

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI INGEGNERIA

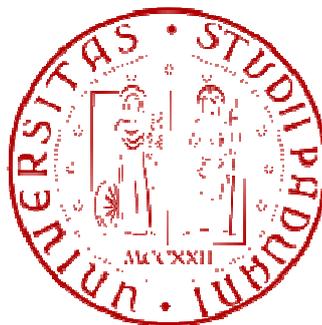
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

TESI DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

MATERIALI BIOMIMETICI PER L'INGEGNERIA DEI TESSUTI NEURALI

RELATORE: CH.MO PROF. ANDREA BAGNO

LAUREANDA: ILARIA MAZZONETTO



ANNO ACCADEMICO 2010-2011

Indice

ABSTRACT.....	5
1. INTRODUZIONE.....	7
2. SCAFFOLDS PER IL MIDOLLO SPINALE.....	13
2.1. Caratteristiche richieste.....	15
2.2. Possibilità offerte dall'utilizzo di nanomateriali nell'ingegneria dei tessuti neurali.....	19
3. BIOMATERIALI POLIMERICI.....	22
3.1. Polimeri naturali.....	26
3.1.1. Collagene.....	26
3.1.2. Agarosio/Alginato.....	28
3.1.3. Acido ialuronico.....	29
3.1.4. Chitosano.....	30
3.1.5. Fibronectina.....	31
3.2. Polimeri sintetici.....	32
3.2.1. Acido polilattico (PLA).....	32
3.2.2. Copolimero acido lattico - acido glicolico (PLGA).....	33
3.2.3. Policaprolattone (PCL).....	33
3.2.4. Polipirrolo.....	34
3.2.5. Glicole polietilenico (PEG).....	34
3.2.6. Poliidrossimetilmetacrilato (PHEMA).....	35
4. TECNICHE DI FABBRICAZIONE.....	36
4.1. Electrospinning.....	36
4.2. Self-assembly (SA).....	38
4.3. Liquid-liquid phase separation.....	39
4.4. Gas foaming.....	40
4.5. Solvent-casting particulate leaching.....	40
4.6. Solid Freeform Fabrication (SFF).....	40
4.6.1. Three Dimensional Printing (3DP).....	42
4.6.2. Stereolithography (SLA).....	43
4.6.3. Fused Deposition Modelling (FDM).....	44
4.6.4. 3D Bioplotter.....	44
5. BIOFUNZIONALIZZAZIONE DI SCAFFOLD.....	46
5.1. Interazioni delle cellule con l'ambiente extra-cellulare.....	46
5.1.1. Interazioni cellula-ECM: le integrine.....	47
5.2. Molecole biologicamente attive per l'ingegneria dei tessuti neurali.....	49

6. TECNICHE DI FUNZIONALIZZAZIONE.....	53
6.1. Funzionalizzazione superficiale.....	53
6.1.1. Deposizione superficiale (adsorbimento proteico).....	54
6.1.2. Eletrostatic attachment.....	54
6.2.1.1. Layer-by-Layer (LbL) self-assembly.....	54
6.2.1.2. Electrochemical polymerization.....	55
6.1.3. Covalent attachment.....	57
6.2. Funzionalizzazione del bulk.....	60
6.2.1. Blending.....	60
7. RISULTATI OTTENUTI.....	62
7.1. Morfologia.....	62
7.2. Allineamento.....	68
7.3. Adesione.....	71
7.4. Sopravvivenza e proliferazione.....	72
7.5. Differenziazione.....	75
CONCLUSIONI.....	79
BIBLIOGRAFIA.....	80

Abstract

I danni al sistema nervo centrale affliggono circa 2 milioni di persone all'anno, con conseguenze spesso devastanti. In questo lavoro di tesi sono presentate le enormi possibilità che sembrano poter essere offerte dall'ingegneria dei tessuti per la riparazione di midollo spinale lesionato. Sono descritte le caratteristiche richieste allo scaffold, i materiali che meglio rispondono a tali necessità e le principali tecniche di produzione. L'attenzione viene poi rivolta all'approccio biomimetico, che combina l'utilizzo di scaffolds con molecole biologicamente attive per ottenere materiali biomimetici capaci di indurre specifiche risposte cellulari e dirigere la formazione di nuovo tessuto mediante meccanismi di riconoscimento molecolare.

Il lavoro si conclude citando alcuni studi sperimentali con lo scopo di mostrare come il comportamento cellulare *in vitro* possa essere influenzato da molteplici aspetti, sia fisici che biochimici.

Capitolo 1

Introduzione

I danni al sistema nervoso centrale, che affliggono circa 2 milioni di persone all'anno [1], possono essere devastanti; qualunque ne sia l'origine, il risultato di un grave danno al midollo spinale è in genere lo stesso: paralisi totale o parziale, accompagnata dalla perdita di sensibilità in tutte le parti del corpo sottostanti la lesione.

Anche se la natura precisa di una lesione al midollo spinale varia da caso a caso, si possono individuare alcuni elementi comuni. Quando una caduta o qualche altro trauma fratturano o dislocano la colonna vertebrale, le vertebre che normalmente racchiudono e proteggono il midollo possono schiacciarlo, distruggendo o danneggiando gli assoni. Talvolta viene lesa in modo significativo soltanto la sostanza grigia; se così è, i disturbi muscolari e sensoriali rimangono confinati ai tessuti che scambiano segnali con i neuroni del livello colpito del midollo spinale, senza alterare molto le funzioni al di sotto di tale livello. Al contrario, se viene distrutta anche tutta la sostanza bianca di uno stesso segmento midollare, la lesione interrompe i segnali in verticale, impedendo ai messaggi che hanno origine nel cervello di propagarsi al di sotto dell'area danneggiata e bloccando il flusso di segnali sensoriali che provengono da sotto la lesione e che sono diretti al cervello.

Purtroppo la lesione meccanica è soltanto l'inizio dei problemi: essa provoca infatti una seconda ondata di danni che con il passare del tempo allarga progressivamente i confini, e quindi l'entità, del danno funzionale. Questa diffusione secondaria tende in

un primo momento a progredire longitudinalmente attraverso la sostanza grigia e poi si estende alla sostanza bianca. Alla fine i diversi segmenti midollari, sia sopra sia sotto la lesione originaria, possono risultare distrutti. Il risultato finale è una complessa situazione di malfunzionamento.

Gli assoni danneggiati si trasformano in monconi inutili, privi di collegamenti, e le loro estremità troncate cominciano a disintegrarsi. Spesso molti assoni rimangono intatti, ma diventano inutilizzabili a causa della perdita del rivestimento mielinico isolante. Al posto dei neuroni, degli assoni o delle altre cellule, si forma una cavità piena di liquido, o cisti, e le cellule gliali proliferano in modo anomalo, formando la cicatrice gliale. Insieme, cisti e cicatrici, rappresentano una barriera impenetrabile per gli assoni recisi.

Si è scoperto che il deterioramento secondario deriva dall'interazione di molti meccanismi differenti: entro pochi minuti dal trauma si verificano piccole emorragie dai vasi sanguigni lesionati, e il midollo spinale si gonfia. Il danno ai vasi sanguigni e il gonfiore impediscono il normale apporto di sostanze nutritive e di ossigeno alle cellule, causando la morte di molte di esse. Nel frattempo, le cellule, gli assoni e i vasi sanguigni danneggiati liberano sostanze chimiche tossiche che vanno ad agire sulle cellule vicine intatte. Una di queste sostanze, in particolare, avvia un processo altamente distruttivo conosciuto come eccitotossicità. Nel midollo sano, le estremità di molti assoni secernono piccole quantità di glutammato che si lega a recettori sui neuroni bersaglio e li stimola a emettere impulsi. Ma quando i neuroni spinali, gli assoni o gli astrociti sono lesi, il flusso di glutammato diventa abbondante. L'elevato livello di tale sostanza eccita oltre misura i neuroni vicini e li induce a lasciar entrare ondate di ioni, che a loro volta avviano una serie di eventi distruttivi, compresa la produzione di radicali liberi. Queste molecole altamente reattive possono attaccare le membrane e altre componenti cellulari, fino a uccidere i neuroni e gli oligodendrociti (cellule produttrici di mielina).

L'infiammazione, segnalata dall'afflusso di particolari cellule immunitarie, può durare anche giorni, esacerbando questi effetti.

Normalmente le cellule del sistema immunitario si trovano nel sangue e sono incapaci di accedere ai tessuti del sistema nervoso centrale; possono però infiltrarsi laddove i vasi sanguigni sono danneggiati e quando queste cellule e la microglia si

attivano in risposta a una lesione, la produzione di radicali liberi e di altre sostanze tossiche aumenta ancora.

La distruzione di cellule nel midollo spinale subito dopo una lesione si verifica soprattutto per necrosi. Giorni o settimane dopo il trauma iniziale si ha inoltre l'apoptosi degli oligodendrociti, spesso addirittura fino a quattro segmenti di distanza dal sito del trauma.

Negli scorsi anni sono state identificate molte sostanze (fattori neurotrofici) che promuovono la sopravvivenza dei neuroni e delle cellule gliali. La migliore terapia dovrebbe essere in grado non solo di ridurre l'estensione di una lesione, ma anche di riparare il danno. Un elemento chiave di questo processo di riparazione dovrebbe consistere nello stimolare la rigenerazione degli assoni danneggiati: indurre cioè il loro allungamento e la riconnessione con le appropriate cellule bersaglio.

È importante sottolineare che dal punto di vista delle lesioni, il sistema nervoso periferico (SNP) e il sistema nervoso centrale (SNC) rispondono diversamente (figura 1.1).

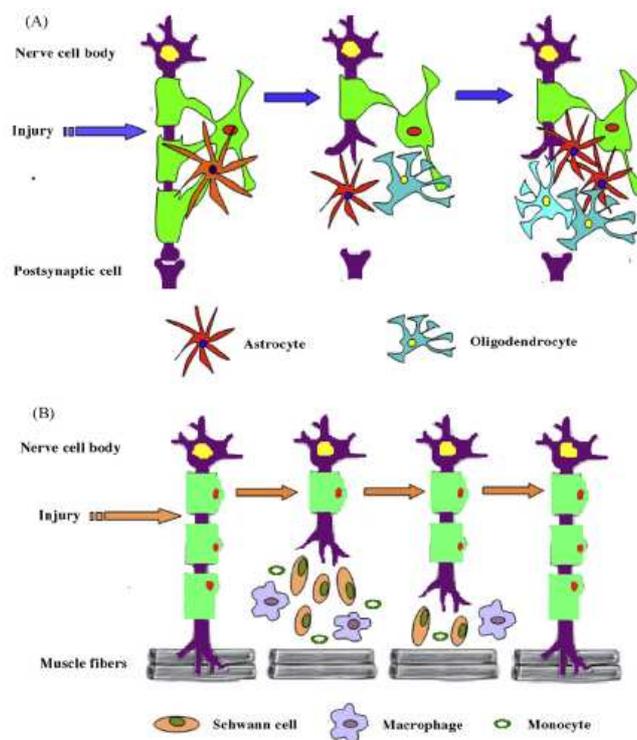


Figura 1.1 – Rappresentazione del processo di rigenerazione di un nervo lesionato nel sistema nervoso centrale e periferico. Processo di guarigione nel SNC (A) con formazione delle cicatrici gliali e processo di guarigione nel SNP (B) mediato da cellule di Schwann, macrofagi e monociti.

Mentre in molti casi gli assoni del SNP sono in grado di ricrescere e reinnervare i loro targets (non sempre ciò però coincide con il recupero funzionale), nel caso del SNC raramente si è osservato una riparazione del tessuto danneggiato. Ciò comporta che malattie e lesioni a carico del SNC sono spesso degenerative e accompagnate da disfunzioni permanenti.

Diversi studi hanno dimostrato che il recupero strutturale e funzionale in seguito a lesioni nel sistema nervoso dipendono da una varietà di fattori, sia intrinseci che estrinseci ai neuroni. I fattori intrinseci coinvolgono in primo luogo la capacità del neurone di rigenerare, mentre quelli estrinseci sono fortemente legati all'ambiente circostante il sito della lesione.

Comparando il tessuto circostante le diverse lesioni del SNP e del SNC, si nota che nel SNC mancano alcuni fattori presenti invece nel SNP. Nel SNP si trovano le cellule di Schwann che sono in grado di fornire nutrimento, fare da guida e provvedere alla mielinizzazione degli assoni rigenerati; sintetizzano inoltre i fattori neurotrofici che favoriscono la sopravvivenza neuronale e la crescita assonale e danno origine a strutture indispensabili nel processo di rigenerazione: le bande di Bungner che orientano la crescita degli assoni. Tali cellule sono assenti nel SNC, dove vi è invece sovrabbondanza di molecole, alcune delle quali presenti nella mielina, che inibiscono attivamente la rigenerazione degli assoni. Sono state scoperte molte molecole ad attività inibitoria: alcune sono prodotte dagli astrociti e altre sono normalmente presenti nella matrice extracellulare. Sembra quindi verosimile la necessità di terapie combinate per combattere o bloccare la produzione simultanea di molteplici inibitori.

Oltre a rimuovere i "freni" alla ricrescita assonale, una strategia efficace dovrebbe fornire sostanze che promuovano attivamente l'allungamento degli assoni (fattori neurotrofici).

Fortunatamente i neuroni adulti mantengono la capacità di rispondere ai segnali di stimolo della rigenerazione assonale che provengono da questi fattori, anche se, come è ovvio, la produzione naturale di queste sostanze è ben inferiore a quanto sarebbe necessario per la rigenerazione del midollo spinale. Anzi, sembra che la sintesi di certi fattori neurotrofici, invece di aumentare, diminuisca per alcune settimane dopo il trauma.

Dopo che gli assoni incominciano a crescere, devono essere guidati verso il loro bersaglio naturale, vale a dire le cellule a cui erano originariamente collegati. Durante lo sviluppo, gli assoni in crescita vengono indirizzati verso il loro bersaglio da molecole che agiscono sulle estremità anteriore, o cono di accrescimento, dell'assone. È stato scoperto un notevole numero di sostanze che partecipano a questo processo. Alcune, come quelle chiamate complessivamente netrine, vengono liberate o esposte dai neuroni o dalle cellule gliali. Esse stimolano gli assoni a crescere in particolari direzioni e impediscono l'accrescimento in altre. Ulteriori molecole guida sono i componenti della matrice extracellulare: alcune molecole della matrice si legano strettamente a specifiche molecole di adesione cellulare presenti sul cono di accrescimento fornendo così un'ancora per gli assoni in crescita. Durante lo sviluppo, le molecole direzionali necessarie vengono presentate ai coni di accrescimento secondo sequenze temporali prestabilite.

Un diverso metodo consiste nel cercare di colmare la lacuna creata dal danno al midollo: si tratta di dirigere gli assoni danneggiati verso la loro esatta destinazione fornendo un condotto attraverso cui possano propagarsi, oppure rendendo disponibile un altro sostegno adeguato che sia in grado di garantire supporto fisico alle fibre mentre queste cercano di attraversare la cisti (normalmente impenetrabile). Il supporto può anche servire come fonte di farmaci che promuovano la crescita [2].

Ecco quindi che l'ingegneria tessutale, che applica i metodi dell'ingegneria e delle scienze biologiche per costruire scaffolds artificiali utili alla rigenerazione di tessuti, offre molte possibilità per la riparazione di tessuto neurale.

Il paradigma dell'ingegneria tessutale consiste nell'isolare specifiche cellule dal paziente attraverso una piccola biopsia, far crescere tali cellule in uno scaffold biomimetico tridimensionale in condizioni di coltura controllate, inserire il costrutto nel sito anatomico del paziente e guidare la formazione di nuovo tessuto all'interno dello scaffold che può essere eventualmente degradato nel tempo.

Al fine di ottenere, con l'ingegneria tessutale, una soddisfacente rigenerazione di organi o tessuti danneggiati occorre considerare diversi elementi critici riguardanti:

- i biomateriali che costituiscono il supporto meccanico per la crescita cellulare;
- le cellule progenitrici che devono differenziarsi in specifici tipi cellulari;

- i fattori di crescita e di adesione in grado di modulare l'attività cellulare.

I biomateriali rivestono un ruolo importante in molte tecniche dell'ingegneria tessutale: essi possono servire, per esempio, come substrato al quale far aderire e sul quale far migrare una certa popolazione cellulare; lo scaffold così ottenuto può essere impiantato con una combinazione di tipi cellulari come veicolo per le cellule oppure può essere utilizzato come sistema di *drug delivery* in modo da attivare specifiche funzioni in regioni localizzate [3].

Tale supporto dovrebbe contenere stimoli per l'adesione cellulare in modo da permettere ai neuroni di estendere i loro assoni nel sito lesionato; dovrebbe inoltre servire da ponte per guidare la ricrescita degli assoni e ristabilire le connessioni tra i neuroni [4].

Lo sviluppo di biomateriali si sta ora focalizzando sulla progettazione di materiali biomimetici capaci di indurre specifiche risposte cellulari e dirigere la formazione di nuovo tessuto mediante meccanismi di riconoscimento molecolare [3,5].

L'approccio biomimetico, che combina l'utilizzo di scaffold con molecole della matrice extra-cellulare, permette un miglioramento nel controllo della proliferazione, della sopravvivenza, della migrazione e della differenziazione cellulare [6].

Capitolo 2

Scaffolds per il midollo spinale

La classificazione dei biomateriali utilizzati negli scaffolds per il midollo spinale è basata sulla loro natura, sul fatto che siano biodegradabili o meno e sull'eventuale presenza di modificazioni specifiche o adattamenti funzionali.

Molti impianti contengono specifiche popolazioni cellulari che andranno selezionate per soddisfare alcuni dei seguenti criteri:

- compatibilità con il midollo spinale;
- ripristino di neuroni persi o cellule gliali;
- attivazione della rigenerazione degli assoni;
- mielinizzazione di nuovi dendriti o di assoni demielinizzati;
- abilità di migrare nel midollo spinale.

Le cellule impiantabili finora studiate comprendono le cellule nervose di nervi periferici, le *olfactory ensheathing cells*, fibroblasti geneticamente modificati, cellule del midollo spinale fetale, macrofagi stimolati, cellule staminali e cellule di Schwann.

La scelta del materiale è una delle prime considerazioni da fare al momento della progettazione di uno scaffold per tessuti neurali; le due principali tipologie di materiali studiati sono i polimeri naturali e i polimeri sintetici.

In accordo con le proprietà dei materiali naturali o sintetici, gli scaffolds vengono progettati in modo da rispondere al meglio ai requisiti richiesti per avere un'ottima funzionalità. Le caratteristiche considerate al momento della progettazione sono

elencate in tabella 2.1, alcune delle quali verranno approfondite nel paragrafo successivo.

FUNZIONI DELLO SCAFFOLD	CARATTERISTICHE RICHIESTE
Non deve indurre una risposta infiammatoria e anticorpale <i>in vivo</i>	Compatibile, non tossico e non cancerogeno
Assistere alla crescita del tessuto/organo nelle tre dimensioni	Tridimensionale con una specifica forma
Fornire una superficie appropriata per l'attecchimento, la proliferazione e la differenziazione cellulare	Accurata topografia e biofunzionalizzazione della superficie e dello scheletro
Permettere significative interazioni delle cellule superficiali, es. adesione cellulare	Elevata area superficiale per unità di volume
Promuovere la proliferazione e la migrazione cellulare indotta grazie ad una elevata porosità e interconnettività tra i pori	Dimensione ottimizzata dei pori per permettere la penetrazione cellulare e la crescita del tessuto in ogni parte dello scheletro
Dirigere l'orientazione delle cellule nell'ECM e nel nuovo tessuto	Corretta orientazione delle fibre
Permettere il movimento dei nutrienti e dei rifiuti dall'esterno all'interno e viceversa	Elevata porosità e interconnettività tra i pori
Deve degradarsi lasciando posto al nuovo tessuto	Tasso di degradazione confrontabile con il tasso di formazione del tessuto, i prodotti di degradazione non devono essere tossici e non devono indurre infiammazioni <i>in vivo</i>
Possedere una sufficiente integrità strutturale per mantenere la propria forma <i>in vivo</i> e un'adeguata resistenza meccanica per supportare il tessuto in formazione e resistere alle forze <i>in vivo</i>	Proprietà meccaniche equivalenti a quelle del tessuto

Tabella 2.1 – Parametri strutturali ideali di uno scaffold.

2.1 Caratteristiche richieste

Le proprietà ideali di uno scaffold per la rigenerazione del tessuto nervoso sono: biocompatibilità, biodegradabilità controllabile nel tempo con prodotti di degradazione non tossici per l'organismo, porosità per la vascolarizzazione e migrazione cellulare, matrice tridimensionale con proprietà meccaniche simili a quelle della matrice extracellulare e processi di fabbricazione semplici che consentono, durante la produzione, la modifica chimica del materiale per migliorarne l'interazione con il tessuto circostante.

È fondamentale che i materiali abbiano proprietà compatibili con l'ambiente specifico del midollo spinale.

I materiali ideali per l'ingegneria dei tessuti neurali dovrebbero avere eccellenti proprietà meccaniche ed elettriche e un'ottima citocompatibilità.

Senza una buona citocompatibilità, i materiali potrebbero ostacolare la crescita del neurone e indurre pericolose reazioni di infiammazione.

Scaffolds con proprietà meccaniche insufficienti potrebbero non essere in grado di fornire supporto fisico alle fibre in rigenerazione.

Nella comunicazione tra neuroni un ruolo chiave è svolto dal potenziale d'azione che si genera nelle sinapsi: una buona conduzione elettrica è perciò essenziale per promuovere la crescita del neurite [7].

In relazione al sangue, il liquido cefalo-rachidiano contiene meno nutrienti cellulari. La permeabilità dello scaffold a molecole di varie dimensioni è quindi cruciale per l'accesso dell'ossigeno e dei nutrienti e per la rimozione di rifiuti metabolici.

Per evitare la compressione dei nervi rigenerati e per mantenere il corretto allineamento è inoltre fondamentale conoscere il grado di dilatazione del materiale in presenza di un ambiente acquoso quale quello del midollo spinale.

La rigidità, la permeabilità, la resistenza, la velocità di degradazione e il coefficiente di dilatazione sono specifici del particolare polimero impiegato, ma possono essere modificati variando la concentrazione del polimero o la percentuale dei costituenti.

Anche le metodologie d'impianto richiedono una particolare attenzione: quando il materiale è posizionato nella colonna vertebrale, la colonna vertebrale richiede un'ulteriore fissazione; scaffolds inseriti in colonne vertebrali mobili tendono a spostarsi e portano facilmente a scoliosi [8].

Rooney e collaboratori hanno dimostrato che la fissazione della colonna vertebrale previene la scoliosi, riduce la cifosi e permette allo scaffold di mantenere un corretto allineamento.

Per quanto riguarda la rigenerazione del tessuto, scaffolds non allineati con il midollo spinale lesionato potrebbero potenzialmente aumentare la formazione delle cicatrici glialie ostacolando la crescita degli assoni.

