



Corso Luigi Einaudi, 55 - Torino

**Appunti universitari**

**Tesi di laurea**

**Cartoleria e cancelleria**

**Stampa file e fotocopie**

**Print on demand**

**Rilegature**

NUMERO: 1429A -

ANNO: 2015

# A P P U N T I

STUDENTE: Tortorici

MATERIA: Bioreattori, Prof.Massai

Il presente lavoro nasce dall'impegno dell'autore ed è distribuito in accordo con il Centro Appunti.

Tutti i diritti sono riservati. È vietata qualsiasi riproduzione, copia totale o parziale, dei contenuti inseriti nel presente volume, ivi inclusa la memorizzazione, rielaborazione, diffusione o distribuzione dei contenuti stessi mediante qualunque supporto magnetico o cartaceo, piattaforma tecnologica o rete telematica, senza previa autorizzazione scritta dell'autore.

**ATTENZIONE: QUESTI APPUNTI SONO FATTI DA STUDENTIE NON SONO STATI VISIONATI DAL DOCENTE.  
IL NOME DEL PROFESSORE, SERVE SOLO PER IDENTIFICARE IL CORSO.**

# Bioreattori

Lezioni: Massai

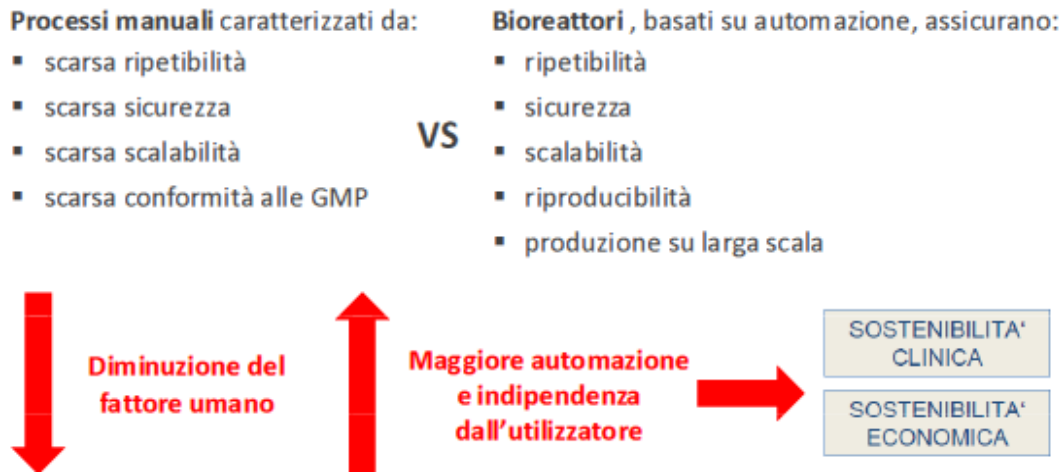
## INDICE

Introduzione	2
Bioreattori	2
Componenti dei Bioreattori	4
Requisiti di Progetto	11
Classificazione dei Bioreattori	14
Utilità dei Bioreattori	18
Bioreattori per espansione cellulare	19
Bioreattori per maturazione tessuti	26
Bioreattori per tessuto osseo	27
Bioreattori per cartilagine	31
Bioreattori per tessuto cardiaco	32
Microbioreattori fluidici	38

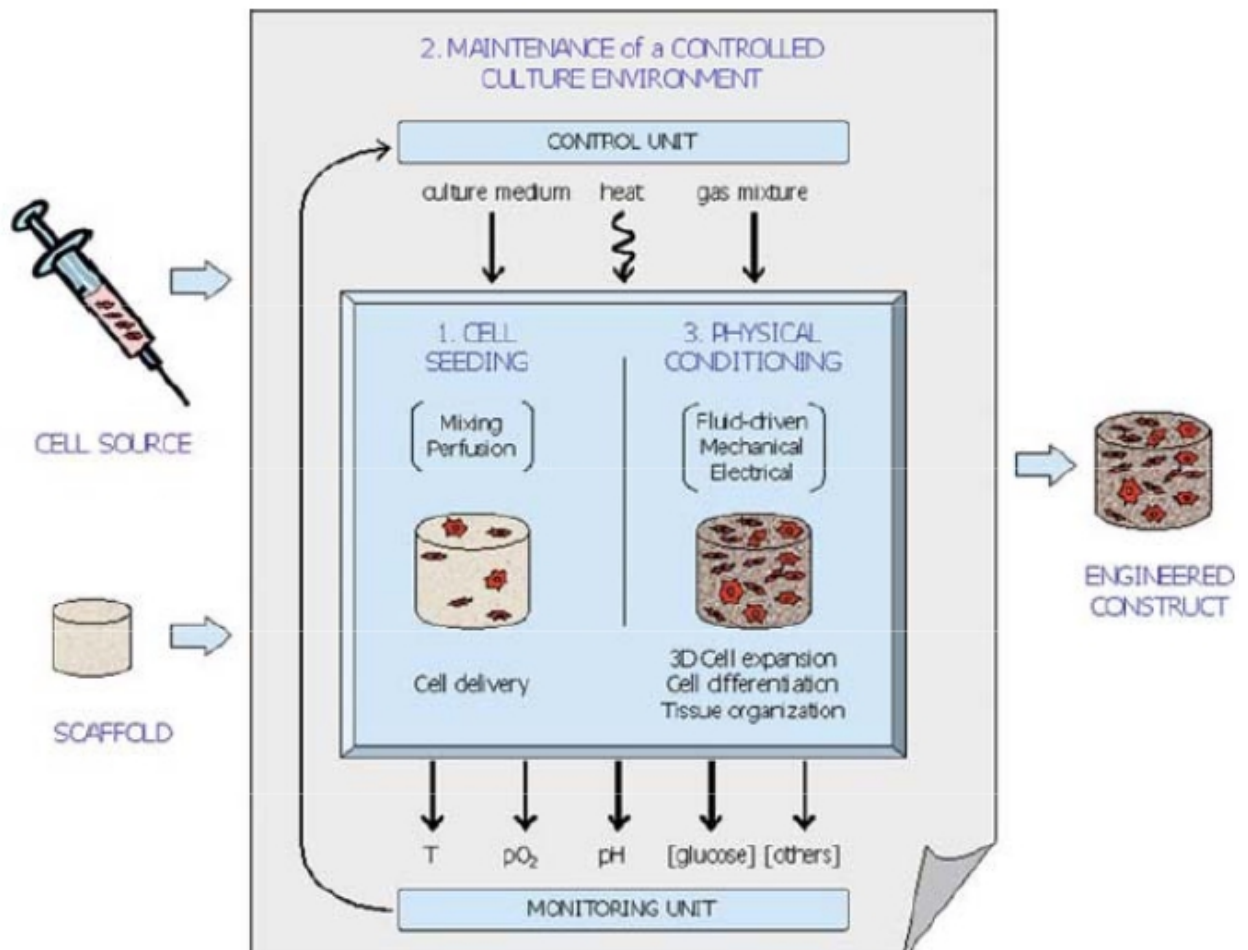
I bioreattori rappresentano uno strumento innovativo ed efficace per superare le limitazioni delle colture statiche bidimensionali, infatti possono fornire:

- condizioni di coltura tridimensionali;
- condizioni di coltura dinamiche (ricircolo, perfusione, stimoli fisiologici);
- ambiente di coltura automaticamente monitorato e controllato;
- aumento dell'efficienza del processo tramite automazione, riproducibilità, standardizzazione, sicurezza.

Oltre a permettere il controllo e il monitoraggio delle condizioni di coltura, un bioreattore dovrebbe garantire la possibilità di rendere automatici gli step del processo. Questo è essenziale non solo per studi controllati, riproducibili e statisticamente rilevanti, ma anche per la futura fabbricazione di tessuti per l'applicazione clinica.

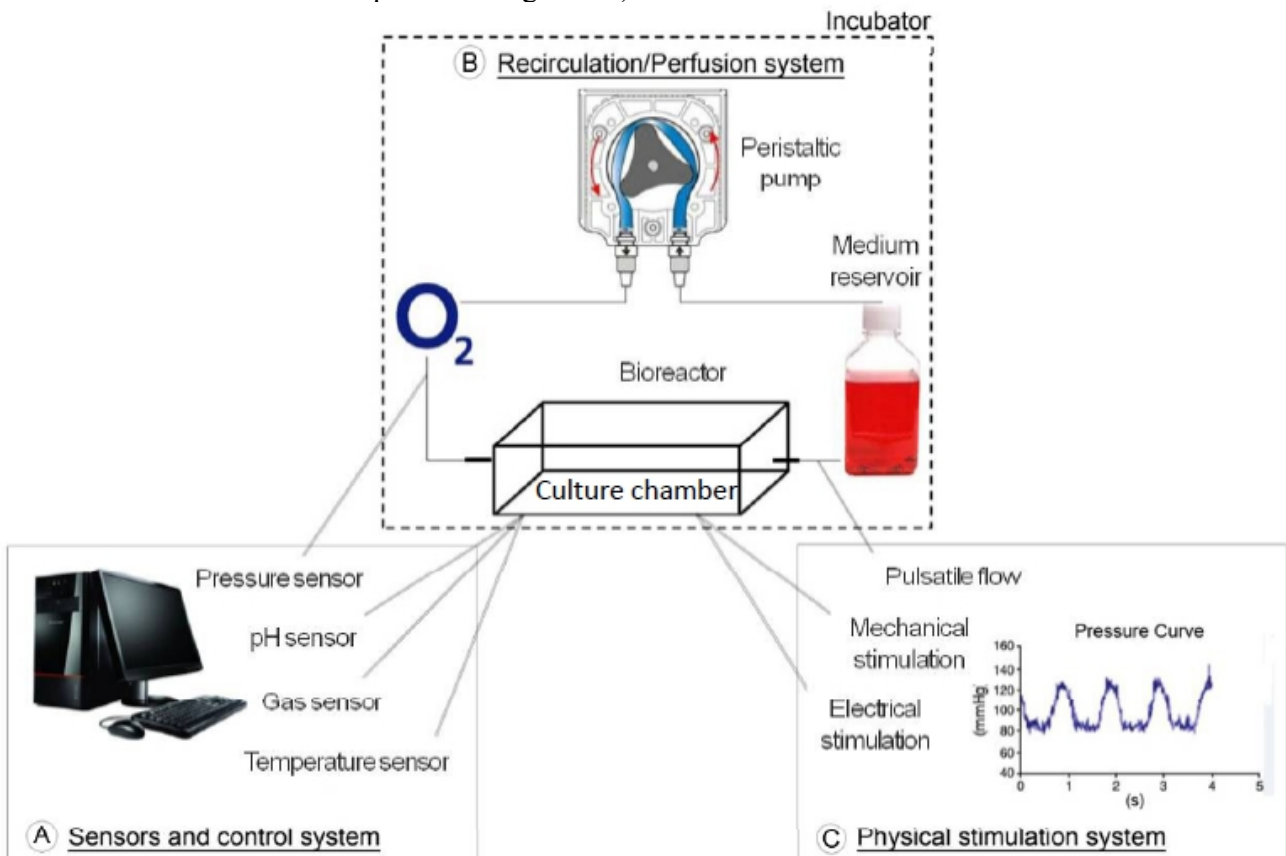


Rappresentazione schematica delle funzioni chiave di un bioreattore:

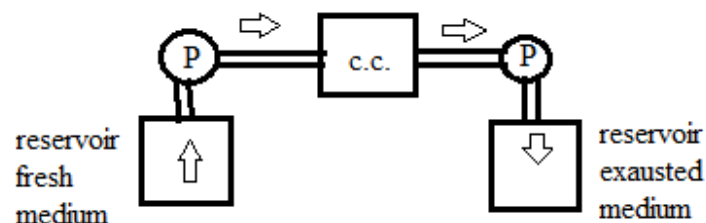


sistema che mette in azione un attuatore;

- **sistema di ricircolo o perfusione:** la camera di coltura è collegata a un sistema che permette al medium di ricircolare (cioè esce dalla camera e si agisce su di esso ossigenandolo e rimuovendo i prodotti di scarto). Si potrebbe asportare il medium a mano, ma c'è il rischio di contaminazioni, richiede tanto tempo e si cambia di botto l'ambiente in cui si trovano le cellule (batch feeding). Alcune cellule hanno bisogno che i cambiamenti dell'ambiente siano gradualmente o che l'ambiente sia stabile. Inoltre le cellule staminali secernono fattori nel medium: se esso viene cambiato, tali fattori vengono buttati, ma avolte è importante che rimangano (sono dei segnali). Tramite l'automazione del processo si può contare su un ricambio continuo di medium. In questo modo si evitano sbalzi. Lo stesso sistema può essere usato per forzare il passaggio di medium attraverso scaffold spessi (per esempio quelli per il tessuto osseo, che sono scaffold 3D molto porosi);
- **sistema di stimolazione fisica:** mima (in modo approssimato) ciò che avviene nell'organismo. Bisogna seguire la maturazione del tessuto con l'applicazione di carichi graduali per avere un costrutto finale ottimale. La stimolazione può essere meccanica o elettrica. Questo sistema serve anche a scopi di ricerca (per es: le cellule come sono influenzate da campi elettromagnetici?).



Possibile schema di un sistema di ricircolo (sistema aperto):



La camera di coltura permette di alloggiare o mantenere (se per esempio è necessario un afferraggio) le cellule in un ambiente sterile e sigillato. Sterile significa senza microrganismi, che potrebbero contaminare la coltura. La sterilizzazione più comune è quella in autoclave (121°C per 20 o 30 minuti). Proprio per mantenere la sterilità la camera di coltura deve essere sigillata.

Requisiti di progetto per la camera di coltura:

- essere in grado di alloggiare e mantere il costruito;
- essere sigillata, cioè avere una tenuta stagna che eviti contaminazioni e fuoriuscite di fluido;
- ogni componente deve poter lavorare a 37°C in atmosfera umida o totalmente immerso nel medium;
- essere il più trasparente possibile (il biologo è abituato a osservare cosa succede);
- materiali che possano essere sterilizzati in autoclave;
- avere buona finitura, cioè evitare zone di accumulo di contaminanti (avere bordi smussati, evitare angoli e buchini non passanti).

L'afferraggio dipende dal tipo di scaffold e dal tipo di stimolo che si vuole fornire.

Il circuito di perfusione (o di ricircolo) è costituito da reservoir di medium, pompa (spesso peristaltica) e tubi. Se i tubi sono permeabili all'ossigeno, la loro superficie diventa una zona di scambio, migliorando l'efficienza dello scambio di gas. È l'ideale se si mette il bioreattore in incubatore, dove l'anidride carbonica è mantenuta al 5%. Se il bioreattore non va posto in incubatore, i tubi devono essere impermeabili.

