

TACCUINO DI INGEGNERIA · BIOMEDICA · TESSUTI

Ingegneria tessutale

Il quaderno completo di come si fa crescere un tessuto: cellule, scaffold, segnali, porosità, diffusione dell'ossigeno, bioreattori, fabbricazione, biostampa 3D, formule ed esempi svolti, limiti ed esercizi.

Indice

- | | |
|--|--|
| 1 A cosa serve e un po' di storia | 8 Bioreattori e stimoli |
| 2 I tre ingredienti: cellule, scaffold, segnali | 9 Formule ed esempi svolti |
| 3 Cellule, matrice e tessuti | 10 Limiti, insuccessi e questioni aperte |
| 4 Lo scaffold: requisiti e materiali | 11 Norme e prospettive |
| 5 Come si fabbrica uno scaffold | 12 Esercizi con soluzione |
| 6 L'ossigeno e il problema dei vasi | 13 Glossario |
| 7 Schema a blocchi: il ciclo di produzione di un tessuto | 14 Fonti |

1 A cosa serve e un po' di storia

Le protesi sostituiscono una parte con un oggetto artificiale che resta per sempre. L'**ingegneria tessutale** propone un'altra idea: costruire un'**impalcatura temporanea** (lo scaffold), popolarla di cellule vive e dare loro i segnali giusti, affinché formino tessuto nuovo che, a poco a poco, prende il posto dell'impalcatura. Alla fine rimane solo il tessuto del paziente.

Perché serve? Perché molti tessuti si rigenerano male o per niente (cartilagine, grandi pezzi di osso, nervi, cuore) e perché i trapianti d'organo sono troppo pochi rispetto alle persone in attesa. L'obiettivo di lungo periodo sono organi cresciuti su misura; oggi il risultato concreto sono **tessuti sottili o semplici** e modelli di laboratorio.

La domanda guida di questo taccuino è: **che cosa serve alle cellule per diventare un tessuto?** Se si capisce questo (spazio, nutrimento, segnali chimici e meccanici, tempo) si capisce anche perché è difficile, e perché molti esperimenti riusciti in laboratorio non arrivano in ospedale.

Dalle colture alle prime applicazioni

La parola «tissue engineering» si diffuse con un articolo di **Langer e Vacanti** su Science nel 1993, che definì il campo: cellule, materiali e fattori biochimici. Esperienze prima di allora avevano aperto la strada: negli anni Settanta e Ottanta le cellule della pelle coltivate in laboratorio permisero di coprire grandi ustioni; negli anni Novanta il trapianto di condrociti autologhi (**ACI**) fu il primo trattamento cellulare per la cartilagine del ginocchio; nel 2006 furono riportati i primi pazienti con una **vescica ricostruita** con cellule proprie su un'impalcatura.

Nel 2006 Yamanaka mostrò che cellule adulte possono essere «riprogrammate» a staminali (**iPSC**), aprendo la strada a fonti di cellule personalizzate. Negli anni Duemila la **stampa 3D** è entrata nel campo (biostampa) e dal 2009 gli **organoidi** hanno mostrato che le cellule staminali, nel gel giusto, si auto-organizzano in piccoli tessuti.

Tabella. Tappe principali (date indicative)

Periodo	Novità	Che cosa ha cambiato
anni '70-'80	epidermide coltivata per ustioni	primo tessuto cresciuto in laboratorio per curare
1993	definizione di tissue engineering	cellule + scaffold + segnali
1994	trapianto di condrociti autologhi	terapia cellulare per la cartilagine
2006	vescica ingegnerizzata; iPSC	organo cavo e nuove fonti di cellule
2000-2015	biostampa 3D	cellule e gel posizionati strato per strato
dal 2009	organoidi	auto-organizzazione di mini-tessuti

Che cosa troverai qui. Gli ingredienti, le cellule e la matrice, i requisiti e i materiali degli scaffold, le tecniche di produzione, la diffusione dell'ossigeno e il problema dei vasi, uno schema a blocchi del ciclo di produzione, i bioreattori, formule con esempi svolti, i grafici, limiti e insuccessi, esercizi, glossario e fonti.

2 I tre ingredienti: cellule, scaffold, segnali

Le cellule. Sono il «cantiere vivo». Possono essere **autologhe** (del paziente, nessun rigetto, ma servono tempo e una biopsia), **allogeniche** (di un donatore, pronte all'uso ma con rischio immunitario) o **staminali**. Le staminali possono essere **mesenchimali** (MSC, da midollo osseo o tessuto adiposo: danno osso, cartilagine, grasso), **embrionali** (pluripotenti, ma con problemi etici e di controllo) o **pluripotenti indotte** (iPSC, da cellule adulte riprogrammate). Le cellule specializzate (condrociti, osteoblasti, fibroblasti) sono più facili da gestire ma si espandono poco e perdono carattere in cultura.

Lo scaffold. È l'impalcatura: un materiale poroso, biocompatibile e di solito biodegradabile che dà forma, spazio per le cellule e supporto meccanico mentre il tessuto cresce. Deve sparire «al momento giusto», con una velocità vicina a quella con cui il nuovo tessuto prende il suo posto.

I segnali. Le cellule rispondono a stimoli: **chimici** (fattori di crescita come BMP-2 per l'osso, TGF- β per la cartilagine, VEGF per i vasi), **meccanici** (compressione, stiramento, flusso di liquido che crea sforzi di taglio) ed **elettrici** (per cuore e nervi). Anche la rigidità e la forma dello scaffold sono segnali: le staminali scelgono il tipo di cellula da diventare in base alla rigidità del supporto, che sia morbido come il cervello, medio come il muscolo, rigido come l'osso.

Il quarto ingrediente è il tempo. I tessuti maturano in settimane o mesi, non in giorni. Una cultura che funziona a tre settimane può non reggere la fase successiva, quando lo scaffold perde resistenza e il tessuto non è ancora abbastanza forte.

Fonte di cellule	Vantaggio	Limite
Autologhe specializzate	nessun rigetto	poche cellule, perdono caratteristiche
Staminali mesenchimali	disponibili, danno più tessuti	qualità variabile, invecchiamento
Staminali embrionali	danno quasi ogni tipo di cellula	etica, rischio di tumori, immunità
iPSC	personalizzate, nessun embrione	costo, controllo, tempi lunghi
Allogeniche	pronte all'uso	risposta immunitaria

Idea chiave. Le cellule non «leggono» un progetto: reagiscono a ciò che trovano attorno. Il lavoro dell'ingegnere è creare un ambiente in cui il comportamento più probabile sia quello desiderato.

