura.

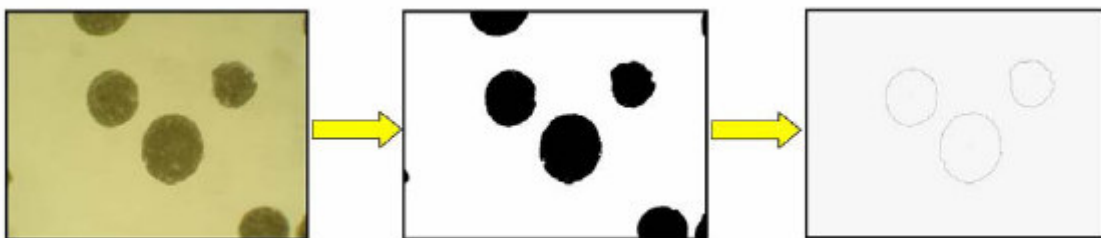


Figura 6: Processo di analisi delle microparticelle mediante programma ImageJ.

3.3.5 Analisi istologica

Per le analisi istologiche 1ml di sospensione di microbiglie seminate con fibroblasti viene prelevata dalle spinner flask è posta in un tubo Eppendorf, le microbiglie vengono fatte sedimentare e il surnatante eliminato.

Le microbiglie vengo sciacquate in PBS e poi fissate in formalina al 10% per 24h. Al fissaggio segue una disidratazione in una serie crescente di alcool (75°, 85°, 96°, 100°) ciascun step di 10 min, e l'inclusione in paraffina.

Sezioni di 5µm ciascuna effettuate mediante taglio al microtomo e colorate con ematossilina per 10 min seguita da eosina per 20 min a temperatura ambiente.

Un vetrino copri oggetto è infine montato affinché sia possibile effettuare le osservazioni del costrutto al microscopio.

3.3.6 Analisi SEM

Per le analisi SEM 1ml di sospensione di microbiglie seminate con fibroblasti viene prelevata dalle spinner flask è posta in un tubo Eppendorf, le microbiglie vengono fatte sedimentare e il surnatante eliminato

Le microbiglie vengono fissate con gluteraldeide al 2.5%, il fissaggio è iniziato a temperatura ambiente seguito da conservazione nel fissativo per 3 giorni a 4°C.

I campioni sono poi lavati in 100mM di tampone cacodilato per 10 min a temperatura ambiente. Un secondo fissaggio viene fatto in Osmio tetrossido all' 1% in tampone cacodilato 100mM over night a 4°C. Successivamente i campioni sono stati disidratati decrementando l'acqua e incrementando la concentrazione di etanolo (10%, 30%, 50%, 70%, 90% , 100% e di nuovo 100% per dieci min a temperatura ambiente). Dopodichè i campioni sono stati trattati con anidride carbonica liquida usando il Critical point.

Infine le osservazioni e le micrografie sono effettuate con un microscopio a scansione elettronica.

3.3.7 Analisi istochimica: Tricomica di Mallory

Ciascun campione è stato fissato in formalina al 10% per 24 ore, deidratato in alcol ed incluso in paraffina. Sezioni di 5 µm sono state tagliate al microtomo e colorate in una soluzione di fucsina acida per 2 min. seguito dall'incubazione in soluzione di acido fosfomolibdico per altri 2 min.

Dopo un lavaggio veloce in acqua distillata, i vetrini sono incubati in una soluzione di orange G e di blu di metilene per 15 min. Infine, i vetrini sono stati deidratati, montati e osservati al microscopio.

3.4 Risultati e discussione

Prima di iniziare la semina dinamica nelle spinner flask per valutare la capacità dei fibroblasti di aderire alle microbiglie di gelatina sono stati effettuati degli esperimenti preliminari di colture su microsferi in piastra.

10^5 cell/ml sono state inoculate con 2 mg di biglie Percell per un rapporto di 100 cell/biglia in una piastra da 35mm.

I campioni di microsferi seminate con i fibroblasti sono stati osservati al microscopio ogni giorno e raccolti dopo 3 e 7 giorni per l'analisi di vitalità (MTT) e quella istologica.

In tali condizioni le cellule hanno aderito alle microbiglie e proliferato formando un strato continuo intorno a ciascuna microsfera, tale strato composto di cellule e matrice extracellulare funge da ponte tra le microsferi interconnettendole l'una all'altra (fig. 7 A, B).

La vitalità cellulare sulle microbiglie è stata valutata utilizzando il test di vitalità MTT. Le microbiglie sono completamente ricoperte di cellule vitali come dimostrato dagli spot di colore blu scuro che appaiono nell'immagine (fig. 7C).

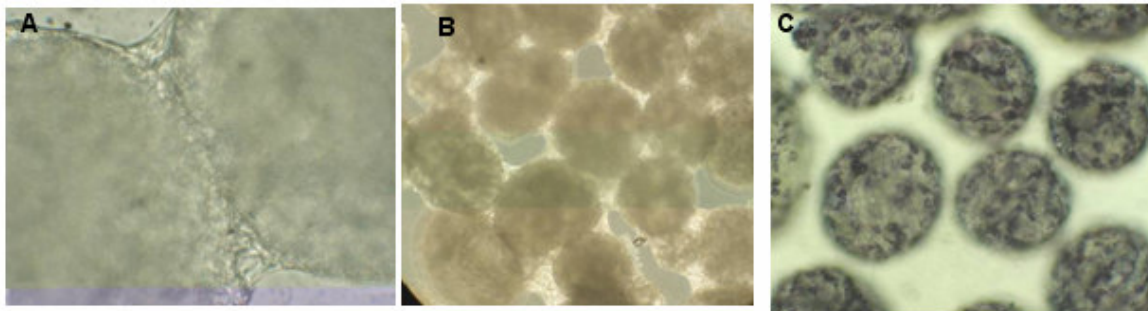


Figura 7: Microbiglie di gelatina seminate con fibroblasti.

(A, B) Le cellule ricoprono la superficie delle microbiglie e l'interazione cellula-cellula porta all'assemblaggio delle biglie adiacenti. (C) il saggio di vitalità MTT evidenzia la presenza di cellule vitali adese alle biglie.

All'aumentare del tempo di coltura, l'interazione cellula-cellula e cellula-matrice favorisce l'assemblaggio delle biglie adiacenti portando alla formazione di un aggregato macroscopico formato da più biglie seminate con le cellule. Per controllo la stessa quantità di microsferi senza cellule è stata posta nelle stesse condizioni di quelle seminate con le cellule e nessun tipo di assemblaggio è stato riscontrato (fig. 8). L'analisi istologica con ematossilina/eosina (fig. 8D), ha evidenziato la presenza di un'abbondante deposizione di matrice tra le microbiglie; ed un elevato rapporto

matrice extracellulare/numero di cellule, indicando un' elevata attività biosintetica piuttosto che proliferativa da parte delle cellule. L'analisi istochimica con tricromica di Mallory (fig. 8 E,F) mostra l'abbondante presenza di collagene (colore verde/blu) nella matrice depositata dalle cellule.

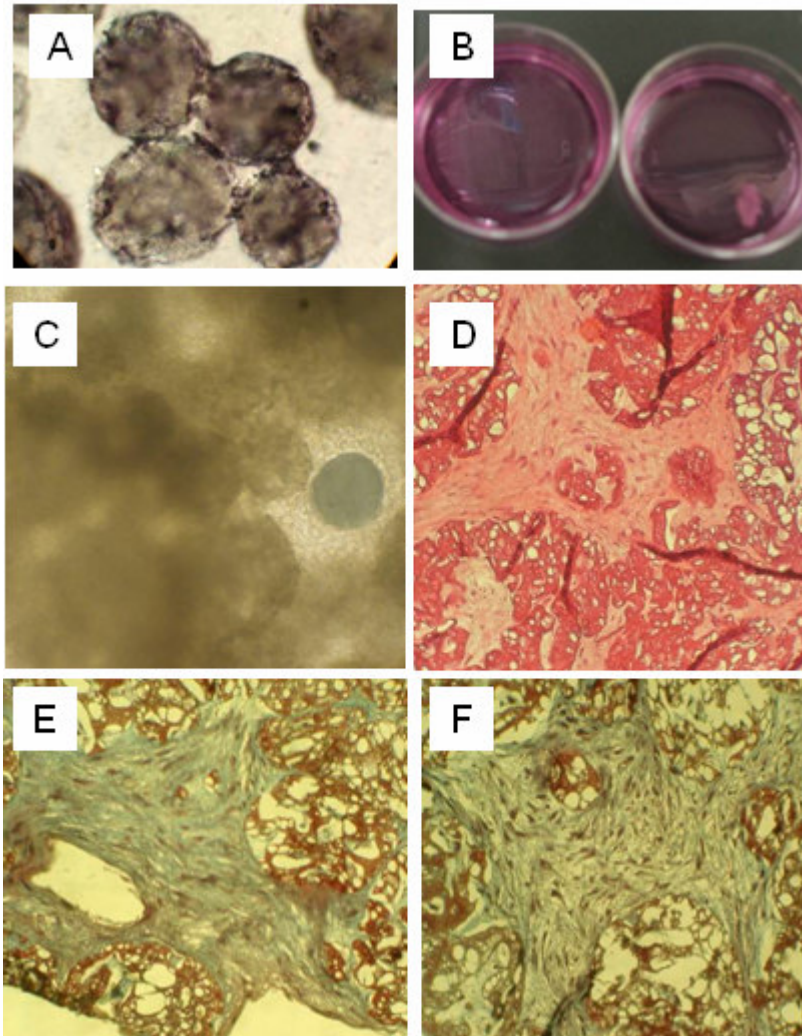


Figura 8. Assemblaggio di microbiglie cellula mediato. Le microbiglie Cultisphere-G sono state coltivate con fibroblasti bovini.

(A) dopo 2 giorni, le microbiglie hanno incominciato a connettersi le une alle altre e il saggio MTT evidenzia la loro vitalità. (B) dopo 5 giorni, l'assemblaggio può essere osservato a livello macroscopico (piastra a destra), mentre nulla è stato osservato nel caso in cui le microbiglie non erano in presenza di cellule (piastra a sinistra). (C) Immagine a contrasto di fase delle microbiglie assemblate. (D) istologia con dopo 5 giorni, le cellule hanno riempito gli spazi tra le microbiglie ed è evidente la produzione di un'abbondante matrice tipica del tessuto connettivo che funge da collante. La colorazione usata (ematossilina/eosina) colora le biglie di un rosa scuro, mentre la matrice prodotta da cellule rosa chiaro, gli spot rosa scuro nella matrice rappresentano le cellule. (E, F) Tricromica di Mallory su microbiglie di gelatine seminate con FB per 10. La matrice appare colorata in verde-blu, per il suo alto contenuto in collagene.

Accertato con le prove preliminari in piastra che le microbiglie di gelatina rappresentano un supporto idoneo per l'adesione, la proliferazione e la sintesi di matrice da parte dei fibroblasti, mantenendo lo stesso rapporto di 100 cellule per microbiglia, si è passato allo *scale up* del processo di semina utilizzando le spinner flask.

Le spinner sono state caricate con 10^5 cell/ml e 1mg/ml di microbiglie commerciali oppure 0.2 mg/ml di microbiglie *home made* in 250 ml di mezzo di coltura corrispondente a 100 cellule per biglia.

La continua agitazione nella spinner flask garantisce una distribuzione omogenea dei nutrienti ed uno scambio ottimale di gas tra soluzione ed ambiente esterno. La velocità tuttavia non deve essere né troppo elevata da causare una disgregazione meccanica delle microsfele, né troppo bassa da causare sedimentazione delle stesse.

Le prime ore di contatto tra le cellule e il materiale sono le più critiche, dal momento che è noto che per le cellule ad ancoraggio dipendente, l'adesione al substrato deve avvenire in poche ore altrimenti le cellule perderanno la propria vitalità [2].

Alla luce di queste osservazioni le condizioni di semina sono state settate con l'obiettivo di avere un'elevata probabilità di interazione cellula-microsfera, pertanto nelle prime 5 ore di semina si è scelto di optare per un'agitazione intermittente (5min @30 rpm, 30 min @0rpm) al fine di migliorare la distribuzione delle cellule sulle biglie e di ottenere il minimo numero di biglie non colonizzate [3].

Assumendo che il numero di cellule (in sospensione e adese alle sfere) nelle prime 5 ore di semina rimanga costante, la scomparsa delle cellule libere in sospensione è stata determinata, come riportato nel paragrafo 3.1.2.2 del capitolo 3, e utilizzata come indicatore dell'adesione delle cellule alle microsfele.

Sono state testate tre tipologie di microsfele le microsfele commerciali Percell e quelle *home made* a 2 diverse percentuali di crosslinking 10% e 20%.

Valutando la densità volumetrica dei fibroblasti nel mezzo di coltura durante la fase intermittente della semina è possibile osservare che la concentrazione decresce suggerendo che stia avvenendo contemporaneamente un aumento della densità di cellule che aderiscono alle microsfele.

Al termine della fase intermittente di semina il numero di cellule in sospensione è diminuito del 60% che approssimativamente equivale a dire che circa 40 cellule hanno aderito ad ogni microsfera (fig. 9).

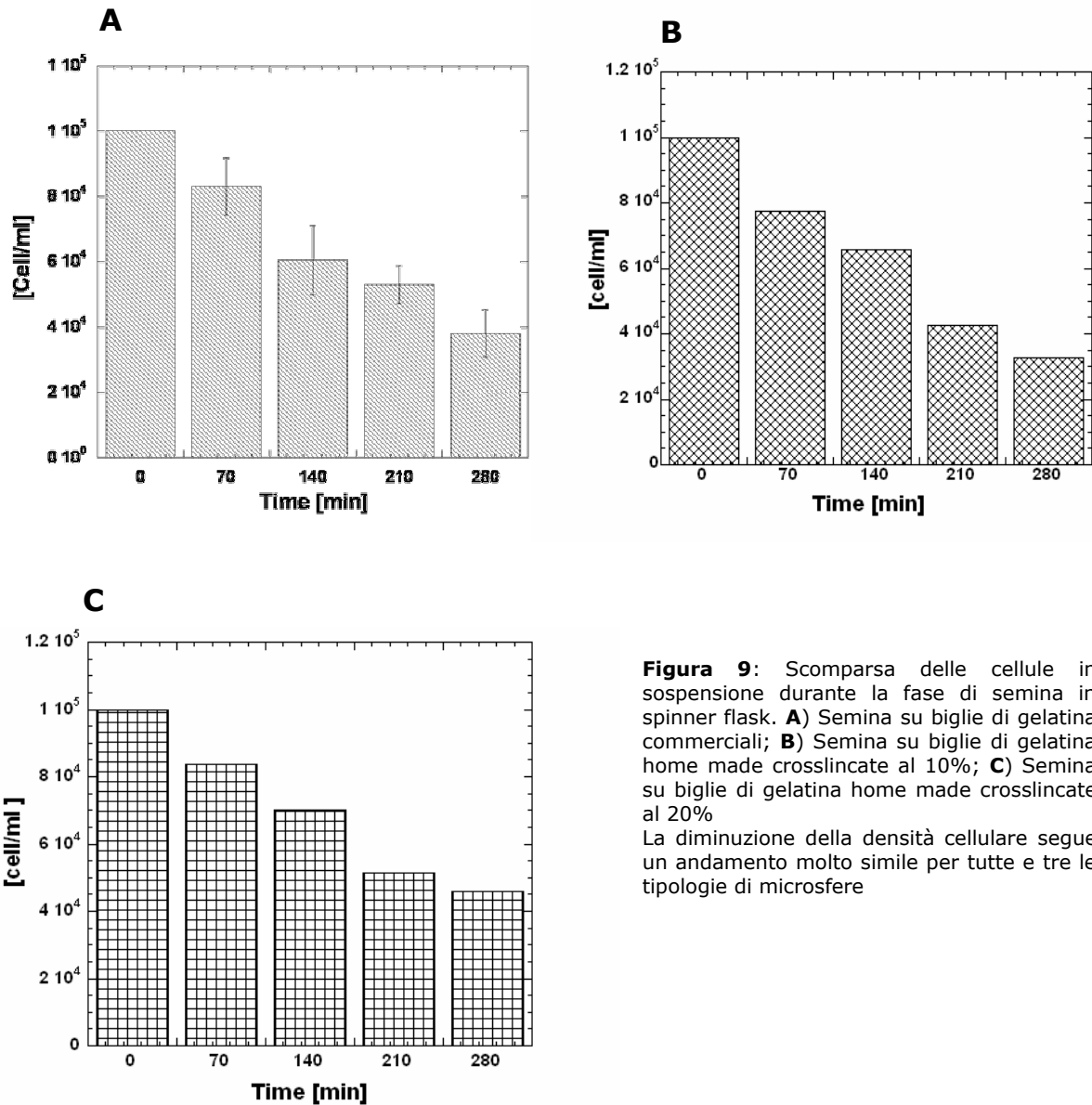


Figura 9: Scomparsa delle cellule in sospensione durante la fase di semina in spinner flask. **A)** Semina su biglie di gelatina commerciali; **B)** Semina su biglie di gelatina home made crosslinkate al 10%; **C)** Semina su biglie di gelatina home made crosslinkate al 20%

La diminuzione della densità cellulare segue un andamento molto simile per tutte e tre le tipologie di microsfere

Nei successivi 4 giorni di semina dinamica la velocità era mantenuta costante a 30rpm, e il numero di cellule seminato per microbiglia era valutato ogni giorno come riportato nel paragrafo 3.1.2.2 del capitolo 3.

I risultati riportati nel grafico in (fig. 10) mostrano che il numero di cellule su ogni microsfera cresce con il tempo di coltura da 50 fino a 200 cellule per biglia al quarto giorno di semina.

