



Corso Luigi Einaudi, 55 - Torino

Appunti universitari

Tesi di laurea

Cartoleria e cancelleria

Stampa file e fotocopie

Print on demand

Rilegature

NUMERO: 1431A -

ANNO: 2015

A P P U N T I

STUDENTE: Tortorici

MATERIA: Ingegneria per la medicina rigenerativa, Prof.Chiono

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

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

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

Ingegneria Per La Medicina Rigenerativa

Lezioni: V. Chiono

INDICE

Introduzione.....	2
Tissue Engineering.....	3
Matrice Extracellulare.....	8
Interazione Cellula – Matrice Extracellulare.....	14
Adesione Cellula – Cellula.....	18
Giunzioni Cellulari.....	21
Cell Staining.....	24
Citoscheletro.....	25
Interazione Cellule – Molecole Di Segnalazione.....	28
Progettazione Scaffold: Materiali.....	34
Migrazione Cellulare.....	49
Progettazione Scaffold: Composizione Chimica.....	53
Scaffold: Metodi e Materiali.....	60
Funzionalizzazione Scaffold Con Proteine.....	67
Funzionalizzazione Con Fattori Di Crescita.....	72
Rilascio Controllato Di Farmaci (facoltativo)	75
Organ Printing.....	79
Cellule Staminali Embrionali.....	80
Cellule Staminali Dell'Adulto.....	83
Differenziamento Cellule Staminali.....	86
Scaffold per TE dell'osso (facoltativo).....	87
Rigenerazione del SNP (facoltativo)	90
Rigenerazione denti (facoltativo)	96
Rigenerazione cardiaca	98
Terapia genica.....	103
Stent Cardiovascolari.....	105
DES.....	109
Terapia cellulare per rigenerazione del miocardio	112

La medicina rigenerativa integra:

- terapia cellulare umana;
- terapia genica;
- biomateriali;
- medicina molecolare (sviluppo di farmaci con funzione rigenerativa).

Il concetto chiave della medicina rigenerativa è non solo rallentare la progressione della malattia, ma anche regredire il suo corso. Il requisito base per raggiungere tale scopo è quello di conoscere a fondo la patologia da trattare. Per l'ottenimento di modelli umani delle patologie si sfruttano cellule staminali embrionali e cellule staminali umane indotte alla pluripotenza.

La **rigenerazione** (regeneration) è il processo secondo il quale un tessuto specializzato danneggiato è rimpiazzato dalla proliferazione di cellule specializzate di quel tessuto. Tale processo nell'uomo è limitato a pochi tessuti, come il fegato, ed è portato avanti da cellule staminali.

La **riparazione** (repair) consiste nel rimpiazzare un tessuto con tessuto di granulazione che genera poi una cicatrice.

La medicina rigenerativa è finalizzata a recuperare la salute dell'uomo e quindi si fonda sul concetto di rigenerazione e non di riparazione del danno.

“Organ regeneration is distinct from organ repair as an endpoint of a healing process following injury. Repair is an adaptation to loss of normal organ mass and leads to restoration of the interrupted continuity by synthesis of scar tissue without restoration of the normal tissue.

By contrast, regeneration restores the normal structure and function of the organ; repair does not”

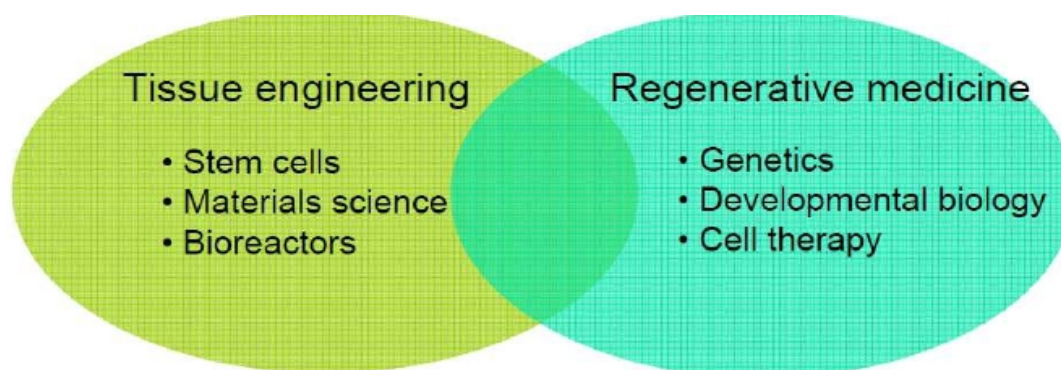
[Yannas IV: Tissue and Organ Regeneration in Adults. Springer Publishing (2007)].