3 Cellule, matrice e tessuti

I tessuti sono di quattro tipi: **epiteliale** (rivestimenti e ghiandole, strati di cellule vicine su una membrana), **connettivo** (osso, cartilagine, sangue, grasso: poche cellule in molta matrice), **muscolare** (scheletrico, cardiaco, liscio) e **nervoso**. L'ingegneria tessutale lavora oggi soprattutto con il connettivo (osso, cartilagine, pelle) e con piccoli pezzi di muscolo e vaso.

Un tessuto non è solo cellule: è **cellule più matrice extracellulare** (ECM), la rete di proteine e zuccheri che le circonda. L'ECM dà resistenza (collagene), elasticità (elastina), idratazione (proteoglicani) e segnali. Uno scaffold è in sostanza una ECM artificiale temporanea.

Osso. Tre tipi di cellule lavorano insieme: gli **osteoblasti** costruiscono osso nuovo, gli **osteoclasti** lo riassorbono, gli **osteociti** (osteoblasti intrappolati nella matrice) fanno da sensori del carico. L'osso è molto vascolarizzato e si rimodella di continuo: per questo è uno dei pochi tessuti che si rigenera davvero. Ma i

grandi difetti (più di 2 cm di lunghezza, i «difetti critici») non guariscono da soli.

Cartilagine. È **avascolare** (nessun vaso, nutrimento per diffusione dal liquido articolare) e con poche cellule, i condrociti. Per questo guarisce malissimo, e per questo è un buon bersaglio per l'ingegneria tessutale: non richiede vasi. La difficoltà è ottenere cartilagine ialina, non fibrocartilagine più debole.

Pelle. L'epidermide si rigenera da sola, il derma no. Esistono sostituti di derma (matrici di collagene e glicosaminoglicani) e costruiti con cellule; per le grandi ustioni si coltiva l'epidermide del paziente.

Altri tessuti. Nervi periferici (tubi guida per colmare lacune di alcuni centimetri), vasi (piccolo diametro difficile), vescica e trachea (organi cavi), muscolo (soprattutto in modelli di laboratorio), fegato e rene (organoidi, ancora in ricerca).

Tessuto	Vasi	Capacità di rigenerarsi	Stato dell'ingegneria tessutale
Osso	molti	buona per i difetti piccoli	innesti sintetici in uso, grandi difetti in ricerca
Cartilagine	nessuno	molto scarsa	cellule e matrici in uso clinico limitato
Epidermide	derma sotto	ottima	colture per ustioni estese
Derma	sì	limitata	sostituti dermici in commercio
Nervo periferico	sì	lenta, difetti brevi	tubi guida per difetti corti
Cuore, fegato, rene	moltissimi	scarsa o nulla	ricerca: organoidi e cerotti cellulari

4 Lo scaffold: requisiti e materiali

Uno scaffold ideale deve avere sei qualità: (1) essere **biocompatibile** e non lasciare residui tossici; (2) essere **biodegradabile** con velocità adatta; (3) avere **porosità alta e pori collegati** per far entrare cellule, liquidi e vasi; (4) avere una **superficie** adatta all'adesione delle cellule; (5) avere **proprietà meccaniche** adeguate al sito; (6) poter essere **fabbricato** nella forma del difetto e sterilizzato.

Per l'**osso** servono una porosità di circa 60–90 % e pori da 100 a oltre 300 µm: sotto 100 µm i vasi non entrano, e i pori più grandi (> 300 µm) favoriscono la formazione diretta di osso con i vasi. La resistenza però cala quando i pori aumentano: ecco il compromesso centrale del progetto.

Polimeri sintetici. **PCL** (lento, facile da stampare), **PLA**, **PGA** e **PLGA** (più veloci, con acidi che possono irritare), poliuretani. Pro: controllo di forma, resistenza e velocità; contro: poca bioattività, assenza di segnali.

Polimeri naturali. **Collagene**, **gelatina**, **fibrina**, **chitosano**, **alginato**, **acido ialuronico**, **seta**. Pro: riconosciuti dalle cellule, bioattivi; contro: deboli, variabili da lotto a lotto, rischio immunitario. Spesso si usano come **idrogeli**, reti piene d'acqua con consistenza simile ai tessuti molli.

Ceramiche. **Idrossiapatite**, **β-TCP**, **vetri bioattivi**: per l'osso, perché sono simili al minerale osseo e si legano; sono fragili.

Compositi. Polimero + ceramica (PCL con idrossiapatite, PLGA con vetro bioattivo) uniscono la lavorabilità del primo con la bioattività della seconda.

Matrici decellularizzate. Un organo di donatore o animale viene «lavato» con detergenti che tolgono le cellule e lasciano la matrice con la sua struttura e i suoi vasi; poi si ripopola con cellule del paziente. Pro: struttura perfetta; contro: difficile da ripopolare, rischio di resti di DNA e di risposta immunitaria.

$$P = 1 - \rho_{\text{app}} / \rho_{\text{mat}}$$

Porosità da densità apparente e densità del materiale pieno.

$$E/E_s \approx (1 - P)^2, \sigma/\sigma_s \approx 0,3 (1 - P)^{1,5}$$

Gibson-Ashby per una schiuma a celle aperte: rigidità e resistenza relative (densità relativa = 1 - P).

Materiale	Densità (g/cm³)	Degradazione	Note
PCL	1,15	2-3 anni	facile da stampare, idrofobo
PLA	1,25	mesi - anni	rigido, acido in degradazione
PLGA 50:50	1,3	1-2 mesi	velocità regolabile con il rapporto
Collagene	1,3	settimane	segnali per le cellule, debole
Alginato (gel)	≈ 1	regolabile	si gelifica con calcio
Idrossiapatite	3,16	molto lenta	bioattiva, fragile
β-TCP	3,07	mesi - anni	riassorbibile
Vetro 45S5	2,7	settimane - mesi	si lega all'osso