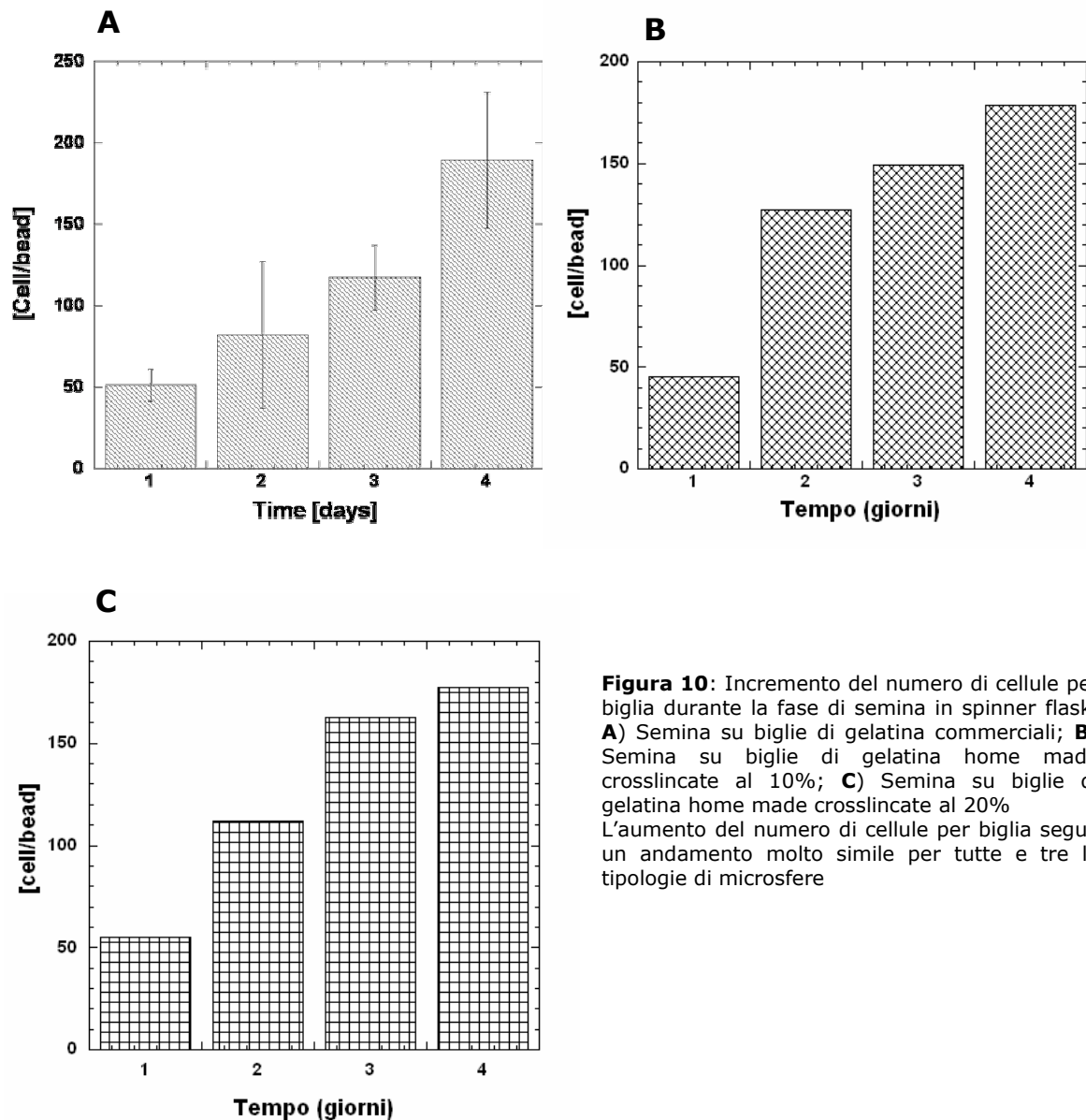


Figura 10: Incremento del numero di cellule per biglia durante la fase di semina in spinner flask. **A)** Semina su biglie di gelatina commerciali; **B)** Semina su biglie di gelatina home made crosslinkate al 10%; **C)** Semina su biglie di gelatina home made crosslinkate al 20%. L'aumento del numero di cellule per biglia segue un andamento molto simile per tutte e tre le tipologie di microsferi.

La vitalità delle cellule adese è stata monitorata con la stessa tecnica utilizzata negli esperimenti preliminari in piastra, ovvero con l'MTT.

Tale saggio è stato eseguito come riportato nel paragrafo 3.1.2.3 del capitolo 3 su campioni di microsferi seminate, prelevati dalle spinner a diversi tempi di coltura 1 giorno, 2 giorni e 4 giorni (fig. 11).

La colorazione con MTT, è utile perché dà un riscontro immediato, sia pur qualitativo della vitalità delle cellule e della loro adesione alle biglie.

Le cellule vitali sono evidenziate dagli spot blu scuro presenti nell'immagine e come è evidente il numero di questi spot aumenta con il tempo di coltura indicando l'incremento del numero di cellule per biglia.

Se dopo 1 giorno di coltura ci sono ancora zone della microsfera non colonizzate dalle cellule dopo 4 giorni non è più possibile osservare il singolo spot a dimostrazione che la microsfera è coperta da uno strato continuo di cellule (fig. 11).

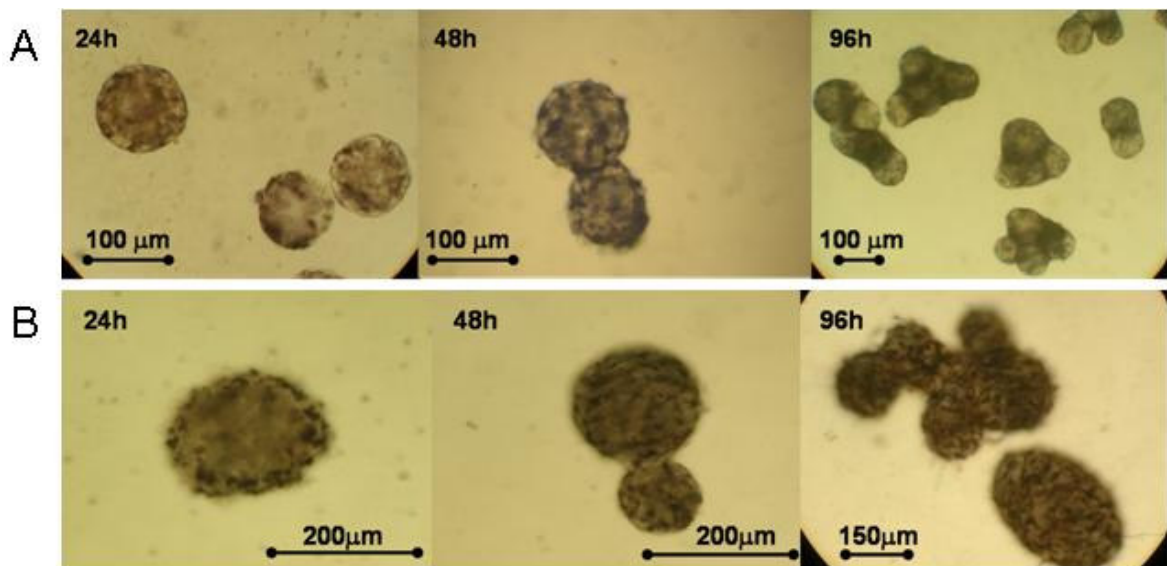


Figura 11: Risultato della colorazione con MTT dei precursori di microtessuti dopo 24h, 48h e 96h; **A)** microbiglie home made; **B)** microbiglie commerciali Percell.

Dopo 4 giorni di coltura si nota anche la formazione di piccoli aggregati di biglie, le cellule e la neo matrice sintetizzata fanno da ponte tra una biglia e l'altra formando degli aggregati, come dimostrano anche le istologie e le immagini SEM (fig. 12; fig. 13).

E' interessante notare che il tessuto neo-formato è presente non solo sulla superficie ma anche all'interno delle porosità interconnesse delle microsferi, inoltre non è stata evidenziata alcuna differenza significativa nei precursori dei microtessuto ottenuti con le microbiglie "home made" o con quelle commerciali della Percell.

Le condizioni di coltura dinamica tendono comunque a sfavorire la formazione di aggregati multibiglie (>5 biglie), in questa fase del processo infatti l'obiettivo è di

avere microsfele ricoperte di un layer/multilayer di cellule ed ECM, o piccoli aggregati di microbiglie (fig. 14), che possano poi essere facilmente inserite in un *mould* per essere assemblate, nella seconda fase del processo.

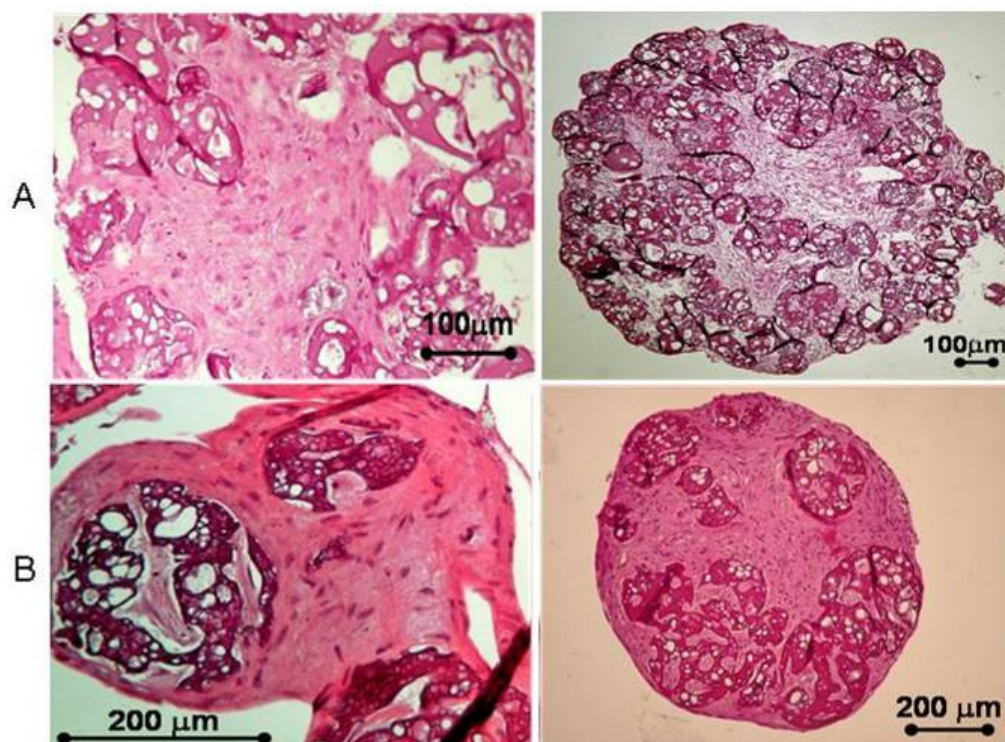


Figura 12. Colorazione istologica con ematossilina/eosina delle microbiglie seminate con cellule dopo 4 giorni di coltura in spinner. (A) microbiglie home made e (B) microbiglie commerciali (Percell).

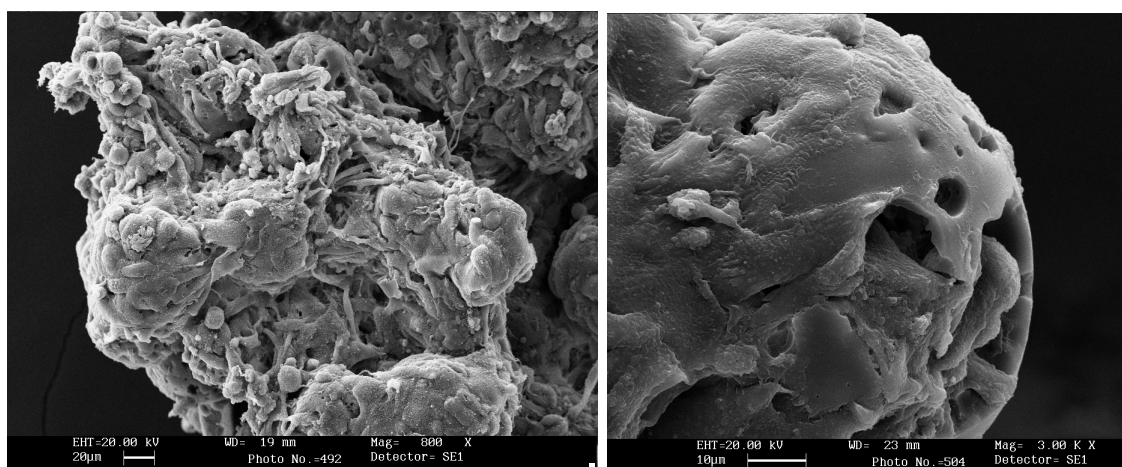


Figura 13. Immagini SEM di microsfele home made dopo 4 giorni di semina. A sinistra un aggregato di biglie completamente ricoperto di cellule e ECM barra 20 μm; A destra un particolare delle porosità delle biglie invase dalle cellule barra 10 μm.



Figura 14. Colorazione istologica con ematossilina/eosina delle microbiglie seminate con cellule nelle spinner flask a diversi tempi di coltura A) 24h; B) 48h; C) 96h

In figure 14 A e 12 B si può osservare bene il *layer* di tessuto e cellule che circonda le microsferiche di gelatina commerciali.

Tale *layer* è stato valutato anche in maniera quantitativa utilizzando un programma per l'analisi delle immagini image j.

Per controllo microbiglie tal quali, senza cellule, erano mantenute nelle stesse condizioni di semina di quelle nelle spinner.

Con questa analisi è stato possibile valutare l'incremento del diametro delle microbiglie seminate con le cellule, che come si può notare dalla figura 15 incrementava progressivamente con il tempo di coltura.

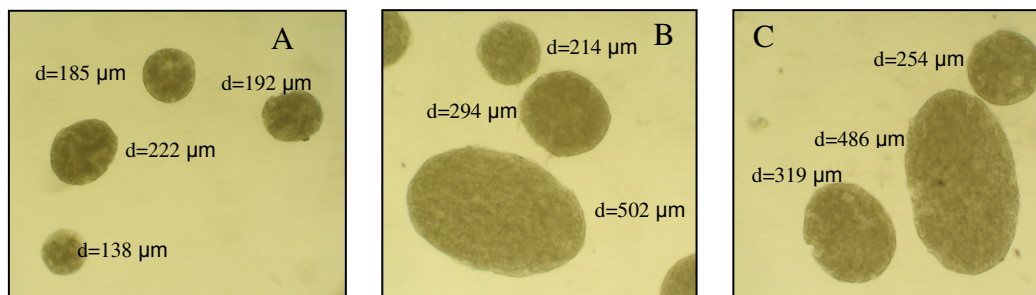


Figura 15: immagini analizzate per risalire al diametro delle microbiglie. A) microbiglie idratate in mezzo di coltura e non seminate con le cellule, B) microbiglie seminate con le cellule dopo 24h, C) microbiglie seminate con le cellule dopo 48h

E' stato misurato il diametro di almeno 100 microbiglie per ogni tempo di coltura e i risultati sono stati riportati nell' istogramma in figura 16.

Nell'istogramma sono riportati per ogni tempo le classi dei diametri rilevati attraverso l'analisi di immagine, e la percentuale di biglie che cade in ogni classe. Ogni classe ha l'ampiezza di 50 μ m.

Come si può notare il massimo, che rappresenta il diametro più frequentemente misurato si sposta verso destra, denotando un aumento dello spessore delle biglie con il tempo di coltura ed inoltre scompaiono le classi che rappresentano i diametri più piccoli e ne compaiono altre che rappresentano i diametri maggiori.

L'analisi è compiuta anche sulle biglie non caricate con le cellule ed idratate con il mezzo di coltura, e il risultato è che le biglie non seminate hanno un (intervallo) di diametri tra 130 e i 430 μ m, che concorda con quanto riportato sulla scheda tecnica delle CultiSphere G.

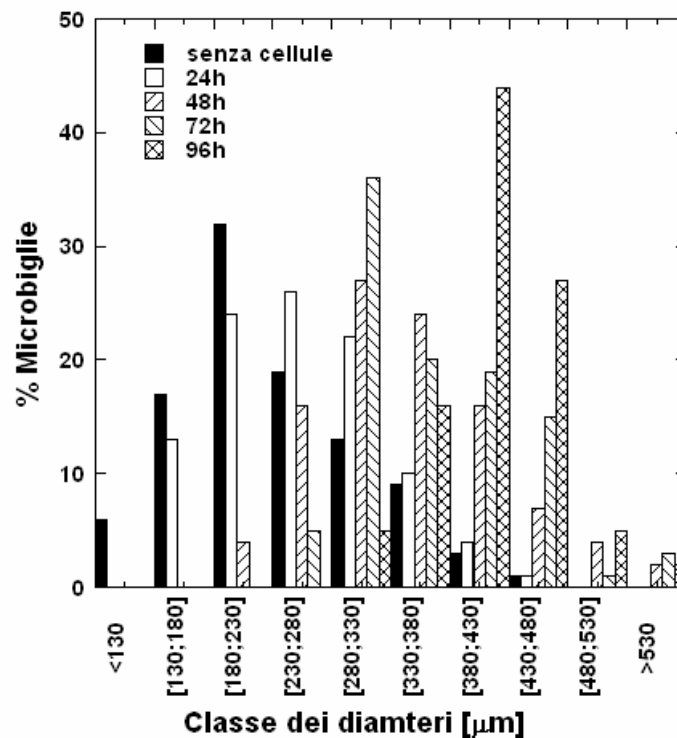


Figura 16: immagini analizzate per risalire al diametro delle microbiglie. A) microbiglie idratate in mezzo di

3.5 Conclusioni

Il processo di produzione del tessuto finale *in vitro* passa per uno step intermedio che è la produzione dei Precursori di tessuto micrometrici (μ TPs).

