



Centro Stampa

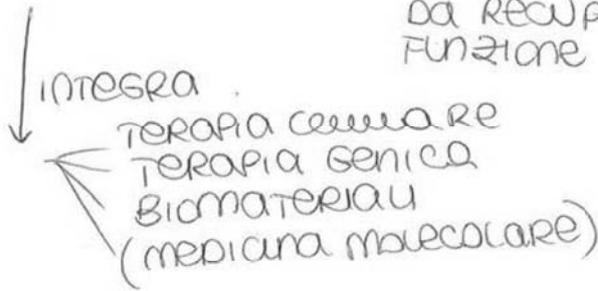
ATTENZIONE QUESTI APPUNTI SONO OPERA DI STUDENTI , NON SONO STATI VISIONATI DAL DOCENTE. IL NOME DEL PROFESSORE, SERVE SOLO PER IDENTIFICARE IL CORSO.

N°1001

**MEDICINA RIGENATIVA
TEORIA TEMI ESAME**

DI BETTALE VALENTINA

Medicina RIGENERATIVA = SOSTITUISCE O RIGENERA LE CELLULE, I TESSUTI E GLI ORGANI UMANI, IN MODO DA RECUPERARNE LA NORMALE FUNZIONE



Cellule umane

- somatiche specializzate
- staminali adulte CSA (MULTI P)^{AUTO}
- derivate da staminali embrionali CSE (TOTIP etero)
- somatiche riprogrammate e inotte alla pluripotenza ips (PurIP auto)

Cellule Staminali

alternative al T.E

- autotrapianto
- allotrapianto
- xeno trapianto
- protesi
- trapianto di organi

Ingegneria dei Tessuti = CAMPO MULTIDISCIPLINARE che applica i principi dell'ingegneria dei tessuti e delle scienze della vita x la realizzazione di sostituti biologici che ripristinano o migliorano le funzioni di tessuti o organi

Produzione di tessuto grazie alla crescita di cellule in scaffold porosi e assorbenti

- Fonti di cellule
- Angiogenesi
- Innervazione
- Validazione e inserimento nel mercato
- Caratt. meccaniche
- Integrazione chirurgica
- Infiammazione



Scaffold = Impalcatura x mantenere nella giusta posizione le cellule

- Biodegradabile
- Attivo
- con cellule
- Comunicante
- Adesione e proliferazione cellule
- Formazione tessuto
- Struttura 3D porosa
- Prop. meccaniche
- Biodegradabilità
- Biocompatibilità
- Chimica superficiale
- Facoltà di adesione e migrazione

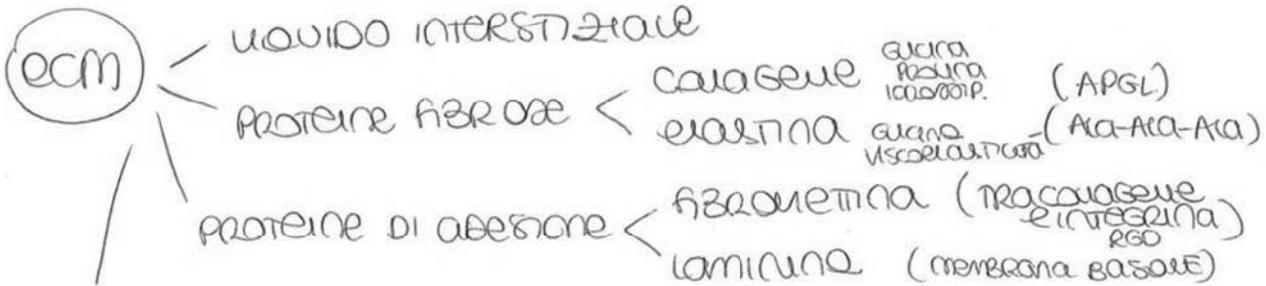


4 approcci

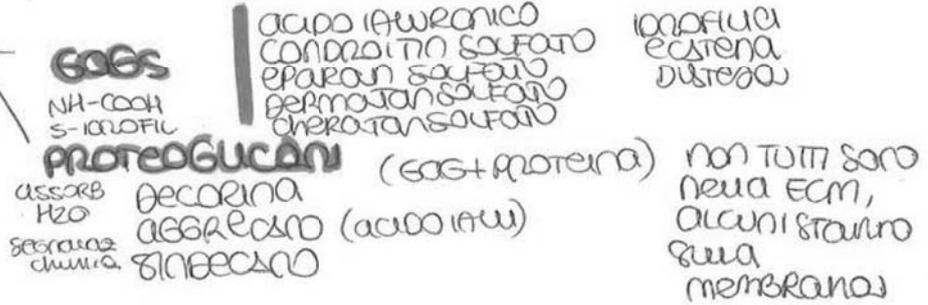
- Scaffold senza cellule
- Scaffold con cellule e coltivo fino al completo sviluppo del tessuto
- Scaffold con cellule e impianto (aumento adesione)
- Scaffold con cellule, coltivo e poi impianto