Requisiti di progetto per il sistema di perfusione e ricircolo:

- profilo del flusso (pulsatile o costante);
- portata ( $Q$ =litri/minuto);
- pressioni ( $p$  ingresso,  $p$  uscita);
- dimensionamento del circuito;
- nessun contatto tra i componenti esposti della pompa e il medium di coltura.

Le pompe possono essere peristaltiche o a siringa. La pompa peristaltica permette di pompare medium senza che i meccanismi vi entrino in contatto (mantiene la sterilità). La portata di una pompa peristaltica è determinata dal diametro interno del tubo, dal diametro della pompa e dai suoi giri al minuto. La pompa a siringa non permette la perfusione continua.

Il sistema di stimolazione fisica deve essere controllato dal sistema di controllo. Può essere costituito da un motore (per l'applicazione di forze) o da un generatore (per la stimolazione elettrica).

Requisiti di progetto per motore lineare:

- forza massima (di trazione o compressione);
- profilo del moto (sinusoidale, trapezoidale, ecc);
- profilo di velocità (velocità massima);
- risoluzione (cioè qual è lo spostamento minimo che deve garantire).

Requisiti di progetto per un motore rotazionale:

- coppia;
- profilo di velocità angolare.

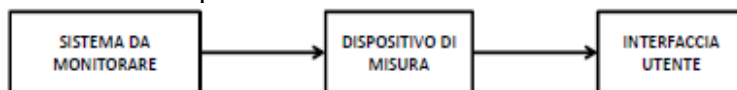
Esistono due tipi di motori:

- *stepper*: motore elettrico che si muove a step (cioè discretamente). Non c'è bisogno di un sensore di feedback che ne controlli la posizione perché essa può essere stabilita contando gli step;
- *servomotore*: attuatore rotativo che deve essere accoppiato a un sensore di feedback. Spesso richiede anche un controllore sofisticato, con un modulo dedicato.

Per realizzare un movimento lineare con un motore rotatorio servono delle viti.

- valutare l'evoluzione;
- identificare problemi e miglioramenti;
- quantificare i risultati.

In termini informatici sono veri e propri sistemi (strumentazione più software specializzato) che rilevano più segnali o valori contemporaneamente.



Il monitoraggio di parametri di coltura e del tessuto è utile per:

- tracciare il processo di coltura;
- rendere noti i meccanismi fisici e biochimici dello sviluppo del tessuto;
- implementare strategie controllate dal feedback volte a ottimizzare la progressione della coltura;
- automazione dei processi.

Per esempio, senza il sistema di monitoraggio il pH si misura qualitativamente guardando il colore del medium, che vira in base all'acidità. Questo rende difficile la ripetizione del processo.

Il sistema di monitoraggio può monitorare 2 tipi di parametri (ESAME!):

- parametri ambientali: riguardano il medium e ciò che sta intorno al costrutto;
- parametri del costrutto: non si riesce ancora a monitorarli in modo ottimale.

	Environment parameters	Construct parameters
physical	temperature, pressure, and flow rate	stiffness, strength, and permeability
chemical	pH, dissolved O <sub>2</sub> and CO <sub>2</sub> , chemical contaminants, concentration of significant metabolites/catabolites such as glucose, lactate, or secreted proteins	composition of the scaffold and of the developing extracellular matrix
biological	bacterial contamination (sterility)	cell number and proliferation rate, concentration of intracellular proteins, and cell viability

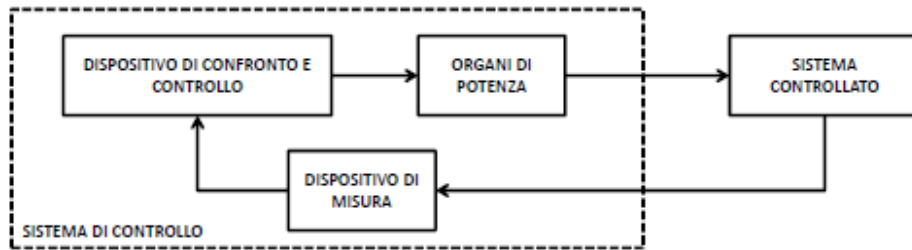
I parametri normalmente monitorati sono temperatura, pH, concentrazione di ossigeno.

I sensori per valutare le proprietà ambientali possono essere:

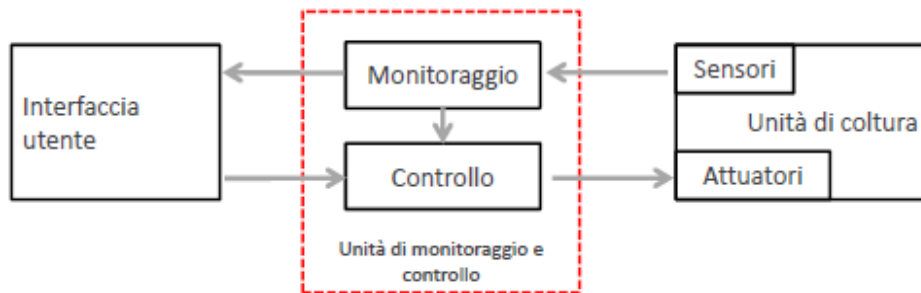
- *invasivi*: sono posti direttamente in camera di coltura o a contatto con il costrutto.  
 Vantaggi:
  - si sente ciò che succede nella camera (alta specificità);
  - alta sensibilità;
 Svantaggi:
  - se non è usa e getta deve essere sterile e sterilizzabile (non esistono sensori che possano essere messi in autoclave: vengono sterilizzati con i raggi UV, ma tutta la superficie deve essere colpita dai raggi);
  - difficile calibrazione;
- *non invasivi*: sono posti al di fuori della camera di coltura, ma danno informazioni su ciò che succede al suo interno.  
 Vantaggi:
  - non c'è necessità di sterilità;
  - facile calibrazione.

- rispondere il più prontamente possibile alle sollecitazioni;
- fornire la risposta più precisa possibile con un limite ristretto di errore.

Un sistema di controllo automatico è un insieme di elementi tra loro interagenti, nei quali almeno una interazione rientra nella definizione di azione di controllo automatico.



Schematicamente:



interfaccia utente → comunicazione con l'utente in forma grafica. Permette di visualizzare in tempo reale le esecuzioni dei processi di cui è responsabile il sistema di monitoraggio e controllo;

unità di monitoraggio e controllo → insieme di dispositivi hardware di misura ed attuazione per realizzare il rispettivo monitoraggio e controllo trasmettendo i dati da e all'interfaccia utente;

sensori → dispositivi in grado di rilevare dati fisici dall'ambiente e trasmetterli a una unità di monitoraggio e controllo;

attuatori → dispositivi in grado di alterare lo stato fisico di un sistema sulla base di informazioni ricevute dal sistema di controllo.

## REQUISITI DI PROGETTO

La progettazione di un prodotto segue precisi step:

- 0) bisogno;
- 1) ricerca: sul mercato e in letteratura come si esaudisce il bisogno? Si valutano vantaggi e svantaggi delle soluzioni trovate;
- 2) concept: si sviluppa il concetto del nuovo prodotto;
- 3) design: si deve tener conto di un elenco di necessità imposte da chi userà lo strumento e dalle tecniche di fabbricazione;
- 4) sviluppo: si integrano i vari elementi;
- 5) documentazione del progetto: si tratta di tavole e documenti che descrivono lo strumento;
- 6) prototipo: deve essere fatto con materiale poco costoso;
- 7) ingegnerizzazione: rende il prototipo definitivo;
- 8) produzione.





- resistenza a colonizzazione batterica.

La FDA ha classificato i materiali in gradi a seconda del livello di tossicità e del rilascio di detriti. Secondo questa classificazione, i materiali usati in un bioreattore devono essere almeno **grado alimentare**, meglio se sono **grado medico**. La differenza tra i due è che il food grade non è in contatto costante e continuativo con l'organismo, mentre il medical grade sì.

In più i materiali devono essere facilmente sterilizzabili, possibilmente con le tecniche usate nei laboratori.

La tecnica di sterilizzazione più comune è l'*autoclave a vapore*: l'oggetto da sterilizzare viene posto in una busta di plastica, che viene sigillata e scaldata a 121°C per circa 20 minuti (a una pressione di 2 bar? Controllare).

La *sterilizzazione a secco* prevede un trattamento a 160°C per 2 ore e a 190°C per 6 minuti (90? controllare).

Esistono anche metodi molto più costosi, come l'*ossidazione di etilene*. Viene usato con i materiali che non sopportano le alte temperature: è un sistema molto sicuro e viene usato anche negli ospedali.

Un altro metodo costoso sono le *radiazioni*: gamma, x microonde, UV. Le prime 3 vengono usate in metodi industriali, mentre gli UV vengono integrati nelle cappe: bisogna assicurarsi che tutti i lati dell'oggetto vengano colpiti.

I possibili materiali da usare per un bioreattore sono metallici o polimerici. La scelta di un tipo o dell'altro dipende dal pezzo. Per trasmettere il moto è meglio usare un metallo, mentre per coperchi o altri pezzi che non richiedono resistenza si usano i polimeri. I polimeri sono meno resistenti, ma più facili da lavorare rispetto ai metalli.

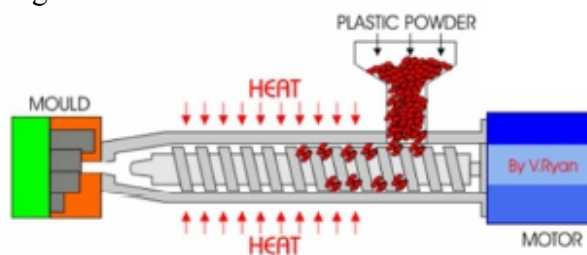
I metalli non hanno problemi per la sterilizzazione in autoclave. Devono essere food grade. Si usano stainless steel 304, 31 o 316L (quest'ultimo è medical grade).

I polimeri devono essere autoclavabili e food/medical grade. Si usano policarbonato (è trasparente), polioossimetilene (è bianco), teflon, nylon, silicone biomedicale (per sigillare).

Tenendo conto della lista dei requisiti di progetto, i componenti dei bioreattori sono progettati mediante **CAD** (Computer-Aided Design). I file ottenuti dalla progettazione assistita dal calcolatore sono dati a delle macchine **CNC** (Computer Numerical Control), che li rielaborano grazie a programmi **CAM** (Computer-Aided Manufacturing). Si ottiene un file con le istruzioni per realizzare il pezzo.

Tecniche di fabbricazione:

- **fresatura** (milling): usata per lavorare materiali solidi. Ha un'elevata precisione di taglio (minore di 0,025 mm) e permette di ottenere geometrie complesse (se si vogliono ottenere geometrie complesse è importante che la macchina sia CNC e non manuale). Per ottenere il pezzo voluto, il materiale viene fatto traslare mentre una punta si muove su di esso;
- **tornitura** (turning): usata per materiali solidi. È utile per ottenere forme assialsimmetriche. Il pezzo ruota e gli si avvicinano delle punte;
- **iniezione a stampaggio** (injection moulding): viene usata per materiali termoplastici. Si parte da granuli di materiale, che vengono fatti cadere in un condotto riscaldato. I granuli si sciolgono, vengono iniettati in uno stampo e si ottiene il pezzo. Il policarbonato, lavorato con questa tecnica, rimane trasparente. Problema: lo stampo potrebbe costare più del prototipo. Questa tecnica si usa solo quando si è decisa la forma definitiva, quindi è usata per produzione su larga scala.



sul costruito.

I bioreattori a parete rotante sono non fisiologici. Si ottiene una sospensione mettendo in moto il fluido tramite la rotazione delle pareti di una camera cilindrica. La giusta velocità di rotazione si ricava sperimentalmente oppure tramite **CFD** (fluidodinamica computazionale). La velocità di rotazione va variata con l'aumento del peso del costruito: c'è bisogno di monitoraggio costante.

Sono bioreattori più complessi e costosi dei precedenti, sviluppati a seguito di esperimenti nello spazio con degli osteociti: simulano l'assenza di gravità.

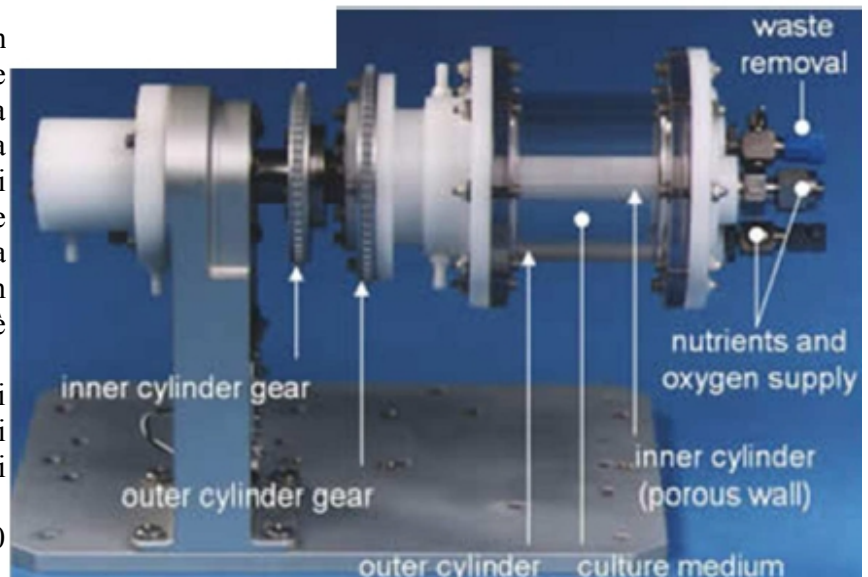
Il bioreattore ruota a una velocità di 15-30 rpm.

Svantaggio:

- più costoso rispetto a spinner flask.