Nella prova sono stati analizzati 18 ratti a cui è stato inserito uno scaffold (contenente bario come mezzo di contrasto) di PLGA 85:15 nella colonna vertebrale in seguito ad una lesione del midollo spinale. A 9 di questi ratti è stata praticata la fissazione della colonna vertebrale (figura 2.1.1).

Nel caso di colonne vertebrali non fissate, confrontando le radiografie effettuate il giorno stesso dell'impianto (figura 2.1.2 (A)) con le radiografie effettuate 2 e 4 settimane dopo l'intervento si nota la comparsa di una progressiva scoliosi (figura 2.1.2 (B) e figura 2.1.2 (C) rispettivamente).

Nel caso di colonne vertebrali fissate le radiografie mostrano invece un corretto allineamento dello scaffold all'interno della colonna vertebrale (figura 2.1.3 (A)) e una minima deformità scoliotica (figura 2.1.3 (B)).

Le immagini da MRM tridimensionale (figura 2.1.3) confermano che, in ratti a cui è stata praticata la fissazione della colonna vertebrale, lo scaffold rimane allineato con il midollo spinale lesionato [9].

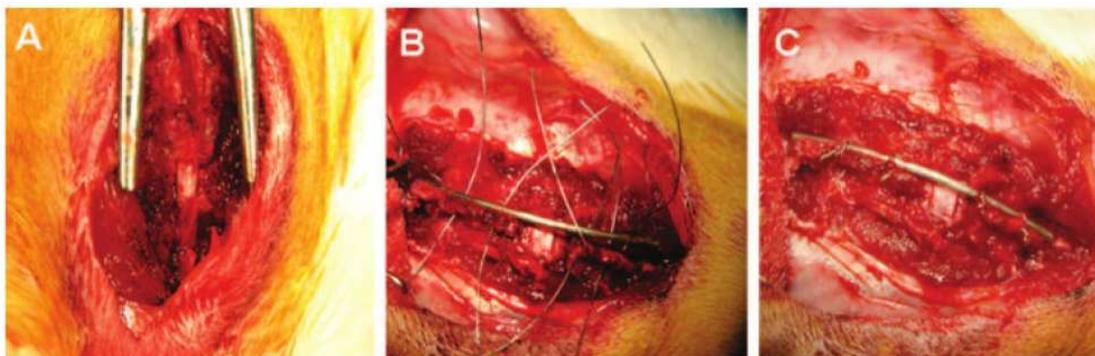


Figura 2.1.1 – Procedura chirurgica mostrante il posizionamento dello scaffold e la fissazione della colonna vertebrale. È stata eseguita una laminectomia a livello delle vertebre T9/T10 con conseguente esteriorizzazione del midollo spinale (A). Dopo l'impianto dello scaffold nel midollo spinale lesionato sono stati praticati dei fori nei processi spinosi delle vertebre a monte e a valle della lesione. Attraverso questi fori sono stati fatti passare dei fili d'acciaio e sopra questi fili è stato posizionato un tondino d'acciaio inossidabile (B). Il tondino d'acciaio è stato fissato alla colonna vertebrale mediante i fili suddetti (C).



Figura 2.1.2 – Radiografia mostrante una progressiva scoliosi nel ratto con colonna vertebrale non fissata. Radiografia eseguita il giorno stesso dell’intervento (A), 2 settimane dopo (B) e 4 settimane dopo (C). La freccia indica la posizione dello scaffold.

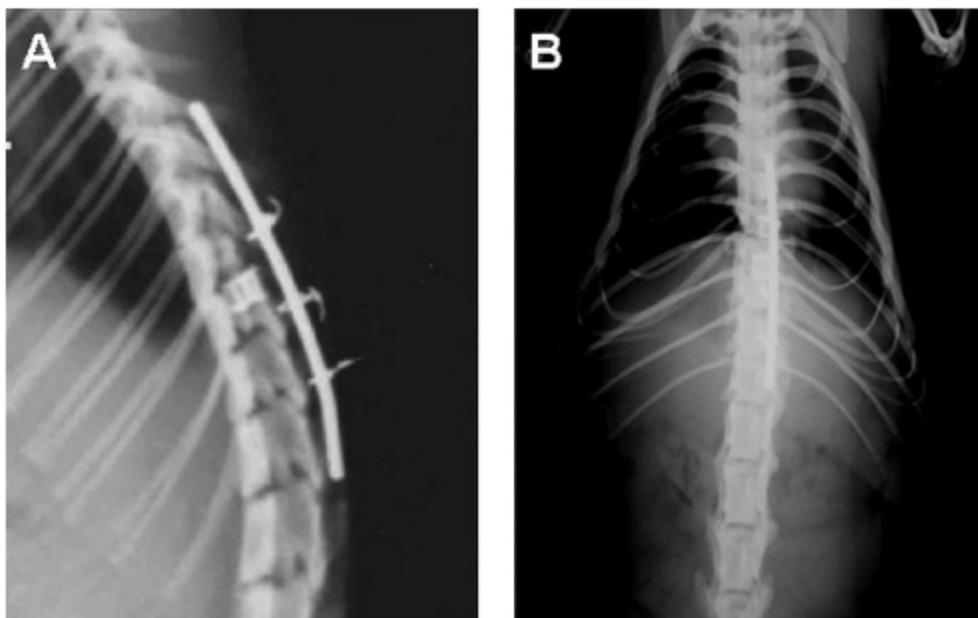


Figura 2.1.3 - La radiografia laterale (A) e la radiografia ventre-dorsale (B) mostrano rispettivamente un corretto allineamento dello scaffold e una minima scoliosi dopo 4 settimane dall’impianto.

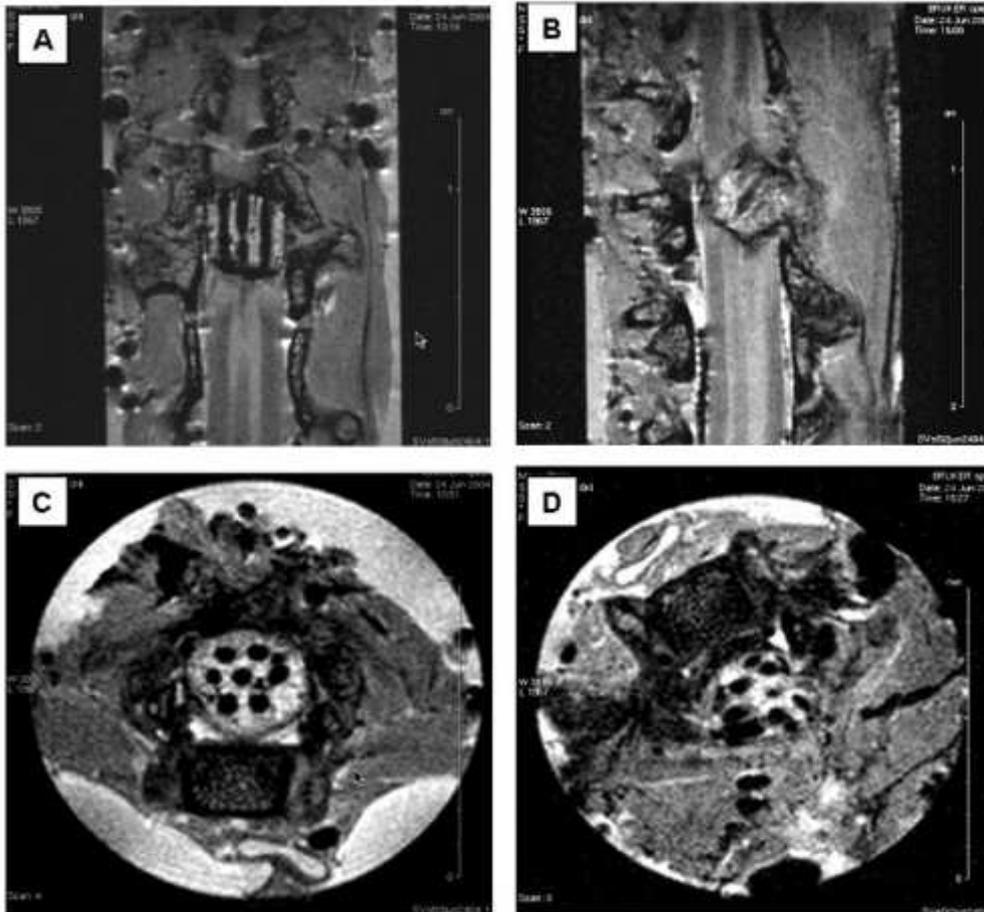


Figura 2.1.4 - Effetto della stabilizzazione della colonna vertebrale sull'allineamento dello scaffold. Immagini da MRM tridimensionale: immagine longitudinale ((A) e (B)) e immagine trasversale ((C) e (D)) dopo 4 settimane dal posizionamento dello scaffold nel midollo sezionato con ((A) e (C)) e senza ((B) e (D)) fissazione della colonna vertebrale.

I prodotti di degradazione del polimero e qualsiasi altro residuo di fabbricazione non devono essere citotossici, localmente o sistemicamente, e non devono indurre risposte immunitarie e conseguente gliosi la quale si rivela spesso distruttiva sia per lo scaffold che per gli assoni in rigenerazione.

Un altro aspetto fondamentale dello scaffold è la sua porosità. Per creare pori nella struttura possono essere incorporati nella miscela polimerica cristalli di cloruro di sodio, cristalli di ghiaccio o bolle di gas. La dimensione del poro può essere controllata modificando i parametri che controllano la dimensione e la direzione di crescita del cristallo o aggiustando il contenuto d'acqua nel caso di *hydrogel*.

Una struttura porosa che imita molto fedelmente le caratteristiche meccaniche del tessuto originale fornisce il miglior ambiente per la rigenerazione. La porosità del materiale è essenziale per l'attacco cellulare, consente di collegare distanze maggiori

e migliora il recupero funzionale dopo la lesione. La porosità facilita inoltre la vascolarizzazione, influenza la migrazione cellulare e il fenotipo e aumenta la stabilità dell'impianto nell'interfaccia scaffold-colonna vertebrale [8].

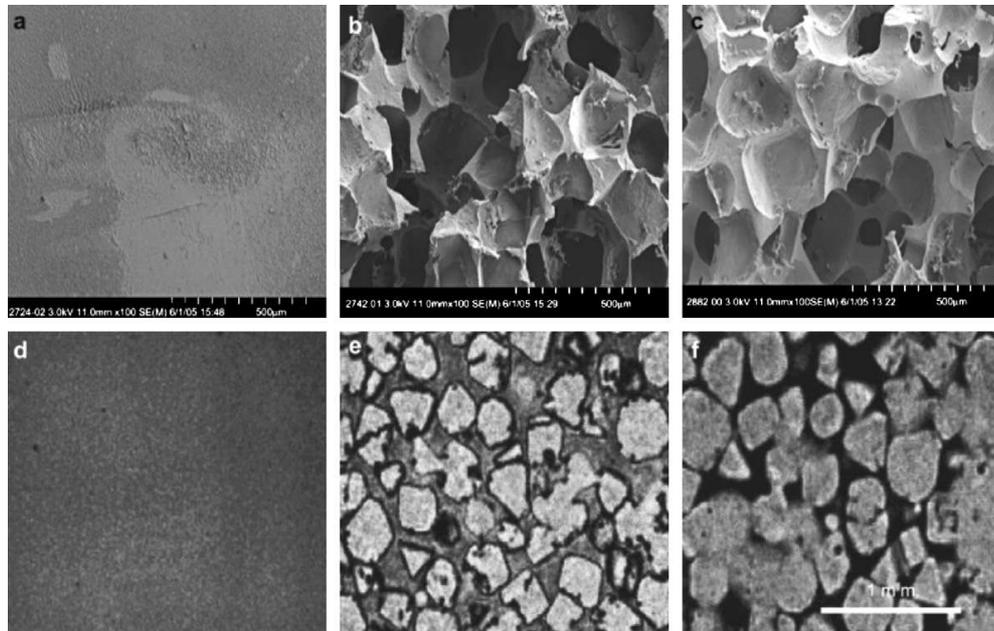


Figura 2.1.3 - Porosità di uno scaffold. La porosità di un *hydrogel* a base di glicole polietilenico è controllata variando la dimensione dei cristalli. SEM di *hydrogel* liofilizzato ((a)-(c)) mostrano una struttura fortemente porosa con pori aperti, interconnessi circondati dalle pareti del polimero. Sono comparate immagini da MRM dello scaffold in situazioni idratate ((d)-(f)): le dimensioni delle particelle di cloruro di sodio appartengono ad un intervallo di 100-500 μm . (a) e (d): rappresentano uno scaffold senza porosità; (b) e (e): rappresentano uno scaffold con un contenuto di cristalli di cloruro di sodio pari al 75%, cristallo di dimensione 300 μm ; (c) e (f): rappresentano uno scaffold con un contenuto di cristalli di cloruro di sodio pari al 75%, cristallo di dimensione 500 μm .

2.2 Possibilità offerte dall'utilizzo di nanomateriali nell'ingegneria dei tessuti neurali

I nanomateriali sono ottimi candidati per la progettazione di scaffolds di nanofibre/nanotubi citocompatibili ed elettricamente conduttivi.

L'interesse per le nanotecnologie deriva dalla possibilità di controllare le proprietà dei materiali attraverso il loro assemblaggio a livello nanometrico.

I materiali organizzati a tale livello acquisiscono nuove caratteristiche: sono più resistenti, più leggeri, più porosi, più attivi chimicamente, meno corrosivi, aumentano la loro conduttività elettrica e le proprietà magnetiche (super paramagnetismo).

Scaffolds con strutture nanometriche presentano quindi funzionalità che non avrebbero in scala micrometrica [4].

I nanomateriali sono materiali con una struttura di base (grani, particelle, fibre o altri costituenti) inferiore ai 100 nm in almeno una dimensione. I nanomateriali sono stati studiati abbondantemente per numerose applicazioni biomediche, in particolare per la medicina rigenerativa. Possono essere costituiti di metalli, ceramiche, polimeri, materiali organici e compositi. Attualmente diverse tecnologie di fabbricazione (electrospinning, self assembly, deposizione di film sottili, fotolitografia, ecc..) sono in grado di sintetizzare nanomateriali con una nanotopografia ordinata o casuale.

A mano a mano che la dimensione scende a livello nanometrico, aumenta fortemente l'area superficiale; le irregolarità sulla superficie e l'area superficiale disponibile per unità di volume possono essere controllate per migliorare le proprietà fisico-chimiche dei materiali. L'elevata superficie fornisce un'ampia zona di contatto tra le cellule e le fibre e perciò aumenta l'interazione tra biomateriale e tessuto.

Dato che i componenti di organi e tessuti su scala molecolare hanno dimensioni nanometriche e che le cellule interagiscono direttamente con la matrice extracellulare (nanostrutturata), le caratteristiche biomimetiche di tali materiali giocano un ruolo fondamentale nella stimolazione della crescita cellulare tanto quanto nella guida della rigenerazione del tessuto [10].

Le fibre della matrice extra-cellulare (ECM) come il collagene, l'elastina e la cheratina forniscono un supporto biologico e fisico per l'adesione, la proliferazione, la migrazione, la differenziazione e la morte delle cellule; sono perciò fondamentali nella regolazione del comportamento cellulare influenzando le cellule con segnali biochimici e stimoli topografici. Ugualmente, le nanofibre polimeriche possono giocare lo stesso ruolo chiave nei processi di rigenerazione dei tessuti.

La topografia delle nanofibre in sé, indipendentemente dal materiale, è potenzialmente in grado di modulare comportamenti cellulari quali: l'allineamento unidirezionale; l'adesione, la produzione di ECM, la migrazione guidata e la differenziazione controllata.

Alcuni studi hanno dimostrato che una superficie nanoporosa aumenta notevolmente la formazione di neuriti tra i neuroni mentre viene limitata la cicatrizzazione gliale, principale ostacolo al recupero funzionale.

In aggiunta, diversi esperimenti hanno evidenziato come le caratteristiche della struttura superficiale a livello sub-micrometrico possano influire sulla crescita neuronale.

Modificando la nanotopografia di una superficie e creando una specifica nanoarchitettura è possibile aumentare quindi la funzionalità delle cellule neuronali.

La versatilità delle nanofibre alla funzionalizzazione con biomolecole apre le porte a vaste opportunità per la progettazione di scaffolds con un sempre maggior controllo sulle funzioni cellulari.

Malgrado le potenzialità delle nanofibre polimeriche fin ora ci sono pochi successi clinici rilevanti perché non esiste una singola tecnica di fabbricazione che permette un controllo sull'organizzazione strutturale, sulla composizione del materiale e sulla biofunzionalizzazione mantenendo costi e profitti ragionevoli [11,12].

Capitolo 3

Biomateriali polimerici

I polimeri sono materiali organici prodotti mediante polimerizzazioni controllate a partire da singole molecole dette monomeri. Le reazioni di polimerizzazione possono avvenire per condensazione (per ottenere ad esempio il poliestere) oppure per via radicalica (per ottenere il polistirene o il polietilene).

I biomateriali polimerici sono facilmente fabbricabili in diverse forme (solidi, films, materiali viscoelastici, *hydrogels*) e taluni hanno densità simile a quella dei tessuti naturali. È possibile modulare le proprietà chimiche, fisiche e meccaniche formando copolimeri o miscele utilizzando differenti monomeri.

Gli svantaggi legati al loro utilizzo sono principalmente:

- il basso modulo elastico, soprattutto per i polimeri degradabili, che limita il loro uso nelle applicazioni dove è richiesta una grande resistenza al carico;
- la natura stessa della polimerizzazione che li rende talvolta biodegradabili;
- la difficoltà nell'ottenere polimeri utilizzabili come biomateriali senza utilizzare additivi, antiossidanti e plasticizzanti.

I polimeri possono presentare diverse strutture: copolimeri alternati, random, ramificati, a blocchi; possono costituire *networks* interpenetrati oppure possono costituire miscele compatibili o incompatibili secondo la miscibilità reciproca.

I polimeri per applicazioni biomedicali, a seconda del loro comportamento dopo l'impianto o quando sono in contatto con i fluidi biologici, possono essere classificati in non degradabili o biodegradabili.

I polimeri biodegradabili, una volta impiantati, subiscono sostanziali trasformazioni chimiche e/o fisiche che li portano a scomparire nel tempo.

Particolare attenzione è rivolta ai polimeri biorisorbibili. Questi subiscono una progressiva degradazione all'interno del sistema biologico, senza che ciò provochi reazioni di rigetto o effetti tossici.

Per questa proprietà sono studiati per applicazioni a breve termine che richiedono solo la presenza temporanea dell'impianto polimerico: sistemi a rilascio controllato di farmaci, mezzi di sutura o substrato a sostegno del tessuto in rigenerazione.

A seconda delle diverse applicazioni gli impianti richiedono velocità di biodegradazione diversa, che quindi devono essere programmate e predeterminate sulla base delle specifiche applicazioni cliniche. A questo proposito è importante identificare i fattori che influenzano la velocità di biodegradazione e i relativi meccanismi.

Nel corpo umano i principali agenti degradativi che possono modificare i materiali polimerici sono l'acqua, gli enzimi, l'ossigeno e i suoi prodotti di reazione all'interno dell'organismo. Il meccanismo più importante di degradazione nel corpo umano è sicuramente la reazione di idrolisi, la cui velocità dipende dalla natura del polimero (quindi dal tipo di legami presenti nella catena polimerica), dall'eventuale presenza di eteroatomi nella catena polimerica e dalla concentrazione di acqua disponibile per il processo d'idrolisi.

Assumono importanza di conseguenza il coefficiente di diffusione dell'acqua nei polimeri (compreso tra 10^{-6} e 10^{-9} cm^2/s a seconda del tipo di polimero) e l'assorbimento d'acqua. In base a quest'ultimo parametro si definiscono *idrofobi* i polimeri che assorbono meno dell'1% in peso d'acqua, *moderatamente idrofili* quelli che assorbono una percentuale compresa fra 1 e 10%, *idrofili* i polimeri che ne assorbono una percentuale maggiore.

Il processo di diffusione dell'acqua nei polimeri, sia in termini cinetici che termodinamici, dipende contemporaneamente da diversi fattori e, quindi, può essere molto complesso. È noto ad esempio che la presenza di anioni e cationi presenti nell'acqua che diffonde nel materiale polimerico modifica sostanzialmente la velocità d'idrolisi: gli ioni Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cl^- , HCO_3^- , CO_3^{2-} , H_2PO_4^- , PO_4^{3-} , HSO_4^- possono aumentare la velocità d'idrolisi di 3-5 volte.

Altri fattori importanti che influenzano la cinetica d'idrolisi sono:

- la cristallinità del polimero, in quanto le zone amorfe sono più rapidamente coinvolte nel processo essendo più accessibili alle molecole d'acqua;
- la temperatura, in quanto un suo aumento fino a valori superiori alla temperatura di transizione vetrosa del materiale determina una maggiore mobilità di catena favorendo così la penetrazione dell'acqua;
- la struttura chimica, in particolare la presenza di gruppi idrofobici o idrofilici che possono rendere il processo più o meno agevole;
- la morfologia superficiale, in quanto la presenza di disomogeneità, rugosità, cavità accelera in genere il processo di degradazione.

In base alla struttura, il polimero riassorbibile può anche subire degradazione enzimatica, per la quale è degradato e/o riassorbito.

La composizione del polimero influenza molto la degradazione enzimatica ed essa avviene sempre in connessione alla degradazione idrolitica.

La degradazione enzimatica può essere stimolata inserendo in catena sequenze specifiche di amminoacidi riconoscibili da particolari enzimi.

L'idrolisi dei polimeri sintetici con legami idroliticamente deboli può essere divisa in due categorie: meccanismo di degradazione "bulk" e meccanismo di erosione superficiale. Nella degradazione bulk la velocità di penetrazione dell'acqua è maggiore della velocità di rottura dei legami, nell'erosione avviene il processo inverso.

I fattori che influenzano la degradazione idrolitica sono di tipo microstrutturale e macrostrutturale e sono riassunti nella tabella 3.1.

Infine, anche i radicali presenti nel corpo umano possono iniziare processi di degradazione dei polimeri in esso introdotti [13].

FATTORI MICROSTRUTTURALI	FATTORI MACROSTRUTTURALI
Struttura chimica	Dimensione e geometria dell'impianto (design)
Composizione chimica del polimero (unità più idrofiliche velocizzano la degradazione)	Rapporto peso/superficie
Distribuzione delle unità ripetitive	Metodo e condizioni di processo
Presenza di gruppi ionici	Eventuali trattamenti termici
Presenza di unità inaspettate o difetti di catena	Metodo di sterilizzazione
Permeabilità all'acqua	Durata e condizioni dell'immagazzinamento
Struttura configurazionale	Ambiente di impianto
Peso molecolare e sua distribuzione (polidispersione)	pH, forza ionica e temperatura del mezzo di degradazione
Morfologia e grado di cristallinità	Composti adsorbiti e assorbiti
Presenza di microstrutture e di stress residui	Meccanismo di degradazione
Porosità e qualità della matrice e della superficie	

Tabella 3.1 - I principali fattori che influenzano la velocità di degradazione dei polimeri.