Materiali x Scaffold

- Sintetici < organici - polimeri
inorganici - ceramiche
 - Naturali < organici - polimeri
inorganici
- Compositi e **Bioartificiali**
(anche x semplice funzionalità)



eteropolisaccaridi



Interazioni ECM-Cell

- **Integrine** = recettori di adesione cellulare
 - **αβ** glicoproteine
 - 2^{me} • Ca²⁺, Mg²⁺
 - Actina-Talina-Integrina-fibronektina-collagene
 - Attacco/spreading/adesioni focali/prolungamenti
 - Cell-cell < risposta infiammatoria
 - Riconoscimento specifiche sequenze
 - Sindecano / CD44 e RHAMM / Trombospondina
- RGD**
REDV NO PT
DGEA SI PT

Interazioni cell-cell

- Recettori CAMs (Glicoproteine transmembranae)

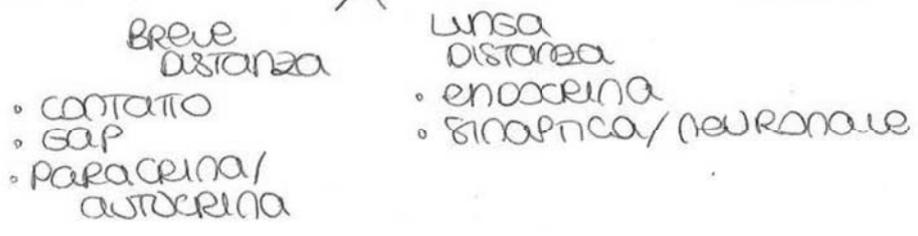
- Cadherine < ^{Ca²⁺} _{NC}: act-act
- Selectine
- Immunoglobuline (Integrine)

- Giunzioni

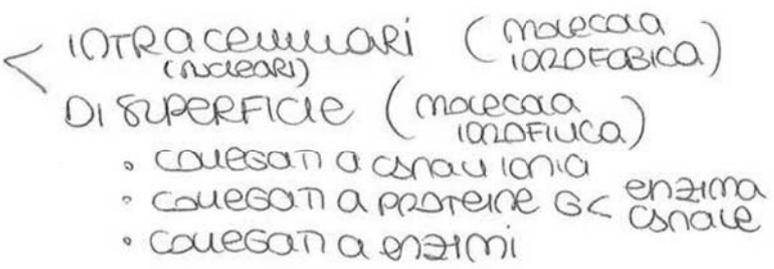


Interazioni cell-molecole segnalazione

- Proteine
- AA
- Derivati acidi grassi
- Gas disciolti CO/NO



Recettori



Impo molecole di segnalazione sono



= polipeptidi rilasciati dalle cellule
 Basse concentrazioni
 Locali - non selettivi
 Recettori di membrana di tirosina chinasi (RTK) che auto-fosforilano residui di tirosina (con attività enzimatica)

- IGF - FGF - TGF - BMP - NGF

TERAPIE GF =

- sistemi rilascio di GF (funzionauzzi scaffold)
 - terapia cellulare
 - terapia genica
- PROBLEMI
- dosi, [GF]
 - no selettività
 - vita breve
 - somministrazione locale
 - stabilità fisico-chimica

VASCOLARIZZAZIONE

(RECEPTORI = VEGF-R₁)
FGF

- VASCULOGENESI DA EMBRIONE / ANGIOBLASTI / PROGENITRICE ENDOTEL
- ARTERIOGENESI DA ARTERIA ASSOLA A BIG
- ANGIOGENESI V RAMIFICAZIONE VASI ESISTENTI

Stimoli < $\begin{matrix} \text{terroto ischemico} \\ \text{stimolo ipertonico} \end{matrix}$ (LANTANE)

CITOSCHELETRO = NETWORK DI FIBRE PROTEICHE

- actina : + Piccola su membrana, 1 unita
Riarrangiamento, funzioni
- microtubuli : + Grandi, da centrosoma, 2 unita α e β
Riarrangiamento
- Filamenti intermedi : Diversi
Stabili
Polipeptidici
Funzioni

MIGRAZIONE CELLULARE

- Gastrulazione
- Paruloste
- Rimovimento tessuti
- Rigenerazione tessuti
- Infiammazione
- Cancro
- Riparazione tessuti

mesenchimale : prevedibile, organizzata, si integra
 • Polarizzazione cell
 • Protrusione direzionale
 • Adesioni focali + appostamento
 • Motone actina + polariz e rilascio post.

ameboida : non specifica, serrice, no integrina
 vesciche + pressione

colettiva : richiami chimici e strutturali
 funzioni cell-cell + actina

CIL = inibizione della mobilita x contatto < $\begin{matrix} \text{ridirezionam.} \\ \text{adesione fogueto} \end{matrix}$

materiale =
polimeri

DEGRADABILITÀ

BIOSTABILITÀ
BIOPERTI

vs

BIODEGRADAZIONE
BIOPERTI (gruppi x enzimi)
BIODISSOLUBILI (PRODOTTI)

- Velocità di degradazione appropriata x ^{RISERVA TESSUTO} infiammazione x PRODOTTI

INFLUENZATA DA:
 composizione chimica, PM, PULVERIZZABILITÀ
 MORFOLOGIA (CRIST), SITO IMPIANTO, FORMA,
 DIMENSIONE, TIPO DEGRADAZIONE
 GRUPPI < IONOFILI PEG, esteri -O-, $\begin{matrix} O \\ || \\ C-N \\ | \\ S \end{matrix}$, $\begin{matrix} O \\ || \\ C-N \\ | \\ S \end{matrix}$
 IONOFILI PCL CH₂-CH₃

