

POLITECNICO DI MILANO

Facoltà di Ingegneria Industriale e dell'Informazione  
Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica  
Ingegneria per Cellule, Tessuti e Biotecnologie



**POLITECNICO**  
**MILANO 1863**

**Progettazione di uno scaffold per  
ingegneria tissutale tracheale  
realizzabile con 3D printing**

Relatrice: Prof.ssa Sara Mantero

Correlatrice: PhD Beatrice Belgio

Tesi di Laurea Magistrale di  
Elisa Giacometti matr. 917639

Anno accademico 2019/2020

*“La vita è divertente come una  
pochette di Saccottini”*

# Indice

Indice delle abbreviazioni .....	I
Sommario .....	I
Abstract .....	XII
Introduzione .....	1
Capitolo 1 La trachea .....	2
1.1 Anatomia e fisiologia della trachea .....	3
1.2 Patologie della trachea e soluzioni chirurgiche .....	6
Capitolo 2 Ingegneria tissutale .....	8
2.1 Scaffold .....	9
2.1.1 Tecniche di stampa 3D per TET .....	10
2.1.2 Geometria .....	16
2.1.3 Materiali utilizzabili .....	18
2.1.4 Tabella riassuntiva .....	25
2.2 Cellule .....	26
2.2.1 Condrociti .....	28
2.2.2 Cellule epiteliali .....	29
2.3 Fattori di crescita .....	29
2.4 Bioreattore .....	31
Capitolo 3 Progettazione dello scaffold .....	34
3.1 Proprietà meccaniche .....	34
3.1.1 Proprietà meccaniche del tessuto nativo .....	34
3.1.2 Proprietà meccaniche del biomateriale .....	38
3.2 Fabbricazione dello scaffold .....	41
3.2.1 Stampa 3D .....	42
3.2.2 Disegno CAD e soluzioni progettuali .....	45

3.2.3 Slicing .....	50
Capitolo 4 Conclusioni e sviluppi futuri.....	52
Bibliografia .....	55

# Indice delle abbreviazioni

**3D** Tridimensionale

**BSA** Siero albumina bovina

**CAD** *Computer aided techniques*

**DMEM** *Dulbecco's Modified Eagle's medium*

**FDM** *Fused deposition modeling*

**GeIMA** Gelatina metacrilata

**hMSCs** cellule staminali mesenchimali umane

**LFDM** *Liquid frozen deposition manufacturing*

**MSCs** Cellule staminali mesenchimali

**PCL** Policaprolattone

**PGA** Acido poliglicolico

**PLA** Acido polilattico

**PLGA** Acido polilattico-glicolico

**PU** Poliuretano

**TET** *Tissue engineered trachea* – Trachea realizzata con ingegneria tissutale

**TGF** *Transforming growth factors*

**UV** Ultravioletti

# Sommario

## Introduzione

La ricostruzione della trachea è una delle maggiori sfide della chirurgia toracica quando, a seguito della resezione di una porzione estesa dell'organo, l'anastomosi delle estremità non è praticabile. Innesti protesici sintetici e tissutali permettono di riparare la porzione di tessuto danneggiato ma non sono in grado di indurre una rigenerazione di tessuto funzionale [1]. L'ingegneria tissutale tracheale (TET) propone una soluzione innovativa agli ostacoli posti dalle tecniche chirurgiche odierne, puntando alla completa rigenerazione dei tessuti che costituiscono la trachea [2].

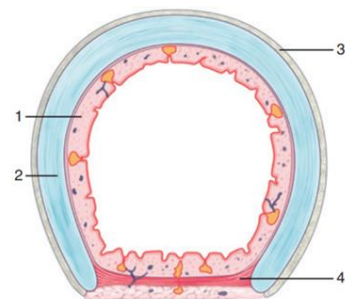
### La trachea

La trachea è un condotto di forma ovoidale situato nella porzione superiore dell'apparato respiratorio che connette la laringe ai bronchi. È deputata alla ventilazione e permette sia di intrappolare organismi patogeni e polveri sia di evacuare le secrezioni bronchiali.

Lunghezza	~12 cm
Diametro esterno	~2 cm
Spessore di parete medio	~3 mm
Altezza singolo anello cartilagineo	~4 mm
Distanza tra due anelli consecutivi	~1,5mm
Numero medio di anelli per trachea	20

Tabella I. Tabella riassuntiva delle principali misure della trachea [3]

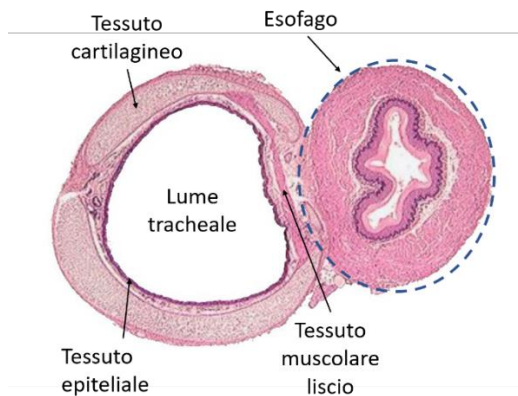
È composta da anelli cartilaginei con forma a "C" che vanno a costituire le pareti laterali e anteriore, mentre nella porzione posteriore è presente una membrana muscolare che connette i due rami cartilaginei [4]. Questi prevengono il collasso del lume durante le variazioni di pressione intraluminale e sono separati tra loro da intervalli di tessuto connettivo che conferisce alla trachea flessibilità longitudinale.



I. Struttura di un anello tracheale. 1. Tunica interna mucosa; 2. Anello cartilagineo; 3. Avventizia; 4. Membranosa. [5]

Gli anelli sono costituiti di cartilagine ialina composta principalmente di collagene di tipo II e glicosamminoglicani [6]. La membrana di tessuto muscolare liscio che connette i due rami degli anelli cartilaginei va a formare una parete contrattile che, contraendosi in risposta agli stimoli esterni, va a modificare il diametro del lume. È composta da due famiglie di fibre ortogonali tra loro: le trasversali sono responsabili della flessione degli anelli cartilaginei, le longitudinali assecondano i movimenti di deglutizione dell'esofago posto adiacente alla trachea. Il lume tracheale è rivestito di tessuto epiteliale pseudostratificato che costituisce una barriera fisica e

immunologica dall'ambiente esterno, oltre a regolare le funzioni metaboliche delle vie aeree [7]. Il tessuto sottostante all'epitelio è molto irrorato, rendendo complessa la riproduzione *in vitro* di questo tessuto [8].



*II. Sezione trasversale di trachea ed esofago. Si può osservare come l'esofago sia confinante con la regione di tessuto muscolare liscio, nella zona dove il tessuto cartilagineo si interrompe.*

### Patologie e soluzioni chirurgiche

Condizioni patologiche, traumi o complicazioni derivanti da interventi chirurgici possono portare alla resezione di porzioni più o meno estese della trachea. In caso di resezione di un segmento superiore al 50% della lunghezza totale, l'anastomosi delle due estremità tracheali non può essere eseguita e risulta necessario l'utilizzo di un sostituto tracheale per ricostruire la porzione rimossa [9]. Le opzioni chirurgiche disponibili per ottenere sostituti tracheali sono: protesi sintetiche, allograft, trapianto di trachea, compositi di tessuto autologo e ingegneria tissutale [10]. L'utilizzo di sostituti sintetici risulta limitato da problemi di biocompatibilità e mancanza di rigenerazione di tessuto funzionale, mentre i trapianti allogenici

necessitano di terapie immunosoppressive e sono limitati dal numero di donatori compatibili [11]. L'ingegneria dei tessuti rappresenta una valida alternativa in grado di rispettare i requisiti richiesti e favorire la rigenerazione dei tessuti [12].

#### Caratteristiche sostituto tracheale

Rigidezza laterale

Flessibilità longitudinale

Tenuta ermetica all'aria

Biocompatibilità: integrazione con i tessuti adiacenti, non inducendo infiammazione cronica, formazione di tessuto di granulazione, infezione ed erosione.

Bioattività: stimolazione della rigenerazione del tessuto e della ricrescita di epitelio cigliato respiratorio.

Non immunogenicità, non tossicità, non carcinogenicità

Facile impiantabilità, con tecnica affidabile, fattibile e riproducibile

Non necessitare immunosoppressori

*Tabella II. Caratteristiche da rispettare per la realizzazione di un sostituto tracheale.*

### Ingegneria tissutale

La realizzazione di una trachea ingegnerizzata (*tissue engineered trachea - TET*) sembra la soluzione ideale per la sostituzione di porzioni estese di trachea. L'interazione tra appropriati fattori di crescita, cellule e scaffold porta alla rigenerazione del tessuto desiderato, in grado di emulare le strutture biologiche e le funzioni di una trachea nativa [13]. Inoltre, sfruttando le moderne tecniche di stampa 3D è possibile ottenere design personalizzati, adattabili alla morfologia del paziente [12].

## Scaffold

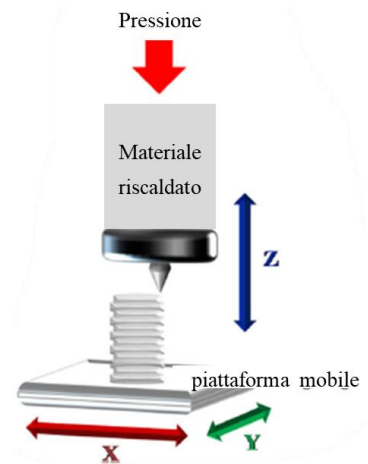
Nell'ingegneria tissutale, uno scaffold è un supporto o una matrice realizzata per facilitare la migrazione, l'adesione, la crescita di cellule o il trasporto di agenti bioattivi [7].

### Specifiche particolari scaffold per TET

Porosità ~90%
Dimensione dei pori 5-300 $\mu\text{m}$
Porosità interconnessa
Geometria simile a quella di una trachea nativa o della porzione da sostituire
Buona resistenza meccanica ( $212 \pm 18\text{N}$ )
Flessibilità simile al tessuto di trachea nativa: tensile modulus [ $10.6 \pm 1.8 \text{MPa}$ ]

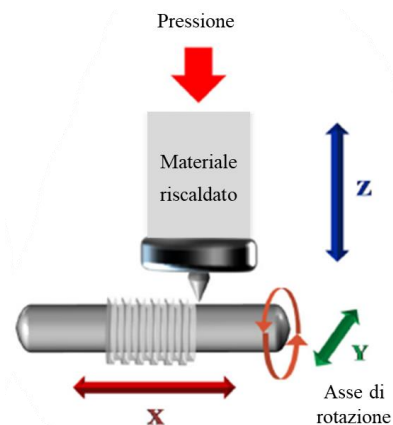
Tabella III. Specifiche di progetto particolari per la realizzazione di scaffold per ingegneria tissutale tracheale[14].

Per realizzare uno scaffold tracheale sono disponibili diversi metodi di fabbricazione. L'utilizzo della stampa tridimensionale (3D) è il più diffuso poiché consente di fabbricare scaffold paziente-specifici con un'architettura porosa ben controllata e offre la possibilità di integrare cellule in configurazioni tridimensionali, a fronte di un buon rapporto costo-beneficio [15]. La struttura stampata è modellizzata con programmi di *computer-aided-design* (CAD), riproducendo la conformazione anatomica della porzione di organo da sostituire. Esistono differenti processi di stampa 3D. Il *fused deposition modeling* (FDM) si basa sulla deposizione di filamenti di polimero termoplastico su di un supporto piano e va a generare la struttura dal basso verso l'alto [16].



III. Processo schematico di fabbricazione di uno scaffold per trachea tramite stampa 3D FDM su piattaforma mobile piana.

I limiti legati a questa tecnica di produzione sono: l'incapacità di stampare strutture sporgenti senza supporto, la non sempre corretta adesione tra gli strati depositati, l'appiattimento dei filamenti depositati e un'accuratezza legata al diametro dell'ugello utilizzato. L'evoluzione del FDM è rappresentata di un mandrino cilindrico rotante come struttura di appoggio per la stampa[17].

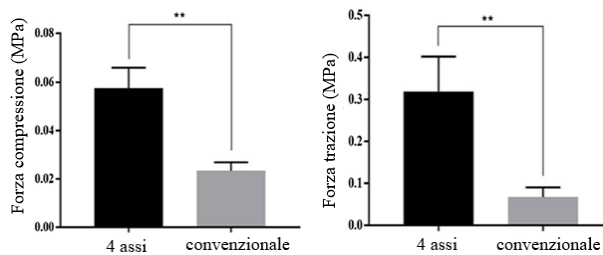


IV. Processo schematico di fabbricazione di uno scaffold per trachea tramite stampa 3D FDM su mandrino rotante.

Permette di ottenere migliore accuratezza nella riproduzione del modello CAD, maggiore uniformità nella stampa dei filamenti e una



maggior resistenza a trazione e compressione rispetto agli scaffold convenzionali.

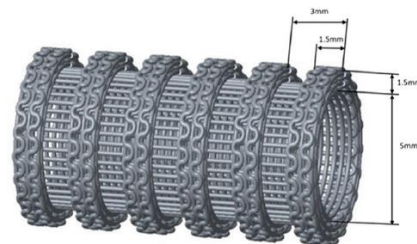


V. Proprietà meccaniche di scaffold in PCL per trachea stampati 3D. A sinistra resistenza a compressione, a destra resistenza a trazione [17].

Una tecnologia simile alla FDM è la *Liquid-frozen deposition manufacturing (LFDM)*; un processo di produzione a freddo adatto alla realizzazione di scaffold in poliuretano (PU) biodegradabile *water based*. Non essendo necessario il riscaldamento del materiale si evita l'idrolisi termica e vengono mantenute intatte le proprietà meccaniche del polimero durante il processo di stampa [10]. È possibile utilizzare anche la stampa tridimensionale indiretta, in cui si parte da uno stampo sacrificale realizzato con stampa 3D nel quale viene colato il materiale polimerico che andrà a costituire lo scaffold [18]. Gli scaffold risultanti presentano buona flessibilità longitudinale, porosità ben interconnessa e con dimensione dei pori ottimale per facilitare la colonizzazione da parte delle cellule. Questa tecnica risulta tuttavia complessa e implica lo spreco di una grossa quantità di materiale. Il bioprinting è un metodo di *additive manufacturing* che consiste nella stampa di biocompositi contenenti cellule, biopolimeri e componenti bioattivi [19]. Esistono diverse

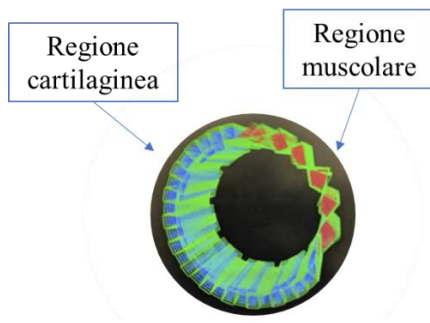
tipologie di 3D bioprinting tra cui scegliere in base al biomateriale utilizzato, alla tipologia cellulare scelta e al livello di vitalità cellulare desiderato post stampa[20]. Il bioprinting ad estrusione (*extrusion-based bioprinting*) consente di realizzare costrutti con un buon livello di risoluzione e vitalità cellulare utilizzabili nel campo della TET [21].

Uno dei requisiti particolari per la realizzazione di scaffold tracheali è la riproduzione di una geometria simile a quella della trachea nativa o della porzione da sostituire. Quando viene utilizzata la tecnica di stampa per FDM, utilizzando come piattaforma una superficie piana, è possibile ottenere una struttura con sezione ovoidale più simile a quella nativa, quando, invece, viene utilizzato come base un mandrino cilindrico rotante la geometria del lume è dettata dalla forma del mandrino.



VI. Scaffold realizzato su mandrino cilindrico[12]

È inoltre possibile scegliere di differenziare lo scaffold in più regioni con geometrie differenti che rispondano alle necessità per la rigenerazione dei diversi tessuti costituenti la trachea [2].

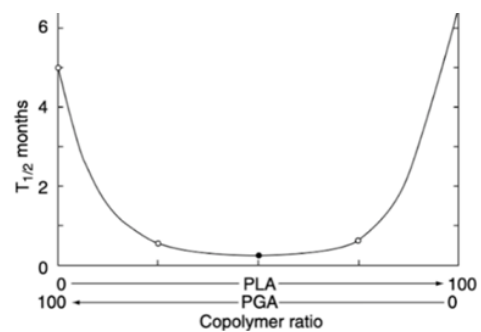


VII. Design di trachea in PCL con regioni separate per la formazione di muscolo liscio (rosso) e cartilagine (blu) [2].

Nel caso di stampa tridimensionale indiretta la geometria è dettata dalla forma dello stampo sacrificale che viene utilizzato.

La resistenza meccanica, importante per prevenire il collasso delle vie aeree, è una delle specifiche di maggiore importanza che uno scaffold tracheale deve rispettare e questa dipende principalmente dalla composizione e dalla lavorazione del materiale. I polimeri utilizzati per la fabbricazione di scaffold per ingegneria tissutale possono essere classificati in due categorie: naturali, la cui origine viene da un materiale biologico, e sintetici, interamente sintetizzati o prodotti [1]. Una combinazione di materiali naturali e sintetici permette di ottenere uno scaffold con eccellente bioattività e adeguate proprietà meccaniche [22]. Il tempo di degradazione deve essere tale da garantire che lo scaffold sorregga il tessuto durante tutto il periodo di rigenerazione. I materiali più utilizzati per la realizzazione di TET sono: acido poliglicolico (PGA), acido polilattico-glicolico (PLGA), policaprolattone (PCL), poliuretano (PU), compositi di fibrina/ialuronano, compositi di

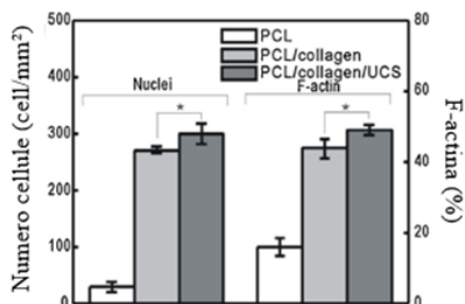
PGA/alginate. Il PGA ha un ottimo grado di biocompatibilità, buona resistenza meccanica ed elevata rigidità, tuttavia presenta un tempo di degradazione molto rapido che potrebbe portare al cedimento strutturale dello scaffold. Inoltre, il rilascio di acido glicolico come prodotto di degradazione può danneggiare i tessuti circostanti e innescare infiammazione e risposta immunitaria [23]. Il PLGA presenta tempo di degradazione e proprietà meccaniche modulabili, che variano col variare il rapporto tra PLA e PGA di cui è costituito.



VIII. Tempo di degradazione del PLGA in relazione alla percentuale di PGA e PLA.

Il PLGA necessita comunque di essere utilizzato congiuntamente ad altri materiali per garantire le proprietà meccaniche necessarie. Il PCL si presta ad essere lavorato con tecniche di stampa 3D senza l'utilizzo di solventi tossici, possiede eccellenti proprietà meccaniche (elevata flessibilità) e il suo tempo di degradazione *in vivo* per idrolisi enzimatica è sufficiente da consentire la rigenerazione completa del tessuto, oltre a non rilasciare prodotti di degradazione tossici [12]. È stata osservata una buona biocompatibilità cellulare del materiale, ulteriormente migliorata

dall'utilizzo combinato con materiali bioattivi di origine naturale [24].



IX. Analisi quantitativa del numero di cellule per mm<sup>2</sup> e area (%) con presenza di F-actina[24].

Per ultimo il PCL si è dimostrato stabile al processo di sterilizzazione per irradiazione con raggi  $\gamma$ , senza mostrare alterazioni nella struttura cristallina [12]. Il PU si distingue dai materiali visti fin ora per la sua buona biocompatibilità e proprietà meccaniche.

Scaffolds	Proprietà meccaniche (compressione)		
	$E'$ [MPa]	$E''$ [MPa]	$\tan\delta$
PLGA	1.66 ± 0.06	0.16 ± 0.02	0.10 ± 0.01
PU	0.48 ± 0.06	0.09 ± 0.01	0.18 ± 0.02
PUe	0.40 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.38 ± 0.06

Scaffolds	Recupero della forma (%)		
	1% strain	5% strain	10% strain
PLGA	69.1 ± 0.7	59.7 ± 0.6	38.2 ± 0.6
PU	99.8 ± 0.1	87.2 ± 0.5	67.7 ± 1.2
PUe	87.8 ± 1.1	74.6 ± 1.3	57.0 ± 0.6

Tabella IV. Proprietà meccaniche di scaffold realizzati con diversi materiali con tecnica di stampa 3D [25].

Scaffold realizzati con questo materiale hanno mostrato proprietà elastiche superiori ai classici polimeri e analisi *in vitro* hanno dimostrato che questa tipologia di scaffold, trattata con l'aggiunta di acido ialuronico, favorisce la differenziazione di MSCs e stimola la secrezione di ECM ricca in

glicosamminoglicani e collagene, utili per la rigenerazione del tessuto cartilagineo [10]. I polimeri naturali utilizzati in TET appartengono a due categorie: polisaccaridi (alginato e chitosano) e proteine (collagene e gelatina). L'alginato possiede ottima biocompatibilità, bassa citotossicità ed è in grado di supportare l'adesione e la proliferazione cellulare quando reticolato. Tuttavia, non possiede elementi bioattivi e un'elevata concentrazione può avere effetti dannosi sulla vitalità cellulare. La concentrazione ottimale, sia per ottenere buona vitalità cellulare sia per rendere stampabile il polimero, si assesta attorno al 3% [21].



X. Cubi di alginato stampato per estrusione con concentrazione crescente da sinistra verso destra. La concentrazione al 3% permette di ottenere una struttura più precisa e porosa [21].

Il collagene è una proteina biodegradabile e biocompatibile, che favorisce l'adesione e la proliferazione cellulare. La sua limitazione principale è la bassa viscosità a temperatura ambiente e il lungo tempo di gelificazione. La gelatina è prodotta per denaturazione del collagene, è biocompatibile, biodegradabile e favorisce l'adesione e la proliferazione cellulare; viene spesso combinata con altri materiali che ne modificano la viscosità o ne consentono la reticolazione. Un esempio è la forma di gelatina metacrilata (GelMA), che grazie all'aggiunta di foto-polimerizzanti

reticola e permette di ottenere un idrogelo stabile in grado di mantenere la forma [2].

## **Cellule**

Il successo nella realizzazione di un costrutto di TET dipende ampiamente dalla tipologia di cellule utilizzate e dalle condizioni di coltura. Il tessuto tracheale è composto da differenti tipi di cellule con diverse funzioni, suddivise in cinque tessuti principali: mucosa, sub-mucosa, tessuto cartilagineo, tessuto connettivo e tessuto muscolare [1]. Gli studi per la realizzazione di TET si sono concentrati sull'utilizzo di condrociti, cellule epiteliali e cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs) [1]. Le cellule del tessuto epiteliale e i condrociti della cartilagine ricoprono il ruolo più importante nella riproduzione della struttura della trachea. Per veicolare le cellule all'interno dello scaffold possono essere utilizzate tecniche di semina statica, perfusione dinamica, bioprinting, colata cellulare (*casting*), assemblaggio di foglietti cellulari (*cell sheet assembly*), immersione in soluzione di idrogel e cellule (*dip coating*) [20]. I condrociti sono le cellule deputate alla produzione di tessuto cartilagineo. Le fonti principali di condrociti sono i tessuti cartilaginei delle costole, dell'orecchio e del setto nasale o cellule staminali mesenchimali (MSCs) differenziate. La tecnica di estrazione delle MSCs dal midollo osseo risulta meno complessa di altre e per questo vengono preferiti ad altre cellule [26]. La loro coltivazione in bioreattore ha permesso la

rigenerazione di tessuto biofunzionale con buone proprietà meccaniche; studi *in vivo* hanno mostrato una adeguata vitalità, neo-vascularizzazione e formazione di strato epiteliale luminale [27]. Le cellule epiteliali sono localizzate nello strato della mucosa e vanno a costituire un epitelio cigliato [28]. Sono isolabili dalla mucosa tracheale e dal tessuto nasale. Cellule staminali embrionali e MSCs presentano una valida alternativa in quanto sono in grado di generare cellule basali, cigliate e caliciformi, fondamentali per una corretta rigenerazione dell'epitelio. Inoltre, promuovono l'angiogenesi e accelerano la rigenerazione della mucosa [28].

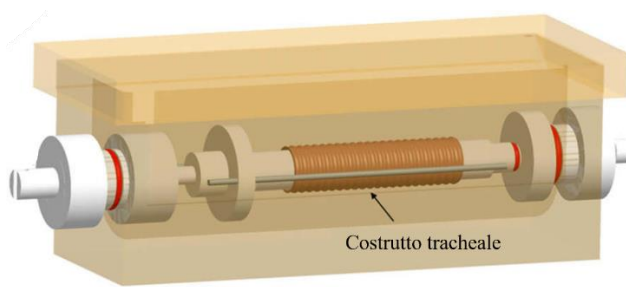
## **Fattori di crescita**

La loro selezione va effettuata tenendo conto della specifica combinazione di cellule e di scaffold che vengono utilizzati [1]. Possono essere diluiti nel mezzo di coltura o inseriti all'interno del materiale che compone lo scaffold per veicarli direttamente nel sito di impianto. Per la rigenerazione del tessuto cartilagineo, risultati promettenti sono stati ottenuti con l'utilizzo di rhTGF- $\beta$ 3 (*human recombinant transforming growth factor*) [29]. Laminina e fibronectina favoriscono la rigenerazione di tessuto epiteliale [28]. TGF- $\beta$ 1 stimolano la differenziazione di MSCs in tessuto muscolare liscio [2].

## **Bioreattore**

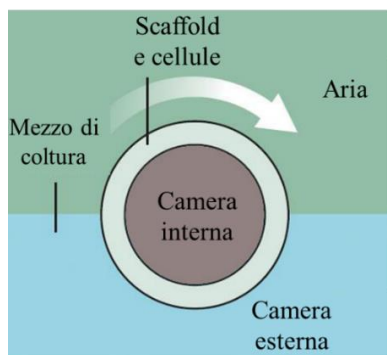
I bioreattori sono dispositivi progettati per contenere strutture cellulari, mimare le

condizioni *in vivo*; fornire stimoli meccanici alle cellule, perfondere il tessuto con i nutrienti necessari e regolare la crescita del tessuto in modo che riproduca fedelmente il tessuto nativo [12]. Per la coltura di TET esiste un bioreattore *ad hoc* costituito di un condotto rotante su cui viene alloggiato lo scaffold.



XI. Vista tridimensionale del bioreattore assemblato, con costrutto tracheale alloggiato sul condotto ruotante [30].

In questo modo si vanno a formare due camere, una interna al lume e una esterna al costrutto, nelle quali è possibile inserire mezzi di coltura distinti [30].



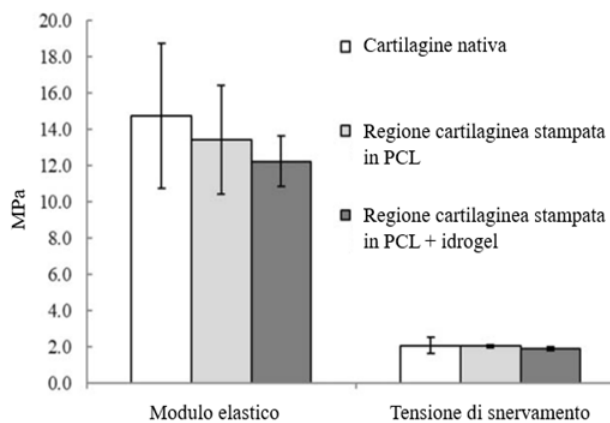
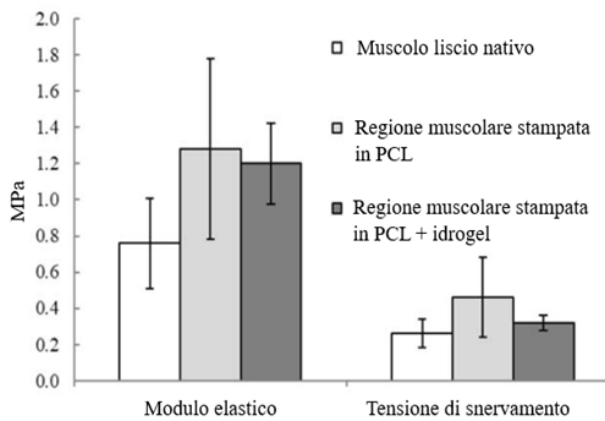
XII. Suddivisione schematica della camera del bioreattore [30].

## Progettazione dello scaffold

### Proprietà meccaniche

Esiste una stretta relazione tra le prestazioni meccaniche della trachea e la sua funzione

fisiologica durante la respirazione. Le componenti che hanno maggiore influenza sul comportamento meccanico della trachea sono la cartilagine, il muscolo liscio e il tessuto connettivo. La cartilagine ha un comportamento viscoelastico modellizzabile però come isotropo lineare all'interno dell'intervallo fisiologico di deformazioni a cui è sottoposta (5%) [31]. Il suo modulo di Young è circa 3,33MPa, ma può variare tra 1MPa e 20MPa. La muscolatura liscia, data la presenza di fibre sia longitudinali che trasversali ha comportamento anisotropo, con maggiore rigidità in direzione longitudinale [6]. Per questo tessuto sono stati ricavati modulo elastico ( $0,76 \pm 0,25\text{MPa}$ ) e di tensione di snervamento ( $0,26 \pm 0,22\text{MPa}$ ) [2]. Il tessuto connettivo viene considerato un materiale isotropo iperelastico [32]. Sulla base delle proprietà meccaniche di questi tre tessuti è stata selezionata la tipologia di scaffold più adeguata. Una valida soluzione è rappresentata da scaffold ibridi realizzati alternando filamenti di polimero sintetico, che fornisce supporto meccanico, ad idrogel contenente cellule, che si comporta da componente bioattivo. Il PCL combinato con idrogel consente di ottenere costrutti con valori di modulo elastico appropriati per una potenziale applicazione di TET [2].