3.1 Polimeri naturali

I polimeri naturali presentano spesso il vantaggio di possedere specifiche interazioni cellulari (il cosiddetto “riconoscimento cellulare”), ma essendo prelevati da tessuti umani, animali o vegetali, non sono sempre disponibili in grandi quantità. I materiali di origine naturale possono essere portatori di agenti patogeni e differiscono anche notevolmente tra loro dipendentemente dall’organismo da cui sono prelevati. Dispongono di una versatilità limitata nella costruzione di scaffolds con proprietà specifiche (ad es. in termini di resistenza meccanica) e richiedono elevati costi di lavorazione [14].

3.1.1 Collagene

Il collagene è considerato come una matrice ideale per l’ingegneria dei tessuti dato che è il principale costituente della matrice extra-cellulare (ECM).

Sono stati identificati almeno 12 tipi di collagene. I tipi I, II e III sono i più comuni e formano fibrille strutturalmente simili fra loro. Il collagene di tipo IV forma invece un reticolo bidimensionale.

Il collagene è costituito da catene polipeptidiche, denominate catene α , strettamente intrecciate tra loro in modo da formare una super-elica compatta. Nel collagene di tipo I, II e III, la struttura primaria delle singole catene è composta da oltre 1400 amminoacidi ed è caratterizzata dalla ripetizione di numerose triplette di sequenza Gly-Pro-Hp (glicina, prolina, idrossiprolina). Ogni singolo filamento assume una struttura terziaria elicoidale sinistrorsa; tre singoli filamenti si organizzano in una super-elica destrorsa, che costituisce la struttura quaternaria del tropocollagene, precursore del collagene. L’organizzazione delle fibrille (polimeri ordinati di collagene) nella ECM si adatta ai bisogni del tessuto: sono infatti le cellule del tessuto connettivo a determinare la dimensione e la disposizione delle fibrille di collagene. La singola fibra di collagene è composta da una matassa di molte macrofibrille; ciascuna macrofibrilla è a sua volta costituita da molte microfibrille, ognuna delle quali è composta da molte eliche di tropocollagene (figura 3.1.1.1).

Nel collagene di tipo IV, la sequenza amminoacidica Gly-X-Y, che si ripete nelle catene α del tipo IV, si interrompe in alcune zone perdendo in tali siti la struttura a tripla elica. Le molecole di “pro-collagene” di tipo IV non vengono scisse dopo la

secrezione, interagiscono per mezzo dei loro domini pro-peptidici non scissi e anziché aggregarsi in fibrille, formano un reticolo piano a più strati [15].

Il collagene viene isolato principalmente dal tessuto animale; nelle applicazioni biomediche il più usato è il collagene di tipo I, che costituisce approssimativamente il 30% del tessuto muscolo-scheletrico nei mammiferi.

Il collagene contiene siti molecolari per l'adesione e la migrazione cellulare; ha un ruolo importante nella trasmissione dei segnali per la proliferazione e la differenziazione, ha proprietà meccaniche simili a quelle dei tessuti molli, è biocompatibile ed ha una bassa antigenicità.

Può essere prodotto in diversi formati come gels, lamine o nanofibre porose.

Il collagene in sé ha una limitata capacità di supporto per la crescita dei neuriti, e richiede una specifica funzionalizzazione. L'estensione degli assoni lungo le fibre di collagene può essere aumentata attraverso modificazioni covalenti o l'incorporazione di molecole che mediano l'adesione cellulare (p. es. laminina).

Poiché a temperatura fisiologica il collagene gelifica, può essere utilizzato come polimero iniettabile per *delivery system*. Tale proprietà rende possibile l'incorporazione di fattori neurotrofici, farmaci o cellule al momento della gelificazione senza danni termici ai fattori di crescita o alle popolazioni cellulari.

Si sta valutando anche l'utilizzo di collagene denaturato, conosciuto come gelatina.

Il collagene di tipo IV, principale componente delle membrane basali, si utilizza come scaffold per la crescita neuronale in forma di *matrigel*.

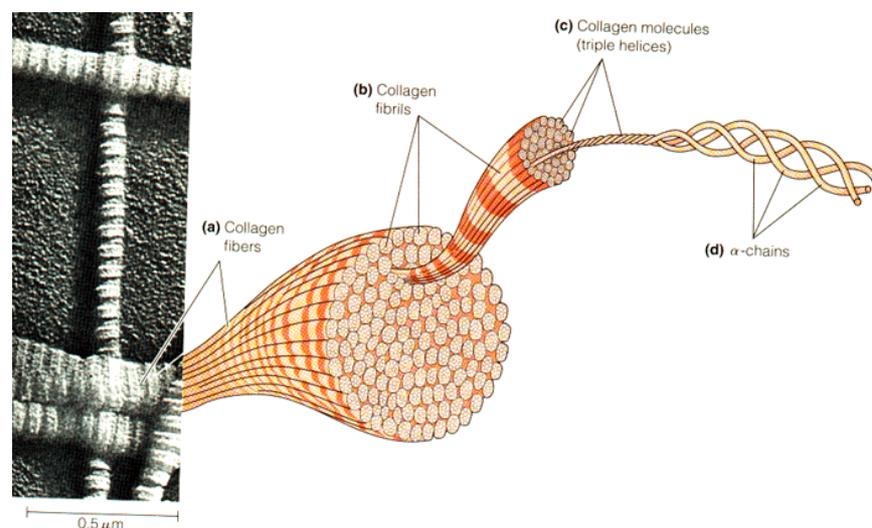


Figura 3.1.1.1- Le catene α di collagene si organizzano in molecole, fibrille e fibre.

3.1.2 Agarosio/Alginato

L'agarosio ha utilizzi simili a quelli del collagene, ma non è biodegradabile. È un polisaccaride purificato dall'agar-agar, una sostanza gelatinosa isolata a sua volta da delle alghe. È un polimero lineare neutro formato da unità di D-galattosio e 3,6-anidro-L-galattosio legate alternativamente con legami glicosidici (figura 3.1.2.1).

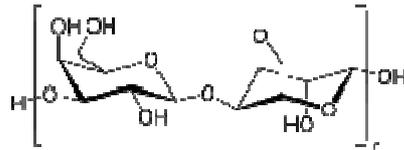


Figura 3.1.2.1 – Struttura delle unità ripetute di agarosio.

È uno zucchero solubile in acqua alla temperatura di ebollizione, mentre diventa solido a mano a mano che si raffredda formando un gel grazie alla formazione di una matrice tridimensionale che si costituisce attraverso legami a idrogeno tra le catene lineari. È usato come sistema iniettabile, può essere raffreddato rapidamente *in situ* usando vapori di azoto liquido. Come il collagene, l'agarosio è poco penetrabile dagli assoni, ma si è dimostrato un eccellente substrato per la crescita assonale se funzionalizzato con laminina.

Gli alginati sono sali dell'acido alginico, copolimeri a blocchi composti da due unità monosaccaridi, l'acido L-guluronico (G) e l'acido D-mannuronico (M) (figura 3.1.2.2).

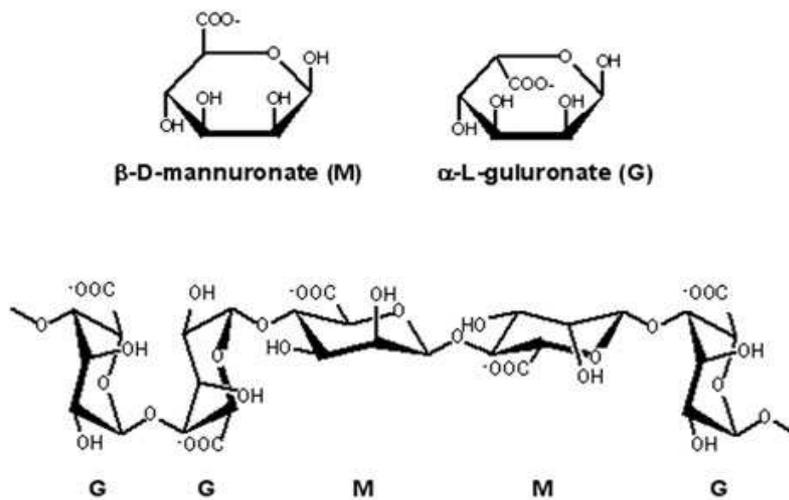


Figura 3.1.2.2 – In alto è rappresentata la struttura dell'acido D-mannuronico (M) e l'acido L-guluronico (G), in basso la formula del copolimero.

Le regioni costituite da blocchi di tipo G formano *hydrogels* in soluzioni acquose di cationi bivalenti (tipicamente calcio) a temperatura ambiente: tale caratteristica viene sfruttata per incapsulare farmaci, fattori di crescita e/o cellule [4].

Grazie alla loro biocompatibilità, idrofilicità e bassa tossicità gli *hydrogels* di alginati vengono usati per riempire le cavità comparse in seguito alle lesioni del midollo spinale; tali scaffolds riducono la formazione della cicatrice gliale e consentono la crescita assonale senza la presenza di fattori di crescita [16].

I processi di fabbricazione di scaffolds a base di alginati comprendono normalmente una fase di gelificazione attraverso la quale si ottiene l'architettura tridimensionale richiesta.

Alcuni svantaggi legati all'utilizzo dell'alginato includono la scarsa resistenza meccanica e la difficile adesione cellulare sulla superficie.

Per superare tali limitazioni viene miscelato con altri materiali, inclusi polimeri naturali quali l'agarosio e il chitosano.

Prima dell'utilizzo nella produzione di scaffolds, agarosio e alginato vanno trattati perché spesso le preparazioni commerciali contengono sottoprodotti citotossici e mitogeni.

3.1.3 Acido ialuronico

L'acido ialuronico è un componente naturale dei tessuti (è un glicosamminoglicano presente nella ECM del cervello) in grado di svolgere un ruolo chiave nella riparazione dei tessuti.

L'acido ialuronico regola l'adesione, la crescita e la migrazione cellulare e non è immunogenico.

A causa del veloce riassorbimento, della solubilità in ambiente acquoso e della sua non processabilità si ricorre ad un suo derivato ottenuto mediante esterificazione dei gruppi carbossilici dell'acido glucuronico con alcol benzilico.

Tale derivato è processabile, biocompatibile, si degrada lentamente ed è compatibile con il processo di sterilizzazione. Viene prodotto in forma di matrice tridimensionale per la crescita di cellule *in vitro*.

Con metilcellulosa, l'acido ialuronico costituisce un copolimero in forma di gel utilizzato per il *drug delivery* intratecale.

In figura 3.1.3.1 è rappresentata la formula dell'acido ialuronico.

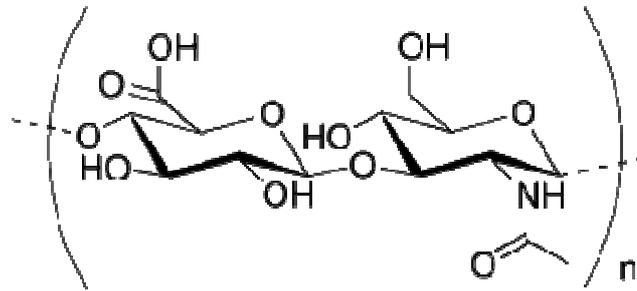


Figura 3.1.3.1 - Unità disaccaridica che si ripete nella macromolecola dell'acido ialuronico.

3.1.4 Chitosano

Il chitosano è un polimero di origine naturale composto da D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina, legate tramite legami $\beta(1-4)$.

È derivato per deacetilazione alcalina dalla chitina (figura 3.1.4.1), presente nell'esoscheletro di crostacei, insetti ed in alcuni tipi di funghi. Il chitosano viene dissolto in acqua agendo sul pH.

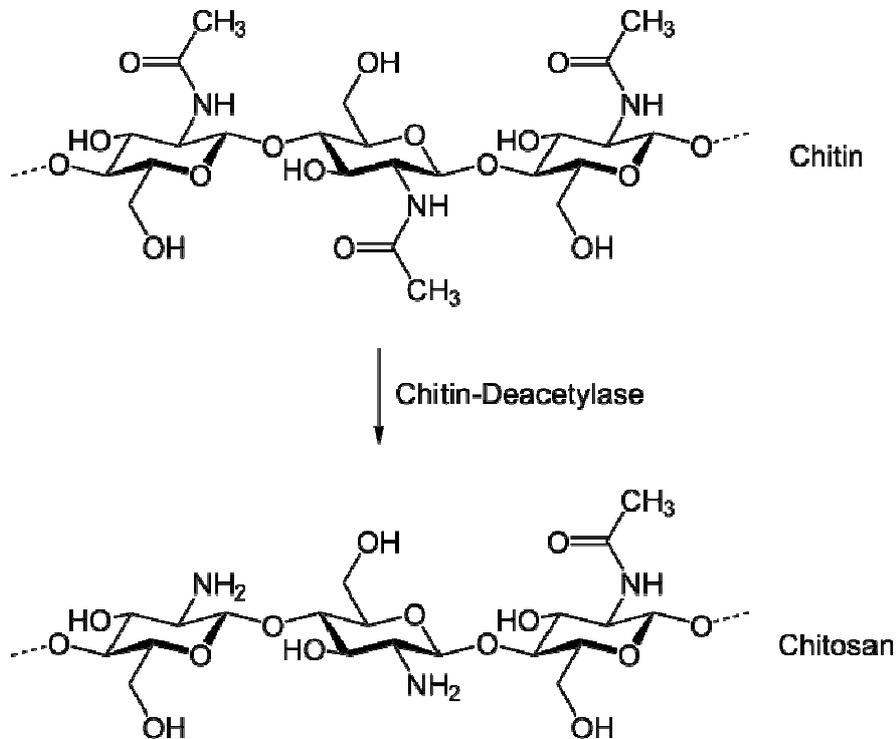


Figura 3.1.4.1 – Sintesi del chiosano.

Scaffolds di chitosano inducono nell'organismo una minima reazione da corpo estraneo, sostengono la crescita assonale e il polimero può essere utilizzato per incapsulare specifiche popolazioni cellulari .

Il suo utilizzo ha permesso la realizzazione di condotti intramidollari ed extramidollari capaci di supportare la differenziazione di cellule staminali neurali nel midollo spinale lesionato.

Il chitosano possiede gruppi chimici per l'attacco di altre molecole: l'entità dell'adesione cellulare indotta è determinata dall'estensione della carica positiva, la quale a sua volta è funzione del grado di deacetilazione alcalina. Viene facilmente combinato con altri materiali per aumentarne la resistenza. Attualmente si utilizzano miscele con polimeri naturali come il collagene e con polimeri sintetici come il glicole polietilenico [4].

3.1.5 Fibronectina

La fibronectina, ottenuta dal plasma umano o bovino, è un'importante proteina di adesione presente nell'ECM.

Il ruolo fondamentale della fibronectina è quello di far aderire le cellule all'ECM, interagendo e legando specifiche proteine ancorate sulla superficie della membrana cellulare. Interagisce inoltre con altre biomolecole dell'ECM come collagene, fibrina ed eparina.

È una lunga molecola flessibile (figura 3.1.5.1), di norma presente sotto forma di dimero con le due subunità tenute assieme da un ponte disolfuro che si realizza nella zone C-terminale.

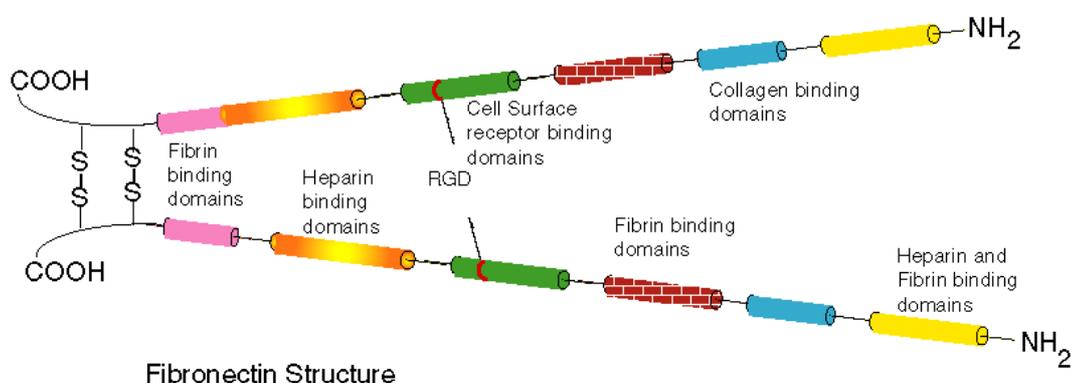


Figura 3.1.5.1 – Diversi domini della fibronectina.

Ciascuna catena di fibronectina è costituita da 4 domini strutturali che si ripetono, chiamati tipo I (FnI), tipo II (FnII), tipo III (FnIII) e dominio V. Nella maggior parte delle fibronectine, questi domini sono organizzati in modo che 6 domini di FnI risultano seguiti da 2 domini FnII, 3 domini FnI, 14 domini FnIII, 1 dominio V, 1 dominio FnIII e 3 domini FnI. Il sito per l'interazione con l'integrina è stato individuato in 10FnIII, dove è presente un motivo RGD [15].

Porzioni di fibronectina sono in grado di direzionare la crescita assonale, sono strutture porose in grado di fornire siti per l'adesione cellulare e di assorbire fattori di crescita (NGF) e anticorpi [4].

3.2 Polimeri sintetici

I materiali sintetici possono essere industrialmente producibili su grande scala e possono essere trasformati in una matrice tridimensionale nella quale la struttura principale, le proprietà meccaniche e la velocità di degradazione possono essere controllate. Hanno una composizione nota e possono essere progettati in modo da minimizzare la risposta immunitaria.

Polimeri sintetici con caratteristiche diverse possono essere fatti reagire assieme in modo da combinare le proprietà specifiche di ciascuno. Il principale svantaggio dei materiali sintetici consiste nella mancanza di segnali specifici per il riconoscimento cellulare.

3.2.1 Acido polilattico (PLA)

L'acido polilattico è un poliesteri biodegradabile derivato dall'acido lattico. L'acido lattico è un composto naturale normalmente presente nell'organismo e quindi ben tollerato e facilmente metabolizzato.

Dato che questo polimero è biodegradabile, biocompatibile, gode di buone proprietà meccaniche e dissolve nei comuni solventi industriali è stato utilizzato con successo come matrice per il trapianto di cellule e la rigenerazione di tessuto.

È stato dimostrato, *in vivo* ed *in vitro*, che il PLA e i suoi prodotti di degradazione sono compatibili con il midollo spinale e con le cellule di Schwann [4].

Lo sviluppo di scaffolds macroporosi funzionalizzati con cellule di Schwann che effettivamente promuovono la rigenerazione assonale nel midollo spinale lesionato è

ostacolato dalla scarsa sopravvivenza di tali cellule una volta impiantate nello scaffold. Una possibile soluzione è stata proposta da Miller con i suoi collaboratori. Miller ha utilizzato scaffolds nella cui struttura erano presenti dei microcanali con adsorbite molecole di laminina. La laminina si è dimostrata in grado di aumentare l'adesione delle cellule di Schwann nel substrato. Tali cellule si allineavano lungo i canali. È stato scoperto inoltre che la larghezza del canale influenza notevolmente l'allineamento, mentre la profondità non sembra giocare un ruolo altrettanto significativo [17].

3.2.2 Copolimero acido lattico – acido glicolico (PLGA)

L'acido poliglicolico (PGA) è altamente cristallino, ha un elevato punto di fusione e rispetto al PLA ha una bassa solubilità nei solventi organici. Per la sua natura idrofilica è stato utilizzato come materiale di sutura già a partire dagli anni '70.

È stato dimostrato che suture di PGA tendono a perdere rapidamente la loro resistenza meccanica dopo 2-4 settimane dall'intervento. Migliori prestazioni si possono ottenere usando copolimeri di PGA e PLA. La presenza di un gruppo metilico in più rende l'acido lattico più idrofobico dell'acido glicolico. L'idrofobicità del PLA limita l'assorbimento di acqua da parte del copolimero, rendendone l'idrolisi più lenta rispetto a quella del solo PGA. Agendo sul rapporto PLA:PGA del copolimero è possibile variare le proprietà *in vitro* (rigonfiamento, permeabilità, velocità di degradazione, deformazione) del PLGA. De Ruyter ha determinato i valori ottimali di tale rapporto per scaffolds utilizzabili nella riparazione del midollo spinale [4].

3.2.3 Policaprolattone (PCL)

Il policaprolattone è un poliestere alifatico dotato di buone caratteristiche di biocompatibilità, riassorbibilità ed elevata stabilità termica.

Questo polimero ha un basso punto di fusione (intorno ai 60° C) e una temperatura di transizione vetrosa intorno a -60°, particolarmente bassa rispetto ad altri polimeri biorassorbibili usati per applicazioni biomediche.

Ha una buona resistenza nei confronti del cloro, dell'acqua, dell'olio e dei solventi in genere.

Si degrada in condizioni fisiologiche per idrolisi a causa della presenza all'interno della sua struttura di legami esterei e perciò ha ricevuto una particolare attenzione per la realizzazione di dispositivi impiantabili.

È utilizzato per la realizzazione di impianti di lunga durata, a causa della sua più lenta degradazione rispetto al PLA [4].

3.2.4 Polipirrolo

Il polipirrolo oltre ad essere biocompatibile, è in grado di condurre corrente elettrica ed è antiossidante. È stato scoperto che il polipirrolo aumenta la rigenerazione nervosa se stimolato elettricamente. Inoltre, date le proprietà antiossidanti potrebbe deossidare qualsiasi radicale libero nel sito della lesione minimizzando la formazione della cicatrice gliale [7].

Viene ossidato e ridotto facilmente e reversibilmente grazie all'azione di dopanti; i principali dopanti utilizzati sono anioni, proteine, fattori di crescita e altre molecole biologicamente attive.

Non è però biodegradabile e problemi legati alla sua sicurezza nei sistemi biologici ne hanno limitato fortemente l'utilizzo in condotti per la ricrescita nervosa.

3.2.5 Glicole polietilenico (PEG)

Il glicole polietilenico, conosciuto anche come PEO o POE, è commercialmente il più importante dei polieteri. Nella forma nativa è sostanzialmente non adesivo per le cellule ma può essere funzionalizzato e coniugato con diverse molecole bioattive tra cui peptidi recanti segnali di adesione cellulare (p. es. sequenze RGD).

L'utilizzo di PEG riduce l'assorbimento proteico su una varietà di substrati idrofobici. Per queste proprietà aiuta a minimizzare la risposta immunitaria dopo l'impianto.

In aggiunta tale polimero può anche contribuire a sigillare le membrane cellulari dopo la lesione, limitando la morte cellulare.

Il PEG è biocompatibile, ha un comportamento idrofilico, viene utilizzato nella produzione di *hydrogels* per il *drug delivery* con tassi di degradazione e di rilascio di farmaci variabili in un ampio range. È anche utilizzato come *delivery system* per cellule, neurotrofine e costrutti genetici.