Le microsfere di gelatina porose sia commerciali che non, utilizzate come scaffold micrometrico per la produzione di tali precursori, risultano essere un substrato idoneo per la crescita dei fibroblasti.

La semina dinamica promuove l'adesione, la proliferazione e la sintesi di matrice extracellulare da parte dei fibroblasti generando dei "precursori micrometrici di tessuto".

L'utilizzo delle microsfere come substrato per la semina permette di coltivare un elevato numero di cellule in piccoli volumi grazie all'elevata area a disposizione per l'adesione rispetto alle normali colture in monolayer. Inoltre è stato anche riportato [4] che le cellule coltivate in questa maniera sono metabolicamente più attive che quelle cresciute su monolayer nelle colture standard.

Inoltre la struttura porosa delle microsfere (superficie dei pori circa 20 μ m) utilizzate in questo lavoro, permette alle cellule di aderire e migrare non solo sulla superficie delle microsfere ma anche al loro interno.

Le cellule adese sulle microsfere possono essere, successivamente alla semina, trasportate e trapiantate senza essere prima staccate da questa matrice. In questo modo la tripsinizzazione è eliminata e le cellule possono essere trasportate in uno stato più naturale crescendo su una matrice biologica [5,6].

Per la loro natura particolata hanno inoltre, il vantaggio di essere iniettabili, pertanto possono essere iniettate in tessuti soft ed agire come scaffold per la rigenerazione guidata di un tessuto senza la necessità di un'operazione chirurgica.

Le cellule oltre ad aderire e proliferare sulle microsfere svolgono anche la loro naturale attività biosintetica depositando le componenti fondamentali della matrice extra cellulare, in questo modo le microsfere diventano dei precursori micrometrici di tessuto (μ TPs), nel senso che possono essere utilizzati oltre che come carrier per la veicolazione di cellule, come "*building block*" per la "costruzione di tessuti *in vitro*."

I risultati riportati, infatti, dimostrano come la ECM depositata sulle microsfere funga da "colla" per la formazione di piccoli aggregati di multibiglie, tale proprietà può

essere sfruttata per generare costrutti tessutali più grandi attraverso l'assemblaggio di diversi *building block* (μ TPs) sotto determinate condizioni di coltura.

Bibliografia

1. Tabata, Y., and Ikada, Y. **Protein release from gelatin matrices.** Adv. Drug Deliv. Rev. 31, 287, 1998.
2. GA Silva, OP Coutinho, P Ducheyne, IM Shapiro, RL Reis, **The effect of starch and starch-bioactive glass composite microparticles on the adhesion and expression of the osteoblastic phenotype of a bona cell line.** Biomaterials 2006
3. Y-C. Ng, J. M. Berry, and M. Butler **"Optimization of Physical Parameters for Cell Attachment and Growth on Macroporous Microcarriers"** Biotechnology and Bioengineering, Vol. 50, Pp. 627-635 (1996)
4. Tao X, Shaolin L, Yaoting Y. **"Preparation and culture of hepatocytes on gelatine microcarriers"**. J. Biomed Mater Res A 2003; 65:306-10
5. F.R.M. Huss, J.P.E. Junker, H.Johnson, G. Kratz **"Macroporous gelatine spheres as culture substrate, transplantation vehicle, and biodegradable scaffold for guided regeneration of soft tissues. In vivo study in nude mice"** Journal of plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery (2007) 60, 543-555.
6. C.J. Gustafson, A. Birgisson, J. Junker, F. Huss, L. Salemark, H. Johnson, G. Kratz. **"Employing human keratinocytes cultured on macroporous gelatine spheres to treat full thickness-wounds: An in vivo study on athymic rats"**. Burn 33 (2007) 726-735.

Capitolo 4

Realizzazione di costrutti tessutali 3D *disc-shape* in condizioni dinamiche

4.1 Introduzione

In questo capitolo verrà descritta la seconda fase del processo ovvero, l'assemblaggio dei precursori micrometrici di tessuto in un costrutto 3D di forma predefinita.

Come mostrato nel capitolo 3, i precursori di tessuto, ovvero microsferi cellularizzate, possono assemblare spontaneamente e produrre matrice extracellulare. Al fine di poter controllare ed ottimizzare la produzione di matrice extracellulare, si è provveduto a realizzare un bioreattore in grado di migliorare il supporto di nutrienti, l'aggregazione dei precursori e rendere l'intero processo di maturazione riproducibile.

Verranno descritte la geometria del bioreattore, le modalità di riempimento e l'analisi fluidodinamica all'interno della camera di maturazione in base alla quale sono stati ottimizzati i parametri di processo per la coltura.

Infine i costrutti ottenuti verranno caratterizzati con una serie di analisi qualitative e quantitative.

4.2 Assembling e coltura dei μ TPs nel bioreattore

4.2.1 Geometria interna del bioreattore

Successivamente alla fase di semina i μ TPs ottenuti sono assemblati per formare un costrutto cellulare a forma di disco utilizzando un bioreattore.

Come riportato in figura 3 il bioreattore è composto da una camera A creata ponendo due griglie sottili ma rigide (B) sui lati opposti dello spaziatore C con un'apertura centrale (A) nella forma desiderata per il bioibrido che si otterrà (ID=35 mm; h=2mm).

Lo spazio vuoto A delimitato dalle superfici delle griglie e dalle superfici interne dello spaziatore forma lo spazio di maturazione. Le griglie microforate (B) utilizzate hanno una misura caratteristica della maglia ($a=18 \mu\text{m}$), tale che le microsferi sono trattenute nella camera mentre è possibile il passaggio del mezzo di coltura.

Due diverse possibilità sono state valutate per pressare le griglie microforate (B) contro lo spaziatore (C), l'utilizzo di una griglia macroforata (fig. 3A) e quello di un

anello (fig. 2B; fig. 3D). Per semplicità è stato riportato solo lo schema dell'intero bioreattore nella configurazione con l'anello. Il bioreattore viene poi chiuso per mezzo dei due piatti F e E avvitati l'uno all'altro attraverso delle viti G. La tenuta della camera è garantita da guarnizioni H opportunamente alloggiare dentro la camera di maturazione. I piatti E e F posseggono una rientranza in maniera tale da provvedere ad uno spazio per il flusso del liquido sopra e sotto la camera A, e sono anche provvisti con porte di ingresso 1 e di uscita 4 (fig. 3b) che permettono l'introduzione di un fluido perpendente nello spaziatore C. Utilizzando le porte 1,4 (fig. 3b) il fluido perpendente attraversa le griglie adiacente al piatto usato come ingresso, poi attraversa la camera e ogni singolo elemento di tessuto destinato a dar vita al tessuto finale dopo la perfusione, e infine esce dalla camera attraversando la griglia che delimita la camera dal lato opposto a quello usato per l'ingresso del fluido. Il fluido lascia infine il bioreattore attraverso la porta di uscita 4 che si trova sul piatto opposto. In questa configurazione si genera un tipo di flusso perfusivo. Il mezzo di coltura attraversa trasversalmente la camera di maturazione. Inoltre i piatti E e F (fig. 3) sono anche provvisti delle porte di ingresso 2 e 3, e delle porte di uscita 5 e 7 (fig. 3) che permettono l'introduzione di un fluido di coltura nelle rispettive cavità che si trovano nello spessore del piatto, e la rimozione del fluido dalla cavità stessa, senza che avvenga il passaggio attraverso le griglie microforate e la camera di maturazione. In questa configurazione si instaura un tipo di flusso che denominiamo tangenziale e che non attraversa trasversalmente la camera di maturazione. Inoltre la porta di ingresso 6 (fig. 3b) nello spazio C (fig. 3a) permette l'introduzione di precursori micrometrici di tessuto (μ TP) nella camera, cioè lo spazio vuoto A tra le griglie microforate (fig. 3). Tutti i materiali utilizzati per le griglie, lo spaziatore, i piatti e la camera di maturazione sono di acciaio inossidabile. Il bioreattore mostrato in figura 3 è di forma circolare cosicché la camera di maturazione è cilindrica, per produrre bioibridi con la forma di dischi.

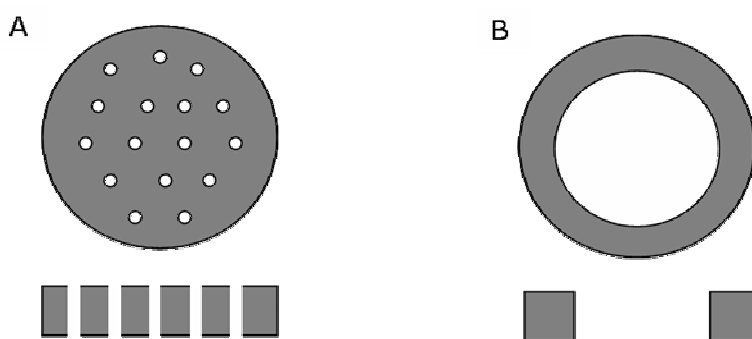


Figura 2: A) griglia macroforata; B) anello; per entrambe in alto sezione frontale; in basso sezione trasversale

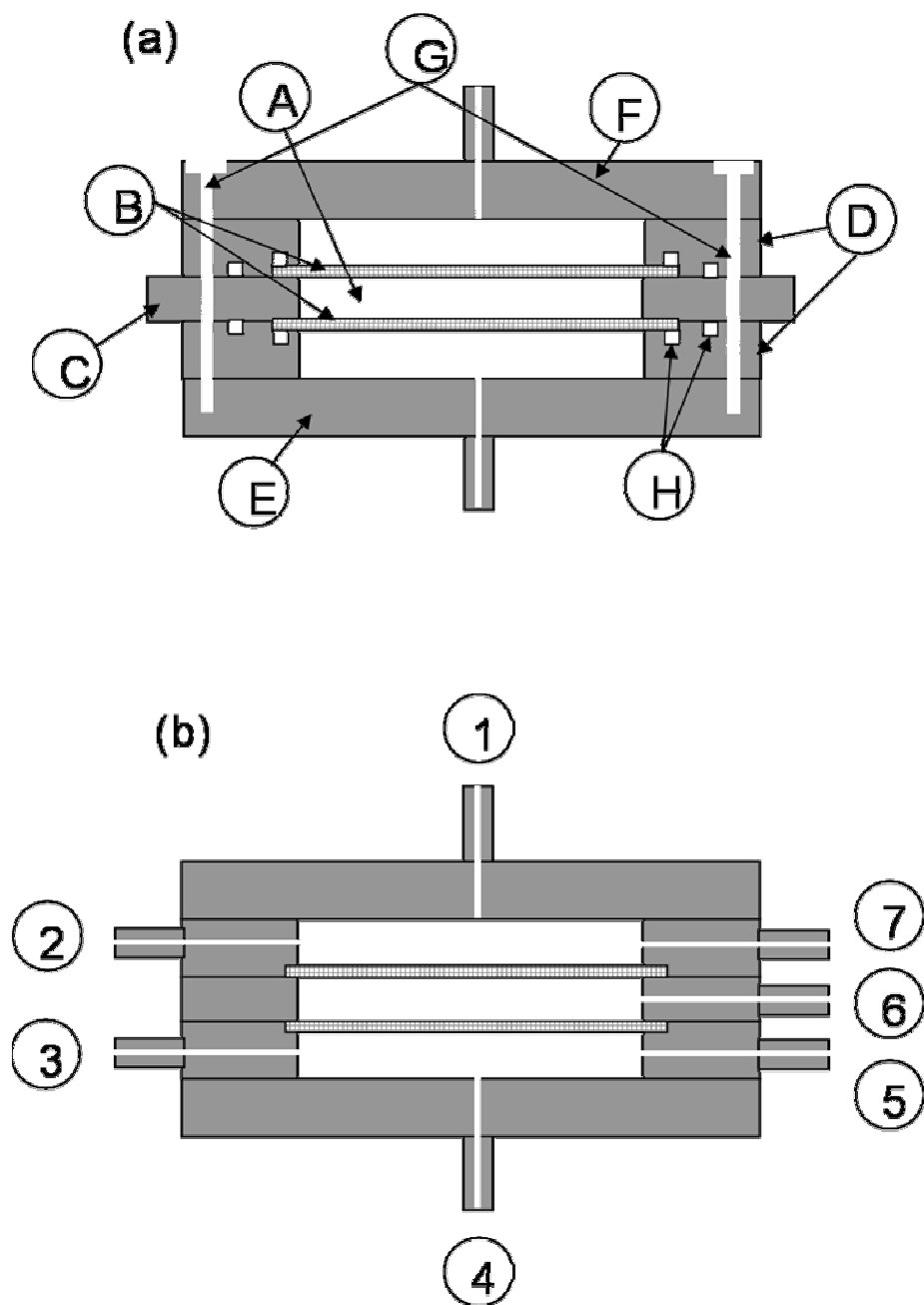


Figura 3: Rappresentazione schematica della geometria interna del bioreattore

4.2.2 Caricamento del bioreattore con i μ TPs e *flow loop* del sistema

In figura 4 è mostrato il circuito del flusso del fluido al bioreattore, includendo sia la modalità di flusso trasversale che quella di flusso tangenziale, ed anche la linea di caricamento dei μ TPs.

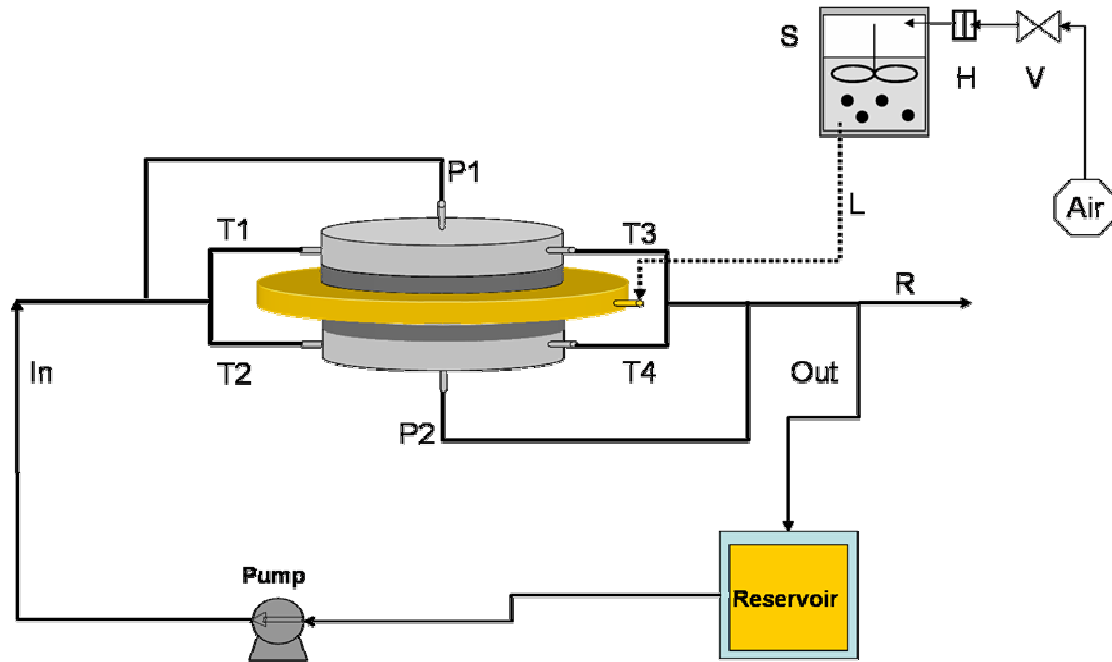


Figura 4: Rappresentazione schematica del circuito del bioreattore

I μ TPs, cioè le microsferi di gelatina colonizzate da fibroblasti durante la fase di semina del processo (cap. 3), sono introdotti nella camera di perfusione attraverso la porta di ingresso 6 (fig. 3) come una sospensione nel mezzo di coltura alla concentrazione di 0.2 mg/ml pressurizzando la spinner flask (S) fig. 4. La pressurizzazione avviene connettendo la spinner ad una linea di aria compressa attraverso la valvola V (fig. 4).

Aperto la valvola e mantenendo la pressione a 0.3 Bar la sospensione di μ TPs fluisce dalla spinner alla camera di maturazione A (fig. 3a) attraverso la porta di ingresso 6 (fig. 3b) e attraverso la linea L (fig. 4).

Durante la fase di caricamento la linea di fluido P1, P2, T1 e T2 (fig. 4) del circuito del flusso di fluido sono mantenute chiuse mentre le linee T3 e T4 (fig. 4) sono mantenute aperte per permettere la fuoriuscita del fluido sospeso attraverso la linea R (fig. 4), mentre i μ TPs sono mantenuti nello spazio di maturazione A (fig. 3a). Questa è una fase molto delicata del processo da cui dipende l'ottenimento di

un bioibrido compatto. Il riempimento deve essere effettuato in maniera tale da assicurare un'omogenea distribuzione dei μ TPs nella camera di maturazione inoltre deve avvenire facendo attenzione che i μ TPs non si aggregino durante il percorso che dalla spinner porta al bioreattore, il che provocherebbe un blocco al passaggio. Infine dal momento che i μ TPs sono altamente deformabili la pressione con cui sono spinti nella camera di maturazione deve essere tale da assicurarne il completo riempimento ma senza che vi sia un elevato impacchettamento dei μ TPs che non lascerebbe spazio per la formazione del neo tessuto.