MODALITÀ < omogenea, omogenea ← (PA) IONOFILI, film
 eterogenea, superficiale IONOFILI, fibra, enzimi

MECCANISMI

- IDROLISI: poliesteri, poliammide, policarbonati, poluretani
(PCL) (PRODOTTO ACIDO + ALCOOL)
- OSSIDAZIONE: DIRETTA DALL'OSPITE (x infiammazione)
(PEG) PRODOTTA DA IONI METALLICI DA CORROSIONE
AMBIENTE ESTERNO (RAGGI UV)
- ENZIMATICA: IDROLISI - ESTERASI
(SUPERFICIALE) - PROTEASI
(VELOCE) - COLAGENASI "APGL + PEG + APGL"
(LOCALIZZ) - ELASTASI AAAA
INCLUDERE SEQUENZE ATTACCHATE DA ENZIMI

- MECCANISMI
- I separazione in frammenti uncinati reticolati
 - II sostituzione gruppi laterali da idrofili a idrofili
 - III da oligomeri a monomeri

CHE POLIMERI? < COLAGENE, GELATINA, CHITINA, CHITOSANO,
 ACIDO IALURONICO
 PUA, PGA, **PLA**, PCL, PHA, PLGA
 PEG $\begin{matrix} O \\ || \\ NH-C-O \end{matrix}$

PU

- HARD + SOFT = elastomerici

PROGETTAZIONE SCAFFOLD

Modello = ECM Naturale → approccio Biomimetico

↳ monocomponenti
multicomponenti



- ARCHITETTURA = STRUTTURA FIBRILLARE
 PROTEINE FIBROSE < collageno elastina
 - ELETTROSPINNING
 - TIPS → POLYMER NETWORK
 - PEPTIDI ANFIFILI
 AUTORASSEMBLANTI (Rise, Osea)

- CONTENERE H₂O = LIQUIDO INTERSTIZIALE
 IDROGELI POLIMERICI < FISICI
 CHIMICI

- COMPOSIZIONE < PROTEINE
 ETEROPOLISACCARIDI
 MATERIALI CON LEGANDI INSERIBILI FUNZIONALIZZATI O CON SCAFFOLD
 CON LEGANDI

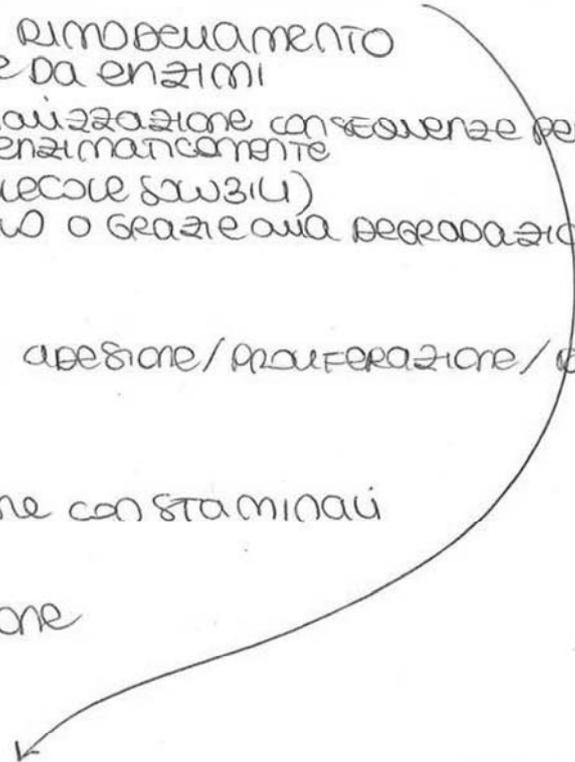
- DEGRADAZIONE E RIMODELLAMENTO
 DALE CELLULE E DA ENZIMI
 SERVE ALLA FUNZIONALIZZAZIONE CON SEQUENZE PEPTIDICHE
 DEGRADABILI ENZIMATICAMENTE

- RILASCIO GF (MOLECOLE SOLUBILI)
 X EFFETTO DIFFUSIVO O GRAZIE ALLA DEGRADAZIONE

- P. MECCANICHE
 INFLUENZANO ADESIONE / PROLIFERAZIONE / DIFFERENZIAMENTO

- MORFOGENESI
 RIGENERAZIONE CON STAMINALI

- VASCOLARIZZAZIONE



- SERVE X ADESIONE CON LE INTEGRINE X LA CELLULA NON VALE
 IN APOPTOSI → SCEGLIERE LA GIUSTA SEQUENZA AA = TIPO DI LEGANDO
 • C'È SEMPRE UN RESTO DI ACIDO ASPARTICO O GLUTAMMICO → (D⁺)
 • SERVONO Ca²⁺ ANIONICAMENTE
 • ESEMPIO RGD



POI BISOGNA ANALIZZARE LA FUNZIONALITÀ

analisi

QUALITATIVA

- presenza
- TEST INGAO DI CONTATTO
- ANALISI INFRAROSSO

QUANTITATIVE

- QUANTO NE È RIMASTO
- SASSIO COLORIMETRICO

SI VALUTANO:

TEST CELLULARI IN VITRO

- adesione cellulare (1-4h)
- SPREADING "
- RIORGANIZZAZIONE CITOSCHELETRO
- FORMAZIONE ADERENZE FOCALI
- PROLIFERAZIONE
- MORTALITÀ

analisi al MICROSCOPIO OTICO
 Tecniche Microscopiche
 SEM
 MAFW

esempio: RGD (valutare specificità legame)

CONTROLLI: NEGATIVI

- NO RGD
- RGE/RAD } peptide non attivo
- RGD
- mancanza integrina

CONTROLLARE:

- attività peptide → giusta conformazione con ammina di attaccamento
 - specificità → dipende da conformazione
 - accessibilità → spacer x esporsi (13 giorni)
 - densità →  + cellule aderite se + densità
 - distribuzione → meglio in cluster serve x la migrazione cell (gradiente x una direzione)
 - preservazione caratteristiche
- ↓
 Strategie on-folding con PEG
- Dipende dal peptide ≠ 
 si muovono verso ↑ densità ma ↓ produzione ECM

altre RGD, KRAGDV
 CRRETAWAC
 RPDV, LQV
 DGEA

X RECEPTORI
 non INTEGRINICI
 (PROTEOGUCANICI)

{
 laminina
 YIGSR
 IKVAV
 αBASI
 GWCOFID



COMPOSIZIONE e FUNZIONALITÀ SCAFFOLD

- PROTEINE

ECM

- COLLAGENE Da RETICOLARE x materiale BASE (costa) sequenze RGD
- GELATINA Da RETICOLARE x materiale BASE Denaturazione ACIDA / BASICA del COLLAGENE
- FIBRONECTINA Molecola di funz x adesione attiva - Integrina - COLLAGENE
- ELASTINA Insolubile \Rightarrow NO BASE PEPTIDI DERIVATI x FUNZIONALIZZARE
- FIBRINA Da FIBRINOGENO + TRAMBINA x COAGULO adesivo BIOCOMPATIBILE, IDEALE x RILASCIO FARMACI
- LAMININA Molecola x FUNZIONALIZZAZIONE
- VITRONECTINA // //
- KERATINA Sequenza LQV x adesione CELL x INTEGRINE
- SETA Guanina-alanina (beta sheet anti //) RESISTENTE e FLESSIBILE
- PROTEINE adesive dei MAWUSCHI (DOPA) ^{TIROSINA} BIOadesivi, GEL INIEGIBILI e RIEMPIENTI, RIVESTIMENTO x COATING
- PROTEINE RICOMBINANTI (x le altre DERIVATO da ANIMALI) (TECNICA DNA RICO)

FIBRONECTINE

- POLISACCARIDI

x adesione CELL mediata da RECEPTORI non INTEGRINICI

ECM

- GAGS AI, CS, DS, CHS, ES
- ALGHE agar, carraghenani, ^{instabilizzata}
- CHITINA-CHITOSANO

INVECE DEGLI SCAFFOLD:

- GEL DI ECM SOLUBILIZZATA
- MATRICE CELLULARIZZATA INTEGRA
- MATRIGEL = SUBSTRATO commerciale mimalamina basale

SCAFFOLD BIOATTIVI \leftarrow MISCELE RIVESTIMENTI SUPERFICIALI

(9)

TECNICHE DI FUNZIONALIZZAZIONE

MASSA-BULK

- SEQUENZE PEPTIDICHE NEL POLIMERO
 - GEL POLIURETANICO TERMOSENSIBILE (FISICO) IDROFIL/FOS (SINTESI POI FUNZIONALI)
 - IDROGEL CON PEPTIDE (CHIMICO) PEO DA + RETICOLA 2 CON UV + PEPTIDE (CMP) RICEVENDO RIGIDITÀ
- MISCELAZIONE POLIMERO/PROTEINE
 - MISCELE BIODIFFICILI POLIMERO BINT - non soluble (PL/GEATINA) - soluble (PEG-PL-PEG) RICEVENDO RIGIDITÀ
 - FOAM BINT E NOT SOLUBILI + RETICOLAZIONE
- IDROGEL
 - MATRICI RETICOLATE CON PROT/PEPTIDI

SUPERFICIE

- **GRAFTING COVALENTE** PEPT/PT
 - PLA + AMMINOACIDI + ASSICURAZIONE CON LEGAME AMMIDICO
 - LEGAME STEP-DOWN/BLANKING
 - COATINGS NON COVALENTE PEPT/PT
 - PLA + AMMINOACIDI + LAYER BY LAYER = IMMERSIONI OPPOSITE + LAVASSIO (CRETANAC) LBL - EPARINA - URINA - SPACER - CRETANAC
- PRIMA C'È SEMPRE UNA MODIFICA SUPERFICIALE
- AMMINOACIDI } POESTERI
 - IDROGEL } POESTERI
 - PLASMA } Ossidazione
 - DOPA } DOPAMINA
- SCALFOLA IN SOLUZIONE DI DOPA (1M) = POLI-DOPA IN SUPERFICIE CON CATECOLO - OSSIDAZIONE PEPTIDI - ANTIFOUING + GRAFTING COVALENTE