Questi gels possono essere modificati chimicamente aggiungendo siti per l'adesione cellulare o molecole della matrice extra-cellulare.

3.2.6 Poliidrossietilmetacrilato (PHEMA)

Il poliidrossietilmetacrilato (PHEMA) è un *hydrogel* che si ottiene dalla polimerizzazione e reticolazione dell'idrossietilmetacrilato (HEMA). È un polimero termoindurente, non biodegradabile.

È un *hydrogel* neutro, cioè non ionico, e può contenere acqua approssimativamente pari al 40% in peso, regolabile attraverso la copolimerizzazione con monomeri idrofobici o idrofilici.

All'aumentare del contenuto d'acqua, diminuisce la resistenza a trazione ed a rottura del PHEMA; anche la temperatura esercita indirettamente una certa influenza, dal momento che controlla il fenomeno del rigonfiamento.

Differenti metodi di preparazione del PHEMA possono indurre diversi valori delle proprietà meccaniche e fisiche.

Tale polimero è particolarmente attraente per le applicazioni dell'ingegneria biomedica.

Nonostante per sua natura non sia adesivo per le cellule, può essere facilmente modificato con peptidi per stimolare specifiche risposte cellulari.

Flynn e i suoi collaboratori hanno creato canali con PHEMA orientati longitudinalmente per la rigenerazione di tessuto neurale: hanno scoperto che questi scaffolds sono in grado di aumentare la rigenerazione nervosa dopo una lesione del midollo spinale aumentando l'area superficiale disponibile e fornendo una guida per l'estensione degli assoni e l'invasione delle cellule [4].

Capitolo 4

Tecniche di fabbricazione

Sono state sviluppate diverse tecniche per ottenere, da materiali naturali o sintetici, scaffolds porosi adatti ad applicazioni biomediche. Le principali tecniche sono: electrospinning, self-assembly, solvent-casting particulate leaching, gas foaming, liquid-liquid phase separation e sistemi di solid freeform fabrication.

Le più diffuse sono l'electrospinning e il self-assembly che permettono la formazione di *networks* tridimensionali di nanofibre con morfologia e diametro vicini a quelli delle fibre che costituiscono la matrice extracellulare del tessuto nervoso.

4.1 Electrospinning

Tale tecnica utilizza forze elettrostatiche per generare fibre polimeriche con diametri variabili tra i 100-500 nm. Diversi materiali possono essere elettrofilati. Le fibre elettrofilate possono essere orientate o disposte in maniera casuale, in esse è possibile incorporare antibiotici, agenti antitumorali, proteine, DNA e RNA. Anche sospensioni contenenti cellule viventi possono essere elettrofilate con successo [18].

Confrontando substrati costituiti di film polimerici e di nanofibre elettrofilate è stata dimostrata, sia *in vivo* che *in vitro*, l'efficacia delle nanofibre elettrofilate nell'aumentare la rigenerazione nervosa [19].

Un tipico sistema per l'electrospinning è costituito da una siringa nella quale è contenuto il fluido polimerico sotto forma di soluzione o fuso; un generatore di

tensione ad alto voltaggio ed un collettore posto a massa (figura 4.1). La siringa forza il passaggio della soluzione polimerica attraverso l'ago. Il generatore, collegato all'ago, carica elettrostaticamente il fluido. All'aumentare dell'intensità del campo elettrico, la superficie del fluido sulla punta del capillare si allunga formando il cosiddetto "cono di Taylor". Se all'interno del liquido le forze elettrostatiche dovute alla repulsione di cariche simili superano la tensione superficiale, il fluido carico viene emesso a partire dall'apice del cono di Taylor e accelerato verso il collettore. Durante il tragitto verso il collettore il getto subisce un processo di instabilità (*whipping instability*). Tale processo porta all'assottigliamento del getto stesso, aumenta il tempo di transito e la lunghezza del percorso consentendo l'evaporazione del solvente.

Le fibre sono poi raccolte in un collettore. Le configurazioni possibili per i collettori variano a seconda delle applicazioni: per *mats* di fibre orientate casualmente si utilizzano collettori stazionari; per *mats* di fibre allineate si ricorre a collettori rotanti (in questo caso la velocità di rotazione gioca un ruolo fondamentale nel determinare il grado di anisotropia).

La conducibilità e la porosità del collettore determinano invece la densità di impaccettamento (*packing density*) delle fibre raccolte.

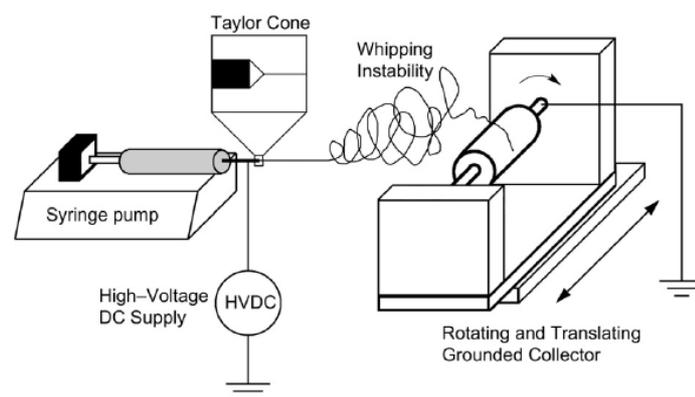


Figura 4.1 – Schematizzazione di un tipico apparato per electrospinning.

Diversi parametri del processo (tensione applicata, velocità di flusso e distanza capillare-collettore) e della soluzione (concentrazione del polimero, volatilità del solvente e conducibilità della soluzione) possono influenzare la formazione e la

morfologia delle fibre. Sebbene si possano individuare delle relazioni generali tra la morfologia delle fibre e i vari parametri sopraelencati (tabella 4.1), l'esatta influenza di ciascuno di essi dipende dal particolare sistema polimero/solvente [18].

PARAMETRI	EFFETTI SULLA MORFOLOGIA DELLE FIBRE
Tensione applicata	Aumentando la tensione il diametro delle fibre inizialmente diminuisce, poi torna ad aumentare.
Velocità di flusso	All'aumentare della velocità di flusso aumenta il diametro delle fibre e la dimensione dei pori. Per velocità elevate si ha un aumento dei difetti (<i>beads</i>) dovuto al fatto che le fibre non si asciugano completamente prima di raggiungere il collettore.
Distanza capillare-collettore	Tale distanza può influenzare la dimensione delle fibre di uno o due ordini di grandezza. All'aumentare della distanza il diametro delle fibre diminuisce. Se la distanza è troppo piccola si formano dei difetti.
Concentrazione del polimero	La concentrazione del polimero influenza sia la viscosità che la tensione superficiale della soluzione. Se la soluzione è troppo diluita la fibra polimerica si rompe prima di raggiungere il collettore, mentre se la soluzione è troppo concentrata la fibra non riesce a formarsi. All'interno del range ottimale di concentrazioni per la formazione di nanofibre, un aumento della concentrazione comporta un aumento del diametro della fibra.
Conducibilità della soluzione	All'aumentare della conducibilità il diametro diminuisce. Soluzioni con elevata conducibilità sono altamente instabili in presenza di campi elettrici elevati e le fibre che ne derivano hanno un diametro variabile in un ampio range.
Volatilità del solvente	Affinché avvenga una sufficiente evaporazione del solvente durante il tragitto tra il capillare e il collettore è necessario usare un solvente volatile. Al diminuire della volatilità del solvente diminuisce la densità dei pori.

Tabella 4.1 – Effetti dei parametri del processo e della soluzione sulla morfologia delle fibre.

4.2 Self-Assembly (SA)

Il *self-assembly* consiste nell'organizzazione spontanea di molecole in strutture particolari, senza l'intervento umano. Questo processo è mediato da legami non covalenti, come forze di Van Der Waals, legami a idrogeno e forze elettrostatiche. Sebbene questi legami siano relativamente insignificanti se isolati, nel loro insieme governano la conformazione strutturale di tutte le macromolecole biologiche e influenzano le loro interazioni con altre molecole [20].

Le nanofibre ottenute con tale tecnica imitano molto fedelmente la struttura della matrice extracellulare: il loro diametro è almeno di uno o due ordini di grandezza più piccolo di quello delle fibre elettrofilate.

Diversi studi hanno dimostrato che molte proteine e peptidi possono produrre strutture di nanofibre stabili e ordinate con notevole regolarità. Tali molecole peptidiche, coinvolte nella formazioni di nanofibre, possono scindersi in L-amminoacidi che oltre a non essere tossici, potrebbero essere usati da cellule vicine a tali fibre per la crescita e la riparazione.

I peptidi più comunemente usati nella produzione di scaffolds di nanofibre autoassemblate (SAPNSs) per la coltura di cellule neurali sono Arginina-Alanina-Aspartato (RAD) 16-I e Isoleucina-Lisina-Valina-Alanina-Valina (IKVAV), in grado di promuovere e dirigere la crescita di neuriti.

Nella riparazione del sistema nervoso centrale, come già spiegato nel capitolo 1, la cicatrice gliale è il principale ostacolo alla rigenerazione assonale dopo una lesione al midollo spinale. Inibire la sua formazione è perciò cruciale per avere successo.

Tysseling-Mattiate e i loro collaboratori hanno dimostrato che utilizzando uno SAPNSs IKVAV è possibile inibire la formazione della cicatrice gliale e al contempo promuovere l'allungamento assonale dopo una lesione al midollo spinale.

Sebbene i vantaggi nell'utilizzo di scaffolds di nanofibre auto-assemblanti siano stati provati sia *in vivo* che *in vitro*, tale tecnica presenta delle limitazioni legate all'instabilità meccanica della struttura tridimensionale e alla formazione non controllabile di macro-pori. Se confrontato con l'electrospinning, il self-assembly inoltre richiede tecniche e procedure più complicate che potrebbero portare ad una riduzione della produttività [19].

4.3 Liquid-liquid phase separation

Il polimero viene sciolto in un solvente caratterizzato da bassa temperatura di fusione in grado di sublimare facilmente, come il naftalene o il fenolo. In alcuni casi sono aggiunte piccole quantità di acqua, in veste di non solvente, per indurre la separazione di fase. La soluzione polimerica viene poi raffreddata al di sotto del punto di fusione del solvente e essiccata sotto vuoto per alcuni giorni per assicurare la completa sublimazione del solvente. La morfologia dello scaffold risultante dipende da diversi parametri quali: la concentrazione della soluzione; il metodo di raffreddamento e il tempo impiegato; il rapporto solvente/non solvente e la presenza di surfattanti che possono ridurre la tensione sulla superficie di separazione tra le

fasi, incrementare la dimensione dei pori e la loro interconnessione. Grazie alla possibilità di controllare la porosità e la dimensione dei pori attraverso svariati parametri, tale tecnica è molto diffusa nonostante richieda l'utilizzo di solventi organici, potenzialmente nocivi per le cellule.

4.4 Gas foaming

Questa tecnica ha il notevole vantaggio di eliminare l'utilizzo di solventi organici nella produzione di spugne porose: l'agente porogeno è in questo caso un gas.

Il polimero viene saturato con CO₂ ad alta pressione. La solubilità del gas nel polimero è poi diminuita rapidamente portando la pressione di CO₂ alla pressione atmosferica. Ciò comporta nel polimero la nucleazione e la crescita di bolle gassose la cui dimensione varia tra 100-500 µm. In una struttura così ottenuta solo il 10-30 % dei pori risulta connesso.

4.5 Solvent-casting particulate leaching

Un altro metodo per creare pori nello scaffold consiste nell'utilizzo di agenti porogeni solubili in acqua, come ad esempio il cloruro di sodio.

Il primo passo del processo prevede la dissoluzione del polimero in cloroformio o cloruro di metilene; a tale soluzione andranno poi aggiunti i cristalli di cloruro di sodio. Il solvente viene lasciato evaporare e il composto polimero/sale viene immerso in acqua. La porosità dello scaffold risultante dipende dalla quantità di sale aggiunto, mentre la dimensione dei pori è controllata dalla dimensione dei cristalli di NaCl.

Tale procedura prevede l'utilizzo di solventi organici che in molti casi precludono la possibilità di aggiungere agenti farmacologici allo scaffold durante la fabbricazione [21].

4.6 Solid Freeform Fabrication (SFF)

Le tecniche finora presentate non consentono un controllo accurato né della microstruttura dello scaffold né della geometria e della distribuzione delle cavità porose.

Le tecnologie SFF potrebbero essere la soluzione a tale problema: permettono di produrre scaffolds con una forma esterna predefinita e una morfologia interna riproducibile; consentono di controllare la porosità, la dimensione dei pori e la loro distribuzione; creano strutture in grado di migliorare il trasporto di ossigeno e dei nutrienti in profondità nello scaffold. Sebbene ci siano diverse varianti commerciali, il processo generale prevede l'utilizzo di sistemi di elaborazione automatica delle immagini (CAD) e la fabbricazione assistita al computer. L'oggetto viene prodotto sovrapponendo progressivamente sezioni parallele partendo dalla base fino ad arrivare alla sommità. Le informazioni ottenute mediante tomografia assiale computerizzata (TAC) e risonanza magnetica (MRI) vengono usate per creare modelli CAD su misura, lo scaffold così ottenuto avrà l'esatta forma esterna richiesta dal sito d'impianto e una morfologia interna predefinita e riproducibile.

Nei successivi paragrafi sono descritte brevemente le tecnologie SFF usate in campo biomedico.

Esiste anche una differente scuola di pensiero secondo la quale i sistemi di prototipazione rapida vengono usati per produrre degli stampi all'interno dei quali andranno poi colati i materiali utilizzati per la produzione degli scaffolds. Il procedimento è illustrato in figura 4.6. Tale metodo non presenta gli inconvenienti tipici dei sistemi di solid freeform fabrication (uso di collanti organici tossici, elevate temperature di processo, poca resistenza meccanica e difficoltà nella rimozione delle polveri), mantenendo al contempo l'alto grado di controllo e l'elevata risoluzione offerta dalle tecniche SFF

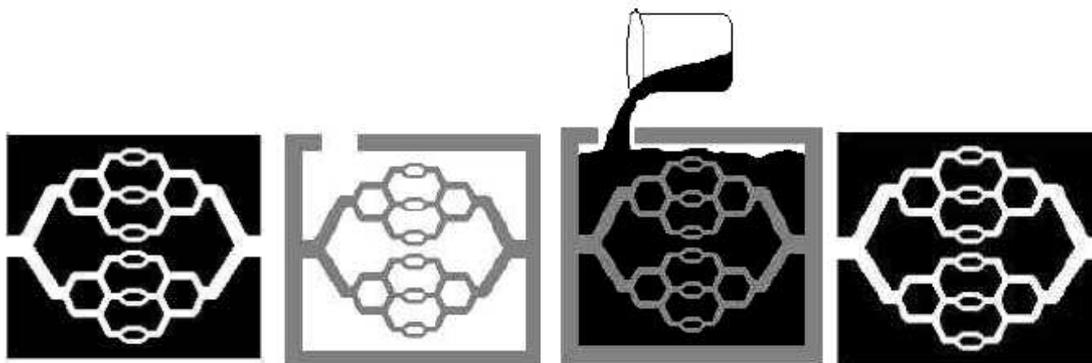


Figura 4.6 – Punti principali per produrre uno stampo per scaffold con prototipazione rapida: lo scaffold previsto; lo stampo possiede la forma negativa dello scaffold, è progettato da un computer usando CAD e prodotto con una tecnica di prototipazione rapida; il materiale biodegradabile e biocompatibile viene colato nello stampo e lasciato solidificare; lo stampo viene rimosso attraverso una tecnica di dissoluzione chimica o termica.

Sachlos e collaboratori utilizzando la tecnica appena descritta sono riusciti a produrre uno scaffold di collagene per l'ingegneria dei tessuti molli con una morfologia interna predefinita.

Lo stampo, prodotto con un sistema SFF, è stato riempito con una dispersione di collagene di tipo I, la temperatura è stata poi abbassata a -20°C . Lo stampo e i cristalli di ghiaccio sono stati sciolti per immersione dello stampo stesso in etanolo. È stata così prodotta una struttura porosa di collagene con canali interni definiti durante la progettazione dello stampo. Lunghezza e larghezza minima ottenibile per i canali è di $200\pm 20\ \mu\text{m}$.

L'etanolo, probabilmente il solvente organico più appropriato perché eventuali suoi residui non sono letali per le cellule, è stato rimosso per essiccazione al punto critico con diossido di carbonio liquido.

Le temperature durante tutto il processo di produzione non hanno mai raggiunto i 36°C , è stata così garantita la non denaturazione del collagene.

Con tale tecnica, date le basse temperature raggiunte, è quindi possibile l'incorporazione di molecole biologiche allo scaffold.

4.6.1 Three Dimensional Printing (3DP)

Inizialmente viene steso uno sottile strato di polvere su un apposito apparato e da una testina simile a quella di una stampante a getto d'inchiostro viene spruzzato un collante. Tale testina è controllata automaticamente da una stazione di lavoro connessa al computer (figura 4.6.1).

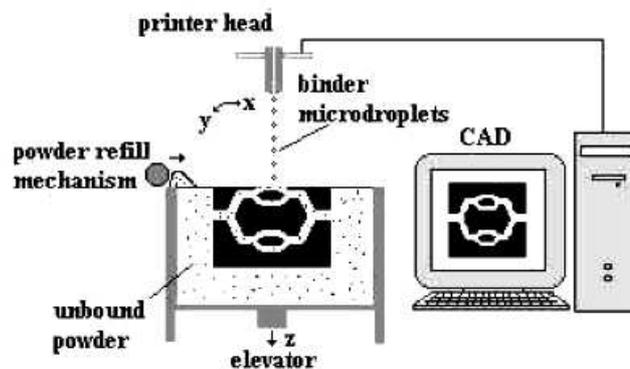


Figura 4.6.1 – Schematizzazione di un apparato per 3D printing.

Il collante si dissolve e unisce le polveri adiacenti, lo strato viene abbassato, la superficie ricoperta di un nuovo strato di polveri ed il processo riparte.

La polvere in eccesso aiuta a sorreggere, strato dopo strato, l'oggetto in costruzione impedendone ogni deformazione geometrica.

Terminato lo scaffolds è necessario rimuovere le polveri: questa procedura si rivela alquanto complicata nei canali più profondi della struttura.

Oltre ai problemi legati alla rimozione delle polveri, tale tecnica prevede spesso l'utilizzo di solventi organici come collanti.

4.6.2 Stereolithography (SLA)

Questo processo si basa sulla polimerizzazione di un monomero liquido fotosensibile per mezzo di un raggio laser ultravioletto. Il raggio UV viene deflesso sulla superficie liquida contenente il monomero grazie ad un sistema di specchi pilotato dal computer. In figura 4.6.2 è schematizzata tale struttura.

Appena il primo strato è costruito, il carrello su cui poggia l'oggetto in costruzione viene abbassato così da permettere al fotopolimero liquido di ricoprire nuovamente la superficie.

L'ultimo step prima di ripetere il procedimento prevede l'utilizzo di una specie di tergicristallo per spianare la superficie e renderla uniforme.

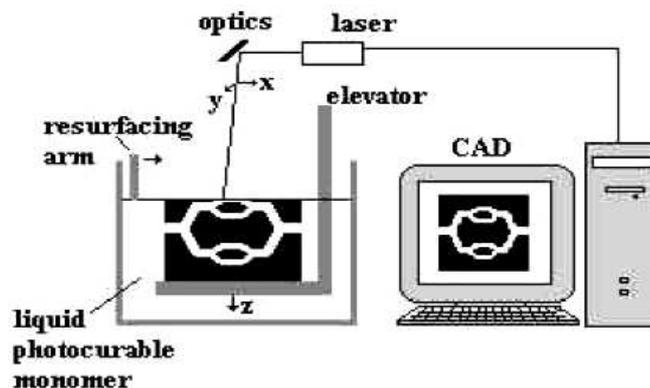


Figura 4.6.2 - Schematizzazione di un apparato per stereolithography.

Se nello scaffold sono presenti parti non vincolate alla base o che potrebbero cadere durante la fabbricazione, è necessario aggiungere delle strutture di supporto provvisorie che andranno poi rimosse manualmente una volta completato lo scaffold.

4.6.3 Fused Deposition Modelling (FDM)

FDM usa un ugello mobile per estrudere una fibra polimerica con la quale è costruito, strato dopo strato, l'intero scaffold. Al termine della formazione di uno strato, l'oggetto viene abbassato e la procedura riparte (figura 4.6.3).

In maniera automatica vengono anche prodotte delle strutture esterne che dovranno essere poi rimosse manualmente per supportare parti sporgenti o scollegate.

La porosità può variare tra il 48-77% in dipendenza del diametro della punta dell'ugello.

Questa tecnica, non implicando l'utilizzo di solventi organici tossici, ha suscitato notevole interesse nel campo dell'ingegneria dei tessuti. Essa opera però a temperature elevate (120 °C) che impediscono l'incorporazione di molecole biologiche durante il processo.

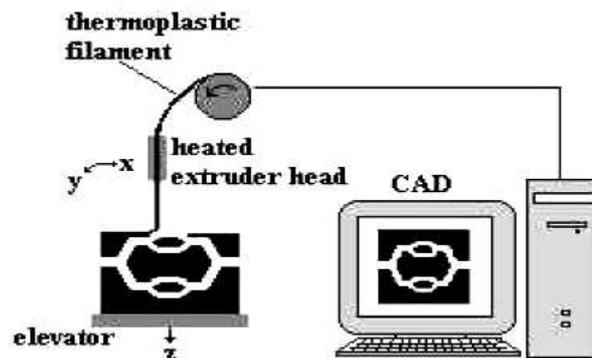


Figura 4.6.3 – Schematizzazione di un apparato per fusion deposition modelling.

4.6.4 3D Bioplotter

Tale tecnica utilizza un ugello mobile, controllato nelle tre direzioni, e aria compressa per far uscire la soluzione (figura 4.6.4). L'ugello può essere riscaldato a temperatura desiderata. La soluzione solidifica quando entra in contatto con lo strato precedente.

Il bioplotter è estremamente versatile perché consente di lavorare leghe a caldo, dispersioni di polimeri, monomeri o oligomeri reattivi ed è inoltre utilizzabile per la produzione di *hydrogel*.

Essendo praticabile già a 37° C, offre inoltre la possibilità di incorporare diverse popolazioni cellulari nelle soluzioni [22].

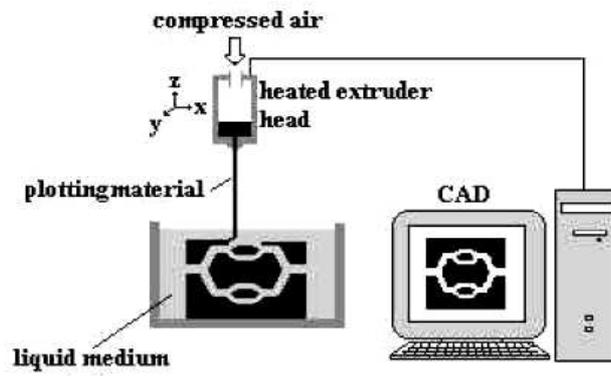


Figura 4.6.4 – Schematizzazione di un apparato per 3D bioplotter.