*XIII. Confronto di modulo elastico e tensione di snervamento tra tessuto nativo, costruito stampato con solo PCL e costruito stampato con PCL + idrogel [2].*

La porosità è uno dei parametri che va ad influire maggiormente sulle variazioni delle proprietà meccaniche della struttura finale. I parametri che la influenzano sono: dimensione dei filamenti, distanza tra i filamenti e organizzazione spaziale dei filamenti. I primi due hanno peso maggiore sulla variazione di percentuale di porosità [33]. È importante selezionare il materiale con il peso molecolare adeguato alla realizzazione delle componenti di interesse. Per il PCL un aumento del peso molecolare comporta un aumento della resistenza a compressione e della tensione di snervamento. Per realizzare costrutti biomedicali in PCL è consigliato utilizzare un

peso molecolare di circa ~45K g/mol (PCL45)[34].

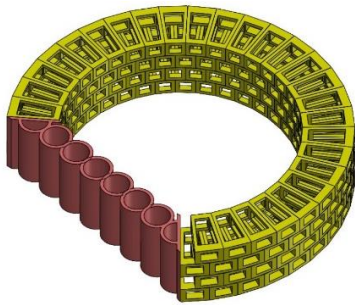
**Fabbricazione dello scaffold**

Alla luce dell'analisi dei materiali e delle tecniche di produzione a disposizione per la realizzazione di scaffold per TET si è scelto di progettare per questo lavoro di tesi uno scaffold ibrido in PCL45 e idrogel. Il PCL supporta meccanicamente la struttura, mentre l'idrogel veicola cellule e fattori di crescita all'interno della struttura di supporto sintetica, dove verrà depositato, per favorire la colonizzazione dello scaffold da parte delle cellule. Per la realizzazione è opportuno utilizzare una bioprinter a più ugelli, che permetta la deposizione di entrambi i materiali [20].

<b>Materiale sintetico</b>	PCL45;
<b>Estrusione PCL45</b>	Temperatura di estrusione: 90°C; pressione di estrusione 700kPa; ugello metallico Ø200µm.
<b>Idrogel regione cartilaginea</b>	Mezzo di coltura specifico per la differenziazione condrogenica (StemPro™), collagene modificato (Gelin-S®), ialuronano, eparina (Heprasil®).
<b>Idrogel regione muscolare</b>	DMEM, collagene modificato (Gelin-S®), ialuronano, eparina (Heprasil®), TGF-β1.
<b>Estrusione idrogel</b>	Temperatura di estrusione 15°C; pressione di estrusione: 100kPa; ugello in Teflon Ø200µm.
<b>Cellule</b>	Cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs); densità: 1.5×10 <sup>7</sup> hMSCs/ml.

Tabella V. Tabella riassuntiva della scelta di: materiale sintetico, composizione dei due idrogel, parametri di estrusione, cellule e loro densità.

Per andare a disegnare un modello tridimensionale della struttura in PCL45 è stato utilizzato il software di disegno *SolidWorks*. La componente per la rigenerazione di tessuto cartilagineo è costituita da quattro strati di celle sfalsate cave in cui è possibile incorporare la componente idrogel. Il modello muscolare è costituito di una serie di cilindri adiacenti e connette i due rami dell'anello cartilagineo.



XIV. Modello di un anello tracheale completo. Giallo: regione tessuto cartilagineo; rosso: regione tessuto muscolare.

Tra due anelli cartilaginei consecutivi viene inserito un elemento di supporto per la rigenerazione di tessuto connettivo. Il restante spazio vuoto tra due anelli può essere riempito di idrogel fotopolimerizzato che fornisca supporto per la stampa dell'anello successivo.

Componente tessuto cartilagineo	
Raggio interno	7 mm
Raggio esterno	10 mm
Altezza anello	4 mm
Altezza singola cella	1 mm
Componente tessuto muscolare liscio	
Spessore	2,01 mm
Spessore parete cilindri	0,2 mm

Supporto tessuto connettivo	
Altezza	1,5 mm
Raggio interno	7 mm
Raggio esterno	8,5 mm

Tabella VI. Tabella riassuntiva delle misure del modello di scaffold tracheale.

Diametro estrusore	0,2 mm
Layer height	0,2 mm
Infill	100%

Tabella VII. Parametri per lo slicing del modello.

## Conclusioni e sviluppi futuri

In questo progetto di tesi si è cercato di proporre una soluzione innovativa per la ricostruzione della trachea a seguito della resezione di un suo segmento. È stata fatta un'analisi delle possibili soluzioni offerte da costrutti realizzati con tecniche di ingegneria tissutale. La progettazione dello scaffold è stata eseguita tenendo conto delle proprietà meccaniche del tessuto nativo e sulla base di questo sono stati selezionati tecnica di stampa, biopolimero sintetico, formulazione di idrogel e tipologia di cellule da utilizzare. Il modello presenta regioni distinte per la rigenerazione di tessuto cartilagineo, tessuto muscolare liscio e tessuto connettivo. Infine, sono stati definiti i parametri di slicing e di stampa per una futura realizzazione del modello su cui effettuare test preliminari *in vitro*. Sviluppi futuri di questo lavoro includono: definizione dei parametri di coltura in bioreattore, caratterizzazione meccanica della componente cartilaginea e della componente muscolare, analisi reologiche della componente idrogel, test immunochimici sulla matrice extracellulare

depositata e di verifica della vitalità cellulare.  
Per una possibile futura applicazione clinica  
bisogna considerare di effettuare test *in vivo* su  
modello animale per verificare la  
differenziazione cellulare, la formazione di  
tessuto maturo e la funzionalità *in situ* come  
sostituto di una porzione o di un'intera trachea.



# Abstract

## Introduction

Tracheal reconstruction is one of the major challenges in cardiothoracic surgery when is impossible to perform direct end -to-end anastomosis [9]. Synthetic and tissue prosthetic grafts allow to repair the portion of damaged tissue but are not suitable to induce the regeneration of functional tissue [1]. Tissue engineered trachea (TET) is an innovative solution to the obstacles of current surgical techniques, aiming at the complete regeneration of tracheal tissues [2].

### Trachea

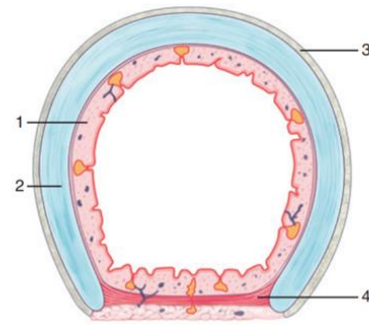
The trachea is an ovoid-shaped duct located in the upper portion of the respiratory system that connects the larynx to the bronchi. It is responsible for ventilation, protects the airways from pathogenic organisms and dust and helps to evacuate bronchial secretions.

Length	~12 cm
External diameter	~2 cm
Average wall thickness	~3 mm
Height of a cartilage ring	~4 mm
Distance between consecutive rings	~1,5mm
Number of rings in a trachea	20

Table I. summary of the main sizes of trachea [3].

It's composed of cartilage "C" shaped rings which constitute laterals and anterior walls, while in the back there is a smooth muscle

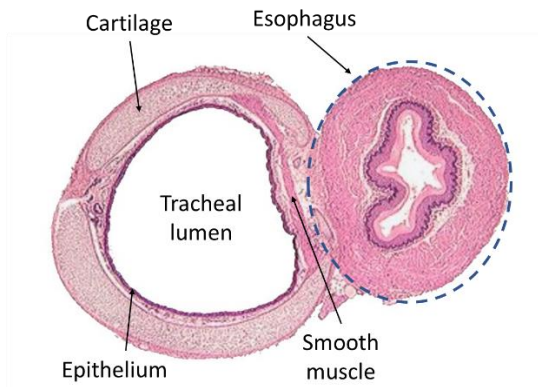
membrane which connects the two branches of cartilage [4]. These prevent the collapse of the trachea during the variations of internal pressure. They are separated by portions of connective tissue which confer longitudinal flexibility to the structure.



I. Structure of tracheal ring. 1. Internal mucous membrane; 2. Cartilage ring; 3. Adventitia; 4. Membrane. [5]

The rings are made of hyaline cartilage with high percentage of glycosaminoglycans and type II collagen [6]. The smooth muscle membrane connects the branches of the cartilage ring, forming a contractile wall which can modify the diameter of the tracheal lumen. It is composed of two families of orthogonal fibers: the transverse ones are responsible for flexing the cartilaginous rings, the longitudinal ones support the swallowing movements of the oesophagus located adjacent to the trachea. The tracheal lumen is lined with pseudostratified columnar epithelial tissue which forms a physical and immunological barrier from the external environment, as well as regulating the metabolic functions of the airways [7]. The tissue underlying the epithelium is heavily perfused, making it

difficult to reproduce this tissue in the laboratory [8].



*II. Cross section of the trachea and esophagus. It can be observed that the esophagus is bordering the region of smooth muscle tissue, in the area where the cartilage tissue breaks down.*

## Pathologies and surgical solutions

Pathological conditions, trauma or complications deriving from surgery can lead to the resection an extended portion of the trachea. In the event of resection of a segment longer than 50% of the total length, the end-to-end anastomosis cannot be performed, and the use of a tracheal substitute is necessary to reconstruct the removed portion [9]. The surgical options available are synthetic implants, allografts, tracheal transplantation, autologous tissue composites and tissue engineering [10]. The use of synthetic substitutes is limited by problems of biocompatibility and lack of regeneration of functional tissue, while allogeneic transplants require immunosuppressive therapies and are limited by the number of compatible donors [11]. Tissue engineering represents a valid alternative able to respect the requirements and to promote tissue regeneration [12].

### Caratteristiche sostituto tracheale

Lateral stiffness.

Longitudinal flexibility.

Airtight.

Biocompatibility: integration with adjacent tissues, not inducing chronic inflammation, formation of granulation tissue, infection, or erosion.

Bioactivity: stimulation of tissue regeneration and regrowth of respiratory ciliated epithelium.

Non-immunogenic, non-toxic, non-carcinogenic.

Easy implantation, with reliable, feasible and reproducible technique.

No need of immunosuppressive therapies.

*Table II. Requirements for fabrication of a tracheal substitute.*

## Tissue engineering

Tissue engineered trachea (TET) seems to be the ideal solution to substitute extensive portions of damaged trachea. The interaction between proper growth factors, cells and scaffold can lead to the complete regeneration of the desired tissue mimicking the biological structures and their functions [13]. Using the modern techniques of 3D printing it's possible to achieve patient matched designs [12].

### Scaffold

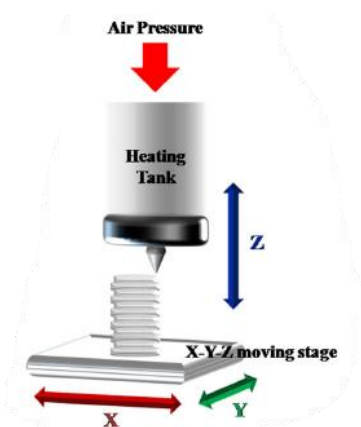
In tissue engineering a scaffold is a support or a matrix used to facilitate migration, adhesion, and growth of cells or to vehicle bioactive agents [7]. Exist A variety of techniques to fabricate a tracheal scaffold. The most used is 3D printing since allows to produce scaffold with patient matched design and offers the possibility to integrate cells in three-

dimensional structures; it also has good cost-benefit ratio [15]

Requirements specific for TET scaffolds
Porosity ~90%
Pore dimension: 5-300 $\mu\text{m}$
Interconnected porosity
Geometry like that of a native trachea or the portion to be replaced.
Mechanical strength ( $212 \pm 18\text{N}$ )
Flexibility like native trachea tissue: tensile modulus [ $10.6 \pm 1.8 \text{MPa}$ ]

Table III. Requirements specific for scaffold for TET [14].

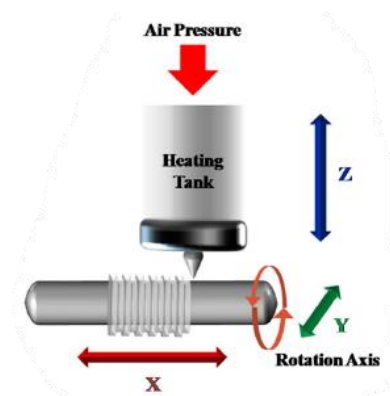
The printed structure is modeled with computer-aided-design (CAD) programs, reproducing the anatomical conformation of the portion of the organ to be replaced. There are different 3D printing processes. Fused deposition modeling (FDM) is based on deposition of thermoplastic polymer filaments on top of a flat support which can move along X-Y-Z axis. The structure is fabricated from bottom to the top [16].



III. Process of fabrication of a tracheal scaffold with 3D printing FDM technique.

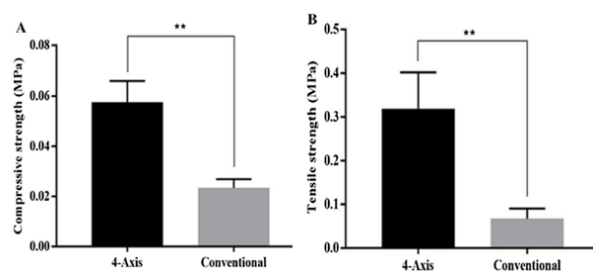
The limits related to this technique are several. It's impossible to print protruding geometries

without support material; layers suffer of poor adhesion between them and filaments on the bottom layers tend to collapse under the structure's weight. Moreover, the accuracy level is determined by the dimension of the extruder. The evolution of FDM is a four-axis technique which uses a rotating mandrel as support, instead of a flat surface [17].



IV. Fabrication process of a TET scaffold using four-axis FDM.

This technique allows to obtain more accuracy during the reproduction of the digital model, more uniformity during the printing process, higher tensile strength and compressive strength compared to traditional scaffolds.

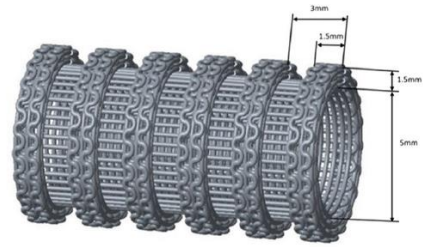


V. Mechanical properties of PCL scaffolds realized by 3D printing FDM conventional and 4-axis technique. [17]

A technique like FDM is the *Liquid-frozen deposition manufacturing (LFDM)*; it consists in a cold production process used for the

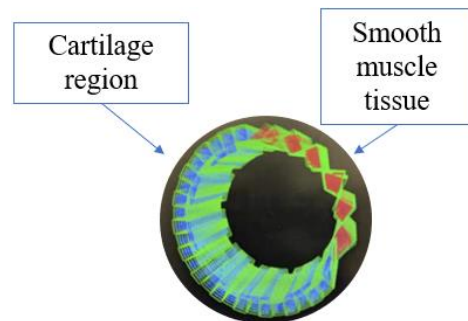
fabrication of polyurethane water-based scaffolds. No heating of the material is needed, so thermal degradation of the biopolymer is avoided, and mechanical properties of the material are kept unaltered during the printing process [10]. It is also possible to use indirect three-dimensional printing. A sacrificial mold is made with 3D printing, then the polymeric material is poured inside to reproduce the geometry of the scaffold [18]. The scaffold obtained presents good flexibility, porosity well interconnected and with optimal pore size to facilitate colonization by cells. This technique is however complex and involves the waste of a large amount of material. The bioprinting is an additive manufacturing technique consisting in printing of biocomposites containing living cells, biopolymers, and bioactive components [19]. Different types of 3D bioprinting can be chosen based on the choice of the biomaterial, the cells printed, and the level of post printing cells viability desired [20]. Extrusion based bioprinting allows to replicate native structures with high resolution level and cells viability, and for that is widely used in TET applications [21].

One requirement specific for TET scaffolds is the mimicking of the native trachea geometry. When 3D printing FDM is performed with a flat surface as platform, it is possible to recreate a more ovoidal section, while using a rotating mandrel, the geometry of the scaffold is dictated by the mandrel.



VI. Scaffold fabricated with 4-axis technique on cylindrical mandrel [12].

It's possible to fabricate a scaffold with different sub regions, one for each tissue to be regenerated and with specific geometries [2].

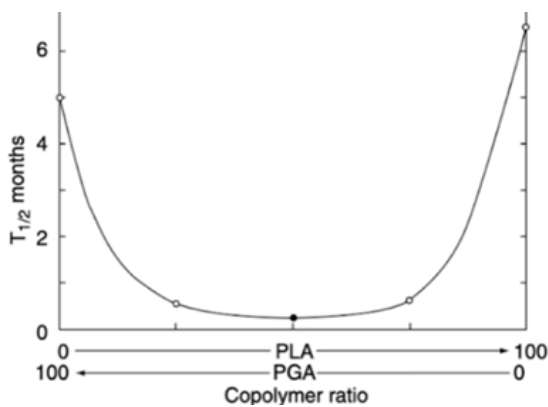


VII. Tracheal scaffold designed with cartilage region (blue) and smooth muscle region (red) [2].

In the case of indirect three-dimensional printing, the geometry is associated to the shape of the sacrificial mold that is used.

Mechanical strength is important for preventing airway collapse and is one of the main requirements that a tracheal scaffold must respect. It depends mainly on the composition and processing of the material. The polymers used for the fabrication of tissue engineering scaffolds can be classified into two categories: natural ones, whose origin comes from a biological material, and synthetic ones, entirely synthesized or produced [1]. A combination of natural and synthetic materials allows to obtain a scaffold

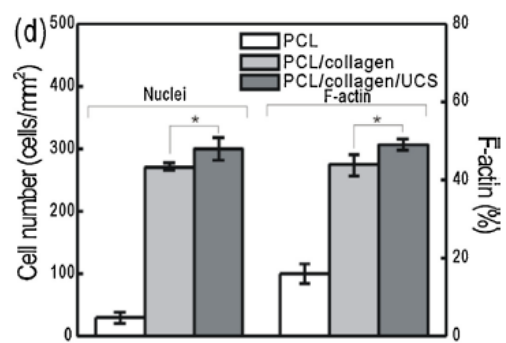
with excellent bioactivity and good mechanical properties [22]. The degradation time must be such as to ensure that the tissue is supported throughout all the regeneration period. The most used materials for the realization of TET are: polyglycolic acid (PGA), polylactic-glycolic acid (PLGA), polycaprolactone (PCL), poly urethane (PU), fibrin / hyaluronan composites, PGA / alginate composites. PGA has an excellent degree of biocompatibility, good mechanical strength and high stiffness; however, it has a very short degradation time which could lead to structural failure of the scaffold. Furthermore, the release of glycolic acid as degradation product can damage surrounding tissues and trigger inflammation and immune response [23]. PLGA has modulable degradation time and mechanical properties, which vary with the ratio between PLA and PGA of which the material is made.



VIII. Degradation time of PLGA related to the percentage of PGA and PLA.

Anyway, PLGA always need to be used blended with other materials to reach the mechanical properties needed. PCL can be processed with 3D printing techniques without

the use of toxic solvents, has excellent mechanical properties (high flexibility) and its degradation time *in vivo* by enzymatic hydrolysis is sufficient to allow complete regeneration of the tissue. Furthermore, it does not release toxic degradation products [12]. Good cellular biocompatibility has been observed. It can also be increased by using bioactive materials from natural sources [24].



IX. Quantitative analysis of the cell number per mm<sup>2</sup> and percentage of area with presence of F-actin [24].

PCL also demonstrated to be stable to sterilization process by gamma ray, without showing signs of alteration in the crystalline structure [12]. The PU differ from the other biomaterials for its good biocompatibility and mechanical properties [25]. Scaffolds made of this material have shown superior elastic properties respect to other biopolymers and *in vitro* analysis have shown that if treated with hyaluronic acid, they can favor the differentiation of MSCs and stimulates the secretion of ECM rich in glycosaminoglycans and collagen, useful for the regeneration of cartilage tissue [35].

Scaffolds	Dynamic mechanical properties (compression mode)		
	$E'$ [MPa]	$E''$ [MPa]	$\tan\delta$
PLGA	$1.66 \pm 0.06$	$0.16 \pm 0.02$	$0.10 \pm 0.01$
PU	$0.48 \pm 0.06$	$0.09 \pm 0.01$	$0.18 \pm 0.02$
PUe	$0.40 \pm 0.02$	$0.16 \pm 0.03$	$0.38 \pm 0.06$

Scaffolds	Dimensional recovery [%]		
	1% strain	5% strain	10% strain
PLGA	$69.1 \pm 0.7$	$59.7 \pm 0.6$	$38.2 \pm 0.6$
PU	$99.8 \pm 0.1$	$87.2 \pm 0.5$	$67.7 \pm 1.2$
PUe	$87.8 \pm 1.1$	$74.6 \pm 1.3$	$57.0 \pm 0.6$

Table IV. The mechanical properties of the 3D-printed scaffolds [36].

Natural polymers applied in TET belongs to two categories: polysaccharides (alginate and chitosan) and proteins (collagen and gelatin). Alginate has excellent biocompatibility, low cytotoxicity and can support cell adhesion and proliferation when cross-linked. However, it does not have bioactive elements and a high concentration can have harmful effects on cell viability. The optimal concentration, both to obtain good cell viability and to make the polymer printable, is around 3% [37].



X. Alginate printed cubes fabricated with extrusion bioprinting. The concentration of alginate increases from left to right. 3% alginate concentration allows to obtain a more precise and porous structure [1].

Collagen is a biodegradable and biocompatible protein, which promotes cell adhesion and proliferation. Its main limitation is the low viscosity at room temperature and the long gelation time. Gelatin is produced by denaturation of collagen, is biocompatible,

biodegradable and promotes cell adhesion and proliferation; it is often combined with other materials that modify its viscosity or allow it to cross-link. An example is the form of methacrylate gelatin (GelMA), which, thanks to the addition of photo-polymerizing agents, cross-links and allows to obtain a stable hydrogel capable of maintaining its printed shape [37].

## Cells

A successful fabrication of a TET depends largely on the type of cells used and on the culture conditions. Tracheal tissue is composed of different types of cells with different functions, divided into five main tissues: mucosa, sub-mucosa, cartilage tissue, connective tissue, and muscle tissue. Studies for the implementation of TET have focused on the use of chondrocytes, epithelial cells, and human mesenchymal stem cells (hMSCs) [4]. Epithelial cells and chondrocytes play the most important role in the reproduction of the structure of the trachea. Static seeding techniques, dynamic perfusion, bioprinting, cell casting, cell sheet assembly, and dip coating can be used to introduce the cells within the scaffold [3]. Chondrocytes are the cells responsible to produce cartilage tissue. The main sources of chondrocytes are the cartilage tissues of the ribs, ear and nasal septum or differentiated mesenchymal stem cells (MSCs). The technique to extract MSCs from bone marrow is less complex than others and for this reason they are preferred to other

cells in experimental studies [5]. Their culture in a bioreactor allows the regeneration of bio functional tissue with good mechanical properties; *in vivo* studies showed adequate viability, neo-vascularization, and luminal epithelial layer formation [38]. Epithelial cells are in the mucosal layer and form a ciliated epithelium. They can be isolated from the tracheal mucosa and from the nasal tissue. Embryonic stem cells and MSCs present a valid alternative as they can generate basal, ciliate and goblet cells, essential for proper epithelial regeneration. In addition, they promote angiogenesis and accelerate the regeneration of the mucosa [6].

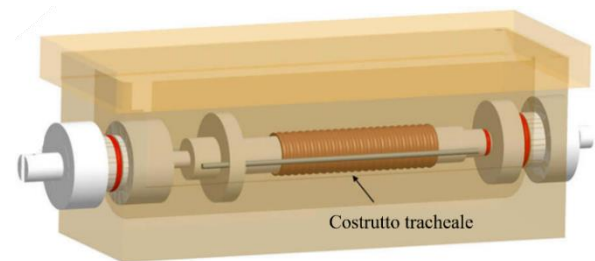
### Growth factors

The choice of growth factors must be done based on the specific combination of cells and scaffold that will be used [39]. They can be diluted in the culture medium or incorporated into the printed material so that they can be released directly in the implantation site. For the regeneration of cartilage tissue, promising results have been obtained with the use of rhTGF- $\beta$ 3 (human recombinant transforming growth factor) [7]. Laminin and fibronectin promote the regeneration of epithelial tissue [8]. TGF- $\beta$ 1 guide the differentiation of MSCs into smooth muscle tissue [9].

### Bioreactor

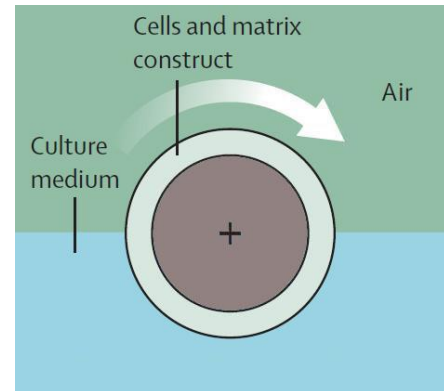
Bioreactors are devices designed to contain cell structures, mimic *in vivo* conditions; provide mechanical stimuli to the cells, perfuse

the tissue with necessary nutrients and regulate tissue growth so that it will reproduce the native tissue [15]. To culture TET exists a specific bioreactor with a rotating conduit on which is fixed the scaffold.



XI. Three-dimensional view of the bioreactor assembly [15].

This way two chambers are defined, one inside the lumen and one outside the construct, in which it is possible to introduce distinct culture media [12].



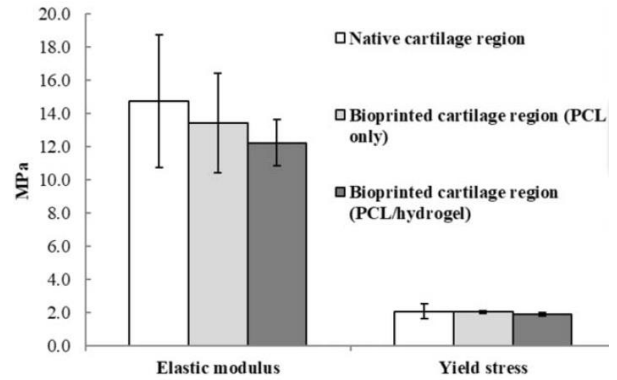
XII. Schematic division of the chamber of the chamber of the bioreactor. In grey the internal one, in blue-green the outer one [22].

## Scaffold design

### Mechanical properties

Exists a close relationship between mechanical performance of the trachea and its physiological function during breathing. The components that play the main role the

mechanical behavior of the trachea are cartilage, smooth muscle, and connective tissue. Cartilage has a viscoelastic behavior that can be modeled as a linear isotropic within the physiological range of deformations to which it is subjected (5%). Its Young's modulus is about 3.33MPa, but it can vary between 1MPa and 20MPa [11]. The smooth muscle, given the presence of both longitudinal and transverse fibers, has anisotropic behavior, with greater rigidity in the longitudinal direction [12]. It has elastic modulus of  $0.76 \pm 0.25$ MPa and yield strength of  $0.26 \pm 0.22$ MPa [7]. Connective tissue is considered a hyperelastic isotropic material [40]. Starting from the mechanical properties of this tissues can be selected the most suitable scaffold. One choice is represented by hybrid scaffolds made of alternated synthetic biopolymers and hydrogels containing cells. The first one provides the mechanical strength, the second one provides the bioactive components. PCL combined with hydrogels allows to obtain constructs with elastic modulus values appropriate for a potential TET application [22].

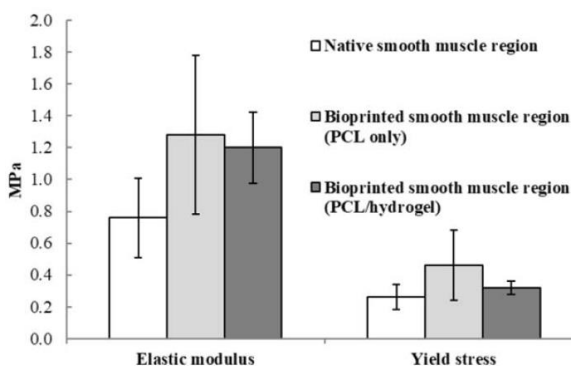


*XIII. Comparison between elastic modulus end yield stress of native tissue, only PCL scaffold and hybrid scaffold [1].*

Porosity is one of the parameters that has the greatest influence on the variations in the mechanical properties of the final structure. It is influenced by size of the filaments, distance between the filaments and spatial organization of the filaments. The first two have importance in changing of the percentage of porosity [15]. It's important to select the appropriate molecular weight of the material, suitable for printing the components of interest. An increasing of PCL molecular weight leads to an increase in compressive strength and yield stress. To produce biomedical constructs made of PCL it is recommended to use a molecular weight of about  $\sim 45$ K g / mol (PCL45) [16].

### Scaffold fabrication

By the analysis of the materials and the fabrication processes for TET scaffolds, it has been chosen to design a hybrid scaffold made of PCL45 and hydrogel. PCL offer the mechanical support for the structure while the hydrogel carries cells and growth factors inside the synthetic structure, to favor the colonization of the scaffold by the cells. For





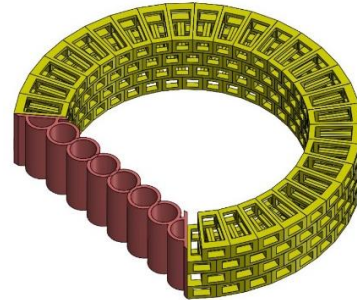
the fabrication is suggested to use a bioprinter with multiple nozzles to allow the deposition of both materials [17].