PROTEINE VS PEPTIDI

- CONDIZIONE DI PROCESSO NON AGGRESSIVE X DENATURANO
- DA ANIMALE: RISPOSTA IMMUNITARIA
- PROCESSO COSTOSO DI PURIFICAZIONE
- + BIOMIMETICHE
 - GIUSTA CONFORMAZIONE
- FUNZIONALITÀ SPAZIALE E TEMPORALE
- - CONTROLLABILE LA FUNZ SUPERF
- MULTIFUNZIONALI/NON SPECIFICI
- SEGNALE CON DINAMICA SPAZIO/TEMPORALE
- DEGRADAZIONE CON ENZIMI
 - TE IN VITRO
 - TE IN VIVO

- SPECIFICI/MANIFUNZIONALI
- ORIENTATI
- SINTESI
 - NO RISP IMM
 - RIPRODUCIBILI
- CONTROLLAZIONE ↑ FUNZIONALITÀ
- DEGRADAZIONE CON ENZIMI (ACQUA + RESISTENTI)
- FUNZIONALITÀ SUPERFICIALE + CONTROLLABILE
- RESISTENZA A DENATURAZIONE MA CON CONDIZIONI NON AGGR
- SOTTILMENTE ACCURABILE

(10)

Rigenerazione ossea

- osteoblasti
- cellule staminali osteoprogenitrici
- Fibronectina → $\alpha_5\beta_1$
- collagene → $\alpha_2\beta_1$

1° Gen: RGD
+ anti-fouling
+ AA. Affiancamento

2° Gen: RGD + Rcent proteo
RGD + PHSRV $\alpha_5\beta_1$
≠ RGD

Funzionalizzazione con GF

1) sistemi a rilascio di GF [10-9/11]
 ▲ dose non selettiva vita breve
 somministrazione locale
 limitata stabilità chimico-fisico
 denaturazione durante sintesi scaffold
 degradazione enzimatica in vivo
 si devono disattivare deg in fretta t_{1/2}

2) Fattori di crescita adsorbiti su superfici di scaffold

- parti cellule da mettere in scaffold
- DIRETTO: scaffold immerso in soluzione con GF
- IRREGOLARI SUPERFICIALE: ↓ contatto con cell/cell/molecole ECM
- EPAPINA (anche enzimi)
- layer by layer
- GF ≠ GF
- curentiche ↑ dose
- superfici irregolari
- condizioni non assidue BMP + VEGF
- no BR

3) GF dispersi dentro scaffold → idrogeli

- parti cellule da mettere in scaffold
- biodegradazione
- w/o si sciolgono in solvente non acquoso: w/o/w emulsione
- w/o si sciolgono in H₂O: w/o emulsione/terrace
- primari/terciari; scaffold polimerici
- porosità; polim + scaffold (swelling)
- → Assembla iX guide nervose (iniettabili) ASCR/condrina
- NO BURST RELEASE

4) Coniugazione = legame covalente GF con scaffold o MP

- Diffusione GF → + avanzata, no burst release
- migrazione cell
- degradazione aumentata

|| prima si deve sempre funzionalizzare la superficie, poi si lega il GF

Si mettono anche + GF in modi ≠!

2) Terapia cellulare

- iniezione cellule senza supporto
- cellule + supporto (idrogel)

effetto paracrina
 xk le cellule non si integrano e dopo po' muoiono

Schwann in guide nervose
 stemnaux rige miocardio

3) Terapia genica

Trasfezione del gene

4) Rilascio GF tramite l'uso di plasma ricco di piastrine (previa attivazione)

RESUME T.E e REQUISITI X SCAFFOLD

FUNZIONI

- Biocompatibile
 - Prop. Meccaniche
 - Biodegradabilità
 - Permeabilità
 - Funzionizzati
 - Processabili e Sterilizabili
- Matrice x aderenza cellule
 - Rinforzo strutturale
 - Barriera
 - Veloci di rilascio

Importanza di

- Composizione chimica
 - scelta materiale (Base/ Funzionizzati)
 - Resca aderenza
 - influenza
 - approccio biomimetico
 - Architettura/Struttura Pori
 - Tecniche di fabbricazione
 - Porosità
 - Φ Pori (10/100 μ m)
 - Interconnessione
 - Orientamento
 - Modificabili
 - Velocità di degradazione
 - veloce \rightarrow vs struttura/ infiamm
 - lenta \rightarrow vs rigide
 - Proprietà Meccaniche
 - Supporto - Rigido
 - Sollecitazioni elastiche
 - Miscelano polimeri \neq
 - Reticolazione nei naturali
- una lamina) Litosano
 + aderenza + migrazione
 + morfologia + migrazione
 + rigidità + fibroblasti
 + \downarrow E + rigore
 + morfologia + migrazione