La prima definizione di medicina rigenerativa è stata:

“La medicina rigenerativa è un campo interdisciplinare emergente di ricerca e applicazioni cliniche, focalizzato sulla riparazione o rigenerazione di cellule, tessuti o organi per recuperare la funzione persa a causa di difetti congeniti, malattia, trauma e invecchiamento. Utilizza una combinazione di approcci tecnologici che vanno al di là del tradizionale trapianto e delle terapie che si basano sull'uso di sostituti (es. uso di protesi). Questi approcci possono includere (ma non solo): l'uso di molecole solubili, la terapia genica, il trapianto di cellule staminali, l'ingegneria dei tessuti.” [Greenwood et al. Int J Biotechnol 8: 60-77 (2006)].

Questa definizione non è adatta perché il concetto di riparazione non è proprio della medicina rigenerativa; inoltre non sottolinea l'importanza dell'utilizzo di cellule umane.

TISSUE ENGINEERING



Il tissue engineering (TE) può essere effettuato in vivo o in vitro: entrambe gli approcci fanno parte

dell'organo originario, ottenendo così una vera e propria sorta di replicante biologico naturale, dove il supporto artificiale, quando presente, si degradi nel tempo (generalmente).

Molto importante è lo scaffold, che deve poter comunicare con le cellule. Per questo motivo non deve essere un materiale inerte (cioè che si mantiene stabile e non si degrada), ma bioattivo (cioè che interagisce con l'ambiente biologico, si degrada, dà le giuste informazioni alle cellule).

Concetti fondamentali per TE:

- fonte di cellule: sono meglio le cellule autologhe e si devono scegliere quelle più adatte (differenziate o staminali);
- angiogenesi: vascolarizzazione. Se sviluppato in vitro, il tessuto deve avere vasi sanguigni che al momento dell'impianto si integrino con quelli già presenti nel corpo. Se sviluppato in vivo, nel tessuto devono crescere vasi sanguigni insieme al resto del tessuto;
- innervazione: vale lo stesso discorso dell'angiogenesi;
- meccanica: il tessuto rigenerato deve avere le stesse caratteristiche del tessuto originario;
- integrazione chirurgica: il tessuto si deve integrare perfettamente con il sito d'impianto;
- infiammazione: ci deve essere poca risposta infiammatoria dopo l'impianto, altrimenti si forma una capsula fibrotica che isola l'impianto dal resto del corpo;
- validazione: la soluzione non deve essere troppo complessa per poter essere validata e riprodotta.

Le tecniche di TE richiedono l'uso di uno **scaffold**, che serve come impalcatura 3D per l'adesione iniziale delle cellule, la loro proliferazione e la seguente formazione di tessuto sia in vitro che in vivo. Lo scaffold è degradabile, quindi alla fine del processo si ottiene solo il tessuto rigenerato.

Per l'approccio in vitro, si progetta uno scaffold e vi si seminano le cellule in un bioreattore. In questa fase le cellule aderiscono alla matrice, proliferano ed eventualmente si differenziano (se staminali). Nel frattempo lo scaffold si degrada e rimane solo il tessuto che può essere impiantato. Questo approccio si usa anche per ottenere modelli di tessuto umani per lo studio di patologie: in tal caso si parla di *medicina degenerativa* (si vuole ottenere un tessuto patologico).

Per l'approccio in vivo si possono seguire strade diverse. Dopo la progettazione dello scaffold si possono seminare le cellule in un ambiente di coltura statico, poi impiantare il costruito (→ scaffold + cellule); oppure si possono seminare le cellule in vitro e tenerle in coltura in vitro in un bioreattore specifico per stimolare la proliferazione (24 ore) e la differenziazione (2-3 settimane), infine impiantare. Nell'approccio in vivo si possono anche impiantare scaffold senza cellule: la matrice le prenderà dai tessuti circostanti.

