

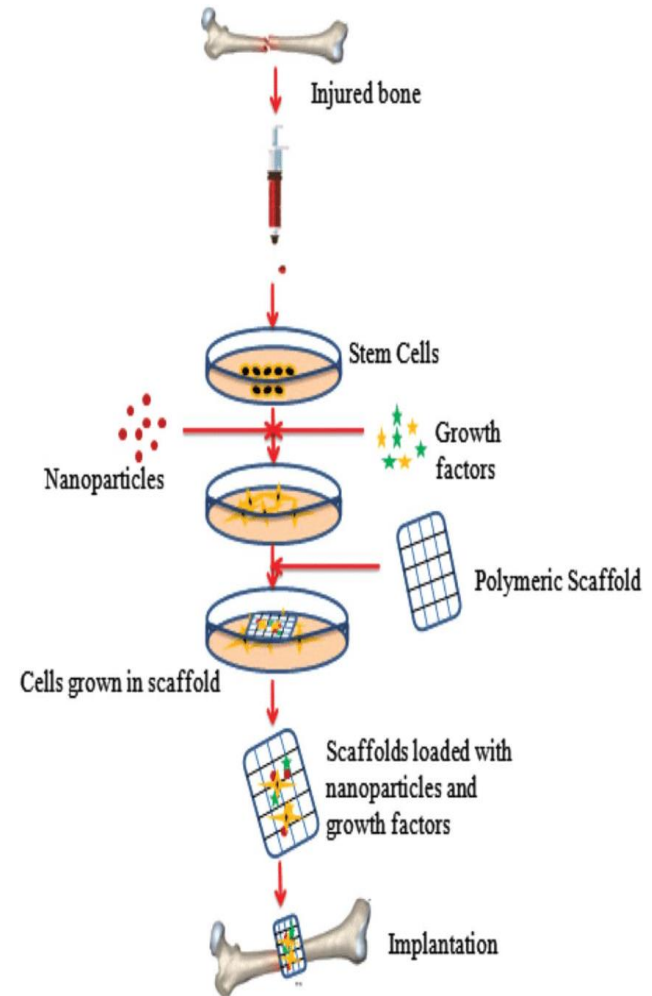
Bone Tissue Engineering

Alessia Blundo
Chiara Bulgheresi
Michele Gemma
Leonardo Geronzi
Francesca Sergi

Ingegneria tissutale e BTE

L'ingegneria tissutale è un campo di ricerca interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria e delle scienze della vita allo sviluppo di sostituti biologici che ristabiliscono, mantengono o migliorano la funzione tissutale.

L'ingegneria tissutale dell'osso (BTE) si pone l'obiettivo di ripristinare le funzionalità del tessuto osseo mediante l'impianto di elementi viventi che siano in grado, in tempi clinicamente accettabili, di diventare parte integrante dell'organismo in cui vengono introdotti.



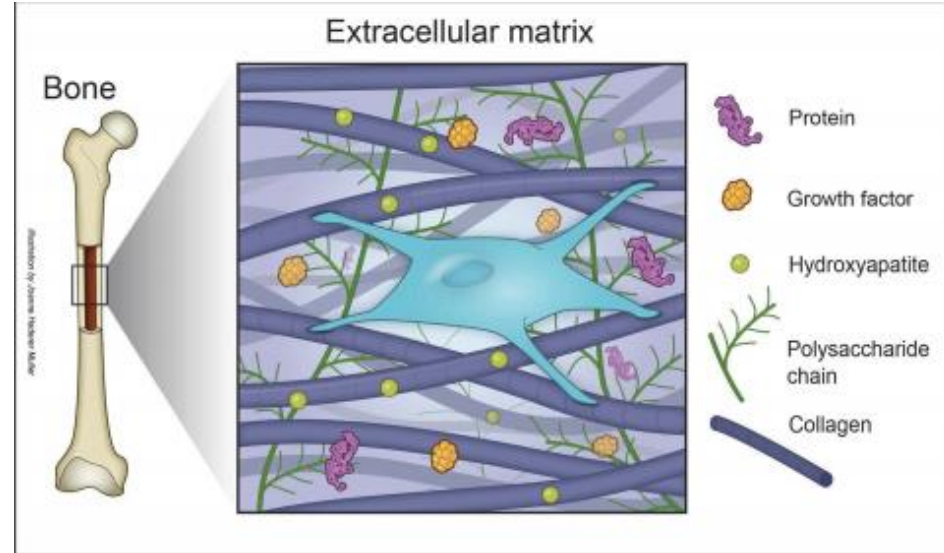
Cenni sul tessuto osseo

L'osso è un materiale composito naturale costituito da:

- Cellule
 - Cellule osteoprogenitrici
 - Osteoblasti
 - Osteociti
 - Osteoclasti
- Matrice extracellulare ossea
 - Componente organica (collagene di tipo I, proteoglicani, glicoproteine...)
 - Componente minerale (fosfato di calcio, idrossiapatite...)

Funzioni del tessuto osseo

- Impalcatura e sostegno
- Protezione di organi interni
- Movimento
- Ematopoiesi
- Assorbimento metalli pericolosi
- Riserva di ioni calcio



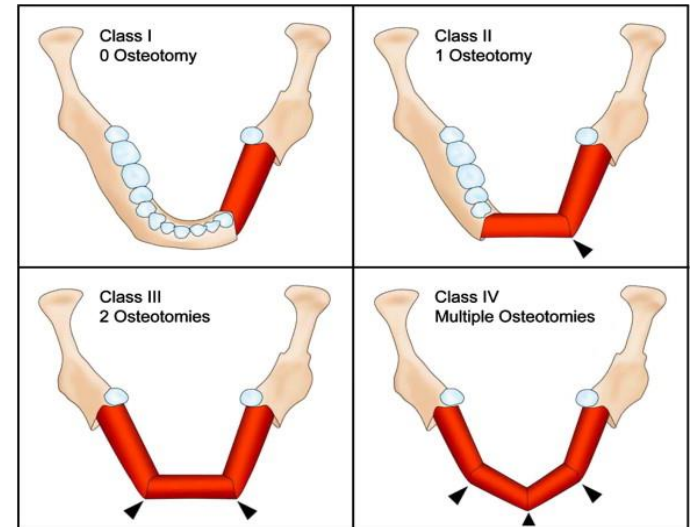
Clinical Need

La BTE rappresenta una importante alternativa all'uso tradizionale di protesi ed innesti ossei che possono essere:

- Autoinnesti: trapianto di osso prelevato dal paziente stesso.
- Alloinnesti: trapianto di osso da donatore della stessa specie.
- Xenoinnesti: trapianto di osso da donatore di specie diversa.

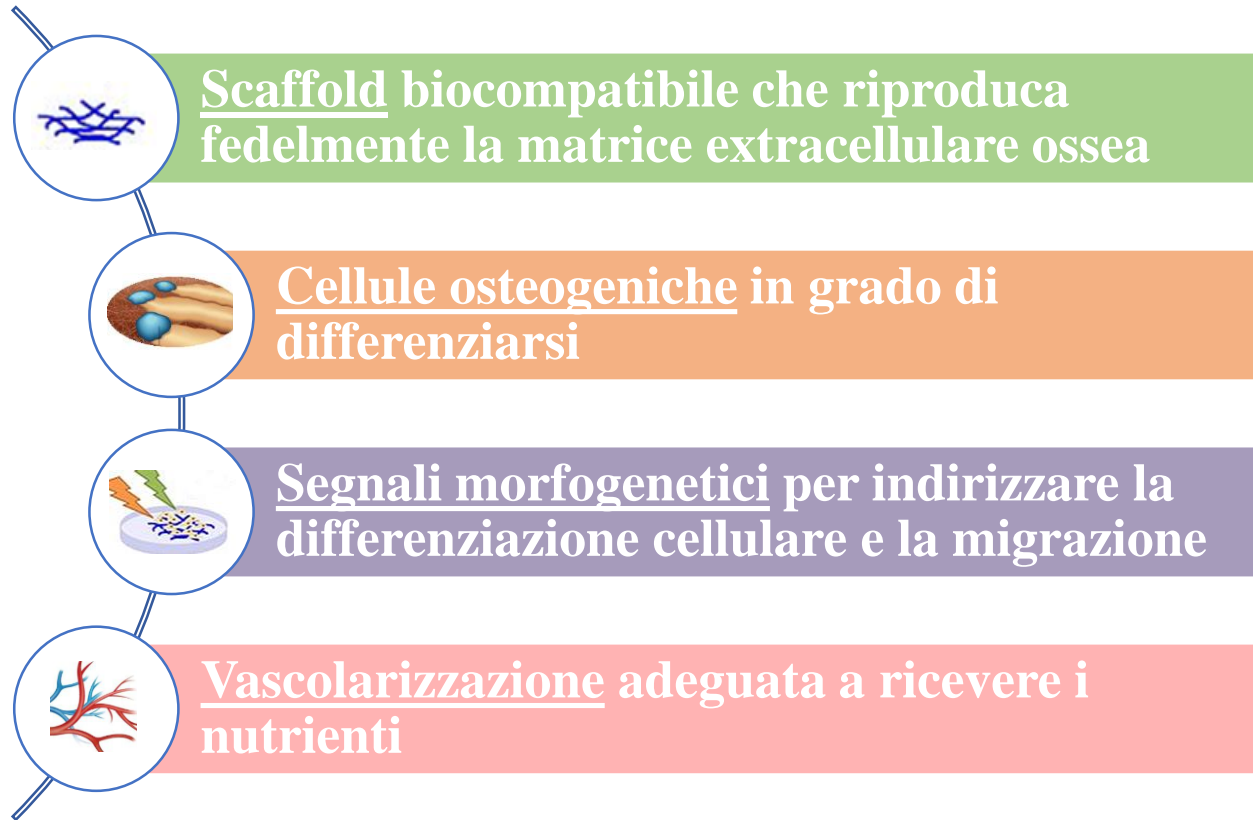
Svantaggi:

- Costi elevati
- Rischi chirurgici
- Rigetto e immunoreazioni
- Il tessuto trapiantato presenta ridotte proprietà osteoinduttive
- Debole vascolarizzazione
- Presenza di materiale metallico
- Scarsa presenza di donatori
- Inadatto nel caso in cui il sito di trapianto richiede grandi quantità di osso