Tecniche di fabbricazione = serie una struttura gerarchica porosa

convenzionali

- Metodi delle schiume
- Metodo degli amidi
- Metodo bruciare fase org
- Metodo spugna polimerica
- ✓ solvent casting
- Gas foaming
- ✓ emulsione + liofilizzazione
- Separazione di fase: TIPS, IIPS
- Metodi di spinning: melt-spinning
- ✓ elettrospinning
- fibre dtw

non convenzionali

- PROTOTIPAZIONE RAPIDA
- Laser
 - SLA: stereolitografia
 - SLS: sinterizzazione laser selettiva
 - UGED:
 - FDM: modellamento deposizione fuso
 - PAM: microspina assistita pressione
 - 3D: bioplotter
 - Stampaggio classico
 - 3D printing
- \rightarrow organ printing (13)

tecniche convenzionali

ripetibilità limitata
semplice, - costosi

★ sinterizzazione ceramica

- metodi della schiuma

- da sospensione
- vetroceramico + H₂O₂
↑ T → O₂ esparsi
sinterizzazione
- polveri ceramiche +
polimero con consistenza
che polimerizza
↑ T → polimero brucia
sinterizza
- polveri + proteine ^{artificiali} / schiume / coagulo
↑ T coagulo di proteine
↑ T proteine brucia e sinterizza

• SOL-GEL

- soluzione particellare / liquido
↑ T soluzione
gel
secco (togliere parte liquida)
sinterizza < poroso T < T_{cr}
denso T > T_{cr}

- METODO DEGLI AMIDI (polimeri del glucosio)

- sospensione ceramica + amido + H₂O → amido swelling
- ↑ T amido brucia e sinterizza

- METODO X BRUCIARE FASE ORGANICA

- mix secco di polveri + componente organico (polimero)
→ importante mixaggio omogeneo
+ compressione + ↑ T sinterizza

- METODO DELLA SPUGNA POLIMERICA

- spugna in emulsione acquosa di polveri + slurry polimerico
+ compressione x togliere eccesso +
trattamento termico x bruciare polimero, sinterizza spugna

poco porosità
poco interconnessione dei pori

★ SOLVENT CASTING & PARTICULATE LEACHING

NO ↑ T

polimero + solvente organico = soluzione

- soluzione in stampo con particelle di porogeno che non si scioglie nel solvente

sali
glicerolo
polimero (PEO)

[H₂O]

si evapora il solvente

si immerge in bagno x sciogliere porogeno e non polimero

ex: PCL + PEO

★ GAS FOAMING (schiuma)

dischetto polimerico in un dispositivo dove fluisce il gas (↑ pCO₂)
che forma porosità

★ EMULSIONE + LIOFILIZZAZIONE

emulsione = polimero + solvente + H₂O in stampo

+ congelata x non sciogliersi 2 fasi

+ liofilizzata x rimuovere H₂O e solvente (sublimazione)
solido → gas

≠ T = ≠ ϕ pori

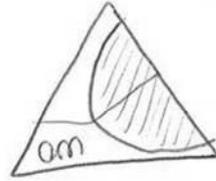
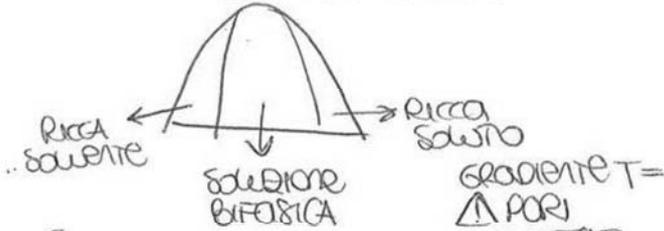
generina
causare

★ **SEPARAZIONE DI FASE = SMISCELAMENTO**

- RIPS REAZIONE
- DIPS DIFFUSIONE (sp+valore)
- TIPS $\downarrow T, \downarrow$ quantità solvente

- IIPS immersione in un bagno di non solvente

soluzione omogenea



gradiente $T = \Delta P / r$
orientati = anisotropia

- Soluzione stampo congelam 2x fase
- Liofilia solvente
- O la vasi in non solvente

★ **SPINNING**

- MELT = FUSO + estrusione + $\downarrow T$ = FIBRA
- DRY = soluzione + // + $\uparrow T$ aria = FIBRA x evaporare solvente } $> 10 \mu m$
- WET = UMIDO x polimeri che non fondono e non si sciolgono
Polimeri + estrusione in bagno UMIDO = REAZ. FASE = PRECAPITA IL POLIMERO

★ **ELEKTROSPINNING**

Pompa + siringa + carotaylor + ΔV + \downarrow peso + distanza + cassetto } $100 nm$

- $\downarrow \Phi$
- $\leftarrow \uparrow \Delta V$
 - $\leftarrow \uparrow$ distanza U-C (3)
 - $\leftarrow \uparrow$ consistenza soluzione

- $\uparrow \Phi$
- $\leftarrow \uparrow$ velocità flusso (2)
 - $\leftarrow \uparrow$ concentrazione polimerica (viscosità) (1)
 - $\leftarrow \uparrow$ quantità solvente (macrofori)

\neq dimensione fibre = \neq differenziazione < neurone $\uparrow nm$
guai $\downarrow nm$

★ **FIBRE CAVE**

- DRY-JET-WET SPINNING μm
- CO-AXIAL ELEKTROSPINNING nm

(15)

Tecniche non convenzionali

PROTOTIPAZIONE RAPIDA = immagine paziente +
calcolatore che guida
STRATO X STRATO
+ cellule!