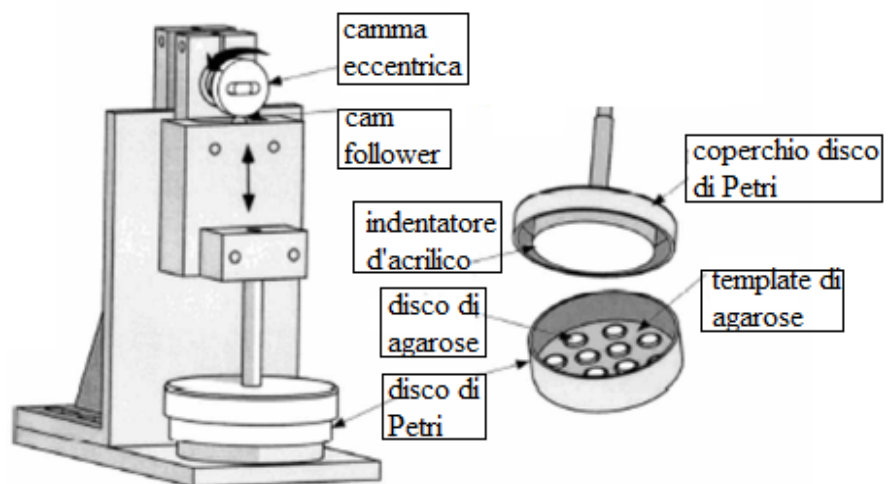
Vantaggi:

- il fluido si muove con bassa velocità (moto laminare): sforzi di taglio minori rispetto a spinner flask;
- non ci sono oggetti che possano urtare le cellule in camera di coltura.



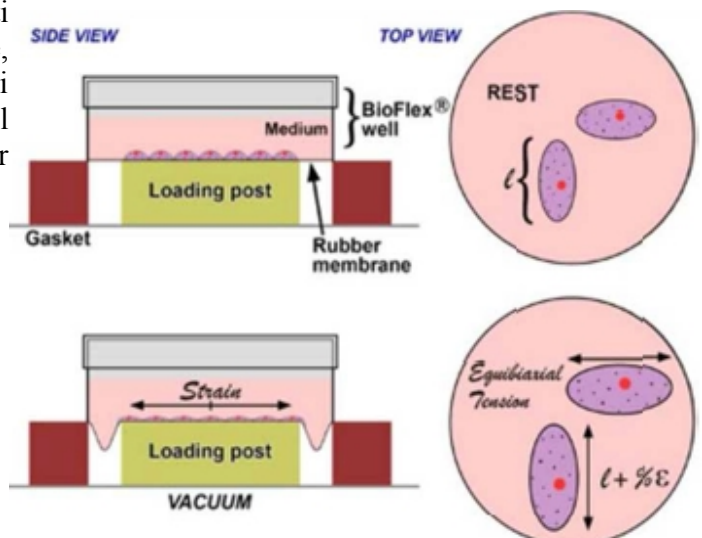
I bioreattori a compressione sono fisiologici: forniscono uno stimolo di compressione. Una camma eccentrica ruota, spingendo su e giù un pistone, che a sua volta spinge sulla camera di coltura. Simula lo stimolo che si ha nelle articolazioni, anche se è solo una semplificazione rispetto allo stimolo fisiologico.

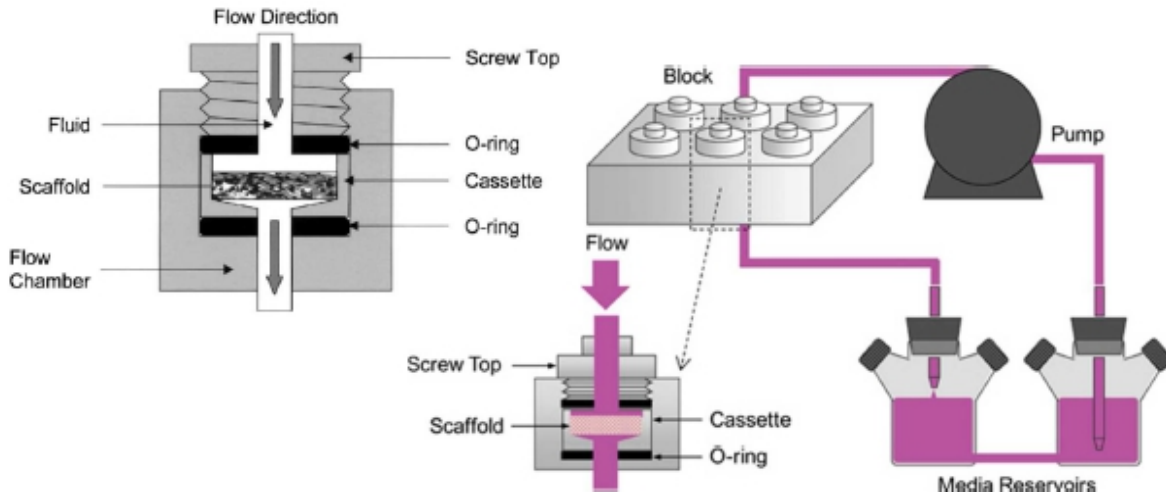
Esempio in commercio: *C10-12 CartiGen*. La camera di coltura è il disco di Petri; il sistema di perfusione è assente, quello di monitoraggio non si può dire dall'immagine. C'è il sistema di controllo del motore. C'è il sistema di stimolazione fisica.



I bioreattori a trazione sono fisiologici e vengono usati per legamenti, tessuto cardiaco, tessuto vascolare, muscoli e tendini. Il design è simile a quello dei bioreattori a compressione, con la differenza che il costruito viene tirato, quindi serve un modo per afferrare lo scaffold.

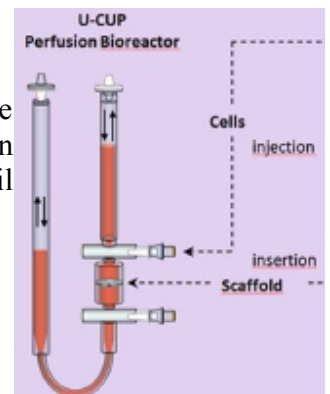
Esempi in commercio:



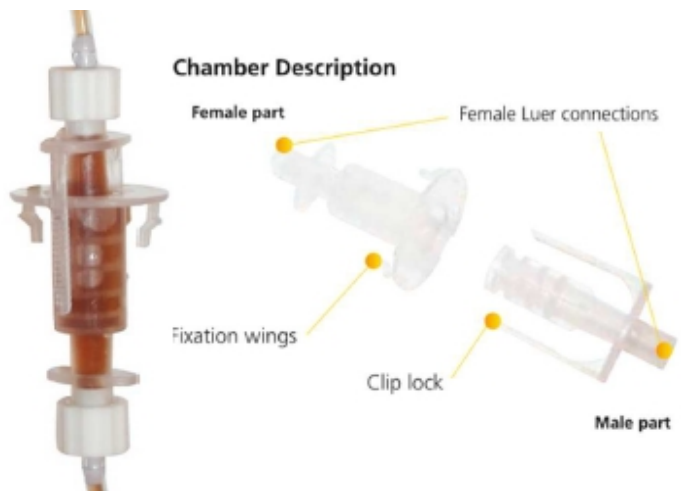


Esempi in commercio:

*U-cup*. Ha una forma a U, con tubi, una camera di coltura e due sistemi che permettono di iniettare dentro la camera di coltura o di isolarla (come dei rubinetti). In cima ci sono dei filtri per l'aria, ai quali si collega una pompa a siringa che spinge il medium su e giù in modo ciclico. I tubi sono usa e getta.



*P3D chambers*. Hanno camere di coltura usa e getta (→ non sterilizzabili in autoclave). Lo scaffold viene tenuto dalla camera stessa, che poi viene collegata a tubi. C'è una pompa peristaltica montata sul fondo dell'incubatore. C'è uno schermo che permette di comunicare con la pompa. È un sistema autosufficiente, ma è complesso da montare. Viene usato soprattutto per costrutti cilindrici.



*3D CulturePro Bioreactor*. Non ha viti, ma una chiusura a incastro (ottima cosa). Gli afferraggi hanno una superficie bucherellata per permettere la perfusione.



- colonizzazione omogenea;
  - standardizzazione;
  - apporto continuo di medium;
- V. si fa maturare il tessuto: le cellule devono iniziare a svolgere le loro funzioni. Si può usare un bioreattore:
- condizioni di coltura controllate;
  - campionamento automatico;
  - standardizzazione;
  - apporto continuo di medium;
  - stimoli fisiologici;
- VI. una volta ottenuto il tessuto maturo esso può:
- essere impiantato nel paziente;
  - essere usato per test: si può usare un bioreattore.

## BIOREATTORI PER ESPANSIONE CELLULARE

Le cellule staminali sono cellule indifferenziate con la capacità di autoreplicarsi e di differenziare in vari tipi cellulari. Alcune cellule umane non hanno la capacità di autorinnovarsi (cardiomiociti, cellule nervose, condrociti, epatociti): le cellule staminali possono diventare anche questi tipi cellulari. Queste proprietà le rendono molto appetibili per applicazioni terapeutiche, anche se i prodotti di terapia cellulare sul mercato sono ancora molto pochi. Sono in atto molti trial clinici sulle cellule staminali. Dopo lo studio in vitro, in piccolo animale e in grande animale si fanno i *trial clinici*, ovvero la nuova terapia viene testata su pazienti umani. È l'ultima fase di test e viene fatta su 3 gruppi: a un gruppo di persone si somministra la nuova terapia, a un gruppo si somministra un placebo e all'ultimo gruppo si somministra la vecchia terapia. A valle dei trial c'è la certificazione da parte delle opportune associazioni (per es FDA). Bisogna garantire che le terapie rispondano alle richieste del mercato, cioè deve essere possibile la loro produzione su larga scala. Le terapie devono essere sicure, robuste, efficienti, economiche.

Le cellule staminali vengono prelevate dal paziente in numero limitato, quindi è fondamentale avere un buon sistema di espansione affinché la terapia cellulare possa rispettare le necessità di una terapia. L'espansione deve essere ottenuta rispettando le GMP (good manufacturing practices), un insieme di indicazioni comportamentali su *come* la terapia debba essere prodotta.

Le terapie basate su cellule staminali sono il risultato della ricerca di piccole aziende o università, quindi sono costose e ardue da implementare e commercializzare.

Attualmente, dunque, la terapia cellulare ha due grossi problemi:

- a partire da poche cellule bisogna produrne una grande quantità;
- i costi di produzione devono essere bassi.

Questo rappresenta una delle maggiori sfide della bioingegneria: lo sviluppo di un processo di produzione che sia compatibile con le specifiche GMP su larga scala e che sia in grado di generare prodotti basati su cellule staminali efficienti, riproducibili e sicuri senza costi elevati.

I bioreattori offrono una valida alternativa ai tradizionali sistemi di coltura statica, in quanto i bioreattori forniscono la scalabilità richiesta, incorporano sistemi di monitoraggio e controllo e possiedono la flessibilità operativa per essere usati in diverse applicazioni richieste dalla pratica clinica.

Requisiti dei bioreattori per espansione cellulare:

- **produzione di alte dosi di cellule.** Anche se molti trial clinici con cellule staminali sono ancora nelle prime fasi, e dunque i dettagli per le applicazioni cliniche sono ancora in fase di studio, i dati esistenti indicano la necessità di alte dosi di cellule per avere un'efficacia terapeutica. Per esempio le terapie basate su cellule mesenchimali e stromali richiedono dosi

- per le funzioni cellulari, per il metabolismo e per la biosintesi;
- **prodotti metabolici di scarto**: possono inibire la crescita cellulare (in particolare lattato e ammoniaca), quindi vanno controllati strettamente. Questo parametro e i nutrienti in ingresso determinano l'efficienza del processo, quindi devono essere costantemente gestiti;
- **fattori di crescita e citochine**: sono proteine di segnalazione che modulano una grande quantità di funzioni cellulari, incluse l'auto-rinnovamento, il differenziamento e la sopravvivenza.

La maggior parte delle cellule staminali sono dipendenti dall'adesione e necessitano di un substrato solido sul quale aderire e proliferare.

Per la coltura di cellule staminali vi sono 3 formati principali:

- colture in sospensione non aderenti;
- colture aderenti monolayer;
- colture aggregate.

Esempi di cellule staminali che possono essere coltivate sia come un monolayer aderente che come aggregati, in condizioni statiche o dinamiche, sono le cellule staminali mesenchimali (MSC) e le cellule staminali pluripotenti, come le cellule staminali embrionali (ESC) e le cellule pluripotenti indotte (iPSC).

Quando si progetta un bioreattore per l'espansione di cellule staminali si devono anche tenere in considerazione i requisiti biomeccanici dei diversi tipi di cellule. Per esempio, i bioreattori per cellule ancoraggio dipendenti devono essere in grado di alloggiare l'appropriato supporto fisico (microcarriers o scaffolds).

Inoltre, sia per cellule aderenti che per quelle in sospensione bisogna caratterizzare e adeguare l'idrodinamica del sistema in modo che sia adatta alle necessità delle cellule specifiche (a causa dell'effetto che possono avere gli sforzi di taglio).

Al giorno d'oggi il problema non è tanto la capacità di espandere o meno le cellule, quanto il massimizzare l'efficienza dei processi di espansione (ottenere un numero elevato di cellule con costi bassi).

Il **metodo più semplice** per l'espansione a livello di laboratorio prevede l'uso di superfici 2D piatte, come flasks, pozzetti, dischi di Petri, sacche opportunamente adattati alle cellule (in funzione di tipologia e condizioni di coltura). Si ottiene un singolo compartimento non agitato in cui i nutrienti diffondono alle cellule. Nonostante la semplicità, la facilità di manipolazione e il basso costo, questi sistemi di coltura statica hanno delle serie limitazioni:

- lo scambio di gas (come  $O_2$  e  $CO_2$ ) avviene solo all'interfaccia tra medium e gas e la natura statica della coltura porta alla formazione di gradienti di concentrazione → coltura non in condizioni ottimali. Ci vuole omogeneità spazio-temporale!
- Sebbene il monitoraggio sia possibile, è difficile (quasi impossibile) controllare i parametri;
- vanno bene su piccola scala (laboratorio), ma non se si vuole aumentare il numero di cellule prodotte. Infatti il rapporto superficie/volume ridotto implica l'uso di più recipienti di coltura, con il conseguente aumento di ingombro dell'incubatore, tempo di manipolazione, rischio di contaminazione e prezzo.

Una **prima alternativa** è quella di introdurre in laboratorio sistemi robotici automatizzati (per esempio inserirli in cappa e farli controllare da un computer). In questo modo tutti i processi sono programmati ed effettuati automaticamente. Si aumenta il numero di cellule prodotte, ma è un sistema costoso, ingombrante, non molto efficiente e comporta tanti problemi in caso di guasti. Di fatto non hanno senso perché replicano ciò che fa il biologo sulla stessa scala: è tecnologia sprecata e le condizioni di coltura sono sempre statiche.