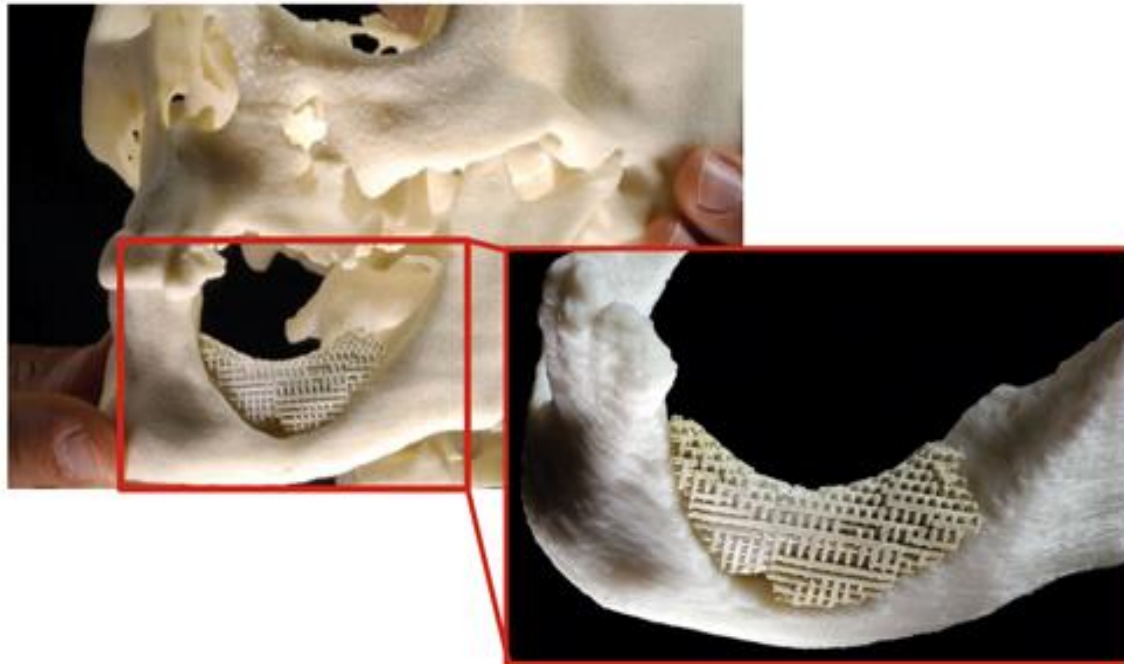
Elementi principali della BTE

I quattro elementi fondamentali per la rigenerazione ossea sono:



Scaffold

Struttura tridimensionale che agisce temporaneamente come matrice extracellulare per favorire il differenziamento e la proliferazione cellulare al fine di rigenerare il tessuto. Questo deve imitare o replicare alcune caratteristiche della ECM naturale e spesso incorporare alcune caratteristiche ingegnerizzate al fine di stimolare e accelerare la rigenerazione del tessuto.



Caratteristiche desiderate:

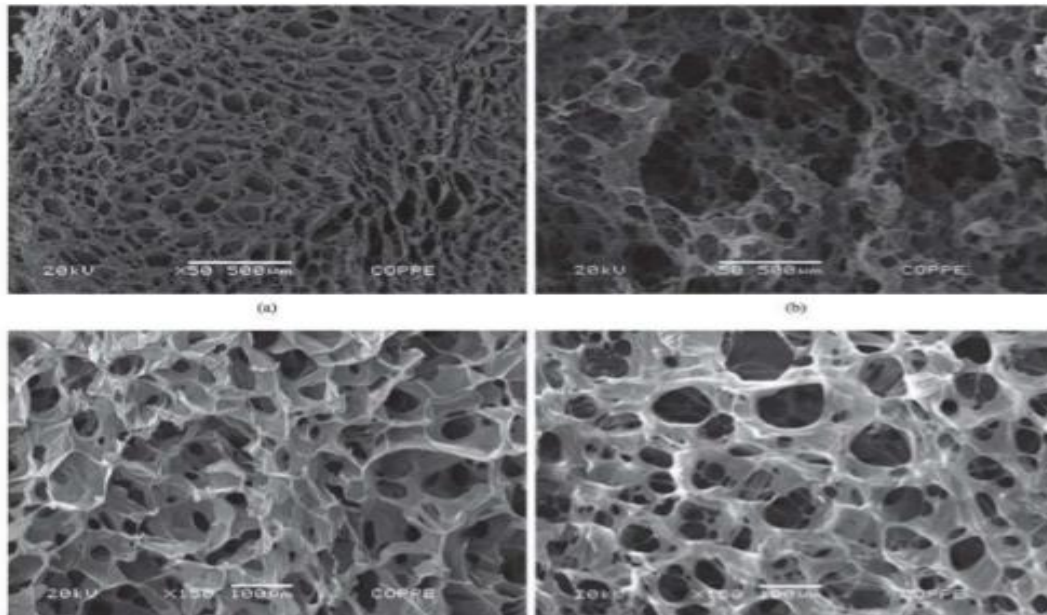
- Biocompatibilità, biodegradabilità e bioriassorbibilità in tempi compatibili con quelli di formazione del nuovo tessuto;
- Bioattività;
- Favorire la crescita e la proliferazione del tessuto;
- Proprietà meccaniche simili al tessuto osseo da sostituire;
- Porosità adeguata per ospitare osteoblasti
 - Porosità prossima al 90% del volume complessivo della struttura;
 - Dimensione dei pori tra 200 e 400 micron;
 - Interconnettività;
- Garantire la meccano-trasduzione;
- Favorire la vascolarizzazione e il conseguente passaggio di nutrienti e metaboliti;
- Adeguata chimica superficiale.

Materiali

Diversi studi sono stati effettuati sui seguenti materiali:

- **Polimeri naturali:**

Fibrinogeno, Acido ialuronico, Idrossibutirrato, Collagene, Chitosano



Immagini al SEM: a) Chitosano; b) Chitosano-Collagene.

Vantaggi

- ✓ Basso potenziale immunogenico
- ✓ Bioattività
- ✓ Versatilità chimica

Svantaggi

- Scarse proprietà meccaniche
- Bioattività non controllabile

- **Polimeri sintetici:**

Acido polilattico-co-glicolico (PLGA), Acido poliglicolico (PGA), Acido polilattico (PLA), Policaprolattone (PCL), Polipropilenefumarato (PPF), Policarbonato (PC), Polianidridi, copolimeri di Polibutilene e polietilentereftalato.

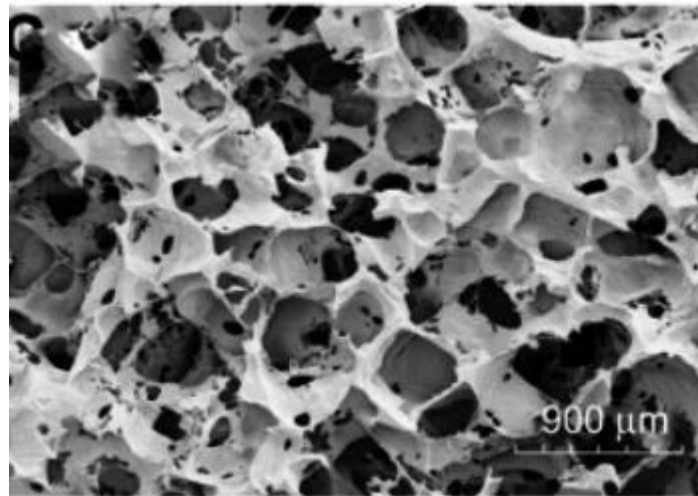


Immagine al SEM scaffold in PLGA.

Vantaggi

- ✓ Rate di degradazione controllabile
- ✓ Osteoconduttività
- ✓ Bioattività
- ✓ Modulazione delle proprietà fisico-chimiche e meccaniche
- ✓ Discreta permeabilità

Svantaggi

- Scarsa osteoinduttività
- Rilascio di sottoprodotti tossici pericolosi



Risolubile con Polifosfazeni in grado di rilasciare prodotti basici o neutri

- **Materiali ceramici:**

Idrossiapatite HA (naturale o sintetica), β -Tricalciofosfato β -TCP

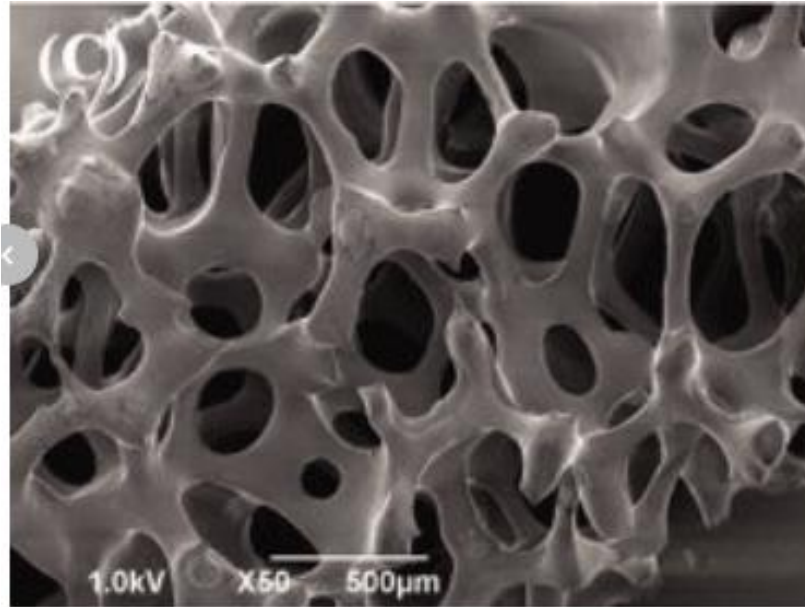


Immagine al SEM di uno scaffold in HA.

Vantaggi

- ✓ Osteoinduttività e osteoconduttività
- ✓ Modulo elastico elevato e resistenza a compressione paragonabile all'osso sano corticale

Svantaggi

- Forte risposta infiammatoria
- Fragilità
- Lento rate di degradazione
- Scarsa interconnettività tra i pori

- **Materiali compositi:**

in generale compositi polimero-polimero (PLGA+polifosfazeni) o polimero-ceramici come HA-PLGA, HA-PLA, HA-gelatina, HA-Chitosano, HA-Collagene.

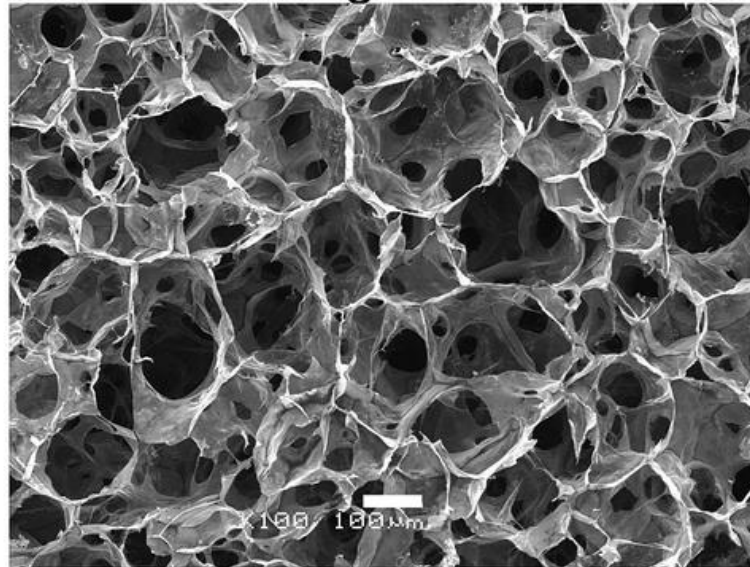


Immagine al SEM di uno scaffold in Collagene/HA.