<b>Synthetic material</b>	PCL45;
<b>Parameters for PCL45 printing</b>	Extrusion temperature: 90°C; extrusion pressure: 700kPa; metallic nozzle Ø200µm.
<b>Cartilage hydrogel</b>	Culture medium specific for chondrogenic differentiation (StemPro™), modified collagen (Gelin-S®), hyaluronan, heparin (Heprasil®).
<b>Muscle hydrogel</b>	DMEM, modified collagen (Gelin-S®), hyaluronan, heparin (Heprasil®), TGF-β1.
<b>Parameters hydrogel extrusion</b>	Extrusion temperature 15 ° C; extrusion pressure: 100kPa; Teflon nozzle Ø200µm.
<b>Cells</b>	Human mesenchymal stem cells (hMSCs); density: 1.5 × 10 <sup>7</sup> hMSCs / ml.

Table V. Resuming table of material chosen, hydrogel compositions, extrusion parameters, cells, and their density.

To design our model for PCL45 scaffold *SolidWorks* software has been used. The component for the regeneration of cartilage tissue consists of four layers of hollow staggered cells in which the hydrogel component can be incorporated. The muscular model consists of a series of adjacent cylinders and connects the two branches of the cartilage rings. A support element is introduced between two consecutive cartilaginous rings for the regeneration of connective tissue. The remaining empty space between two rings can

be filled with light-cured hydrogel that provides support for printing the next ring.



XIV. Model of a complete tracheal ring. Yellow: cartilage tissue region; red: muscle tissue region.

<b>Cartilage region</b>	
Internal diameter	14 mm
External diameter	20 mm
Ring height	4 mm
Single cell height	1 mm
<b>Smooth muscle region</b>	
Thickness	2,01 mm
Cylinder wall thickness	0,2 mm
<b>Support for connective tissue</b>	
Height	1,5 mm
Internal diameter	14 mm
External diameter	17 mm

Table VI. Summary table of measures of the tracheal scaffold model.

Extruder diameter	0,2 mm
Layer height	0,2 mm
Infill	100%

Table VII. Slicing parameters.

## Conclusions and future developments

In this thesis project we tried to propose an innovative solution for the reconstruction of the trachea following resection. It was made an analysis of the possible solutions offered by tissue engineering techniques. The scaffold

was designed considering the mechanical properties of the native tissue and based on those were selected the printing technique, synthetic biopolymer, formulation of hydrogel and type of cells to be used. The model features distinct regions for regeneration of cartilage, smooth muscle, and connective tissue. The slicing and printing parameters were defined for a future production of the model to carry out preliminary *in vitro* tests. Future developments of this work include definition of culture parameters in bioreactor, mechanical characterization of the cartilage component and muscle component, rheological analysis of the hydrogel component, immunochemical tests on the deposited extracellular matrix and verification of cell viability. For a possible future clinical application, it is necessary to consider performing *in vivo* tests on an animal model to verify cell differentiation, the formation of mature tissue and *in situ* functionality as a substitute for a portion or a whole trachea.

# Introduzione

---

La ricostruzione tracheale a seguito di un suo danneggiamento è sempre stata una delle maggiori sfide della chirurgia toracica. La prima resezione tracheale fu eseguita da Belsey nel 1950[10], da allora le tecniche di chirurgia si sono evolute rapidamente, tuttavia, il percorso della chirurgia tracheale è stato più lungo e lento a causa della peculiarità anatomica di questa porzione delle vie aeree [18]. A seguito di una resezione di una porzione di trachea, l'anastomosi delle estremità del tessuto rimanente è generalmente considerata l'opzione chirurgica migliore, tuttavia, in pazienti con patologie molto estese l'anastomosi diretta non è praticabile e la sostituzione del tessuto danneggiato con una protesi rimane l'opzione principale[41]. Una grande varietà di innesti protesici sintetici e tissutali è stata ampiamente sperimentata per trattare i difetti tracheali; protesi artificiali, stent e graft vanno a riparare il tessuto danneggiato ma possiedono comunque una applicabilità limitata al trattamento di lesioni localizzate e non garantiscono una rigenerazione di tessuto funzionale [21]. Queste problematiche sono legate alle particolari caratteristiche anatomiche della trachea (vicinanza ai vasi principali, afflusso di sangue segmentale) e alla presenza di diversi tipologie di tessuto (cartilagine, epitelio respiratorio, tessuto muscolare liscio e vasi sanguigni)[4]. Storicamente le soluzioni adottate risultate più convincenti sono state protesi a base di silicone e, più recentemente, allotrapianti o compositi di tessuto autologo, mentre l'utilizzo di stent ha dimostrato scarsi risultati[9].

L'ingegneria tessutale ha il potenziale per lo sviluppo di migliori tecniche di ricostruzione tracheale, andando a superare le limitazioni imposte dai graft odierni e puntando alla rigenerazione di tessuto tracheale completamente funzionale.

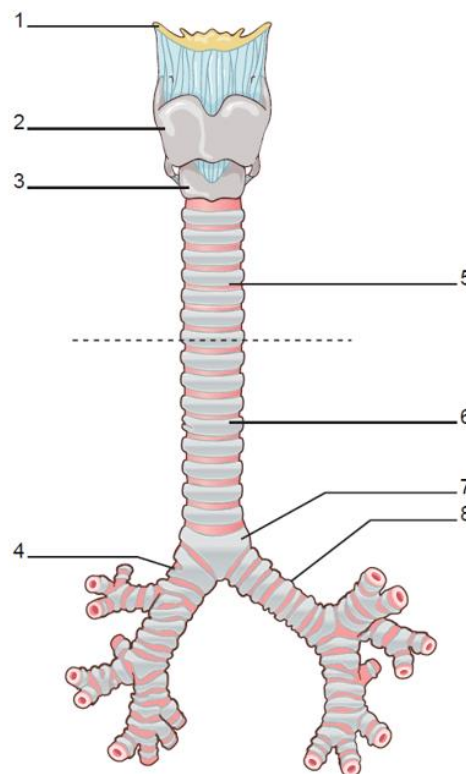
Questo progetto di tesi nasce con l'intento di investigare una possibile soluzione innovativa per la realizzazione di uno scaffold per ingegneria tissutale della trachea, realizzabile con stampa tridimensionale(3D), che possa rappresentare un passo verso il superamento delle sfide cliniche legate alla ricostruzione di porzioni estese del condotto tracheale.

# Capitolo 1

## La trachea

---

La trachea è un condotto facente parte delle vie respiratorie deputato alla ventilazione. È situata nella porzione superiore dell'apparato respiratorio, lungo la linea mediana del corpo, anteriormente all'esofago, e connette la laringe ai bronchi; permette sia l'intrappolamento di organismi patogeni e polvere sia l'evacuazione delle secrezioni bronchiali. È composta di anelli cartilaginei con forma a "C" che vanno a costituire le pareti anteriore e laterali, mentre nella porzione posteriore è presente una membrana muscolare che connette i due rami cartilaginei a formare un lume ovoidale. [2]



*Figura 1. Vista anteriore della trachea e sua morfologia esterna.*

*1. Osso ioide; 2. Cartilagine tiroide; 3. Cartilagine cricoide; 4. Bronco principale destro; 5. Trachea cervicale; 6. Trachea toracica; 7. Carena; 8. Bronco principale sinistro [3]*

La trachea

## 1.1 Anatomia e fisiologia della trachea

La trachea è un tubo di forma ovoidale con dimensioni che variano con l'età e il sesso dell'individuo. In un individuo maschio adulto le sue dimensioni sono mediamente quelle indicate in Tabella 1.

Tabella 1. Tabella riassuntiva delle principali misure della trachea [12].

Lunghezza	~12 cm
Diametro esterno	~2 cm
Spessore di parete medio	~3 mm
Altezza singolo anello cartilagineo	~4 mm
Distanza tra due anelli consecutivi	~1,5mm
Numero medio di anelli per trachea	20

Gli anelli cartilaginei hanno forma a “C” e, comportandosi come elementi rigidi, prevengono il collasso della trachea durante le variazioni di pressione intraluminale che si susseguono durante gli atti respiratori; sono separati tra loro da intervalli di tessuto connettivo che conferiscono al condotto la caratteristica flessibilità longitudinale.

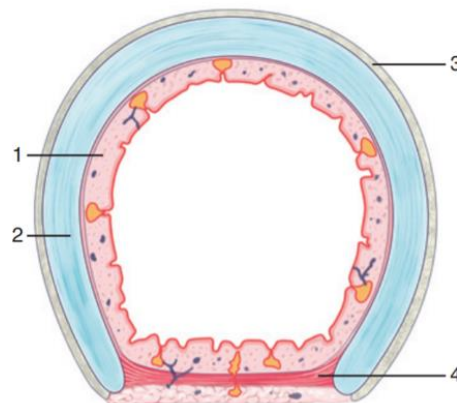


Figura 2. Struttura anatomica. 1. Tunica interna mucosa; 2. Anello cartilagineo; 3. Avventizia; 4. Membranosa. [42]

Gli anelli sono costituiti di cartilagine ialina, con matrice extracellulare composta principalmente da glicosamminoglicani e collagene di tipo II. La zona luminale e la zona esterna sono ricche di collagene, mentre il cuore dell'anello è ricco in proteoglicani. I condrociti sono localizzati in lacune circondate da matrice extracellulare e, avvicinandosi alla zona superficiale, ricca di collagene,

La trachea

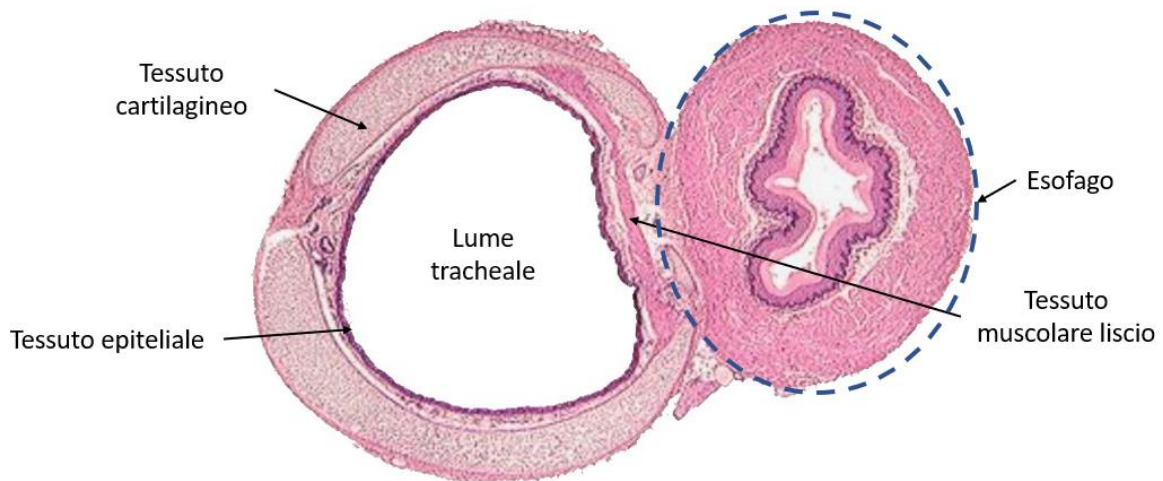
risultano appiattiti e ravvicinati tra loro [42]. Le fibrille di collagene costituenti la cartilagine sono organizzate in una rete con orientamento casuale e non organizzato man mano che ci si avvicina al centro del tessuto cartilagineo [38]. L'orientamento delle fibre risulta complessivamente non preferenziale, rendendo il comportamento del tessuto modellizzabile come isotropo. Gli anelli sono soggetti fisiologicamente solo a flessione, quando la parete muscolare viene contratta, e mostrano un comportamento meccanico quasi lineare fino al 10% di deformazione (deformazione fisiologica *in vivo* ~5%), infatti, l'isteresi e lo stress residuo al di sotto di questa percentuale sono trascurabili, mentre al di sopra di questo limite aumentano progressivamente [18]. La determinazione del modulo elastico della componente cartilaginea risulta comunque complessa e i risultati presenti in letteratura variano di molto tra uno studio e l'altro, in un range di valori tra 1,8 e 20 Mpa. Le proprietà meccaniche della cartilagine variano inoltre in base ad età e sesso dell'individuo.

Factor	Group	Young's modulus	F value	P value
Age	Young	12.178±1.265	0.022	0.004
	Old	20.540±1.840		
Gender	Female	16.227±1.623	0.084	0.908
	Male	16.491±1.534		
Position	Cranial	18.119±1.538	2.486	0.146
	Caudal	14.597±1.692		

Tabella 2. Modulo di Young per la cartilagine tracheale in termini di età, sesso e posizione nella trachea (craniale vs. caudale) [1].

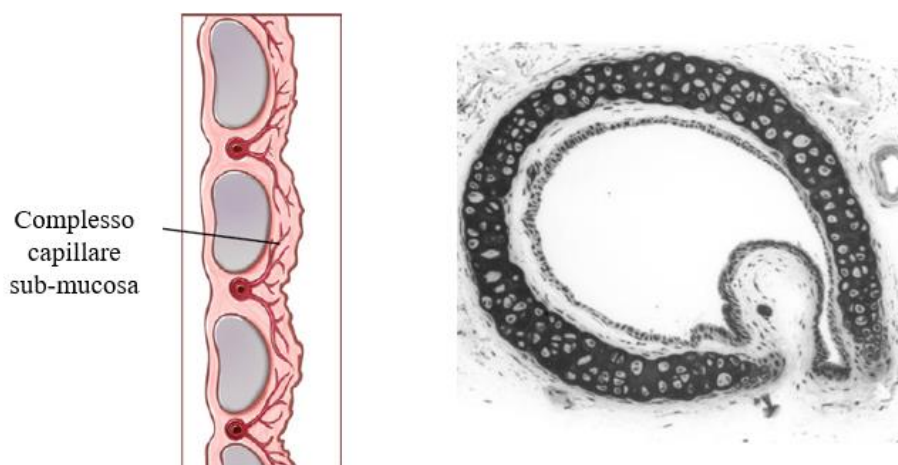
Una membrana di tessuto muscolare liscio, composta da due famiglie di fibre muscolari ortogonali tra loro, connette le estremità degli archi cartilaginei andando a formare una parete membranosa contrattile che permette l'avvicinamento dei rami cartilaginei in risposta agli stimoli esterni; le fibre trasversali costituiscono la maggioranza delle fibre e si inseriscono a livello delle estremità dei rami cartilaginei andando a conmetterle; la loro contrazione è perciò responsabile della flessione degli anelli cartilaginei e della variazione del diametro luminale della trachea. La contrazione delle fibre trasversali avviene principalmente durante i colpi di tosse. Le fibre longitudinali sono invece posizionate esternamente al condotto tracheale e percorrono la trachea per tutta la sua lunghezza. Queste intervengono nei movimenti che guidano la deglutizione [6]. La membrana muscolare è, infatti, un elemento altamente deformabile che permette alla trachea di assecondare l'espansione dell'esofago ad essa adiacente e quindi di facilitare la deglutizione. La presenza di queste due famiglie di fibre va tenuta in considerazione nella valutazione delle caratteristiche meccaniche del tessuto.

## La trachea



*Figura 3. Sezione trasversale di trachea ed esofago. Si può osservare come l'esofago sia confinante con la regione di tessuto muscolare liscio, nella zona dove il tessuto cartilagineo si interrompe.*

Il lume tracheale è rivestito da tonaca sottomucosa di tessuto connettivo contenente ghiandole tracheali e, più internamente, da tonaca mucosa costituita di un epitelio cigliato pseudostratificato. L'epitelio costituisce una barriera fisica e immunologica dall'ambiente esterno e regola le funzioni di trasporto di fluidi, le funzioni metaboliche delle vie aeree e la clearance mucociliare, infatti, tramite il loro movimento, le ciglia spingono il muco verso l'alto [22]. Nella regione che ricopre la cartilagine lo strato risulta più sottile con cellule che presentano ciglia più corte, mentre nella regione che ricopre il tessuto connettivo, senza cartilagine, le cellule epiteliali mostrano uno sviluppo maggiore con un folto bordo cigliato, inoltre, intervallate alle cellule cigliate sono distribuite le cellule a calice della mucosa. La zona sottostante allo strato epiteliale è molto irrorata, rendendo complessa la riproduzione in laboratorio di questo tessuto[23]. Alla base dell'epitelio si trovano cellule basali ed elementi staminali in grado di dividersi per mitosi quando risulta necessario sostituire altre cellule epiteliali.



*Figura 4. A sinistra sezione longitudinale della trachea con rappresentazione del complesso capillare presente al di sotto dello strato della mucosa [4]. A destra sezione trasversale della trachea nella regione di tessuto connettivo senza cartilagine; si osserva come lo strato epiteliale sia spesso e ben sviluppato[8].*

## 1.2 Patologie della trachea e soluzioni chirurgiche

Condizioni patologiche come tumori maligni, fistula tracheoesofagea, stenosi congenita, traumi o complicazioni derivanti da interventi chirurgici, possono comportare la necessità di resezione di porzioni estese della trachea, andando a incidere severamente sulla durata e qualità di vita del paziente, alterando la capacità di parlare, respirare e deglutire. In caso di necessità di resezione di un segmento superiore al 30% della lunghezza per i bambini e al 50% per gli adulti, l'anastomosi delle due estremità tracheali non può essere eseguita e, per ripristinare la porzione di tessuto rimosso, risulta necessario l'utilizzo di un sostituto tracheale per ricostruire la porzione rimossa. Le opzioni disponibili per la realizzazione di possibili sostituti tracheali possono essere classificate in cinque tipologie: protesi sintetiche, allograft, trapianto di trachea, compositi di tessuto autologo e ingegneria tissutale. Le caratteristiche che un ideale sostituto tracheale deve rispettare sono riportate in Tabella 3 [11] [12].

*Tabella 3. Caratteristiche progettuali che un sostituto tracheale deve rispettare. [12] [11]*

<b>Caratteristiche sostituto tracheale</b>
Rigidezza laterale;
Flessibilità longitudinale;
Tenuta ermetica all'aria;
Biocompatibilità: integrazione con i tessuti adiacenti, non inducendo infiammazione cronica, formazione di tessuto di granulazione, infezione ed erosione;
Bioattività: stimolazione della rigenerazione del tessuto e della ricrescita di epitelio cigliato respiratorio;
Non immunogenicità, non tossicità, non carcinogenicità;
Facile impiantabilità, con tecnica affidabile, fattibile e riproducibile;
Non necessitare terapie immunosoppressive;

L'impianto di sostituti tracheali artificiali risulta limitato in termini di biocompatibilità per la predisposizione ad infezioni, stenosi del tessuto tracheale e mancanza di rigenerazione di tessuto epiteliale che portano al fallimento dell'impianto[43]. Allo stesso modo trapianti allogeneici necessitano del trattamento con terapie immuno soppressive a lungo termine e sono limitati dalla disponibilità di donatori compatibili oltre che dal rischio di rigetto, necrosi, infezioni postoperatorie e inadeguata rigenerazione vascolare che possono portare alla morte del paziente [44]. L'ingegneria dei tessuti per la rigenerazione del tessuto nativo ha diverse caratteristiche utili, non solo per



## La trachea

supportare cellule coltivate *ex vivo*, ma anche come vettore per fornire i segnali bioattivi e i nutrienti necessari alle aree danneggiate per aiutare la rigenerazione dei tessuti [11]. Appare, inoltre, una soluzione in grado di rispettare i requisiti richiesti per la produzione di un possibile sostituto tracheale, essendosi dimostrata in diversi studi la soluzione in grado di risolvere il problema legato all'epitelizzazione e alla vascolarizzazione. Per questi motivi, negli ultimi anni, molti studi si sono focalizzati sulla produzione di scaffold combinando l'ingegneria tissutale con le tecniche di stampa 3D. Scegliendo il materiale appropriato per la fabbricazione dello scaffold e seminando le cellule adatte alla rigenerazione dei tessuti di interesse all'interno della struttura è possibile ottenere una trachea ingegnerizzata in grado di emulare le strutture biologiche e le funzioni di una trachea nativa. Inoltre, sfruttando le moderne tecniche di stampa 3D è possibile progettare la geometria del costrutto in modo personalizzato, così che si adattati alla morfologia del paziente e garantisca il supporto adeguato al mantenimento della forma del tessuto tracheale ingegnerizzato [45].

## Capitolo 2

# Ingegneria tissutale

---

L'ingegneria tissutale è un campo interdisciplinare che applica i principi della bioingegneria, della scienza dei materiali e delle scienze della vita per ottenere sostituti biologici che ripristino, mantengano o migliorino le funzioni di un tessuto o di un organo. Il successo nella creazione di un tessuto funzionale ingegnerizzato si basa sulla combinazione di cellule, biomateriali e fattori di crescita; altro componente essenziale è il bioreattore che deve fornire perfusione e stimoli fisici per migliorare la vitalità cellulare e la funzione tissutale [46].

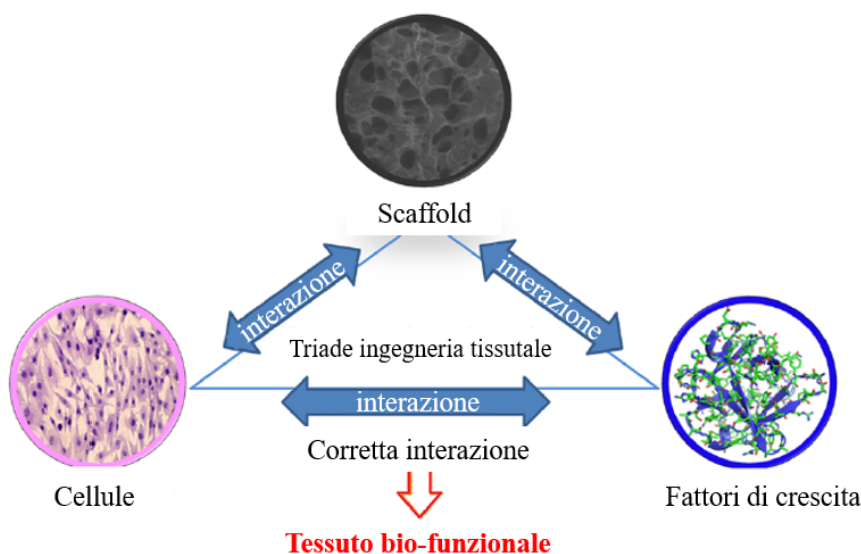


Figura 5. Triade dell'ingegneria tissutale [1].

Per decenni numerosi studiosi hanno proposto diversi approcci per superare gli ostacoli clinici associati con la stenosi e con il danneggiamento di aree estese delle vie aeree; alcuni progressi marginali sono stati fatti in aree di ricerca quali: trapianti di tessuto autologo, utilizzo di trachee decellularizzate xenogeniche o allogeniche, applicazioni di trachee artificiali. Tuttavia, queste opzioni non hanno portato risultati soddisfacenti a causa di limitazioni di varia natura, come: mancanza di buone proprietà meccaniche, scarsa epitelizzazione, inadeguata rigenerazione della cartilagine e scarsa efficacia a lungo termine [24]. La realizzazione di una trachea per ingegneria

Ingegneria tissutale

tissutale (TET) sembra la soluzione ideale per la sostituzione di porzioni estese di trachea. Scegliendo il corretto materiale per la realizzazione dello scaffold e le cellule da seminare su di esso, è possibile emulare le strutture biologiche e le funzioni di una trachea nativa, senza necessitare di terapie immuno soppressive post-impianto [2].

## 2.1 Scaffold

Nell'ingegneria tissutale, uno scaffold è un supporto o una matrice realizzato per facilitare la migrazione, l'adesione o il trasporto di cellule e agenti bioattivi. Uno scaffold ideale per applicazioni in ingegneria tissutale non solo deve permettere adesione, crescita e differenziazione delle cellule, ma anche costituire un microambiente tridimensionale stabile con una porosità sufficiente da permettere la crescita cellulare all'interno della struttura [7]. La progettazione dello scaffold inizia con una accurata selezione del biomateriale e del metodo di fabbricazione, in modo da ottenere tempo di degradazione e proprietà meccaniche desiderate. Il biomateriale scelto non deve rilasciare prodotti di degradazione tossici o scatenare una risposta immunogenica o infiammatoria che potrebbero compromettere il processo di guarigione [12]. Uno scaffold ben progettato deve supportare l'adesione, migrazione, proliferazione e differenziazione cellulare, promuovendo la rigenerazione tissutale. Struttura tridimensionale e porosità devono essere progettate in modo da permettere la distribuzione di acqua e sostanze nutritive all'interno della struttura porosa e l'eliminazione delle sostanze metaboliche di scarto. La rete di pori interna deve inoltre essere sufficientemente interconnessa da consentire alle cellule di penetrare, aderire e proliferare agevolmente[47].

Molti materiali sono stati studiati per essere utilizzati come scaffold per TET e, ad oggi, la soluzione più soddisfacente risulta essere una combinazione di materiali sintetici e naturali che permette di coniugare le corrette proprietà meccaniche con una eccellente bioattività. Nel caso della progettazione di TET la resistenza meccanica dello scaffold risulta fondamentale per prevenire il collasso delle vie aeree e le conseguenti complicanze post-operatorie; il materiale biodegradabile deve fornire il supporto adeguato mentre le cellule condrogeniche seminate producono la matrice extracellulare per formare il tessuto cartilagineo. Di conseguenza la velocità di degradazione del materiale deve essere inferiore al tempo di formazione del tessuto cartilagineo, in modo da mantenere stabile la struttura del costruito durante tutto il periodo di rigenerazione dei tessuti. Per rendere il processo di rigenerazione più rapido ed efficace è possibile progettare scaffold che rilascino, durante la degradazione, dei fattori di crescita tessuto specifici che inducano la differenziazione *in vitro* o *in vivo* [48]. Quando si considera di realizzare uno scaffold per TET una delle specifiche particolari di maggiore importanza è la tenuta ermetica all'aria del condotto. Tuttavia, le strutture porose,

Ingegneria tissutale

necessarie per la rigenerazione del tessuto, hanno una capacità di tenuta all'aria insufficiente. Pertanto, è necessario rivestire la protesi con un sigillante per evitare perdite d'aria [22]. Per questo scopo possono essere utilizzati idrogel a base di polimeri naturali come collagene, fibrina o composti a base di gelatina modificata.

Gli scaffold per TET devono rispettare le specifiche particolari illustrate nella Tabella 4.

#### **Specifiche particolari scaffold per TET**

Porosità ~90%;

Dimensione dei pori 5-300  $\mu\text{m}$ ;

Interconnessione tra pori;

Geometria simile a quella di una trachea nativa o della porzione da sostituire;

Buona resistenza meccanica ( $212 \pm 18\text{N}$ );

Flessibilità simile al tessuto di trachea nativa: *tensile modulus* [ $10.6 \pm 1.8\text{MPa}$ ].

*Tabella 4. Specifiche di progetto particolari per la realizzazione di scaffold per ingegneria tissutale tracheale [25].*

### **2.1.1 Tecniche di stampa 3D per TET**

Per realizzare uno scaffold tracheale sono ad oggi disponibili diversi metodi di fabbricazione, associati alla scelta del materiale da utilizzare. Negli ultimi anni, la stampa tridimensionale (3D) è stata una tendenza in rapida crescita nell'ingegneria dei tessuti grazie alla sua capacità di fabbricare scaffold paziente-specifici con un'architettura porosa ben controllata, offrendo la possibilità di integrare cellule in configurazioni tridimensionali, a fronte di un buon rapporto costo-beneficio. Gli oggetti sono fabbricati in un processo gerarchico che prevede la deposizione di materiale strato su strato. La struttura stampata è progettata con programmi di *computer-aided-design* (CAD) riproducendo la conformazione anatomica della porzione di organo da sostituire; risulta quindi possibile realizzare un modello che riproduca un intero segmento tracheale utilizzabile per applicazioni di TET [25]. Esistono differenti processi di stampa 3D, che differiscono tra loro per il metodo di deposizione degli strati e per i materiali utilizzati.

Il *fused deposition modeling* (FDM) deposita filamenti di polimero termoplastico su di un supporto piano e va a generare la struttura dal basso verso l'alto; l'ugello, da cui viene estruso il materiale riscaldato e fuso, può traslare nel piano X-Y e andando a depositare il materiale su una piattaforma in grado di traslare verticalmente. Questa tecnica è il processo di stampa 3D più diffuso ad oggi grazie alla sua semplicità di utilizzo e all'ampia gamma di stampanti FDM disponibili sul mercato. Tuttavia, la tecnica FDM presenta ancora alcuni punti deboli tra cui: un'accuratezza legata al diametro

## Ingegneria tissutale

dell'ugello, l'incapacità di stampare strutture sporgenti senza supporto, la non sempre corretta adesione tra gli strati depositati e l'appiattimento dei filamenti depositati negli strati inferiori causato dal peso della struttura sovrastante [10].

Un riadattamento del FDM è la stampa del materiale estruso al di sopra di un mandrino cilindrico rotante che funge da supporto al posto della piattaforma piana, tradizionalmente usata in questa tecnica di stampa 3D. Questo metodo è stato rinominato da H. S. Park et al. [17] "FDM a quattro assi". I filamenti depositati sul mandrino rotante sono andati a generare una struttura con lume cilindrico utilizzabile come scaffold per la realizzazione di una trachea artificiale.