Al fine di riempire lo spazio di maturazione in modo omogeneo e con una quantità minima di μ TPs, la camera è stata riempita con microsfere in caduta libera (senza flussi) ed è stato calcolato che la quantità minima di microsfere necessaria al riempimento della camera è pari a 120-150 mg. Tale quantità, che offre condizioni di impacchettamento minimo, deve essere iniettata all'interno della camera a basse velocità per evitare la formazione di fori nel punto di iniezione. Per ridurre la spinta necessaria a trasferire la sospensione nella camera di maturazione bisogna diminuire la concentrazione di partenza. Dopo diversi tentativi è stato visto che partendo da concentrazione di 0.1 g/l alla quale viene fornita una pressione iniziale di 0.1-0.2 bar, il sistema dissipa tale pressione trasferendo nella camera una quantità di microsfere pari a 150mg in meno di 30 minuti, senza la formazione di fori nel punto di iniezione.



Figura 5. Esempio di bioibridi ottenuti da camere riempite con flussi ottimizzati (sinistra) e **con alte** pressioni (destra)

Il ricircolo del mezzo di coltura attraverso il bioreattore, sia nella modalità di flusso trasversale che di flusso tangenziale è ottenuta per mezzo di una pompa peristaltica, che prende mezzo fresco dalla riserva.

Il mezzo uscendo dal bioreattore può poi ritornarvi instaurando così un circolo chiuso.

4.2.3 Analisi fluidodinamica all'interno del camera di maturazione

Il regime dei flussi nel bioreattore è stato modellato utilizzando la fluidodinamica computazionale (CFD). Il sistema è diviso in 3 differenti domini come mostrato in figura 5: il dominio D1 dove il fluido fluisce liberamente nella camera del bioreattore (compreso la griglia macroforata) e i domini D2 e D3 in cui il mezzo di coltura fluisce rispettivamente attraverso la griglia porosa e il letto di microbiglie.

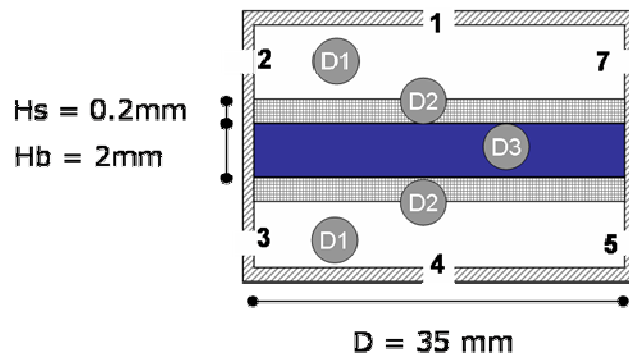


Figura 5: suddivisione della camera di maturazione in domini per l'analisi fluidodinamica computazionale

L'equazione utilizzata per descrivere la fluidodinamica nel dominio D1 è l'equazione di Navier Stokes:

$$\mu^f \nabla^2 v^f = \nabla P$$

Dove μ^f è la viscosità cinematica, v^f è la velocità del fluido e p la pressione idrostatica (il suffisso f si riferisce al fluido nel dominio D1). Nel dominio D2 e D3 è stata usata l'equazione di Brinkman per descrivere il flusso attraverso i due mezzi porosi (la griglia microporosa e il letto di microbiglie).

$$\mu_e^i \nabla^2 v^i - \frac{k^i}{\mu^f} = \nabla P^i; i = s, b$$

il suffisso i si riferisce al fluido nella griglia porosa ($i=s$) e nel letto di microbiglie ($i=b$), μ è la viscosità effettiva; k è la permeabilità idraulica e p la pressione. Per risolvere il campo di moto all'interno dei mezzi porosi è necessario calcolare i coefficienti di permeabilità idraulica nel filtro poroso (K_s) e nel letto di microsferine (K_b) come mostrato in figura 6.

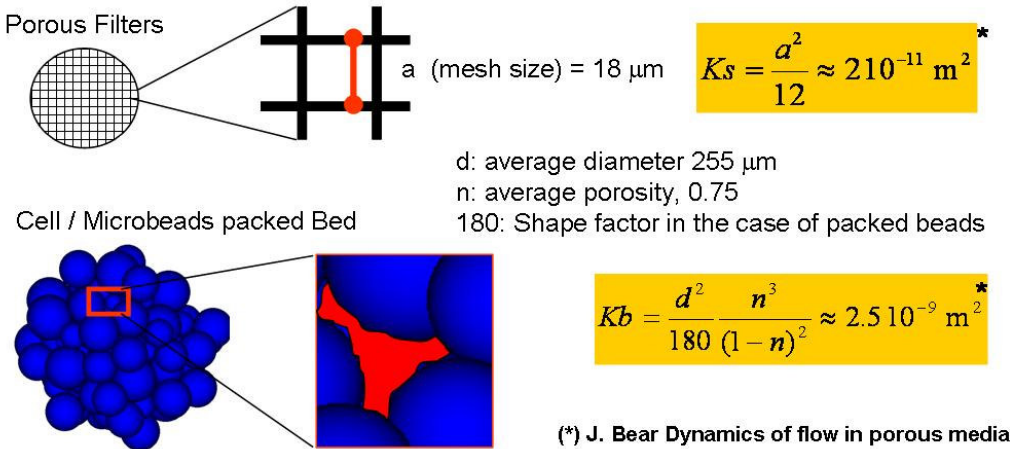


Figura 6 Calcolo dei coefficienti di permeabilità idraulica

In figura 7 sono riportati i profili di velocità lungo il diametro del bio-ibrido (letto di microsferine dominio D3) quando il bioreattore funziona in configurazione di flusso a perfusione trasversale ovvero che attraversa il bio-ibrido in direzione normale al proprio diametro (il fluido entra dall'ingresso 1 fig5 e esce da 4 fig5.)

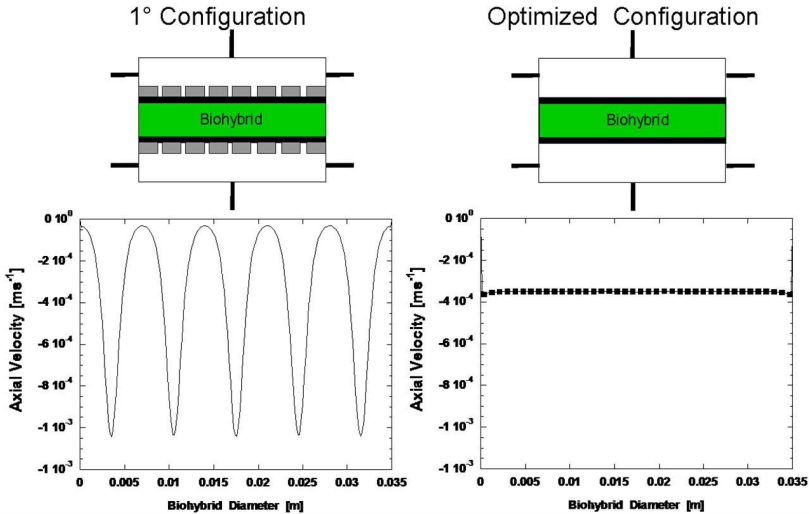


Figura 7 Profili di velocità nel letto di microbiglie. A sinistra è riportato il profilo nel caso sia presente la griglia microforata , a destra senza griglia macroforata (configurazione ottimizzata).

Dall'analisi fluido dinamica si nota come i profili di velocità lungo il diametro del bio-ibrido quando viene utilizzata la griglia macroforata non sono omogenei con dei picchi concentrati in corrispondenza dei fori. Inoltre il valore massimo raggiunto dalla velocità della fase fluida è di 0.001 m/s. Quindi questa configurazione è caratterizzata da una non uniformità della distribuzione dei nutrienti all'interno della camera nonché da un basso tempo di residenza delle macromolecole neo-sintetizzate.

Il profilo di velocità risulta, invece, essere piatto nel caso in cui alla griglia microforata viene sostituito un anello (fig. 7), ragion per cui si è ritenuto opportuno utilizzare il bioreattore in questa configurazione (fig. 3)

4.2.4 Condizioni di coltura nel bioreattore

Alla fine della fase di semina, i μ TPs sono trasferiti nella camera di maturazione come descritto precedentemente. Al fine di valutare l'effetto del tempo di coltura e delle condizioni fluido dinamiche sulla maturazione del costrutto, due regimi di flusso di fluido sono stati esplorati fino ad 8 settimane di coltura.

Le condizioni di flusso utilizzate sono la modalità di flusso perfusivo continuo (CF) e alternato (MF). Quest'ultima è ottenuta alternando il flusso perfusivo e quello tangenziale ogni 24h (figura 8).



Figura 8 Le frecce indicano il verso del fluido nelle due modalità di flusso

Il volume della riserva del mezzo (Modified eagle's medium [MEM-high glucose concentration (4,5 g/L)], 20% heat-inactivated FBS, 100 μ g/ml glutamine and 100U/ml penicillin/streptomycin) è di 200 ml. Sia la riserva che il bioreattore sono stati posti in incubatore (NOME 37°C, 5% CO₂).

La riserva del mezzo è stata posta in contatto con atmosfera controllata attraverso filtri di 0.4 μ m che permettono lo scambio di gas, e mantenuta in agitazione con uno stirrer per evitare la formazione di gradienti così come la deposizione di macromolecole. Ogni 3 giorni il mezzo di coltura è cambiato ed è aggiunto acido

ascorbico alla concentrazione di 50 µg/ml. La velocità del flusso (Q) è stata settata a 0.5ml/min per il flusso trasversale e 1ml/min per quello tangenziale. Due tempi di coltura sono stati esplorati, due settimane e otto settimane.

Ad ogni tempo di coltura sono stati performati 3 esperimenti indipendenti ottenendo campioni a forma di disco (35mm in diametro e 2 mm di spessore) denominati bioibridi che sono stati rimossi con attenzione dalla camera di maturazione per essere caratterizzati.

4.3 Caratterizzazione del costrutto tessutale 3D

4.3.1 Analisi Biochimiche

Nel mezzo di coltura:

Al fine di valutare il contenuto di GAG e collagene rilasciati nel mezzo di coltura, sono state effettuate analisi biochimiche su aliquote raccolte dalla riserva contenente il mezzo dopo 8 settimane di coltura e per bioibridi coltivati sia in perfusione continua che in flusso alternato.

Per la determinazione dei GAG nel mezzo di coltura, 1 ml di mezzo è stato centrifugato, successivamente il surnatante è stato rimosso e il pellet digeriti con 1ml di papain digestion buffer (125 µg/mL of papain in 150mM cloruro di sodio, 55mM sodio citrato, 5mM L-cysteina, 5mM EDTA) per 16 h a 60°C

La determinazione di S-GAG, è stata condotta attraverso la reazione di 40 µl con 250 µl di DMB, in microlplates da 96 leggendo l'assorbanza a 525 nm con Wallac Victor3™ (Perkin Elmer).

I chondroitin sulfate (0-5 mg da cartilagine di squalo, Sigma) è stata usata come standard.

Il collagene totale solubile presente nel mezzo di coltura è stato quantificato con il kit Sircol (Biocolor Ltd, Northern Ireland) per la determinazione del collagene seguendo le istruzioni della casa produttrice.

Il mezzo di coltura è stato fatto reagire con un reagente Sircol, contenente rosso di Sirio, che reagisce specificamente con le catene laterali del collagene sotto l'azione di uno shaker meccanico per 30 min. Successivamente viene centrifugato per 10 min a 12000 giri, il colorante non legato viene rimosso, e il colorante legato al collagene era recuperato con un reagente alcalino. L'assorbanza infine è letta a 540nm.

Nel bioibrido:

Per valutare la quantità di GAG depositata nei bioibridi, i campioni erano pesati, liofilizzati e poi digeriti in 1ml di papain digestion buffer (125 mg/mL di papaina in 150mM cloruro di sodio, 55mM sodio citrato, 5mM L-cisteina, 5mM EDTA) per 16 h a 60°C. La determinazione dei GAG è stata effettuata come descritto precedentemente.

4.3.1 Analisi Reologiche

Dai bioibridi ottenuti nel bioreattore dall'assemblaggio dei μ TPs sono stati tagliati dei dischetti di 15 mm con una fustella cilindrica.

Tali campioni sono stati testati utilizzando un reometro Gemini (Bohlin) a torsione oscillatoria nel range di frequenza 0.01-10Hz alla temperatura di 37°C in modalità a deformazione controllata.

In un siffatto test il campione viene sottoposto ad una deformazione a taglio variabile con legge sinusoidale. Il reometro misura la risposta del materiale al variare della frequenza di oscillazione sottoforma di modulo elastico (G') e viscoso (G''). Brevemente, G' rappresenta l'energia elastica immagazzinata in un ciclo di deformazione mentre G'' è associato alla dissipazione viscosa dell'energia.

Il rapporto G''/G' è il fattore di dissipazione o $\tan\delta$. In un tipico esperimento in shear oscillatorio, entrambi i moduli sono registrati in funzione della frequenza applicata.

Ciascun campione è stato sottoposto ad un amplitude sweep prima dell'oscillazione al fine di controllare quale fosse il range di linearità. Un'ampiezza di oscillazione di 0.1% è stato settato dal momento che tale valore cadeva nel range di linearità per tutti i campioni testati.

I campioni sono stati serrati, con un precarico a compressione di circa 20g tra due piatti paralleli. E' stata utilizzata una camera di umidità per contenere il campione in maniera tale da evitarne la disidratazione. Sono stati misurati modulo elastico (G') e modulo viscoso (G'') al fine di monitorare il corretto assemblaggio dovuto alla formazione di neotessuto.

4.3.2 Analisi SEM

Per le analisi SEM i costrutti ottenuti dalla coltura nel bioreattore sono fissati con gluteraldeide al 2.5%.

Il fissaggio è iniziato a temperatura ambiente seguito da conservazione nel fissativo per 3 giorni a 4°C.

I campioni sono poi lavati in 100mM di tampone cacodilato per 10 min a temperatura ambiente. Un secondo fissaggio viene fatto in Osmio tetrossido all' 1% in tampone cacodilato 100mM over night a 4°C. Successivamente i campioni sono stati disidratati decrementando l'acqua e incrementando la concentrazione di etanolo (10%, 30%, 50%, 70%, 90% , 100% e di nuovo 100% per dieci min a temperatura ambiente). Dopodichè i campioni sono stati trattati con anidride carbonica liquida usando il Critical point.

Infine le osservazioni e le micrografie sono effettuate con un microscopio a scansione elettronica.

4.3.3 Analisi istologica

Per le analisi istologiche parti dei biobridi a diversi tempi di coltura sono stati sciacquati in PBS e poi fissate in formalina al 10% per 24h.

Al fissaggio segue una disidratazione in una serie crescente di alcool (75°, 85°, 96°, 100°) ciascun step di 10 min, e l'inclusione in paraffina.

Sezioni di 5µm ciascuna effettuate mediante taglio al microtomo e colorate con ematossilina per 10 min seguita da eosina per 20 min a temperatura ambiente.

Un vetrino copri oggetto è infine montato affinché sia possibile effettuare le osservazioni del costrutto al microscopio.

4.3.4 Analisi istochimica: Tricromica di Mallory

Ciascun campione è stato fissato in formalina al 10% per 24 ore, deidratato in alcol ed incluso in paraffina. Sezioni di 5 µm sono state tagliate al microtomo e colorate in una soluzione di fucsina acida per 2 min. seguito dall'incubazione in soluzione di acido fosfomolibdico per altri 2 min.

Dopo un lavaggio veloce in acqua distillata, i vetrini sono incubati in una soluzione di orange G e di blu di metilene per 15 min. Infine, i vetrini sono stati deidratati, montati e osservati al microscopio.

4.4 Risultati e discussione

Il bioreattore è stato concepito in maniera tale da permettere il caricamento della camera di maturazione per injection moulding, iniettando i μ TPs per mezzo di una pressione imposta alla soluzione in cui si trovano sospesi.

L'ottimizzazione del processo di riempimento ha permesso di ottenere bioibridi omogenei e compatti (fig. 8) che mantengono la forma e le dimensioni della camera di maturazione ($h=2\text{mm}$; $D=35\text{mm}$) anche dopo la rimozione dello stesso dalla camera.

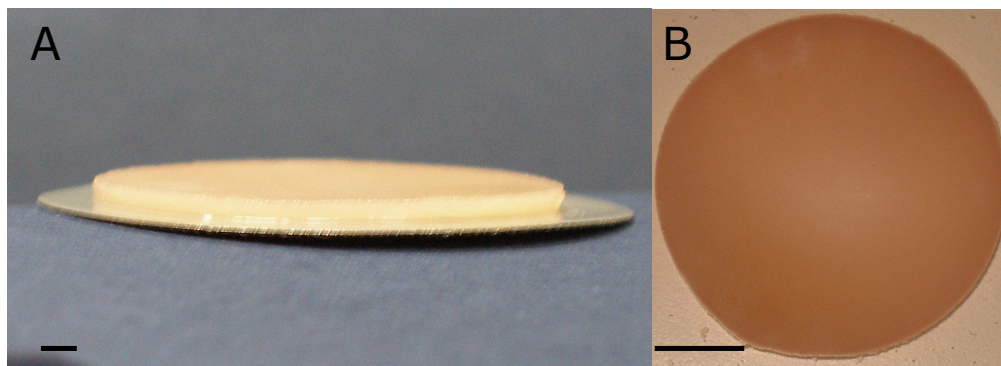


Figura 8 Bioibrido ottenuto dopo 8 settimane di coltura; A) immagine che evidenzia l'uniformità dello spessore del bioibrido (2mm) la barra è 2mm. B) immagine frontale del bioibrido la barra è 10mm

I bioibridi sono stati ottenuti iniettando nella camera circa 160mg di microbiglie che corrispondono a 160.000 microbiglie ognuna colonizzata con 200 cellule (cap.3) pertanto la densità cellulare nel costrutto è di $4 \cdot 10^6$ cell/ml.

Inoltre questo tipo di processo che definiamo "*bottom-up*" dal momento che si costruisce un costrutto tessutale 3D a partire da materiale particolato (μ TPs), garantisce un'omogenea distribuzione delle cellule lungo lo spessore del bioibrido.