Una **seconda alternativa** è l'uso di bioreattori. Sono una soluzione migliore in quanto aumentano il numero di cellule prodotte, il controllo, l'efficienza, la riproducibilità, la scalabilità, mentre diminuiscono dimensioni e tempi. Le condizioni di coltura possono essere dinamiche e permettono

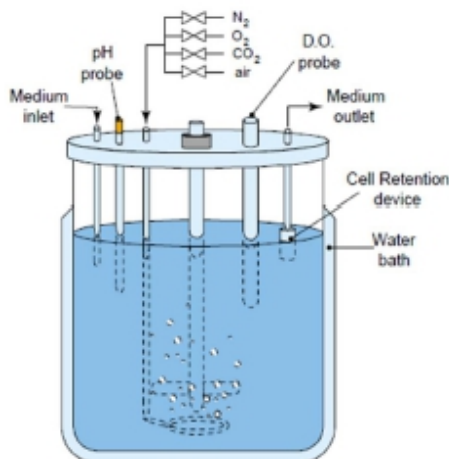
gas (CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>), quindi ha un controllo sull'iniezione che gli spinner flasks non hanno. È il bioreattore più usato per l'espansione di cellule staminali perché ha un sistema di monitoraggio e controllo, un sistema di perfusione e permette condizioni più costanti di medium. Si possono coltivare sia singole cellule, sia aggregati, sia cellule ancoraggio dipendenti su microcarriers o scaffolds. Si ha un ricambio omogeneo e costante di medium con piccole portate (4 ml/h), che non comportano sbalzi e permettono un'espansione migliore rispetto a un ricambio totale. Si possono ottenere concentrazioni di 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> cell/ml (clinicamente rilevanti) lavorando con volumi da 100 ml a 10 l. Questi bioreattori offrono maggiori efficienza, controllo, monitoraggio e scalabilità, ma generano degli sforzi di taglio dovuti al moto turbolento del medium che interferiscono con la pluripotenza delle cellule e con la riproducibilità del processo (problema ancora da risolvere). Inoltre non si riescono a controllare le dimensioni degli aggregati cellulari, che condizionano le cellule (maggiori dimensioni → isolamento delle cellule più interne).

Ricapitolando, gli stirred bioreactor sono adatti per la produzione su larga scala perché:

- promuovono la distribuzione omogenea dei componenti;
- migliorano il trasferimento di massa di gas e nutrienti in cellule e aggregati;
- facilitano il monitoraggio e il controllo dei parametri;
- sono scalabili.

Ma presentano i seguenti limiti:

- moto turbolento, che provoca uno stress sulle cellule, riducendone la vitalità e interferendo con l'equilibrio proliferazione/differenziamento, con conseguente eterogeneità della coltura;
- eterogeneità nelle dimensioni degli aggregati, che può influenzare il mantenimento della pluripotenza e interferire nel differenziamento e quindi inficiare la riproducibilità del processo;
- per evitare l'eccessiva crescita e il differenziamento non desiderato e per ristabilire condizioni omogenee si usano enzimi o procedure meccaniche. Questi passaggi sono eseguiti con manipolazione da parte degli operatori, che consuma tempo, è faticosa e dipende dall'operatore.



- *Bioreattori a fibre cave.* Sono sistemi a due compartimenti costituiti da un fascio di fibre vuote inserite in un cilindro. Le cellule possono essere coltivate all'interno o all'esterno delle fibre: il medium, perfondendo, lambisce le cellule. Il flusso all'interno di ciascuna fibra ha un profilo di velocità parabolico: per questo le cellule adese alla superficie interna sono soggette a uno shear stress uniforme che è direttamente proporzionale alla velocità del flusso intercapillare. La membrana delle fibre cave è semipermeabile. Questo tipo di reattori offre

Bioreactor configuration	Main characteristics
Roller bottles	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Versatile system with simple operation and usage</li> <li>• Low-cost solution</li> <li>• Monitoring and control is possible, but not straightforward</li> <li>• Simple design. Homogeneous conditions are achieved</li> </ul>
Stirred suspension bioreactor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bioreactor operation and sampling are easily performed</li> </ul>
Wave bioreactor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monitoring and control solutions are widely available</li> <li>• Disposable system and easily scalable</li> <li>• Contamination issues are minimized and sterilization is not needed, rendering it suitable for GMP operations</li> <li>• Low-shear stress environment and efficient gas transfer</li> <li>• High productivities can be achieved</li> <li>• Accumulation of toxic metabolic side-products is minimized, but continuous removal of secreted factors may be detrimental</li> <li>• Low shear stress environment, provides better mimic of the cellular microenvironment</li> </ul>
Rotating wall vessel Parallel plates bioreactor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monitoring and control is not straightforward</li> <li>• Provides 3D scaffolding for cell attachment and growth</li> <li>• Cell-cell or cell-matrix interactions are possible, providing a better mimic of the <i>in vivo</i> intricate structure</li> <li>• Low volumes and difficulties in scaling-up, when compared with other systems</li> </ul>
Hollow-fiber bioreactor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Only allows anchor-age-dependent cell culture</li> <li>• Concentration gradients are minimized, but still persist</li> <li>• In addition to suspension culture (as cell aggregates or single cells) also allows adherent growth when microcarriers are used</li> <li>• Hydrodynamic shear stress due to mechanical agitation can be harmful to cells</li> <li>• Microcarrier bridging and/or cell agglomeration may occur</li> <li>• Sampling, monitoring and control are not as simple as with other systems</li> <li>• High-cost solution</li> </ul>
Fixed and fluidized bed bioreactor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Complex system, not easily scalable</li> <li>• Medium-intensive culture system</li> <li>• Effects of hydrodynamic shear stress are unknown</li> <li>• Spatial concentration gradients are formed at the hollow-fibers interfaces</li> <li>• Scale-up is difficult to perform</li> <li>• Spatial concentration gradients (in the fixed bed configuration)</li> <li>• Possible shear stress effects (in the fluidized bed configuration)</li> </ul>

I bioreattori forniscono i seguenti elementi essenziali per la maturazione dei tessuti:

- spazio 3D;
- omogeneità delle condizioni;
- stimoli fisici.

Non è facile scegliere gli stimoli fisici, sia per tipo che per range di attuazione. Possono essere:

- elettrici;
- elettromagnetici;
- chimici;
- meccanici;
- interazione cellula – cellula e/o cellula – substrato.

Spesso in vivo si trovano diversi tipi di stimoli contemporaneamente: il dispositivo deve essere in grado di fornirli.

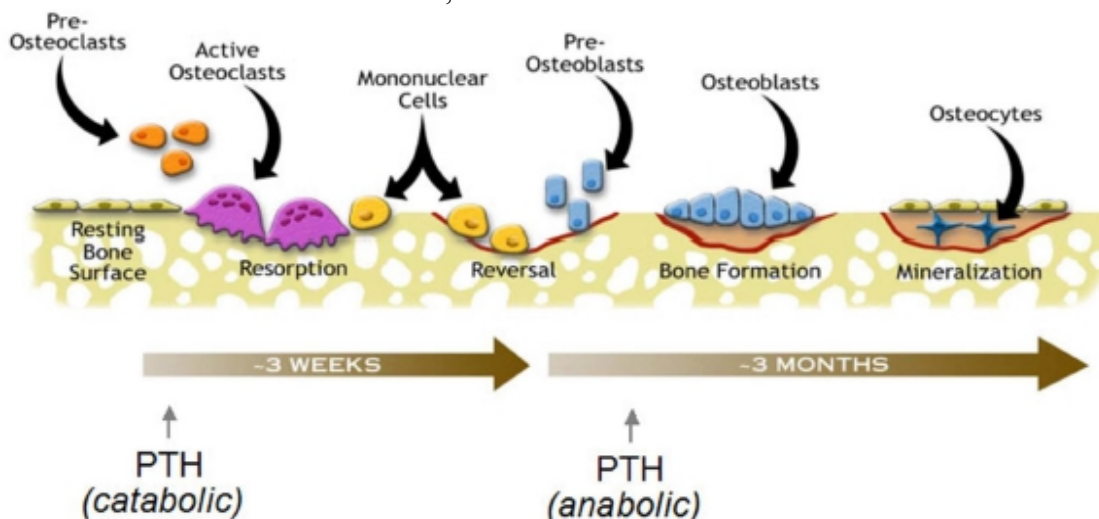
## BIOREATTORI PER TESSUTO OSSEO

Per l'aumento dell'aspettativa di vita, le malattie dell'osso che causano difetti di dimensioni critiche nel sistema scheletrico e che richiedono un intervento chirurgico stanno diventando un grande problema socioeconomico.

L'ingegneria dell'osso mira a generare quantità illimitate di sostituti del tessuto vitale tramite l'interfacciamento di cellule osteocompetenti di diverse origini e stadio di sviluppo con scaffold in biomateriali e la coltivazione del costruito in condizioni di coltura adatte in bioreattori.

L'osso è continuamente rinnovato da osteoblasti (formano l'osso) e osteoclasti (assorbono l'osso), che stabiliscono l'omeostasi in umani sani. Si pensa che gli osteociti percepiscano gli stimoli meccanici in diversi modi, per esempio attraverso il corpo cellulare, o processi dendritici o la flessione di cilia. Il trasferimento del segnale è mediato da gap junctions, semicanali e il rilascio di molecole di segnalazione nel fluido osseo. Il percorso preciso, però, non è ancora stato scoperto.

L'osso è un tessuto complesso che fornisce un supporto interno a tutti i vertebrati. Si sviluppa mediante osteogenesi, il processo di ossificazione, che parte come una forma altamente specializzata di tessuto connettivo. Durante l'osteogenesi, gli osteoblasti secernono collagene di tipo I, oltre a molte altre proteine (osteocalcina, sialoproteina, osteopontina). All'inizio l'ECM secreta dagli osteoblasti può essere amorfa o non cristallina, ma gradualmente si trasforma in cristallina. La mineralizzazione è un processo di formazione dell'osso promosso dagli osteoblasti e si pensa che parta da vescicole di matrice che gemmano dalla membrana plasmatica della cellula per creare un ambiente per la concentrazione di calcio e fosfato, permettendo la cristallizzazione. Il collagene serve come template e può anche iniziare e propagare una mineralizzazione indipendente dalle vescicole della matrice. Alla fine, gli osteoblasti sono circondati dalla matrice ossea che formano e diventano osteociti. Gli osteociti non sono metabolicamente inattivi: dissolvono e riassorbono alcuni minerali dell'osso tramite l'osteolisi. Il riassorbimento dell'osso è la funzione principale degli osteoclasti, che possono anche digerire la cartilagine calcificata (in tal caso sono chiamati condroclasti). La formazione da parte degli osteoblasti e il riassorbimento da parte degli osteoclasti mantiene l'osso in costante rinnovamento, rendendolo un tessuto dinamico.





meccanica per via della contrazione dei muscoli e dei movimenti del corpo. Le forze applicate all'osso durante i movimenti risultano in variazioni della pressione idrostatica, sforzi diretti sulle cellule, sforzi di taglio indotti dal flusso di fluidi e campi elettrici.

Bisogna fornire:

- sforzi di taglio: stimolano la proliferazione e il differenziamento di osteoblasti. Bisogna fornire sforzi di taglio in un range di 0,8-3 Pa;
- cerico meccanico: stimola la produzione di osseo e aumenta la massa ossea.

Si usano bioreattori **spinner flask** per la maturazione. Forniscono uno sforzo di taglio utile per la maturazione del tessuto (per la semina era dannoso). Lo shear stress dipende dalla vorticosità de flusso. Si ha un aumento della mineralizzazione del costrutto (cioè aumenta l'ECM del tessuto voluto), dei marker genici tipici (quindi c'è differenziamento delle cellule staminali) e della proliferazione degli osteoblasti. Un altro vantaggio è il costo contenuto del sistema. Svantaggi:

- si forma uno strato superficiale denso di cellule, che impedisce all'ossigeno e ai nutrienti di raggiungere l'interno dello scaffold;
- lo shear stress non è applicato in modo omogeneo, in quanto c'è un gradiente di forze convettive con il livello maggiore in prossimità dello stirrer.

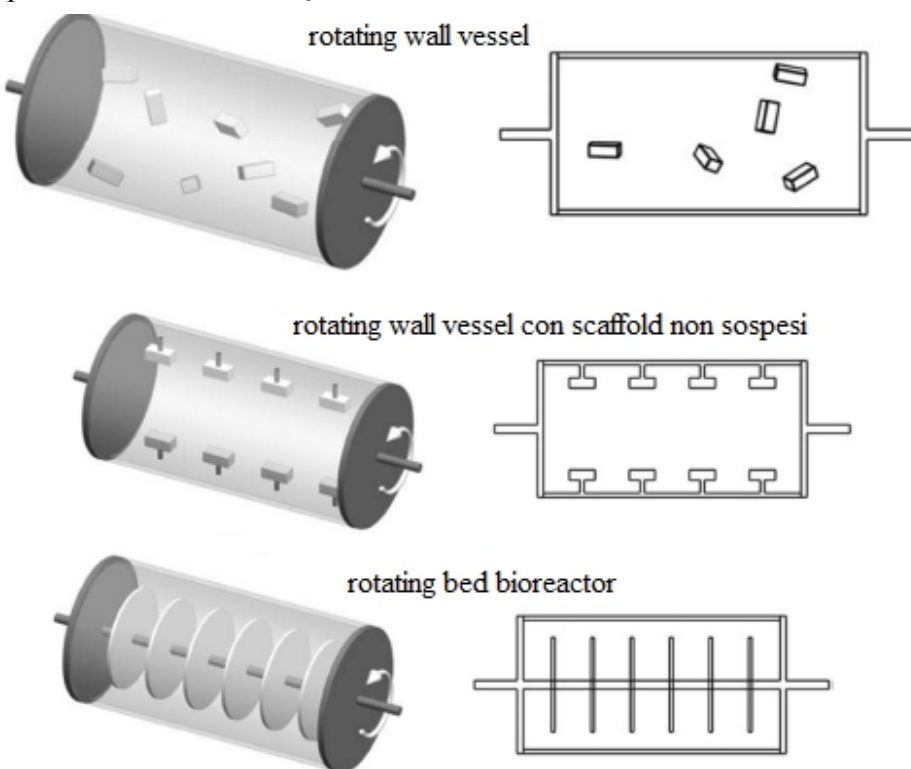
I **rotating wall vessel** sono stati progettati dalla NASA per simulare la microgravità. Si generano bassi sforzi di taglio che riducono le limitazioni alla diffusione di nutrienti e di prodotti di scarto. Nel 1999 Qiu ha usato questo sistema con scaffolds con densità simile a quella del medium, che quindi evitavano la collisione con le pareti del bioreattore. Questo metodo di coltura ha indotta la formazione di ECM.