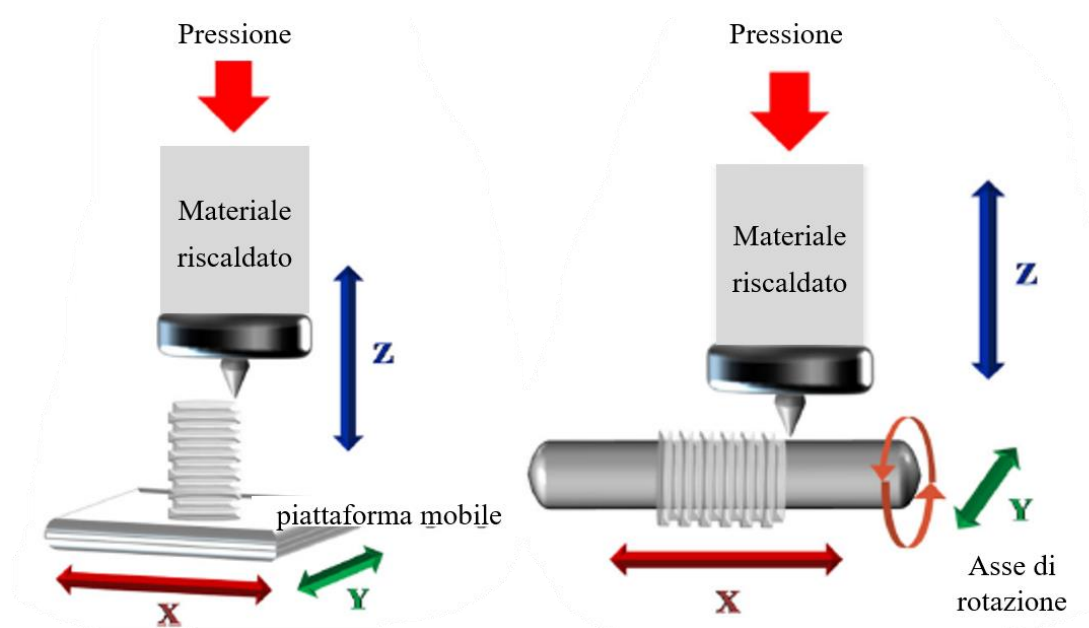


Figura 6. Processo schematico di fabbricazione di uno scaffold per trachea tramite stampa 3D. A sinistra è illustrata la tecnica a 4 assi, a destra la tecnica convenzionale. [17]

I risultati ottenuti dallo studio hanno evidenziato come questa tecnica alternativa permetta di ottenere una migliore accuratezza nella riproduzione del modello CAD e una maggiore uniformità dei filamenti polimerici stampati, della dimensione dei pori e della loro forma rispetto a scaffold realizzati con FDM tradizionale che denotano, invece, fibre polimeriche appiattite e una struttura complessiva meno uniforme. I risultati dei test meccanici hanno inoltre evidenziato che gli scaffold ottenuti con FDM a quattro assi hanno una resistenza alla trazione e alla compressione significativamente superiori rispetto a quelli ottenuti con FDM convenzionale [17].

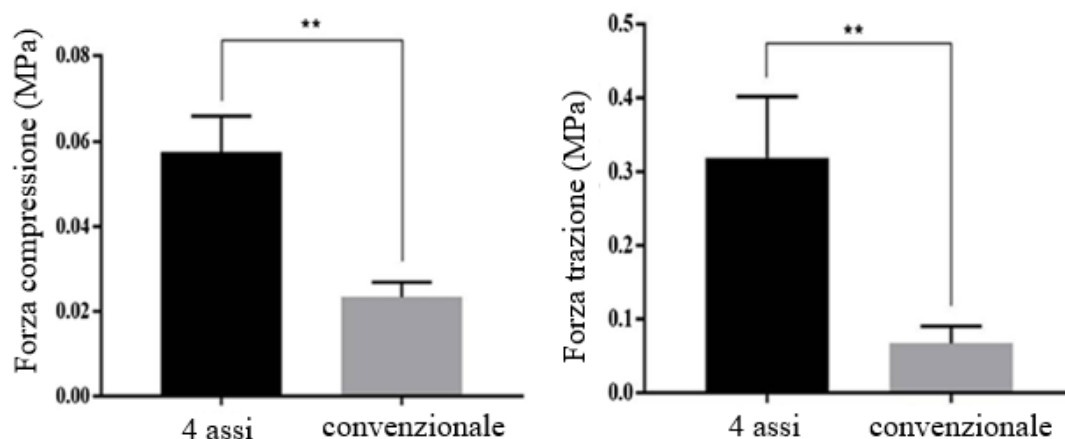


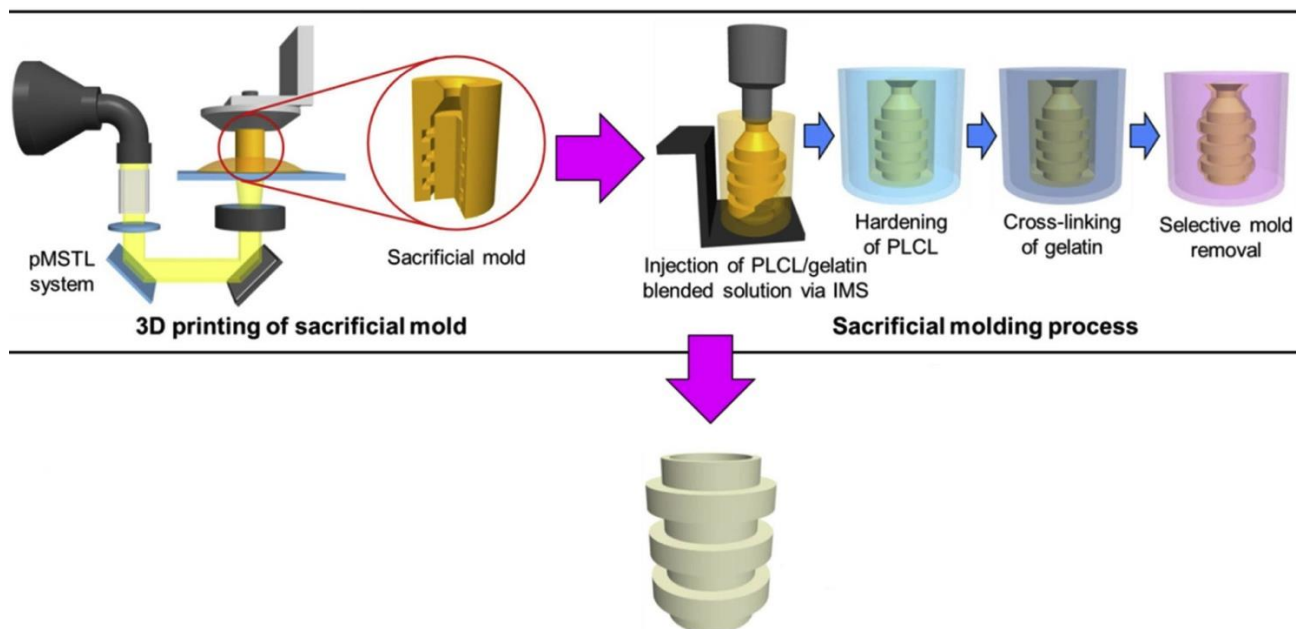
Figura 7. Proprietà meccaniche di scaffold in PCL per trachea stampati 3D. A sinistra resistenza a compressione, a destra resistenza a trazione. [17]

Una tecnologia simile alla FDM è il *Liquid-frozen deposition manufacturing (LFDM)*. Questa tecnica consente di fabbricare scaffold realizzati a partire da una soluzione acquosa di polimero (poliuretano *water based*, chitosano, alginato). È un processo a freddo, che non necessita del riscaldamento del materiale ed evita l'idrolisi termica mantenendo intatte le proprietà meccaniche del polimero durante il processo di stampa. Il materiale viene estruso sotto forma di filamenti e depositato su di una piattaforma alla temperatura di -20/30 °C. Questo metodo è stato utilizzato dai ricercatori della *National Taiwan University* per la produzione di scaffold tubulari per ingegneria tissutale tracheale a base di due differenti tipi di poliuretano biodegradabile *water-based*, con differenti proprietà meccaniche e tempi di degradazione, che si sono dimostrati promettenti per potenziali applicazioni future nel campo dell'ingegneria tissutale tracheale [21].

Una tecnica alternativa è la stampa tridimensionale indiretta. In questo caso si parte dalla preparazione di uno stampo sacrificale in fotopolimero solubile in soluzione basica (*alkali-soluble photopolymer*) tramite micro-stereolitografia di proiezione. In questo stampo viene quindi colato il polimero che, una volta polimerizzato, andrà a costituire lo scaffold da utilizzare come TET. Una volta rimosso lo stampo sacrificale, la struttura ottenuta può essere funzionalizzata con elementi bioattivi per poi procedere alla semina delle cellule (Figura 8). Questa tecnica è stata utilizzata da J. H. Park et al. [18] per la fabbricazione di uno scaffold innovativo per ingegneria tissutale tracheale. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il costruito era in grado di mimare il comportamento meccanico, la resistenza radiale, la flessibilità e la pervietà luminale di una trachea nativa. Il prodotto risultante presentava inoltre una porosità ben interconnessa e con dimensione dei pori di 300µm, ottimale per una colonizzazione efficace da parte delle cellule [2]. Questa tecnica risulta tuttavia più complessa rispetto

Ingegneria tissutale

alle precedenti e implica lo spreco di una grossa quantità di materiale, risultando più costosa e complessa da eseguire in laboratori di piccolo calibro.



*Figura 8. Illustrazione schematica del processo di produzione di trachea per ingegneria tissutale. Preparazione dello scaffold in PLCL/gelatina tramite stampa 3D indiretta. Lo stampo sacrificale viene realizzato usando la tecnica di micro-stereolitografia a proiezione [18].*

Un metodo innovativo di *additive manufacturing*, che permette di ottenere costrutti tridimensionali di biomateriali e cellule a partire da modelli digitali, in modo simile alle tecniche di stampa 3D tradizionali, è il 3D bioprinting. Questa tecnica emergente si propone come alternativa ai metodi di stampa 3D tradizionali per la riproduzione di strutture biologiche complesse andando a realizzare strutture stampate a partire da bio-inchiostri contenenti cellule e biopolimeri [49]. Il maggiore vantaggio che deriva dall'utilizzo di questa tecnica per la realizzazione di strutture tubulari è la possibilità di andare a creare un costrutto stratificato suddiviso in strati con diversa composizione cellulare, a seconda del tessuto specifico da rigenerare. Questa nuova tecnologia ha un elevato potenziale per applicazioni nell'ambito dell'ingegneria tissutale tracheale in quanto i prodotti possono essere adattati alla morfologia del paziente. Le complesse strutture biologiche che possono essere prodotte presentano una elevata risoluzione e vengono realizzate con cellule autologhe per evitare l'utilizzo di immunosoppressori e casi di rigetto immunitario [20]. Esistono diverse tipologie di 3D bioprinting tra cui scegliere in base al biomateriale da utilizzare in fase di stampa, alla tipologia cellulare scelta e al livello di vitalità cellulare desiderato post stampa (Tabella 5).

Tabella 5. Metodi di 3D bioprinting con elenco di vantaggi e svantaggi [20].

METODI	PRO	CONTRO	ESEMPI
<b><i>Ink-Jet Bioprinting</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Adatto ad ospitare più ugelli che operano contemporaneamente</li> <li>•Gelificazione a velocità moderata durante la fabbricazione di strutture complesse</li> <li>•Stampa di materiale bioattivo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Richiedono biomateriali a bassa viscosità per evitare ostruzioni</li> <li>•Gocce con volumi troppo piccoli per la produzione di grandi organi artificiali</li> <li>•Difficoltà di stampa di strutture verticali</li> <li>•Essiccazione potenziale delle cellule</li> <li>•Sollecitazione termica, meccanica e di taglio alle cellule</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Tessuti di vasi sanguigni, cartilagine, muscolo-scheletrico, ossa, neuroni e pelle</li> </ul>
<b><i>Laser-Assisted Bioprinting</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Nessun ugello di erogazione, evitando il problema di occlusione</li> <li>•Riduzione dello sforzo di taglio che può influire sulla vitalità cellulare</li> <li>•Stampa con alta precisione</li> <li>•Utilizza una varietà di materiali bioattivi</li> <li>•Deposito di biomateriali in un'ampia gamma di viscosità stampabile</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Difficoltà nel realizzare strutture complesse</li> <li>•Il calore del laser può danneggiare le cellule</li> <li>•Difficile incorporare più tipi di prodotti biologici</li> <li>•Richiede un film metallico che potrebbe contaminare le cellule</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Tessuti ossei, adiposi, cutanei, vasi sanguigni e tessuto cardiaco</li> </ul>
<b><i>Extrusion-Based Bioprinting</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Deposito multiplo di cellule e biomateriali</li> <li>•Fabbricare a temperatura ambiente</li> <li>•Incorporazione diretta e distribuzione omogenea di cellule</li> <li>•Alta fedeltà della forma in post-stampa</li> <li>•Può stampare direttamente celle e fattori bioattivi</li> <li>•Buona stampabilità verticale</li> <li>•In grado di stampare biomateriali ad alta viscosità e strutture ad alte densità cellulari</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Velocità di stampa lenta</li> <li>•Tempistica critica nella gelificazione</li> <li>•Ugelli di piccole dimensioni (<math>\phi \approx 150 \mu\text{m}</math>) possono ridurre la vitalità cellulare (<math>\approx 68,6\%</math>)</li> <li>•Perdita di vitalità cellulare dovuta agli sforzi di taglio da parte degli ugelli</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Tessuti di vasi sanguigni, muscoli, ossa, cartilagine, valvole cardiache, fegato e neuroni</li> </ul>
<b><i>Stereolithography-Based Bioprinting</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Nessuna limitazione di viscosità dei bioinks</li> <li>•Tempo di produzione ridotti ed indipendenti dalla geometria strutturale</li> <li>•Buona stampabilità verticale</li> <li>•Tecnica senza ugelli</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Limitato ai biomateriali fotosensibili</li> <li>•Microfratture e vuoti causati dalla granulometria ridotta della polvere fotocurabile residua</li> <li>•La sorgente di luce UV è dannosa per il DNA e la pelle umana e tossica per le cellule durante la fotopolimerizzazione</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Tessuti di vasi sanguigni, fegato, ossa, cartilagine e condotti neuronali</li> </ul>

Tabella 6. Metodi di 3D bioprinting ad estrusione. Descrizione, vantaggi e svantaggi.

In particolare, il sistema di bioprinting ad estrusione (*extrusion-based bioprinting*) consente di realizzare costrutti con una risoluzione micrometrica e un buon livello di vitalità cellulare post stampa [50]. Anche in questo caso sono presenti diverse varianti del metodo che differiscono tra loro per il tempo di produzione richiesto, il biomateriale utilizzabile, il costo di produzione, l'architettura realizzabile e la densità cellulare (Tabella 6). Le cellule come condrociti o cellule staminali possono quindi esser aggiunte a soluzioni specifiche di idrogel e fattori di crescita per essere poi stampate in costrutti di TET [1]. Il bioprinting ad estrusione può essere, ad esempio, utilizzato congiuntamente al FDM per andare a stampare strutture ibride con struttura in biopolimero sintetico riempita poi con



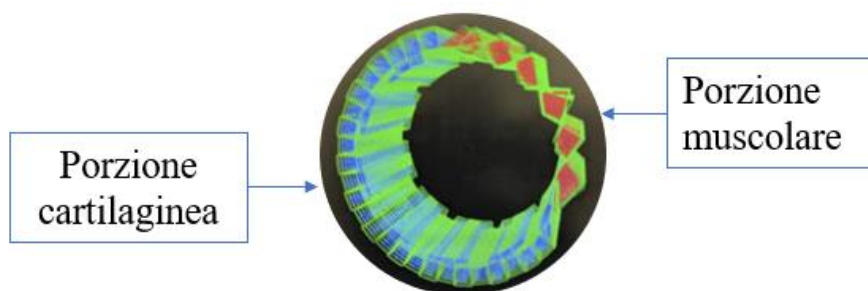
## Ingegneria tissutale

idrogel contenente cellule per la rigenerazione sia di cartilagine sia di tessuto muscolare; risultati della coltura *in vitro* su questo tipo di scaffold hanno mostrato un'alta vitalità cellulare post stampa e lo sviluppo di un'appropriata morfologia cellulare per ciascuna delle due tipologie tissutali da rigenerare [2].

<b>METODI AD ESTRUSIONE</b>	<b>DESCRIZIONE</b>	<b>PRO</b>	<b>CONTRO</b>
<b>Bioprinting coassiale</b>	Estrusione di un filamento tubulare tramite ugello composto da separatori concentrici.	Possibilità di estrarre contemporaneamente due o più biomateriali, o strutture cave con componenti biologici funzionali. Produzione di strutture vascolari di piccolo diametro con strati lisci ed endoteliali.	Difficoltà nella realizzazione di strutture impilate gerarchicamente.
<b>Metodo Kenzan</b>	Realizzazione di strutture posizionando sferoidi su una matrice di aghi sottili e sfruttando la proprietà di aggregazione delle cellule.	Strutture ad alta densità cellulare. Tempi di stampa ridotti per gli sferoidi cellulari.	Requisito aggiuntivo di sferoidi nel processo di fabbricazione. Distanza intermedia costante.
<b>Rod supporting bioprinting</b>	Produzione di un costrutto cavo erogando uno o più biomateriali direttamente su di un cilindro rotante, su cui vanno ad avvolgersi.	Capacità di produrre strutture cave multistrato autoportanti con componenti cellulari specifici per il target selezionato. Stampa sequenziale utilizzando due o più biomateriali.	Dipendenza dalla forma dell'asta ruotante.
<b>Bioprinting con bagno di supporto</b>	Utilizzo di una vasca con gel termosensibile o altro materiale sacrificale come supporto allo stampaggio dei biomateriali per evitarne il collasso.	Stampa di biomateriali idrati. Creazione di una complessa architettura anatomica 3D.	Limitazione dei biomateriali disponibili. Costo elevato.
<b>Bioprinting diretto</b>	Stampa diretta di biomateriali e idrogeli caricati con cellule strato per strato.	Alta libertà di scelta delle geometrie possibili.	Lunghi tempi di produzione. Necessità di adatte proprietà reologiche del biomateriale stampato.

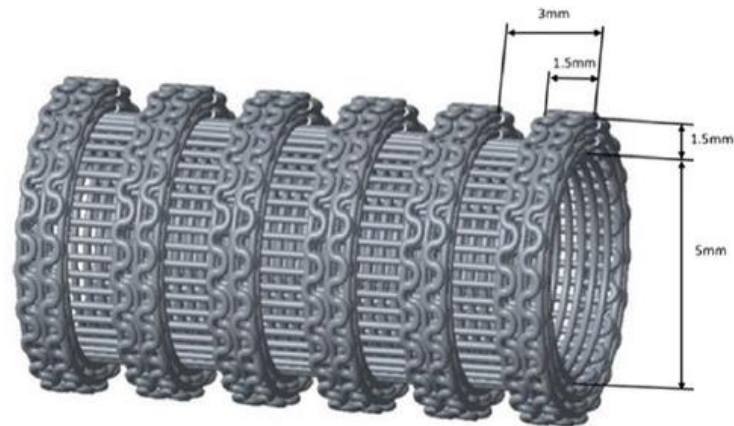
## 2.1.2 Geometria

Uno dei requisiti particolari per la realizzazione di scaffold tracheali è la riproduzione di una geometria simile a quella della trachea nativa o della porzione da sostituire. La configurazione scelta deve inoltre esser progettata per fornire un adeguato supporto meccanico unitamente ad una buona flessibilità longitudinale. In letteratura sono riportate diverse tipologie di geometrie possibili che differiscono principalmente nella scelta di riprodurre anelli tracheali completi o, più similmente al modello nativo, con forma a “C”; questa scelta è dettata anche dal processo di produzione selezionato per lo scaffold. Quando viene utilizzata la tecnica di stampa FDM, utilizzando come piattaforma una superficie piana, è possibile ottenere una struttura con sezione ovoidale più simile a quella nativa, come riportato nello studio svolto dai ricercatori del *Wake Forest Institute for Regenerative Medicine* nel 2019 [2]. È stato da loro realizzato un anello tracheale che replicava sia la struttura cartilaginea a “C” sia la porzione muscolare. Nello specifico i ricercatori hanno realizzato la struttura portante e cava in PCL nella quale è stato successivamente incorporato l'idrogel contenente le cellule e i fattori di crescita.



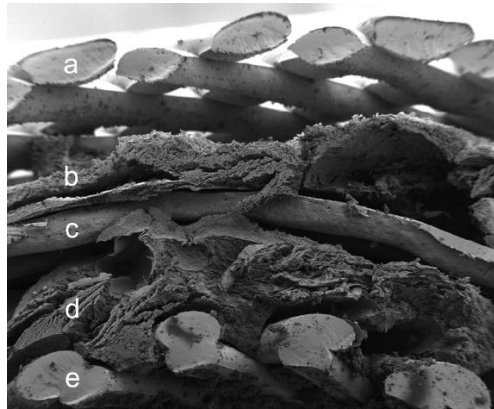
*Figura 9. Design per trachea da realizzare in PCL con regioni separate per la formazione di muscolo liscio (rosso) e cartilagine (blu). La regione della cartilagine è costituita da strati di quadrati interconnessi e sfalsati tra uno strato e l'altro; la regione del muscolo liscio è costituita da diamanti allineati tra loro con minore rigidità rispetto alla regione cartilaginea[2].*

Quando viene utilizzato come base un mandrino cilindrico rotante (tecnica FDM a quattro assi). Si riesce ad ottenere una struttura ben stratificata dal lume interno verso l'esterno ed è possibile ottenere uno sviluppo di tessuti funzionali diversi tra loro e localizzati specificamente nella zona di interesse. La scelta di realizzare anelli cilindrici completi o con forma a “C” è arbitraria e in letteratura sono riportati esempi di entrambe le configurazioni.



*Figura 10. Lo strato interno dello scaffold è costituito di un incrocio di filamenti di PCL verticali e orizzontali, con diametro di 0.12mm, che agisce da supporto per la struttura e offre sufficiente spazio per ricoprire questa area con condrociti[12].*

Un esempio è riportato nello studio svolto nel 2018 da S. W. Bae et al., dove è stata realizzata una trachea artificiale con 5 strati di materiali biocompatibili, PCL e idrogel di alginato. Lo studio si propone di realizzare uno scaffold che contenga sia cellule epiteliali sia cellule staminali mesenchimali derivate da midollo osseo, separate da uno strato centrale di PCL; gli strati più interno e più esterno, realizzati anch'essi in PCL, presentano invece micro-pori che consentono un certo grado di comunicazione tra le cellule e i tessuti circostanti[42].



*Figura 11. Struttura dello scaffold al SEM. (a, c, e) strati composti di PCL; (b) strato di alginato con cellule staminali mesenchimali (MSC); (d) strato di alginato con cellule epiteliali. Lo strato più interno (e) e quello più esterno (a) presentano una struttura con micropori. Il terzo strato (c) è non poroso e separa lo strato con cellule epiteliali (d) da quello con cellule MSC (b)[42].*

Nel caso di stampa tridimensionale indiretta la geometria è dettata dalla forma dello stampo sacrificale che viene utilizzato. Per quanto riguarda lo studio svolto da J. H. Park et al. la struttura è

Ingegneria tissutale

stata realizzata con forma cilindrica in materiale PCL, andando poi a creare una stratificazione specifica per riprodurre le strutture cartilaginee ed epiteliali [18].

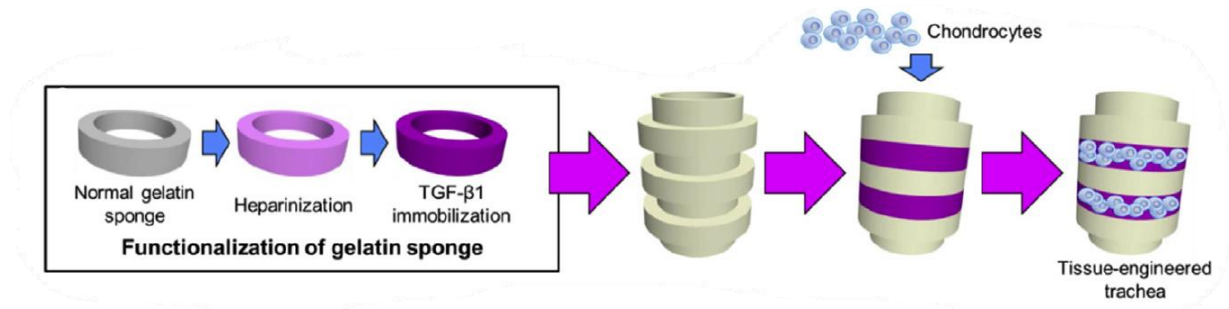


Figura 12. Funzionalizzazione di una spugna di gelatina per eparinizzazione e immobilizzazione di fattori di crescita TGF- $\beta$ , con semina di condrociti [18].

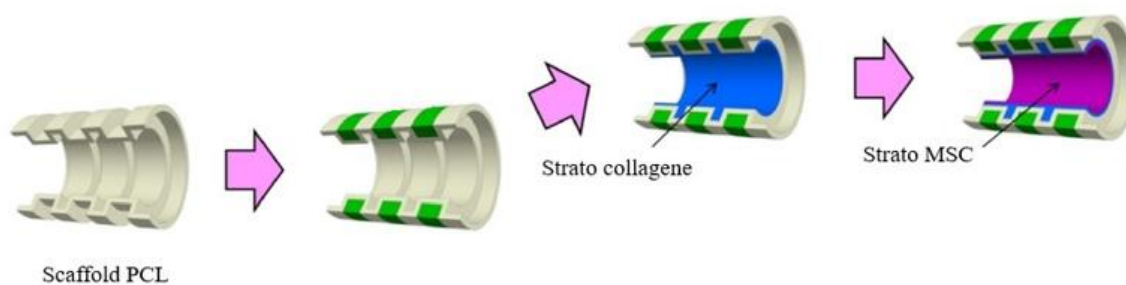


Figura 13. Scaffold PCL ottenuto per stampa 3D indiretta. Applicazione di uno strato di su cui viene trasferito un foglio di cellule MSC per andare a ricostituire un epitelio funzionale [51].

### 2.1.3 Materiali utilizzabili

La scelta del materiale è fondamentale per conferire allo scaffold le caratteristiche desiderate. La resistenza meccanica, importante per prevenire il collasso delle vie aeree, è una delle specifiche di maggiore importanza che uno scaffold tracheale deve rispettare e questa dipende significativamente dalla composizione e dalla lavorazione del materiale. I polimeri utilizzati per la fabbricazione di scaffold per ingegneria tissutale possono essere classificati in due categorie: naturali, la cui origine viene da un materiale biologico, e sintetici, interamente sintetizzati o prodotti. I polimeri biodegradabili sono definiti come polimeri che possono essere degradati da microrganismi nell'ambiente o da fluidi biologici *in vivo*. Una combinazione di materiali naturali e sintetici permette di ottenere uno scaffold con eccellente bioattività e adeguate proprietà meccaniche. La funzione principale di uno scaffold biodegradabile per ingegneria tissutale tracheale è fornire un supporto

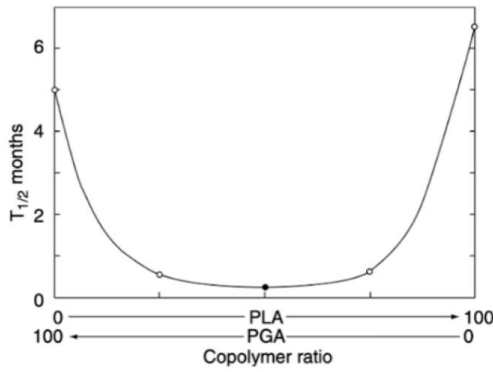
## Ingegneria tissutale

temporaneo mentre le cellule condrogeniche seminate generano una matrice cellulare per formare tessuto cartilagineo, perciò risulta fondamentale individuare un tempo di degradazione adeguato, proporzionale alla velocità di formazione della cartilagine, e scegliere sulla base di questo il materiale più adatto. È importante verificare che la scelta del materiale sia compatibile con la tecnica di produzione selezionata per lo scaffold, così che vengano mantenute le proprietà meccaniche e la biocompatibilità. Tra i materiali polimerici biodegradabili che vanno incontro ad idrolisi *in vivo* e che possono essere utilizzati, singolarmente o in combinazione con altri, per la fabbricazione di scaffold tracheali troviamo l'acido poliglicolico (PGA), l'acido polilattico-glicolico (PLGA), il policaprolattone (PCL), poli(L-lattico-co-caprolattone) PLLA-PCL, poli uretano (PU), poliestere-uretano (DegraPol®) oltre a compositi di fibrina/ialuronano, compositi di PGA/alginate[22].

### Polimeri sintetici

L'acido poliglicolico (PGA) è un polimero biodegradabile lineare alifatico, termoplastico e con elevata temperatura di fusione (225-230°C) e di transizione vetrosa (35-40°C). Ha un ottimo grado di biocompatibilità, buona resistenza meccanica ed elevata rigidità, tuttavia presenta un tempo di degradazione molto rapido: in 4-6 mesi degrada completamente, ma già dopo 1-2 mesi perde le sue proprietà meccaniche; questo comporta che l'acido glicolico, rilasciato come prodotto di degradazione, possa danneggiare i tessuti circostanti andando a innescare un'inflammazione e una risposta immunitaria. Per questi motivi in letteratura sono riportati pochi studi che utilizzino il PGA come materiale per la realizzazione di scaffold tracheali; il PGA risulta comunque utilizzabile se utilizzato congiuntamente con materiali che garantiscano la stabilità meccanica dello scaffold per un periodo di tempo adeguato o se pre-coltivato *in vitro* con conseguente formazione di ECM che funge da barriera tra PGA e tessuto ospite[1].