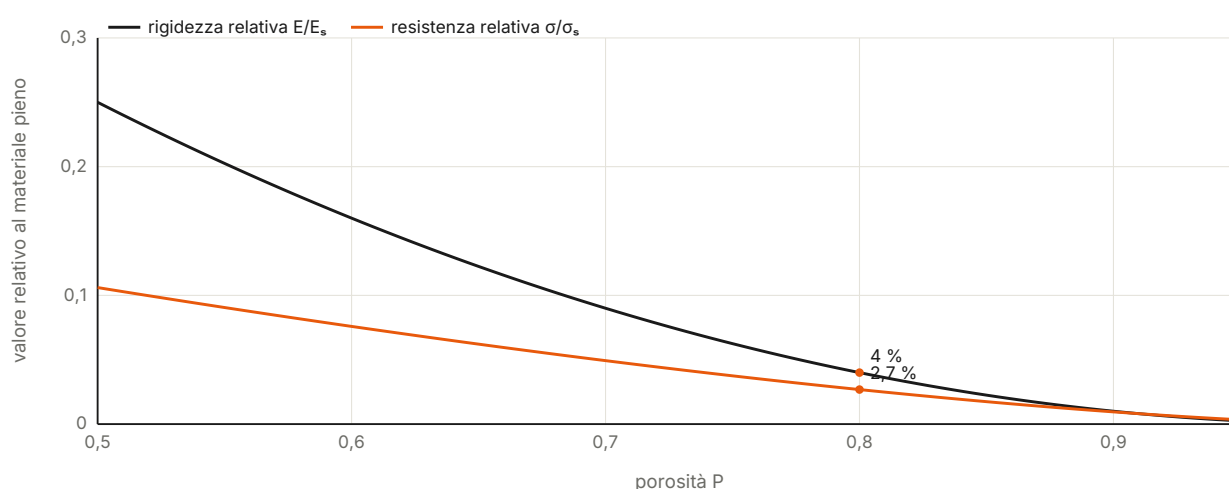


Figura. Rigidità e resistenza di uno scaffold al crescere della porosità. A porosità 80 % la rigidità è il 4 % di quella del materiale pieno. Si può avere molto spazio per le cellule o molta resistenza, mai tutte e due al massimo.

Un'altra regola. Lo scaffold deve perdere resistenza a mano a mano che il tessuto la guadagna. Se si degrada troppo in fretta cede prima che il tessuto sia pronto; se troppo lentamente blocca la crescita e lascia tessuto «ingabbiato».

5 Come si fabbrica uno scaffold

Lisciviazione di particelle. Si mescolano grani di sale (di dimensione scelta) con una soluzione di polimero; evaporato il solvente, si scioglie il sale in acqua e restano pori della forma dei grani. Semplice e a basso costo; pori collegati solo ad alta frazione di sale; residui di solvente da eliminare.

Schiume di gas. Un gas ad alta pressione si scioglie nel polimero e, riducendo la pressione, forma bolle che lasciano pori. Senza solventi, ma pori spesso chiusi.

Separazione di fase e liofilizzazione. Una soluzione polimerica si raffredda e si divide in zone ricche e povere di polimero; il solvente si sublima sotto vuoto e lascia una struttura porosa. Si usa per collagene e chitosano; la dimensione dei pori dipende dalla velocità di raffreddamento.

Electrospinning. Un getto di soluzione di polimero esce da un ago ad alta tensione (10-30 kV), si allunga e si solidifica in **fibre di diametro da decine di nanometri a pochi micron** che si raccolgono su un collettore, formando un feltro simile alla matrice naturale. Pro: fibre simili al collagene; contro: pori troppo piccoli per l'entrata delle cellule, spessori limitati.

Stampa 3D. Estrusione di filamento (FDM, di solito PCL), sinterizzazione laser di polveri (SLS), fotopolimerizzazione di resina (SLA, DLP): permettono di fabbricare uno scaffold **su misura**, ricavando la forma da una TC, con porosità e canali controllati. Limite: i pori da meno di 100–200 µm sono difficili.

Biostampa. Il «bioinchiostro» è un idrogel con cellule vive. Con la **estrusione** si depositano gel densi con molte cellule, risoluzione di centinaia di micron; con il **getto** (inkjet) gocce piccole e veloci, ma solo gel fluidi; con la **stereolitografia** si indurisce la luce in strati, con risoluzione alta; con il **laser** (LIFT) si sparano gocce da un nastro. Il bioinchiostro ideale deve essere **stampabile** (scorre sotto pressione e poi mantiene la forma), **cellulo-compatibile** (le cellule sopravvivono alla pressione e al taglio) e **funzionale**.

Tecnica	Dimensione dei pori	Vantaggi	Limiti
Lisciviazione di sale	50–500 µm	semplice, economica	solventi, pori poco collegati
Schiume di gas	100–500 µm	senza solventi	pori chiusi
Liofilizzazione	10–200 µm	collagene e chitosano	poco controllo di forma
Electrospinning	fibre 0,05–5 µm	simile alla matrice naturale	pori troppo piccoli
Estrusione 3D (FDM)	200–800 µm	forma su misura, controllo dei pori	risoluzione limitata
Biostampa a estrusione	≥ 100–200 µm	contiene cellule vive	resistenza minima, sopravvivenza
Stampa a luce (SLA)	50–300 µm	risoluzione alta	fotoiniziatori, materiali limitati

Un ponte con il resto del sito. Le basi della stampa 3D di tutti i giorni (estrusione, resina, strati) sono le stesse: sono spiegate nella guida /stampa-3d/ del sito. In ingegneria tessutale cambiano i materiali (biocompatibili e sterili) e il fatto che nel materiale ci sono cellule vive.

6 L'ossigeno e il problema dei vasi

Una cellula ha bisogno di ossigeno e nutrienti ogni secondo. Nei tessuti normali nessuna cellula è a più di 100–200 µm da un capillare. In un costrutto senza vasi l'ossigeno arriva solo per **diffusione** dalla superficie, mentre le cellule lo consumano lungo la strada: perciò oltre una profondità di circa **0,1–0,3 mm** le cellule muoiono per mancanza di ossigeno (nucleo necrotico). È il limite numero uno dell'ingegneria tessutale.

Il modello più semplice è quello di una **lastra** con consumo costante, alimentata da un lato: l'ossigeno cala con una parabola dalla superficie verso l'interno. La profondità massima utile dipende dalla diffusività dell'ossigeno D , dalla concentrazione in superficie C_0 e dal consumo per unità di volume q ; più le cellule sono fitte, meno si penetra.

Strategie. (1) Costrutti **sottili** (pelle, cartilagine, tessuti di meno di 0,5 mm). (2) **Perfusione**: un bioreattore fa scorrere il terreno attraverso i pori, portando ossigeno all'interno. (3) **Canali** stampati che fanno da «strade» per il liquido. (4) **Prevascolarizzazione**: si seminano insieme cellule dei vasi (endoteliali) e di sostegno (periciti, fibroblasti) che si organizzano in reti di capillari. (5) **Fattori angiogenetici** come il VEGF rilasciati dallo scaffold. (6) **Ossigeno rilasciato** da materiali che producono ossigeno. (7) **Impianto in un sito ben vascolarizzato** (per esempio avvolto in un lembo muscolare) e collegamento chirurgico dei vasi.