★ LASER
FOTOPOLIMERIZZAZIONE
POLIMERI SENSIBILI ALLA LUCE

- SLA = STEREO LITOGRAFIA
RESINA LIQUIDA + LASER UV macchinista!
FOTOPOLIMERICA

- SLS = SINTERIZZAZIONE LASER SELETTIVA
PARTICELLE + LASER = FONDO
POI SI AGGIUNGE ALTRO MATERIALE SOPRA E SI RIPETE
TANTO MATERIALI

★ UGEO
FORZA DI ESTROSIONE

- FDM FUSED DEPOSITION MODELING (no cellule)
TERMOPLASTICO FUSO E DEPOSITATO DA UGEO (DA SOTTO A SU)
+ MATERIALE DI SUPPORTO (ad ex solubile in H₂O)
UGEO SIMILE DA CIRCOLAZIONE

- PAM PRESSURE ASSISTED MICROSYRINGE
MATERIALE NON FUSO ESTRUSO X TP



- 3D BIOPLOTTER
X SOSTITUIRE CELLULE MORTUE
STRATI IN FUSIONE DI CULTURA DELLE CELLULE

★ STAMPAGGIO
LETTO IN POLVERE + DEPOSIZIONE LEGANTE
O DIRETTAMENTE DEPOSITA MATERIALE

- 3D PRINTING

UGEO RILASCIATA CALDANTE = SOLENTE MOTTO VOLATILE
STRATO X STRATO SI AGGIUNGE POLVERE

↓ IL CALDANTE SCALDARE IL POLVERE CHE POI SODIFICA X
IL CALD. ESPORA

ORGAN PRINTing

DAVA FUSIONE DI ANEMI MIOCARDICI EMBRIONALI
RIGENERAZIONE E AUTO-ORGANIZZAMENTO

ORGAN PRINTING

PREPROCESSING : immagine + modello

PROCESSING : deposizione materiale e cellule

POST PROCESSING : perfusione e maturazione applicazioni



Δ vascolari < GF
presenza di C. ENDOTELIALI
Δ materiale di supporto

CELLULE STAMINALI

non differenziata
auto rinnovamento
proliferazione ∞ (asimmetrica)
TOTIPOTENTE < Puri (E)
MULTI (A)
espressione dei geni della staminalità

POTENZA = differenziazione

- TOTI : zygote / morula
- PURI : CSE (MCI)
- MULTI : CSA
- UNI : CARCINOMI



CSE

COLTIVAZIONE IN VITRO

Le CSE necessitano di uno strato di FIBROBLASTI MITOTICAMENTE INATTIVI (FEEDER LAYER) che hanno un effetto PARACRINO secretando GF e segnali di non differenziamento (citochina UF)

cultivi → corpi embrionali → PROGENITORI → DIFF. CAOTICO

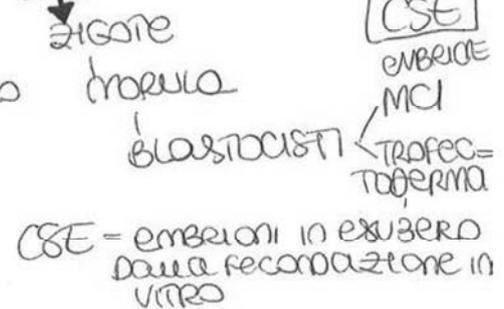
DIMOSTRAZIONE PURI POTENZA

- VIVO → CSE iniettate sottocute → TERATOMI (DIFF. CASUALE)
- VIVO → CSE iniettate in blastocisti → CHIMERA (TROPICAZIONE)
- VITRO → CSE + GF = ≠ DIFFERENZIAMENTI

SEGNAI DELLA STAMINALITÀ

SI PARAGONA IL TRASCRITOMA → con la tecnica del MICROARRAY

embrione:



→ 200 geni co-espressi (CSE-C81-C8N)

FATTORI TRASCRIZIONALI espressi: Oct-4, Nanog, Sox3 + citochine

↓ NO BLASTO NO EMBRIONE

(7)

microarray = se un gene è espresso o represso si cercano segni in comune
 Tecnica RNA interference = regola mRNA
 silenziamento gene
 cosa succede → perdita staminali

→ **IPS** cellule differenziate (fibroblasti pelle)
 modifica genetica
 regressione a staminali PWRi autologhe

Resume strategie x ottenere CS:

- embrioni in eccesso → CSE da MZ → ETE
- clonazione → nucleo in cellula uovo senza → POT. AUTO
- terapia genica → IPS → AUTO

O81 CSE

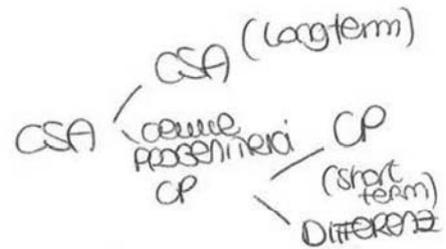
- rimpiazzo cellule non + prodotte
 Diabete - Parkinson - sclerosi multiple

Limiti CSE

- espansione
- differenziazione
- tumori
- rigetto e risposte immunitarie
- etici

CSA

- in tutti tessuti
- autorinnovamento a lungo termine
- non differenziate
- multipotenti
- plastiche
- indici del potenziale rigenerativo del tessuto



STUDI

- Topi transgenici
- Urobelti → marca di CSA = blastema
- Zebrafish → 2/3 mesi rigenera
- Uomo → contenuto CIA

NICCHIA

Le cellule staminali adulte sono collocate nell'organismo cellulare in microambienti particolari determinati nicchie
 Qui sono ancorate alle cellule di supporto e staminali solo se si differenziano.