Il bioibrido prelevato dalla camera di maturazione rimane integro e mostra una certa elasticità (fig.9).



Figura 9 Biobrido ottenuto dopo 8 settimane di coltura.

I bioreattori a perfusione sono ampiamente utilizzati per l'ingegnerizzazione di tessuti vitali e spessi [1-6], al fine di migliorare il trasporto di massa durante il processo dei costrutti cellulari 3D *in vitro*.

E' noto, però, che le condizioni di processo influenzano fortemente le caratteristiche del tessuto che si vuole ingegnerizzare, ad esempio è stato riscontrato che una perfusione continua ad una data portata non è vantaggiosa per la condrogenesi dei condrociti articolari coltivati in costrutti 3D di spugne di collagene [7].

Pertanto, in questo lavoro, la ricerca delle condizioni ottimali di processo per la fase di maturazione è stata piuttosto complessa ed ha richiesto un continuo ridisegno delle condizioni idrodinamiche.

In breve, il principale obiettivo, in questa fase, è stato quello di individuare un adeguato flusso di fluidi interstiziale per assicurare un sufficiente apporto di nutrienti alle cellule e, allo stesso tempo, far sì che il flusso non fosse molto alto da lavare via i componenti della matrice extracellulare neo-sintetizzati. (e.g., collagene e GAG).

Tutto ciò non è facile da raggiungere e porterebbe ad un neo-tessuto non vitale se il flusso è troppo basso o assente o ad un tessuto impoverito dei suoi componenti extracellulari se è troppo alto. Inoltre, il flusso interstiziale dovrebbe essere regolare e omogeneo per impedire un deposito eterogeneo del neo-tessuto che potrebbe fortemente influenzare le proprietà finali del costrutto.

Pertanto in seguito sono riportati, confrontati e discussi i risultati ottenuti in condizioni di flusso perfusivo continuo e quelli ottenuti in condizioni di flusso alternato.

Le proprietà meccaniche dei bioibridi, sono state valutate come descritto nel paragrafo 4.3.1, dopo 1 e 8 settimane di coltura sia per bioibridi coltivati in perfusione continua che per bioibridi sottoposti a modalità di coltura alternata perfusione/tangenziale. In figura 10 sono riportati i moduli elastici contro la frequenza ai diversi tempi di coltura, inoltre è riportato anche il modulo elastico del derma bovino nativo.

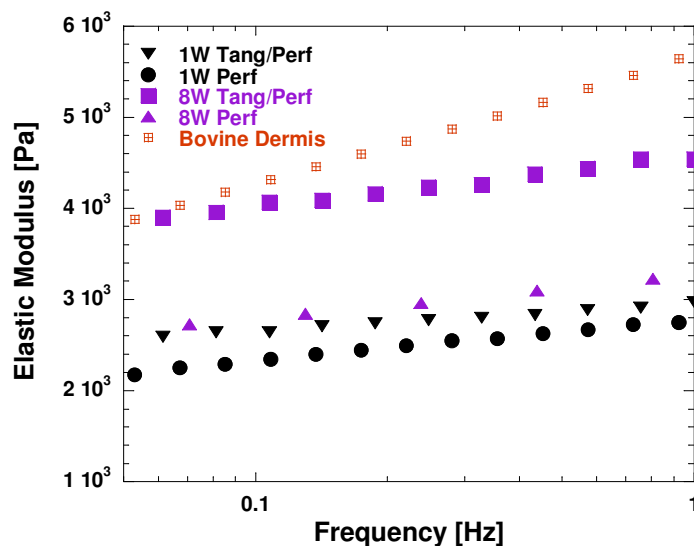


Figura 10 modulo elastico dei bioibridi a diversi tempi di coltura e per diversi modalità di flusso

Dal grafico si osserva che il modulo elastico del costruito mantenuto in perfusione continua, aumenta leggermente da 1 a 8 settimane di coltura, ciò è probabilmente da ascrivere ad una progressiva biosintesi e maturazione (assemblaggio) di matrice neo-depositata.

Oltre al tempo di coltura, anche il tipo di flusso impiegato durante il processo di maturazione ha profonde influenze sulla risposta dinamico-meccanica del tessuto. In particolare, bioibridi coltivati utilizzando un flusso a perfusione continuo, mostrano proprietà meccaniche costantemente inferiori rispetto a quelle che si ottengono da bioibridi sottoposti a coltura intermittente, ovverosia alternando cicli di flusso tangenziale a cicli di flusso perfusivo. Inoltre nel caso di flusso perfusivo continuo, non si nota una aumento sensibile delle proprietà meccaniche col tempo di maturazione, mentre si ha un sostanziale aumento delle proprietà meccaniche ad 8 settimane di coltura utilizzando condizioni di coltura intermittenti.

Come si evince dal diagramma, lo spettro meccanico dei bioibridi ottenuti per coltura intermittente dopo 8 settimane è molto simile a quello del derma nativo.

Le stesse analisi sono state effettuate per controllo su microbiglie nude senza cellule ma non essendoci un assemblaggio mediato dalle cellule e dalla ECM non è stato possibile rilevarne le proprietà meccaniche.

Le prove reologiche dimostrano pertanto che le proprietà meccaniche dei bio-ibridi ottenuti con il flusso alternato sono più alte. In condizioni di flusso perfusivo continuo, nonostante il profilo di velocità sia piatto all'interno della camera (fig. 7) e quindi la distribuzione dei nutrienti uniforme, i valori di velocità in gioco sono comunque alti e quindi i tempi di residenza delle macromolecole neo sintetizzate sono bassi sfavorendo il processi di assembly del tessuto.

Infatti misurando le concentrazioni di GAG e collagene nel mezzo di coltura a 8 settimane nelle due diverse condizioni di flusso, si nota che vi è un accumulo di entrambi nel mezzo e in maggior quantità quando la perfusione è continua (fig. 11). In fig. 11 è stato riportato solo il valore dell'assorbanza e non delle concentrazioni a cui si può comunque risalire attraverso una retta di taratura.

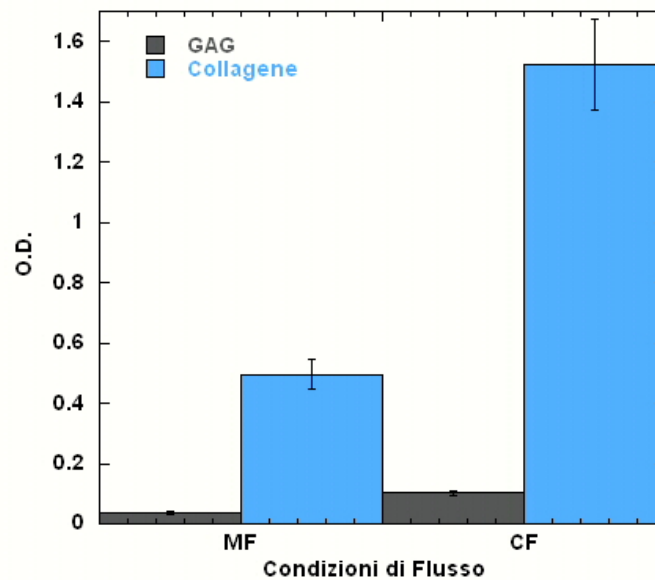


Figura 11 Gag e collagene rilasciati nel mezzo di coltura dopo 8 settimane

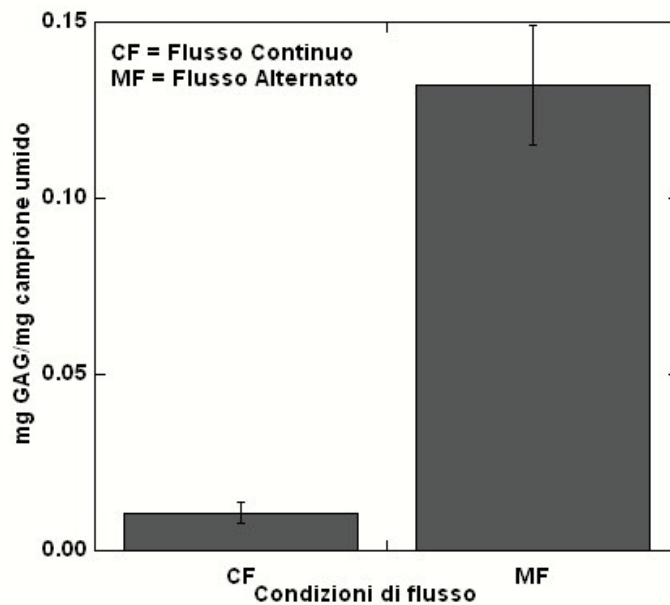


Figura 12 GAG depositati nei bioibridi coltivati per 8 settimane sia in perfusione continua (CF) che in flusso alternato (MF). La quantità di gag è stata normalizzata rispetto al peso del campione analizzato

La quantità di glicosamminoglicani presente nei bioibridi dopo 8 settimane di coltura sia in condizione di perfusione continua che di flusso intermittente è stata pure analizzate e la massa di gag è stata normalizzata rispetto al peso del campione.

Come si può vedere dal grafico, la quantità di glicosamminoglicani depositata nei bioibridi coltivati in condizioni di flusso intermittente (MF) è maggiore rispetto alla quantità trovata in quelli coltivati in condizioni di flusso perfusivo continuo (CF).

I risultati delle analisi biochimiche ci danno quindi delle informazioni quantitative dell'effetto di lavaggio del flusso perfusivo sulle componenti neo sintetizzate della matrice extracellulare (collagene e gag).

L'effetto di lavaggio della matrice neo-sintetizzata, è riscontrato anche in maniera qualitativa osservando al microscopio, le griglie microforate che costituiscono le pareti della camera di maturazione.

In fig. 13 sono riportate 2 immagini delle griglie, in fig. 13 A la griglia del bioreattore tenuto per 8 settimane in regime di flusso alternato, in fig. 13 B la griglia dopo 8 settimane di perfusione continua. In fig. 13 A la griglia è pulita mentre in fig. 13 B la griglia è occlusa dalla neomatrice sintetizzata imbrigliata nelle maglie della griglia.

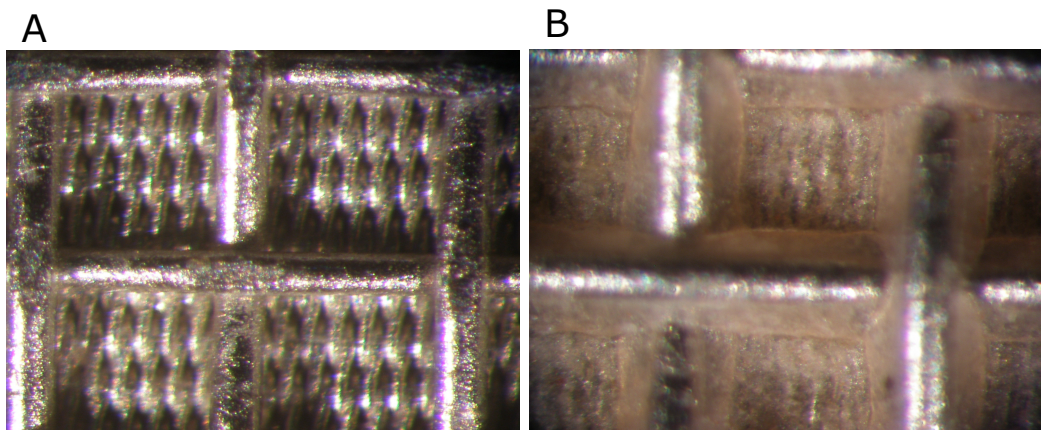


Figura 13 immagini della griglia microforata. A) griglia del bioreattore tenuto in regime alternato; B) griglia del bioreattore tenuto in regime di perfusione continua.

Inoltre l'analisi fluidodinamica dei flussi all'interno della camera di maturazione sono stati analizzati con la CFD.

Il campo delle velocità è stato calcolato sia nel caso il regime di flusso sia perfusivo che tangenziale.

Nel grafico 14 sono riportati i vettori velocità all'interno della camera di maturazione sia nel caso della perfusione (A) e del flusso tangenziale (B), in quest'ultimo caso poiché il problema è simmetrico si può riportare solo metà camera.

Come si può vedere dai grafici nel primo caso la velocità hanno una direzione perpendicolare al diametro del bioibrido nell'altro caso parallelo al diametro del bioibrido.

I moduli della velocità sono stati riportati in grafico (fig. 15), nel caso della perfusione (fig. 15 A) è stato riportato sull'asse delle x il diametro del bioibrido (0.035m) e sull'asse delle y la componente lungo x della velocità V_y in termini di ms^{-1} . Il valore negativo è dovuto al fatto che la direzione della velocità è verso il basso.

Nel caso di flusso tangenziale (fig. 15 B) è stato riportato sull'asse delle x la metà dello spessore del bioibrido e della griglia microforata (1.2 mm) e sull'asse delle y la componente lungo y della velocità V_x in termini di ms^{-1} .

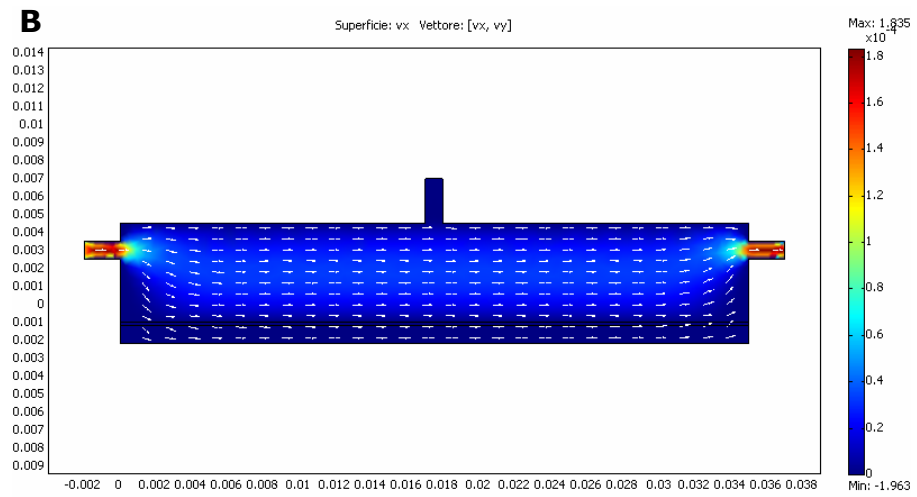
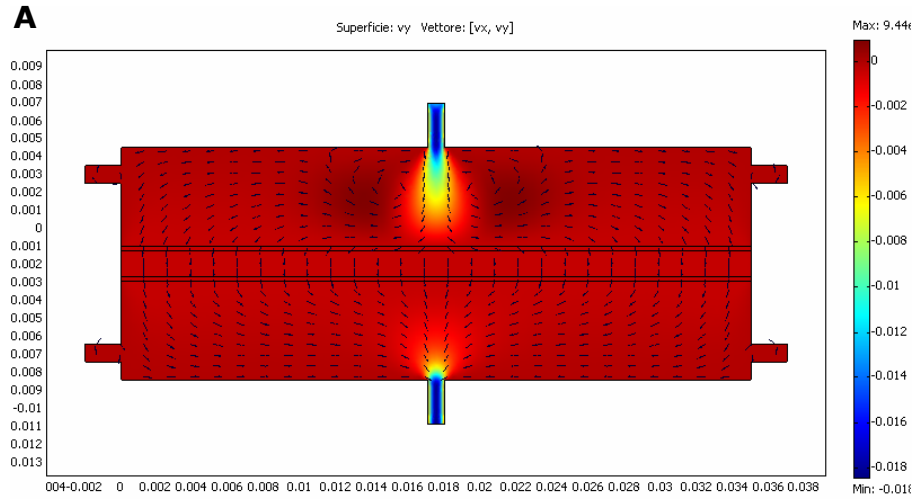


Figura 14 Profilo delle velocità nella camera di maturazione. A) Perfusione; B) Flusso tangenziale

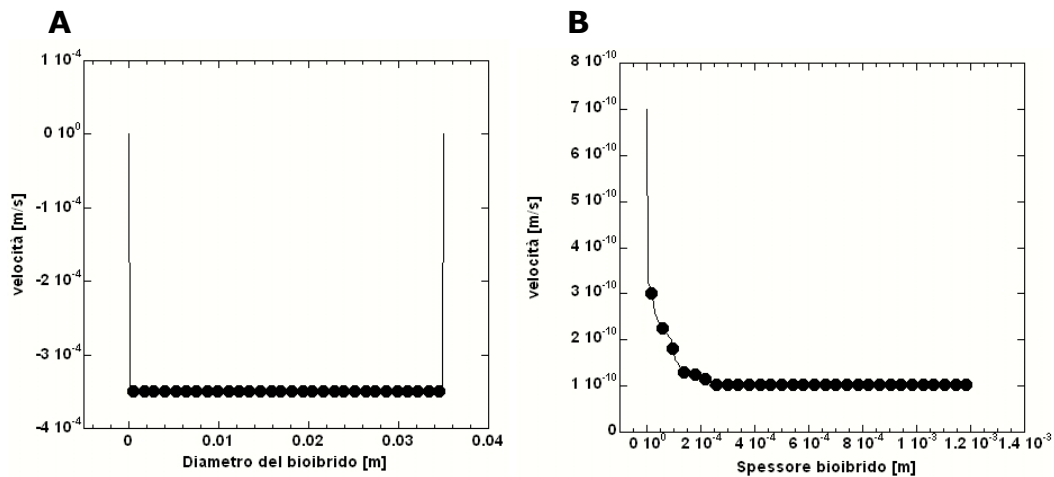


Figura 15 A) Andamento della velocità lungo lo spessore del bioibrido in condizioni di flusso tangenziale; B) Andamento della velocità lungo il diametro del bioibrido in condizioni di flusso perfusivo.