Capitolo 5

Biofunzionalizzazione di scaffolds

5.1 Interazioni delle cellule con l'ambiente extra-cellulare

La matrice extra-cellulare (ECM) è una struttura molto complessa che circonda e supporta le cellule dei tessuti animali e contiene numerosi pori per la diffusione delle sostanze nutritive e dell'ossigeno. Serve da sostegno strutturale per i tessuti ma ha anche un ruolo attivo nella trasmissione dei segnali in quanto regola lo sviluppo, la migrazione, la proliferazione, la forma e la funzione delle cellule a stretto contatto con essa. Si comporta quindi come uno scaffold sul quale ed entro il quale i tessuti possono organizzarsi, tale aspetto merita una particolare attenzione nel momento in cui si progetta uno scaffold, che dovrebbe fungere da ECM permanente

I principali componenti della ECM sono:

- le proteine strutturali (collagene ed elastina);
- i glicosamminoglicani ed i proteoglicani;
- le proteine di adesione (fibronectina, laminina, tenascina e vitronectina).

L'esatta composizione e l'organizzazione spaziale varia comunque anche a seconda del tessuto [15].

Le interazioni tra cellula e matrice extracellulare sono fondamentali per determinare il destino della cellula stessa. È stato dimostrato che la cellula richiede un'area minima di contatto per sopravvivere in un substrato; cellule che perdono tale contatto hanno una frequenza di apoptosi più alta rispetto alle cellule ancorate [23].

5.1.1 Interazioni cellula-ECM: le integrine

Le cellule sono collegate tra loro e alla matrice extra-cellulare per mezzo delle molecole di adesione cellulare (CAMs). Le CAMs si possono suddividere in quattro ampie famiglie: le integrine, le caderine, la Super Famiglia delle Immunoglobine (Ig SF) e le selectine.

La trasmissione di segnali chimici e meccanici dalla matrice extracellulare è mediata principalmente dalle integrine. Le interazioni ECM-integrina controllano la sopravvivenza, la crescita, la migrazione e la differenziazione della cellula.

Le integrine sono una famiglia di recettori transmembrana che si trovano sulla superficie cellulare. Ciascuna integrina è un eterodimero che contiene una subunità α e una subunità β legate fra loro in modo non covalente [24].

Le zone più importanti sono tre: una serie di 7 porzioni di circa 60 amminoacidi che si ripetono nella zona N-terminale della subunità α : ogni porzione ha un sito di legame per il Ca^{2+} ; un “inserted domain”, sempre nella subunità α , contenente un sito di coordinazione per uno ione bivalente e un sito di legame per un nucleotide; una zona simile all’inserted domain nella catena β [15]. Entrambe le subunità sono caratterizzate da un ampio dominio extra-cellulare e da una corta coda citoplasmatica in grado di interagire con il citoscheletro (figura 5.1.1.1).

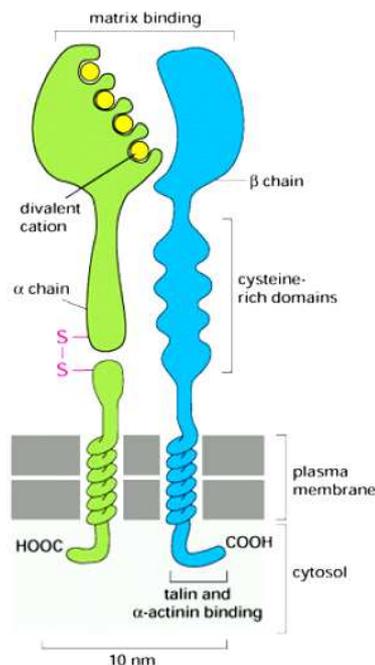


Figura 5.1.1.1 – Schematizzazione di un'integrina, per entrambe le subunità sono evidenziate le zone più importanti.

Esistono 8 diverse subunità β e 18 subunità α che associandosi fra loro formano 24 distinte combinazioni $\alpha\beta$. La combinazione di una subunità α con una β dà la specificità di ligando. Molte integrine possono legare diverse molecole della matrice extracellulare e, viceversa, molte molecole possono legarsi a più di una integrina.

Le vie biochimiche associate alla funzione delle integrine sono bidirezionali, “interno-esterno” o “esterno-interno” (“*inside-out cell signalling*”, “*outside-in cell signalling*”).

In seguito alle interazioni tra domini extracellulari delle integrine e molecole della matrice extracellulare si formano aggregati macromolecolari che si estendono in entrambi i lati della membrana e collegano la matrice extracellulare ai filamenti del citoscheletro. Queste strutture prendono il nome di adesioni focali (figura 5.1.1.2). All'interno della cellula si generano così segnali biochimici e si attivano vie metaboliche intracellulari capaci di generare diverse risposte come riarrangiamento del citoscheletro e regolazione dell'espressione genica.

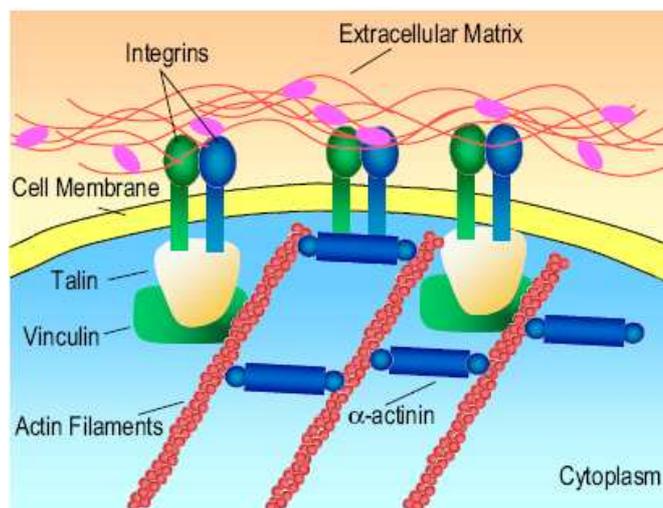


Figura 5.1.1.2 – Meccanismo di adesione cellulare mediato dalle integrine. Nel disegno le molecole legate della matrice extracellulare sono collagene e fibronectina.

Nonostante le macromolecole della ECM abbiano strutture primarie costituite da migliaia di amminoacidi, le integrine riconoscono e legano solo brevi sequenze peptidiche: nel collagene tipo I, II, III le cellule si legano alla sequenza GFOGER e RGD mentre nella fibronectina vengono riconosciute le sequenze RGD, PHSRN, REDV e LDV. Il legame con laminina è invece permesso grazie alle sequenze RGD, IKVAV, YIGSR e PDSGR [24].

Nel prossimo paragrafo saranno indicate sequenze aggiuntive, specifiche però dell'adesione neurale.

5.2 Molecole biologicamente attive per l'ingegneria dei tessuti neurali

La biofunzionalizzazione di scaffolds adatti ad applicazioni neurali si basa principalmente sull'utilizzo di molecole di adesione che legano integrina e fattori di crescita.

Molecole in grado di mediare l'adesione cellula-cellula (per es., molecole di adesione delle cellule neurali: NCAMs) non hanno trovato finora molte applicazioni in questo campo.

Anche i proteoglicani promuovono l'adesione cellulare, ma sono raramente usati nell'ingegneria dei tessuti neurali perché hanno un effetto inibitorio per la rigenerazione assonale nel sistema nervoso centrale [5].

Poiché l'applicazione di proteine native, molecole di adesione o fattori di crescita, è penalizzata dalla labilità della struttura terziaria (fondamentale per garantire l'attività biologica di queste proteine) e dalla difficile reperibilità, l'uso dell'intera proteina è stato soppiantato dall'utilizzo di particolari sequenze peptidiche [15].

L'applicazione di specifiche sequenze peptidiche agli scaffolds per applicazioni neurali sta ricevendo grande attenzione. I peptidi, rispetto alle proteine, sono più stabili, facilmente sintetizzabili e hanno meno problemi legati all'ingombro sterico dopo la funzionalizzazione del biomateriale [5]. Occorre però tenere presente che sperimentalmente, a parità di concentrazione, l'attività biologica dei peptidi è inferiore rispetto a quelle delle proteine native da cui sono tratte le sequenze amminoacidiche. Quest'unico svantaggio è comunque ben bilanciato da quanto visto sopra [15].

La sequenza RGD (presente in collagene, laminina e fibronectina) è stata identificata come la minima sequenza di ricognizione cellulare in grado di mediare l'adesione di molti tipi di cellule, neuroni inclusi.

Specifiche sequenze per l'adesione neurale si trovano soprattutto nella laminina e sono: YIGSR, IKVAV, RNIAEIIKIDI e RYVVLPR. La combinazione di questi peptidi e sequenze estese di peptidi che comprendono YIGSR e IKVAV sono in grado di aumentare significativamente l'adesione neuronale. Anche nel collagene, si

trovano sequenze peptidiche in grado di promuovere l'adesione delle cellule neurali per mezzo delle integrine, la più studiata è la sequenza DGEA presente nel collagene di tipo I e nelle fibrille che lo costituiscono.

Oltre alle proteine della ECM e ai peptidi da esse derivati, anche la polilisina influenza positivamente l'adesione cellulare. La polilisina è un polipeptide composto da sequenze di lisina: esso aumenta l'adesione neurale, la proliferazione e l'estensione dei neuriti. L'adesione cellulare, in questo caso, non è mediata da recettori presenti sulla membrana cellulare dato che le cellule non hanno recettori specifici per questo polipeptide.

La carica positiva presente nella molecola di polilisina attrae la membrana cellulare carica negativamente portando alla formazione di un legame elettrostatico (figura 5.2.1) [5]. Una volta formato il legame elettrostatico, la polilisina induce una ridistribuzione di carica sulle molecole della membrana cellulare che porta a variazioni di conduttività e permeabilità della membrana stessa [25].

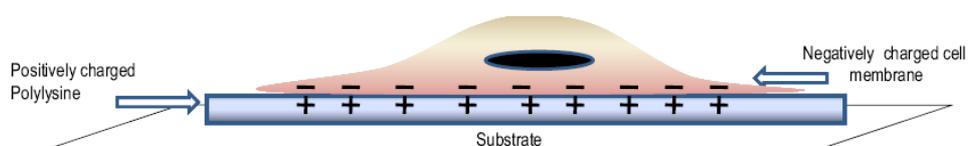


Figura 5.2.1 – Meccanismo di adesione cellulare della polilisina.

L'interazione risultante polilisina-cellula è simile alle interazioni mediate da recettore-ligando.

È stato scoperto che la funzionalizzazione di biomateriali con piccole concentrazioni di polilisina a basso peso molecolare promuove solo debolmente l'adesione, mentre se presente in alte concentrazioni ed elevato peso molecolare induce lisi cellulare nel tessuto limitrofo all'impianto. La risposta delle cellule in superficie funzionalizzate con polilisina dipende quindi fortemente dal peso molecolare della stessa [5].

Come anticipato all'inizio del paragrafo, enormi possibilità per l'interazione cellula-materiale sono offerte anche dai fattori di crescita. I fattori di crescita sono proteine che si legano a recettori specifici sulla superficie della membrana citoplasmatica e attivano opportune funzioni cellulari [15].

Di seguito sono riportati i fattori di crescita che hanno trovato applicazioni nella funzionalizzazione di scaffolds per il midollo spinale.

Alcuni dei più comuni fattori di crescita usati per promuovere la rigenerazione di tessuto neurale sono le neurotrofine [14]. Le neurotrofine sono una famiglia di fattori di crescita che includono *nerve growth factor* (NGF), *neurotrofina-3* (NT-3), *neurotrofina-4/5* (NT-4/5) e *brain derived neurotrophic factor* (BDNF). Queste proteine si legano a recettori di terminazioni nervose, vengono internalizzate e poi trasportate per via retrograda al corpo cellulare, dove attivano la produzione di proteine associate con crescita, sviluppo e sopravvivenza neuronale. Ogni neurotrofina possiede un Trk recettore per il quale ha elevata affinità: l'NGF si lega al Trk A, il BDNF al Trk B, NT-3 al Trk C. Vi è inoltre un recettore a bassa affinità, il p75^{NTR} che lega tutte e quattro le neurotrofine con uguale affinità. Questo recettore però in assenza di recettore Trk A, può causare apoptosi in risposta al NGF [23].

L'NGF gioca un ruolo cruciale nella crescita e nella conservazione di neuroni simpatici, di alcuni neuroni sensoriali e, nel cervello, di neuroni colinergici.

L'NT-3 è fondamentale nella neurogenesi, promuove la differenziazione di nuovi neuroni e la formazione del tratto corticospinale durante lo sviluppo. Basandosi su ciò, studi hanno dimostrato che questa neurotrofina può favorire la sopravvivenza e la crescita di neuroni motori dopo una lesione al midollo spinale.

Originariamente isolato dal cervello, il BDNF può aiutare a dirigere il normale sviluppo neurale e possiede proprietà neuroprotettive simile a quelle di NGF ed NT-3.

Altri fattori di crescita studiati per la loro capacità nel promuovere la rigenerazione nervosa nel midollo spinale includono *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), *fibroblast growth factors* (acido e basico, aFGF e bFGF), *transforming growth factor β* (TGF- β).

Il CNTF promuove la sopravvivenza di neuroni lesionati e neuroni del midollo spinale embrionale, è stato utilizzato per trattare lesioni al midollo spinale, ma alcuni studi fanno pensare che contribuisca alla formazione della cicatrice gliale.

I fattori di crescita FGF promuovono il recupero in maniera indiretta, inducendo angiogenesi, e in maniera diretta favorendo la proliferazione cellulare e la crescita assonale nel sito della lesione.

Il TGF- β *in vitro* riduce la proliferazione degli astrociti e può essere utile per rivestire impianti neurali [14].

Capitolo 6

Tecniche di funzionalizzazione

Le molecole biologicamente attive viste nel capitolo precedente possono essere applicate ai biomateriali per indurre risposte favorevoli nelle cellule e nei tessuti con i quali i biomateriali entreranno in contatto.

Le proteine e i peptidi applicati permettono al materiale di “dialogare” sul piano biochimico con le cellule e i tessuti simulando esattamente ciò che avviene in natura tra cellule e matrice extra-cellulare. Tali molecole interagiscono infatti con i recettori superficiali della cellula e inducono la trasduzione di segnali che influenzano, dopo l’adesione, la crescita cellulare e la formazione di nuovo tessuto.

Biomateriali così modificati prendono il nome di “materiali biomimetici”. Essi sono estremamente utili, oltre che per dispositivi protesici, per la preparazione di scaffolds destinati all’ingegneria dei tessuti [15].

6.1 Funzionalizzazione superficiale

Uno dei principali vantaggi dei materiali polimerici è la loro versatilità per le modificazioni superficiali [11]. Le modificazioni superficiali di biomateriali con molecole biattive è un modo relativamente semplice per rendere biomimetici i materiali utilizzati per gli scaffolds [3]. In questo modo però è possibile controllare il comportamento cellulare solamente in prossimità della superficie del dispositivo biomedico.

6.1.1 Deposizione superficiale (adsorbimento proteico)

Consiste nel rivestire la superficie del materiale con molecole biologicamente attive. Le molecole sono legate al materiale per mezzo di deboli forze (forze di Van der Waals, legami a idrogeno).

La deposizione superficiale si realizza lasciando la superficie del materiale a contatto con una soluzione contenente le biomolecole per un tempo stabilito in condizioni controllate. Il processo di adsorbimento non è controllabile e quindi rimane incerta la quantità di biomolecole legate per unità di superficie [15].

Sebbene lo scaffold così modificato sia in grado di promuovere l'adesione di cellule neurali, tale tecnica presenta un grosso limite dovuto alla poca stabilità dello strato biologicamente attivo una volta posto a contatto con l'ambiente biologico. Occorre inoltre considerare che nel caso di proteine o sequenze peptidiche lunghe, la deposizione superficiale può creare ingombro sterico nel sito attivo, ostacolando l'adesione cellulare e quindi la potenziale rigenerazione di tessuto [5].

Nel caso di scaffolds costituiti da nanofibre porose, l'efficienza dell'adsorbimento può essere migliorata per mezzo di un trattamento al plasma. Ciò aumenta l'idrofilicità delle nanofibre consentendo una maggiore infiltrazione delle soluzioni acquose contenenti biomolecole [11].

6.1.2 Electrostatic attachment

Questa tecnica è molto simile all'adsorbimento proteico e al blending; ciò che la contraddistingue è il legame elettrostatico tra molecole attive e materiale. Esistono due tipi di electrostatic attachment: layer-by-layer (LbL) assembly ed electrochemical polymerization.

6.1.2.1 Layer-by-Layer (LbL) assembly

Questa tecnica consiste nella deposizione alternata di strati di materiali policationici e polianionici che possono auto-assemblarsi grazie a forze elettrostatiche per produrre rivestimenti con dimensioni nanometriche ($\sim 100 \text{ \AA}$). Per esempio materiali carichi positivamente possono essere accoppiati elettrostaticamente con molecole di adesione cariche negativamente per produrre strutture alternate di (-materiale-molecole)_N.

Se il materiale non possiede una carica intrinseca, essa può essere indotta attraverso specifici trattamenti superficiali.

Perché si verifichi l'accoppiamento è inoltre necessario che le molecole biologicamente attive possiedano una carica opposta a quella del materiale sufficiente.

La tecnica è relativamente semplice (figura 6.1.2.1.1): consiste nell'immersione del substrato carico negativamente o positivamente alternativamente in soluzioni policationiche e polianioniche. Tra una fase di deposizione e l'altra, eventuali eccessi di polielettrolita vengono rimossi con un risciacquo. L'operazione è ripetuta fino a quando si ottiene lo spessore del film desiderato.

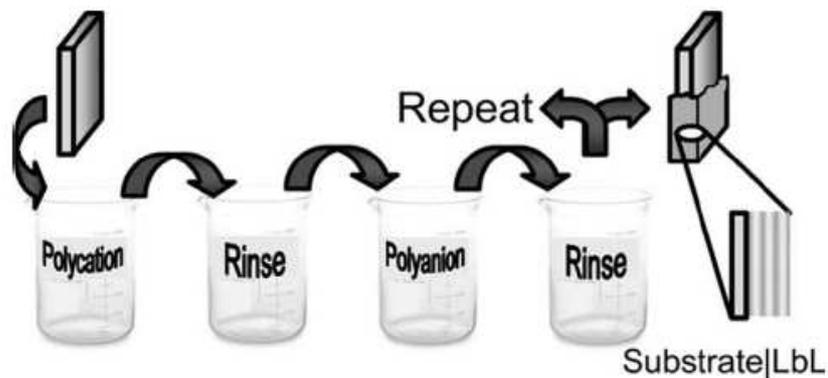


Figura 6.1.2.1.1- Schematizzazione della tecnica LbL.

Per garantire allo scaffold un'interazione diretta con le cellule e i tessuti l'ultimo strato deve contenere la molecola di interesse.

Films LbL hanno molti vantaggi: sono versatili, possono essere potenzialmente applicati a qualsiasi substrato carico e hanno uno spessore controllabile a livello nanometrico. Occorre considerare però che sono molto sensibili a variazioni di pH: piccole alterazioni producono instabilità.

6.1.2.2 Electrochemical polymerization

La polimerizzazione elettrochimica permette di incorporare molecole biologicamente attive in polimeri conduttivi, ad esempio il polipirrolo. Il polipirrolo, dopo essere stato ossidato, sviluppa una carica positiva e può essere accoppiato, grazie a tale tecnica, con molecole di adesione cariche negativamente.

Con questa tecnica è possibile ottenere film estremamente sottili (~ 20 nm).

In questo processo è utilizzato un apparato composto da tre elettrodi: un elettrodo di lavoro (in questo caso silicio), un elettrodo ausiliario (p. es., platino) e un elettrodo di riferimento (p. es., elettrodo a calomelano). Questi elettrodi sono immersi in una soluzione liquida di monomero (il pirrolo) e drogante (le molecole utilizzate per la funzionalizzazione) (figura 6.1.2.2.1).

Applicando una corrente elettrica al sistema, nell'elettrodo di lavoro si deposita un film conduttivo di polimero/molecole.

I monomeri del polimero, in corrispondenza dell'anodo, si ossidano formando cationi che possono legarsi alle molecole di drogante cariche negativamente. Il composto risultante ha perciò una carica netta pari a zero.

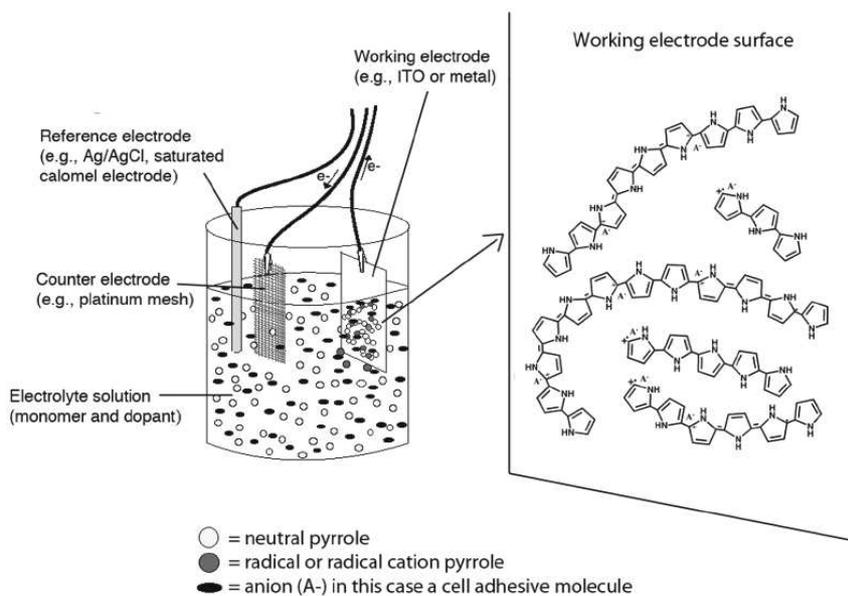


Figura 6.1.2.2.1 – Schema di un apparato per polimerizzazione elettrochimica.

I parametri che possono influenzare la topografia e la conduttività del film polimerico sono: il tempo di deposizione, la temperatura, il sistema di elettrodi e la scelta del solvente.

Un aspetto da sottolineare di questa tecnica è che il drogaggio (quindi la funzionalizzazione del materiale) e la polimerizzazione avvengono in simultanea.

Cui con i suoi collaboratori ha realizzato films di rivestimento di polipirrolo drogato con CDPYIGSR (una sequenza di peptidi derivati da laminina); tali materiali *in vivo*

si sono dimostrati stabili per almeno una settimana e capaci di promuovere l'adesione neurale. Successivamente Cui in collaborazione con Stauffer ha utilizzato come molecole droganti per il polipirrolo la sequenza peptidica RNIAEIKKIDI (anch'essa derivata dalla laminina). Questi composti si sono rivelati migliori nell'aumentare l'adesione neurale e la crescita assonale.