Anche con queste strategie i costrutti spessi non sono ancora risolti: i capillari si formano in giorni, ma devono collegarsi con quelli dell'ospite e mantenere il flusso. Una soluzione parziale sono le reti stampate di canali che possono essere collegate a un circuito di perfusione.

$$t_{\text{diff}} \approx L^2 / (2D)$$

Tempo caratteristico di diffusione su una distanza L .

$$C(x) = C_0 - (q/D)(Lx - x^2/2)$$

Profilo di ossigeno in una lastra di spessore L alimentata dal lato $x = 0$, senza flusso in $x = L$.

$$h_{\max} = \sqrt{(2DC_0 / q)}$$

Spessore massimo che si può alimentare per sola diffusione.

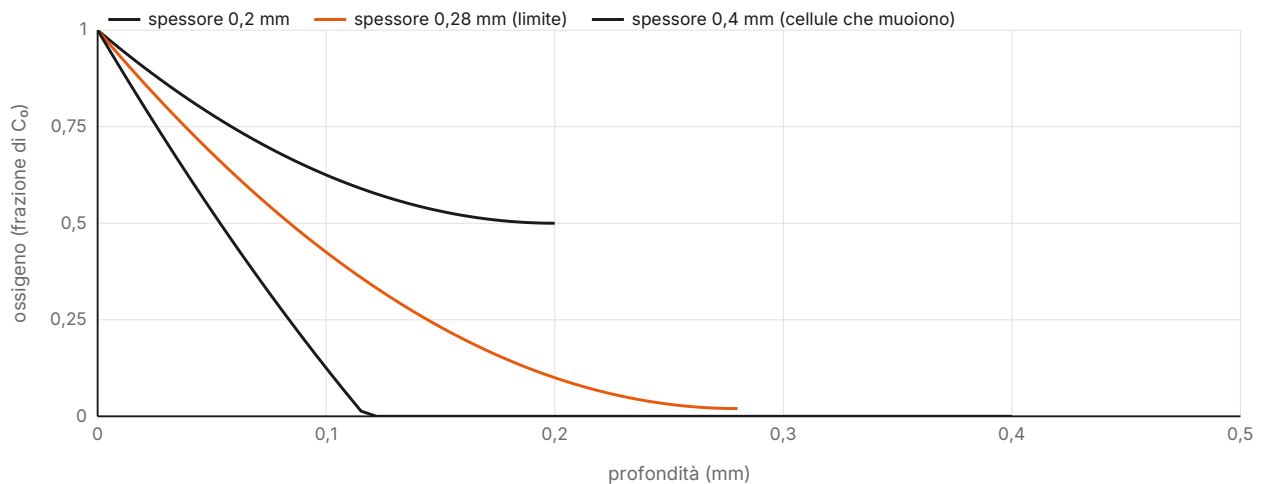
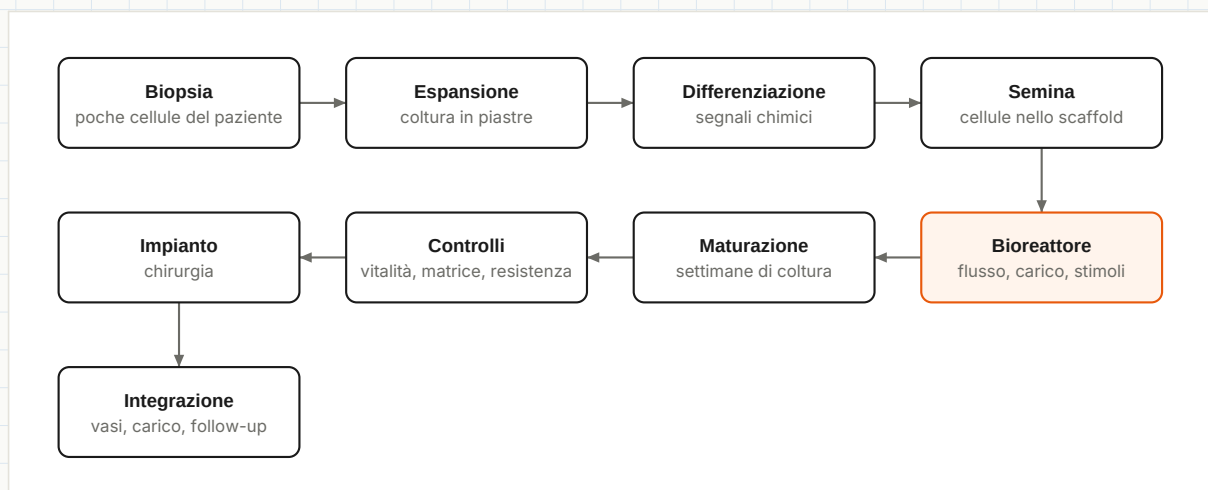


Figura. Ossigeno dentro un costrutto di cellule alimentato da un lato. Modello di diffusione con consumo costante ($q = 10^{-2}$ mol/m³·s, $D = 2 \cdot 10^{-9}$ m²/s, $C_0 = 0,2$ mol/m³). Nel costrutto da 0,4 mm l'ossigeno va a zero prima del fondo: la parte interna è senza ossigeno.

Esempio svolto. Spessore massimo alimentabile per diffusione

1. Diffusività dell'ossigeno nel tessuto $D = 2 \cdot 10^{-9}$ m²/s; concentrazione in superficie $C_0 = 0,2$ mol/m³ (terreno in equilibrio con l'aria); consumo di un tessuto fitto $q = 10^{-2}$ mol/(m³·s) (circa 10^{14} cellule per m³ che consumano 10^{-16} mol/s ciascuna).
2. $h = \sqrt{(2 \cdot 2 \cdot 10^{-9} \cdot 0,2 / 10^{-2})} = \sqrt{(8 \cdot 10^{-8})} = 2,8 \cdot 10^{-4}$ m = **0,28 mm**.
3. Se le cellule consumano dieci volte meno (tessuto meno denso) lo spessore sale di $\sqrt{10} = 3,2$ volte: circa 0,9 mm. È il motivo per cui la densità cellulare è un parametro di progetto.

7 Schema a blocchi: il ciclo di produzione di un tessuto



Schema. Dal paziente al paziente: ciclo di un tessuto ingegnerizzato. Il percorso dura settimane o mesi. In arancio il bioreattore, che alimenta e stimola il costrutto: è il punto in cui un esperimento diventa un processo ripetibile.