Il flusso tangenziale garantisce un rifornimento attivo di nutrienti all'interfaccia del bioibrido senza generare un flusso interstiziale. Inoltre, il flusso tangenziale da solo può non essere in grado di fornire un apporto di nutrienti adeguato, soprattutto nelle regioni più interne del bioibrido rendendo così necessario l'introduzione del flusso a perfusione. Il flusso tangenziale e perfusivo sono stati utilizzati alternandoli ogni 24 ore. Tali condizioni migliorano le forze di taglio dovute al flusso continuo a perfusione e incrementano il tempo di persistenza delle componenti della matrice extracellulare sintetizzata de-novo favorendo il loro assemblaggio nello spazio pericellulare. Utilizzando flussi tangenziali, è possibile, migliorare, soprattutto nei primi giorni di coltura, il rimodellamento e lo sviluppo della nuova matrice sintetizzata dai fibroblasti bovini.

Le analisi SEM e quelle istologiche del bioibridi coltivati per 8 settimane sono riportate nelle figure 16 e 17.

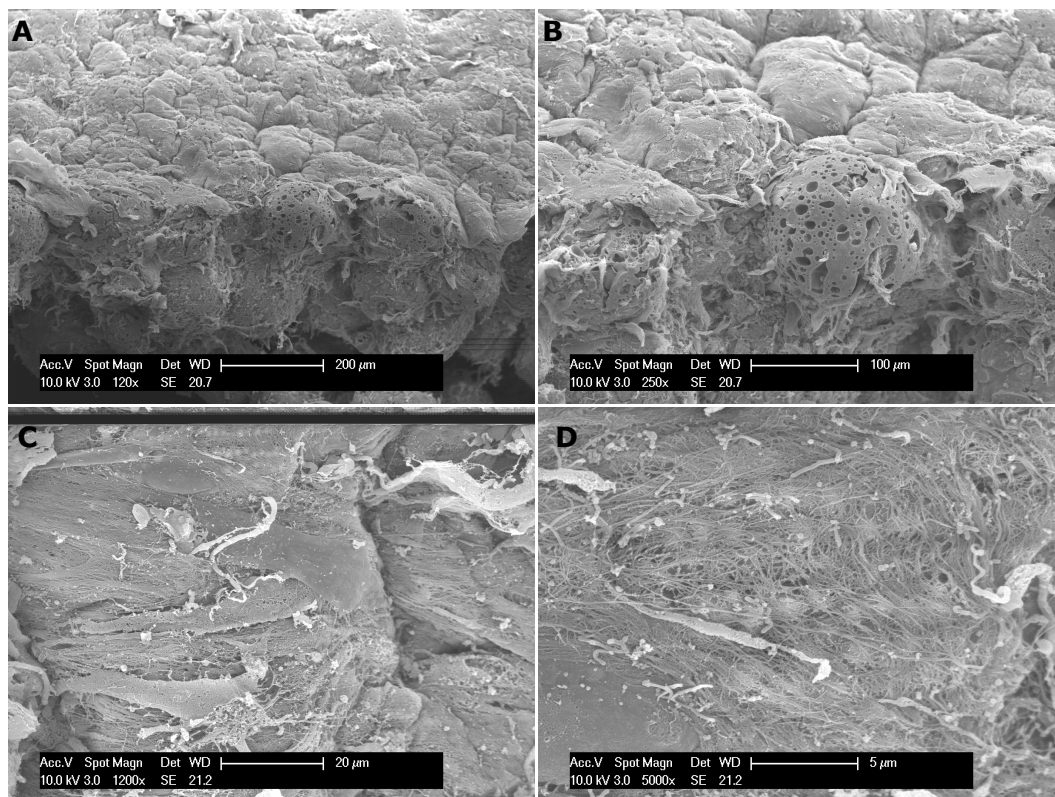


Figura 16 immagini SEM. A) superficie del bioibrido la barra è 200μm; B) ingrandimento della superficie del bioibrido la barra è 5 μm; C) immagini a maggior ingrandimento è possibile vedere la sezione interna del bioibrido e le microbiglie la barra è 200μm; D) ingrandimento di C la barra è 100μm

Le immagini SEM del bioibrido tenuto in coltura per 8 settimane con flusso alternato mostrano un costruito ben assemblato in cui le microbiglie sono completamente circondate dalle cellule e dalla matrice extracellulare.

In fig. 16 A e 16 B sono riportate due immagini SEM in cui si può osservare che la superficie del bioibrido è liscia non si vedono le biglie perché completamente ricoperta da ECM, lungo la sezione si possono osservare le microbiglie anche se le porosità sono completamente invase dalla matrice.

In fig. 16 C e 16 D è mostrato un particolare della superficie del bioibrido, completamente rivestito da collagene e cellule, a maggior in gradimento è possibile osservare la struttura sub-fibrillare della *neo*-matrice prodotta e si nota anche una infiltrazione (o fuoriuscita) di tessuto dai pori delle microsferi, il che dimostra una efficace colonizzazione delle cellule nei precursori.

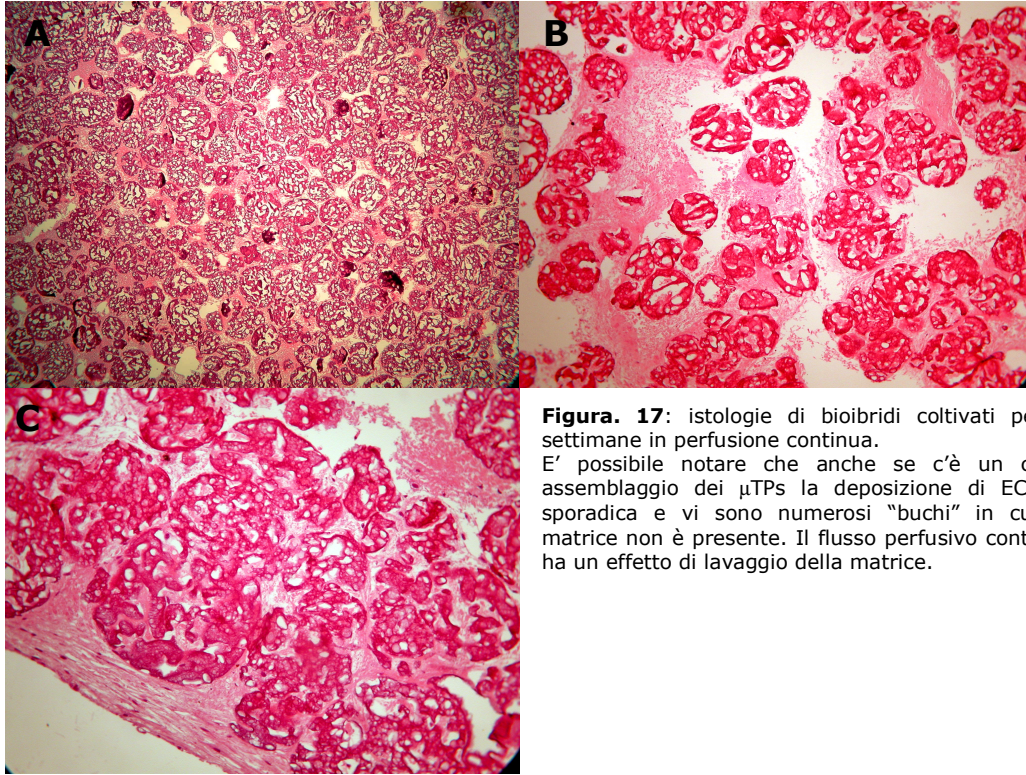


Figura. 17: istologie di bioibridi coltivati per 8 settimane in perfusione continua. E' possibile notare che anche se c'è un certo assemblaggio dei μ TPs la deposizione di ECM è sporadica e vi sono numerosi "buchi" in cui la matrice non è presente. Il flusso perfusivo continuo ha un effetto di lavaggio della matrice.

Sono state riportate solo le istologie dei bioibridi coltivati per 8 settimane perché più significative, quelle dei bioibridi coltivati per 1 settimana mostrano che i μ TPs sono assemblati ma c'è una scarsa deposizione di matrice.

Le istologie dei bioibridi coltivati per 8 settimane mostrano che i μ TPs sono ben assemblati e l'ECM è presente dentro e intorno le microbiglie, ma nei bioibridi coltivati in condizioni di flusso alternato la deposizione di matrice è maggiore che in quelli coltivati in perfusione continua, proprio perché l'alternanza del flusso ha un minor effetto di lavaggio della matrice *neo-sintetizzata*.

In figura 17 sono riportate le istologie di bioibridi coltivati per 8 settimane in perfusione continua, a basso ingrandimento (fig. 17 A) è possibile osservare un certo assemblaggio dei μ TPs ma in numerose zone la matrice è assente come è possibile osservare meglio a maggior ingrandimento (fig. 17 B e C).

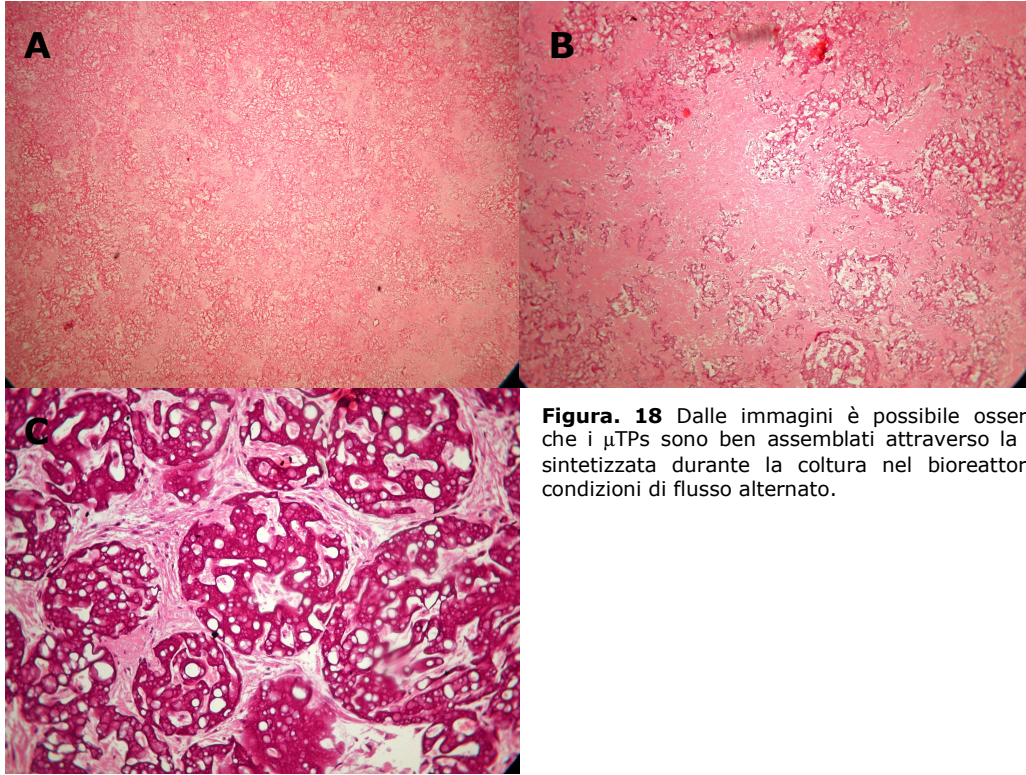


Figura. 18 Dalle immagini è possibile osservare che i μ Tps sono ben assemblati attraverso la ECM sintetizzata durante la coltura nel bioreattore in condizioni di flusso alternato.

In fig. 18 sono riportate le istologie di bioibridi tenuti in coltura per 8 settimane in flusso alternato la matrice è più compatta, il che spiega il maggiore modulo elastico di questi bioibridi rispetto a quelli coltivati in perfusione continua (fig. 10).

Solo in alcune zone del bioibrido è possibile osservare un principio di degradazione delle microbiglie che lascia maggior spazio per la deposizione di matrice.

4.5 Conclusioni

In questa parte del lavoro di dottorato si è esplorato il potenziale utilizzo dei precursori di tessuto micrometrici μ TPs come *building block* per la costruzione di un tessuto equivalente al derma *in vitro*.

L'assemblaggio dei μ TPs e il processo di coltura del bioibrido è stato praticato con l'utilizzo di un bioreattore a perfusione.

I risultati riportati, riguardo la composizione, la struttura e le proprietà meccaniche dei bioibridi ottenuti, mostrano come le condizioni di coltura possano largamente influenzare non solo la vitalità cellulare e l'attività biosintetica, ma anche la capacità di assemblaggio della matrice in un tessuto funzionale. L'ottimizzazione delle condizioni di coltura risulta quindi una condizione imprescindibile per l'ottenimento di tessuti derma-equivalenti.

Dai risultati ottenuti l'utilizzo della perfusione continua ad una certa portata provoca un "effetto di lavaggio" della matrice *neo-sintetizzata* ed evidentemente non ne permette l'assembling.

Al contrario l'utilizzo di un flusso alternato migliora le forze di taglio dovute al flusso perfusivo continuo e incrementa il tempo di persistenza delle componenti della matrice extracellulare sintetizzata *de-novo* favorendo il loro assemblaggio nello spazio pericellulare. Utilizzando flussi tangenziali, è possibile, migliorare, soprattutto nei primi giorni di coltura, il rimodellamento e lo sviluppo della nuova matrice sintetizzata dai fibroblasti bovini.

L'ottenimento di bioibridi compatti, con un'omogenea distribuzione di matrice extracellulare e con una certa consistenza meccanica mostrano che la strategia *bottom-up* proposta può essere uno strumento utile per l'ingegnerizzazione di tessuti soft *in vitro*.

Naturalmente maggiori informazioni sull'assembling del tessuto sono necessarie, e diverse condizioni di flusso devono essere esplorate.

Difatti l'ottimizzazione delle condizioni di flusso sono comunque rese difficili anche dal fatto che non sono ancora perfettamente noti i processi di assemblaggio e di rimodellamento dei tessuti *in vitro*.

Mentre i processi di biosintesi cellulare sono stati ampiamente studiati e discussi, poco noti sono, invece, i meccanismi che regolano e controllano l'assemblaggio delle componenti molecolari della matrice extracellulare che forma il tessuto. In particolare, poco conosciuti in letteratura sono i parametri e le cinetiche che regolano il complesso meccanismo dell'assemblaggio che prende luogo all'interno

dello spazio extracellulare a partire dalle molecole della matrice neo-sintetizzate e il possibile ruolo che le cellule hanno in questo contesto rendendo non facile l'ottimizzazione delle condizioni di flusso.

Infine un altro aspetto evidenziato dalle analisi istologiche è che la lenta degradazione delle microsfeere di gelatina commerciali altamente crosslinkate limita un' estensiva produzione di matrice a causa del limitato spazio disponibile tra le biglie adiacenti. Una tale evidenza suggerisce l'utilizzo di supporti caratterizzati da una cinetica di degradazione più rapida.

Bibliografia

1. T.Sun et al. (2005) "**Development of a closed bioreactor system for culture of Tissue-Engineered Skin at an Air-liquid interface**" Tissue Eng. 11, 1824-1831
2. Carrier, R.L. et al. (2002) "**Perfusion improves tissue architecture of engineered cardiac muscle.**" Tissue Eng. 8, 175-188
3. C.R. Halberstadt et al. (1994) "**The in vitro Growth of a Three-Dimensional Human Dermal Replacement using a single Pass Perfusion System**" Biotechnology and Bioengineering Vol. 43, 740-746
4. S. Mizuno et al. (2004) "**Hydrostatic fluid pressure promotes cellularity and proliferation of human dermal fibroblast in a three-dimensional collagen gel/sponge**" Biochemical Engineering journal 203-208
5. Carrier, R.L. et al. (2002) "**Perfusion improves tissue architecture of engineered cardiac muscle.**" Tissue Eng. 8, 175-188,
6. T. Dvir et al. (2006) "**A Novel Perfusion Bioreactor Providing a Homogenous Milieu for tissue Regeneration**" Tissue Engineering Vol 12 No 10
7. S. Mizuno, F. Allemann, J. Glowacki (2001) "**Effects of medium perfusion on matrix production by bovine chondrocytes in three-dimensional collagen sponges**", J. Biomed. Mater. Res. 56 368-375

Capitolo 5

Realizzazione di costrutti tessutali 3D *disc-shape* e *fiber-shape* in condizioni statiche

5.1 Introduzione

Anche in questo capitolo verrà descritta la seconda fase del processo ovvero, l'assemblaggio dei precursori micrometrici di tessuto in un costrutto 3D di forma predefinita. I precursori micrometrici hanno il vantaggio di poter essere processati per *injection moulding* dando così la possibilità di riempire stampi di forme diverse. Le forme che verranno scelte saranno quella di un disco e quella di una fibra, diversamente da quanto riportato nel precedente capitolo, però, la coltura del costrutto 3D non sarà dinamica ma statica, e i precursori di tessuto sono ottenuti utilizzando microsfere di gelatina ad elevata velocità di degradazione.

Al termine della coltura i costrutti verranno caratterizzati e i risultati della caratterizzazione saranno riportati.

5.2. Caricamento dei mould con i μ TPs e condizioni di coltura

5.2.1 mould fiber-shape

Successivamente alla fase di semina i (Cap. 3 par. 3.3) i μ TPs ottenuti utilizzando microsfere "*home made*" sono trasferiti in microtubi porosi di teflon (PTFE) espanso (Markel Corporation), la porosità è ottenuta dall'espansione, che crea dei microscopici buchi nella struttura del materiale, rendendolo poroso (fig 1).

I microtubi presentano un diametro interno di 430 μ m, un diametro esterno di 860 μ m e presentano una superficie porosa la cui dimensione dei pori è di circa 6 μ m. (Figure 1a e 1b).

Le microsfere seminate sono state trasferite nei microtubi per mezzo di un sistema come mostrato in Figura 8.