Invece di usare direttamente come drogante le molecole peptidiche di interesse, è possibile drogare il polipirrolo con l'acido poligluttammico (PGlu); il polimero può essere poi funzionalizzato con molecole differenti che andranno a legarsi covalentemente con il PGlu [5].

6.1.3 Covalent attachment

Questo metodo prevede la formazione di un legame covalente con cui ancorare stabilmente le molecole alla superficie del materiale. Esistono diverse tecniche di covalent attachment, specifiche per la funzionalizzazione di biomateriali. In alcune si utilizzano gruppi reattivi esistenti, in altre sono previsti dei pre-trattamenti superficiali per indurvi di nuovi. Il legame fra biomolecola e materiale può essere diretto oppure può coinvolgere un'ulteriore molecola [15]. Generalmente si preferisce l'utilizzo di *crosslinkers* intermedi piuttosto che legare direttamente le molecole al biomateriale: in questo modo si riduce l'ingombro sterico in superficie e si preserva la conformazione della proteina o del peptide. La scelta dell'agente di cross-linking dipende dall'applicazione; nell'uso *in vivo* per esempio si sceglie un agente in grado di minimizzare la risposta immunitaria. I principali metodi di covalent attachment sfruttano i seguenti gruppi reattivi: -SH, -NH₂, -COOH, -OH.

La modificazione chimica per mezzo del gruppo tiolico (-SH) prevede la reazione di un composto sulfidrilico con un maleimide-derivato portando alla formazione di un legame tioetere (figura 6.1.3.1).

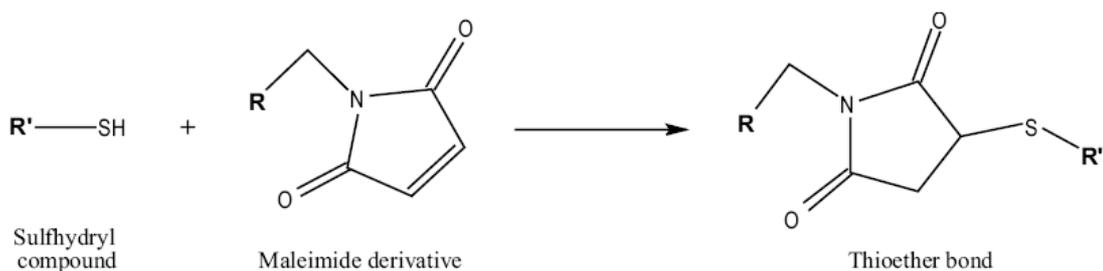


Figura 6.1.3.1 – Reazione di covalent attachment per mezzo di un gruppo tiolico.

È possibile utilizzare come agente di cross-linking il sulfo-SMCC (figura 6.1.3.2).

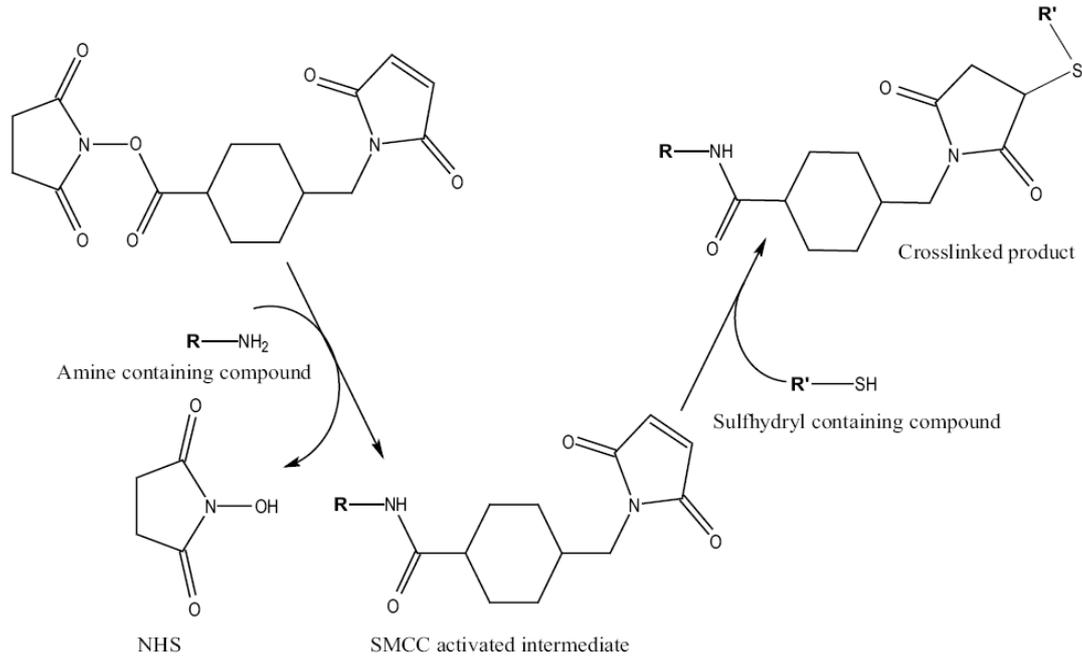


Figura 6.1.3.2 – Reazione di covalent attachment per mezzo di un gruppo tiolico e agente di cross-linking.

Molti polimeri usati nell'ingegneria dei tessuti neurali (per es., l'agarosio e l'acido ialuronico) contengono il gruppo ossidrilico (-OH).

Il carbonildiimidazolo (CDI) può essere utilizzato per legare i biomateriali con le molecole di adesione per mezzo di tale gruppo (figura 6.1.3.3).

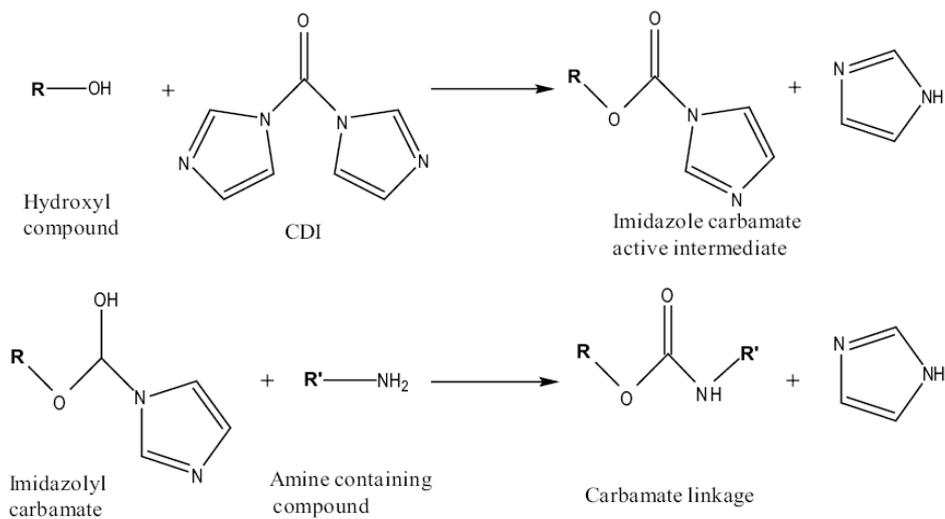


Figura 6.1.3.3 - Reazione di covalent attachment per mezzo di un gruppo ossidrilico e agente di cross-linking.

Con tale tecnica è stato possibile legare l'agarosio a frammenti di laminina (CDPGYIGSR, IKVAV, GRGDCP e loro combinazioni).

Il metodo forse più diffuso per legare covalentemente polimeri e molecole attive sfrutta il gruppo carbossilico (-COOH) e l'EDC o EDAC (figura 6.1.3.4).

Se i prodotti intermedi sono altamente instabili e presenti in basse concentrazioni è necessario l'uso aggiuntivo di sulfo-NHS.

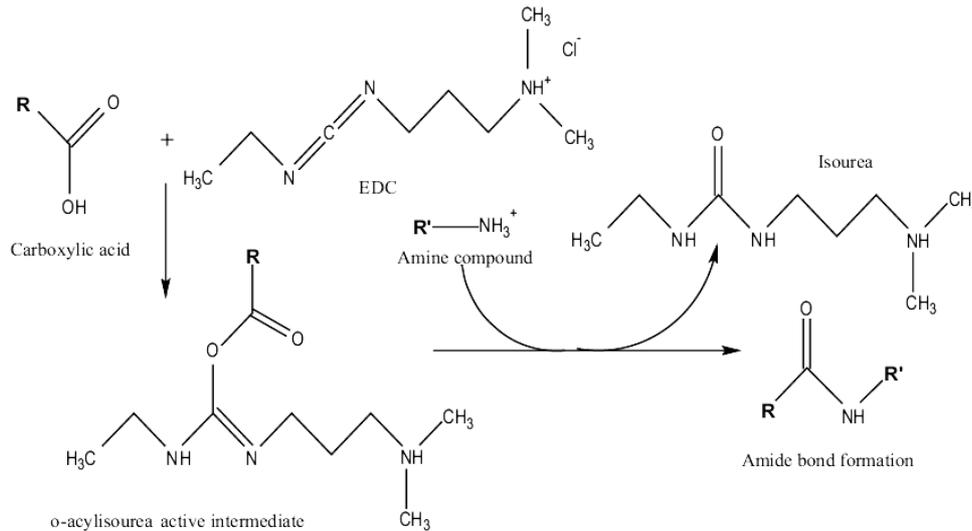


Figura 6.1.3.4 - Reazione di covalent attachment per mezzo di un gruppo carbossilico e agente di cross-linking.

Tale tecnica è molto utilizzata per la funzionalizzazione di biomateriali adatti a tessuti neurali.

È stata usata per legare covalentemente il chitosano con sequenze peptidiche derivate dalla laminina, l'acido ialuronico con polilisina, l'alginato con la sequenza YIGSR, PLGA e chitosano con laminina. Recentemente sono state funzionalizzate con laminina anche fibre elettrofilate di PLA [5].

I principali svantaggi di tale tecnica sono legati alle rigide condizioni di lavoro che potrebbero limitare i tipi di biomolecole utilizzabili. Per esempio, i solventi organici usati in alcune procedure di covalent attachment potrebbero deattivare i fattori di crescita [11].

Oltre a questi metodi, è possibile legare covalentemente le molecole ai materiali per mezzo di foto-attivazione e coagulazione enzimatica. Con la foto-attivazione si ha

maggior controllo sulla reazione di accoppiamento e i tempi vengono ridotti (la reazione termina in pochi minuti).

La coagulazione enzimatica è stata utilizzata da Schense e collaboratori per la funzionalizzazione di scaffolds di fibrina. Peptidi derivati dalla laminina in grado di promuovere l'estensione dei neuriti sono stati aggiunti a gel di fibrina per migliorare le loro intrinseche proprietà di adesione cellulare [5].

6.2 Funzionalizzazione del bulk

La funzionalizzazione del bulk permette di incorporare molecole attive nello scheletro dello scaffolds già durante il processo di fabbricazione. È stato dimostrato che le tecniche di incorporazione diretta, se comparate con le tecniche di modificazione superficiale, consentono di incorporare una quantità maggiore di biomolecole e aumentano la bioattività dello scaffolds. Nel caso di materiali biodegradabili tali tecniche consentono il rilascio prolungato di biomolecole, rilascio che dipende dalla cinetica di degradazione dello scaffold. La funzionalizzazione dello scheletro consente inoltre di incorporare all'interno del biomateriale cellule o sequenze degradabili enzimaticamente [3].

6.2.1 Blending

Alcune molecole possono essere incorporate direttamente nel polimero durante il processo di fabbricazione. Tale tecnica può essere usata per incorporare molecole attive in film, *hydrogels* o in scaffolds tridimensionali di fibre elettrofilate. È importante sottolineare però che le forze attrattive tra materiale e biomolecole sono forze deboli e quindi le molecole tendono nel tempo ad abbandonare la matrice polimerica. Questa tecnica permette di produrre comunque scaffolds più stabili rispetto a quelli ottenuti con adsorbimento diretto ed è più veloce rispetto alla modificazione covalente.

Chengel e collaboratori hanno utilizzato il chitosano miscelato con collagene e polilisina per formare un film adatto ad applicazioni in tessuti nervosi. Tale film aumenta l'adesione dei neuroni rispetto al chitosano non modificato.

Film così prodotti potrebbero essere usati come rivestimenti per impianti protesici neurali; occorre considerare però l'instabilità dovuta ad una incorporazione non

covalente, la riduzione del numero di molecole disponibile per unità di area superficiale all'aumentare dello spessore del film e la struttura bidimensionale.

Gli *hydrogels* sono stati ampiamente studiati come *brain mimetics* per la struttura molto simile a quella dei glicosamminoglicani, principali componenti della matrice extra-cellulare (ECM) del cervello. L'aggiunta di molecole di adesione agli *hydrogels* tramite blending aumenta l'adesione delle cellule nervose e permette di ottenere una matrice con proprietà simili alla ECM.

Dal punto di vista produttivo, tale tecnica è più vantaggiosa per i costrutti nanostrutturati se confrontata con il metodo che prevede l'ancoraggio delle molecole alla superficie per mezzo di legami covalenti. Le molecole possono essere infatti incorporate direttamente durante il processo di produzione, senza richiedere fasi successive.

Nel caso di scaffolds porosi nanostrutturati, la funzionalizzazione post-produzione è piuttosto impegnativa perché diventa difficile garantire alle molecole un accesso uniforme all'interno dello scaffold. Ciò diventa ancora più complicato quando le dimensioni dei pori sono confrontabili con quelle delle biomolecole. Nel caso di pori con dimensioni maggiori delle molecole, tale metodo di incorporazione è però sconsigliato perché le molecole, non essendo più intrappolate fisicamente all'interno della struttura, possono diffondere nell'ambiente circostante [5].

Capitolo 7

Risultati ottenuti

I risultati ottenuti possono essere valutati rispetto alla morfologia, allineamento, adesione, proliferazione e differenziazione delle cellule. Nei prossimi paragrafi sono rappresentati alcuni lavori, con lo scopo non tanto di dare un'idea completa di quanto è stato fatto finora nell'ambito della rigenerazione dei tessuti neurali, ma di mostrare come i vari aspetti del comportamento cellulare possano essere controllati da moltissimi parametri, sia fisici che biochimici.

7.1 Morfologia

La morfologia della cellula può essere influenzata dal substrato. Per esempio, in molti casi la morfologia assunta su un substrato piano è diversa da quella assunta, dalla stessa cellula, su un substrato tridimensionale di nanofibre.

Viene descritta generalmente come il rapporto tra l'area disponibile e il grado di *spreading*. In alternativa può essere valutato il rapporto tra l'asse lungo e l'asse corto o, come nel caso di prove che coinvolgono neuroni, la lunghezza dei prolungamenti.

Il successo della rigenerazione nervosa dipende dalla crescita assonale: lo studio di seguito riportato evidenzia gli effetti dell'allineamento e delle dimensioni di fibre di PLLA sulla lunghezza dei neuriti.

Il gruppo di F. Yang ha studiato l'efficacia nell'ingegneria dei tessuti neurali di scaffolds di nano/micro fibre allineate di PLLA. Le loro prestazioni sono state

confrontate con quelle di scaffolds costituiti da fibre disordinate dello stesso polimero. Gli scaffolds sono stati prodotti con la tecnica dell'electrospinning, il diametro delle fibre è stato controllato agendo sulla concentrazione della soluzione polimerica (vedi Capitolo 4). La loro efficacia nel promuovere la differenziazione neurale (vedi paragrafo 7.5) e la crescita guidata dei neuriti (esposta in seguito e ripresa al paragrafo 7.2) è stata valutata *in vitro* usando cellule staminali neurali (NSCs) C17.2.

La struttura morfologica delle fibre allineate ottenute da soluzioni polimeriche al 2% e al 5% sono mostrate in figura 7.1.1 a) e b). Le fibre di entrambi gli scaffolds presentano un notevole allineamento che risulta quindi essere indipendente dalla concentrazione della soluzione. Il diametro varia tra 150 e 500 nm per concentrazioni di PLLA pari a 2% e tra 800 e 3000 nm per concentrazioni di PLLA pari al 5%. La media è di circa 300 nm per il primo caso (nanofibre allineate: ANF) e 1.5 μm per il secondo caso (microfibre allineate: AMF). Gli scaffolds di fibre disordinate sono stati prodotti con concentrazioni della soluzione pari a 1% e 3%, il diametro medio delle fibre risulta essere 250 nm nel primo caso (nanofibre disordinate: RNF) e 1.25 μm nel secondo caso (microfibre disordinate: RMF), Figura 7.1.1 c) e d).

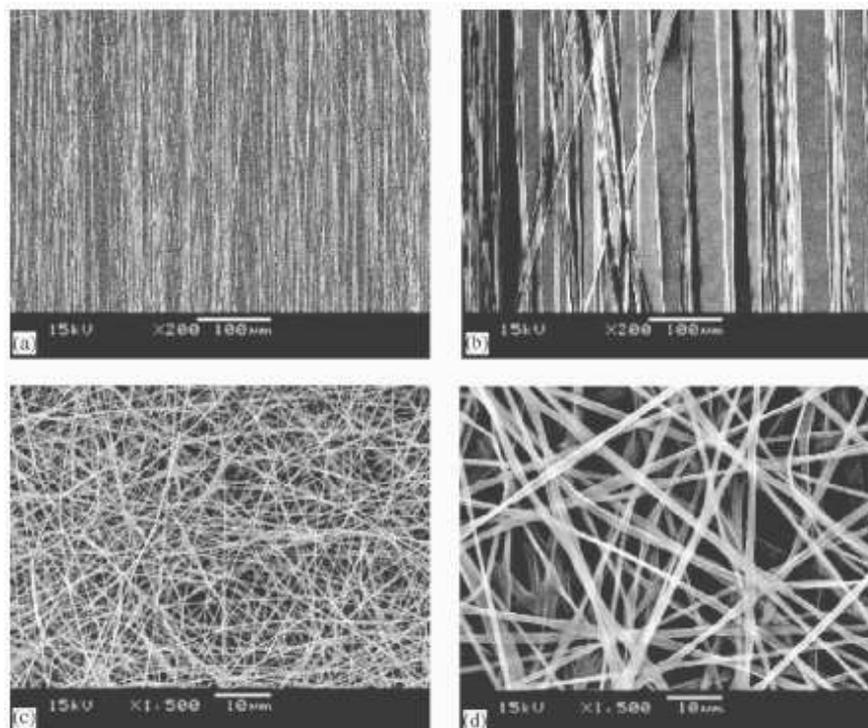


Figura 7.1.1 - Micrografia SEM di PLLA (a) ANF; (b) AMF; (c) RNF ; (d) RMF.

La figura 7.1.2 mostra la lunghezza dei neuriti di NSCs coltivate per due giorni sugli scaffolds in funzione del tipo di fibre che costituiscono gli scaffolds stessi. La lunghezza media dei neuriti è maggiore nelle ANF ed è pari a circa 100 μm . Tra le AMF, RNF e RMF non ci sono differenze significative ed i valori medi sono compresi tra 75 e 80 μm .

I risultati ottenuti evidenziano che in scala nanometrica la disposizione delle fibre influisce notevolmente sulla crescita dei neuriti, mentre nel caso delle microfibre non ci sono significative differenze tra fibre allineate e non.

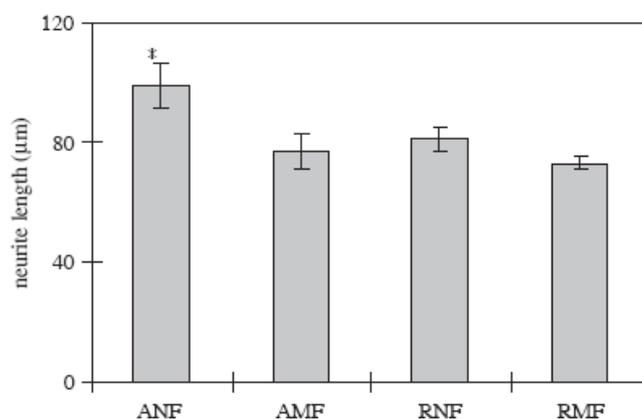


Figura 7.1.2- La lunghezza media del neurite più lungo per cellula è misurata tra 50 cellule scelte casualmente in ogni scaffold (sono state piastrate 2.8×10^4 cellule/ cm^2).

I risultati della prova indicano quindi come migliore substrato per la crescita di cellule nervose scaffolds di nanofibre allineate [26].

L'importanza delle nanotecnologie nel controllo del comportamento cellulare è stata evidenziata anche dalle prove condotte da Bechara e i suoi collaboratori. Il gruppo ha realizzato una superficie di policaprolattone (PCL) con *nanowires* allineati verticalmente. Come modello cellulare per valutare l'adesione, la proliferazione e la differenziazione sulla superficie sono state usate cellule PC12.

In questo e nei successivi paragrafi verranno esposti i risultati ottenuti.

La morfologia cellulare sulla superficie di PCL con *nanowires* (NW) e sulla superficie di PCL liscia (SPCL) è stata analizzata usando immagini SEM. Le immagini sono prese al primo e quarto giorno di coltura (figura 7.1.3).

Dopo 4 giorni di coltura sulla superficie SPCL è visibile un basso numero di cellule (figura 7.1.3 a) e b)).

Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che tale superficie non fornisce stimoli fisici in grado di indurre l'adesione delle cellule e la loro conseguente crescita. Sulla superficie NW invece, già al primo giorno di coltura si nota un certo *spreading* (figura 7.1.3 c)). Dopo 4 giorni (figura 7.1.3 d)) è visibile, evidenziato dal cerchio tratteggiato, una prima comunicazione cellulare. Dopo un giorno di coltura, l'immagine con maggiore ingrandimento delle cellule coltivate sulla superficie NW mostra una rete di lamellipodi e filopodi che interagiscono con la struttura del substrato (figura 7.1.3 e) cerchio tratteggiato). Questo comportamento è più marcato dopo 4 giorni di coltura (figura 7.1.3.f) cerchio tratteggiato).