Biopsia ed espansione. Si prelevano poche cellule (da una piccola biopsia di cartilagine, midollo o tessuto adiposo) e si moltiplicano in coltura: da migliaia a milioni. Ogni raddoppio richiede un giorno circa (il tempo varia con il tipo di cellula); le cellule specializzate perdono caratteristiche dopo troppi passaggi.

Differenziazione. Le staminali ricevono i segnali (per esempio dexametazone, acido ascorbico e β -glicerofosfato per l'osso) che le spingono verso il tipo di cellula voluto. Si controlla con marcatori.

Semina. Le cellule vengono introdotte nello scaffold. Una semina statica (goccia) lascia molte cellule vicino alla superficie; una semina dinamica (agitata o perfusa) le distribuisce meglio. Si controlla l'efficienza (quante cellule restano attaccate).

Maturazione in bioreattore. Il costrutto cresce in un contenitore che controlla temperatura (37 °C), pH, ossigeno, composizione del terreno, flusso e stimoli meccanici. È la fase più lunga e più costosa.

Controlli di qualità. Vitalità, distribuzione delle cellule, quantità di matrice, resistenza meccanica, sterilità. I tessuti vivi non si possono sterilizzare alla fine: la produzione si fa in condizioni asettiche in sale pulite (GMP), ed è per questo che il costo è alto.

Impianto e follow-up. Dopo l'impianto si osservano integrazione, vascolarizzazione, funzione e possibili reazioni immunitarie. Questi dispositivi sono, per la normativa europea, **medicinali per terapie avanzate (ATMP)** se contengono cellule, con requisiti molto severi.

8 Bioreattori e stimoli

Una coltura statica in piastra va bene per cellule in monostrato, ma un costrutto 3D spesso più di 1 mm ha bisogno di **movimento del liquido**. Un **bioreattore** è un contenitore che lo ottiene e controlla le condizioni.

Spinner flask. Un'ancora magnetica mescola il terreno attorno ai costrutti appesi: semplice ed economico, migliora gli scambi sulla superficie ma poco all'interno.

Rotating wall. Un cilindro che ruota lentamente tiene i costrutti sospesi in caduta libera con basso sforzo di taglio: va bene per costrutti delicati e piccoli.

Perfusione diretta. Il terreno è pompato attraverso i pori dello scaffold: porta ossigeno e nutrienti all'interno e produce uno **sforzo di taglio** sulle cellule. Per le cellule ossee uno sforzo di taglio dell'ordine di 0,1-1 Pa stimola la formazione di matrice; valori troppo alti staccano le cellule.

Stimolazione meccanica. Per la cartilagine si usa una **compressione ciclica** (qualche percento di deformazione, circa 1 Hz) che aumenta la sintesi di matrice; per tendini e legamenti uno **stiramento ciclico**; per i vasi un **flusso pulsatile** e una pressione; per il cuore la **stimolazione elettrica** (impulsi di qualche V/cm) che sincronizza la contrazione.

Monitoraggio. Ossigeno e pH con sensori; glucosio e lattato nel terreno come indice di attività; quantità di DNA e di collagene; imaging non distruttivo con micro-TC o ottica. L'obiettivo è controllare il processo senza distruggere il costrutto.

$$\tau = 6\mu Q / (wh^2)$$

Sforzo di taglio alla parete di un canale rettangolare largo e basso (placche piane): viscosità μ , portata Q , larghezza w , altezza h .

$$Q = \pi r^4 \Delta P / (8\mu L), \tau_p = \Delta P r / (2L)$$

Hagen-Poiseuille per un tubo: portata e sforzo di taglio alla parete (fluido newtoniano).

Bioreattore	Come agisce	Tessuto tipico	Limite
Spinner flask	agitazione magnetica	osso, cartilagine in prova	poco scambio all'interno
Rotating wall	caduta libera lenta	costrutti piccoli, organoidi	costrutti grandi cadono

Bioreattore	Come agisce	Tessuto tipico	Limite
Perfusione diretta	flusso attraverso i pori	osso, fegato	sforzo di taglio da controllare
Compressione ciclica	carichi ripetuti	cartilagine	attrezzatura più complessa
Stiramento ciclico	allungamenti ripetuti	tendine, muscolo, vaso	ancoraggio dei costrutti
Stimolazione elettrica	impulsi nel terreno	cuore, muscolo, nervo	elettrodi e prodotti elettrolitici

Esempio svolto. Sforzo di taglio in una camera di perfusione

1. Terreno con viscosità $\mu = 0,78 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ a 37°C . Canale largo $w = 10 \text{ mm}$, alto $h = 0,5 \text{ mm}$. Portata $Q = 10 \text{ mL/min} = 1,67 \cdot 10^{-7} \text{ m}^3/\text{s}$.
2. $\tau = 6 \cdot 0,78 \cdot 10^{-3} \cdot 1,67 \cdot 10^{-7} / (0,010 \cdot (0,5 \cdot 10^{-3})^2) = 7,8 \cdot 10^{-10} / 2,5 \cdot 10^{-9} \approx \mathbf{0,31 \text{ Pa}}$.
3. È nell'intervallo che stimola le cellule ossee ($0,1\text{--}1 \text{ Pa}$). Raddoppiando la portata si raddoppia τ ; dimezzando l'altezza si quadruplica.

9 Formule ed esempi svolti

$$N(t) = N_0 \cdot 2^{t/T_d}$$

Crescita esponenziale delle cellule: T_d è il tempo di raddoppio.

$$n = \log_2(N/N_0)$$

Numero di raddoppi per passare da N_0 a N .

$$N_{\text{cellule}} = \rho_c \cdot V_{\text{scaffold}} \cdot (1 - P)$$

Cellule necessarie per riempire il tessuto: densità cellulare per volume di tessuto (la parte di volume non porosa conta poco).

$$t_{1/2} = \ln 2 / k$$

Dimezzamento della massa o della resistenza dello scaffold.