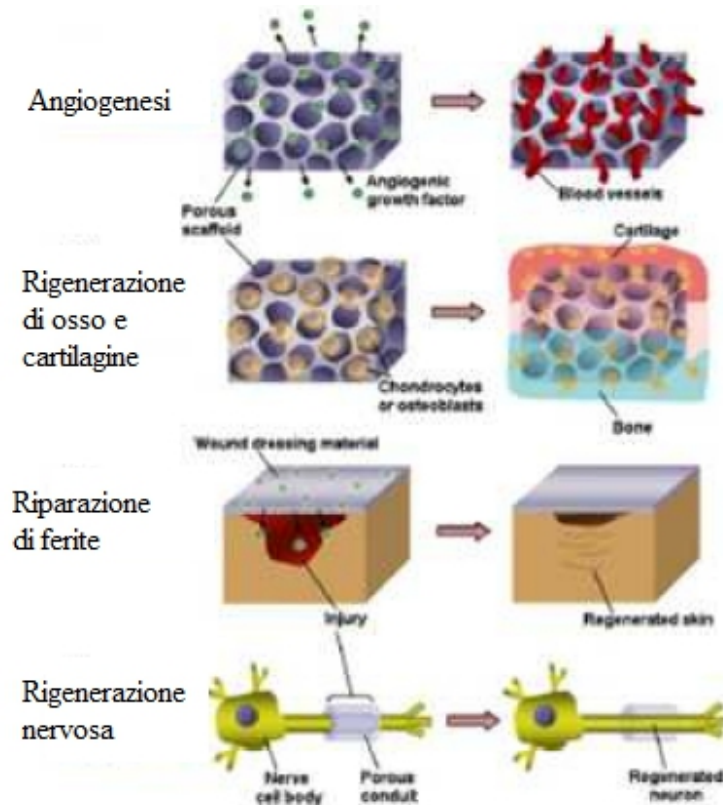
Come stabilire se usare l'approccio in vivo o in vitro?

Per l'approccio in vitro bisogna progettare sia lo scaffold che il bioreattore, mentre per quello in vivo lo strumento fondamentale è solo lo scaffold. Anche usando un bioreattore nell'approccio in vivo, esso ha una funzione ben specifica ed è quindi più semplice da progettare di uno che deve ingegnerizzare del tutto un tessuto. Con l'approccio in vitro bisogna impiantare il tessuto: questa è una fase complicata perché la connessione con i vasi sanguigni deve essere rapida per evitare l'apoptosi cellulare. In vivo, invece, i vasi sanguigni si sviluppano in parallelo al tessuto (angiogenesi → ramificazione dei vasi sanguigni che passano vicini al costruito). Per quanto visto, sembrerebbe che l'approccio in vivo sia quello più semplice; in realtà bisogna anche tener conto del fatto che in vitro il processo viene controllato meglio, quindi è meno rischioso per il paziente.

Attualmente non si sono ancora rigenerati completamente tessuti che non hanno la capacità di rigenerazione spontanea. Si sfruttano le tecniche di TE per rigenerare pelle (Integra) e cartilagine (Carticel), ma non si ottengono risultati identici ai tessuti naturali. L'esperienza, però, insegna che una rigenerazione completa potrebbe non essere necessaria per ottenere risultati clinici significativi (per esempio sollievo dal dolore, ripristino delle funzioni, estetica).