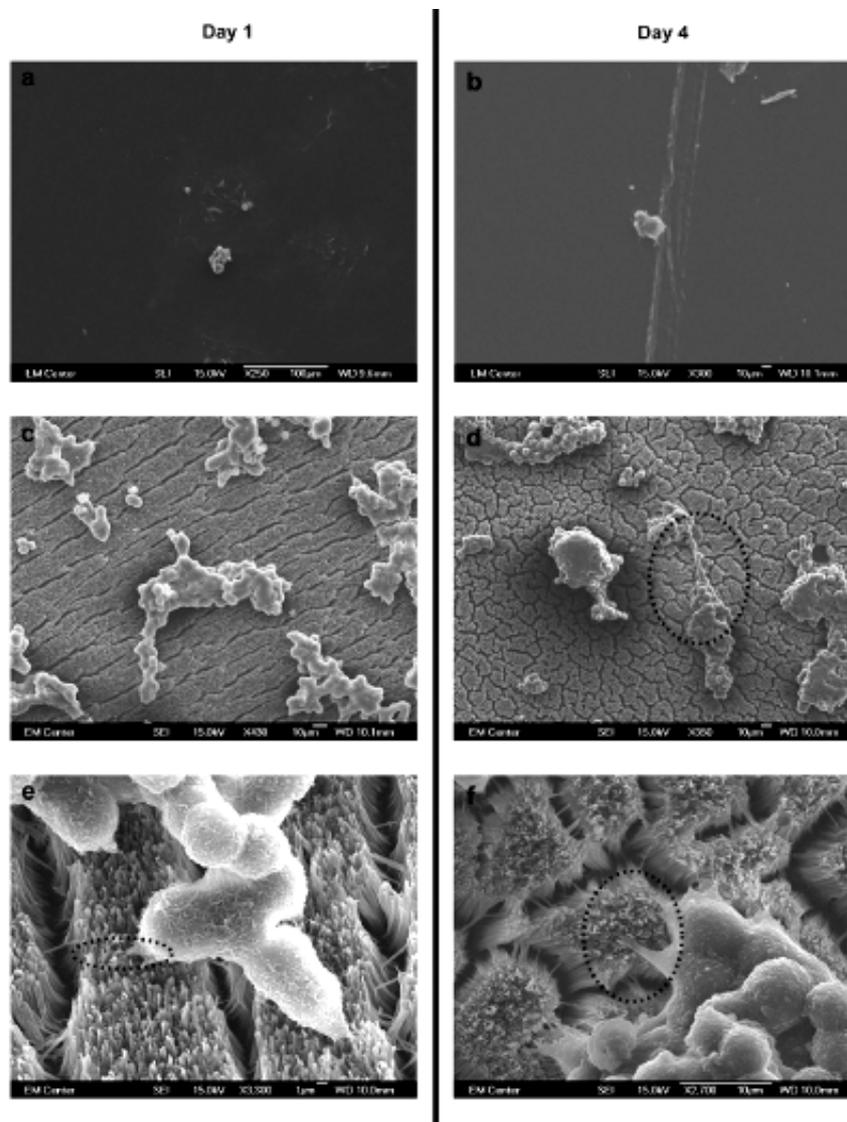


Figura 7.1.3 – Immagini SEM di cellule PC12 su SPCL (a) e b)) e NW (c) e d)) dopo 1 e 4 giorni di coltura rispettivamente. Le immagini SEM ad elevato ingrandimento (e) e f)) mostrano le interazioni delle cellule con l'architettura nanometrica dopo 1 e 4 giorni di coltura rispettivamente.

L'interazione dei filopodi con la superficie è mediata dalle integrine ed è estremamente importante per mantenere il fenotipo delle cellule a lungo termine. I risultati ottenuti confermano che le cellule sono in grado di interagire con strutture di scala nanometrica [12].

Il substrato di crescita può influenzare la morfologia cellulare attraverso le sue proprietà fisiche come si è appena visto, ma anche attraverso le sue proprietà chimiche.

Il gruppo di Morabekeh ha analizzato la crescita di neuriti su nanofibre di policaprolattone (PCL) funzionalizzate con gelatina. Mediante electrospinning sono stati prodotti scaffolds di nanofibre, allineate e non, di PCL/gelatina in rapporti diversi. Le analisi sulla crescita di neuriti si basano sul confronto tra la crescita di neuriti in substrati funzionalizzati e non, il confronto tra fibre allineate e disordinate è servito invece come spunto di riflessione per l'analisi della proliferazione presentata al paragrafo 7.4.

Le nanofibre di PCL/gelatina 70:30 sono risultate avere le migliori proprietà per la rigenerazione di tessuto nervoso e sono state utilizzate per la coltura *in vitro* di cellule C17.2. La figura 7.1.4 mostra la micrografia SEM dell'interazione della cellula con nanofibre elettrofilate di PLC e PCL/gelatina dopo 6 giorni di coltura. Come si vede, il PCL funzionalizzato con gelatina aumenta l'estensione dei neuriti rispetto al solo PCL, inoltre i neuriti di cellule coltivate sul PCL sono più corti di quelli presenti sulle nanofibre contenenti gelatina. Questa osservazione indica una migliore integrazione delle cellule con gli scaffolds di PCL funzionalizzati con gelatina.

Risultati simili sono stati ottenuti anche da Schnell e i suoi collaboratori che hanno realizzato scaffolds di nanofibre elettrofilate di PCL e PCL funzionalizzato con collagene [26].

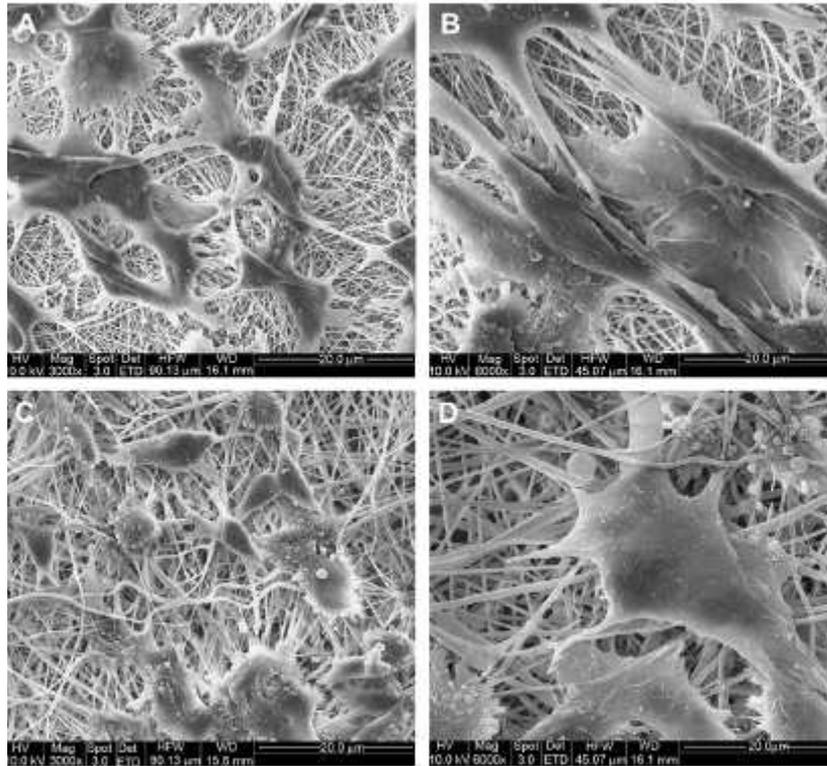


Figura 7.1.4 – Morfologia di cellule C17.2 su PCL/gelatina (ingrandimento: 3000 (A) e 6000 (B)) e su PCL (ingrandimento: 3000 (C) e 6000 (D)) dopo 6 giorni di coltura.

7.2 Allineamento

L'allineamento delle cellule è un aspetto della morfologia cellulare che merita una trattazione a parte.

Molti tessuti sono costituiti da cellule orientate secondo una precisa direzione. Gli scaffolds previsti per la rigenerazione di tali tessuti dovrebbero riuscire ad influenzare l'allineamento per ottenere una disposizione delle cellule simile a quella naturale.

È documentato che le cellule adottano un'orientazione lineare in substrati che presentano scanalature in superficie o costituiti da fibre ordinate.

Molti studi hanno dimostrato che le cellule si allineano secondo la direzione delle fibre che costituiscono il substrato di crescita.

Le prove condotte da Yang e i suoi collaboratori, presentate al paragrafo precedente, hanno evidenziato come le NSCs si allungano e i loro neuriti crescano lungo la direzione di allineamento delle fibre. Nessuna dipendenza è stata evidenziata invece per il diametro delle fibre stesse.

La figura 7.2.1 rappresenta la micrografia PLCM di cellule C17.2 in coltura nei differenti scaffolds ANF, AMF, RNF di PLLA dopo un giorno.

I risultati indicano che le NSCs hanno aderito su tutto lo scaffold e che le cellule hanno abbandonato la loro originale forma rotonda e si sono allungate assumendo una forma simile a quella di un fuso.

La direzione di allungamento delle NSCs e della crescita dei neuriti è parallela alla direzione di allineamento delle fibre ANF e AMF (figura 7.2.1 a) e b)), mentre è caotica nelle fibre RNF (figura 7.2.1 c)). In figura 7.2.2 è riportata la micrografia LSCM delle NSCs al secondo giorno di coltura in fibre allineate di PLLA con differenti diametri.

In accordo con i risultati della PLCM, le cellule crescono parallele alle nanofibre di PLLA che forniscono il miglior effetto di *contact guidance*. La teoria del *contact guidance* sostiene che le cellule sembrano avere maggior probabilità di migrare in particolari direzioni associate a proprietà chimiche, strutturali e/o meccaniche del substrato. La maggior parte delle cellule differenziate ha una forma bipolare con due estesi neuriti che emergono dalle regioni del soma parallelamente alla fibre e distribuiti in maniera simmetrica rispetto al soma stesso.

Esistono comunque delle eccezioni evidenziate in figura 7.2.2 b) con delle frecce. È stato stimato che la frequenza di neuriti con direzione di crescita parallela alle fibre è del 94% per le ANF e 88% per le AMF. Il 4% dei neuriti su ANF e AMF sono perpendicolari e il rimanente 2% per ANF e 8% per AMF si trova in una situazione intermedia. Questi risultati indicano che le NSCs si orientano preferibilmente seguendo la direzione delle fibre di PLLA e che la dimensione delle fibre non influenza tale comportamento.

In figura 7.2.3 è riportata la micrografia LSCM delle NSCs al secondo giorno di coltura in fibre disordinate di PLLA con differenti diametri. Le immagini indicano che le fibre disordinate inducono notevoli cambiamenti nel fenotipo delle cellule neurali in coltura per 2 giorni rispetto alle fibre allineate. Si nota che i neuriti sono orientati casualmente, le cellule presentano diversi prolungamenti e alcuni dei neuriti si diramano durante lo sviluppo e si connettono con altri neuriti o soma di altri neuroni formando le giunzioni sinaptiche. Dato che le fibre disordinate non forniscono *contact guidance* la crescita dei neuriti potrebbe essere guidata principalmente da stimoli chimici o cellulari [26].

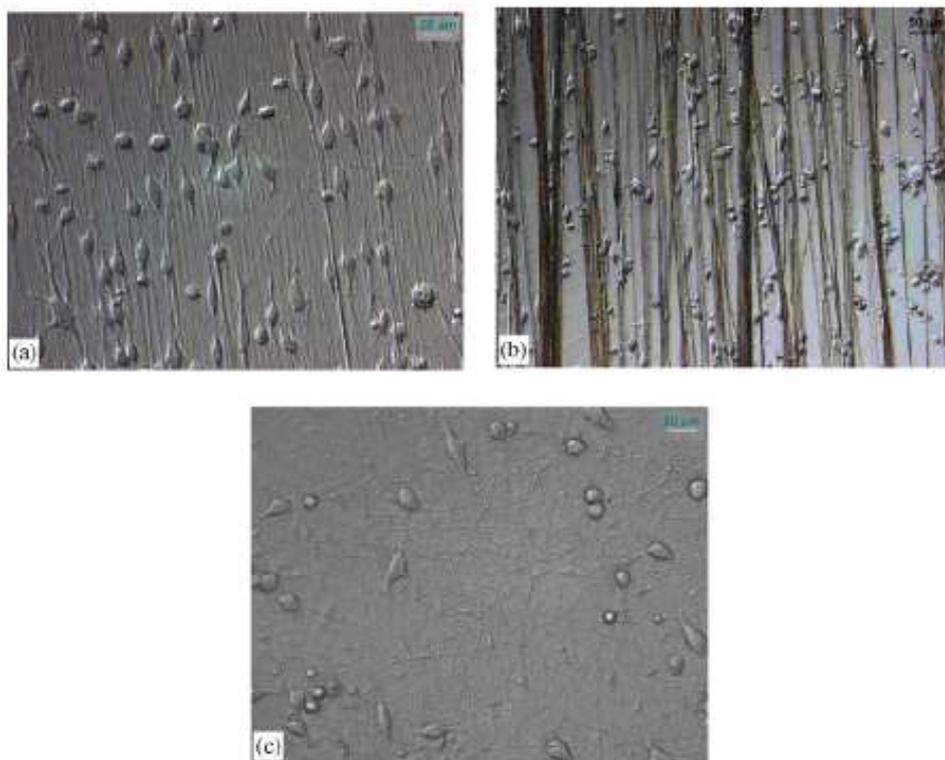


Figura 7.2.1 – Micrografia PLCM: si nota l’adesione delle NSCs su (a) ANF; (b) AMF e (c) RNF, dopo 1 giorno di coltura.

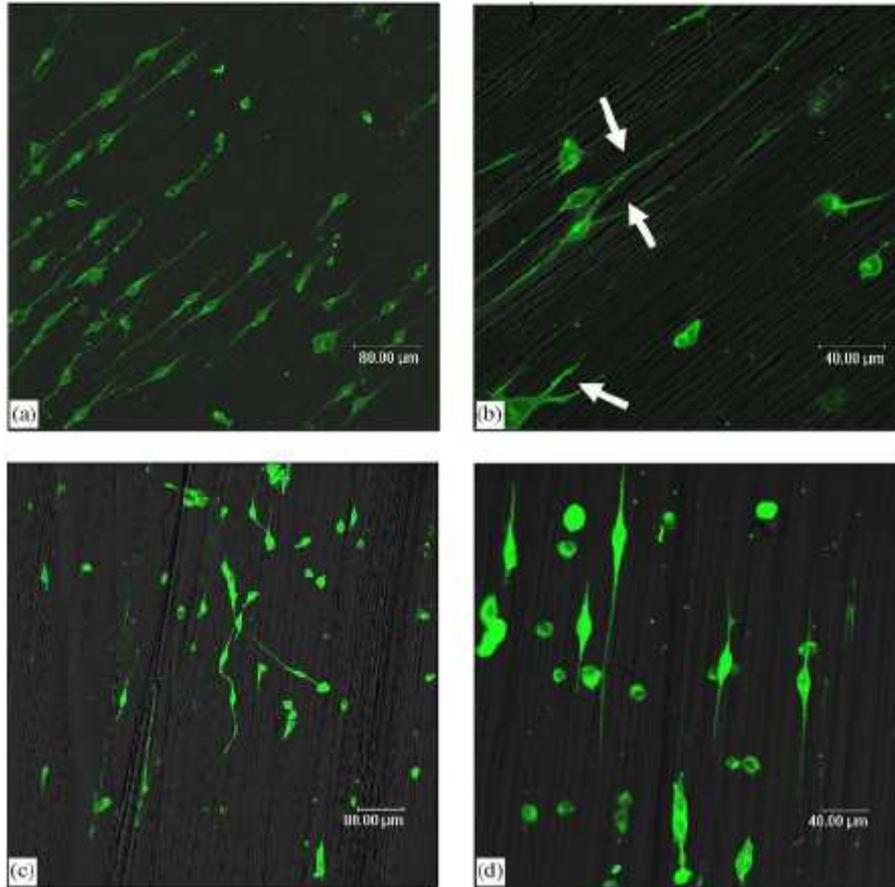


Figura 7.2.2 – Micrografia LSCM di neurofilamenti marcati con immunostochimica 200 kD in NSCs dopo 2 giorni di coltura; (a) su ANF, ingrandimento x 200; (b) su ANF, ingrandimento x 400; (c) su AMF, ingrandimento x 200 e (d) su AMF, ingrandimento x 400.

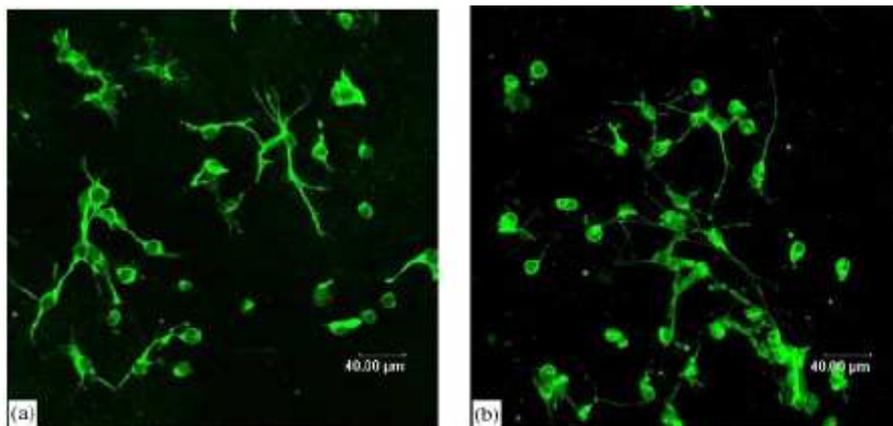


Figura 7.2.3 – Micrografia LSCM di neurofilamenti marcati con immunostochimica 200 kD in NSCs dopo 2 giorni di coltura; (a) su RNF e (b) su RMF.

7.3 Adesione

L'adesione deve essere considerata come una vera e propria forma di comunicazione. È quindi facilmente intuibile che per ottenere una efficiente rigenerazione di tessuto è fondamentale che le cellule aderiscano allo scaffold (vedi Capitolo 5).

Diversi esperimenti sembrano confermare che le cellule aderiscono maggiormente a substrati di nanofibre rispetto a substrati lisci. I substrati di nanofibre infatti riescono ad intrappolare le cellule penetrate all'interno e presentano un maggior numero di adesioni focali. L'adesione delle cellule al substrato in questo caso dipende dal diametro delle fibre (il valore ottimale è funzione del tipo di cellule e delle condizioni) e dalla loro disposizione [11].

Oltre ai benefici portati dall'utilizzo di nanofibre, notevoli vantaggi derivano anche dalla modificazione dello scaffold con molecole bioattive (vedi Capitolo 5).

T. Tina Yu e M.S. Soichet hanno realizzato degli scaffolds P(HEMA-co-AEMA) con una particolare geometria e li hanno poi funzionalizzati con peptidi derivati da laminina. Gli scaffolds presentano numerosi canali orientati longitudinalmente con un diametro medio di $196 \pm 6 \mu\text{m}$ per promuovere la fascicolazione dei neurofilamenti rigenerati e con un modulo di compressione di $192 \pm 8 \text{ kPa}$, dello stesso ordine di grandezza del modulo di compressione del midollo spinale felino (200-600 kPa).

La copolimerizzazione di 2-idrossietilmetacrilato (HEMA) con 2-amminoetilmetacrilato (AEMA) fornisce un gruppo amminico primario al quale sono legati covalentemente, per mezzo di sulfo-SMCC, le sequenze peptidiche CDPGYIGSR e CQAASIKVAV.

La sequenza YIGSR promuove l'adesione neurale, mentre la sequenza IKVAV aumenta la crescita dei neuriti. Le sequenze CDPG e CQAAS sono degli *spacer*.

Tali scaffolds forniscono stimoli fisici (i canali) e chimici (i peptidi) per l'adesione delle cellule neurali e guidano la crescita dei neuriti secondo precise direzioni.

L'adesione cellulare è stata testata utilizzando neuroni primari del ganglio della radice dorsale (DRG) di un pulcino.

Come mostrato in figura 7.3.1 l'adesione cellulare è maggiore sulla superficie modificata con i peptidi rispetto alla superficie non trattata P(HEMA-co-AEMA) e non c'è differenza tra l'adesione sullo strato di controllo PLL/laminina e l'adesione sullo scaffold funzionalizzato [28].

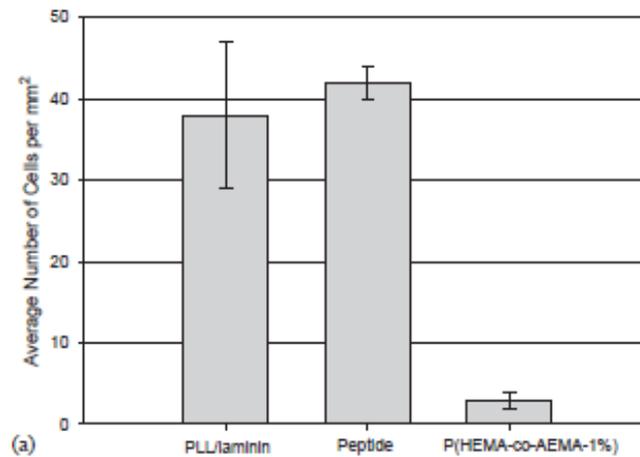


Figura 7.3.1 – Confronto tra l’adesione su: scaffold di P(HEMA-co-AEMA-1%) funzionalizzato, substrato di controllo PLL/laminina e scaffold non funzionalizzato. I dati provengono dalla media dei valori ottenuti da 55 campi di raccolta casuali presenti sulla superficie dello scaffold dopo 2 giorni di coltura.

7.4 Sopravvivenza e proliferazione

Sebbene gli eventi che governano il ciclo cellulare non siano stati completamente capiti, è noto che la presenza di un particolare ambiente extracellulare concorre nel determinare se e quando la cellula si dividerà. In dipendenza della loro propensione per la proliferazione, le cellule si possono classificare in *labili*, *permanenti* o *stabili*. Le cellule labili si replicano continuamente mentre le cellule permanenti sono cellule terminalmente differenziate incapaci di proliferare (p. es., neuroni). Le cellule stabili si collocano tra questi estremi, dopo una divisione assumono una specifica funzione, ma possono essere indotte da particolari stimoli a rientrare nel ciclo e a proliferare.

Stimoli non adatti provenienti dall’ambiente extra-cellulare possono viceversa indurre alla morte della cellula stessa. Ciò può avvenire per necrosi o apoptosi. Il controllo della proliferazione della cellule e della loro sopravvivenza è fondamentale per la rigenerazione dei tessuti [29].

In molti casi si cerca di raggiungere la massima proliferazione, ma esistono alcune eccezioni: per esempio la proliferazione di astrociti nell’interfaccia impianto/tessuto nel sistema nervoso centrale porta all’indesiderata formazione della cicatrice gliale (vedi Capitolo 1).

Come anticipato, Mobarak si è occupato dello studio della proliferazione delle cellule C17.2 su scaffolds di nanofibre di PCL e PCL funzionalizzato con gelatina. In

figura 7.4.1 si vede come la proliferazione delle cellule sugli scaffolds funzionalizzati è più alta rispetto a quanto avviene su substrati semplici di PCL. Inoltre se confrontata con le nanofibre disordinate la proliferazione su nanofibre allineate è maggiore [27].

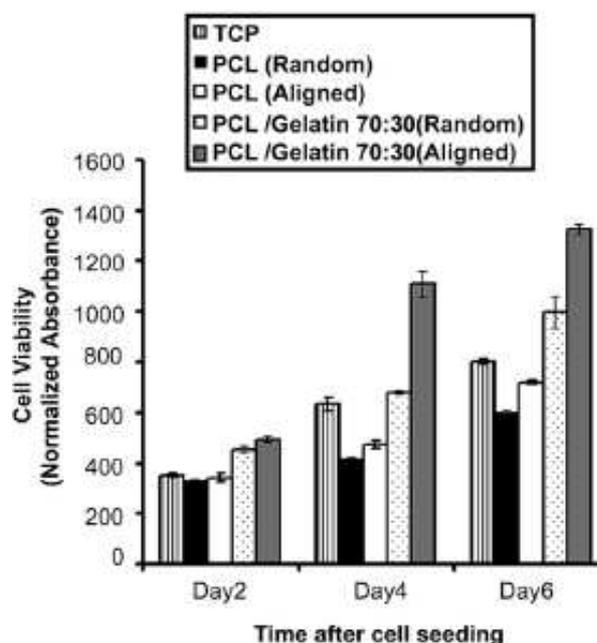


Figura 7.4.1 – Valori ottenuti da saggio MTS per cellule C17.2 su nanofibre ordinate e non di PCL e PCL/gelatina dopo 2, 4, 6 giorni dalla seminazione.