L'acido poli(lattico-co-glicolico) o PLGA è un copolimero biodegradabile e biocompatibile approvato dalla FDA per applicazioni biomedicali. È stato studiato per realizzare scaffold ingegnerizzati della trachea per via del suo grado di porosità adeguato a favorire e indurre la rivascolarizzazione dell'impianto *in vivo*. Il suo tempo di degradazione e le sue proprietà meccaniche sono modulabili andando a variare il rapporto tra PLA e PGA di cui è costituito. Un aumento della percentuale del PLA rende il PLGA più idrofobico, aumentando il tempo di degradazione. Tuttavia, la presenza del PLA disgrega la struttura cristallina del PGA. Per questo motivo, se la quantità di PGA supera il 75% si osserva un ulteriore incremento del tempo di degradazione. Il PLGA necessita comunque di essere utilizzato congiuntamente ad altri materiali per garantire le proprietà meccaniche necessarie per la realizzazione di una trachea ingegnerizzata.



Polymer	Biodegradation time (months)
L-PLA	>24
DL-PLA	12–16
DL-PLGA (85 : 15)	5–6
DL-PLGA (75 : 25)	4–5
DL-PLGA (50 : 50)	1–2
DL-PLGA (50 : 50) H <sup>a</sup>	<1
PGA	6–12

Figura 14. Tempo di degradazione del PLGA in relazione alla percentuale di PGA e PLA.

Il PCL è un poliesteri alifatico dotato di ottima stampabilità per la sua bassa temperatura di fusione (60°C) e di transizione vetrosa (-60°C), è inoltre approvato dalla *Food and Drug Administration (FDA)* come polimero biocompatibile e biodegradabile. In vari studi eseguiti negli ultimi anni è stato dimostrato che il PCL possiede proprietà che lo rendono idoneo per una possibile applicazione nell'ingegneria tissutale tracheale in quanto si presta ad essere lavorato con tecniche di stampa 3D senza l'utilizzo di solventi tossici, possiede eccellenti proprietà meccaniche (elevata flessibilità) e il suo tempo di degradazione *in vivo* per idrolisi enzimatica è sufficientemente lungo (circa 3 anni) da consentire la rigenerazione completa del tessuto, oltre a non rilasciare prodotti di degradazione tossici [28]. Nel 2019 al *Shanghai Children's Medical Center* una ricerca ha indagato le proprietà meccaniche di uno scaffold realizzato in PCL per applicazioni su modello animale di TET. Lo scaffold è stato realizzato con tecnica di stampa 3D ed è composto da sei anelli in PCL con forma a "C" e con la stessa morfologia e struttura degli anelli cartilaginei del modello animale di capra. I test meccanici di compressione radiale eseguiti sia sul modello in solo PCL sia sul modello TET hanno mostrato una maggiore resistenza rispetto alla trachea nativa, confermandoli ideale per impianti chirurgici a lungo termine [12].

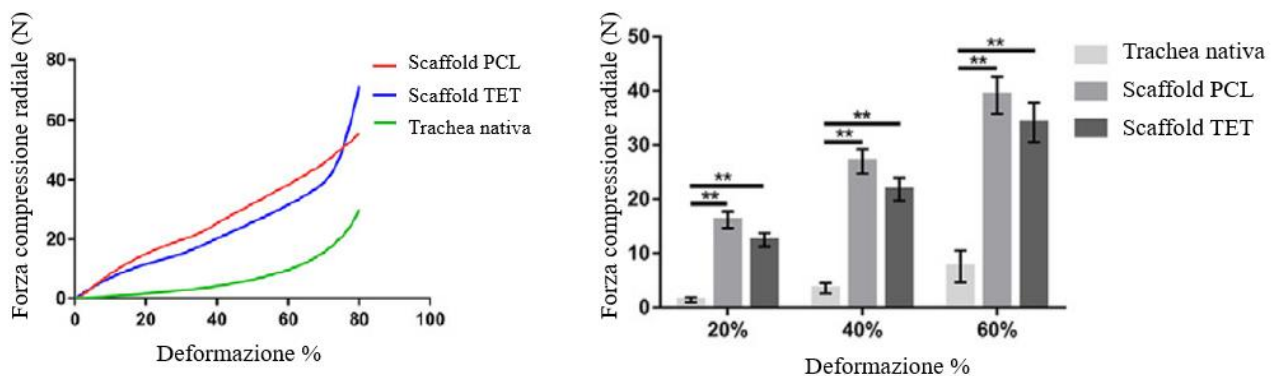


Figura 15. Analisi di compressione radiale su trachea nativa, scaffold cellularizzato (TET) e non (PCL) [11]

## Ingegneria tissutale

In diversi studi è stata osservata una buona biocompatibilità cellulare del materiale, ulteriormente migliorata dall'utilizzo combinato con materiali di origine naturale che si comportano come elementi bioattivi. L'utilizzo di uno scaffold in PCL coniugato con collagene di tipo II con condrociti ha permesso ai ricercatori Lin et al. di ottenere una struttura con adeguata resistenza meccanica e una crescita di epitelio cigliato pseudostratificato[52]; risultati simili sono stati ottenuti da Wu et al. con scaffold in P(LLA-CL) e collagene portando ad una completa rigenerazione di tessuto funzionale e ad una completa rivascularizzazione dell'area danneggiata a seguito di esperimenti *in vivo* su ratti [46]. La buona proliferazione delle cellule su scaffold in PCL e collagene, trattati ulteriormente con siero di cordone ombelicale, nella zona luminale, come veicolo di fattore di crescita, è stata verificata e quantificata da Jang et al. [24] con tecniche di rilevazione di densità ottica e in termini di percentuale di F-actina presente nei campioni (Figura 16).

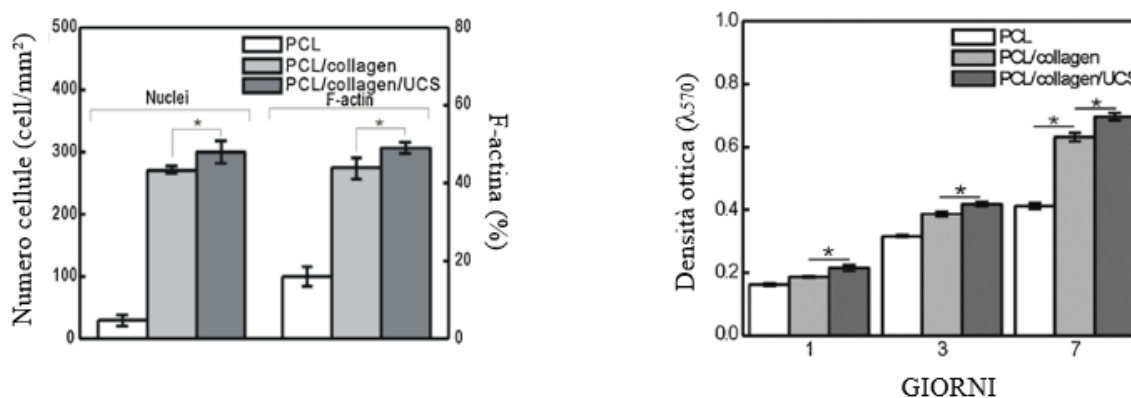


Figura 16. A sinistra analisi quantitativa del numero di cellule per mm<sup>2</sup> e area (%) con presenza di F-actina. A destra vitalità cellulare di PCL puro, PCL con collagene e PCL con collagene e trattamento con siero di cordone ombelicale (UCS)[24].

Mentre il PCL da solo è sufficiente per mimare le proprietà meccaniche della cartilagine nativa, è necessaria un'ottimizzazione per riprodurre la regione muscolare che deve mantenere la resistenza meccanica richiesta ma anche la flessibilità necessaria per mimare le caratteristiche del tessuto muscolare liscio. La porzione di interesse può quindi essere progettata e realizzata, via stampa 3D, con una geometria specifica che permetta di ottenere proprietà meccaniche comparabili alla trachea nativa, come è stato fatto nello studio di Ke et al., dove è stato prodotto uno scaffold in PCL e idrogel cellulare con fattori di crescita [2].

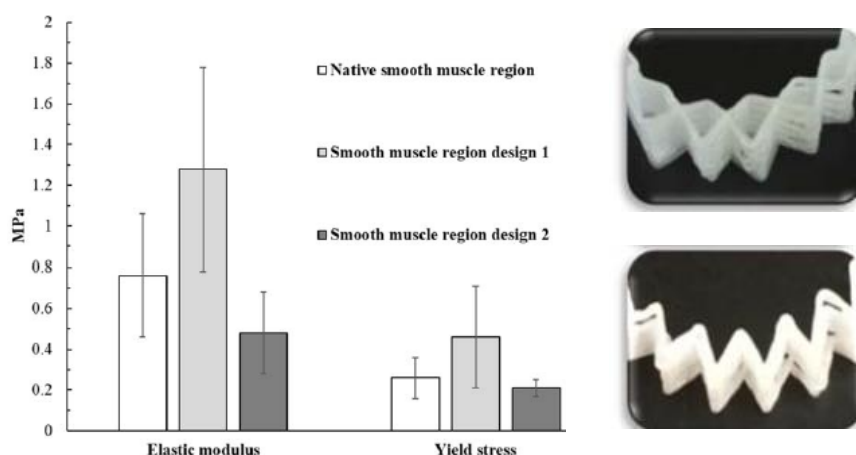


Figura 17. Confronto di modulo elastico e tensione di snervamento tra due diversi design di regione di muscolo liscio (1 sopra, 2 sotto) e muscolo liscio di trachea nativa. Entrambi i design mostrano proprietà meccaniche comparabili con il muscolo liscio di trachea nativa, seppur con un certo margine di miglioramento [2].

Per ultimo, ma non meno importante, il PCL si è dimostrato stabile al processo di sterilizzazione per irradiazione con raggi gamma, senza mostrare alterazioni nella struttura cristallina pre e post trattamento [6].

I materiali visti fin ora presentano un'elasticità limitata che non riesce a mimare perfettamente quella del tessuto nativo. Il poliuretano (PU) è un elastomero versatile ampiamente utilizzato per applicazioni biomedicali per la sua buona biocompatibilità e proprietà meccaniche. Il PU biodegradabile a base acqua è nato come alternativa al tradizionale PU a base solvente in risposta alle preoccupazioni legate alla dispersione di composti organici volatili nell'ambiente. Nel 2014 un gruppo di ricercatori della *National Taiwan University* ha sintetizzato un nuovo poliuretano biodegradabile sotto forma di nanoparticelle mediante un processo a base acquosa in cui il segmento soft era basato su dioli di PCL e PEBA (polietilene butilene adipato) [25]. La composizione dei segmenti soft è stata progettata per ottenere un PU con le proprietà meccaniche e il tempo di degradazione appropriate per l'utilizzo in ingegneria tissutale della cartilagine.

Tabella 7. Proprietà meccaniche di scaffold realizzati in diversi materiali con tecnica di stampa 3D [25].

Scaffolds	Proprietà meccaniche (compressione)			Recupero della forma (%)		
	$E'$ [MPa]	$E''$ [MPa]	$\tan\delta$	1% strain	5% strain	10% strain
PLGA	$1.66 \pm 0.06$	$0.16 \pm 0.02$	$0.10 \pm 0.01$	$69.1 \pm 0.7$	$59.7 \pm 0.6$	$38.2 \pm 0.6$
PU	$0.48 \pm 0.06$	$0.09 \pm 0.01$	$0.18 \pm 0.02$	$99.8 \pm 0.1$	$87.2 \pm 0.5$	$67.7 \pm 1.2$
PUe	$0.40 \pm 0.02$	$0.16 \pm 0.03$	$0.38 \pm 0.06$	$87.8 \pm 1.1$	$74.6 \pm 1.3$	$57.0 \pm 0.6$



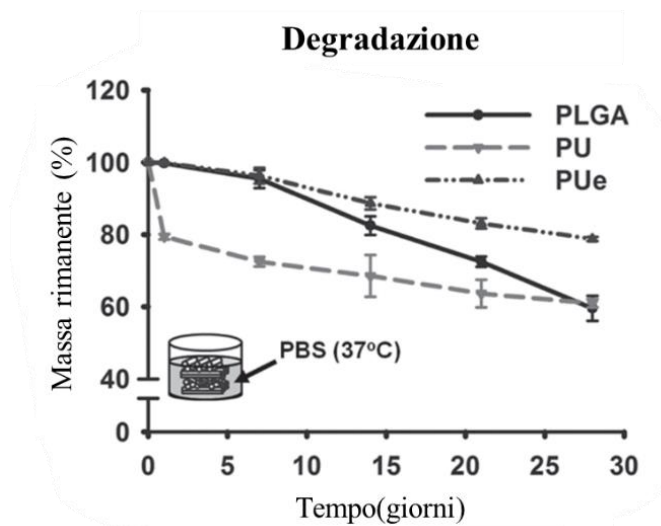


Figura 18. Confronto tra profilo di degradazione di scaffold in PLGA, PU e PUE (scaffold in PU dopo aver rimosso l'ossido di polietilene - PEO) espresso come percentuale di massa rimanente[25].

Il materiale è quindi stato utilizzato per fabbricare scaffold con la tecnica del 3D printing che hanno mostrato proprietà elastiche superiori ai classici polimeri impiegati nell'ingegneria tissutale e con una porosità inter-filamenti tale da favorire la deposizione di matrice extracellulare da parte delle cellule coltivate sulla struttura. Studi *in vitro* hanno dimostrato che questa tipologia di scaffold, trattata con l'aggiunta di acido ialuronico, favorisce la differenziazione di MSCs e stimola la secrezione di ECM ricca in glicosamminoglicani e collagene, utili per la rigenerazione del tessuto cartilagineo [10]. Risulta inoltre possibile incorporare fattori di crescita e altre molecole bioattive all'interno dello scaffold durante il processo di fabbricazione e prevenire la denaturazione delle biomolecole grazie al processo di stampa a freddo utilizzato (LFDM). L'elasticità finale del costruito risulta quindi promettente per applicazioni future di ingegneria tissutale della trachea.

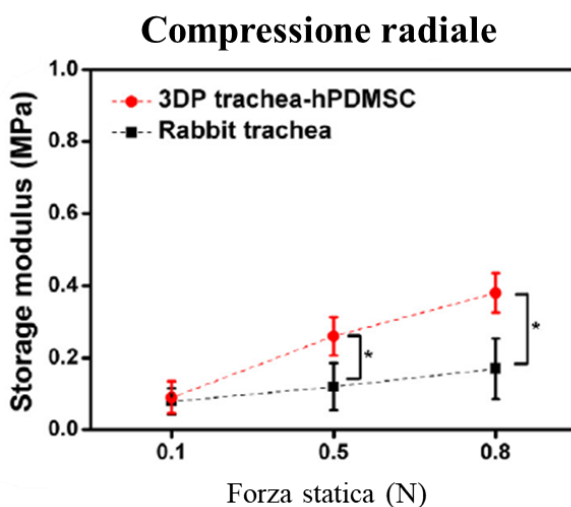


Figura 19. Storage modulus dello scaffold per trachea, ottenuto per stampa 3D (LFDM); stimolazione a compressione dinamica circonferenziale.  $p < 0.05$  tra i due gruppi [10].

Ingegneria tissutale

## Polimeri naturali

I polimeri naturali utilizzati nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti per la creazione di costrutti tracheali appartengono a due categorie: polisaccaridi, come alginato e chitosano, e proteine, come collagene e gelatina.

L'alginato è un polisaccaride anionico di origine vegetale, estratto dalla parete cellulare dell'alga bruna. Possiede un'ottima biocompatibilità, bassa citotossicità ed è in grado di supportare l'adesione e la proliferazione cellulare quando reticolato. Il processo di reticolazione avviene con l'esposizione del polimero a cationi multivalenti come  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Ba}^{2+}$ , senza l'utilizzo o la produzione di sostanze tossiche. Tuttavia, non possiede elementi bioattivi per l'adesione cellulare e deve essere trattato con componenti che favoriscano l'adesione e la differenziazione cellulare. L'ottimizzazione della concentrazione di alginato è importante per ottenere una stabilità per il mantenimento della desiderata e per prevenire il collasso della struttura. Tuttavia, un'elevata concentrazione può avere effetti dannosi sulla vitalità cellulare e va quindi calibrata in modo da ottenere sia una buona stampabilità sia una buona vitalità, la concentrazione ottimale si assesta al 3% [21].



*Figura 20. Cubi di alginato stampato per estrusione concentrazione crescente da sinistra verso destra. La concentrazione maggiore di alginato (3%) permette di ottenere una struttura più precisa e porosa [21].*

Il collagene costituisce il maggior componente dei tessuti connettivi. È una proteina biodegradabile e biocompatibile, utilizzata ampiamente come materiale per bioprinting. È presente nella matrice extracellulare e provvede al supporto strutturale delle cellule, oltre a favorire l'adesione e la proliferazione cellulare. La limitazione principale legata all'utilizzo del collagene è la sua bassa viscosità a temperatura ambiente e il lungo tempo di gelificazione. Per migliorar e la stampabilità e le proprietà meccaniche è possibile combinarlo con altri polimeri. Ke et al. [2] hanno realizzato in uno studio del 2019 uno scaffold in PCL e collagene modificato (Gelin-S<sup>®</sup>), con aggiunta di ialuronano, eparina e fattori di crescita per supportare la differenziazione cellulare post stampa e con agenti reticolanti per conferire al materiale le proprietà meccaniche adeguate al bioink. Il costrutto realizzato

Ingegneria tissutale

ha mostrato una alta vitalità post stampa e una appropriata differenziazione della morfologia cellulare, con produzione di ECM cartilagine specifica.

La gelatina è prodotta per denaturazione del collagene, è biocompatibile, biodegradabile e favorisce l'adesione e la proliferazione cellulare. È termosensibile e si presenta in forma di idrogel a basse temperature o in forma di sol con bassa viscosità alla temperatura corporea di 36°C. Viene spesso combinata con altri materiali che ne modificano la viscosità o ne consentono la reticolazione. Un esempio è la forma di gelatina metacrilata (GelMA), che grazie all'aggiunta di foto-polimerizzanti sensibili ai raggi UV reticola in modo proporzionale al tempo di esposizione e all'intensità dei raggi, così da ottenere un idrogelo stabile in grado di mantenere la forma stampata.

## 2.1.4 Tabella riassuntiva

<b>TECNICHE STAMPA 3D</b>		
	Fused deposition modeling (FDM) Liquid frozen deposition manufacturing (LFDM) FDM a quattro assi (su mandrino rotante) Stampa 3D indiretta Bioprinting	
<b>MATERIALI</b>	<b>Sintetici</b>	<b>Naturali</b>
	PGA PLGA PCL PU <i>water based</i>	Alginato Collagene Gelatina GelMa
<b>GEOMETRIE</b>		
	Anelli con forma a "C" o circolari completi Struttura monostrato o multistrato Riproduzione di porzione cartilaginea e muscolare con geometrie e/o materiali distinti	

## 2.2 Cellule

Nel campo dell'ingegneria tissutale tracheale (TET) il successo nella realizzazione di un costrutto funzionale dipende ampiamente dalla tipologia di cellule utilizzate, dalle condizioni di coltura e dalle, precedentemente analizzate, proprietà meccaniche e chimiche dello scaffold. Dalla scelta delle cellule dipende anche il possibile rigetto del costrutto dal sistema immunitario ospite, risulta quindi opportuno utilizzare fonti di cellule autologhe o strategie di induzione di tolleranza immunologica. Il tessuto tracheale è composto da differenti tipi di cellule con diverse funzioni riportate in Tabella 8.

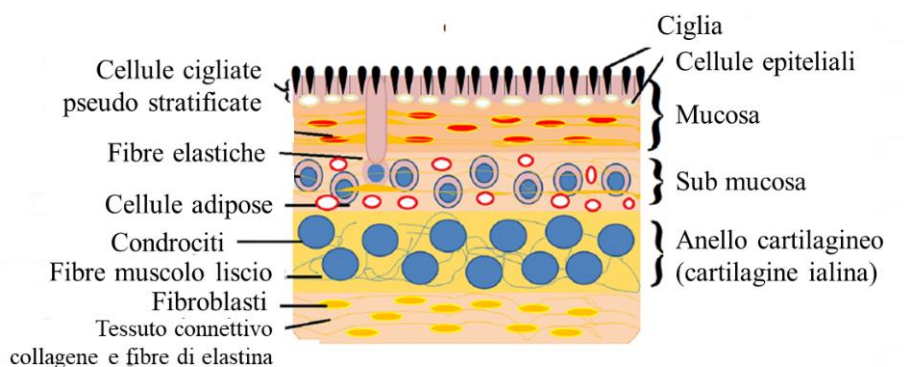


Figura 21. Stratificazione del tessuto tracheale [1].

Tabella 8. Differenti strati del tessuto tracheale, cellule e loro funzioni [1].

Strati	Cellule	Funzioni
Mucosa	Cellule cigliate	Sistema di difesa per bloccare ed espellere patogeni, microbi e polvere inalati.
	Cellule caliciformi	Secernono muco dalle ghiandole per mantenere il tessuto umido.
	Cellule granulari	Secernono ormoni che regolano la respirazione e la vascolarizzazione.
	Cellule epiteliali basali	Sostituiscono gli strati più esterni dell'epitelio.
	Fibroblasti e cellule linfatiche	Aiutano a rigenerare la matrice sottostante contenente fibre elastiche e tessuto linfatico, stabilizzare l'epitelio e degradare le particelle patogene.

## Ingegneria tissutale

Sub mucosa	Cellule adipose ed endoteliali	Questo strato è composto da tessuto connettivo con vasi ematici e linfatici che consentono la corretta diffusione delle secrezioni della mucosa attraverso le ghiandole.
Strato cartilagineo	Condrociti	Rilasciano matrice cartilaginea, mentre le cellule muscolari lisce garantiscono la flessibilità e mantengono il lume pervio.
Tessuto connettivo	Fibroblasti	Secernono una matrice ricca di collagene ed elastina per generare tessuto connettivo. Permettono di mantenere in contatto la trachea con gli organi adiacenti (esofago).

Esistono due principali fonti cellulari da cui attingere per lo sviluppo di tessuti ingegnerizzati: le cellule primarie somatiche, con funzioni specializzate e capacità proliferativa limitata, e le cellule staminali, capaci di auto-rinnovarsi e differenziarsi sviluppando funzioni specifiche (plasticità). Nello specifico gli studi per la realizzazione di costrutti tracheali ingegnerizzati si sono focalizzati sull'utilizzo di condrociti e cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs) autologhe [2]. Le cellule epiteliali sono un'altra linea cellulare utilizzata per la rigenerazione del tessuto della mucosa e sub mucosa, tessuto deputato alla protezione da agenti esterni e alla regolazione delle funzioni metaboliche delle vie aeree. Per veicolare le cellule all'interno dello scaffold possono essere utilizzate tecniche di semina statica e di perfusione dinamica, o il bioprinting. Altri metodi utilizzati tradizionalmente per la realizzazione di costrutti multistrato come la trachea sono: colata cellulare (*casting*), assemblaggio di foglietti cellulari (*cell sheet assembly*), immersione in soluzione di idrogel e cellule (*dip coating*).

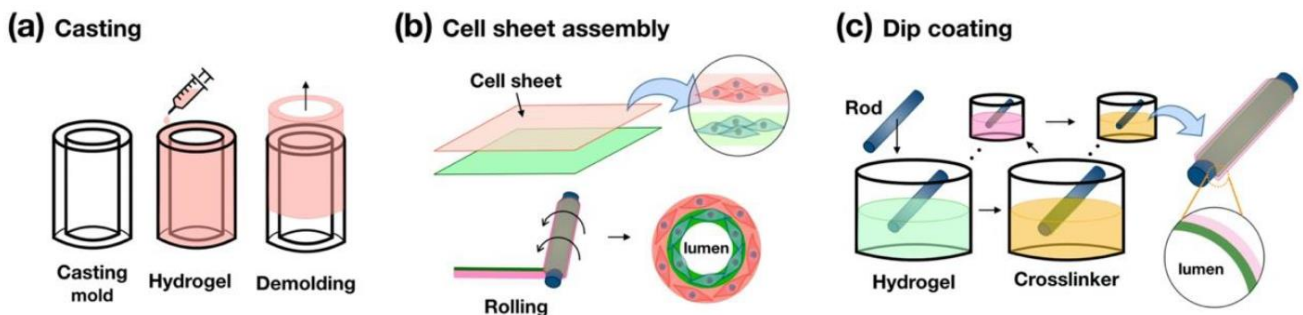


Figura 22. Illustrazione dei metodi tradizionali per la realizzazione di costrutti cellulari tubulari [33].

Le cellule del tessuto epiteliale e i condrociti della cartilagine ricoprono il ruolo più importante nella riproduzione della struttura della trachea e possono essere coltivati ed espansi per poi andare a

Ingegneria tissutale

produrre idrogeli stampabili con la tecnica di bioprinting o essere assemblati in foglietti cellulari per andare a ricostituire lo strato di mucosa una volta applicati nel lume del costruito.

## 2.2.1 Condrociti

I condrociti sono cellule deputate alla produzione di tessuto cartilagineo; possono essere ottenuti da diverse fonti e, in base alla loro origine, presentano diverse proprietà e producono cartilagine con caratteristiche differenti. Le fonti principali di condrociti sono i tessuti cartilaginei delle costole, dell'orecchio e del setto nasale o MSCs differenziate. I condrociti di origine auricolare, costale e tracheale hanno dimostrato una attività metabolica e un livello di vitalità simili, tuttavia, necessitano di una tecnica di raccolta invasiva. La tecnica di estrazione delle MSCs dal midollo osseo, eseguita sotto anestesia locale, risulta invece meno complessa e, di conseguenza, molti studi si sono focalizzati sul loro utilizzo e sulla loro differenziazione in diverse tipologie cellulari, tra cui i condrociti. Kojima et al. [26] hanno utilizzato condrociti prelevati sia dal setto nasale sia dalla trachea per la fabbricazione di TET con risultati promettenti in termini di proprietà meccaniche del tessuto ingegnerizzato che sono risultate assimilabili a quelle del tessuto nativo, utilizzando cellule isolate in modo non invasivo e senza che fosse compromessa la qualità del tessuto ingegnerizzato finale. Invece, un esempio di utilizzo di MSC estratte da midollo osseo è riportato nello studio di Machino et al. [27] del 2019, dove le cellule sono state coltivate in presenza di fibroblasti, cartilagine e cellule endoteliali del cordone ombelicale, incapsulate poi in sferoidi e stampate in una architettura tridimensionale tubulare simile alla trachea nativa. La coltivazione in bioreattore sotto condizioni fisiche e chimiche controllate ha permesso la rigenerazione di tessuto biofunzionale con buone proprietà meccaniche, mentre lo studio successivo *in vivo* ha mostrato una adeguata vitalità, neo-vascularizzazione e formazione di strato epiteliale luminale. Un'altra fonte che si è dimostrata promettente per lo sviluppo di tessuto cartilagineo tracheale sono le cellule staminali estratte dal fluido amniotico; particolarmente utili per il trattamento di stenosi o malacia congenite; queste cellule possono essere estratte in alta densità, risultano facili da isolare e mostrano una elevata abilità proliferativa ponendosi come potenziale soluzione per applicazione di ingegneria tissutale delle vie aeree nei neonati [53].

## 2.2.2 Cellule epiteliali

L'epitelio svolge l'importante funzione di regolazione metabolica delle funzioni delle vie aeree e di barriera fisica contro gli agenti patogeni e microrganismi. Nonostante le cellule epiteliali native abbiano la capacità di migrare sulla superficie luminale del costrutto ingegnerizzato, la riepitelizzazione e la ricrescita della mucosa necessitano di un considerevole lasso di tempo, specialmente nel caso di ricostruzione di segmenti estesi di trachea, andando ad esporre il sito di impianto a infezioni batteriche, crescita di tessuto di granulazione e ristenosi [28]. Per questo risulta necessario seminare sulla superficie dello scaffold ulteriori cellule che rendano più rapido il processo di rigenerazione del tessuto epiteliale. Molte sono le fonti da cui è possibile isolare cellule epiteliali ma quelle più utilizzate per l'epitelizzazione della superficie luminale tracheale sono la mucosa tracheale e il tessuto nasale. Le cellule epiteliali nasali mostrano tuttavia una capacità replicativa ridotta e non sono in grado di differenziarsi oltre il terzo passaggio, questo limita la loro applicabilità. Anche le cellule staminali embrionali (ESCs) sono in grado di generare cellule basali, cigliate e caliciformi, fondamentali per una corretta rigenerazione dell'epitelio. Risultati simili si possono ottenere anche con cellule staminali pluripotenti come le cellule staminali mesenchimali (MSCs). In diversi studi è stato osservato come la presenza di fibroblasti e mesenchima (tessuto connettivo con capacità pluripotente composto di cellule mesenchimali ramificate), e quindi i fattori di crescita secreti da queste cellule, favoriscano la formazione di epitelio colonnare pseudostratificato con cellule cigliate, basali e caliciformi in proporzioni simili al tessuto tracheale nativo. Questa differenziazione non è stata osservata per cellule epiteliali in monocultura[28]. Anche le cellule endoteliali, in uno studio di Zani et al [51], hanno dimostrato avere un ruolo nel promuovere l'epitelizzazione della trachea se utilizzate simultaneamente con cellule epiteliali; nello specifico le cellule epiteliali sembrano avere un'azione di confinamento del sito dove è presente il danno tissutale, mentre le cellule endoteliali proteggono l'epitelio e favoriscono la rivascolarizzazione. Un'azione simile è svolta anche da MSCs che promuovono l'angiogenesi e accelerano la rigenerazione della mucosa [54].