Vantaggi

- ✓ Proprietà modulabili in base al quantitativo di fibre di rinforzo
- ✓ Biomimesi
- ✓ Miglioramento delle proprietà tramite l'incorporazione di particelle di bioceramica o biovetro, nanotubi di carbonio

Svantaggi

- Difficoltà realizzative (utilizzo di tecnologie complesse)

Proprietà topografiche nano-strutturali

Le cellule ossee sono predisposte all'adesione e alla proliferazione sulla base di interazioni sulla nanoscala essendo i principali costituenti della EM di dimensioni nanometriche. In particolare, la nano-topografia influenza significativamente l'osteoaduttività e l'osteointegrazione.

Tecniche per ottenere proprietà nano-strutturali:

- Auto-assemblaggio molecolare
- Separazione di fase
- Elettrospinning

Auto-assemblaggio molecolare

Tecnica che sfrutta l'organizzazione spontanea e autonoma delle singole componenti in strutture ordinate e stabili senza l'intervento umano, simulando il naturale processo di assemblaggio dell'ECM.

Separazione di fase:

Processo termodinamico in cui un sistema omogeneo multi-componente genera una fase ricca di polimero, formando un gel, ed una ricca di solvente, eliminabile con l'aggiunta di acqua. Il gel viene raffreddato e liofilizzato, con conseguente formazione di una struttura nano-porosa.

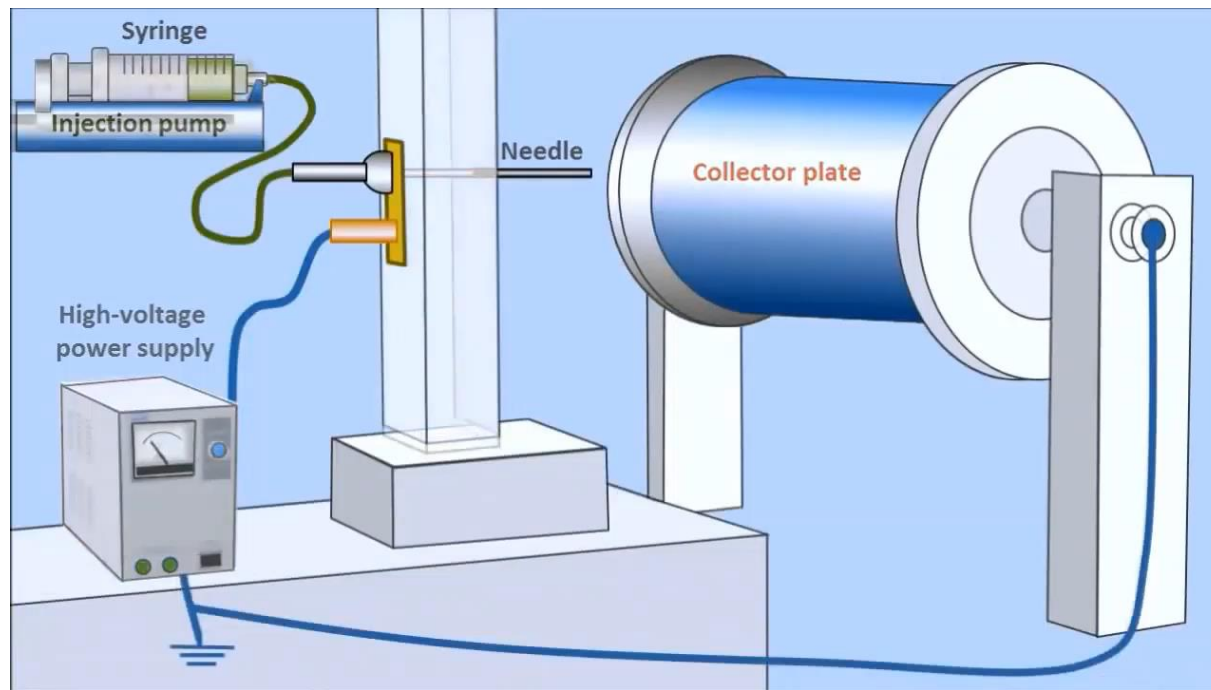
Elettrospinning



Tecnica applicabile ai materiali polimerici che possono essere portati ad uno stato fluido attraverso fusione o dissoluzione in opportuni solventi.

Procedura Elettrospinning:

1. Soluzione polimerica spinta in un capillare;
2. Generazione di un campo elettrico tra dispositivo di raccolta e capillare;
3. Formazione cono di Taylor;
4. Se $F_{\text{elettrostatica}} > \gamma$ della goccia, si genera un sottile getto polimerico, raccolto in forma di reticolo di fibre polimeriche grazie alla differenza di potenziale tra collettore ed estrusore.



L'osso umano è costituito da cristalli nanometrici di HA (tra 5 e 50 nm). L'inserimento di nano-HA comporta:

Amplificazione del processo di differenziamento in osteoblasti

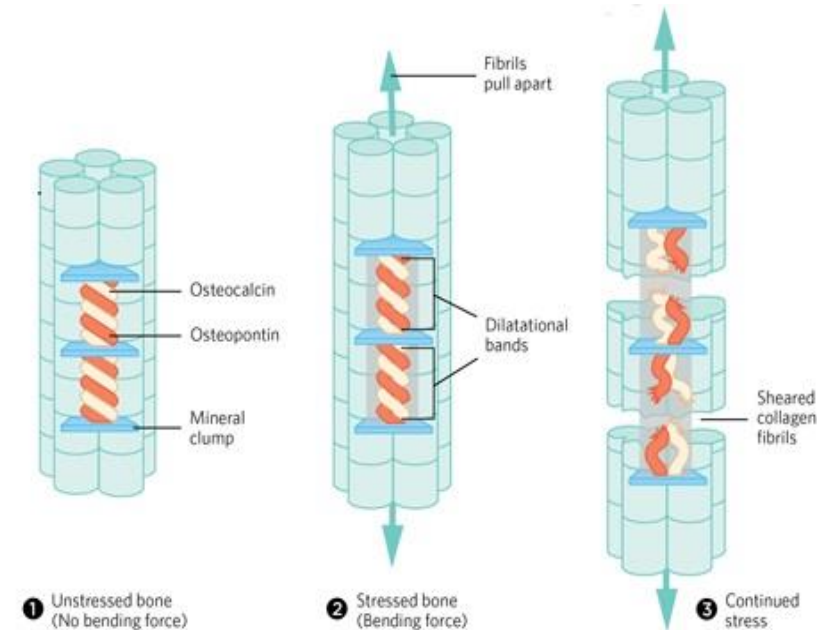
Aumento del rilascio di citochine, importanti per crescita, differenziazione e proliferazione cellulare

Minor rilascio di TNF- α , coinvolta nella regolazione dei processi immunitari

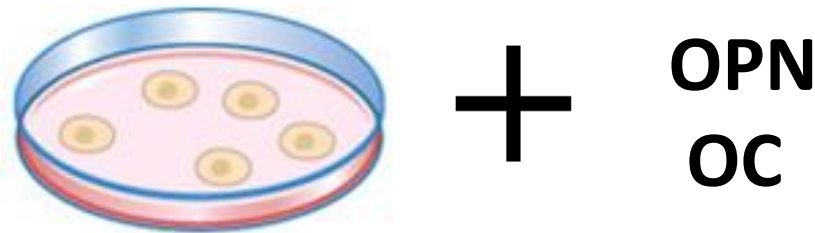
Integrazione di Osteopontina e Osteocalcina

L'Osteopontina (OPN) e l'Osteocalcina (OC) sono proteine che compongono la matrice cellulare ossea.

- OPN contiene la sequenza RGD fondamentale per:
 - adesione e mobilità cellulare;
 - angiogenesi;
 - organizzazione del collagene.
- OC svolge un ruolo fondamentale nel processo di mineralizzazione.



Studi *in vivo* su conigli (*Carvalho et al.* [10]) hanno evidenziato una proliferazione osteoblastica 1.3 volte più veloce nel caso di bulk contenenti OPN e OC rispetto a bulk privi di queste o solo con una delle due, mostrando un effetto sinergico che incrementa la forza di adesione e promuove la formazione di contatti focali.



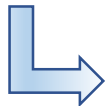
La ricrescita ossea può quindi essere promossa utilizzando scaffold biomimetici con integrate queste proteine.

Cellule staminali per la BTE

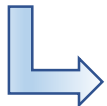
È necessario scegliere una fonte di cellule in grado di proliferare e consentire la crescita del tessuto osseo in vitro e, una volta impiantato, in vivo.

Non è stata ancora individuata la tipologia cellulare ottimale per la BTE, tuttavia numerosi studi sono stati condotti sui seguenti tipi di cellule:

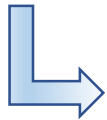
CELLULE STAMINALI EMBRIONALI (ESC)



Cellule pluripotenti che possono essere usate come unica fonte per il differenziamento in diversi tipi di cellule presenti nel tessuto osseo



Differenziamento osteogenico delle ESC è ottenuto mediante formazione di corpi embrionali o in modo diretto



- ✓ Elevata attività proliferativa
- ✗ Problemi immunologici e cancerogenetici
- ✗ Richiedono complesse condizioni di coltura

CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI (MSC)

→ Sono un tipo di cellule staminali adulte che risiedono in tessuti completamente differenziati o adulti

-
- ✓ Coinvolte nel naturale processo di sviluppo osseo
 - ✓ Isolate facilmente grazie alla loro proprietà di adesione alla plastica in coltura
 - ✓ Ottima capacità proliferativa

-
- ✗ Numero limitato di raddoppi di popolazione
 - ✗ Tempi lunghi di coltura possono provocare una trasformazione cellulare maligna
 - ✗ Con l'aumento dell'età del donatore diminuiscono:
 - differenziazione osteogenica in vitro
 - formazione ossea in vivo

CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DEI DENTI

CELLULE STAMINALI DA POLPA DENTALE (DPSC)

- ✓ Differenziazione in odontoblasti o, con aggiunta di un mezzo osteogenico (acido ascorbico, dexametasone e β -glicerofosfato), in osteoblasti

CELLULE STAMINALI DA DENTI DECIDUI ESFOLIATI (SHED)