Tale sistema è costituito da una camera (A) contenente la sospensione di μ TPs; la camera è collegata ad una pompa (P) mediante una valvola (D), è dotata di un'uscita (B) collegata al microtubo e, in corrispondenza di detta camera si trova un apposito sistema di agitazione, quale ad esempio un agitatore magnetico.

Aperto la valvola, la pompa trasferisce la sospensione di μ TPs dalla camera al microtubo attraverso l'uscita. La sospensione di μ TPs viene mantenuta in agitazione mediante il sistema di agitazione, così che la distribuzione di microsfere nella

sospensione risulti omogenea. La parte terminale del tubo in PTFE viene sigillata, in modo da mantenere le microsferi all'interno del tubo e lasciando che il mezzo di coltura possa defluire attraverso le porosità del microtubo.

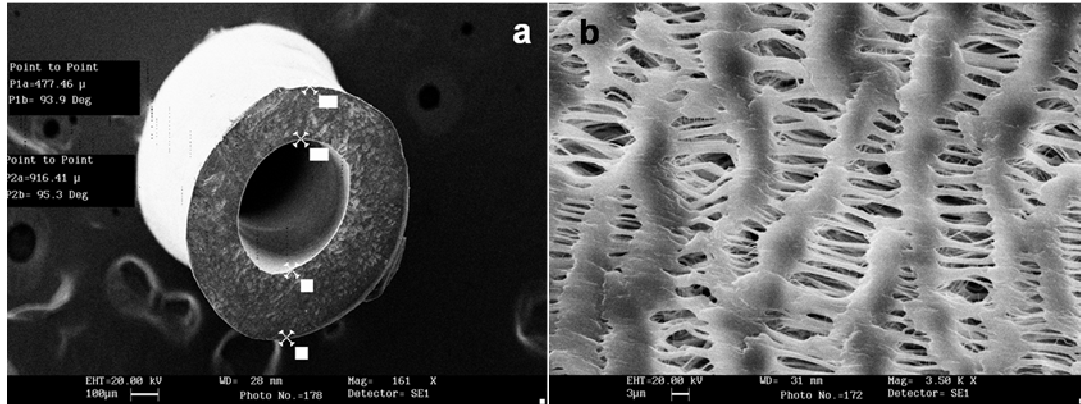


Figura 1: a) Immagine SEM della sezione trasversale del microtubo di PTFE la barra è 100μm; b) Immagine SEM della parete del microtubo di PTFE, l'immagine evidenzia la porosità della parete del tubo, la barra è 3μm

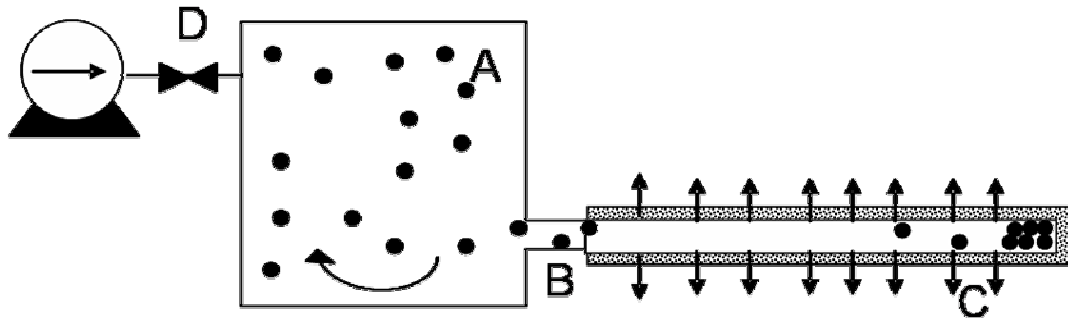


Figura 2: Rappresentazione schematica del sistema per il riempimento del microtubo di PTFE con i precursori di tessuto micrometrici. A) camera in cui si trova la sospensione di precursori di tessuto in condizioni di agitazione per evitarne la sedimentazione. B) connessione tra la camera e il tubo di PTFE per permettere il passaggio dei precursori di tessuto. C) le frecce indicano la fuoriuscita del mezzo in cui sono sospesi i precursori di tessuto attraverso le porosità della parete del tubo. D) Valvola la cui apertura permette che la sospensione della camera A venga spinta verso il tubo.

I microtubi contenenti i μ TPs sono stati quindi mantenuti in condizioni di coltura statica in petri-dish con mezzo di coltura Modified eagles's medium [MEM-high glucose concentration (4,5 g/L)], 20% heat-inactivated FBS, 100μg/ml glutamine and 100U/ml penicillin/streptomycin) in presenza di acido ascorbico 50μg/ml per stimolare la deposizione di matrice extracellulare.

5.2.2 mould disc-shape

μ TPs ottenuti utilizzando microsferi "home made" sono trasferiti in un mould a forma di disco ($H=1\text{mm}$; $D=10\text{mm}$), la geometria è molto simile alla camera di maturazione del bioreattore descritto nel capitolo IV.

In un disco di silicone (fig. 3A) ($h=1\text{mm}$; $D=35\text{mm}$) sono stati ricavati con una fustella 4 mould ($D=10\text{mm}$), 2 griglie microforate (fig. 3B) ($D=35\text{mm}$) vengono pressate sopra e sotto il disco di silicone e tenute insieme attraverso due anelli di teflon (fig. 3C) avvitati l'uno all'altro con delle viti.

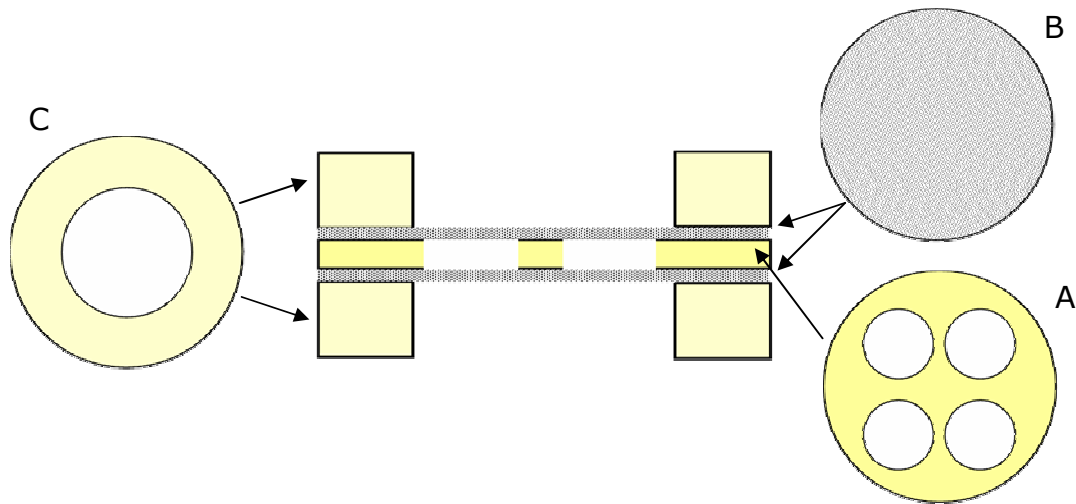


Figura 3: Rappresentazione del sistema per la coltura di costrutti tessutali. A) mould di silicone per l'alloggiamento dei μ TPs; B) griglia microforata; C) anello di teflon

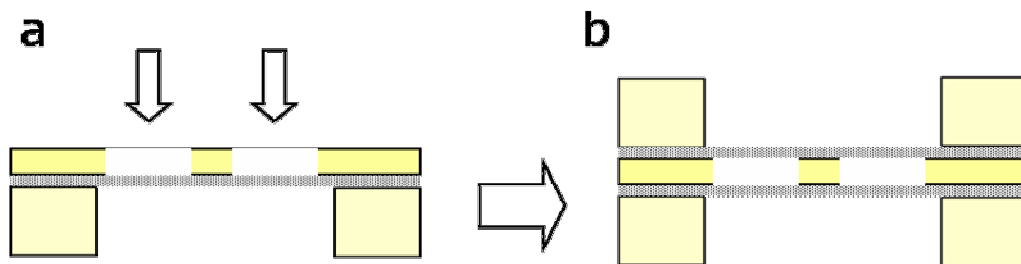


Figura 4: Rappresentazione del sistema per la coltura di costrutti tessutali. a) configurazione del sistema per il riempimento del mould; b) configurazione del sistema chiuso.

Successivamente alla fase di semina la sospensione di mezzo e μ TPs è prelevata dalla spinner flask e versata in tubi Falcon, i μ TPs sono fatti sedimentare eventualmente anche per mezzo di centrifugazione.

Sul fondo della falcon si creerà una sospensione molto concentrata di μ TPs.

Per il riempimento del mould la sospensione è prelevata con una pipetta e depositata nel mould di silicone posto sulla griglia microforata nella configurazione mostrata in fig. 4a.

La griglia microforata drena il mezzo di coltura e trattiene i μ TPs, quando il mould è completamente riempito l'altra griglia verrà pressata contro il disco di silicone e l'anello di teflon superiore avvitato a quello inferiore per chiudere il sistema (fig.4b).

Questa configurazione permette la coltura di 4 costrutti contemporaneamente, è facile intuire che la forma e la dimensione dei dischi possono essere cambiati cambiando il mould di silicone.

Il sistema chiuso (fig.4b) viene poi posto in condizioni di coltura statica in petri-dish con mezzo di coltura Modified eagles's medium [MEM-high glucose concentration (4,5 g/L)], 20% heat-inactivated FBS, 100 μ g/ml glutamine and 100U/ml penicillin/streptomycin) in presenza di acido ascorbico 50 μ g/ml per stimolare la deposizione di matrice extracellulare.

5.3 Caratterizzazione dei costrutti

5.3.1 Analisi istologica

Per le analisi istologiche parti dei biobridi a diversi tempi di coltura sono stati sciacquati in PBS e poi fissate in formalina al 10% per 24h.

Al fissaggio segue una disidratazione in una serie crescente di alcool (75°, 85°, 96°, 100°) ciascun step di 10 min, e l'inclusione in paraffina.

Sezioni di 5 μ m ciascuna effettuate mediante taglio al microtomo e colorate con ematossilina per 10 min seguita da eosina per 20 min a temperatura ambiente.

Un vetrino copri oggetto è infine montato affinché sia possibile effettuare le osservazioni del costrutto al microscopio.

5.3.2 Analisi TEM

I campioni sono stati fissati con gluteraldeide alla concentrazione 2.5% (v/v). il fissaggio inizia a temperatura ambiente ed è seguito da conservazione nel fissativo per tre giorni a 4°C. Successivamente i campioni sono stati lavati due volte in 100mM di buffer cacodilato a pH 7.2 per 10 minuti a temperatura ambiente.

Un secondo fissaggio viene fatto a 4°C over night in osmio 1% (w/v) in tampone cacodilato 100mM pH 7.2. Infine viene effettuata una disidratazione in soluzioni a concentrazione crescenti di etanolo (10, 30, 50, 70, 90, 100, and 100% di nuovo, ciascuno step dura 10 min a temperatura ambiente). Per l'osservazione al microscopio le sezioni del campione sono state tagliate con l'ultramicrotomo.

5.3.3 Analisi SEM

Per le analisi SEM i bioibridi sono stati fissati con gluteraldeide al 2.5%, il fissaggio è iniziato a temperatura ambiente seguito da conservazione nel fissativo per 3 giorni a 4°C.

I campioni sono poi lavati in 100mM di tampone cacodilato per 10 min a temperatura ambiente. Un secondo fissaggio viene fatto in Osmio tetrossido all' 1% in tampone cacodilato 100mM over night a 4°C. Successivamente i campioni sono stati disidratati decrementando l'acqua e incrementando la concentrazione di etanolo (10%, 30%, 50%, 70%, 90% , 100% e di nuovo 100% per dieci min a temperatura ambiente). Dopodichè i campioni sono stati trattati con anidride carbonica liquida usando il Critical point.

Infine le osservazioni e le micrografie sono effettuate con un microscopio a scansione elettronica.

5.3.4 Analisi istochimica: Tricromica di Mallory

Ciascun campione è stato fissato in formalina al 10% per 24 ore, deidratato in alcol ed incluso in paraffina. Sezioni di 5 µm sono state tagliate al microtomo e colorate in una soluzione di fucsina acida per 2 min. seguito dall'incubazione in soluzione di acido fosfomolibdico per altri 2 min.

Dopo un lavaggio veloce in acqua distillata, i vetrini sono incubati in una soluzione di orange G e di blu di metilene per 15 min. Infine, i vetrini sono stati deidratati, montati e osservati al microscopio.

5.4 Risultati e discussione

Le microbiglie "home made" ingegnerizzate in laboratorio sono state utilizzate per ottenere bioibridi di forma differente, sono stati ottenuti sia fibre che dischi di tessuto derma-equivalente, l'aspetto macroscopico di questi bioibridi è di un costruito omogeneo e molto flessibile (Fig 5)

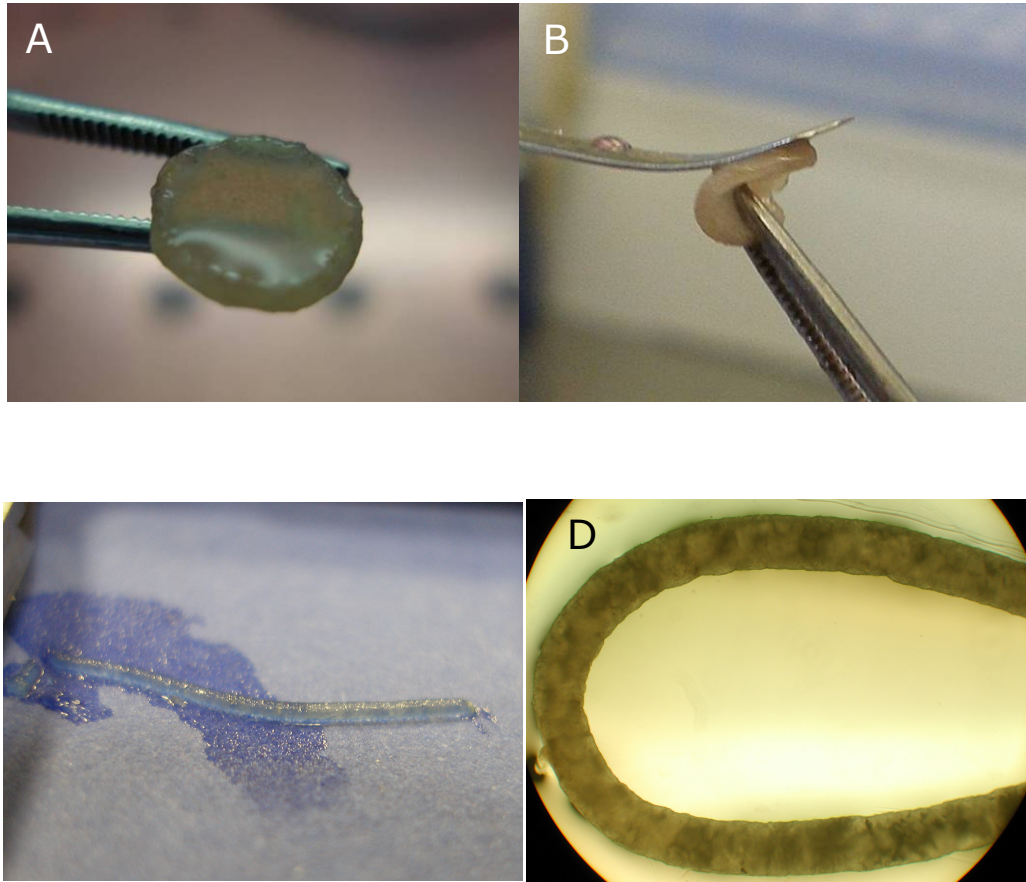


Figura 5: A e B) due immagini di un bioibrido a forma di disco ottenuto dopo 2 settimane di coltura statica come si può vedere dalle immagini il bioibrido è compatto e flessibile, la superficie completamente liscia. C e D) due diversi ingrandimenti di bioibridi a forma di fibra, anche qui è evidente la compattezza e la flessibilità del bioibrido ottenuto.

Anche dalle immagini ad ingrandimento più spinto (fig. 5 D) non è possibile distinguere i singoli μ TPs che sono assemblati in unico costrutto.

In fig. 6 sono riportate le immagini al SEM di fibre di tessuto equivalente ottenute dopo 2 settimane di coltura. In fig. 6 A si può osservare un particolare della superficie, le microsferine non si vedono perché completamente ricoperte dalla ECM, in fig. 6B si può osservare che lo spessore della fibra è omogeneo per tutta la sua lunghezza.

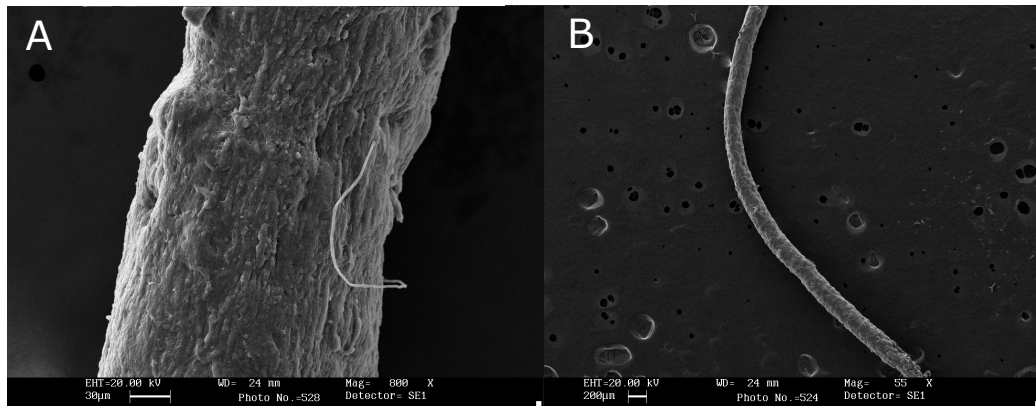


Figura 6: A e B) due immagini SEM di fibre di tessuto ottenute dopo 2 settimane di coltura. A) particolare della superficie non si vedono le microsferine perché completamente ricoperte dalla ECM barra 30µm. B) lo spessore della fibra è omogeneo per tutta la sua lunghezza barra 200µm.