## 2.3 Fattori di crescita

I fattori di crescita sono proteine e molecole capaci di stimolare la proliferazione, il differenziamento cellulare e prevenire l'apoptosi. Sono utilizzate per la comunicazione tra le cellule di un organismo, trasmettono informazioni dall'ambiente circostante, regolano l'entrata in mitosi, la migrazione e il

## Ingegneria tissutale

differenziamento cellulari; un esempio sono le citochine, molecole che modulano la risposta infiammatoria dell'organismo. La selezione di adeguati fattori di crescita è un passaggio fondamentale per la rigenerazione di un tessuto funzionale e va effettuata tenendo conto della specifica combinazione di cellule e di scaffold che vengono utilizzati. Per l'applicazione in ingegneria tissutale tracheale vengono riportati in letteratura diversi tipi di fattori di crescita, i principali sono elencati in Tabella 9.

Tabella 9. Fattori di crescita e loro funzioni per la rigenerazione di tessuto tracheale [1].

Tipologia	Funzione
EGF	Stimola la proliferazione migliora le vie metaboliche e il trasporto di ioni/biomolecole.
PDGF	Accelera la crescita cellulare e la rigenerazione dello strato epiteliale cigliato. Accelera la velocità di guarigione.
IGF	Regola la velocità di proliferazione cellulare, riduce l'apoptosi e mantiene stabili le vie metaboliche.
BMP	Induce la rigenerazione della cartilagine. Stimola la reazione post-infiammatoria.
bFGF	Responsabile per la condrogenesi e per la rigenerazione della cartilagine con neo-vascularizzazione a partire da tessuto cartilagineo auricolare. Stimola la rigenerazione di tessuto epiteliale.
TGF	Induce la differenziazione di condrociti e la formazione di tessuto connettivo con neo-vascularizzazione della TET.
VEGF	Aumenta la proliferazione delle cellule endoteliali e la rivascularizzazione del tessuto.

Abbreviazioni: EGF, *epithelial growth factor*; PDGF, *platelet-derived growth factor*; IGF, *insulin-like growth factor*; BMP, *bone morphogenetic protein*; bFGF, *basic fibroblast growth factor*; TGF, *transforming growth factor*; VEGF, *vascular epithelial growth factor*.

I fattori di crescita possono essere diluiti nel mezzo di coltura o inseriti all'interno del materiale che compone lo scaffold, in questo modo vengono rilasciati col degradarsi della struttura ed è possibile sfruttare il loro effetto direttamente nel sito di impianto. La distribuzione di agenti bioattivi, fattori di crescita e farmaci permette di ottenere una formazione di tessuto con matrice extracellulare simili al tessuto nativo da replicare.

Per la rigenerazione del tessuto cartilagineo, risultati promettenti sono stati ottenuti con l'utilizzo di rhTGF- $\beta$ 3 (*human recombinant TGF*), fattore bioattivo essenziale per una corretta differenziazione condrogenica di MSCs. Wang et al. [29] hanno utilizzato rhTGF- $\beta$ 3 congiuntamente con siero



Ingegneria tissutale

albumina bovina (BSA) per la rigenerazione di tessuto cartilagineo su di uno scaffold in fibre di P(LLA-CL); la BSA è una proteina in grado di stabilizzare il TGF senza andare ad incidere sulle sue proprietà, mentre il rhTGF- $\beta$ 3 favorisce la sintesi di collagene di tipo II e di glicosamminoglicani. I risultati ottenuti dalle analisi di immunofluorescenza e dallo staining istologico hanno evidenziato una maggiore sintesi di collagene di tipo II e una maggiore espressione di glicosamminoglicani da parte dei condrociti rispetto al gruppo di controllo, indicatori della bioattività del rhTGF- $\beta$ 3 rilasciato dallo scaffold.

Quando si considera invece la rigenerazione del tessuto epiteliale un ruolo fondamentale viene ricoperto dalle componenti della matrice extracellulare nel regolare l'adesione delle cellule epiteliali e della loro migrazione presso il sito di impianto. Tra i fattori che favoriscono la rigenerazione del tessuto epiteliale troviamo la laminina e la fibronectina; la laminina esercita il suo effetto facilitando la migrazione delle cellule staminali e favorendo una più rapida ricrescita della mucosa, rispetto alla situazione di uno scaffold non trattato, come riportato nello studio di Lee et al. [28].

## 2.4 Bioreattore

Le cellule scelte per la rigenerazione del tessuto devono imitare lo stato fisiologico delle cellule *in vivo* e mantenere le loro funzioni e vitalità nel tempo. Risulta perciò importante controllare in modo preciso la proliferazione cellulare, in quanto una proliferazione insufficiente può comportare una perdita di vitalità del costruito impiantato, mentre una eccessiva proliferazione può provocare iperplasia o apoptosi. Per questo risulta fondamentale l'utilizzo di bioreattori, dispositivi progettati per contenere strutture cellulari e per mimare le condizioni *in vivo*; fornendo stimoli meccanici alle cellule, consentono di regolare le funzioni cellulari e la crescita del tessuto in modo che riproduca fedelmente il tessuto nativo. Permettono, inoltre, di perfondere il tessuto con i nutrienti necessari per la sopravvivenza delle cellule in una struttura tridimensionale [55]. Quando risulta necessario ricostruire un organo cavo, come i condotti delle vie aeree, con un sostituto funzionale, risulta fondamentale l'utilizzo di un bioreattore che garantisca una tecnica di coltura ed un ambiente adeguati allo sviluppo di tessuto cartilagineo esterno ed epiteliale nel lume interno, differenziando il mezzo di coltura tra interno ed esterno del condotto. È poi fondamentale che l'ossigenazione e la distribuzione di nutrienti risulti uniforme su tutta la lunghezza e la circonferenza del costruito. Per rispettare questi criteri è stato sviluppato nel laboratorio di bioingegneria del Politecnico di Milano un bioreattore che potesse rispondere a tutte queste esigenze.

## Ingegneria tissutale

Il bioreattore rispetta le seguenti specifiche progettuali:

- 1) facilitare la procedura di semina cellulare su entrambi i lati della matrice 3D tubolare, garantendone l'omogeneità;
- 2) permettere la semina e la coltura di differenti tipologie cellulari sui due lati dello scaffold;
- 3) migliorare l'ossigenazione del mezzo di coltura e il trasporto di massa (metaboliti, cataboliti e ossigeno) tra il mezzo e le cellule adese al costrutto;
- 4) stimolare idrodinamicamente il costrutto, favorendo l'attività metabolica e il processo di differenziazione;
- 5) permettere il raggiungimento e il mantenimento della sterilità e rispettare i criteri di *Good Laboratory Practice*, essere di semplice utilizzo e avere un costo contenuto;
- 6) permettere l'automazione del sistema.

È costituito da una camera di coltura principale, alla quale si accede tramite un ampio coperchio rettangolare posto nella porzione superiore del dispositivo, permettendo un facile accesso alla camera per l'alloggio e la rimozione dello scaffold.

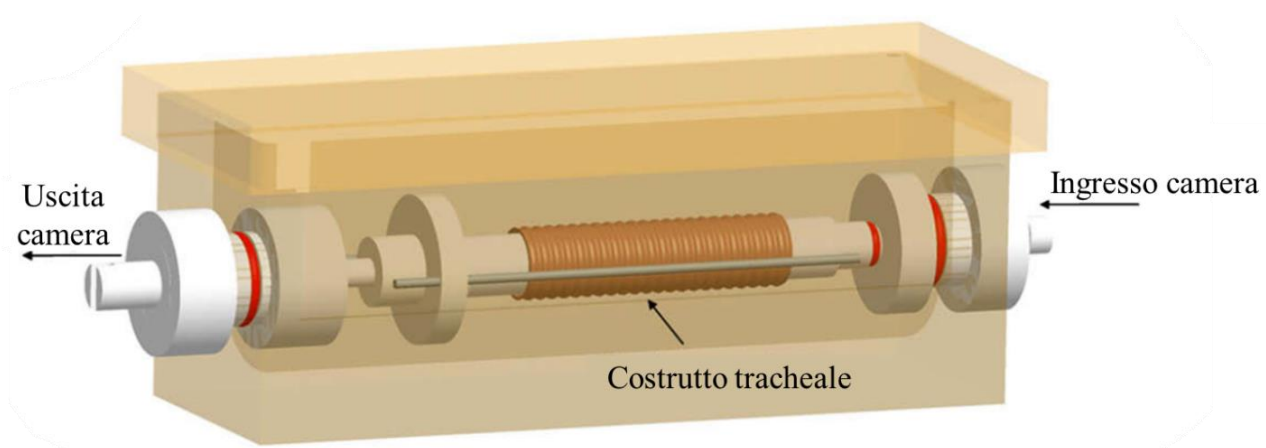


Figura 23. Vista tridimensionale del bioreattore assemblato, con costrutto tracheale alloggiato sul condotto ruotante [30].

Quando lo scaffold viene alloggiato sull'apposito sostegno all'interno della camera, l'ambiente interno al condotto (camera interna) resta separato dall'ambiente esterno (camera esterna) dalla parete del costrutto. Questo permette di mantenere condizioni di coltura differenti tra i due ambienti. Un condotto coassiale al costrutto permette di introdurre cellule e nutrienti nella zona luminale e di

## Ingegneria tissutale

effettuare il ricambio del medium. La separazione delle due camere consente di effettuare semina e coltura confinate e distinte sulle due superfici della matrice tubolare.

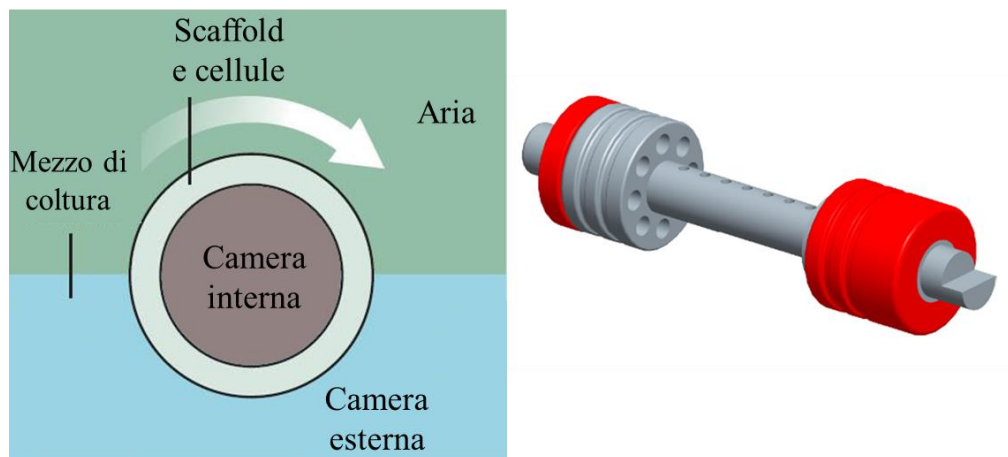


Figura 24. Suddivisione schematica della camera del bioreattore (sinistra). Supporto per l'alloggio dello scaffold e condotto coassiale per l'introduzione del mezzo di coltura nella zona luminale (destra) [30].

Un anello di silicone permette la tenuta idraulica e il mantenimento della sterilità nelle zone di interfaccia critiche tra interno ed esterno del bioreattore, mentre un sistema di elementi mobili collegati al sistema di supporto dello scaffold permettono il movimento rotatorio dello scaffold attorno al suo asse longitudinale. Immergendo metà dello scaffold nel mezzo di coltura e facendo ruotare il mandrino, le cellule sono ciclicamente esposte all'atmosfera gassosa dell'incubatore e alla fase liquida del medium. Durante l'esposizione all'atmosfera dell'incubatore lo scaffold rimane umido e lo strato di mezzo di coltura che resta adeso alla superficie viene saturato di ossigeno ciclicamente. Grazie alla modularità del design e alle diverse configurazioni il sostegno può essere adattato alla lunghezza e al diametro del costrutto cellulare. Il coperchio mima la struttura di chiusura delle piastre Petri, permettendo la chiusura della camera, consentendone ossigenazione tramite filtri HEPA e mantenendo l'ambiente interno in condizioni di sterilità. Tutti i materiali rispettano i criteri di biocompatibilità, autoclavabilità e trasparenza delle pareti [30].

## Capitolo 3

# Progettazione dello scaffold

---

Dopo aver analizzato le opzioni disponibili per la scelta del materiale, del metodo di produzione e della componente cellulare, in questo capitolo verranno definiti i parametri meccanici da tenere in considerazione per la progettazione di uno scaffold per ingegneria tissutale tracheale (TET) e sulla base di questi verranno quindi selezionati i materiali da utilizzare, la tecnica di fabbricazione e la geometria per la realizzazione di una trachea ingegnerizzata, seppur in linea teorica.

### 3.1 Proprietà meccaniche

Esiste una stretta relazione tra le prestazioni meccaniche della trachea e la sua funzione fisiologica durante la respirazione. La sfida principale nella realizzazione di TET è ottenere uno scaffold impiantabile con proprietà meccaniche comparabili a quelle di una trachea nativa. Per realizzare un costrutto con i requisiti meccanici appropriati è necessario caratterizzare il comportamento meccanico della trachea nativa. Di conseguenza, negli ultimi anni è aumentato l'interesse scientifico verso l'analisi delle proprietà meccaniche dei tessuti che costituiscono la trachea (cartilagine, tessuto muscolare e tessuto connettivo) per ottenere una dettagliata caratterizzazione meccanica e una fedele modellizzazione della trachea [2].

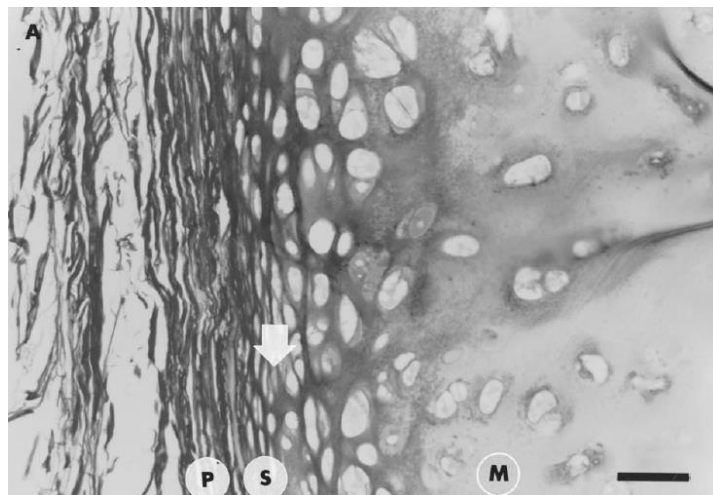
#### 3.1.1 Proprietà meccaniche del tessuto nativo

Nonostante la caratterizzazione meccanica della trachea sia un punto di partenza importante per la realizzazione di uno scaffold per TET, le caratteristiche meccaniche di questo organo non sono ancora state completamente determinate. In letteratura sono riportati risultati e proprietà dei tessuti spesso contrastanti tra loro a causa dei differenti protocolli utilizzati e alla variabilità dei campioni analizzati. Le componenti che hanno maggiore influenza sul comportamento meccanico della trachea sono la cartilagine, il muscolo liscio e il tessuto connettivo. La cartilagine, che costituisce gli anelli tracheali, ha la funzione di mantenere pervio il lume nonostante le variazioni di pressione intratoracica che si susseguono durante la respirazione e che provocherebbero altrimenti il collasso delle vie aeree.

## Progettazione dello scaffold

Variatione delle proprietà biomeccaniche della componente cartilaginea potrebbero contribuire ad un'alterazione delle funzioni polmonari e ad una ostruzione delle vie aeree. Le estremità degli anelli cartilaginei sono congiunte da una porzione di tessuto muscolare liscio che contraendosi provoca la flessione della cartilagine e modula la variazione del diametro del lume durante la respirazione e la deglutizione [2].

Trabelsi et al. [33] hanno svolto un'analisi della risposta meccanica di cartilagine e muscolo liscio sotto l'applicazione di forze di tensione per arrivare a definire un modello costitutivo per la rappresentazione di questi tessuti. La prima parte dello studio si è focalizzata su un'analisi istologica, così da poter mettere in relazione la microstruttura dei tessuti con il loro comportamento meccanico. Sono stati poi eseguiti test su cartilagine e muscolo liscio per tracciare le curve sperimentali che descrivessero il comportamento meccanico con il modello matematico più appropriato. Lo studio istologico è stato eseguito su campioni prelevati dalla trachea umana di un individuo maschio adulto senza alterazioni patologiche del condotto tracheale. È stato osservato come la cartilagine sia organizzata in una rete di fibrille di collagene che si presentano orientate in modo parallelo in prossimità della superficie abluminale e che vanno poi ad assumere un orientamento casuale man mano che ci si allontana da essa; nello studio è quindi stato utilizzato un modello isotropico per rappresentare il suo comportamento.



*Figura 25. Staining istochimico di proteoglicani e collagene in prossimità della superficie abluminale della cartilagine tracheale. Il collagene è organizzato in modo differente nelle tre fasce (P) pericondrio, (S) zona superficiale abluminale e (M) zona centrale della cartilagine [56].*

La cartilagine, come tutti i tessuti biologici, ha un comportamento viscoelastico, in quanto materiale bifasico con struttura interna fibrosa. Tuttavia, quando vengono effettuati test su cartilagine tracheale possono essere applicate alcune semplificazioni: la cartilagine è fisiologicamente soggetta a sforzi

## Progettazione dello scaffold

prevalentemente in flessione applicati dalla fascia muscolare che connette i due rami degli anelli, che possono essere considerati come elementi rigidi. In vari studi riportati in letteratura, infatti, la cartilagine della trachea, all'interno dell'intervallo fisiologico di deformazioni a cui è sottoposta (5%), viene considerata come un materiale elastico lineare, con isteresi trascurabile e stress residuo nel campione quasi nullo; oltre questo limite stress residuo e isteresi aumentano progressivamente. Trabelsi et al. [6] hanno quindi effettuato i test in un intervallo di deformazione inferiore al 5% considerando il comportamento complessivo della cartilagine come isotropico iperelastico. La costante di Neo-Hookean, trovata adattando il modello numerico ai risultati sperimentali, è risultata essere 0,56 MPa. Comparando questo valore con i dati presenti in letteratura e considerando la cartilagine un materiale incomprimibile il valore della costante elastica (modulo di Young) calcolata nello studio è di 3,33MPa, valore consistente con intervalli riportati in letteratura che spaziano da 1MPa fino a 20 MPa. I risultati sperimentali hanno quindi confermato come durante la fase di carico la cartilagine abbia una risposta lineare; quando viene scaricata, invece, si presenta una non linearità nel comportamento dovuta all'intervento della componente acquosa che va a generare una risposta viscoelastica della cartilagine nella fase di rilassamento.

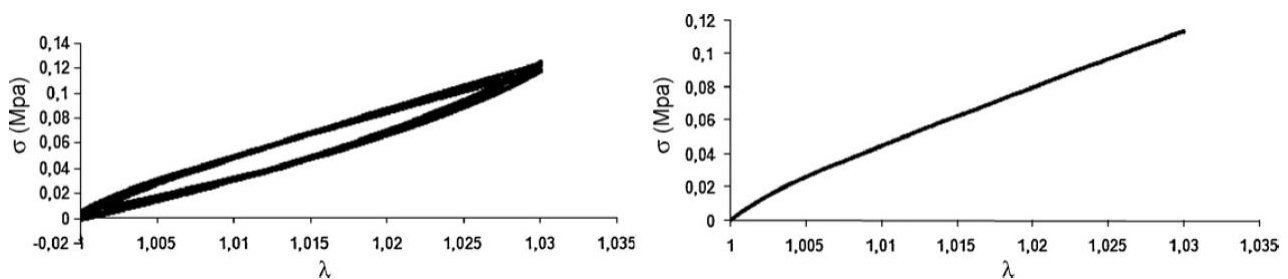


Figura 26. A sinistra curva sforzo-allungamento ottenuta da test ciclici a trazione effettuati su un campione umano del secondo anello tracheale della porzione cartilaginea centrale. A destra curva di carico (stress-deformazione) ottenuta dai test a trazione [6].

Test meccanici di compressione radiale sono altrettanto importanti per poter individuare un materiale che non collassi, provocando una occlusione del lume. Questo tipo di test è stato eseguito da Xia et al. [11] su un modello di trachea animale (*Shanghai white goat*) per verificare che gli scaffold realizzati avessero una resistenza superiore, adatta a sostenere l'impianto fino a completa rigenerazione del tessuto cartilagineo. Dai risultati, rappresentati graficamente in Figura 15, si può osservare come la resistenza a compressione del tessuto nativo sia inferiore rispetto allo scaffold in materiale sintetico (PCL); a fronte di una forza applicata di circa 10N si raggiunge una deformazione

## Progettazione dello scaffold

del 60%, mentre per lo scaffold in PCL è necessaria una forza di circa 40N per ottenere lo stesso livello di deformazione.

Riguardo la muscolatura liscia congiungente i rami degli anelli cartilaginei, le analisi istologiche hanno mostrato la presenza di due famiglie di fibre ortogonali tra loro: una longitudinale, con funzione di rinforzo durante i movimenti di deglutizione, e una trasversale che consente la deformazione della trachea durante i colpi di tosse e durante la respirazione. Il comportamento del muscolo è quindi da considerarsi anisotropo e per comprendere il contributo fornito dalle due famiglie di fibre sono stati effettuati test di trazione sia longitudinali sia trasversali fino al 20% di deformazione. Dai risultati è emerso un comportamento più rigido in direzione longitudinale. Ke et al. [2] hanno svolto la caratterizzazione meccanica di campioni di muscolo liscio prelevati da trachea umana. Il tessuto è stato sottoposto a prove cicliche di trazione, sono stati ricavati i valori di modulo elastico ( $0,76 \pm 0,25\text{MPa}$ ) e di tensione di snervamento ( $0,26 \pm 0,22\text{MPa}$ ) e sulla base dei risultati è stata selezionata la tipologia di scaffold più adeguata.

Nei pochi studi riportati in letteratura il tessuto connettivo della trachea viene considerato un materiale isotropo ed iper-elastico. I risultati ottenuti da prove a trazione effettuate nello studio di Safshekan et al. [32] evidenziano un comportamento più simile alla componente muscolare rispetto alla componente cartilaginea come si può osservare nel grafico stress allungamento in Figura 27.

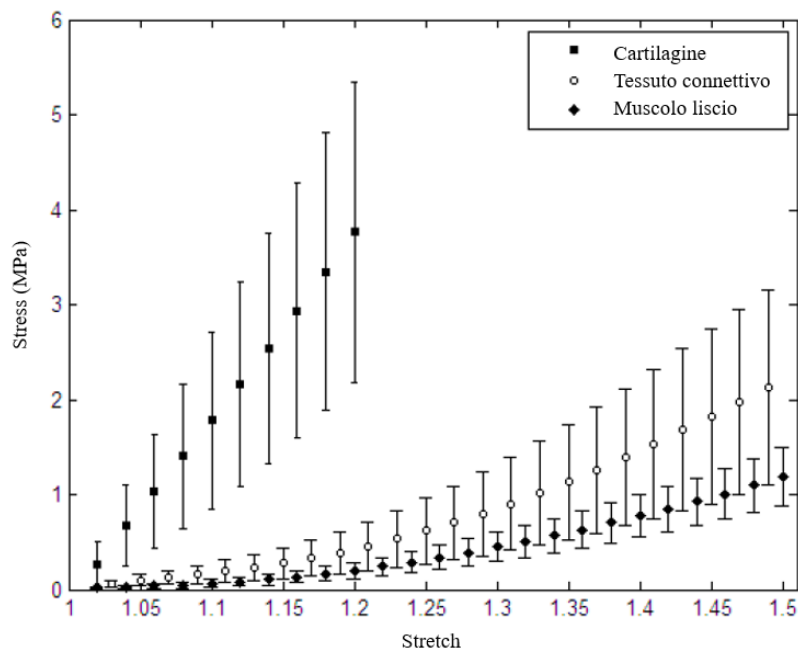


Figura 27. Valori medi per prove a trazione secondo il modello di Cauchy (stress-allungamento) per campioni di cartilagine, muscolatura liscia e tessuto connettivo. Dati espressi come media  $\pm$  scarto quadratico medio [32].

### **3.1.2 Proprietà meccaniche del biomateriale**

Per ottenere un costrutto in grado di riflettere le differenti proprietà meccaniche e le funzioni dei tessuti nativi che costituiscono la trachea è importante capire quali siano i parametri che vanno ad influire sulle variazioni delle proprietà meccaniche dello scaffold. Il materiale per la rigenerazione cartilaginea deve presentare una rigidità adeguata a supportare meccanicamente il costrutto ed evitare il collasso del lume tracheale nelle fasi di inspirazione a pressione negativa. La porzione per la rigenerazione del muscolo liscio deve essere progettata per riprodurre la flessibilità del tessuto muscolare liscio e guidare la corretta differenziazione delle cellule. Tra i materiali a disposizione per la fabbricazione di TET è importante selezionare quelli che consentano di mimare la struttura nativa del tessuto, favorendo la deposizione di matrice extracellulare specifica.

Una valida soluzione è rappresentata da scaffold ibridi realizzati alternando filamenti di polimero sintetico ad idrogel contenente cellule. La componente sintetica di questi costrutti è tipicamente realizzata in PCL, polimero in grado di offrire buona resistenza a trazione, compressione e resilienza [57]; la componente idrogel favorisce invece la ridistribuzione di cellule, nutrienti e dei fattori di crescita tra i pori dello scaffold. Nonostante sia la componente sintetica sia la componente idrogel influiscano sul comportamento meccanico complessivo del costrutto, il contributo del fornito dalla componente idrogel è spesso trascurabile [57]. Il PCL risulta la scelta più comune per la realizzazione di scaffold tracheali, in particolare per la rigenerazione della porzione cartilaginea, in quanto si distingue dagli altri polimeri sintetici per essere altamente biorassorbibile, avere tempo di degradazione lento (da mesi ad anni), eccellenti proprietà viscoelastiche, biocompatibilità cellulare e non-immunogenicità; tutti requisiti fondamentali per la fabbricazione di scaffold per TET[57]. Un esempio di scaffold ibrido è riportato nello studio di Ke et al [2], dove è stato realizzato un costrutto con struttura portante stampata in PCL e idrogel tessuto specifico. In questo caso geometria della struttura in PCL e composizione dell'idrogel sono state differenziate tra la regione cartilaginea e la regione muscolare. La compresenza di PCL e idrogel ha permesso di ottenere un costrutto finale con valori di modulo elastico intermedi tra il tessuto nativo (Figura 28) e il costrutto sintetico in solo PCL, risultando appropriati per una potenziale applicazione clinica.



## Progettazione dello scaffold

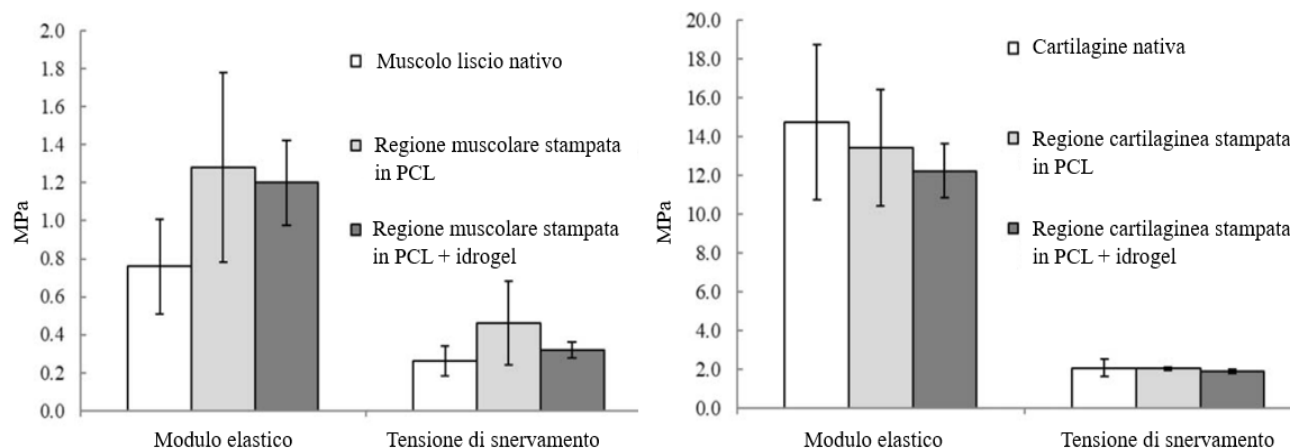


Figura 28. Confronto di modulo elastico e tensione di snervamento tra tessuto nativo, costruito stampato con solo PCL e costruito stampato con PCL + idrogel. A sinistra valori relativi alla regione di tessuto muscolare liscio, a destra per la regione cartilaginea [2].

Durante il processo di caratterizzazione meccanica dello scaffold bisogna valutare la graduale perdita di proprietà meccaniche dovuta al processo di degradazione *in vivo*, che comporta una riduzione della resistenza a compressione. Di conseguenza risulta necessario realizzare un costrutto con proprietà meccaniche iniziali superiori a quelle del tessuto da rigenerare e in grado di sostenere la crescita del tessuto fino alla completa rigenerazione della struttura portante cartilaginea.

La porosità è uno dei parametri che va ad influire maggiormente sulle variazioni delle proprietà meccaniche della struttura finale. Quando si produce uno scaffold via stampa 3D per deposizione di filamenti (FDM) la porosità dello scaffold è definita dallo spazio che si va a creare tra i filamenti di materiale (macro-porosità). I parametri che influenzano la porosità di una struttura sono: dimensione dei filamenti, distanza tra i filamenti e organizzazione spaziale dei filamenti. Aumentando la distanza tra i filamenti e riducendo la loro dimensione si ha un aumento di porosità significativo ( $p < 0,001$ ), una riduzione del modulo elastico e del modulo a compressione con conseguente aumento di viscoelasticità e flessibilità dello scaffold. Andando a modificare la geometria dei pori si assiste comunque ad una variazione della percentuale di porosità anche se non in modo significativo ( $p > 0,05$ ) rispetto alla modifica degli altri due parametri [33].