- ✓ Elevata capacità osteoinduttiva
- ✓ Potenziale di differenziazione simile alle DPSC, ma maggiore tasso di proliferazione
- ✓ Differenziazione in odontoblasti
- ✓ Capacità di generare cellule nervose e dei vasi sanguigni danneggiati (sono ottimali per la rigenerazione del tessuto dentale)

- ✗ Dubbi sulla somiglianza della matrice minerale prodotta da queste cellule con quella dell'osso

CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI INDOTTE (iPSC)



Create artificialmente a partire da cellule non pluripotenti forzate ad esprimere geni specifici

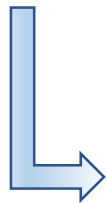


- ✓ Differenziamento in vitro e pluripotenza simili a quelli delle ESC
- ✗ Possibile formazione di tumori a causa di oncogeni integrati
- ✗ Problematiche legate alla memoria della natura delle cellule di partenza

CELLULE STAMINALI DERIVATE DA SANGUE PERIFERICO



- ✓ Procedura di isolamento minimamente invasiva
- ✓ Capaci di trasformarsi in MSC e cellule progenitrici endoteliali (EPC)



- ✗ Efficacia in vivo deve essere ulteriormente indagata

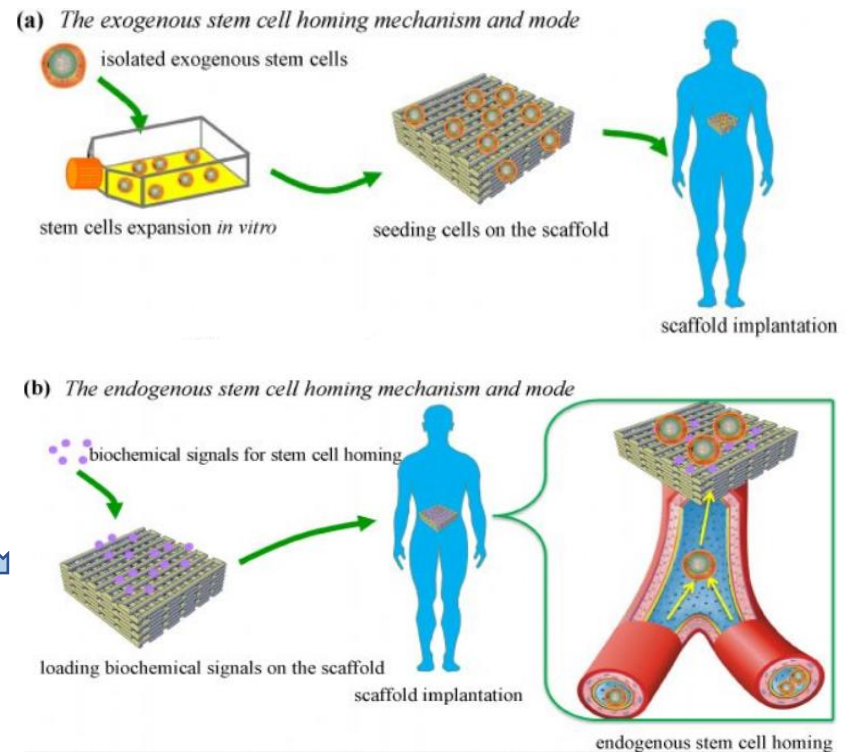
Altri tipi di cellule che possono essere usate in BTE sono: cellule staminali derivate da tessuto adiposo e cellule geneticamente modificate, ma richiedono ulteriori studi.

Stem-cell homing

Le cellule staminali da sole non sono in grado di rigenerare correttamente il tessuto osseo. Il reclutamento di cellule staminali dai siti adiacenti a quello del danno è necessario per una buona osteo-integrazione. Tale reclutamento è chiamato **Stem-cell Homing**.

Due principali metodi per ottenere migliore stem-cell homing:

1. esogeno: cellule staminali vengono “ingegnerizzate” per essere rese più sensibili agli stimoli
2. endogeno: scaffold viene reso più “visibile” alle cellule con l’aggiunta di segnali biochimici



Signaling

Per favorire il corretto sviluppo del tessuto è necessaria la presenza di segnali esogeni che mimino quelli presenti in natura.

Si dividono in:

- Solubili: molecole segnalatrici bioattive;
- Insolubili: stimoli meccanici e fisici.

Segnali solubili

Essi devono essere trasportati al sito di interesse e avere un rilascio controllato tramite Delivery Systems opportuni, integrati nello scaffold o inseriti dall'esterno.

Esempi di segnali solubili

Ormoni

Per esempio, l'ormone paratiroideo (PTH) è cruciale per il rimodellamento dell'osso e serve per il controllo del metabolismo del calcio.

Una somministrazione pulsata promuove la formazione del tessuto osseo mentre un'esposizione continua ne favorisce riassorbimento.

Agenti bioattivi

Spesso si esegue un coating sulla superficie dello scaffold con questi agenti.

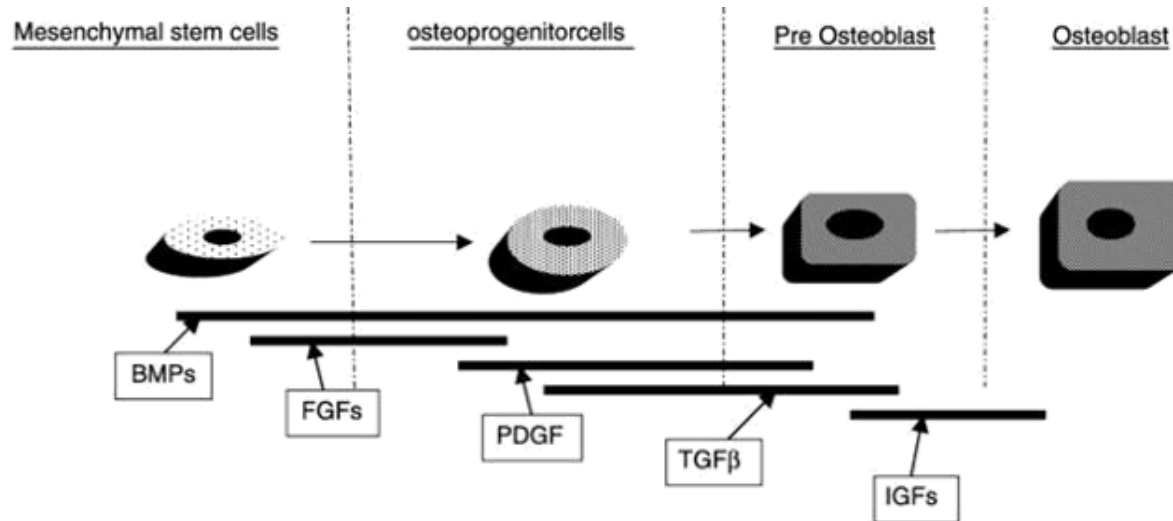
Un esempio sono i fosfati di calcio (CaP) e idrossiapatite per la promozione della proliferazione pre-osteoblastica e differenziazione.

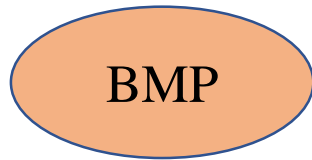
Fattori di crescita

Sono interessati nel processo di rigenerazione del tessuto osseo ed hanno un ruolo importante nel processo di differenziazione degli osteoblasti a partire da cellule osteoprogenitrici MSC. La loro azione è principalmente di tipo osteoinduttivo e osteopromotore.

→ Principali fattori di crescita utilizzati in BTE

- Proteine morfogenetiche ossee-2/7 (BMP-2, BMP-7)
- Fattori di crescita dell'insulina I e II (IGF I / II)
- Fattore di crescita derivato da piastrine (PDGF)
- Fattore di crescita beta trasformante (TGF β)
- Fattori di crescita fibroblastici (FGF)
- Fattori di crescita endoteliali vascolari (VEGF)

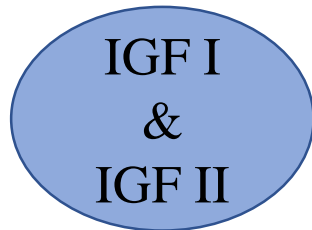




Il loro ruolo principale è quello di reclutare le cellule staminali mesenchimali nel sito di guarigione, per poi differenziarle in cellule osteogeniche.

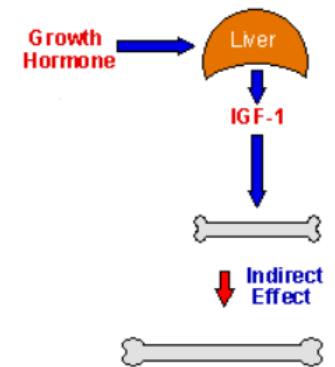
Proteine raggruppate nella superfamiglia TGF- β .

Sono stati ottenuti buoni risultati, ma non è ancora stata trovata una concentrazione ottimale da utilizzare.



Sono ormoni di natura proteica, prodotti soprattutto a livello epatico.

IGF I e II hanno effetti simili sul metabolismo osseo: favoriscono l'attività degli osteoblasti aumentando per esempio il trofismo osseo.



PDGF

Citochina prodotta da piastrine, osteoblasti, macrofagi e monociti che riveste un ruolo importante nei processi di rigenerazione ossea e si crede che abbia anche un ruolo nella migrazione di MSC al sito del danno.

TGF β

Citochina che stimola la proliferazione cellulare e la produzione di collagene in vitro e promuove l'ipertrofia e differenziazione cellulare.