Substrati di PCL sono stati usati anche da Bechara e i suoi collaboratori.

Nell’esperimento, già presentato al paragrafo 7.1, è stata valutata anche l’adesione e la proliferazione delle cellule PC12 su superfici con *nanowires* (NW), su superfici lisce di PCL (SPCL) e su superfici lisce di polistirene (PS).

Di solito, le superfici PS vengono rivestite di collagene per assicurare una buona adesione delle cellule al substrato. Per studiare gli effetti della nanotopografia sulle funzioni cellulari, nessuna delle superfici di test o di controllo è stata rivestita.

Le immagini da microscopia fluorescente indicano che le cellule hanno aderito e hanno proliferato maggiormente sulle superfici NW, rispetto alle superfici SPCL e SP (figura 7.4.2). Le cellule PC12 seminate su NW mostrano una maggiore adesione dopo 1 giorno di coltura (figura 7.4.2 e) e dopo 4 giorni di coltura la loro proliferazione e comunicazione è indicata dall’alto livello di aggregazione cellulare (figura 7.4.2 f). La proliferazione è invece minima per le colture su PS (figura 7.4.2

a) e b)) e su SPCL (figura 7.4.2 c) e d)) dopo 1 e 4 giorni di coltura. Le superfici PS sono state usate come controllo per accertare l'efficacia delle condizioni di coltura, mentre le superfici SPCL servono come confronto per valutare l'efficacia della nanotopografia in superficie. I risultati indicano che manipolando l'architettura superficiale si può controllare la proliferazione cellulare.

Le cellule PC12 normalmente non sono in grado di aderire alle superfici e per questo gli scaffolds necessitano di un rivestimento di collagene. Quanto ottenuto dimostra che una particolare nanotopografia è in grado di portare all'adesione e conseguente proliferazione anche senza l'utilizzo di collagene [12].

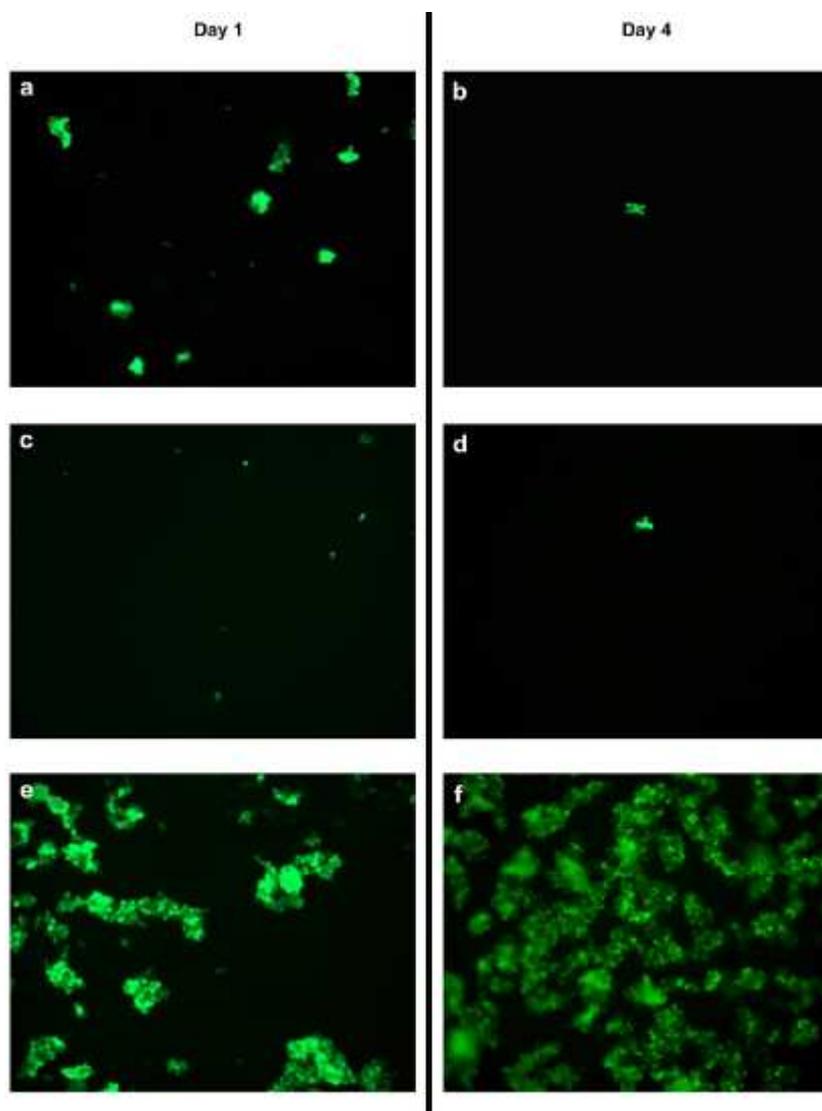


Figura 7.4.2 – Immagini da microscopia fluorescente (10x) di cellule PC12 su superfici PS (a) e b), SPCL (c) e d)) e NW (e) e f)) rispettivamente dopo 1 e 4 giorni di coltura.

7.5 Differenziazione

Molte strategie di rigenerazione dei tessuti richiedono la selettiva differenziazione di cellule progenitrici o staminali in specifici tipi cellulari.

Le cellule staminali sono cellule non specializzate capaci di trasformarsi in diversi altri tipi di cellule del corpo. Sono in grado di produrre *cellule differenziate*, cellule che svolgono una particolare funzione all'interno di un tessuto. Le cellule differenziate possono essere labili, stabili o permanenti, ma possono produrre solo cellule del proprio tipo. Le cellule staminali invece possono dividersi e dare origine a *cellule pluripotenti*, in grado a loro volta di differenziarsi e produrre la maggior parte dei tessuti di un organismo, o *cellule totipotenti*, le cui differenziazioni possono portare alla formazione di tutti i tessuti sia dell'embrione che extra-embionari.

La principale differenza tra le cellule staminali embrionali e le staminali adulte è che le prime, presenti negli embrioni, non sono ancora state impegnate in un certo tipo di tessuto e perciò, in dipendenza dell'età dell'embrione, possono essere considerate più o meno dei totipotenti. Le cellule staminali adulte sono specifiche invece di un particolare tessuto ma possono produrre cellule di tessuti diversi, possono essere viste come dei pluripotenti.

Gli stadi di differenziazione delle cellule staminali possono essere avviati e controllati da complessi segnali provenienti da altre cellule o dall'ambiente in cui vivono [29].

Scaffolds di nanofibre sono in grado sia di prevenire la differenziazione permettendo la proliferazione e il mantenimento di nicchie pluripotenti sia di supportare la differenziazione.

Nelle prove condotte da Yang e collaboratori, già presentate ai paragrafo 7.1 e 7.2, è stata valutata anche l'influenza della topografia delle nanofibre sulla differenziazione delle cellule. Le cellule C17.2, usate nelle prove, sono in grado di differenziarsi senza l'interazione con molecole di adesione come laminina, fibronectina, collagene o polilisina, generalmente richieste come substrato permissivo alla crescita dei neuriti. Questo aspetto le rende notevolmente interessanti, in quanto la loro differenziazione dipende in questo caso solamente dalle caratteristiche delle fibre di PLLA. Si è visto che nelle ANF e nelle RNF si sono differenziate l'80% delle cellule, mentre nelle AMF e nelle RMF solo il 40%.

Questi risultati indicano che la differenziazione delle cellule staminali neurali è indipendente dall'allineamento delle fibre, ma risente fortemente delle loro dimensioni [26].

L'influenza della nanotopografia del substrato sulla differenziazione è stata evidenziata anche dagli esperimenti di Bechara e collaboratori. La linea cellulare usata (PC12) deriva da cellule di feocromocitoma di ratto. Le cellule PC12 sono in grado di differenziarsi in neuroni mediante l'aggiunta di Nerve Growth Factor (NGF).

Dopo 4 giorni di coltura, le cellule sono state esposte al NGF per indurne la differenziazione. Per visualizzare la formazione di reti neuronali le cellule PC12 sono state colorate con CMFDA.

Dopo 1, 4 e 7 giorni dall'aggiunta del NGF sulla superficie SPCL le cellule sono poche e la crescita dei neuriti è molto scarsa (figura 7.5.1 a) c) ed e)). Le cellule coltivate invece sulla superficie NW mostrano una progressiva crescita dei neuriti per l'intera durata della coltura. Già al primo giorno i neuriti cominciano a crescere e le cellule mostrano una migliore colonizzazione (figura 7.5.1 b) cerchio tratteggiato). Dopo 4 giorni i neuriti sono più lunghi e interagiscono tra loro per formare una rete neuronale (figura 7.5.1 d)). In figura 7.5.1 f) si vede che al giorno 7 si è formata una rete neuronale estesa: ciò suggerisce che la nanoarchitettura promuove la differenziazione delle cellule PC12 in neuroni. Conclusioni simili si ottengono studiando i cambiamenti della morfologia cellulare (figura 7.5.2).

Sulla superficie SPCL, come prevedibile, le cellule presenti sono poche dopo 1, 4 e 7 giorni dall'aggiunta del NGF (figura 7.5.2 a), d) e g)). Le cellule hanno una forma sferica e non c'è una crescita evidente di neuriti.

Le cellule sulla superficie NW dopo 1 giorno sembrano comunicare tra loro (figura 7.5.2 b)). Le immagini ingrandite mostrano che le estensioni cellulari interagiscono con i *nanowires* (figura 7.5.2 c)). Dopo 4 giorni, le immagini SEM mostrano un'iniziale crescita dei neuriti (figura 7.5.2 e)); dall'immagine ingrandita si vede che i neuriti si diramano e interagiscono con le strutture del substrato (figura 7.5.2 f)). Al settimo giorno è visibile una rete neuronale (figura 7.5.2 h) e i)). La nanotopografia del substrato mantiene lo stato differenziato delle cellule PC12; la mancanza della nanoarchitettura sulle superfici SPCL non permette invece una forte adesione e

impedisce la formazione di una rete neuronale. Ulteriori studi su tali colture cellulari fanno evidenziato l'espressione di *markers* neuronali, NF-H e TH, da parte delle cellule differenziate su superfici NW [12].

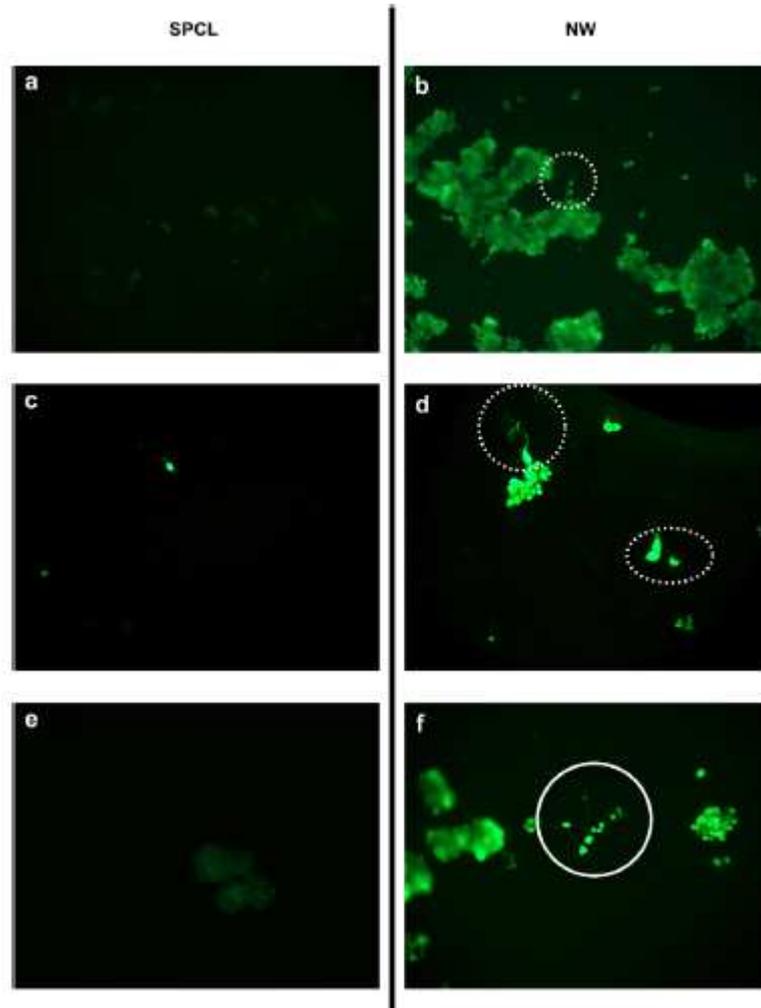


Figura 7.5.1 – Immagine da microscopia fluorescente (10x) di cellule PC12 colorate con CMFDA su SPCL e NW dopo: (a) e b) 1 giorno, (c) e d) 4 giorni e (e) e f) 7 giorni dall'aggiunta di NGF.

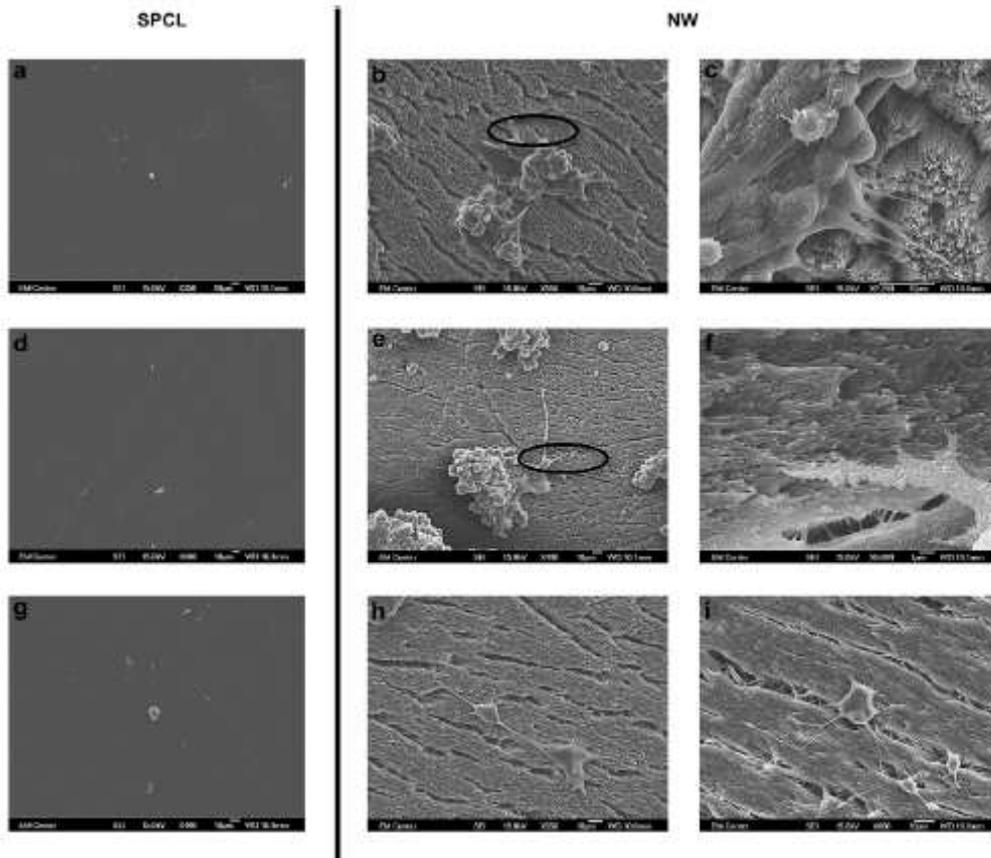


Figura 7.5.2 – Immagine SEM di cellule PC12 su superfici SPCL e NW rispettivamente dopo (a) b) e c)) 1 giorno, (d) e) e f)) 4 giorni e (g) h) e i)) 7 giorni dall'aggiunta di NGF.

Conclusioni

La rigenerazione di tessuto nervoso nel midollo spinale lesionato rappresenta una sfida alquanto complessa. Dal punto di vista della lesione infatti, il sistema nervoso centrale e periferico rispondono in maniera diversa. Mentre nel sistema nervoso periferico in seguito ad una lesione gli assoni possono rigenerare e reinnervare i loro targets (anche se non sempre ciò coincide con il recupero funzionale), nel sistema nervoso centrale raramente si è osservato una riparazione di tessuto danneggiato. Ecco perché malattie e traumi a carico del sistema nervoso centrale sono spesso degenerative e accompagnate da disfunzioni permanenti.

L'ingegneria tessutale in quest'ambito si propone di realizzare dei substrati (scaffolds) in grado di fornire sostegno alle fibre in rigenerazione mentre queste tentano di attraversare la cisti (normalmente impenetrabile). Tali substrati serviranno inoltre come fonte di farmaci o sostanze in grado di promuovere la crescita degli assoni.

Gli studi sperimentali finora condotti *in vivo* ed *in vitro* dimostrano che gli sviluppi sul campo delle nanotecnologie e l'approccio biomimetico sembrano offrire ampie possibilità.

Bibliografia

- [1] Bani-Yaghoub, Tremblay, Nzau, Gangaraju S., Chitty D., Zurakowski B. and Sirkoska M.: *Neurogenerative strategies in the brain: emerging significance of bone morphogenetic protein7(BMP7)*. Biochem.Cell. Biol, 86(5), 361-369, 2008.
- [2] Ning Zhang, Hongai Yan, Xuejun Wen: *Tissue-engineering approaches for axonal guidance*. Brain Research Reviews, 49, 48-64, 2005.
- [3] Heungsoo Shin, Seongbong Jo, Antonios G. Mikos: *Biomimetic materials for tissue engineering*. Biomaterials, 24, 4353-4364, 2003.
- [4] H.Tabesh, Gh. Amobediny, N. Salehi Nik, M.Heydary, M. Yosefifard: *The role of biodegradable engineered scaffolds seeded with Schwann cells for spinal cord regeneration*. Neurochemistry International, 54,73-83, 2009.
- [5] Shreyas S. Rao, Jessica O. Winter: *Adhesion molecule-modified biomaterials for neural tissue engineering*. Frontiers in neuroengineering, 2(6), 1-14, 2009.
- [6] Gaëtan J.-R. Delcroix, Paul C. Schiller, Jean Pierre Benoit, Claudia N. Montenero-Menei: *Adult cell therapy for brain neuronal damages and the role of tissue engineering*. Biomaterials, 31, 2105-2120, 2010.
- [7] Anuradha Subramanian, Uma Maheswari Krishnan e Swaminathan Sethuraman: *Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration*. Journal of Biomedical Science, 16, 1-11, 2009.
- [8] Nicolas N. Madigan, Anthony J. Windebank: *Current tissue engineering and novel therapeutic approaches to axonal regeneration following spinal cord injury using polymer scaffolds*. Respiratory Physiology & Neurobiology, 183-199, 2009.
- [9] Rooney G.E., Vaishya S., Ameeruniddin: *Rigid fixation of the spinal column improves scaffold alignment and prevents scoliosis in the transected rat spinal cord*. Spine (Phile Pa 1976), 33(24), 1-12, 2008.
- [10] Lijie Zhang, Thomas J. Webster: *Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration*. Nano Today, 4, 66-80, 2009.
- [11] Vince Beachley, Xuejun Wen: *Polymer Nanofibrous Structures: Fabrication, Biofunctionalization and Cell Interaction*. Progress in Polymer Science,1-86, 2010.

- [12] Samuel L. Bechara, Anna Judson, Ketul C. Popat: *Template synthesized poly(ϵ -caprolactone) nanowire surfaces for neural tissue engineering*. *Biomaterials*, 31, 3492-3501, 2010.
- [13] Di Foggia Michele: *Studio di biomateriali usati come scaffolds per tissue engineering e loro caratterizzazione con tecniche elettroscopiche vibrazionali di analisi termica*. Università di Bologna, 13-15, 2008
- [14] Stephanie M. Willerth, Shelley E. Sakiyama-Elbert: *Approaches to neural tissue engineering using scaffolds for drug delivery*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 329, 2007.
- [15] Carlo Di Bello, Andrea Bagno: *Iterazioni tra biomateriali e tessuti*. Pàtron Editore, 33-35, 2009.
- [16] David R. Nisbet, Kylie E. Crompton, Malcolm K. Horne, David I. Finkelstein e John S. Forsythe: *Neural Tissue Engineering of the CNS using Hydrogels*. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 87B, 254 , 2008
- [17] Miller Ch., Shanks H., Witt A., Rutkowski G., Mallapragada: *Schwann cell growth on micropatterned biodegradable polymer substrates*. *Biomaterials*, 22, 1263–1269, 2001.
- [18] Travis J.Sill, Horst A. von Recum: *Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering*. *Biomaterials*, 29, 1989-2006, 2008.
- [19] Haoqing Cao, Ting Liu, Sing Yian Chew: *The application of nanofibrous scaffolds in neural tissue engineering*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 3, 2009.
- [20] Shuguang Zhang: *Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly*. *Nature Biotechnology*, 21(10), 1171, 2003.
- [21] Antonios G. Mikos, Johnna S. Temenoff: *Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering*. *Electronic Journal of Biotechnology* EJB, 3(2), 115-117, 2000.
- [22] E. Sachlos e Czernuska: *Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds*. *European Cells and Materials*, 5, 32-37, 2003.
- [23] William F. Ganong: *Fisiologia medica (undicesima edizione italiana)*. Piccin, 14-15, 2005.

- [24] Asha Shrekan, Andrei j. Garcia: *Nanoscale engineering of extracellular matrix-mimetic bioadhesive surfaces and implants for tissue engineering*. Biochimica et Biophysica Acta, 1-11, 2010.
- [25] G. Rainaldi, A. Calabrini, M. T. Santini: *Positively charged polymer polylysine-induced cell adhesion molecule redistribution in K562 cells*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 9, 755-760, 1998.
- [26] F. Yang, R. Murugan, S. Wang, S. Ramakrishna: *Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactid acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering*. Biomaterial, 25, 2603-2610, 2005.
- [27] Laleh Ghasemi Mobarakesh, Molamma P. Prabhakaran, Mohammad Morshed, Mohammad- Hossein Nasr_Esfahani, Seeram Ramakrishna: *Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering*. Biomaterials, 29, 4532-4539, 2008.
- [28] T.Tina Yu, Molly S. Shoichet: *Guided cell-adhesion and outgrowth in peptide-modified channels for neural tissue engineering*. Biomaterials, 26, 1507-1514, 2005.
- [29] J.S. Temenoff, A.G. Mikos: *Biomaterials: the intersection of biology and materials science*. Pearson International Edition 2008.