Nel 2001 Botchwey ha usato questo sistema, osservando un aumento nel differenziamento degli osteoblasti e nella mineralizzazione rispetto a una coltura statica; ma Goldstein ha dimostrato una diminuzione degli stessi fattori usando lo stesso sistema! I risultati sfavorevoli sono stati confermati da Sikavitsas.

Nel 2008 Song ha usato un bioreattore rotating wall con gli scaffold attaccati alla parete tramite clamps in acciaio inox. Si sono ottenuti migliori proliferazione e differenziamento rispetto all'uso di spinner flask e rotating wall con scaffold sospesi.

Una variazione del rotating wall vessel è il **rotating bed bioreactor**, nel quale i costrutti sono attaccati direttamente all'asse del cilindro.

L'asse è l'unico componente che ruota. Il cilindro è pieno solo a metà, quindi i costrutti passano dal gas al liquido in maniera alternata. Oltre agli effetti positivi su proliferazione e differenziamento, uno dei benefici maggiori di questo sistema è la compatibilità con lo standard GMP. Non ruotando la camera, il ricambio di medium è più semplice. L'ampia superficie di adesione permette di mettere in coltura tanti scaffold senza che ci sia il rischio che collidano tra di loro o con le pareti della camera. Lo svantaggio di questo bioreattore è che si hanno mineralizzazione e distribuzione dei nutrienti sono superficiali. Questo è un problema per ogni bioreattore rotante, in quanto manca il sistema di perfusione.



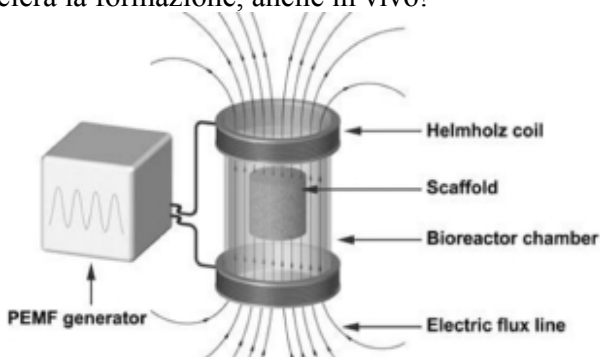
simil piezoelettriche. La vibrazione dei muscoli umani induce uno sforzo meccanico e correnti di specifiche frequenze nelle ossa. Durante l'attività dei muscoli posturali si sono osservate frequenze di 5-30 Hz e frequenze minori di 10 Hz durante il cammino. Poiché le ossa non sono sempre caricate con lo stesso carico, ma sono sottoposte a onde di stimolazione, non è importante solo il tipo di stimolo ma anche come esso venga fornito nel tempo. Se si forniscono campi elettromagnetici pulsatili si riduce la perdita di osso e se ne accelera la formazione, anche in vivo!

Si possono usare due bobine di Helmholtz collegate a un generatore di stimoli elettrici pulsati per generare un campo magnetico. In mezzo si pone il campione. Si vede che aumenta la mineralizzazione e l'espressione di proteine tipiche del tessuto osseo (esperimento di Fassina).

Bodamyali ha ottenuto un aumento dell'espressione di BMP (proteine osso) con campi pulsatili a dente di sega a 15 Hz.

In conclusione, l'uso di bioreattori a stimolazione elettromagnetica migliora il differenziamento in senso osteogenico e aumenta la proliferazione di cellule osteoprogenitrici, ma l'equipaggiamento necessario è molto costoso. Un altro vantaggio di questo sistema è che si può fornire lo stimolo in modo non invasivo, senza interferire con la coltura.

Si possono usare anche **bioreattori in vivo**, cioè si usa un organismo vivente come bioreattore. È quello che si fa con le prove in animale ed è lo step successivo al test in vitro. Si può usare anche un essere umano, come descritto da Warnke: si è impiantato un costrutto in un muscolo del dorso e dopo 7 settimane è stato impiantato per riparare un difetto alla mandibola.

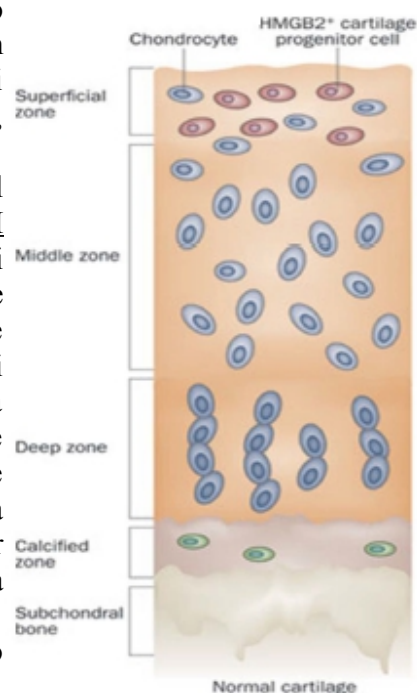


## BIOREATTORI PER CARTILAGINE ARTICOLARE

La cartilagine articolare è caratterizzata da scarsa cellularità, vascolarizzazione quasi assente e mancanza di nervi. Di conseguenza ha una scarsa capacità rigenerativa. Per questo motivo una volta che si genera un difetto, anche se piccolo, esso innesca un processo di degradazione progressiva. Solo un trattamento tempestivo del difetto può portare al ripristino della geometria e dell'integrità dell'articolazione. In clinica si può prendere la cartilagine da altre parti del corpo, ma non ce n'è grande disponibilità; un approccio eterologo ha problemi di rigetto e di contaminazione. La TE offre un trattamento alternativo, ma per il momento si è riusciti a riprodurre solo cartilagine con scarse caratteristiche meccaniche: bisogna sviluppare un bioreattore che faccia maturare il tessuto in maniera corretta. I bioreattori usati sono spinner flask, rotating wall vessel, hollow-fiber bioreactors, perfusion-based bioreactors, dynamic compression bioreactors.

Le cellule della cartilagine sono i condrociti, che rappresentano il 10% del volume del tessuto. Il resto è tutto ECM, composta da collagene di tipo II (10-30%) e proteoglicani (3-10%). Tutto il resto è acqua. I proteoglicani permettono di trattenere l'acqua grazie alla loro carica negativa, che la attrae (è una molecola bipolare). Vi sono anche sali e piccole quantità di altre proteine dell'ECM, glicoproteine e lipidi. La capacità della cartilagine di assorbire gli urti e le compressioni cicliche è data dal fatto che la sua struttura sia imbibita d'acqua: si comprime senza rompersi. La cartilagine articolare può essere divisa in 4 zone: la zona superficiale contiene condrociti e cellule progenitrici (10-20% del tessuto), la zona intermedia (40-60%), la zona profonda (30%) e la zona calcificata. Uno scaffold per tessuto cartilagineo, quindi, dovrà avere porosità e componenti diversi a seconda della profondità.

La cartilagine è un tessuto bifasico, composto da una fase fluida (fluido



## BIOREATTORI PER TESSUTO CARDIACO

Le malattie cardiache sono una delle principali cause di morte nel mondo occidentale: per questo motivo la ricerca è votata a trovare interventi terapeutici efficaci, dato che la completa rigenerazione non avviene per il tessuto cardiaco. Dopo un infarto i cardiomiociti non possono compensare la perdita di cellule perché non hanno capacità proliferativa; vi sono, inoltre, poche cellule staminali muscolari. Di conseguenza si sviluppa una marcata risposta infiammatoria che porta alla formazione di una cicatrice. Il tessuto cicatriziale inficia la contrattilità e le proprietà meccaniche ed elettriche del tessuto, portando a un rimodellamento delle pareti del ventricolo e infine alla perdita di funzionalità cardiaca.

In questa situazione, il trapianto è una misura essenziale per la sopravvivenza del paziente, ma vi sono pochi donatori, c'è il rischio di trasmissione di patologie e di rigetto e bisogna subire una terapia immunosoppressiva vita natural durante.

Si possono usare dispositivi medici, ma hanno una durata limitata, non sono in grado di ripristinare totalmente le funzioni naturali e spesso portano alla formazione di condizioni non fisiologiche, con la necessità di terapie anticoagulanti.

La TE cardiaca cerca di superare i limiti delle terapie attuali. A causa della complessità strutturale e funzionale del tessuto cardiaco, le strategie per la sua generazione in vitro richiedono:

- approfondite investigazioni sullo sviluppo del tessuto;
- adeguati stimoli biochimici e fisici.

In questo contesto i bioreattori possono essere usati come sistemi modello e (in futuro) come sistemi di produzione.

Il cuore è racchiuso in una sacca protettiva, detta *pericardio*, e la sua parete è formata da 3 strati: *epicardio* (il più esterno, composto da tessuto connettivo), *miocardio* (è quello che si tenta di rigenerare, è muscolo), *endocardio* (composto da cellule endoteliali).

Il miocardio è composto da:

- cardiomiociti;
- fibroblasti cardiaci;
- cellule nervose;
- cellule vascolari;
- tessuto connettivo.

I cardiomiociti (75%) e i fibroblasti costituiscono la maggior parte delle cellule del tessuto cardiaco. I cardiomiociti sono cellule contrattili, disposte in modo allineato a formare miofibre che forniscono l'ottimale accoppiamento meccanico ed elettrico. Sono cellule mononucleate con un diametro di circa 25  $\mu\text{m}$  e una lunghezza di 100  $\mu\text{m}$ . Presentano sarcomeri. I cardiomiociti sono collegati tra loro da *dischi intercalari*, siti specializzati nell'adesione e nella comunicazione tra cellule. Insieme ai dischi intercalari si trova una rete di *gap junction*, formata da connessina 43 (si trova solo nel cuore!), che oppone pochissima resistenza al passaggio di elettricità.

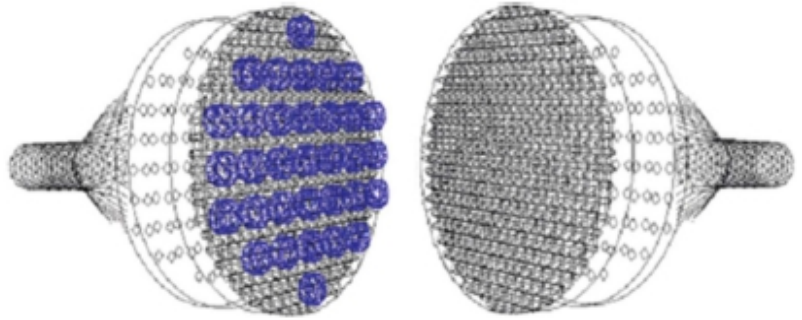
I i fibroblasti cardiaci sono responsabili della produzione e del rinnovamento della ECM. L'ECM cardiaca permette l'orientazione dei miociti, la trasmissione delle forze e il collegamento dei miociti a nervi e capillari. Inoltre fornisce un supporto elastico durante il riempimento dei ventricoli. È composta da collagene di tipo I e di tipo III.

L'ECM costituisce una piccola parte della massa del miocardio: per questo per ingegnerizzare il tessuto bisogna usare alte frazioni cellulari. La necessità di tante cellule di un tipo cellulare che non prolifera comporta l'uso di **cellule staminali** (prima difficoltà della TE cardiaca). A scopo di ricerca si fanno differenziare cellule pluripotenti indotte, di cui bisogna ancora dimostrare l'utilizzabilità in umano.

Una seconda difficoltà è costituita dalla **rete vascolare**, in quanto nel miocardio ogni miocita è direttamente adiacente a molti capillari.

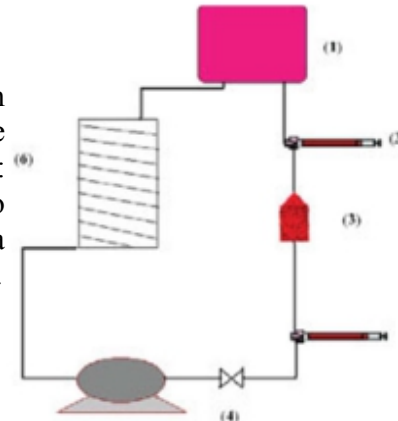
ha aumentato la presenza di marker cardiaci e ha diminuito la soglia di eccitazione.

Nel 2009 Dvir sviluppa un bioreattore a perfusione con una griglia che fornisce un flusso di fluido omogeneo e una massima esposizione al medium che perfonde. Si aumenta la vitalità cellulare rispetto al caso statico.



In seguito si è iniziata a fornire anche una stimolazione meccanica.

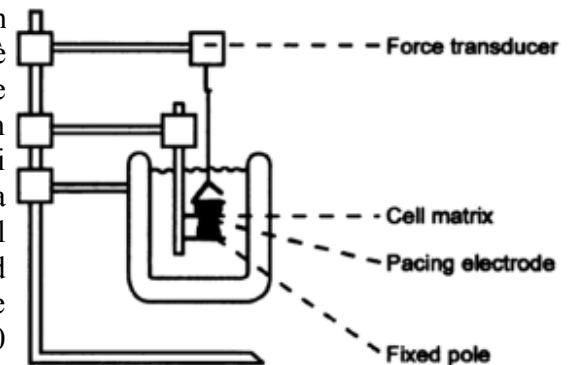
Nel 2008 Brown ha combinato perfusione e stimolazione meccanica in un singolo sistema utilizzando una valvola (pinch valve) con funzione di stimolazione. La valvola si apriva con una frequenza di 1 Hz: l'accumulo del fluido durante il periodo di chiusura risulta in uno sforzo di compressione sul tessuto. Questo sistema ha portato a migliori capacità contrattili del tessuto e a minori soglie di eccitazione.