FGF

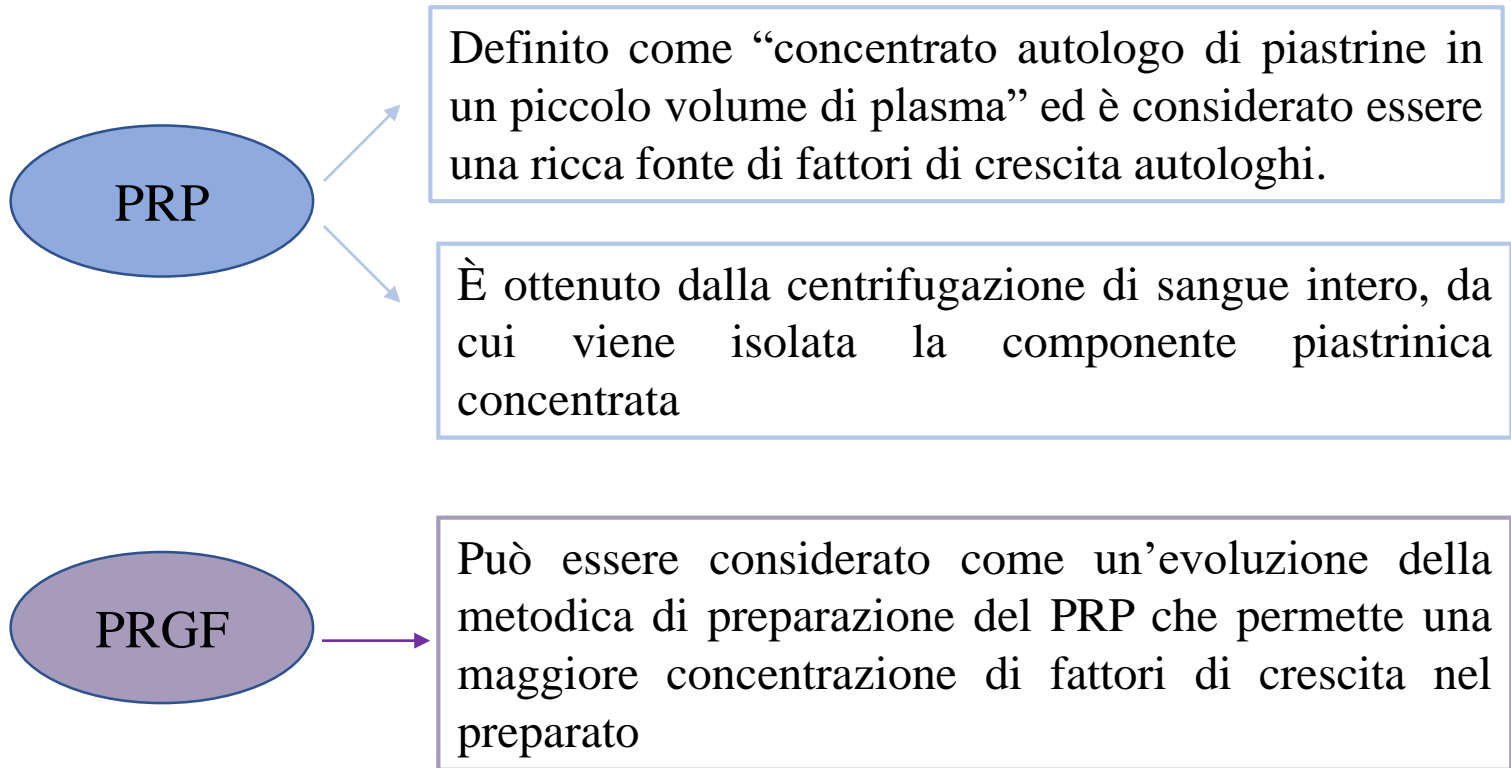
Citochina coinvolta nel processo di rimodellamento osseo, nel mantenimento del delicato equilibrio tra la formazione e il riassorbimento di cellule ossee e nello sviluppo di nuovi vasi sanguigni.

VEGF

Potente fattore angiogenico che svolge un ruolo importante nella regolazione dell'interazione tra angiogenesi e osteogenesi e regola la vascolarizzazione attraverso reclutamento di cellule endoteliali al sito del danno.

Concentrati piastrinici

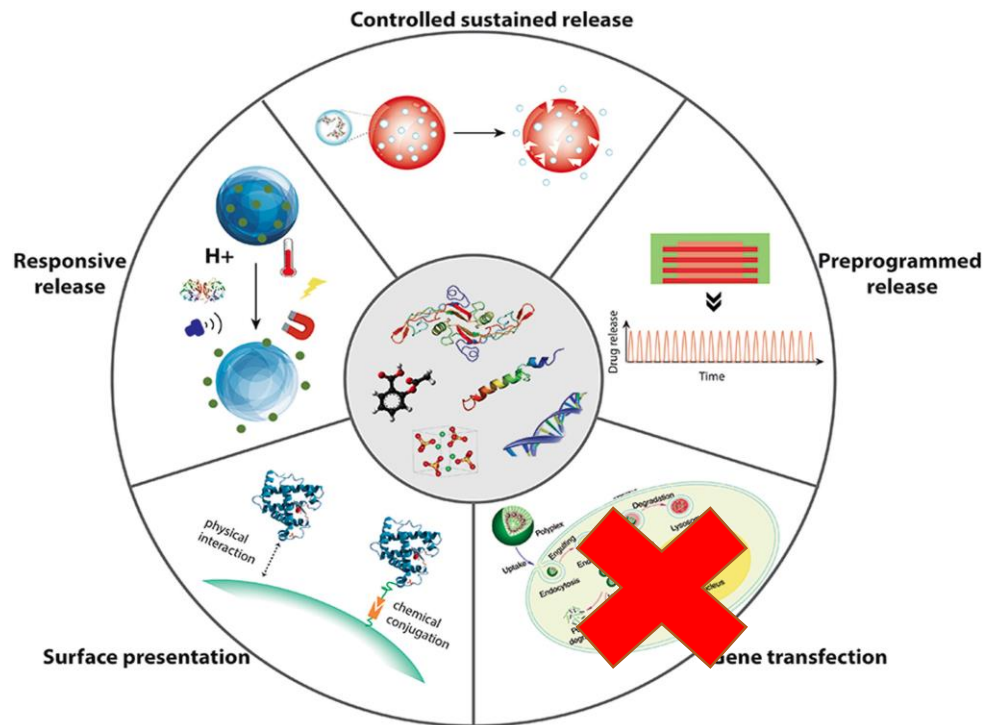
Invece di produrre i fattori di crescita in laboratorio, essi vengono isolati direttamente dal sangue attraverso un concentrato piastrinico e poi vengono forniti al tessuto malato al fine di promuoverne la guarigione. Un esempio sono:



Delivery Systems

Strategie bio-mimetiche di rilascio sono state studiate per rilasciare simultaneamente o in successione vari fattori di crescita e biomolecole per aumentarne l'effetto e mimare il processo naturale di rigenerazione del tessuto osseo.

Alcuni sistemi di rilascio richiedono stimoli esterni, es: pH, temperatura, ultrasuoni ecc..



Varie tecniche di rilascio e trasporto delle biomolecole.
Molecole diverse richiedono sistemi di rilascio diversi.

Surface Presentation

Posizionamento delle molecole bioattive sulla superficie dello scaffold in modo tale da renderle disponibili per entrare in contatto con le cellule che migrano nello scaffold stesso e agire quindi come un segnale biologico localizzato per regolare il comportamento cellulare.

I due metodi per posizionare queste molecole sulla superficie dello scaffold sono:

Assorbimento fisico

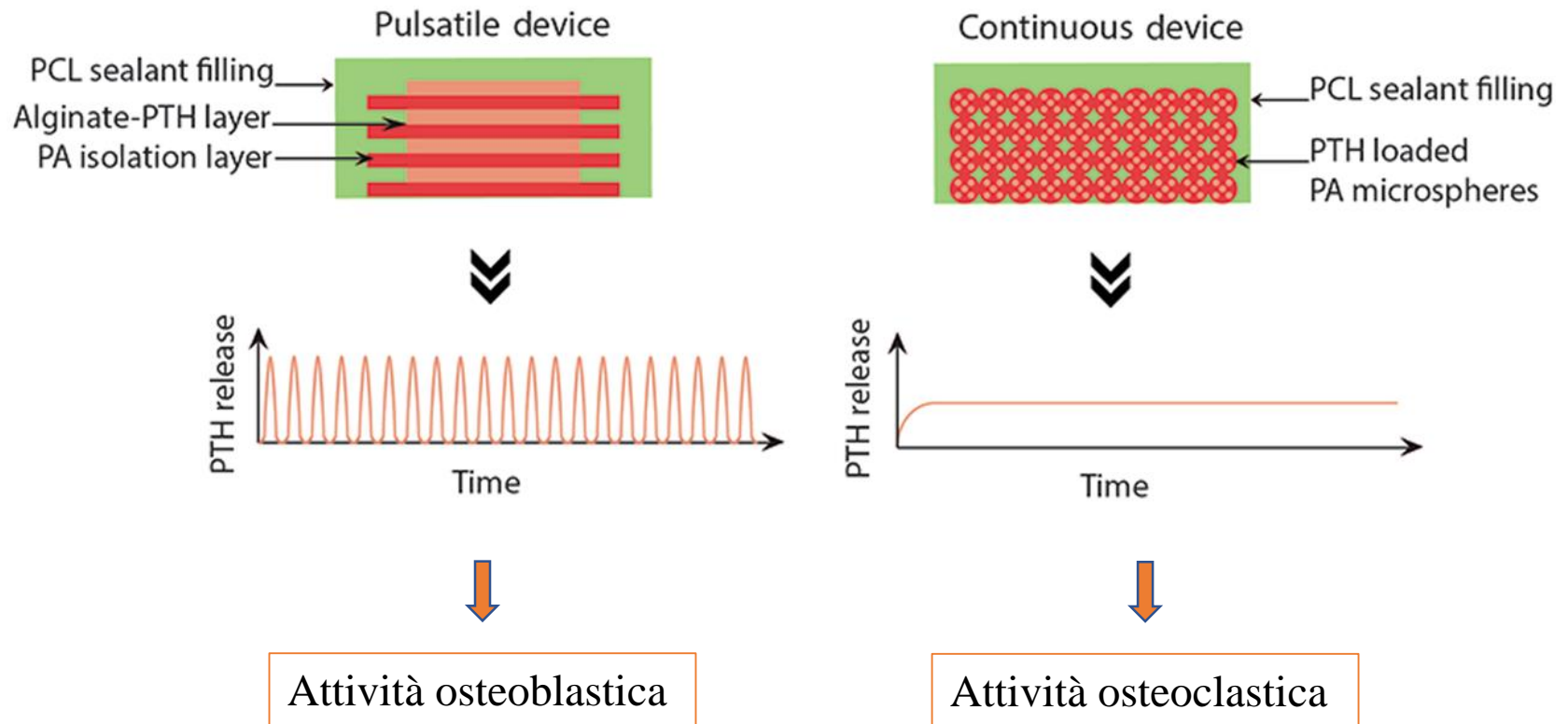
Interazione fisica debole tra lo scaffold e molecole.
Può essere utilizzata eparina sulla superficie per migliorare il legame con i GF.

Coniugazione chimica

Tramite legami covalenti stabili.
La superficie dello scaffold deve essere modificata e attivata tramite dei gruppi funzionali qualora il materiale non includa tali gruppi.
Esistono vari metodi per attivare la superficie (es: coating superficiale, plasma treatment).
Deve essere posta attenzione a mantenere l'integrità dello scaffold e la funzionalità nella biomolecola.

Rilascio controllato e pre-programmato

Il metodo più comune in BTE è l'incapsulamento della biomolecola nello scaffold o tramite l'utilizzo di nanoparticelle. Il rilascio è controllato dalla degradazione della matrice polimerica e dal coefficiente di diffusione della molecola.