18

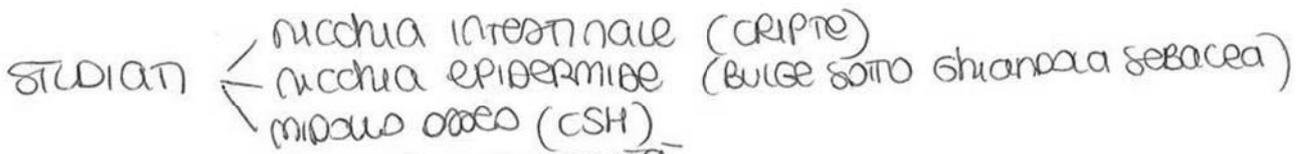
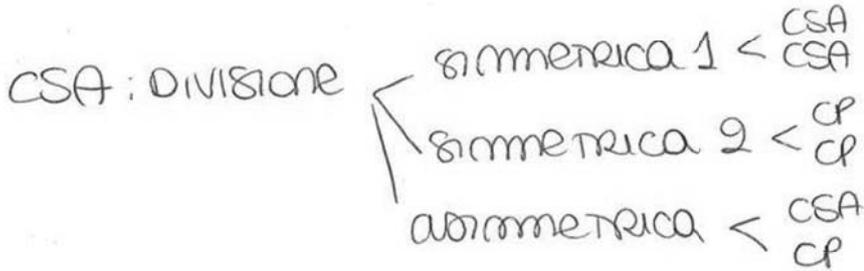
Le cellule di supporto ricercano ECM e comunicano con le ASC
 direttamente x.k. sono a contatto e indirettamente x la produzione
 di fattori solubili (effetto paracrina)

Le CSA sono quindi sottoposte ad un insieme di segnali

- Diretti ("") (da cellule del supporto)
- Paracrini
- Metabolici
- Fisici (dalla nicchia)
- Neurali
- umorali (dalla circolazione sanguigna)
- Strutturali (dalla nicchia)

che bilanciano la sua attività

↓ Nicchia
 tessuto
 stato individuo
 fattori esterni
 Segnalazioni che
 arrivano dall'
 l'organismo



AGING < cancro
 invecchiando la nicchia, invecchiano le staminali

- ↓ CS
- CS non funzionali
- CP " "
- senescenza
- mutazioni

→ ridotto ae < microangiogenesi
 circolazione giovane

CSH • in midollo osseo e sangue e cordone ombelicale e rSE e iPS
 rare - non si distinguono
 trapianto di midollo osseo
 → non proliferano o differenziano in vitro

POX Diff in
 cardiomiociti
 in certe condiz

CSM • osso - tessuto adiposo sono in fo' adulte
 - osso - cartil - muscolo - stroma - legam - adipociti - nervoso - in vivo
 - condrociti - adipociti - osteoblasti in vitro (a seconda del substrato)
 forse
 cardiomiociti

Plasticità
 TRANSDIFFERENZIAMENTO
 la loro urea in reattivi e variabili segnali e dal microambiente
 ex: ematopoietiche nel cuore → cardiomiociti

Approcci x differenziare le staminali

- 1° problema → Fornitura di CS → sistemi di espansione cellulare ex vivo
 2° problema → Diff. CS → studi sul design del BC materiale su proprietà chimiche, topografiche, meccaniche

servono tecnologie che controllano il comportamento delle cellule staminali in vitro

- costruzione di una vescola ingegnerizzata Bioprint → espansione in vitro → cell. si mantengono biologiche → crescita → impianto
- Trachea da cartilagine → decellularizza senza alterare la matrice → scaff. ricellularizza in un bioreattore rotante → cultura in vitro → impianto

CS impiantare con scaff o no (con supporto o no)

Materiali x espansione / diff

- meglio avere subito int. cell. x espansione ha molti problemi
 - ↳ mantenere in diff e lunga come tempo (non cicli x ma unitari) → invecchiamento
 - (tempi di ricambiamento da 1gg a 1 mese ad anno)
- non applicabili in caso animali! anche se si usano (x marcatori immunogenici) → biomateriali sintetici

Materiali x staminali ingegnerizzati generam

Materiali x carriers cellulari x proliferare e veicolare

Materiali x differenziazione

queste proprietà (solite 3↑)

Stimoli chimici = fattori bioattivi
 reticolati / mezzi osmo / adsorbiti
 caricati in microsfere differenz. (nanoparticelle)
 ↳ Regolazione velocità di rilascio
 ↳ protezione da degradazione esterna

Stimoli topografici (caratt. superficiali)
 dimensioni / conformazione / simmetria
 geometria / porosità / rigidità
 ↳ autoorganizzazione fisica

Stimoli Meccanici
 sforzi - rigidità