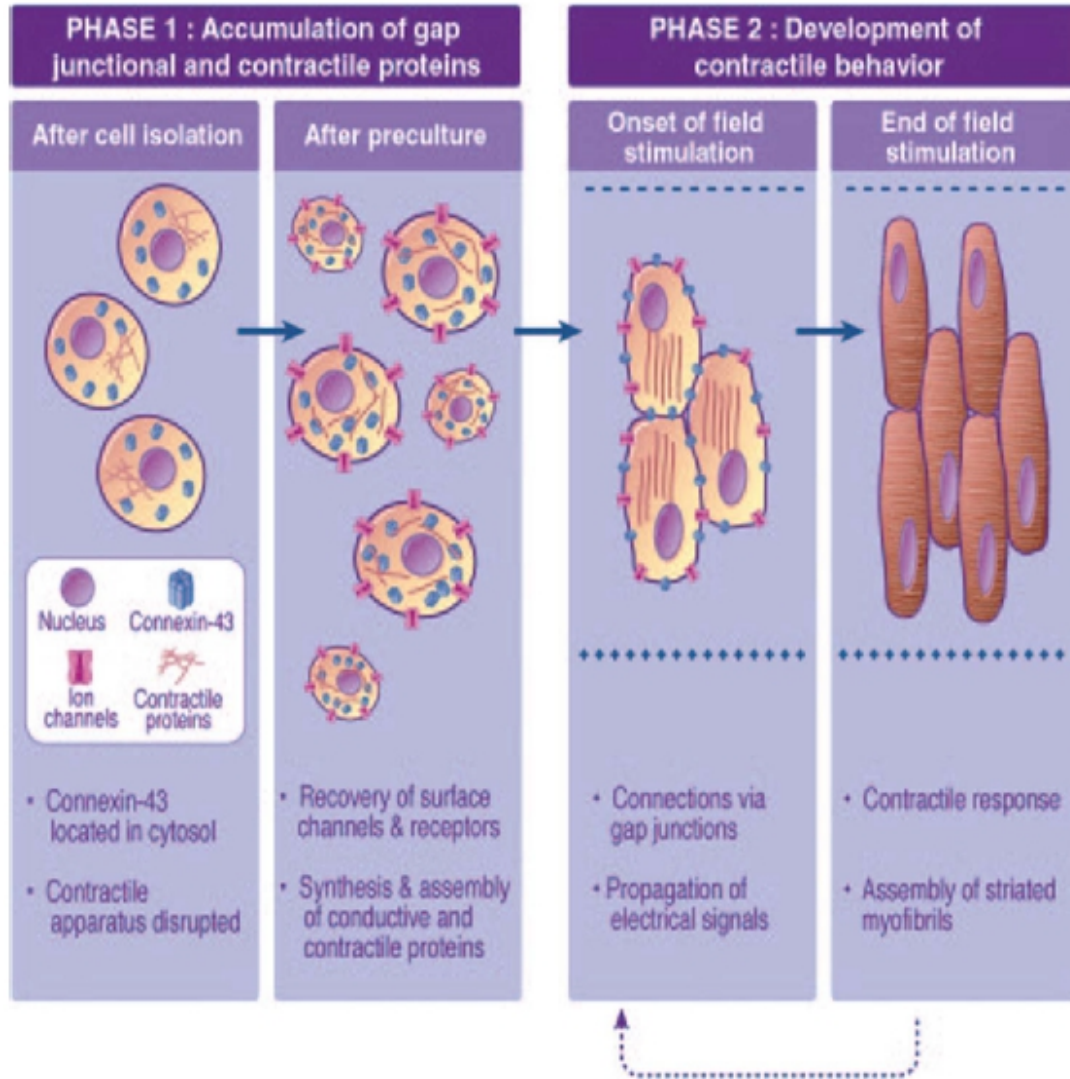
Il gruppo di Eschenhagen e Zimmerman (che ha il background dello sviluppo di farmaci → mira a produrre sistemi modello per drug screening) ha proposto un approccio significativo per la TE, coltivando cellule neonatali di ratto o pollo in un gel di collagene o in Matrigel. (per i cardiomiociti di ratto è fondamentale il Matrigel, che deriva da ECM bovina e quindi non si può usare per impianti)

Nel 1997 Eschenhagen coltiva per la prima volta le cellule su matrigel o gel di collagene. Oltre alla presenza delle cellule di interesse, il gel offre una struttura 3D e le proteine dell'ECM. Il costrutto era alloggiato tra due tubicini in vetro coperti di velcro, tenuti in posizione da uno spacer in metallo. Non si stimola meccanicamente e la struttura viene lasciata in incubatore per un periodo di tempo che va da alcuni giorni ad alcune settimane. Nel tempo il gel inizia a restringersi restando attaccato al velcro, formando una struttura "a clessidra". Il tessuto si indurisce in funzione delle barrette che lo tengono. Per la prima volta si ottiene un tessuto **3D**! All'inizio le singole cellule si contraggono in maniera spontanea e dopo 3-5 giorni la contrazione diventa **sincrona**! Non è ancora tessuto cardiaco ottimale. Sul bordo del costrutto le cellule formano dischi intercalari e sarcomeri (→ giunzioni → connessina 43 → passaggio segnale elettrico). È stata valutata la forza di contrazione del tessuto ottenuto tramite un *organ bath* (non è un bioreattore, ma uno strumento di misura!).

La misura non è facile, in quanto le forze in gioco sono estremamente piccole (mN) per piccole porzioni di tessuto. L'*organ bath* consiste di un recipiente contenente medium, tenuto a temperatura e con 5% di CO<sub>2</sub>, all'interno del quale si inserisce il costrutto. Data la scarsa entità delle forze in gioco, tutto ciò che si frappone tra il costrutto e la cella di carico deve essere trascurabile rispetto ad essa, altrimenti potrebbe inficiare la misura. Vi sono anche due elettrodi per fornire uno stimolo elettrico dall'esterno (durata 10 ms, 20-40 V, frequenza 1,5 Hz). L'intero sistema è molto difficile da mantenere in funzione, è costoso e inoltre costringe a lavorare fuori dal bioreattore (non



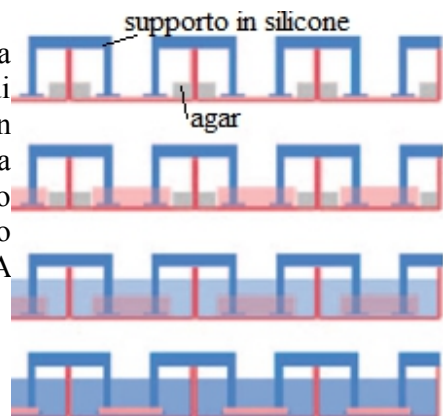
contrattili delle cellule individuali e aumenta il numero di cellule funzionalmente accoppiate impegnate in una contrazione sincrona.



Nel 2009 Heidi Au ha sviluppato un microchip cardiaco (cioè una struttura con topografia con dimensioni microscopiche) collegata a due elettrodi d'oro. La struttura ha canali e colline con dimensioni di 0,5  $\mu\text{m}$  ciascuno ( $\rightarrow$  1  $\mu\text{m}$  di periodo). In questo modo si unisce la stimolazione morfologica (la topografia mima quella del tessuto nativo e le cellule ne risentono) a quella elettrica. Si nota che le cellule sono altamente allineate, elongate e presentano sarcomeri e dischi intercalari.

**Microbioreattori per tessuto cardiaco:** recentemente sono state sviluppate piattaforme di screening miniaturizzate per studiare l'impatto di parametri chimici e fisici sulla maturazione, struttura e funzione del tessuto. La tecnologia micro comporta meno costi e meno spazio occupato in laboratorio. Usata per lo sviluppo di tessuti modello, consente di ottenere tanti dati in poco tempo.

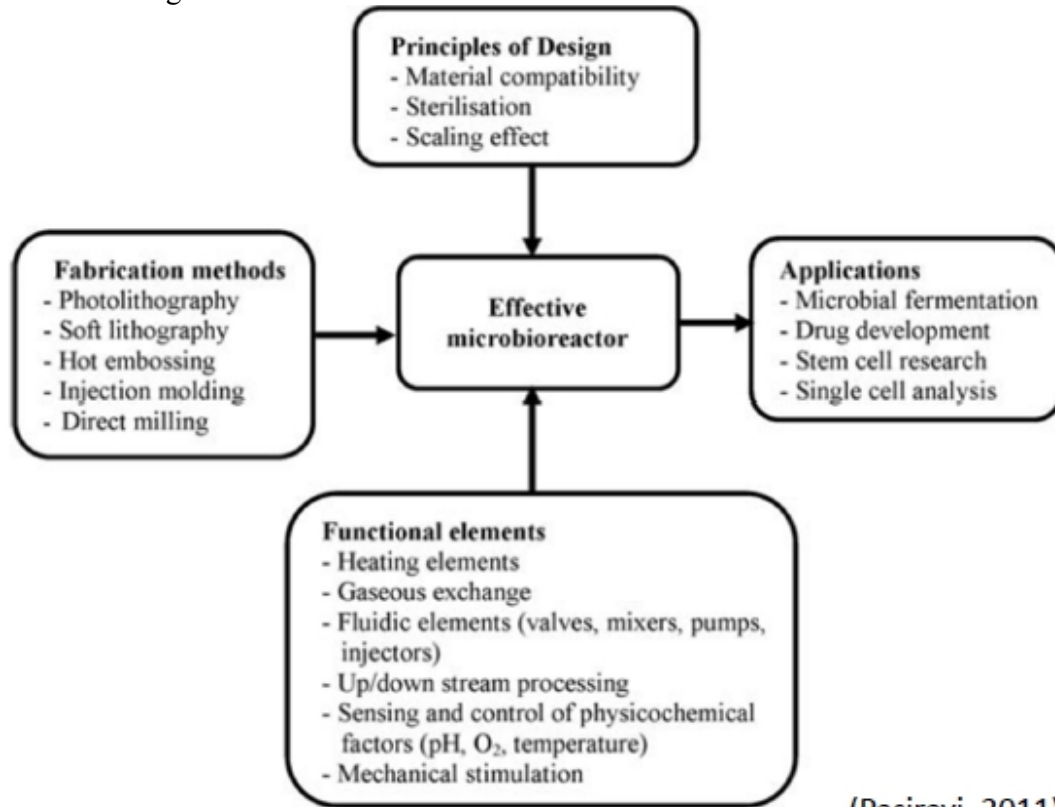
Nel 2010 Hansen (gruppo Eschenhagen) ha sviluppato una piattaforma per drug screening basata su un largo numero di costrutti miniaturizzati. Per fabbricarli si usa uno stampo in teflon, che, posto in una piastra multi well, non occupa completamente lo spazio dei pozzetti. Lo spazio lasciato libero viene riempito di agar e lo si fa indurire. Togliendo lo stampo in teflon, resta uno spazio rettangolare vuoto nel pozzetto. A



- compatibilità con i processi di sterilizzazione (oppure elementi usa e getta);
- **effetto di scala**: andando nella microscala i fenomeni fisici cambiano perché aumenta il rapporto superficie/volume. Per questo bisogna considerare delle forze che sulla macroscala erano trascurabili:
  - tensioni superficiali;
  - resistenza dei fluidi;
  - forze capillari.

I massimi numeri di Reynolds raggiunti sono di circa 100, quindi il flusso è laminare: le forze viscoso predominano sulle forze d'inerzia e bisogna tenerne conto nella progettazione!

È importante valutare e controllare temperatura e pH, in quanto se non c'è una distribuzione omogenea si hanno gradienti molto elevati.



(Pasirayi, 2011)

Elementi per MBR:

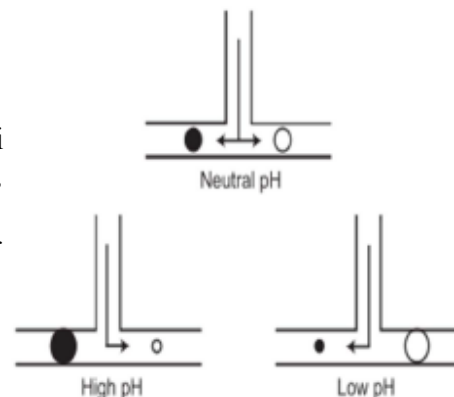
- micromixer;
- microvalvole;
- micropompe;
- elementi di sensing.

**Micromixer:** si occupa del mescolamento di fluidi nel dispositivo, molto importante se si sta usando più di un fluido. Il mixing è necessario per aumentare l'attività enzimatica, mantenere una distribuzione omogenea di temperatura e pH, garantire migliori velocità di trasferimento dell'ossigeno. Alla microscala sono assenti gli effetti inerziali associati alla turbolenza, quindi due fluidi che confluiscono non si mescolano se non in una piccolissima zona all'interfaccia grazie alla diffusione. Non ci si può basare solo sulla diffusione, da cui la necessità di usare mixer, che possono essere attivi o passivi.

I *mixer attivi* usano forze esterne per indurre un mixing caotico (sfruttano soluzioni tecnologiche). Si possono usare forze elettrocinetiche, ultrasoniche, magnetiche, termiche, centrifughe o stirrer elettroidrodinamici e attuatori piezoelettrici. L'elemento attivo comporta un aumento del costo del

**Microvalvole basate su idrogel:** sfruttano la capacità degli idrogeli di rispondere a vari tipi di stimoli, come pH, temperatura, campi elettrici, luce, antigeni. Vengono spesso chiamate valvole intelligenti o adattive.

Il pH dovrebbe rimanere costante → questa soluzione non va bene per cellule delicate.



Schematic of a flow sorter. At neutral pH, the flow goes left and right; however, at high pH one gel expands while the other contracts to direct fluid right. The opposite occurs at low pH, the black gel expands in high pH while the white gel expands at low pH. (Eddington and Beebe, 2004)

**Micropompe:** il loro sviluppo è ancora al limite della realizzabilità tecnologica. In un microbioreattore, una micropompa attua e fornisce una pressione per pompare il medium di crescita, le cellule del sistema e per trasportare campioni da un compartimento all'altro. Possono essere attive o passive.

Le *pompe attive* hanno parti in movimento e il loro sviluppo è ancora oggetto di ricerca. Si usano ancora pompe macroscopiche (a siringa o peristaltica), che devono essere in grado di gestire piccole portate. Inoltre sono costose.

Le *micropompe passive* non hanno parti in movimento: trasformano un certo comportamento o proprietà fisica in un movimento del fluido. La loro fabbricazione è meno complessa rispetto alle pompe attive, cosa che le rende adatte a una produzione di massa a basso costo.

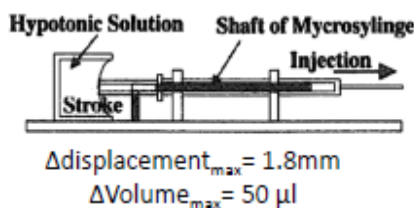
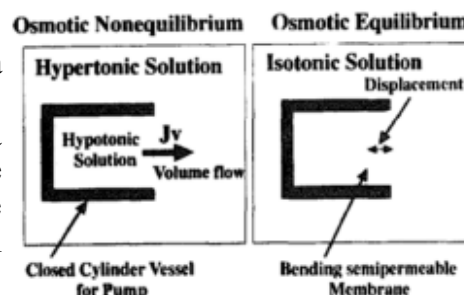
**Micropompa basata sulla pressione osmotica:** sviluppata nel 1996, sfrutta un principio chimico per ottenere un movimento del fluido.