Responsive release

Sono sempre più utilizzati sistemi biomolecolari-sensibili basati sul rilascio di molecole indotto da stimoli dell'ambiente cellulare o stimoli esterni.

Questo sistema richiede materiali intelligenti ingegnerizzati.

Applicazione:

È stato sviluppato un idrogel a base di polietilenglicolico (PEG) con incorporato un reticolante sensibile alla metalloproteasi MMP (una proteasi espressa dalle cellule nell'angiogenesi e nell'invasione cellulare) per rilasciare localmente BMP.

Le BMP si trovano sotto forma di precipitato nella matrice in PEG e vengono rilasciate solo dopo l'esposizione alla proteasi.

Qualche giorno dopo l'impianto dello scaffold nel sito voluto le cellule invadono la matrice di idrogel con conseguente secrezione di MMP e degradazione della rete in PEG; in questo modo BMP presente all'interno viene rilasciato permettendo una rigenerazione ossea efficiente.

Dang et al. 2018 [16]

Segnali insolubili

Segnali fisici e meccanici possono regolare la funzione delle cellule ossee, influenzare le proprietà e la struttura della ECM e condizionare la rigenerazione ossea. Tra questi rientrano:

Stimoli meccanici

Favorire e accelerare la deposizione di nuova matrice extracellulare e quindi garantire una migliore funzionalità dello scaffold;

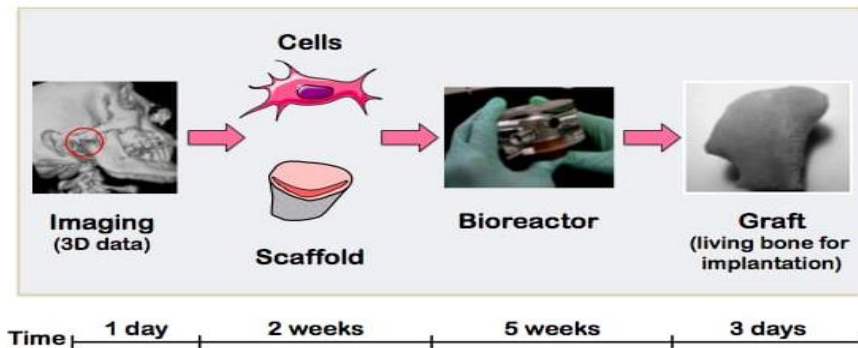
Modulo elastico

Deve essere di **almeno 25kPa**, [20], per indurre differenziazione osteogenica. Se il modulo elastico è basso si avrà una differenziazione neurogenica o miogenica delle cellule mesenchimali staminali.

Le tecniche di coltura standard in vitro non sono efficaci per riprodurre le condizioni dinamiche ambientali ed è quindi necessario utilizzare sistemi dinamici, ovvero **bioreattori** che **forniscono le corrette condizioni ambientali e meccaniche**.

Bioreattori

Legge di Wolff: «*Il rimodellamento osseo è un processo continuo di adattamento strutturale dell'osso alle sollecitazioni provenienti dall'esterno*».



Continuo apporto di nutrienti, ossigeno e GF e rimozione metaboliti



Corretta stimolazione fisica e meccanica delle cellule



Mantenimento del pH tra 7.2 e 7.4



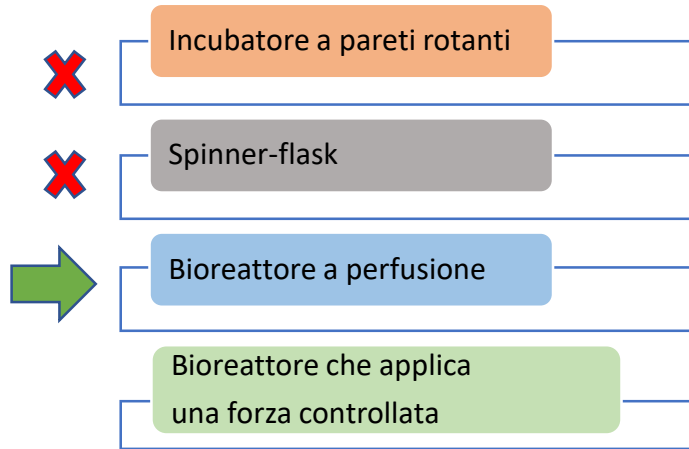
Mantenimento condizioni asettiche



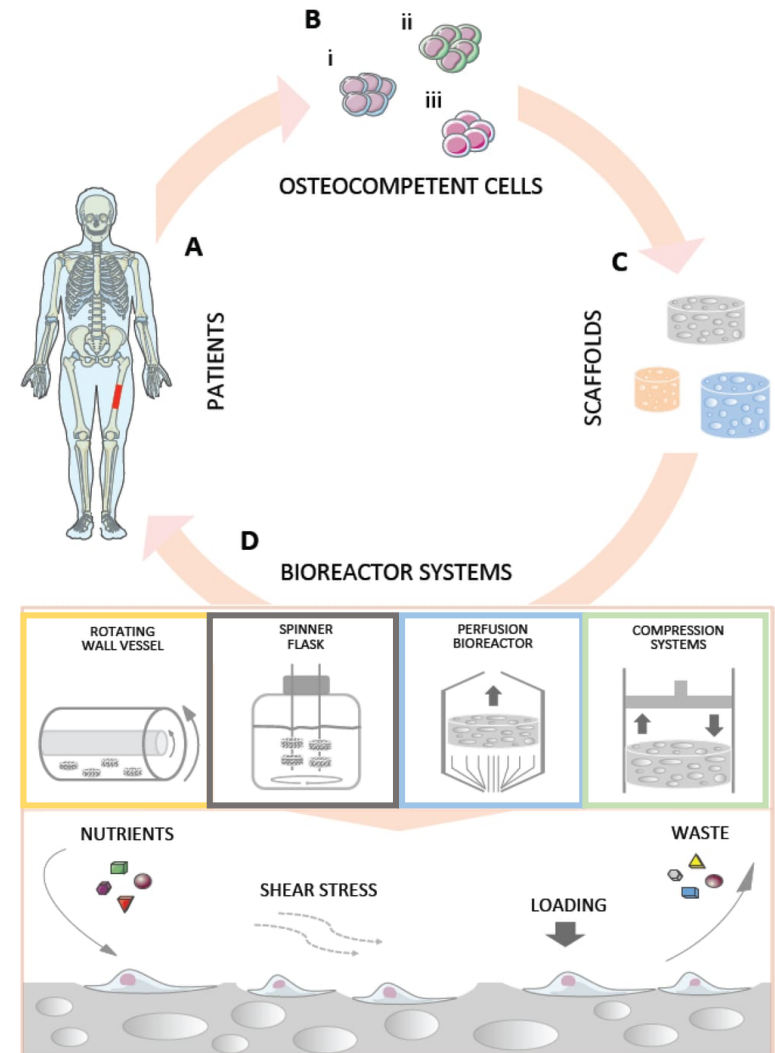
Monitoraggio costante

Bioreattori specifici per la rigenerazione ossea

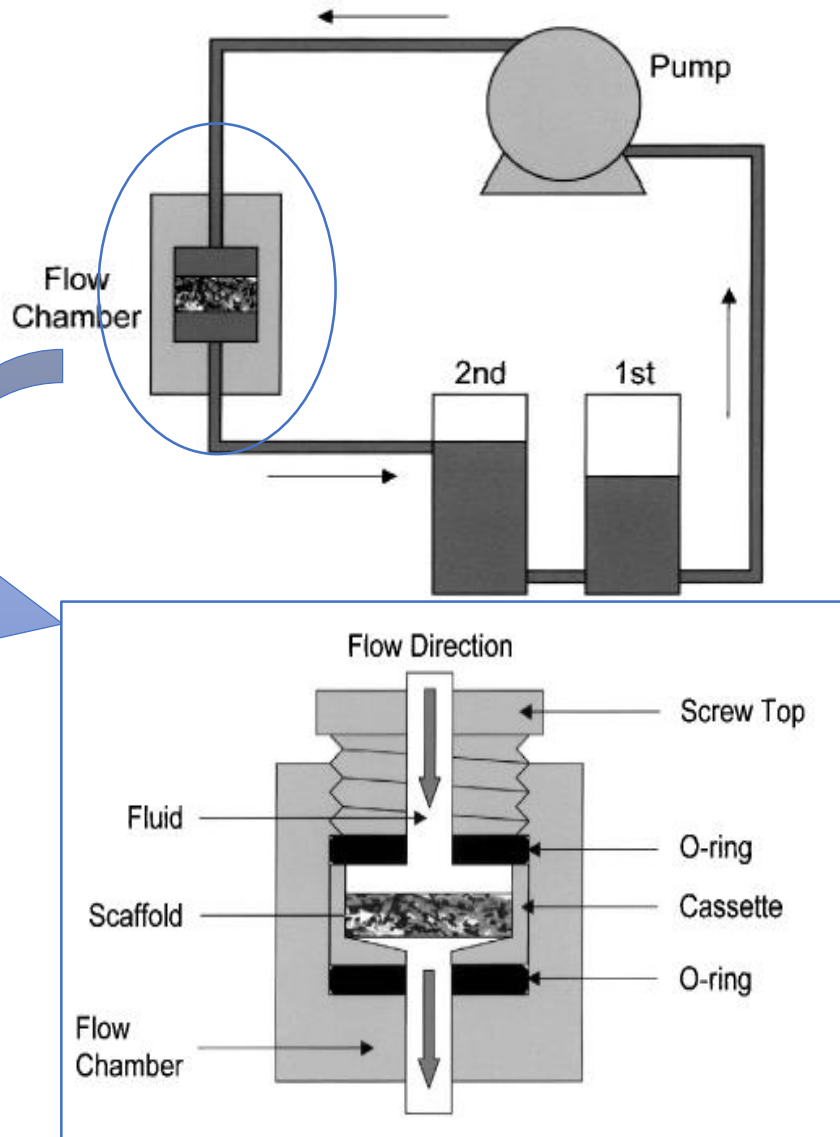
Esistono vari tipi di bioreattori utilizzati nel campo della BTE:



I bioreattori a perfusione sono molto diffusi in BTE perché superano i limiti presentati dagli altri permettendo al terreno di coltura di essere spinto continuamente all'interno dello scaffold sfruttando il suo network poroso e l'interconnettività dei pori.



Flow Perfusion Bioreactor

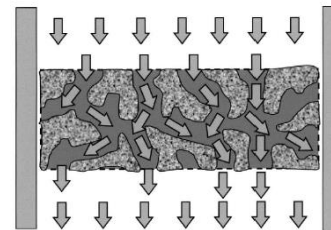


Lo scaffold è mantenuto fermo in una piccola camera realizzata in Plexiglass tra due anelli generalmente in neoprene bloccati da un tappo avvitabile. Una pompa genera un flusso che penetra dall'alto verso il basso attraverso lo scaffold. Il mezzo di coltura è quindi forzato a diffondere attraverso la struttura porosa dello scaffold.