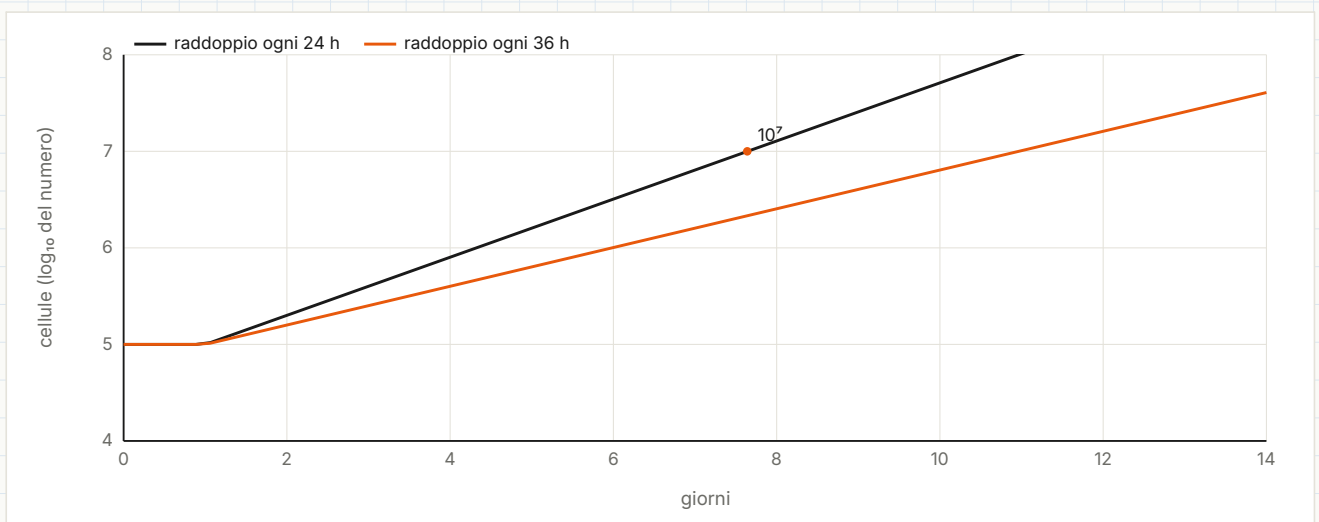


Figura. Espansione di cellule da una biopsia. Dopo una breve fase di adattamento la crescita è una retta in scala logaritmica. Con raddoppio ogni 24 h il numero di cellule passa da 10^5 a 10^7 in circa una settimana.

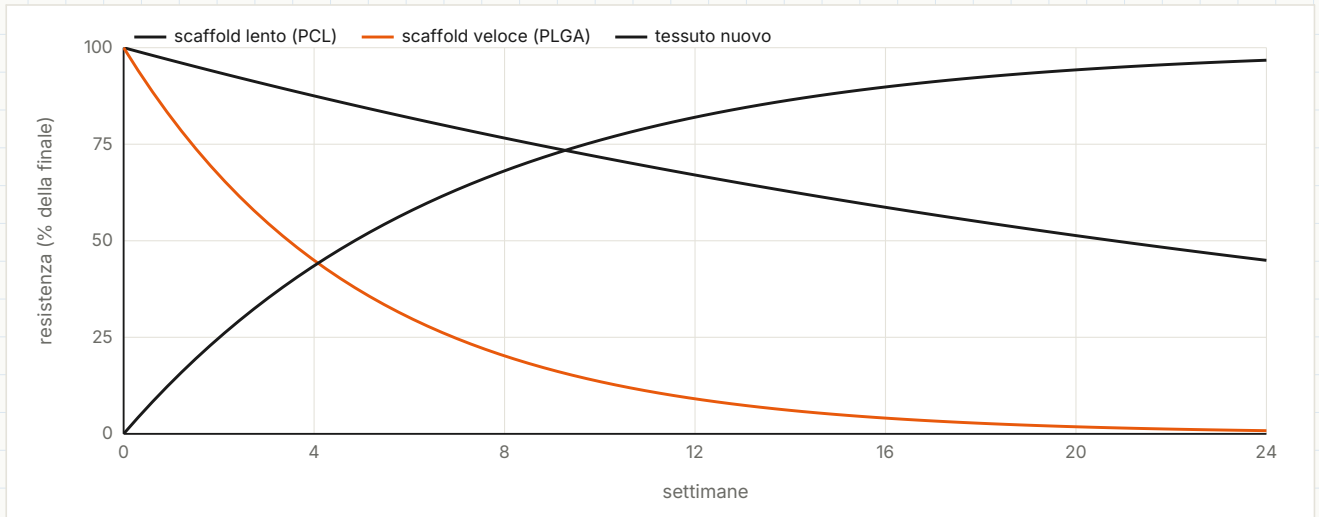


Figura. Il passaggio di consegne: scaffold che si degrada e tessuto che cresce. Curve schematiche. Lo scaffold veloce perde la resistenza prima che il tessuto l'abbia acquistata (buco di resistenza fra le due curve); quello lento tiene fino al passaggio.

Esempio svolto. Quanto tempo per espandere le cellule?

1. Da una biopsia si ottengono $N_0 = 10^5$ cellule; ne servono 10^7 . Tempo di raddoppio 24 ore.
2. Numero di raddoppi: $n = \log_2(10^7/10^5) = \log_2 100 = 6,64$.
3. Tempo: $6,64 \times 24 \text{ h} = \mathbf{159 \text{ ore} \approx 6,6 \text{ giorni}}$. In pratica più lungo: le cellule rallentano e servono passaggi di coltura (e una fase di partenza).

Esempio svolto. Quante cellule per riempire uno scaffold?

1. Scaffold cilindrico di 1 cm^3 con porosità 90 %: $0,9 \text{ cm}^3$ di spazio vuoto.
2. La densità tipica di molti tessuti è dell'ordine di 10^8 cellule/ cm^3 (osso e cartilagine ne hanno meno, fegato di più).
3. Per riempire a metà lo spazio vuoto ($0,45 \text{ cm}^3$) con 10^8 cellule/ cm^3 : $N = 0,45 \times 10^8 = \mathbf{4,5 \cdot 10^7}$ cellule.
4. Con un'efficienza di semina del 50 % ne servono il doppio: $9 \cdot 10^7$, cioè quasi 10 raddoppi a partire dalle 10^5 cellule di una biopsia ($10^5 \cdot 2^{9,8}$).

Esempio svolto. Tempo di diffusione a diverse distanze

1. $D = 2 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$. $L = 200 \text{ } \mu\text{m}$: $t = (2 \cdot 10^{-4})^2 / (2 \cdot 2 \cdot 10^{-9}) = 4 \cdot 10^{-8} / 4 \cdot 10^{-9} = \mathbf{10 \text{ s}}$.
2. $L = 1 \text{ mm}$: $t = 10^{-6} / 4 \cdot 10^{-9} = \mathbf{250 \text{ s}}$ (circa 4 minuti).
3. $L = 1 \text{ cm}$: $t = 10^{-4} / 4 \cdot 10^{-9} = 25 \text{ 000 s} \approx \mathbf{7 \text{ ore}}$. Il tempo cresce con il quadrato della distanza: ecco perché i pezzi spessi hanno bisogno dei vasi.