Un serbatoio contiene una soluzione ipotonica ed è separato da una soluzione ipertonica da una membrana semipermeabile che può essere attraversata dall'acqua. L'acqua tende ad andare verso la soluzione ipertonica: nel tempo si raggiunge una situazione isotonica. Il volume nel serbatoio diminuisce: la membrana, che è l'unica parte mobile, si sposta.

Fluido si muove → membrana si flette.

Potenziale chimico → azione meccanica.

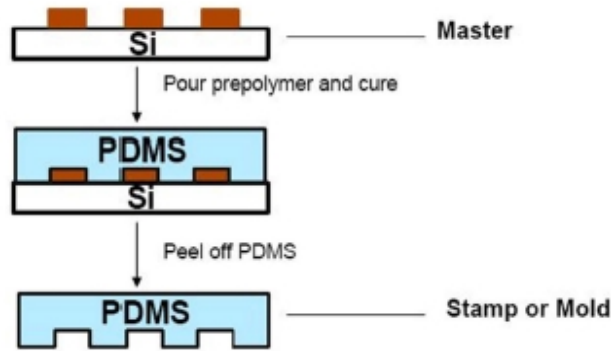
Questo sistema è stato usato per ottenere una micropompa a insulina, nella quale lo spostamento della membrana attivava una microsiringa.



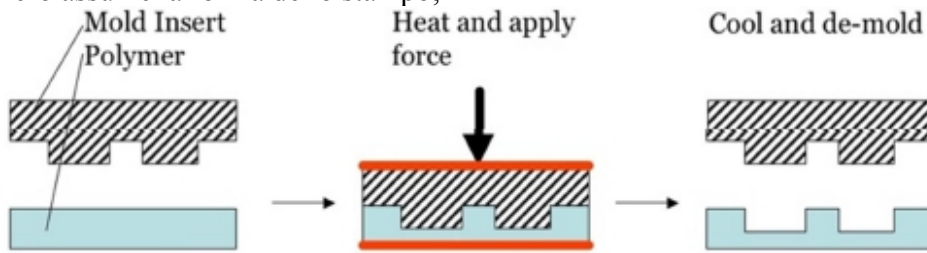
**Elementi di sensing:** servono a misurare i parametri del processo in real time. Servono sensori miniaturizzati integrati. Le tecniche più comuni sono:

- metodi ottici:
  - fluorescenza;
  - assorbimento;
  - spettroscopia raman;
  - near-infra red (NIR);
- metodi elettrochimici:
  - impedenza;
  - amperometrici;
  - conduttometrici;

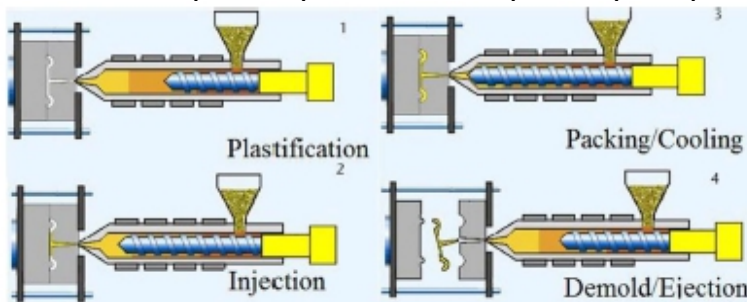
microfabbricazione si cola un materiale elastomerico e lo si fa solidificare;



- *hot embossing*: uno stampo inerte viene accoppiato a un polimero, che viene riscaldato. Il polimero assume la forma dello stampo;



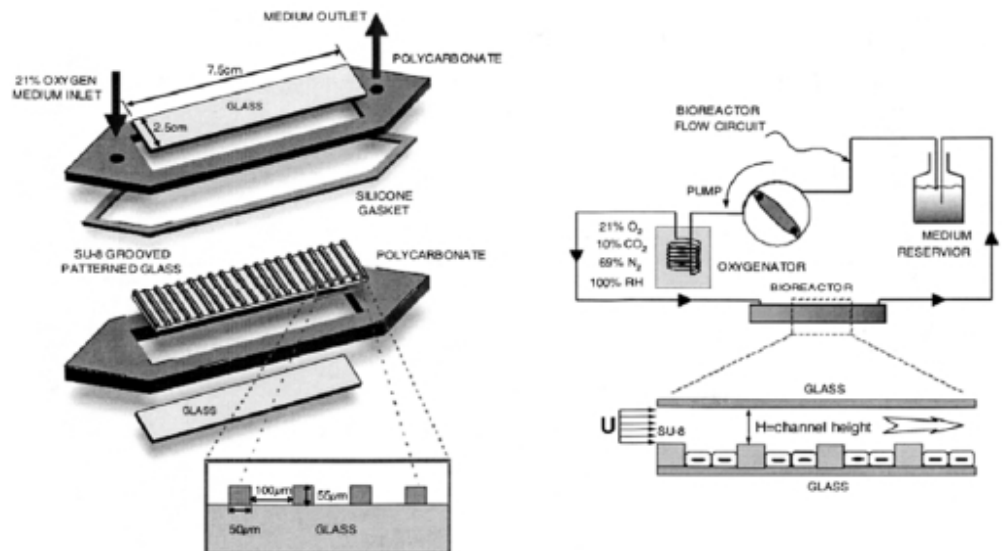
- *micro iniezione*: in uno stampo si cola un polimero riscaldato. È la tecnica più semplice, ma è costosa per via dello stampo. Non può essere usata per fare pochi pezzi;



- *micro-milling*: è come la fresatura, ma usa punte piccolissime che lavorano con elevata affidabilità e risoluzione. Non si scalda il materiale, ma si possono sviluppare tensioni interne che possono portare a deformazioni del pezzo nel tempo.

### Microbioreattori per l'ottimizzazione di bioprocessi.

Nel 2005 è stato sviluppato un supporto per epatociti che consente di ossigenarli molto senza sottoporli a sforzi di taglio. È costituito da un supporto con microcanali in cui si posizionano le cellule, protette da pareti trasversali. Viene inserito in un circuito di perfusione. Le cellule ricevono O<sub>2</sub> senza risentire degli sforzi di taglio perché il flusso non le lambisce





# RIASSUNTI BIOREATTORI

1

La **MEDICINA RIGENERATIVA** ha lo scopo di rigenerare tessuti biologici danneggiati sviluppando sostituti che mimino l'ECM naturale per guidare la crescita di nuovo tessuto funzionale in vivo o in vitro al fine di ripristinare, mantenere o migliorare la funzione del tessuto.

## COLTURE CELLULARI TRADIZIONALI:

- strumenti:
  - pipette monouso, bottiglie e fiaschette bidimensionali;
  - cappa;
  - incubatori;
- condizioni:
  - **bidimensionali** → manca naturale tridimensionalità dei tessuti;
  - **statiche** → formazione gradienti di concentrazione, diffusione insufficiente;
  - **procedure manuali** → consumano tempo, dipendono da operatore, no standardizzazione.

Un **BIOREATTORE** è uno strumento in cui i processi biologici e/o biochimici si sviluppano sotto stretto controllo e monitoraggio delle condizioni ambientali e operative.

- ↳ si misura ciò che succede
- ↳ si agisce attivamente per regolare un parametro

I bioreattori possono fornire:

- condizioni di coltura 3D
- condizioni di coltura dinamiche
- ambiente di coltura automaticamente monitorato e controllato
- aumento efficienza del processo tramite automazione, riproducibilità, standardizzazione, sicurezza. *efficienza* *riproducibilità*

↓ fattore umano  
↑ automazione e indipendenza da operatore } ⇒ sostenibilità clinica ed economica

Funzioni chiave di un BR:

- semina cell su scaffold → massimizzano uso cell
  - ↳ controllano distribuzione cell
  - ↳ aumentano riproducibilità processo
- mantenimento ambiente di coltura controllato → forniscono modelli delle funzioni cell
  - ↳ aumentano riproducibilità processo
- stimolazione fisica del costrutto → migliorano proprietà funzionali e strutturali del tessuto

I BR vengono usati come:

- **sistemi di espansione**: fanno proliferare cell
  - ↳ piastra basculante
  - ↳ piastra sovrapposte perfuse da terreno di coltura
  - ↳ slinging system
- **sistemi per seminare**: si sfrutta perfusione.
- **sistemi di decellularizzazione**: si asporta materia cellulare da un organo, lasciando solo ECM.
- **sistemi modello in vitro**: si studia:
  - come si comportano e sviluppano le cell
  - come i tessuti rispondano a stimoli
  - valutare performance scaffold
  - sviluppo di farmaci
  - modellizzare patologie
- **sistemi di produzione**

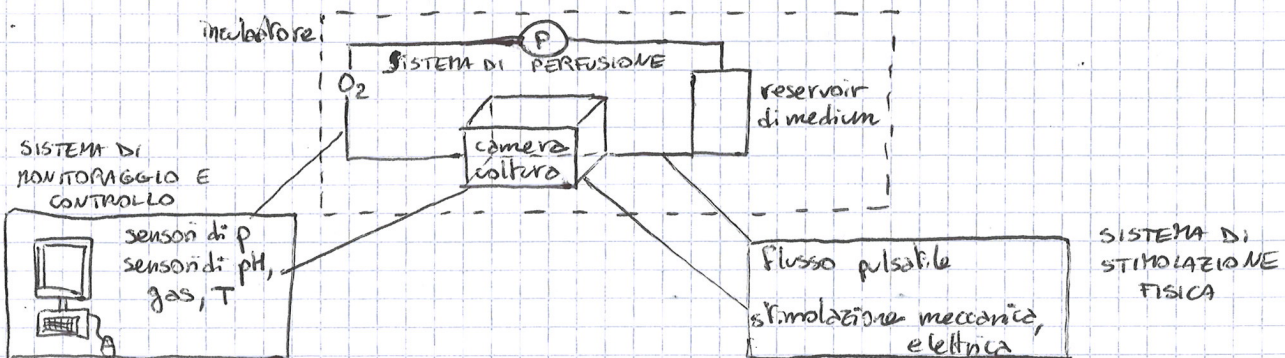
COMPONENTI BR:

sempre presente

CAMERA DI CULTURA

PUÒ essere presente

SISTEMA DI MONITORAGGIO E CONTROLLO  
SISTEMA DI RICIRCOLO O PERFUSIONE  
SISTEMA DI STIMOLAZIONE FISICA



parametri da monitorare

- AMBIENTALI (medium)
- COSTRUITTO

	parametri ambientali	parametri del costruito
FISICI	T, p, flusso	rigidezza, forza, permeabilità (resistenza)
CHIMICI	pH, O <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> disciolti, contaminanti chimici, concentrazione di metaboliti e cataboliti, proteine secrete	composizione dello scaffold e della ECM sviluppata
BIOLOGICI	contaminazione batterica (sterilità)	numero di cell, velocità di proliferazione, vitalità, concentrazione di proteine intracellulari

SENSORI

- INVASIVI: posti in c.c. o a contatto con il costruito
- NON INVASIVI: posti fuori da c.c., monitorano ciò che avviene al suo interno
- INDIRETTI: lontani da c.c., collegati al circuito tramite shunt

	SVANTAGGI	VANTAGGI
INVASIVI	<ul style="list-style-type: none"> <li>devono essere sterili e sterilizzabili</li> <li>difficile calibrazione</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>alta specificità</li> <li>alta sensibilità</li> </ul>
NON INVASIVI	<ul style="list-style-type: none"> <li>necessità di c.c. trasparente</li> <li>bassa specificità</li> <li>bassa sensibilità</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>no necessità sterilità</li> <li>facile calibrazione</li> </ul>
INDIRETTI	<ul style="list-style-type: none"> <li>ritardo nella misura ⇒ artefatti!</li> <li>feedback imperfetto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>alta specificità</li> <li>alta sensibilità</li> </ul>

**SENSORI:** dispositivi in grado di rilevare dati fisici dall'ambiente e trasmetterli a una unità di monitoraggio e controllo

Requisiti di progetto per sensori:

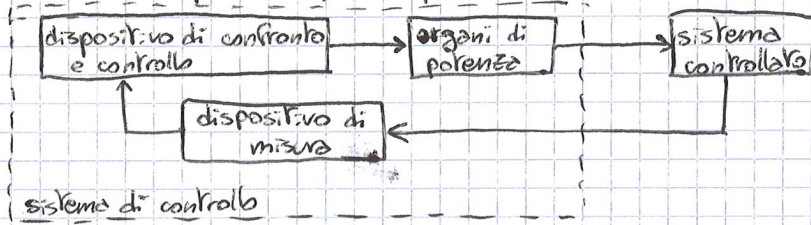
- dimensioni ridotte
- risposta stabile nel tempo
- possibilità di sterilizzazione con tecniche disponibili
- intervallo di linearità nel campo di misura
- risoluzione compatibile con la variazione minima della grandezza di interesse

Il monitoraggio del costruito è ancora oggetto di ricerca.

- ↳ di proprietà funzionali: come si comporta?
- ↳ di proprietà morfologiche: quali sono forma e organizzazione?

**Sistema di controllo:** consente di far variare nel modo voluto le grandezze di uscita di un sistema. Obiettivi:

- rispondere il più prontamente possibile alle sollecitazioni;
- fornire la risposta più precisa possibile con un limite ristretto di errore.



**ATTUATORI:** dispositivi in grado di alterare lo stato fisico di un sistema sulla base di informazioni ricevute dal sistema di controllo.

**PROGETTAZIONE DI UN PRODOTTO**

- 0 - bisogno
- 1 - ricerca
- 2 - concept
- 3 - design
- 4 - sviluppo
- 5 - documentazione del progetto
- 6 - prototipo
- 7 - ingegnerizzazione (vende il prototipo definitivo)
- 8 - produzione



## CLASSIFICAZIONE BIOREATTORI

- ↳ **non fisiologici**: rendono dinamica la coltura.
  - ↳ spinner flask
  - ↳ a parete rotante
- ↳ **fisiologici**: riproducono ambiente simil-fisiologico grazie a stimoli fisici.
  - ↳ a compressione/trazione
  - ↳ a pressione idrostatica
  - ↳ a perfusione

**SPINNER FLASK** sono non fisiologici. Ottengono una sospensione di cell. mediante rotazione del fluido. Girano a 50-80 rpm e il 50% del medium è cambiato ogni 2 giorni. Volumi vari: da 125 ml a 2 L. Si possono coltivare per carrier per cell. ancoraggio dipendenti.