Il rate di diffusione è controllabile:



Variando il rate variamo lo shear stress ricevuto dalle cellule.



Bancroft et al. 2003. [8]

Manipolazione magnetica della catena di segnale Wnt

Remote regulation of magnetic particle targeted Wnt signaling for bone tissue engineering

Michael Rotherham, PhD^{a,*}, James R. Henstock, PhD^{a,1}, Omar Qutachi, PhD^b,
Alicia J. El Haj, PhD^a

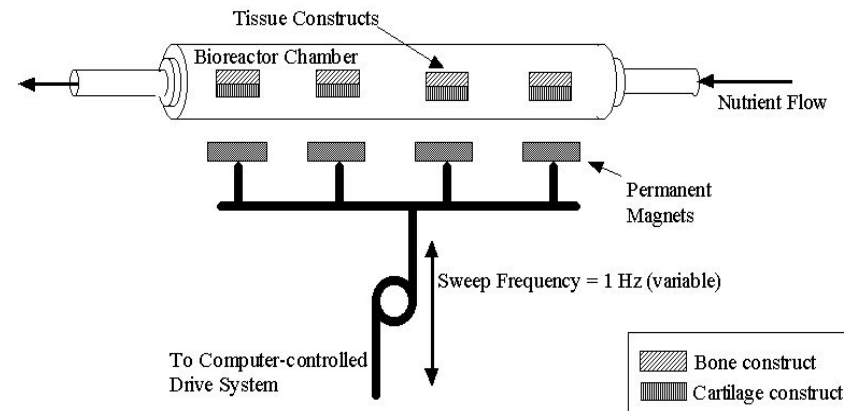
^aInstitute for Science and Technology in Medicine, Keele University, Stoke-on-Trent, UK

^bSchool of Pharmacy, University of Nottingham, Nottingham, UK

Received 8 April 2017; accepted 15 September 2017

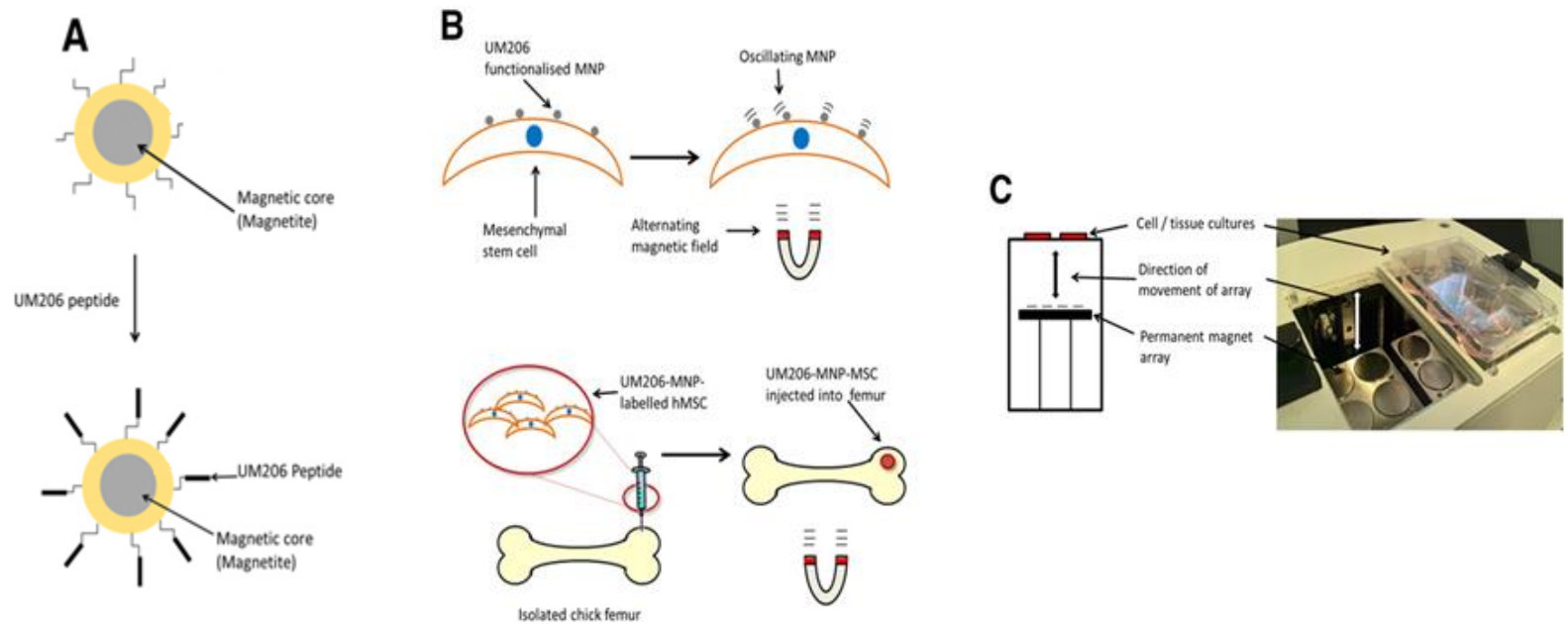
La Wnt è una glicoproteina che, dopo essersi legata a dei recettori specifici detti Frizzled innesca una via di segnalazione che permette la differenziazione di MSC in osteoblasti. Purtroppo, la Wnt è molto difficile da produrre ed i costi di realizzazione risultano eccessivi. Tuttavia, questa via segnalatrice può essere attivata in modo analogo anche da un peptide sintetico chiamato UM206 che sotto certe condizioni sostituisce analogamente la Wnt.

È attualmente in studio, l'uso di peptidi sintetici in collaborazione con nanoparticelle magnetiche (MNP) per attivare in modo meccanico, da remoto, la catena di segnali e regolare la formazione di nuovo tessuto osseo. La stimolazione magnetica può avvenire in un bioreattore a forza magnetica oscillante.



Bioreattore a forza magnetica oscillante

Illustrazione del processo:



A Nanoparticelle magnetiche (MNP) con il peptide UM206 legato covalentemente sulla superficie.

B Le MSC marcate con MNP per mezzo di UM206 possono essere stimulate da un campo magnetico oscillante in vitro oppure essere iniettate nell'osso o nello scaffold prima della stimolazione.

C Il campo magnetico variabile può essere applicato usando un bioreattore

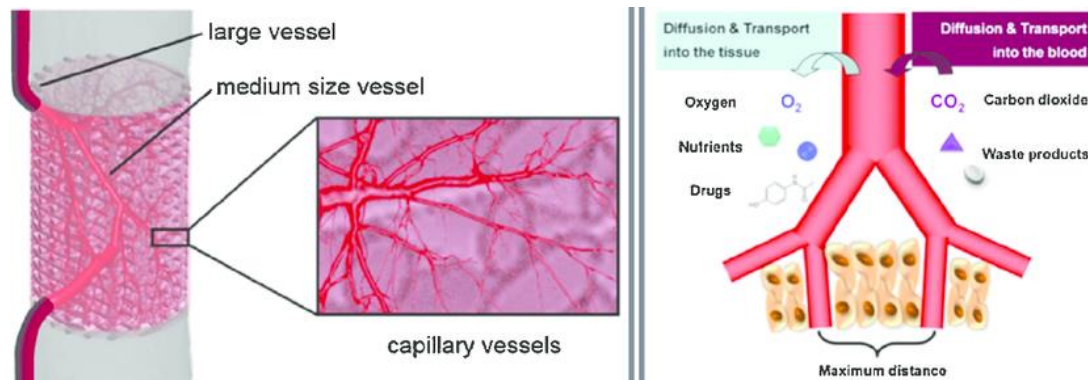
Vascolarizzazione

La formazione di tessuto osseo avviene principalmente nelle zone più vascolarizzate. *Amini et al.* [17] hanno dimostrato che un avanzamento di vasi sanguigni pari a 0.4-0.6 mm/day è ottimale.

In vitro la diffusione di nutrienti può essere facilitata dal bioreattore, ma in vivo questo non può accadere ed occorre che la rete vascolare sia ben espansa ed efficiente.



Introduzione di fattori di crescita angiogenici all'interno dello scaffold come il VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) nella giusta quantità per favorire la creazione di vasi sanguigni ma senza amplificare eventuali futuri fenomeni emorragici.



Indice di corretta guarigione

Due delle principali componenti minerali dell'osso sono calcio e fosforo. I metodi di rilevazione delle concentrazioni di queste componenti possono essere:

- **Invasivi** (biopsie);
- **Non invasivi** (spettroscopie).

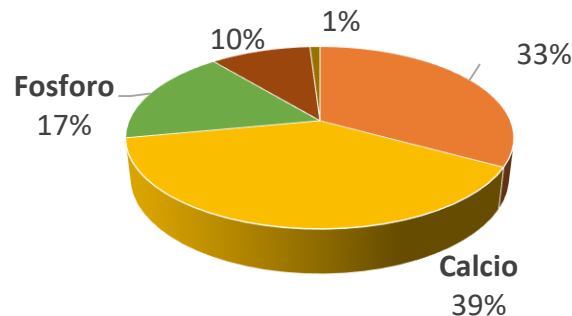
Un indice di valutazione che può essere utilizzato per determinare un'adequata guarigione è il **rapporto Calcio-Fosforo**.

Eseguendo un'analisi dell'osso nella zona rigenerata e nella zona adiacente sana, se

$$\frac{[Ca]}{[P]}_{sana} \approx \frac{[Ca]}{[P]}_{rigenerata}$$

allora il processo di guarigione è avvenuto correttamente.