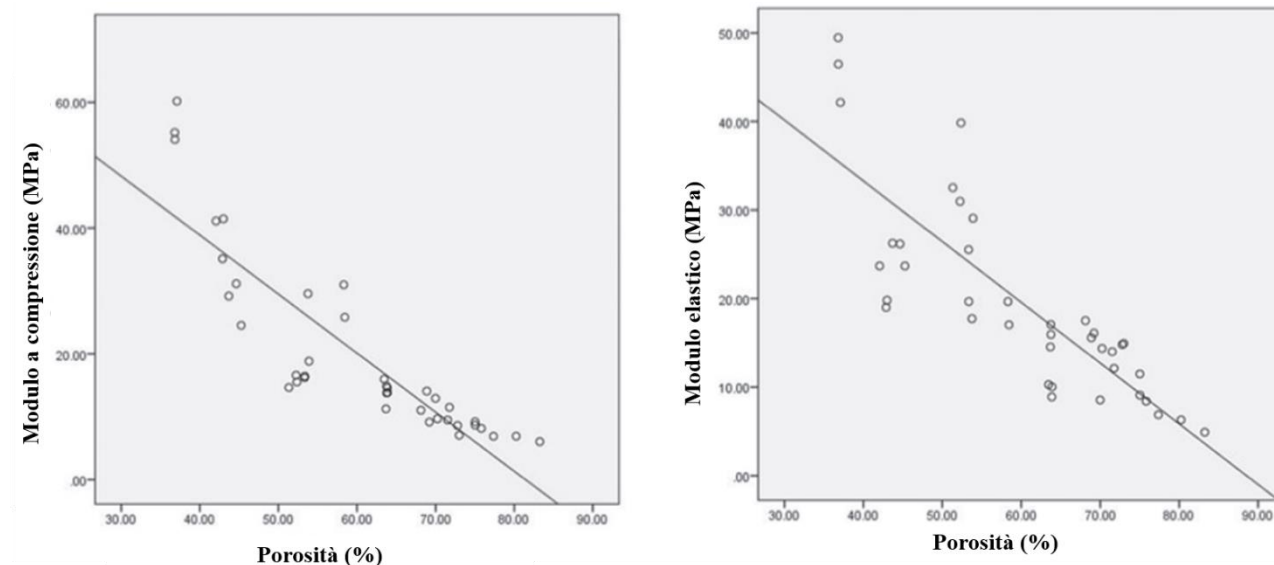


Figura 29. Grafico dei dati che mostrano le relazioni lineari inverse tra (A) modulo a compressione e porosità (B) modulo elastico e porosità, di scaffold stampati in PCL. [33]

Se consideriamo come esempio uno scaffold realizzato in PCL si può osservare come a fronte di un aumento, anche consistente, di porosità, ad esempio da circa il 36% a circa l'80%, non si assista ad un collasso della struttura. La struttura finale ad alta percentuale di porosità presenta invece migliore elasticità e flessibilità, caratteristiche meccaniche che consentono di mimare meglio il comportamento del tessuto cartilagineo nativo [33].

Quando si seleziona la tipologia di polimero sintetico per la stampa dello scaffold va selezionato quello con il peso molecolare adeguato alla realizzazione delle componenti di interesse (porzione cartilaginea o porzione muscolare). Infatti, al variare del peso molecolare del polimero varia il comportamento post stampa del materiale. Nel caso del PCL un aumento del peso molecolare comporta un aumento della resistenza a compressione e della tensione di snervamento. Ad un aumento del peso molecolare si associa anche un aumento della pressione e della temperatura di stampa. Filamenti di PCL con peso molecolare inferiore a 10K g/mol stampati per FDM presentano alta fragilità, bassa resistenza a compressione e rigidità; le strutture tridimensionali ottenibili risultano quindi soggette a cedimento meccanico in tempi minori rispetto a quelle ottenute con lo stesso polimero ma con peso molecolare superiore. Per realizzare costrutti biomedicali in PCL è perciò consigliato utilizzare polimeri con peso molecolare superiore al PCL10; risultati soddisfacenti si possono ottenere con PCL45 (~45K g/mol)[34].

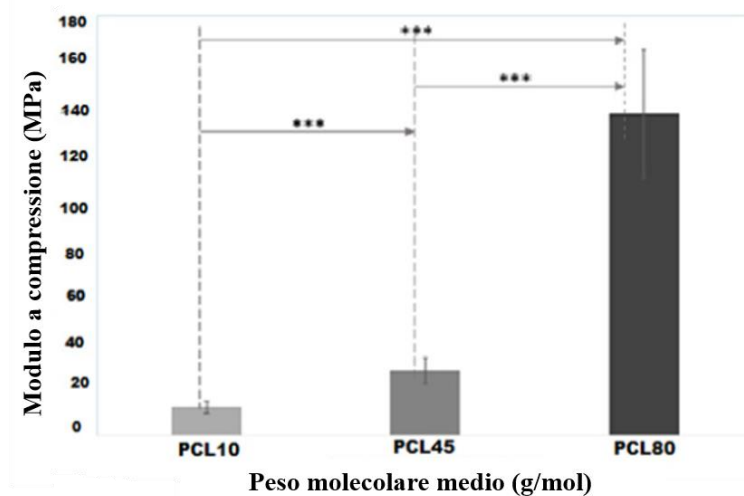


Figura 30. Rappresentazione grafica della differenza del modulo a compressione tra scaffold realizzati in PCL con diverso peso molecolare (PCL10: 10 Kg/mol; PCL45: 45Kg/mol; PCL80: 80Kg/mol) [33].

## 3.2 Fabbricazione dello scaffold

Alla luce dell'analisi dei materiali e delle tecniche di produzione a disposizione per la realizzazione di scaffold per ingegneria tissutale tracheale, si è scelto di progettare per questo lavoro di tesi uno scaffold ibrido in PCL e idrogel potenzialmente adatto alla ricostruzione di segmenti estesi del condotto tracheale. Il PCL ha la funzione di supportare meccanicamente la struttura; è stato scelto per le sue eccellenti proprietà meccaniche, descritte nei capitoli precedenti (2.1.3, 3.1.2), adatte per la realizzazione di scaffold per TET, tempo di degradazione *in vivo* sufficientemente lungo da sostenere il costruito fino alla completa maturazione del tessuto, elevata biocompatibilità, assenza di prodotti di degradazione tossici e stabilità ai processi di sterilizzazione con raggi gamma. Risulta inoltre facilmente lavorabile con diverse tecniche di stampa 3D ed ha un costo di produzione contenuto, rispetto ad altri biopolimeri [46]. L'idrogel ha la funzione di veicolare cellule e fattori di crescita tessuto specifici all'interno della struttura di supporto sintetica, per favorire la colonizzazione dello scaffold da parte delle cellule; viene infatti incorporato all'interno della struttura in PCL e successivamente fotopolimerizzato per mantenere la geometria con cui è stato stampato. Di seguito vengono descritti la tecnica di stampa 3D, la geometria dello scaffold e i parametri di stampa selezionati. Le scelte sono state effettuate tenendo conto dei vantaggi e degli svantaggi delle opzioni

Progettazione dello scaffold

di progettazione analizzate nel capitolo precedente, al fine di definire in linea teorica il corretto processo di fabbricazione per una possibile opzione di trachea ingegnerizzata.

### 3.2.1 Stampa 3D

Per realizzare lo scaffold ibrido è opportuno utilizzare una bioprinter a più ugelli, che permetta la deposizione sia del materiale sintetico (PCL) sia dell'idrogel. Tra le tecniche di bioprinting disponibili si sceglie di utilizzare il metodo ad estrusione con pistone, in quanto risulta la tecnica con maggiore semplicità di utilizzo, relativamente a basso costo e adattabile alla stampa di un ampio spettro di biomateriali con viscosità differenti. Questo metodo consente di ottenere filamenti estrusi in modo omogeneo e di realizzare un costrutto personalizzato ad alta precisione, permettendo di adattare la struttura al sito di impianto [20]. Rispetto agli altri metodi a disposizione per la fabbricazione di scaffold biomedicali (gas foaming, electro-spinning e freeze-drying), nel bioprinting ad estrusione la dimensione dei pori è definita dallo spazio tra i filamenti di materiale sintetico depositati; questo permette di ottenere pori di maggiori dimensioni, con un'interconnessione del 100%; questi fattori favoriscono la colonizzazione dello scaffold da parte delle cellule, la deposizione di matrice extracellulare, un migliore apporto di nutrienti e una più efficace rimozione di sostanze di scarto dalle zone interne al costrutto[47].

Tenendo presente la relazione tra il peso molecolare del biomateriale e le sue proprietà meccaniche, riportata nel paragrafo "Proprietà meccaniche del biomateriali" (3.1.2), si è scelto di utilizzare PCL45 per uso medico con peso molecolare di  $\sim 45000 \text{ g mol}^{-1}$  e temperatura di stampa di  $90^\circ\text{C}$ . Per ottenere filamenti estrusi in modo continuo, omogeneo, che mantengano forma cilindrica una volta depositati e senza provocare il gocciolamento del materiale in fase di estrusione, il polimero va erogato con un ugello metallico di  $200 \mu\text{m}$  di diametro ad una pressione di  $700 \text{ kPa}$  [33].

Per quanto riguarda la componente in idrogel da introdurre nello scaffold si è scelto di selezionare dalla letteratura una formulazione che abbia dimostrato risultati promettenti per una potenziale futura applicazione clinica. Nello specifico verrà definita la formulazione di due differenti idrogel: uno per andare a rigenerare il tessuto della regione cartilaginea e uno per andare a rigenerare il tessuto della regione muscolare. Entrambi gli idrogel hanno in comune la formulazione di base composta da: collagene modificato (Gelin-S<sup>®</sup>), ialuronano ed eparina (Heprasil<sup>®</sup>). L'eparina consente di immobilizzare i fattori di crescita e di consentirne un rilascio graduale e prolungato, così da favorire la differenziazione delle cellule staminali nel lungo termine[48]. Per preparare l'idrogel per la rigenerazione del tessuto cartilagineo la formulazione di base viene ricostituita in mezzo di coltura

## Progettazione dello scaffold

specifico per la differenziazione condrogenica (StemPro™); nell'idrogel per la rigenerazione del tessuto muscolare liscio la formulazione di base viene ricostituita in mezzo di coltura Dulbecco modificato (DMEM) ad alto contenuto di glucosio, mentre per indurre la differenziazione delle cellule staminali vengono aggiunti fattori di crescita TGF-β1. In entrambi gli idrogel vengono aggiunti agenti reticolanti per controllarne le proprietà meccaniche pre e post stampa. Per permettere un'estrusione omogenea e senza gocciolamento dell'idrogel viene effettuata una polimerizzazione pre-stampa con 4-arm Acrylate (20kD) al 4%; per aumentare le proprietà meccaniche post-stampa viene invece aggiunto un secondo agente fotoreticolante (8-arm Alkyne (10kD)), attivato con luce UV una volta terminata la stampa dell'idrogel [49]. Infine, vengono aggiunte le cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs) con una densità di  $1.5 \times 10^7$  hMSCs/ml. L'utilizzo di questa tipologia di cellule staminali è desiderabile in quanto possono differenziarsi sia in condrociti sia in cellule muscolari lisce. Possono essere utilizzate cellule staminali autologhe, estratte con una biopsia direttamente dal paziente, se si desidera realizzare un prodotto finale per uso clinico o cellule di linea continua per studi preclinici *in vitro*; nel secondo caso bisogna tuttavia tener conto che il comportamento delle cellule immortalizzate può risultare differente dalle cellule staminali primarie in termini di proliferazione e attività di sintesi. Per la stampa dell'idrogel selezionato è opportuno utilizzare un ugello in Teflon del diametro di 200μm, una pressione di estrusione di 100kPa e una temperatura di 15°C. Nello studio del *Wake Forest Institute*, in cui è stata utilizzata questa tipologia di idrogel, il modulo conservativo (*storage modulus*) post stampa si è assestato in un intervallo di  $4071 \pm 131$  Pa per l'idrogel del tessuto cartilagineo e di  $6656 \pm 230$  Pa per l'idrogel del tessuto muscolare; questi intervalli sono noti per stimolare la differenziazione delle hMSCs rispettivamente in condrociti e cellule muscolari lisce[50]. È stata inoltre osservata un'alta vitalità post stampa (>95%), una rapida proliferazione e diffusione delle cellule, quantificate con *live/dead staining* (Figura 31). L'utilizzo di idrogel tessuto specifico ha indotto la differenziazione delle hMSCs nelle tipologie cellulari di interesse in tempi rapidi [2].

Progettazione dello scaffold

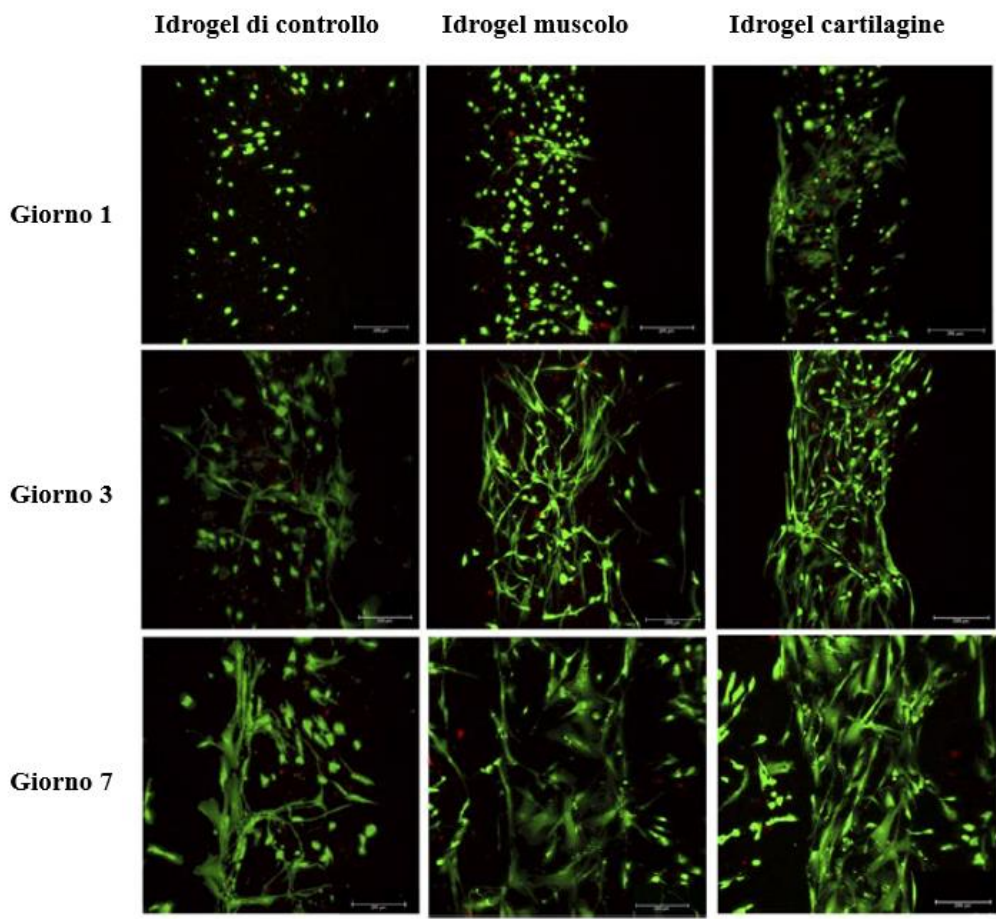


Figura 31. Live/dead staining di MSCs in costrutti stampati con idrogel di controllo, idrogel per rigenerazione di tessuto muscolare e idrogel per rigenerazione di tessuto cartilagineo dopo 1, 3 e 7 giorni di coltura (verde: vivo; Rosso: morto). [2]

Tabella 10. Tabella riassuntiva della scelta di: materiale sintetico con parametri di estrusione, composizione dei due idrogel con parametri di estrusione, cellule da incorporare nell'idrogel e densità.

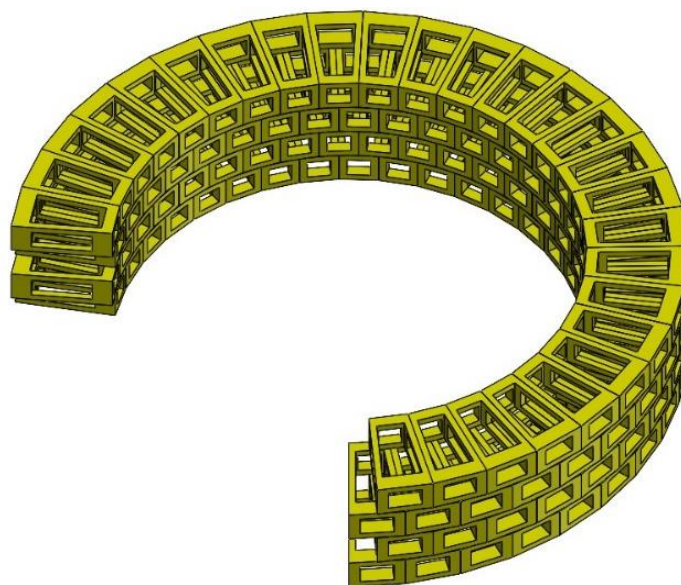
<b>Materiale sintetico</b>	PCL45;
<b>Estrusione PCL45</b>	Temperatura di estrusione: 90°C; pressione di estrusione 700kPa; ugello metallico Ø200µm.
<b>Idrogel regione cartilaginea</b>	Mezzo di coltura specifico per la differenziazione condrogenica (StemPro™), collagene modificato (Gelin-S®), ialuronano, eparina (Heprasil®).
<b>Idrogel regione muscolare</b>	DMEM, collagene modificato (Gelin-S®), ialuronano, eparina (Heprasil®), TGF-β1.
<b>Estrusione idrogel</b>	Temperatura di estrusione 15°C; pressione di estrusione: 100kPa; ugello in Teflon Ø200µm.
<b>Cellule</b>	Cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs); densità: $1.5 \times 10^7$ hMSCs/ml.

### 3.2.2 Disegno CAD e soluzioni progettuali

Per andare a disegnare un modello tridimensionale della struttura in PCL45 è stato utilizzato il software di disegno *SolidWorks*.

*Per il disegno della regione deputata alla rigenerazione del tessuto cartilagineo sono state prese come riferimento le misure della una trachea di individuo maschio adulto indicate in Tabella 1. Il disegno è stato quindi realizzato con le misure in*

Tabella 12. L'anello cartilagineo è costituito da una struttura a quattro strati di celle quadrangolari sfalsate tra uno strato e l'altro (Figura 32). In questo modo va a crearsi una struttura macro-porosa all'interno della quale è possibile incorporare l'idrogel.



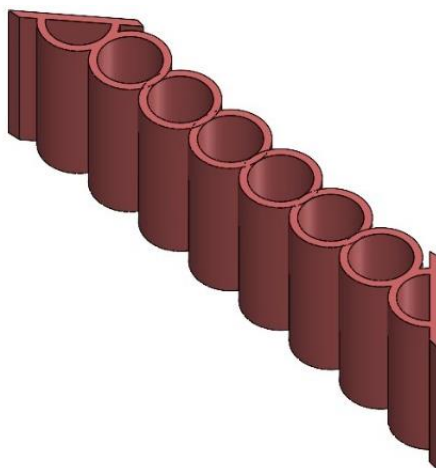
*Figura 32. Disegno realizzato con software CAD (SolidWorks) della componente per la rigenerazione del tessuto cartilagineo.*

La stessa geometria viene impiegata nel modello realizzato dai ricercatori del *Wake Forest Institute* [2] con risultati soddisfacenti sia in termini meccanici sia in termine di rigenerazione del tessuto cartilagineo. Durante la caratterizzazione meccanica riportata nello studio, sono stati eseguiti test a trazione sui campioni in solo PCL e sui campioni in PCL + idrogel; è stato imposto un allungamento con una velocità costante di 10mm/min con cella di carico impostata a 100N. Il test è stato eseguito fino a rottura del campione e successivamente sono stati calcolati modulo elastico e sforzo di snervamento (Tabella 11).

*Tabella 11. Risultati dei test meccanici eseguiti dai ricercatori del Wake Forest Institute [2].*

	<b>Modulo elastico</b>	<b>Sforzo di snervamento</b>
<b>Cartilagine nativa</b>	14,72 ± 4,01 MPa	2.08 ± 0.46 MPa
<b>Regione cartilaginea in PCL</b>	13,43 ± 3,14 MPa	2.04 ± 0.10 MPa
<b>Regione cartilaginea in PCL + idrogel</b>	12.22 ± 1.39 MPa	1.92 ± 0.11 MPa

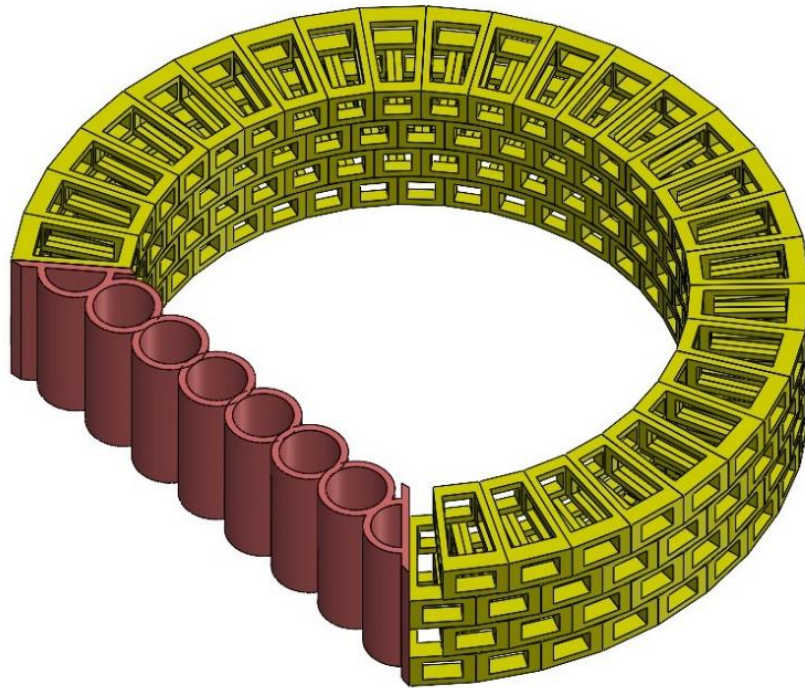
Per la regione deputata alla rigenerazione di tessuto muscolare è stata pensata una struttura costituita da una serie di cilindri adiacenti che connettono i due rami dell'anello cartilagineo (Figura 33). La struttura a cilindri si estende per tutta la lunghezza del costrutto in modo da connettere tra loro gli anelli cartilaginei. La geometria scelta dovrebbe consentire alla regione muscolare di deformarsi sia verso l'interno del lume, in caso di deglutizione, sia verso l'esterno, andando a riprodurre il movimento fisiologico del tessuto nativo. Tuttavia, non essendo state effettuate delle prove sperimentali sul modello stampato e non avendo incontrato in letteratura geometrie analoghe per la rigenerazione della porzione muscolare, l'ipotesi di deformabilità di questa componente è da verificarsi. All'interno dei canali cilindrici è inoltre possibile introdurre l'idrogel tessuto specifico.



*Figura 33. Disegno realizzato con software CAD (SolidWorks) della componente per la rigenerazione del tessuto muscolare liscio.*

La struttura di un anello tracheale completo è illustrata in Figura 34.





*Figura 34. Disegno realizzato con software CAD (SolidWorks) di un anello tracheale completo. In giallo la regione per la rigenerazione del tessuto cartilagineo; in rosso la regione per la rigenerazione del tessuto muscolare.*

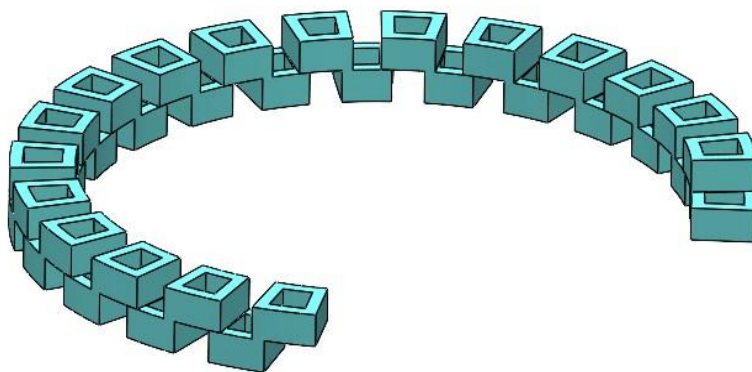
Tra due anelli cartilaginei consecutivi vi è una distanza di 1,5mm. In questa regione sarebbe opportuno inserire una struttura volta a favorire la rigenerazione del tessuto connettivo. Tuttavia, negli studi su scaffold tracheali realizzati con tecniche di 3D printing ad estrusione su superficie piana, non vengono riportati esempi in cui venga progettata una geometria *ad hoc* per la regione di tessuto connettivo presente tra un disco e l'altro. Un esempio è riportato nella Figura 35; questa geometria è stata tuttavia ottenuta grazie alla stampa dello scaffold su di un mandrino rotante e non risulta quindi riproducibile nel nostro modello.

## Progettazione dello scaffold



*Figura 35. Esempio di scaffold tracheale stampato su mandrino cilindrico. Si può osservare nella regione tra un disco tracheale e l'altro sia presente un elemento di connessione costituito da una rete di filamenti sovrapposti con un'angolazione di 0-90° [51].*

Nello spazio che intercorre tra un anello cartilagineo e l'altro si è quindi pensato di inserire una struttura di supporto in PCL45 (Figura 36), per favorire la rigenerazione di tessuto connettivo. Nel restante spazio può essere inserito un riempitivo in idrogel fotopolimerizzato per fornire un supporto per la stampa dell'anello successivo, come è stato fatto nel modello di trachea realizzato nello studio del *Wake Forest Institute* (Figura 37).



*Figura 36. Componente di supporto da inserire tra due anelli consecutivi. Altezza: 1,5mm; spessore: 1,5mm.*

## Progettazione dello scaffold

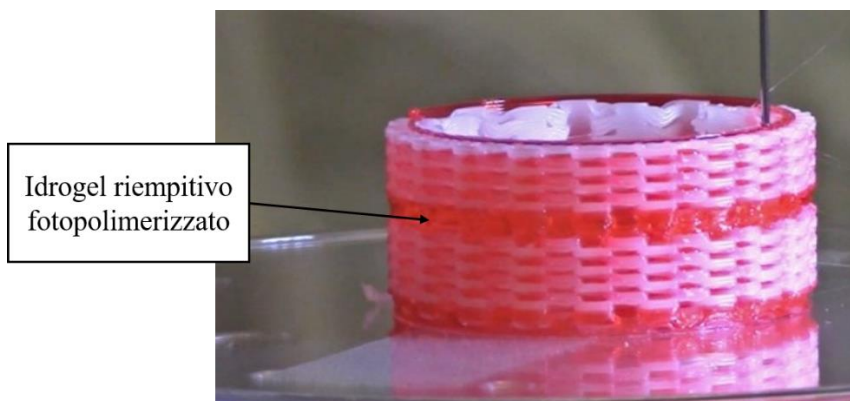


Figura 37. Scaffold realizzato dal Wake Forest Institute. In rosso si può osservare il riempitivo realizzato con idrogel fotopolimerizzato [2].

In Figura 38 è illustrato il modello completo dello scaffold progettato.

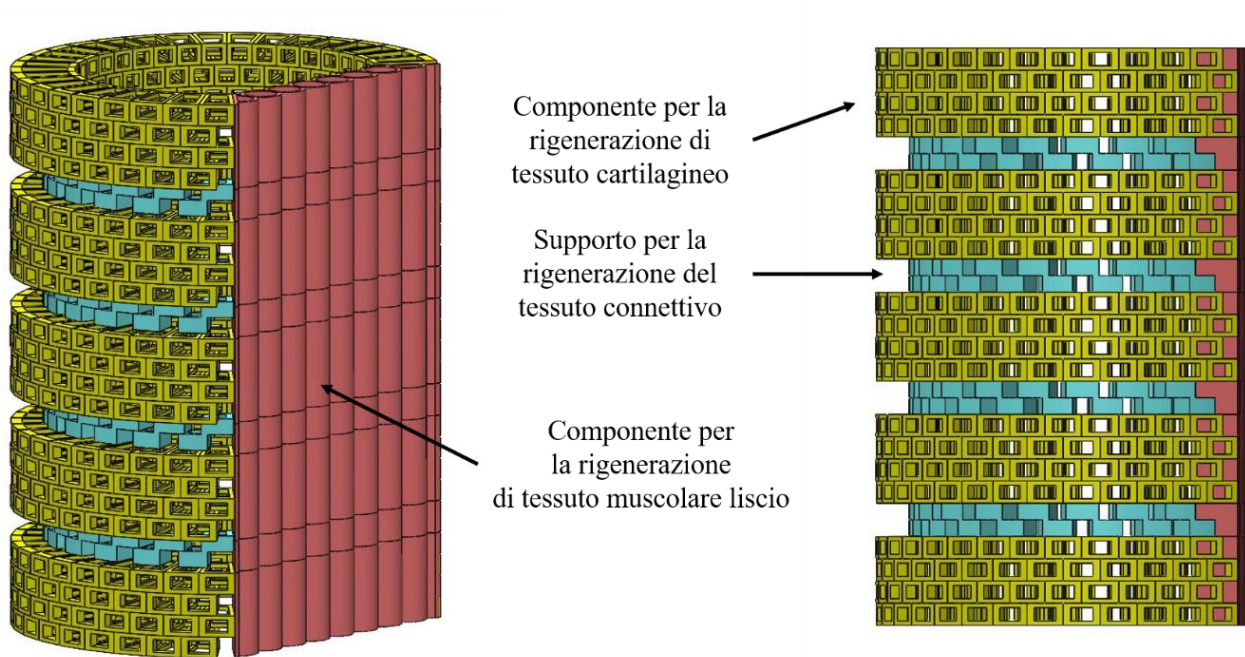


Figura 38. Rappresentazione di un segmento a cinque anelli del modello completo di scaffold per trachea. Il modello è composto da: regione per la rigenerazione del tessuto cartilagineo (giallo), regione per la rigenerazione di tessuto muscolare liscio (rosso) e supporto per la rigenerazione di tessuto connettivo (azzurro).