Le istologie sulle fibre confermano l'abbondante deposizione di matrice che tiene insieme le microsferine, inoltre è possibile notare che laddove c'è più spazio tra le singole microsferine la deposizione di ECM è maggiore (fig. 7).

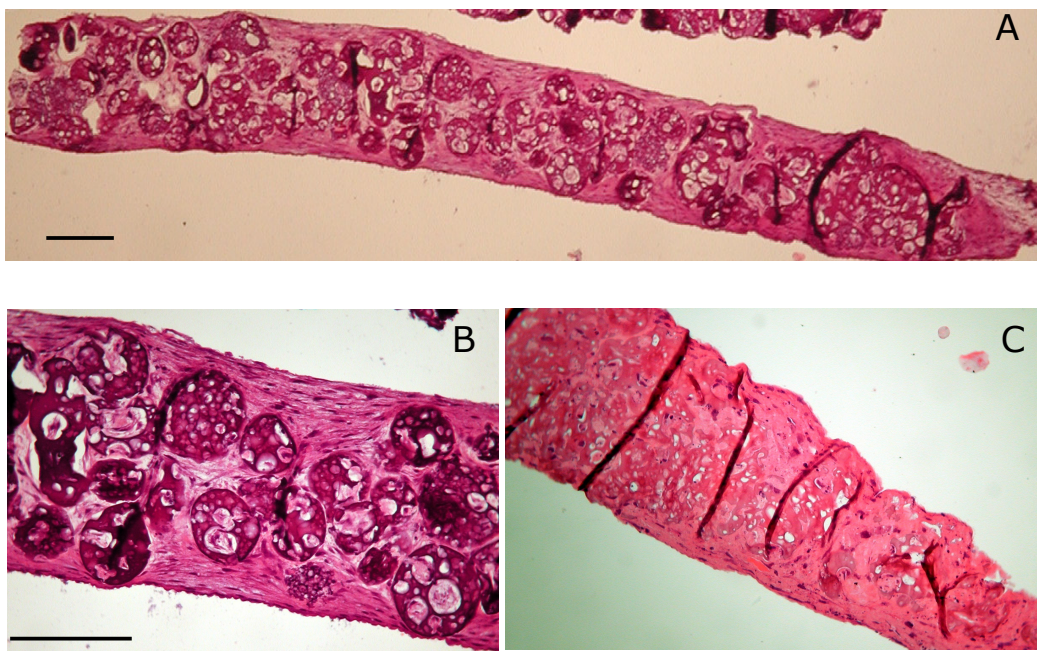


Figura 7: istologie di fibre di neo tessuto coltivate per 2 settimane. A e B) fibra ottenuta dall'assemblaggio di µTPs realizzati utilizzando biglie crosslinkate al 20% di GAL; barra 200µm. C) fibra ottenuta dall'assemblaggio di µTPs realizzati utilizzando biglie crosslinkate al 10% di GAL; barra 200µm.

La percentuale di crosslinking delle microsfele inoltre, ne influenza la degradazione infatti le fibre ottenute utilizzando le microsfele crosslinkate al 10% (fig. 7 C) mostrano come si può notare dalle istologie, un principio di degradazione dopo 2 settimane di coltura..

In fig. 8 sono riportate le immagini istologiche di bioibridi a forma di disco coltivati per 2 settimane, questi bioibridi provengono dall'assemblaggio di μ TPs ottenuti con microbiglie crosslinkate al 10%, diversamente dalle analisi mostrate in precedenza (capitolo 4), ivi si nota un tessuto quasi completamente costituito da ECM, con l'eccezione di poche biglie, peraltro in fase di degradazione. La densità cellulare è relativamente modesta, così come nel tessuto dermico nativo.

Nelle immagini le microbiglie in degradazione sono indicate dalle frecce; hanno perso la tipica morfologia sferica e le porosità sono collassate, le microbiglie la cui degradazione non ha ancora avuto inizio sono poche e sono facilmente distinguibili anche perché si colorano di un viola più intenso diversamente da quelle in degradazione.

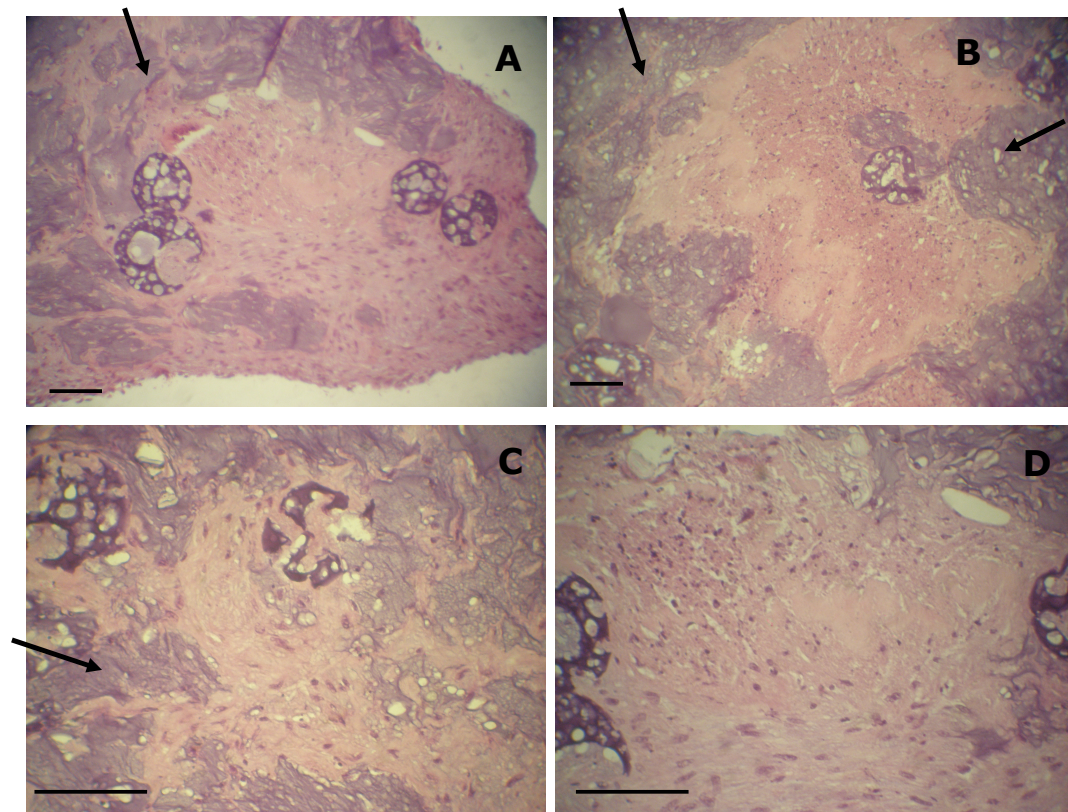


Figura 8: istologie di bioibridi coltivati per 2 settimane. A e B) le frecce indicano le microsfele che si stanno degradando, assumono un colore viola chiaro; barra 100 μ m. C e D) le microsfele in degradazione lasciano spazio per la deposizione di nuova ECM; barra 100 μ m

Al fine di trarre maggiori informazioni circa la composizione di tali tessuti, si è proceduto ad effettuare una colorazione più specifica per il collagene. In figura 9 sono presentate sezioni colorate mediante tricromica di Masson. Il collagene, in blu, è il costituente più abbondante. Inoltre sono presenti zone ove l'intensità della colorazione è abbastanza marcata, la qual cosa potrebbe essere imputabile alla presenza di fasci di fibrille densamente assemblate. In altre zone, invece, si nota una colorazione più blanda ove il collagene sembra essere non essere strutturato in maniera regolare. È plausibile assumere che in tali zone il collagene sia di biosintesi più recente e sia quindi richiesto maggior tempo per una sua maturazione.

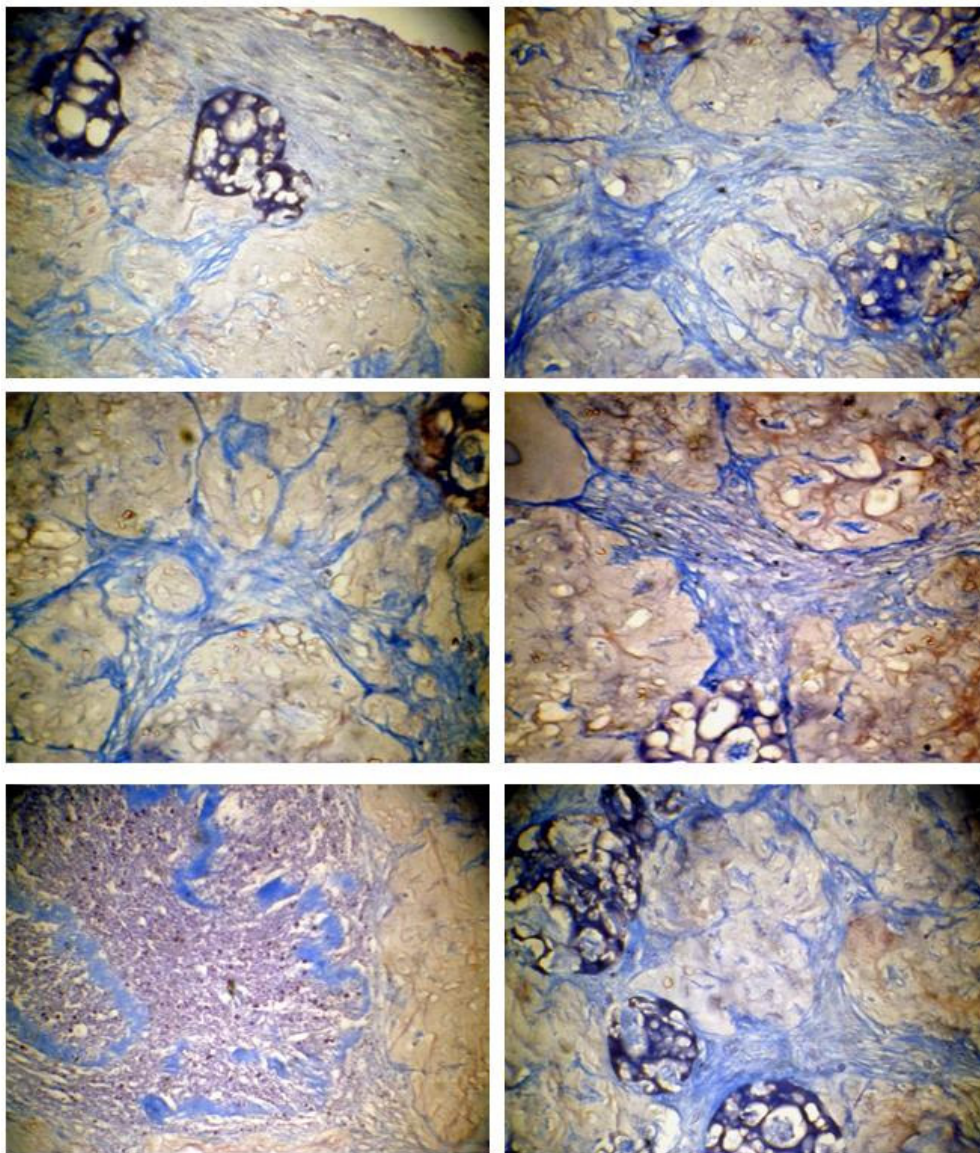


Figura 9: Analisi istochimiche con Masson tricromica, mostrano che la natura collagene della matrice extracellulare. Anche qui le biglie che si stanno degradando assumono una colorazione meno intensa.

Al fine di investigare l'ultrastruttura dei costrutti le fibre sono state sottoposte ad analisi TEM. Le immagini ottenute al TEM di fibre coltivate per 2 settimane mostrano che il collagene della matrice è correttamente assemblato in fibrille, che presentano il caratteristico bandeggio di 67nm (fig. 10 C). Il diametro delle fibrille è dello stesso ordine di grandezza di quello trovato nei tessuti nativi (25-30nm), (fig. 10 D). Anche se le fibrille di collagene sembrano essere impacchettate non è ancora possibile distinguere strutture come i bundles di fibrille. La lunghezza di ogni fibrilla è di qualche mm (fig. 10 A-B). Inoltre è stata rilevata la presenza di elementi che sembrano essere fibropositori, cioè protusioni della membrana cellulare. La base del lume del fibropositore immerso per vari micron nella cellula è un sito di nucleazione della fibrollogenesi del collagene. La punta del fibropositore è un sito di deposizione delle fibrille alla ECM (fig. 10D).

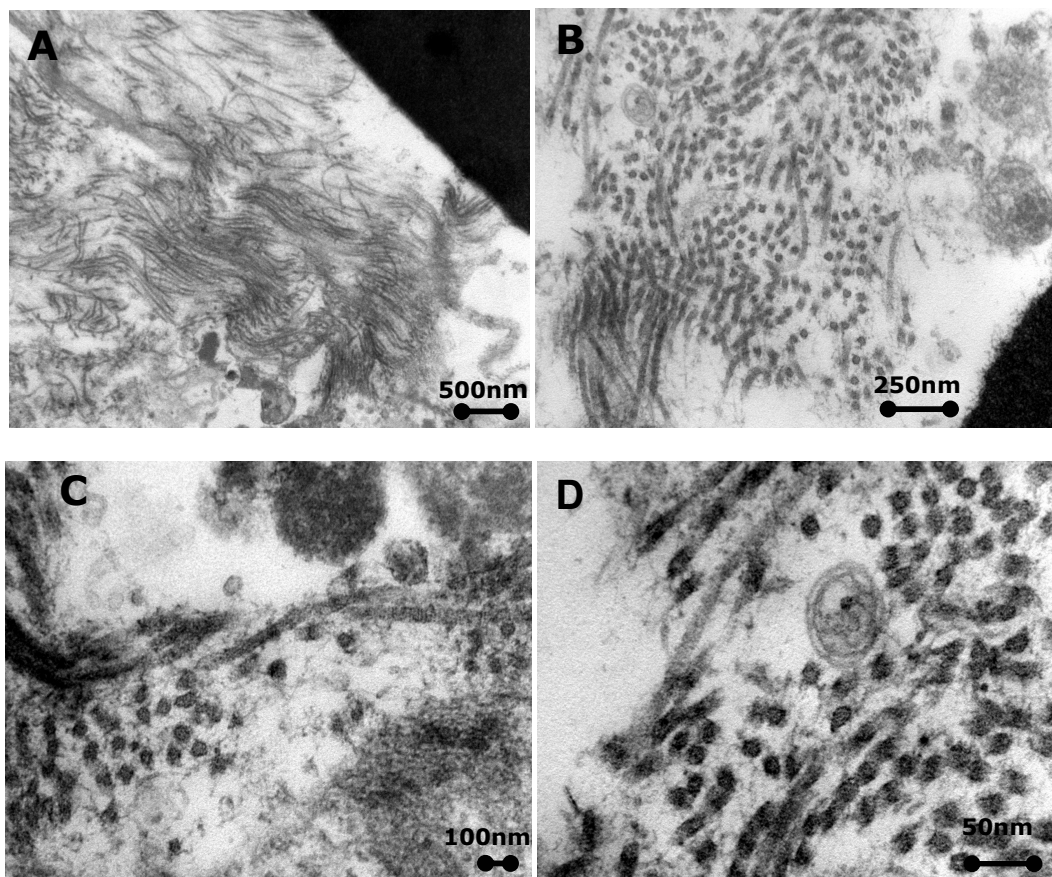


Figura 10: Analisi TEM di fibre di tessuto coltivate per 2 settimane.

5.5 Conclusioni

I risultati ottenuti nel capitolo IV mostrano come la lenta degradazione delle microsfere commercialmente disponibili (Percell) inibisca la produzione di matrice extracellulare.

I risultati riportati in questo capitolo sono ottenuti da analisi su bioibridi realizzati a partire da microsfere porose "home made" maggiormente degradabili e mostrano come la cinetica di degradazione è un parametro fondamentale per l'ottenimento di un tessuto ricco di matrice extracellulare.

In linea di principio, più alta è la velocità di degradazione maggiore è la produzione di matrice neo-sintetizzata.

Tuttavia microsfere troppo degradabili non garantiscono l'integrità strutturale del bioibridi con conseguente scarsa formazione di matrice.

Risulta quindi che esiste un valore ottimale di degradabilità delle biglie, per il quale la perdita di integrità strutturale viene bilanciata da una produzione di neomatrice.

Per quanto in questo lavoro non siano riportati studi di degradazione delle microsfere utilizzate, dalle istologie dei bioibridi sembrerebbe che la concentrazione ottimale di agente reticolante è pari al 10% in peso di Gliceraldeide (GAL) in gelatina. Una tale concentrazione garantisce una degradazione completa delle microsfere nella arco di 2-3 settimane, che è un intervallo di tempo ragionevole per effettuare una coltura in vitro di un tessuto.

I bioibridi ottenuti infatti hanno un aspetto simile a quello del derma naturale e hanno una consistenza propria, il tessuto è quasi completamente costituito da ECM con l'eccezione di poche biglie, peraltro in fase di degradazione, ed inoltre sono meccanicamente stabili e mostrano un elevata elasticità.

Inoltre la natura particolata dei μ TPs ne permette l'assemblaggio in diverse forme come dimostrato dai risultati qui riportati, entrambe le forme proposte portano a costrutti ben assemblati che mantengono la forma del mould utilizzato.