Principali componenti
dell'osso



- Componente organica
- Calcio
- Fosforo
- Carbonato
- Altri componenti

Applicazioni BTE nella cura dei tumori

A 3D-printed scaffold with MoS₂ nanosheets for tumor therapy and tissue regeneration

Xiaocheng Wang^{1,2,4}, Tao Li^{3,4}, Hongshi Ma¹, Dong Zhai¹, Chuan Jiang³, Jiang Chang¹, Jinwu Wang³

NPG Asia Materials (2017) 9, e376; doi:10.1038/am.2017.47; published online 21 April 2017

La cura dei tumori maligni ossei prevede una combinazione di terapie chirurgiche, chemioterapiche e radioterapiche con esiti a volte devastanti

Tumori come l'osteosarcoma sono fortemente associati ad alti rischi di recidiva localizzata

Scaffold ceramico con nanofibre di Solfuro di Molibdeno contenente AKT

Semina di cellule tumorali Saos-2 (osteosarcoma) e cellule MDA-MB-231 (linea tumorale di cancro al seno) sullo scaffold

Coltivazione in vitro

Impianto in vivo su topi e conigli

Esposizione del sito a NIR per vari tempi (1-20 min.) e determinate intensità ($0.1-0.8 \frac{W}{cm^2}$)

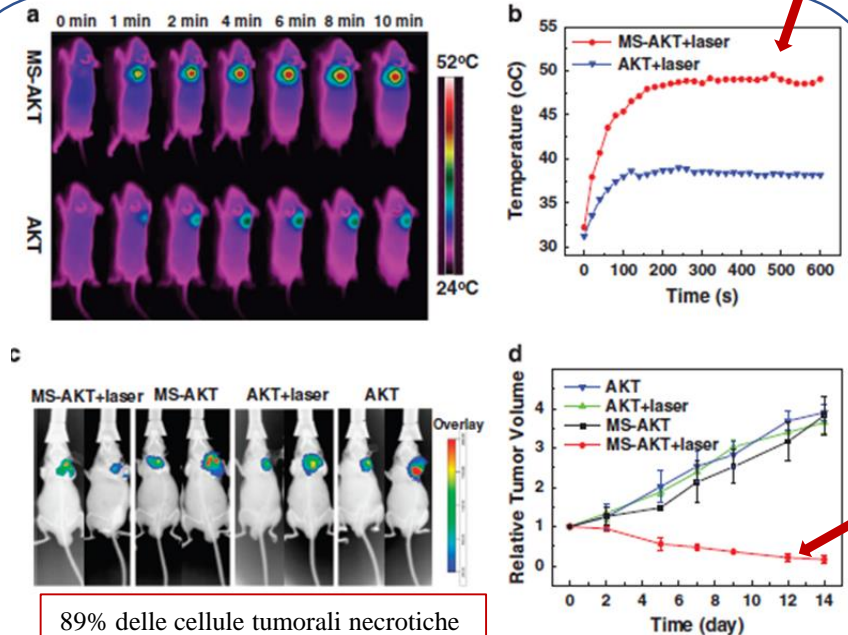
Elevato aumento altamente localizzato di temperatura

Risultati in vitro

3 riscaldamenti consecutivi diminuivano la vitalità cellulare delle cellule tumorali fino al 5% del valore iniziale danneggiando molto più limitatamente le cellule sane, permettendo così la rigenerazione ossea. [18]



Risultati in vivo



89% delle cellule tumorali necrotiche

Sperimentazione clinica

Morishita et al.[21]: Semina di MSCs su scaffold in HA ed inserimento in bioreattore per 6 settimane



Impianto dello scaffold in porzioni difettose tibiali di 2 pazienti femmine e femorali di un maschio

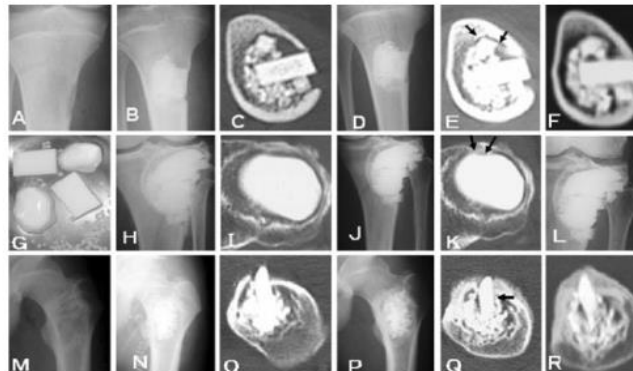


Follow up costante rispettivamente di 43, 40 e 29 settimane



Ripresa delle attività di carico rispettivamente dopo 2,3 e 2 settimane. Scaffold ben osteointegrato dopo 3 mesi e nuova formazione di tessuto osseo sano dopo 4 mesi

Paziente 1



Paziente 2



Paziente 3



Case	Age	Sex	Disease	Location
No. 1	11	F	Aneu. bone	Tibia
No. 2	60	F	Giant cell	Tibia
No. 3	14	M	Fibrous dys.	Femur

To the patients

Limiti e problemi della BTE



Costi eccessivi di realizzazione sperimentale

Lunghi tempi di approvazione pre-marketing

Difficoltà di vascolarizzazione ed integrazione ossea

Forte risposta immunitaria

Necessità di sperimentazione animale prima dell'impianto nell'uomo

Difficoltà di estrapolazione dei risultati in vitro sui modelli in vivo

Qualità e funzionalità dell'osso rigenerato non sempre ottimale

Procedure di realizzazione non idonee a porzioni ossee di grandi dimensioni

Difficoltà nell'ottenere graft impiantabili in tempi brevi

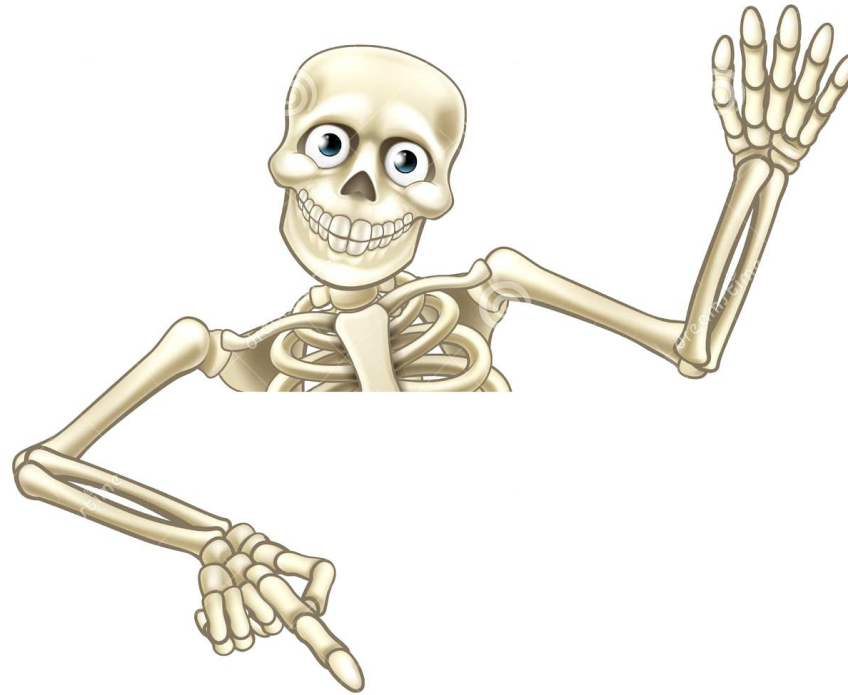
Conclusioni e prospettive future

La BTE è un campo di indagine che offre innumerevoli vantaggi e potenzialità dal punto di vista clinico, tuttavia ad oggi non sono ancora stati effettuati sufficienti esperimenti sull'uomo che possano validarne l'efficacia assoluta e la sicurezza.

Bibliografia

- [1] *Liu, Xiaohua; MA, Peter X. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. Annals of biomedical engineering, 2004, 32.3: 477-486.*
- [2] *Guarino V. (2006). Materiali e Tecnologie per la realizzazione di sostituti ossei per l'ingegneria dei tessuti (Doctoral dissertation, Università degli Studi di Napoli Federico II).*
- [3] *Salgado, A. J., Coutinho, O. P., & Reis, R. L. (2004). Bone tissue engineering: state of the art and future trends. Macromolecular bioscience, 4(8), 743-765.*
- [4] *Black, C. R., Goriainov, V., Gibbs, D., Kanczler, J., Tare, R. S., & Oreffo, R. O. (2015). Bone tissue engineering. Current molecular biology reports, 1(3), 132-140.*
- [5] *Rose, F. R., & Oreffo, R. O. (2002). Bone tissue engineering: hope vs hype. Biochemical and biophysical research communications, 292(1), 1-7.*
- [6] *Crane, G. M., Ishaug, S. L., & Mikos, A. G. (2005). Bone tissue engineering. Nature Medicine, 1(12), 1322.*
- [7] *Chen, G., Ushida, T., & Tateishi, T. (2002). Scaffold design for tissue engineering. Macromolecular Bioscience, 2(2), 67-77.*
- [8] *Bancroft, Gregory N., Vassilios I. Sikavitsas, and Antonios G. Mikos. "Design of a flow perfusion bioreactor system for bone tissue-engineering applications." Tissue engineering 9.3 (2003): 549-554.*
- [9] *Rezwan, K., Chen, Q. Z., Blaker, J. J., & Boccaccini, A. R. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials, 27(18), 3413-3431.*
- [10] *Carvalho, M. S., Poundarik, A. A., Cabral, J. M., da Silva, C. L., & Vashishth, D. (2018). Biomimetic matrices for rapidly forming mineralized bone tissue based on stem cell-mediated osteogenesis. Scientific reports, 8*

- [11] *Burg, K. J., Porter, S., & Kellam, J. F. (2000). Biomaterial developments for bone tissue engineering. Biomaterials, 21(23), 2347-2359.*
- [12] *Hashemi-Beni, B., Khoroushi, M., Foroughi, R., Karbasi, S., & Khademi, A. (2017). Tissue engineering: dentin–pulp complex regeneration approaches (a review). Tissue and Cell.*
- [13] *Kawashima, N., & Okiji, T. (2016). Odontoblasts: Specialized hard-tissue-forming cells in the dentin-pulp complex. Congenital anomalies, 56(4), 144-153.*
- [14] *Burg, K. J., Porter, S., & Kellam, J. F. (2000). Biomaterial developments for bone tissue engineering. Biomaterials, 21(23), 2347-2359.*
- [15] *Rotherham, M., Henstock, J. R., Qutachi, O., & El Haj, A. J. (2018). Remote regulation of magnetic particle targeted Wnt signaling for bone tissue engineering. Nanomedicine. Nanotechnology, Biology and Medicine, 14(1), 173-184.*
- [16] *Dang, M., Saunders, L., Niu, X., Fan, Y., & Ma, P. X. (2018). Biomimetic delivery of signals for bone tissue engineering. Bone research, 6.*
- [17] *Amini, A. R., Laurencin, C. T., & Nukavarapu, S. P. (2012). Bone tissue engineering: recent advances and challenges. Critical Reviews™ in Biomedical Engineering, 40(5).*
- [18] *Wang X., Li T., Ma H., Zhai D., Jiang C., Chang J., Wang J., Wu C. (2017). A 3D-Printed Scaffold with MoS2 Nanosheets for Tumor therapy and Tissue Regeneration.*
- [19] *Dang M., Koh A., Jind X., McCauley L. and Ma.(2017). Local pulsatile PTH delivery regenerates bone defect via enhanced bone remodeling in a cell-free scaffold. Published in final edited form as: Biomaterials. 2017 January ; 114: 1–9. doi:10.1016*
- [20] *A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney and D. E. Discher. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. Cell 126, 677–689, August 25, 2006*



Grazie per l'attenzione!