Esempio svolto. Pressione per spingere il bioinchiostro in un ago

1. Bioinchiostro con viscosità $10 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ (modello newtoniano semplice), ago con raggio $100 \text{ } \mu\text{m}$ e lunghezza 10 mm , portata di $2 \text{ mm}^3/\text{min} = 3,3 \cdot 10^{-11} \text{ m}^3/\text{s}$.
2. $\Delta P = 8\mu LQ / (\pi r^4) = 8 \cdot 10 \cdot 0,01 \cdot 3,3 \cdot 10^{-11} / (\pi \cdot 10^{-16}) = 2,7 \cdot 10^{-11} / 3,14 \cdot 10^{-16} \approx \mathbf{85 \text{ kPa}}$.
3. Sforzo di taglio alla parete: $\tau = \Delta P \cdot r / (2L) = 85 \text{ 000} \times 10^{-4} / 0,02 \approx \mathbf{425 \text{ Pa}}$: valori che le cellule in genere tollerano. Se si dimezza il diametro dell'ago, a parità di portata la pressione sale di 16 volte.

Esempio svolto. Passaggio di consegne fra scaffold e tessuto

1. Lo scaffold perde resistenza con tempo di dimezzamento di 8 settimane; il tessuto raggiunge metà della resistenza finale in 5 settimane.
2. A 8 settimane lo scaffold conserva il 50 % della resistenza e il tessuto ha raggiunto $1 - 2^{-8/5} \approx 67\%$ di quella finale: la somma supera il 100 %, il passaggio è sicuro.
3. Se il tessuto fosse più lento (metà della resistenza a 12 settimane), a 8 settimane sarebbe a $1 - 2^{-8/12} \approx 37\%$: la somma con lo scaffold (50 %) è 87 %, sotto il 100 %, cioè c'è un «buco» di resistenza. Da qui la scelta di un polimero più lento (PCL invece di PLGA).

10 Limiti, insuccessi e questioni aperte

Vascolarizzazione. È il limite principale: oltre circa 0,2–0,3 mm l'ossigeno non arriva per sola diffusione. Funzionano oggi tessuti sottili o poco vascolarizzati (pelle, cartilagine); gli organi interi restano un obiettivo lontano.

Ripetibilità. I tessuti vivi sono variabili: cellule di donatori diversi, lotti di materiali diversi, condizioni leggermente diverse danno risultati diversi. I processi industriali richiedono controlli molto più severi di una ricerca di laboratorio.

Costo e regole. Un prodotto con cellule vive è un medicinale avanzato, con produzione in sale pulite e controlli lunghi e costosi: i prodotti commerciali sono pochi, e alcuni sono stati ritirati dal mercato perché poco vantaggiosi in rapporto al costo.

Il caso dei trapianti di trachea e dei fallimenti clinici. Alcuni interventi pionieristici su organi complessi, senza solide prove precliniche, hanno avuto esiti drammatici e hanno insegnato che il passo dal laboratorio all'uomo richiede prove su animali, dati completi e controllo etico.

Integrazione. Un tessuto che funziona in coltura può non integrarsi: manca il collegamento nervoso, vascolare o meccanico con il tessuto vicino, oppure il sistema immunitario reagisce.

Sicurezza. Le cellule staminali, se non ben controllate, possono dare tumori. Il tracciamento a lungo termine dei pazienti è un obbligo.

Problema	Che cosa succede	Possibile risposta
Nucleo necrotico	cellule morte al centro del costruito	perfusione, canali, costrutti sottili
Pochi vasi dopo l'impianto	tessuto che muore per mancanza di ossigeno	prevascolarizzazione, VEGF
Scaffold che cede troppo presto	costrutto che collassa	polimeri più lenti, compositi
Tessuto debole	fibrocartilagine invece di cartilagine	stimoli meccanici, tempi più lunghi
Variabilità fra lotti	risultati non ripetibili	controllo dei processi, standard
Risposta immunitaria	infiammazione, rigetto	cellule autologhe, matrici trattate

11 Norme e prospettive

Come sono regolati. Un prodotto con cellule vive o tessuti ingegnerizzati è, nell'Unione Europea, un **medicinale per terapie avanzate** (ATMP) secondo il Regolamento (CE) n. 1394/2007, valutato dall'Agenzia europea dei medicinali. Uno scaffold senza cellule, invece, è di solito un **dispositivo medico** secondo il Regolamento (UE) 2017/745, di classe alta. Negli Stati Uniti la FDA ha categorie analoghe. La produzione richiede le buone pratiche di fabbricazione (GMP).

Prospettive. (1) **Organoidi e organi su chip:** mini-tessuti per provare farmaci con meno animali. (2) **Biostampa con vasi:** reti di canali stampati. (3) **Cellule riprogrammate** specifiche per il paziente. (4) **Materiali intelligenti** che rilasciano segnali nel tempo. (5) **Intelligenza artificiale** per progettare scaffold e controllare i bioreattori. (6) **Meno cellule, più segnali:** scaffold che reclutano le cellule del paziente senza

coltura previa (rigenerazione «in situ»), più semplice da regolare.

Il campo è passato dall'entusiasmo degli anni Novanta a una visione più realistica: pochi prodotti in commercio, ma strumenti di laboratorio molto utili e un'intera industria di materiali e di biostampanti.

12 Esercizi con soluzione

Esercizio 1. Uno scaffold ha densità apparente $0,40 \text{ g/cm}^3$ ed è fatto di PLA ($1,25 \text{ g/cm}^3$). Calcola la porosità.

Soluzione. $P = 1 - 0,40/1,25 = 0,68 = 68 \%$.

Esercizio 2. Per una schiuma a celle aperte con $P = 0,85$, calcola rigidità relativa e resistenza relativa (Gibson-Ashby).

Soluzione. Densità relativa $0,15$. $E/E_s = 0,15^2 = 0,0225$ (2,3 %). $\sigma/\sigma_s = 0,3 \times 0,15^{1,5} = 0,3 \times 0,0581 = 0,0174$ (1,7 %).

Esercizio 3. Da $2 \cdot 10^4$ cellule con raddoppio ogni 30 ore, quante ore servono per arrivare a $5 \cdot 10^6$?