### VANTAGGI

- facili da usare
- basso costo
- miglioramento rispetto a coltura statica

### SVANTAGGI

- albero, elica o stirrer possono danneggiare cell.
- sforzi di taglio non fisiologici
- trasferimento di massa insufficiente per avere condizioni omogenee nello scaffold.

**PARETE ROTANTE** sono non fisiologici. Mettono in moto il fluido mediante rotazione delle pareti di una camera cilindrica. La  $v$  di rotazione si ricava sperimentalmente o con CFD e va variata con aumento peso costruito  $\rightarrow$  monitoraggio costante. Ruotano a 15-30 rpm.

### VANTAGGI

- meno sforzi di taglio
- no oggetti che possono urtare cell.

### SVANTAGGI

- più costoso di spinner flask

$$F_{inerzia} + F_{peso} = F_{viscosa}$$

**A COMPRESSIONE**: sono fisiologici. Si ottiene compressione sul costrutto mediante il movimento di un pistone, provocato da una camma eccentrica.

Esempio: C10-12 Carl. Gen. (TG $\Phi$ )

BOSE: Electron Force  $\left\{ \begin{array}{l} \rightarrow \text{compr.} \\ \rightarrow \text{traz.} \\ \rightarrow \text{perf.} \end{array} \right.$

**A TRAZIONE**: sono fisiologici. C'è bisogno di un afferroggio per lo scaffold. Usati per legamenti, tessuto cardiaco, tessuto vascolare, muscoli, tendini.

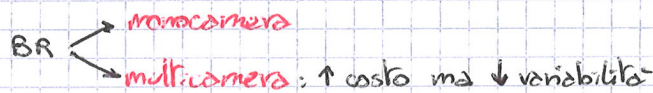
Esempi: Flexcell FX-5000 (trazione circonferenziale ottenuta creando il vuoto)  
 Mechano culture B3 (stimolazione biassiale grazie a particolare afferroggio)  
 Multi-well Mechano culture (sfrutta deformazione del supporto, ma non è omogenea)

**A P IDROSTATICA**: sono fisiologici. Sfruttano il movimento di un pistone per ottenere compressione. Non sono molto diffusi.

**A PERFUSIONE**: sono fisiologici. Forzano il medium a passare attraverso lo scaffold. Sono utili anche per la semina.

Esempi: U-cup (ubi usa e getta, pompa a siringa)  
 P3D chambers (cc. usa e getta; sistema autosufficiente, ma complesso da montare)  
 3D Culture Pro Bioreactor (chiusura a incastro)

Le aziende sono orientate sulla produzione di prodotti semplici e meno costosi.



## CICLO DELLA TE

1. cell. prelevate dal paziente (biopsia)
2. cell. isolare
3. cell. espanso. Uso BR:
  - induce lavoro manuale e fatica
  - automatizza prelievo campioni
  - standardizzazione processo
  - apporto continuo di flusso
4. cell. seminate su scaffold. Uso BR:
  - migliora semina
  - colonizzazione omogenea
  - standardizzazione
  - apporto continuo medium
5. maturazione tessuto. Uso BR:
  - condizioni di coltura controllate
  - campionamento automatico
  - standardizzazione
  - apporto continuo medium
  - stimoli fisiologici
6. tessuto maturo  $\rightarrow$  impiantato in paziente  
 $\rightarrow$  usato per rest (uso BR come punto 5)

## BR PER MATURAZIONE DEI TESSUTI

④

- ↳ spazio 3D
- ↳ omogeneità condizioni
- ↳ stimoli fisici

In vivo la vitalità delle cell è mantenuta da una rete vascolare con spazi di 100-200  $\mu$ m  $\Rightarrow$  la generazione di un tessuto ad alta attività metabolica non può basarsi solo su diffusione, ma deve sfruttare anche meccanismi attivi (perfezione, convezione).

In vivo si trovano diversi tipi di stimolo contemporaneamente (elettrici, chimici, meccanici, ecc.) e il BR deve poter riprodurre questa situazione.

### BR per tessuto osseo

- ↳ formato da OSTEOBLASTI  $\rightarrow$  diventano OSTEOCITI quando circondati da ECM
- ↳ riassorbito da OSTEOCLASTI

Durante l'osteogenesi gli osteoblasti secernono collagene di tipo I, osteocalcina, osteopontina, e promuovono la mineralizzazione. Osteoblasti e osteoclasti mantengono il tessuto osseo in costante rinnovamento  $\rightarrow$  TESSUTO DINAMICO.

Formazione osso nell'embrione:

- ossificazione intramembranosa: cellule mesenchimali differenziano in osteoblasti (per ossa craniofacciali)
- ossificazione endocondrale: cell. mesenchimali  $\rightarrow$  cartilagine  $\rightarrow$  osso.

SEEDING: si usano tecniche di semina dinamiche. Bisogna perforare tutto il volume dello scaffold ( $\Rightarrow$  no spinner flask). La centrifugazione rende la distribuzione cell. più omogenea (Godbey, 2004). La perfusione bilaterale è più efficiente (Du, 2003). Si usa BR oscillatory flow.

MATURAZIONE: i BR devono fornire al costrutto nutrienti,  $O_2$  e stimoli biofisici per dirigere il differenziamento cell. Il rifornimento di nutrienti e  $O_2$  è critico per distanze superiori a 100-200  $\mu$ m. Forze applicate all'osso in vivo risultano in:

- variazioni p. idrostatica
- sforzi diretti sulle cell.
- sforzi di taglio indotti dal flusso di fluidi
- campi elettromagnetici

- Si forniscono:
  - SFORZI DI TAGLIO (0,8-3 Pa)  $\Rightarrow$   $\uparrow$  proliferazione e differenziamento osteoblasti
  - CARICO MECCANICO  $\Rightarrow$   $\uparrow$  produzione di osso e massa ossea.

BR usati:

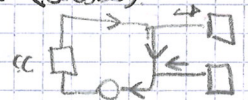
- **spinner flask:**

<b>VANTAGGI</b>	<b>SVANTAGGI</b>
- sforzo di taglio utile per maturazione	- strato superficiale denso di cell. $\Rightarrow O_2$ e nutrienti non arrivano all'interno dello scaffold
- $\uparrow$ mineralizzazione, marker genici tipici, proliferazione osteoblasti	- shear stress non omogeneo (gradiente tra stirrer e sommità)
- basso costo	
- **rotating wall vessel:** bassi sforzi di taglio  $\Rightarrow$   $\downarrow$  limitazione a diffusione di nutrienti e prodotti di scarto. Risultati variabili: Qu (1985), Botchway (2001)  $\Rightarrow$   $\uparrow$  mineralizzazione e differenziamento; Goldstein, Silevits (2001)  $\Rightarrow$   $\downarrow$  " " " " Song (2008): rotating wall con scaffold attaccati a parete  $\Rightarrow$   $\uparrow$  proliferazione e differenziamento rispetto a scaffold sospesi.
- **rotating bed BR:** i costrutti sono attaccati direttamente all'asse del cilindro. Compatibilità con GMP! No rischio collisioni.  $\uparrow$  proliferazione e differenziamento. Svantaggio: mineralizzazione solo superficiale!

- **BR a perfusione:** Flusso oscillatorio: stimolazione osteogenica  $\leftarrow$  Flusso costante o pulsatile (Jacobs)

$\uparrow$  frequenza  $\Rightarrow$   $\downarrow$  ristagno

- perfezione  $\rightarrow$ 
  - indiretta: il medium può scorrere anche lateralmente allo scaffold
  - diretta: il medium può scorrere solo attraverso lo scaffold.



BR a perfusione indiretta  $\Rightarrow$   $\uparrow$  espressione proteine tipiche (Wang e Uemura)

BR a perfusione diretta  $\Rightarrow$   $\uparrow$  densità cell. al centro, proliferazione e differenziamento, deposizione ECM mineralizzata

Porter (2007): BR a perfusione che permette monitoraggio mediante pUTC. Rate di produzione ECM:

- prime 3 settimane:  $0,63 \text{ mm}^3/\text{sett}$  - ultime 2 sett:  $1,03 \text{ mm}^3/\text{sett}$   $\rightarrow$  perfusione diretta
- $0,01 \text{ mm}^3/\text{sett}$  -  $0,16 \text{ mm}^3/\text{sett}$   $\rightarrow$  coltura statica

Portale: 100-600 mL/Br, da ottimizzare per il caso specifico (uso CFD).

- **BR con stress di carico:**
  - $\leftarrow$  500  $\mu$ strains  $\Rightarrow$  riassorbimento osseo
  - $\leftarrow$  500-1000  $\mu$ strains  $\Rightarrow$  mantenimento massa e geom originali
  - $\leftarrow$  1000-4000  $\mu$ strains  $\Rightarrow$   $\uparrow$  produzione osso

- Tipi stimolazione:
- bending a 4 punti  $\Rightarrow$   $\uparrow$  espressione genica e produzione ECM mineralizzata
  - stramento  $\Rightarrow$   $\uparrow$  proliferazione, ma non il differenziamento!
  - compressione dinamica  $\Rightarrow$   $\uparrow$  formazione di osso; compressione continua no! (Lanyon, Rubin, 1984)
  - idrostatica intermittente  $\Rightarrow$   $\uparrow$  mineralizzazione; p continua no! (Burger)
  - stimolazione biassiale  $\Rightarrow$   $\uparrow$  deposizione ECM (Wortella, Wayne)

- **BR con stimoli elettromagnetici:** in vivo: correnti a 5-30 Hz (muscoli posturali) e  $< 10$  Hz (camminare). Fornendo campi elettromagnetici pulsati si induce perdita di osso e se ne accelera la formazione. Si usano bobine di Helmholtz  $\Rightarrow$   $\uparrow$  mineralizzazione e espressione proteine (Fassano) (Bodanvoly, campi a dente di sega a 15 Hz). Costoso!! Stimolo fornito in modo non invasivo.

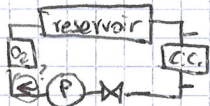
$2 \text{ mT}, 75 \text{ Hz}$

- **BR in vivo** (Warnke: su essere umano)

- Radisic (2006): stesso BR, scaffold con canali interni coltivati con PFC (perfluorocarbore):
  - ↑ DNA presente (⇒ ↑ sopravvivenza cell)
  - ↑ presenza marker cardiaci
  - ↓ soglia di eccitazione
- Dvir (2005): BR a perfusione con griglia → flusso omogeneo  
 - ↑ utilità cell rispetto a caso statico  
 ↳ max esposizione al medium che perfora

**STIMOLI MECCANICI:**

- Brown (2003): perfusione + stimolazione meccanica grazie a pinch valve (si apre con  $f = 1 \text{ Hz}$ )

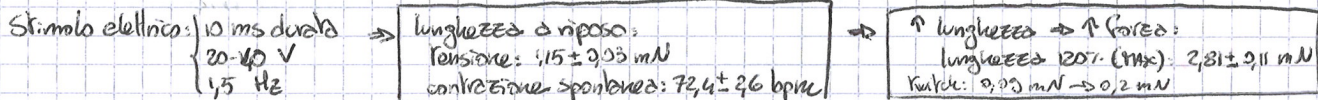


accumulo fluido durante chiusura valvola ⇒ sfuoco di compressione su tessuto  
 - migliori capacità contrattili  
 - ↓ soglie di eccitazione

- Eschenhagen (1997): cell neonatali di ratto o pollo in gel di collagene o Matrigel (⇒ da banco)

Costrutto alloggiato su tibi di vetro ricoperti di velcro tenuti separati da spacer in metallo. Si ottiene:  
 • costrutto 3D  
 • dopo 3-5 gg contrazione sincrona  
 • dischi intercalari e sarcomeri nelle cell sul bordo del costrutto (⇒ giunzioni ⇒ connessione 43 ⇒ passaggio elettrico)

Si è misurate forza di contrazione in organ bath (≠ BR!): sistema difficile da mantenere in funzione, è costoso, si deve lavorare fuori dal BR. Ordine forze da misurare: mN.



- Fink (2009 gruppo E-Z): stesso tipo di costrutto. 4 gg in statico + 6 gg stretch passivo unidirezionale (allarga costrutto)

stretch: 1,5 Hz  
deformazione: 20%  
 ⇒ ↑ RNA/DNA del 100%  
 ⇒ ↑ proteine/cell del 50%  
 ⇒ ↑ F contrazione di 2-4 volte  
 cell grandi e organizzate come tessuto cardiac  
 (NA) cell ammassate

- Gruppo E-Z (2002): anellino contrattile. 7 gg in statico + stretch unidirezionale ciclico

- distribuzione cell uniforme  
 - istologia simile a tessuto adulto  
 - impiantato (2002, 2006): c'è vascolarizzazione ⇒ il tessuto si integra.

- Birla (2007): fascia di tessuto posta in tensione in un multi-well. Risulta stabile al protocollo applicato.

**STIMOLI ELETTRICI:**

- Radisic (2004): scaffold in collagene seminato con cell cardiache di ratto posti tra elettrodi in C.

stimolo elettrico: 2 ms durata  
1 Hz  
5 V  
 ⇒ - induce allineamento e accoppiamento cell  
 - ↑ ampiezza contrazione sincrona fino a 7 volte

Statico: 1-5 gg (ottimale: 3gg) + 8gg stimolo

- Heidi Au (2005): μchip cardiaco. Stimolo morfologico + stimolo elettrico. Si ottengono cell altamente clonate, allineate, con sarcomeri e dischi intercalari.

È importante lasciare il tessuto in condizione statica prima della stimolazione!!

FASE STATICA: le cell si riprendono dopo processo estrazione. Accumulano e assemblano proteine conduttive e contrattili. In questa fase la stimolazione elettrica ha un effetto inibitorio.

FASE DI STIMOLAZIONE: la stimolazione elettrica migliora lo sviluppo di proprietà strutturali e contrattili delle cell individuali e aumenta il n° di cell funzionalmente accoppiate impegnate in una contrazione sincrona.

μBR per tessuto cardiaco: ↓ costi, ↓ spazio, tanti dati in poco tempo.

- Hansen (2010, gruppo E-Z): mix di cell, matrigel e trombina in stampi di agar con supporto in silicore. Si può vedere il costrutto che si contrae (permi in silicore offrono poca resistenza). Morfologia e proteine del tessuto nativo; dopo 8-10 gg battono in maniera sincrona.



REALIZZAZIONE RIPETIBILE ⇒ ESPERIMENTI PARAGONABILI

- Kerschner (2011): BR multimodale per stimolazione meccanica e misure in real time (cella di canca)