Tabella 12. Tabella riassuntiva delle misure del modello di scaffold tracheale.

<b>Componente per la rigenerazione del tessuto cartilagineo</b>	
Raggio interno	7 mm
Raggio esterno	10 mm
Altezza anello	4 mm
Altezza singola cella	1 mm
<b>Componente per la rigenerazione del tessuto muscolare liscio</b>	
Spessore	2,01 mm
Spessore della parete dei cilindri	0.2 mm
<b>Supporto per la rigenerazione del tessuto connettivo</b>	
Altezza	1,5 mm
Raggio interno	7 mm
Raggio esterno	8,5 mm

### 3.2.3 Slicing

Per procedere alla stampa del modello disegnato con *SolidWorks* è necessario effettuare l'operazione di slicing: processo che consente di passare dal modello tridimensionale di un oggetto alla sua realizzazione con una stampante 3D con metodo di FDM. Durante questa fase il modello tridimensionale viene tradotto, da un apposito software, in un numero finito di strati (*layer*) divisi da piani orizzontali. La stampante 3D andrà quindi a depositare il polimero estruso andando a ricreare strato per strato la geometria del modello tridimensionale. In questo lavoro è stato utilizzato il software *Slic3r* per poter realizzare una prova di stampa preliminare di un anello tracheale composto da regione cartilaginea e regione muscolare.

Il software permette di configurare le impostazioni slicing in base alla risoluzione desiderata per la realizzazione degli strati. La risoluzione dell'altezza degli strati (*layer height*) definisce il passo con cui l'estrusore si sposta lungo l'asse verticale prima di estrarre un nuovo strato sopra quello precedente [52]. Per ottenere una struttura con dettagli dell'ordine di  $10^{-4}$ m, come nel caso del modello illustrato nel paragrafo precedente, la risoluzione dell'altezza degli strati deve essere impostata sullo stesso ordine di grandezza. Altro parametro importante è grado di riempimento della struttura (*infill*) che definisce la percentuale di riempimento del volume del modello; una percentuale maggiore di *infill* porta ad avere una resistenza meccanica maggiore [53]. Per un modello come quello

## Progettazione dello scaffold

qui progettato, con una struttura interna già cava, si è deciso di utilizzare un *infill* del 100% per non alterare le proprietà meccaniche del costruito. I parametri principali scelti per effettuare lo slicing del modello di scaffold progettato sono elencati nella Tabella 13.

Diametro estrusore	0,2 mm
<i>Layer height</i>	0,2 mm
<i>Infill</i>	100%

Tabella 13. Parametri principali per lo slicing del modello di scaffold tracheale.

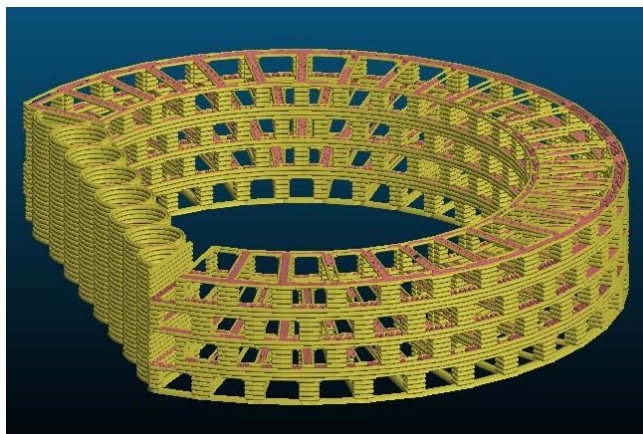


Figura 39. Struttura del modello di anello tracheale (regione muscolare e regione cartilaginea) dopo aver effettuato lo slicing con software Slic3r.

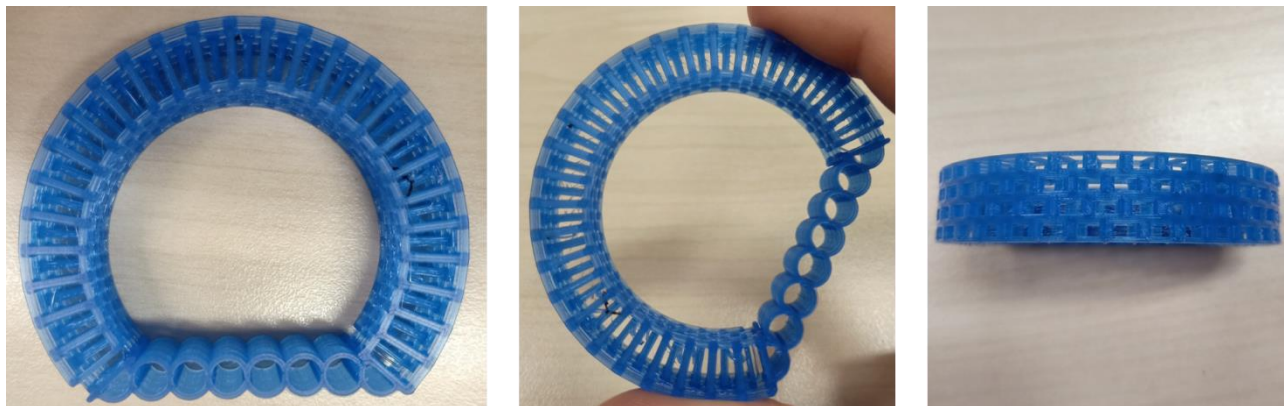


Figura 40. Prova di stampa preliminare del modello di scaffold tracheale con dimensioni scalate del 200%.

## Capitolo 4

# Conclusioni e sviluppi futuri

---

In questo progetto di tesi si è cercato di proporre una soluzione innovativa per la ricostruzione della trachea a seguito della resezione di un suo segmento. Per poter superare le limitazioni imposte dall'utilizzo di graft, stent, protesi artificiali, allotrapianti e composti di tessuto autologo, si è andata a fare un'analisi delle possibili soluzioni offerte da costrutti realizzati con tecniche di ingegneria tissutale. Quest'ultima punta alla rigenerazione di tessuto completamente funzionale applicando i principi della scienza dei materiali e delle scienze della vita per ottenere sostituti biologici in grado di riprodurre un tessuto o di un organo grazie alla combinazione di cellule, biomateriali, fattori di crescita.

Dopo avere definito le specifiche di progetto da rispettare per la realizzazione di uno scaffold per ingegneria tissutale della trachea, è stata fatta un'analisi dello stato dell'arte riguardo le tecniche di stampa 3D e di bioprinting disponibili per la realizzazione dello scaffold. Sono quindi state illustrate le diverse geometrie di scaffold incontrate in letteratura e le tipologie di materiali, sia sintetici che naturali, con proprietà meccaniche adeguate all'utilizzo in costrutti di TET.

La progettazione dello scaffold è stata eseguita tenendo conto delle proprietà meccaniche del tessuto nativo e sulla base di questo sono stati selezionati la tecnica di stampa, il biopolimero sintetico, la formulazione di idrogel e la tipologia di cellule da adottare. Si è quindi deciso di modellare con software di disegno tridimensionale uno scaffold ibrido con componente sintetica in PCL e componente bioattiva in idrogel realizzabile con tecnica di stampa 3D e bioprinting ad estrusione. Il modello presenta due regioni distinte per la rigenerazione di tessuto cartilagineo e di tessuto muscolare liscio, oltre a presentare dei supporti per la rigenerazione di tessuto connettivo. Infine, sono stati definiti i parametri di slicing e di stampa per una futura realizzazione del modello.

A partire dal modello progettato e disegnato nel capitolo precedente, seguendo il protocollo di stampa descritto è possibile ottenere uno scaffold ibrido, in PCL e idrogel, su cui effettuare test preliminari *in vitro*.

Conclusioni e sviluppi futuri

### **Coltura in bioreattore**

Per consentire la colonizzazione dello scaffold da parte delle cellule staminali e favorire la loro differenziazione è opportuno eseguire un periodo di coltura in bioreattore. Per la coltura di costrutti cilindrici come lo scaffold che è stato progettato è possibile utilizzare il bioreattore illustrato nel paragrafo 2.4. Grazie alla presenza di due camere distinte, separate dalla parete del costrutto una volta che questo viene montato sugli appositi supporti, è possibile pensare di inserire all'interno del lume un mezzo di coltura, differente da quello della camera esterna, che possa veicolare cellule e fattori di crescita specifici per la rigenerazione di tessuto epiteliale. Infatti, nello nel modello di scaffold progettato non è presente una struttura specifica per la rigenerazione del tessuto epiteliale. Per le cellule introdotte nella componente idrogel può essere utilizzato *TheraPEAK™ MSCGM™ Medium*, mezzo di coltura specifico per hMSCs che promuove un'alta vitalità cellulare, una rapida crescita e supporta la differenziazione di hMSCs in più linee cellulari [54]. Il mezzo di coltura va sostituito ogni due giorni fino al termine della coltura in bioreattore.

### **Caratterizzazione meccanica**

Per verificare la possibile applicazione clinica dello scaffold è necessario effettuare test meccanici per confermare che le proprietà meccaniche attese della componente cartilaginea (Tabella 11) siano rispettate e per determinare la risposta della componente muscolare con test a trazione in termini di modulo elastico, tensione di snervamento. Le analisi reologiche della componente idrogel sono invece volte a determinare l'effettiva stampabilità della componente idrogel e il mantenimento della geometria stampata una volta reticolato il materiale con luce UV.

### **Vitalità cellulare e test immunoistochimici**

Per dimostrare che lo scaffold promuova vitalità, crescita e differenziazione cellulare si possono svolgere test immunoistochimici, test di vitalità cellulare (*live-dead staining*) e identificazione delle proteine secrete nella matrice extracellulare con *Western Blot*. I test immunoistochimici a disposizione per verificare la differenziazione delle cellule staminali in tessuto muscolare liscio sono:  $\alpha$ -SMA<sup>1</sup> (*Anti-Alpha Smooth Muscle Actin antibody*), MF20<sup>2</sup> (*Anti-Myosin monoclonal antibody*), colorazione per desmina<sup>3</sup> e per smutelina<sup>4</sup> [55]; questi test permettono di individuare le principali

---

<sup>1</sup> Marcatore della  $\alpha$ -actina del tessuto muscolare liscio.

<sup>2</sup> Marcatore della miosina.

<sup>3</sup> Proteina costituente i filamenti intermedi che stabilizzano i filamenti di actina e miosina presenti nei fasci muscolari contrattili[57].

<sup>4</sup> Marcatore tardivo della differenziazione muscolare espresso nel tessuto muscolare liscio e in grado di legarsi ai filamenti di  $\alpha$ -actina, co localizzando con essa [57].

## Conclusioni e sviluppi futuri

componenti proteiche del tessuto muscolare liscio e quindi di confermare una corretta differenziazione delle cellule staminali. Nel caso della regione per la rigenerazione del tessuto cartilagineo è opportuno verificare la presenza di glicosamminoglicani e collagene di tipo II nella matrice extracellulare utilizzando rispettivamente colorazione blu Alcian e colorazione con anticorpi *anti-Collagen II* [56]. È importante verificare la presenza di collagene di tipo II all'interno della matrice extracellulare depositata nella regione cartilaginea in quanto esso è responsabile della resistenza a trazione tipica del tessuto cartilagineo [33].

Per una possibile futura applicazione clinica bisogna considerare di effettuare test *in vivo* su modello animale per verificare la differenziazione cellulare, la formazione di tessuto maturo e la funzionalità *in situ* come sostituto di una porzione o di un'intera trachea.



# Bibliografia

- [1] A. Dhasmana, A. Singh, and S. Rawal, “Biomedical grafts for tracheal tissue repairing and regeneration ‘Tracheal tissue engineering: an overview,’” *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 14, no. 5. John Wiley and Sons Ltd, pp. 653–672, May 01, 2020, doi: 10.1002/term.3019.
- [2] D. Ke *et al.*, “Bioprinted trachea constructs with patient-matched design, mechanical and biological properties,” *Biofabrication*, vol. 12, no. 1, 2020, doi: 10.1088/1758-5090/ab5354.
- [3] M. Hitier, M. Loäec, V. Patron, E. Edy, and S. Moreau, “Trachea: anatomia, fisiologia, endoscopia e diagnostica per immagini,” *EMC - Otorinolaringoiatria*, vol. 12, no. 3, pp. 1–17, Sep. 2013, doi: 10.1016/s1639-870x(13)65389-1.
- [4] D. J. Minnich and D. J. Mathisen, “Anatomy of the Trachea, Carina, and Bronchi,” *Thoracic Surgery Clinics*, vol. 17, no. 4. pp. 571–585, Nov. 2007, doi: 10.1016/j.thorsurg.2006.12.006.
- [5] M. Cazaux *et al.*, “Chirurgia della trachea e dei bronchi (I),” *EMC - Tecniche Chirurgiche Torace*, vol. 21, no. 1, pp. 1–6, 2017, doi: [https://doi.org/10.1016/S1288-3336\(17\)86809-6](https://doi.org/10.1016/S1288-3336(17)86809-6).
- [6] O. Trabelsi, A. P. del Palomar, J. L. López-villalobos, A. Ginel, and M. Doblaré, “Experimental characterization and constitutive modeling of the mechanical behavior of the human trachea,” *Medical Engineering and Physics*, vol. 32, no. 1, pp. 76–82, Jan. 2010, doi: 10.1016/j.medengphy.2009.10.010.
- [7] M. A. B. P. M. Silvia Baiguera, “Tissue Engineered Tracheal Transplantation,” *Transplantation*, pp. 485–491, 2010.
- [8] B. Kuehne and L. C. U. Junqueira, “HISTOLOGY OF THE TRACHEA AND LUNG OF *Siphonops annulatus* (AMPHIBIA, GYMNOPTERON).”
- [9] H. Etienne *et al.*, “Tracheal replacement,” *European Respiratory Journal*, vol. 51, no. 2. European Respiratory Society, 2018, doi: 10.1183/13993003.02211-2017.
- [10] C. T. Hsieh, C. Y. Liao, N. T. Dai, C. S. Tseng, B. L. Yen, and S. hui Hsu, “3D printing of tubular scaffolds with elasticity and complex structure from multiple waterborne polyurethanes

for tracheal tissue engineering,” *Applied Materials Today*, vol. 12, pp. 330–341, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.apmt.2018.06.004.

- [11] D. Xia *et al.*, “Tissue-engineered trachea from a 3D-printed scaffold enhances whole-segment tracheal repair in a goat model,” *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 13, no. 4, pp. 694–703, Apr. 2019, doi: 10.1002/term.2828.
- [12] M. Gao *et al.*, “Tissue-engineered trachea from a 3D-printed scaffold enhances whole-segment tracheal repair,” *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-05518-3.
- [13] L. M. Ott, R. A. Weatherly, and M. S. Detamore, “Overview of tracheal tissue engineering: Clinical need drives the laboratory approach,” *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 39, no. 8, pp. 2091–2113, Aug. 2011, doi: 10.1007/s10439-011-0318-1.
- [14] T. Walles, “Bioartificial tracheal grafts: Can tissue engineering keep its promise?,” *Expert Review of Medical Devices*, vol. 1, no. 2. Future Drugs Ltd, pp. 241–250, 2004, doi: 10.1586/17434440.1.2.241.
- [15] Y. Shan *et al.*, “Biomechanical properties and cellular biocompatibility of 3D printed tracheal graft,” *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 40, no. 12, pp. 1813–1823, 2017, doi: 10.1007/s00449-017-1835-6.
- [16] A. A. Mäkitie *et al.*, “Novel additive manufactured scaffolds for tissue engineered trachea research,” *Acta Oto-Laryngologica*, vol. 133, no. 4, pp. 412–417, Apr. 2013, doi: 10.3109/00016489.2012.761725.
- [17] H. S. Park *et al.*, “A 4-Axis Technique for Three-Dimensional Printing of an Artificial Trachea,” *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 15, no. 4, pp. 415–425, Aug. 2018, doi: 10.1007/s13770-018-0136-8.
- [18] J. H. Park *et al.*, “A novel tissue-engineered trachea with a mechanical behavior similar to native trachea,” *Biomaterials*, vol. 62, pp. 106–115, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.05.008.
- [19] J. Y. Park, J. Jang, and H. W. Kang, “3D Bioprinting and its application to organ-on-a-chip,” *Microelectronic Engineering*, vol. 200, pp. 1–11, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.mee.2018.08.004.

- [20] H. J. Jeong, H. Nam, J. Jang, and S. J. Lee, “3D bioprinting strategies for the regeneration of functional tubular tissues and organs,” *Bioengineering*, vol. 7, no. 2. MDPI AG, Jun. 01, 2020, doi: 10.3390/bioengineering7020032.
- [21] J. H. Park *et al.*, “Experimental Tracheal Replacement Using 3-dimensional Bioprinted Artificial Trachea with Autologous Epithelial Cells and Chondrocytes,” *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-38565-z.
- [22] J. X. Law, L. L. Liau, B. S. Aminuddin, and B. H. I. Ruszymah, “Tissue-engineered trachea: A review,” *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, vol. 91. Elsevier Ireland Ltd, pp. 55–63, Dec. 01, 2016, doi: 10.1016/j.ijporl.2016.10.012.
- [23] X. Luo *et al.*, “Long-term functional reconstruction of segmental tracheal defect by pedicled tissue-engineered trachea in rabbits,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 13, pp. 3336–3344, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.060>.
- [24] Y. S. Jang, C. H. Jang, Y. B. Cho, M. Kim, and G. H. Kim, “Tracheal regeneration using polycaprolactone/collagen-nanofiber coated with umbilical cord serum after partial resection,” *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, vol. 78, no. 12, pp. 2237–2243, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.ijporl.2014.10.022.
- [25] K. C. Hung, C. S. Tseng, and S. H. Hsu, “Synthesis and 3D Printing of biodegradable polyurethane elastomer by a water-based process for cartilage tissue engineering applications,” *Advanced Healthcare Materials*, vol. 3, no. 10, pp. 1578–1587, Oct. 2014, doi: 10.1002/adhm.201400018.
- [26] K. Kojima, L. J. Bonassar, R. A. Ignatz, K. Syed, J. Cortiella, and C. A. Vacanti, “Comparison of tracheal and nasal chondrocytes for tissue engineering of the trachea,” *The Annals of Thoracic Surgery*, vol. 76, no. 6, pp. 1884–1888, 2003, doi: [https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(03\)01193-7](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(03)01193-7).
- [27] R. Machino *et al.*, “Replacement of Rat Tracheas by Layered, Trachea-Like, Scaffold-Free Structures of Human Cells Using a Bio-3D Printing System,” *Advanced Healthcare Materials*, vol. 8, no. 7, Apr. 2019, doi: 10.1002/adhm.201800983.
- [28] D. Y. Lee *et al.*, “Synergistic effect of laminin and mesenchymal stem cells on tracheal mucosal regeneration,” *Biomaterials*, vol. 44, pp. 134–142, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.12.029.

- [29] J. Wang *et al.*, “Evaluation of the potential of rhTGF- $\beta$ 3 encapsulated P(LLA-CL)/collagen nanofibers for tracheal cartilage regeneration using mesenchymal stems cells derived from Wharton’s jelly of human umbilical cord,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 70, pp. 637–645, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.msec.2016.09.044.
- [30] M. A. Asnaghi *et al.*, “A double-chamber rotating bioreactor for the development of tissue-engineered hollow organs: From concept to clinical trial,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 29, pp. 5260–5269, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.07.018.
- [31] A. P. del Palomar, O. Trabelsi, A. Men, J. L. López-Villalobos, M. Doblaré, and A. Ginel, “Patient-specific models of human trachea to predict mechanical consequences of endoprosthesis implantation,” *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, vol. 368, no. 1921, pp. 2881–2896, Jun. 2010, doi: 10.1098/rsta.2010.0092.
- [32] F. Safshekan, M. Tafazzoli-Shadpour, M. Abdouss, and M. B. Shadmehr, “Mechanical characterization and constitutive modeling of human trachea: Age and gender dependency,” *Materials*, vol. 9, no. 6, Jun. 2016, doi: 10.3390/ma9060456.
- [33] A. D. Olubamiji, Z. Izadifar, J. L. Si, D. M. L. Cooper, B. F. Eames, and D. X. B. Chen, “Modulating mechanical behaviour of 3D-printed cartilage-mimetic PCL scaffolds: Influence of molecular weight and pore geometry,” *Biofabrication*, vol. 8, no. 2, Jun. 2016, doi: 10.1088/1758-5090/8/2/025020.
- [34] K. Y. Lim, B. C. Kim, and K. J. Yoon, “The effect of molecular weight of polycaprolactone on the ester interchange reactions during melt blending with poly(ethylene terephthalate),” *Polymer Journal*, vol. 34, no. 5, pp. 313–319, 2002, doi: 10.1295/polymj.34.313.
- [35] R. Belsey, “Resection and reconstruction of the intrathoracic trachea,” *British Journal of Surgery*, vol. 38, no. 150, pp. 200–205, 1950, doi: 10.1002/bjs.18003815008.
- [36] M. O. Jaus, M. G. Mastromarino, and G. Cardillo, “Tracheal surgery: still a challenge or a reality for thoracic surgeons?—A 30 months single-centre experience,” *Current Challenges in Thoracic Surgery*, vol. 2, pp. 14–14, May 2020, doi: 10.21037/ccts.2020.01.04.
- [37] J. S. Virk, H. Zhang, R. Nouraei, and G. Sandhu, “Prosthetic reconstruction of the trachea: A historical perspective,” *World Journal of Clinical Cases*, vol. 5, no. 4, p. 128, 2017, doi: 10.12998/wjcc.v5.i4.128.

- [38] C. R. Roberts, J. K. Rains, P. D. Pare', D. C. Walker, B. Wiggs, and J. L. Bert, "Ultrastructure and tensile properties of human tracheal cartilage," 1998.
- [39] F. Safshekan, M. Tafazzoli-Shadpour, M. Abdouss, M. B. Shadmehr, and F. Ghorbani, "Investigation of the Mechanical Properties of the Human Tracheal Cartilage," *Tanaffos*, vol. 16, no. 2, pp. 107–114, 2017.
- [40] A. Atala, D. J. Irvine, M. Moses, and S. Shaunak, "Wound healing versus regeneration: Role of the tissue environment in regenerative medicine," *MRS Bulletin*, vol. 35, no. 8, pp. 597–606, 2010, doi: 10.1557/mrs2010.528.
- [41] P. Jungebluth, G. Moll, S. Baiguera, and P. Macchiarini, "Tissue-Engineered Airway: A Regenerative Solution," *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, vol. 91, no. 1, pp. 81–93, Jan. 2012, doi: 10.1038/clpt.2011.270.
- [42] S. W. Bae *et al.*, "3D bioprinted artificial trachea with epithelial cells and chondrogenic-differentiated bone marrow-derived mesenchymal stem cells," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 6, Jun. 2018, doi: 10.3390/ijms19061624.
- [43] P. Schultz *et al.*, "Polyelectrolyte multilayers functionalized by a synthetic analogue of an anti-inflammatory peptide,  $\alpha$ -MSH, for coating a tracheal prosthesis," *Biomaterials*, vol. 26, no. 15, pp. 2621–2630, May 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.06.049.
- [44] E. J. Propst, J. D. Prager, J. Meitzen-Derr, S. L. Clark, R. T. Cotton, and M. J. Rutter, "Pediatric tracheal reconstruction using cadaveric homograft," *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, vol. 137, no. 6, pp. 583–590, Jun. 2011, doi: 10.1001/archoto.2011.85.
- [45] C. H. Lin, S. hui Hsu, C. E. Huang, W. T. Cheng, and J. M. Su, "A scaffold-bioreactor system for a tissue-engineered trachea," *Biomaterials*, vol. 30, no. 25, pp. 4117–4126, Sep. 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.04.028.
- [46] T. Wu *et al.*, "Application of a bilayer tubular scaffold based on electrospun poly(l-lactide-co-caprolactone)/collagen fibers and yarns for tracheal tissue engineering," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 5, no. 1, pp. 139–150, 2017, doi: 10.1039/c6tb02484j.
- [47] G. Ahn, Y. Kim, S. W. Lee, Y. J. Jeong, H. Son, and D. Lee, "Effect of heterogeneous multi-layered gelatin scaffolds on the diffusion characteristics and cellular activities of preosteoblasts," *Macromolecular Research*, vol. 22, no. 1, pp. 99–107, Jan. 2014, doi: 10.1007/s13233-014-2024-y.

- [48] S. J. Shieh and J. P. Vacanti, "State-of-the-art tissue engineering: From tissue engineering to organ building," *Surgery*, vol. 137, no. 1, pp. 1–7, 2005, doi: 10.1016/j.surg.2004.04.002.
- [49] J. Y. Park, J. Jang, and H. W. Kang, "3D Bioprinting and its application to organ-on-a-chip," *Microelectronic Engineering*, vol. 200, pp. 1–11, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.mee.2018.08.004.
- [50] J. H. Shim, J. S. Lee, J. Y. Kim, and D. W. Cho, "Bioprinting of a mechanically enhanced three-dimensional dual cell-laden construct for osteochondral tissue engineering using a multi-head tissue/organ building system," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 22, no. 8, p. 085014, Aug. 2012, doi: 10.1088/0960-1317/22/8/085014.
- [51] B. G. Zani, K. Kojima, C. A. Vacanti, and E. R. Edelman, "Tissue-engineered endothelial and epithelial implants differentially and synergistically regulate airway repair," 2008. [Online]. Available: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0802463105](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0802463105).
- [52] A. S. P. Lin, T. H. Barrows, S. H. Cartmell, and R. E. Guldberg, "Microarchitectural and mechanical characterization of oriented porous polymer scaffolds," *Biomaterials*, vol. 24, no. 3, pp. 481–489, Feb. 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(02)00361-7.
- [53] S. M. Kunisaki, M. Armant, G. S. Kao, K. Stevenson, H. Kim, and D. O. Fauza, "Tissue engineering from human mesenchymal amniocytes: a prelude to clinical trials," *Journal of Pediatric Surgery*, vol. 42, no. 6, pp. 974–980, Jun. 2007, doi: 10.1016/j.jpedsurg.2007.01.031.
- [54] M. J. Elliott *et al.*, "Stem-cell-based, tissue engineered tracheal replacement in a child: A 2-year follow-up study," *The Lancet*, vol. 380, no. 9846, pp. 994–1000, Sep. 2012, doi: 10.1016/S0140-6736(12)60737-5.
- [55] V. Vogel and M. Sheetz, "Local force and geometry sensing regulate cell functions," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 7, no. 4, pp. 265–275, 2006, doi: 10.1038/nrm1890.
- [56] B. Gao *et al.*, "Long-segmental tracheal reconstruction in rabbits with pedicled Tissue-engineered trachea based on a 3D-printed scaffold," *Acta Biomaterialia*, vol. 97, pp. 177–186, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.actbio.2019.07.043.
- [57] B. Johansson, A. Eriksson, F. Ramaekers, and L. E. Thornell, "Smoothelin and intermediate filament proteins in human aortocoronary saphenous vein by-pass grafts," *Histochemical Journal*, vol. 31, no. 11, pp. 723–727, 1999, doi: 10.1023/A:1003948515114.

# Ringraziamenti

Per prima voglio ringraziare la professoressa Sara Mantero per avermi dato la possibilità di svolgere questo progetto di tesi nei tempi e nelle modalità migliori, nonostante il singolare anno che stiamo attraversando a livello globale.

Un ringraziamento va anche a Beatrice Belgio (PhD) che mi ha aiutato a realizzare gli elementi prototipali del modello 3D da me realizzato, nonostante io non abbia avuto la possibilità di recarmi personalmente nei laboratori.

Il ringraziamento più grande va ai miei genitori e ai miei nonni. Grazie per aver sempre creduto in me, sin da quando ero una bambina, e per aver supportato le mie scelte durante questo lungo percorso di studi. Grazie per avermi dato la possibilità di diventare l'ingegnere che sono oggi.

Un ringraziamento speciale va a Marco per essermi stato sempre vicino, anche quando ero dall'altra parte del mondo, e per essere stato la mia ancora di calma e di serenità in quei giorni dove la mia mente era solo un mare in burrasca.

Ringrazio poi tutti i miei amici Giulia, Mezzie, Chiara, Vava, Angelo, Alba e Bietto per aver rallegrato tutti questi anni di studio, dal liceo fino ad oggi, con la loro amicizia e buona compagnia. Grazie anche a Jessica, Maria, Maria Laura e Agnese per aver condiviso con me questo percorso universitario e per aver portato un po' di spensieratezza in tutte le sessioni d'esame che abbiamo affrontato assieme.

Infine, ringrazio me stessa per avercela fatta. Perché non è stato facile, ma ce l'ho fatta.