Soluzione. $N/N_0 = 250$; $n = \log_2 250 = 7,97$ raddoppi; $t = 7,97 \times 30 = 239$ ore ≈ 10 giorni.

Esercizio 4. Stima il tempo di diffusione per $L = 500 \text{ }\mu\text{m}$ con $D = 2 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$.

Soluzione. $t = L^2/(2D) = (5 \cdot 10^{-4})^2 / (4 \cdot 10^{-9}) = 2,5 \cdot 10^{-7} / 4 \cdot 10^{-9} = 62,5 \text{ s}$.

Esercizio 5. Calcola lo spessore massimo alimentabile con $D = 2 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$, $C_0 = 0,2 \text{ mol/m}^3$ e consumo $q = 4 \cdot 10^{-2} \text{ mol/(m}^3 \cdot \text{s)}$.

Soluzione. $h = \sqrt{(2 \cdot 2 \cdot 10^{-9} \cdot 0,2 / 4 \cdot 10^{-2})} = \sqrt{(2 \cdot 10^{-8})} = 1,41 \cdot 10^{-4} \text{ m} = 0,14 \text{ mm}$.

Esercizio 6. In una camera di perfusione ($w = 8 \text{ mm}$, $h = 0,4 \text{ mm}$, $\mu = 0,78 \text{ mPa}\cdot\text{s}$) si vuole uno sforzo di taglio di $0,5 \text{ Pa}$. Quale portata serve?

Soluzione. $Q = \tau \cdot w \cdot h^2 / (6\mu) = 0,5 \times 0,008 \times (4 \cdot 10^{-4})^2 / (6 \times 0,78 \cdot 10^{-3}) = 0,5 \times 0,008 \times 1,6 \cdot 10^{-7} / 4,68 \cdot 10^{-3} = 1,37 \cdot 10^{-7} \text{ m}^3/\text{s} \approx 8,2 \text{ mL/min}$.

Esercizio 7. Perché la cartilagine è un buon bersaglio iniziale e il fegato no?

Soluzione. La cartilagine non ha vasi, quindi non c'è il problema di portare ossigeno in profondità: basta un costrutto sottile alimentato per diffusione. Il fegato è denso di cellule che consumano molto ossigeno e ha bisogno di vasi in ogni millimetro.

Esercizio 8. Uno scaffold di PLGA 50:50 si degrada in 6–8 settimane, ma l'osso nuovo ne richiede 16. Che cosa può non funzionare e che cosa cambieresti?

Soluzione. Lo scaffold perde resistenza prima che l'osso la raggiunga: il costrutto può cedere. Si può scegliere un polimero più lento (PLLA o PCL), un composito con ceramica, oppure proteggere il sito con una fissazione esterna.

Esercizio 9. Perché con un ago più stretto serve molta più pressione a parità di portata?

Soluzione. Nella legge di Hagen-Poiseuille la portata è proporzionale a r^4 : dimezzare il raggio riduce la portata di 16 volte a parità di pressione; per mantenere la stessa portata la pressione deve crescere di 16 volte. Cresce anche lo sforzo di taglio sulle cellule.

13 Glossario

Angiogenesi — formazione di nuovi capillari da vasi esistenti.

Avascolare — senza vasi sanguigni (come la cartilagine).

Bioinchiostro — idrogel con cellule vive usato per la biostampa.

Bioreattore — contenitore che alimenta e stimola un tessuto in crescita.

Difetto critico — lesione ossea troppo grande per guarire da sola.

Diffusione — movimento di molecole dalle zone più concentrate a quelle meno concentrate.

ECM — matrice extracellulare: rete di proteine e zuccheri attorno alle cellule.

Electrospinning — produzione di fibre sottilissime con un getto in campo elettrico.

GMP — buone pratiche di fabbricazione.

Idrogel — rete di polimero piena d'acqua.

iPSC — cellule staminali pluripotenti indotte da cellule adulte.

MSC — cellule staminali mesenchimali.

Organoide — mini-tessuto che si auto-organizza da cellule staminali.

Osteoblasto, osteoclasto, osteocita — cellule che costruiscono, riassorbono e controllano l'osso.

Perfusione — passaggio di liquido attraverso un costruito.

Porosità — frazione di volume vuoto.

Scaffold — impalcatura temporanea per le cellule.

Sforzo di taglio — forza per unità di superficie parallela alla parete, creata dal flusso.

VEGF — fattore di crescita che stimola la formazione dei vasi.

14 Fonti

Le fonti sono elencate qui sotto con i collegamenti. I valori numerici sono ordini di grandezza da letteratura e modelli semplici; per un progetto reale servono dati misurati sul tipo di cellule e sul materiale scelto. Il testo non è un consiglio medico. Il testo è scritto da zero.

Fonti e letture

- R. Langer, J. P. Vacanti, Tissue engineering — Science 260 (1993) 920 — <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8493529/>
- L. G. Griffith, G. Naughton, Tissue engineering: current challenges and expanding opportunities — Science 295 (2002) 1009 — <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11834815/>
- S. J. Hollister, Porous scaffold design for tissue engineering — Nature Materials 4 (2005) 518 — <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16003400/>
- V. Karageorgiou, D. Kaplan, Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis — Biomaterials 26 (2005) 5474 — <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15860204/>
- Q. L. Loh, C. Choong, Three-dimensional scaffolds for tissue engineering: role of porosity and pore size — Tissue Eng Part B 19 (2013) 485 — <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23672709/>
- J. Rouwkema et al., Vascularization in tissue engineering — Trends Biotechnol 26 (2008) 434 — <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18585808/>
- S. V. Murphy, A. Atala, 3D bioprinting of tissues and organs — Nature Biotechnology 32 (2014) 773 — <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25093879/>
- A. Greiner, J. H. Wendorff, Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers — Angew Chem 46 (2007) 5670 — <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17585397/>
- M. Brittberg et al., Autologous chondrocyte transplantation — N Engl J Med 331 (1994) 889 — <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8078550/>
- A. Atala et al., Tissue-engineered autologous bladders — The Lancet 367 (2006) 1241 — <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16631879/>
- K. Takahashi, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells — Cell 126 (2006) 663 — <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16904174/>
- Regolamento (CE) n. 1394/2007 sui medicinali per terapie avanzate — testo ufficiale — <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2007/1394/oj>

Materiale divulgativo e di studio, gratuito, scritto da Sandro Feudo per sandrofeudo.com. Non serve a fare diagnosi né a usare apparecchi su persone. Puoi stamparlo e condividerlo citando la fonte.