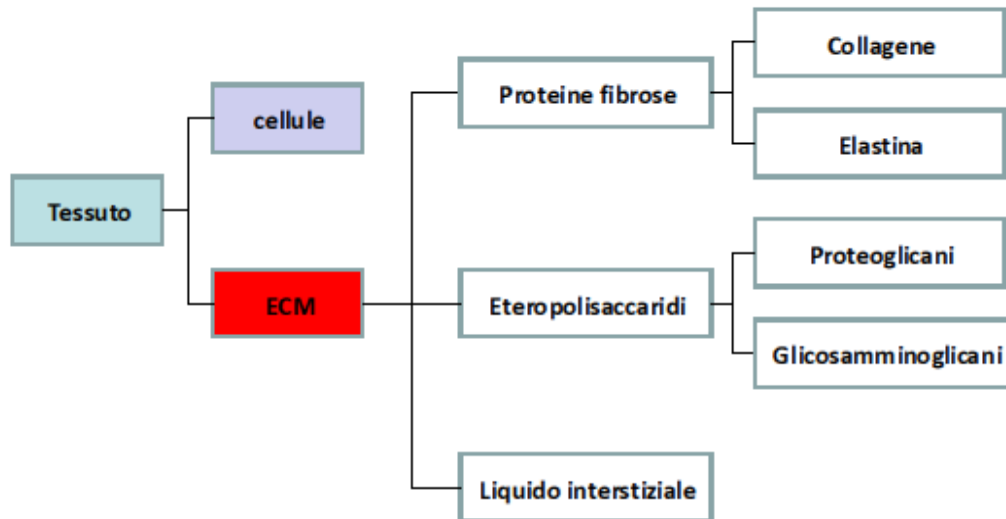
- il biomateriale può avere ligandi per recettori cellulari (integrine);
 - il biomateriale può assorbire selettivamente proteine di adesione alle quali si legano le cellule;
4. può rinforzare il difetto per mantenerne la forma e prevenire la distorsione dei tessuti circostanti;
 5. serve come barriera per prevenire l'infiltrazione di tessuti circostanti, che potrebbero impedire il processo di rigenerazione.

Le caratteristiche di uno scaffold variano a seconda del tipo di tessuto sul quale deve essere applicato.



Caratteristiche generali di uno scaffold:

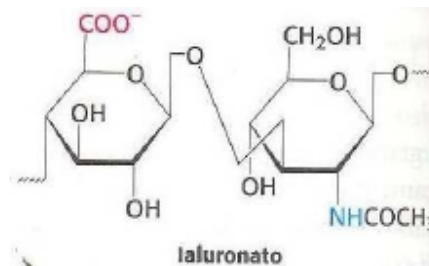
- porosità interconnesse: serve sia ad alloggiare le cellule sia a mantenerle vitali grazie alla diffusione di nutrienti; favorisce, inoltre, lo sviluppo di vasi sanguigni. La porosità di solito è bimodale: i pori maggiori (100-500 μm) servono per la migrazione delle cellule, quelli minori (15-20 μm) per la vascolarizzazione (parte dalle cellule endoteliali, che sono piccole);
- caratteristiche meccaniche: dipendono dal materiale e dalla sua struttura. Devono essere simili a quelle della matrice extracellulare del tessuto, di modo che le cellule si comportino in modo simile a quelle in condizioni naturali. Le caratteristiche meccaniche sono importanti anche quando si impianta il costrutto: se lo scaffold ha caratteristiche inferiori al tessuto subisce deformazioni e viene schiacciato; se ha proprietà eccessive si mantiene, ma introducendo qualcosa di rigido in un tessuto morbido si scatena la reazione da corpo estraneo con la formazione di una capsula fibrotica e conseguente apoptosi delle cellule dell'impianto;
- biodegradabilità: lo scaffold deve degradarsi ed essere sostituito da matrice extracellulare rilasciata dalle cellule;
- bioattività: ci deve essere un'opportuna chimica di superficie per garantire l'adesione, la



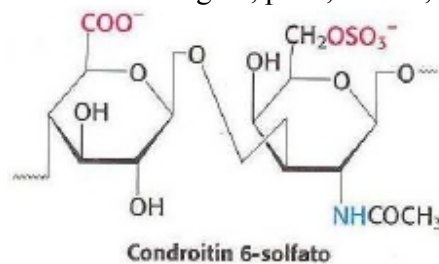
Eteropolisaccaridi:

- **glicosamminoglicani (GAG):** sono polisaccaridi lineari con una struttura base costituita dalla ripetizione di due unità glucidiche, delle quali una è acida (contiene gruppo COOH) e l'altra è un'ammina. Contengono molti gruppi OH, quindi sono molto idrofilici. Poiché hanno dei gruppi carichi negativamente, la catena non tende a raggomitolarsi ma rimane distesa. I GAG sono 5:

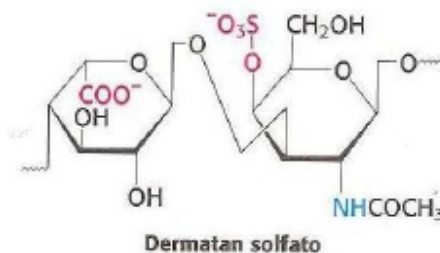
- *acido ialuronico:* si trova in tessuti connettivi, pelle, corpo vitreo, cartilagine, liquido sinoviale;



- *condroitin solfato:* si trova in cartilagine, pelle, cornea, osso, arterie;



- *dermatan solfato:* si trova in pelle, sangue, vasi, cuore, valvole cardiache;

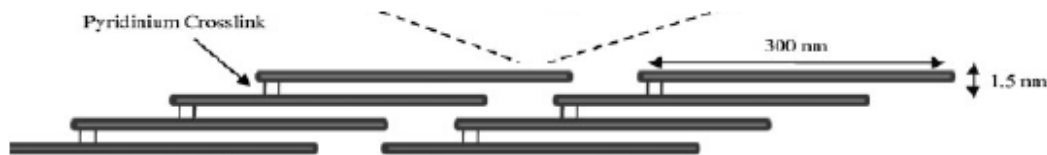


un batterio.

Non tutti i proteoglicani sono componenti della matrice extracellulare: alcuni sono componenti integrali delle membrane plasmatiche e servono da recettori, permettendo alla cellula di avere interazioni con proteine strutturali o solubili. Per esempio: sindecano.

Le proteine fibrose della ECM hanno funzione strutturale o di adesione cellulare. Il collagene fornisce resistenza a trazione, mentre l'elastina dà elasticità.

- Collagene:** è costituito da una sequenza di amminoacidi legati da legami peptidici. L'unità ripetitiva è: glicina – X – Y. X spesso è la prolina, mentre Y spesso è l'idrossiprolina. Le catene di amminoacidi, dette catene α , si organizzano in un'elica sinistrorsa. Tre eliche si assemblano in una struttura a tripla elica destrorsa, detta *tropocollagene*. Il tropocollagene è stabilizzato da legami ionici e da legami a idrogeno; la presenza di questi ultimi dipende dall'idrossiprolina. L'idrossiprolina viene prodotta per ossidazione per mezzo della vitamina C: se la vitamina C manca, il collagene non è funzionale e resistente. Il tropocollagene ha delle dimensioni tipiche. Varie molecole di tropocollagene tendono a disporsi in file parallele, con spaziatura fissa tra l'una e l'altra; ogni fila è sfasata rispetto alle altre. Questa conformazione è stabilizzata da legami covalenti: si formano così le *fibrille*, visibili al microscopio.



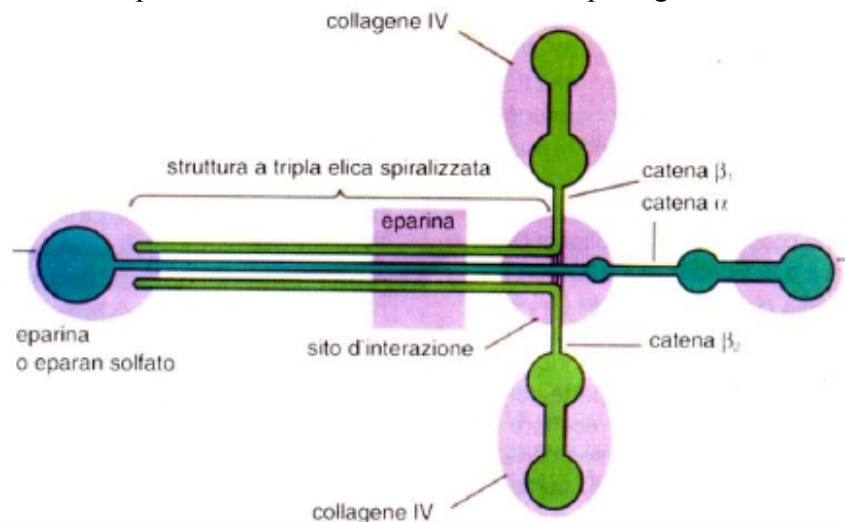
Per una stessa fila, la distanza testa-coda vale 35nm

Nelle file, le molecole adiacenti sono sfasate di 67nm

Ci sono diversi tipi di collagene: la struttura base è la stessa, ma danno luogo a tessuti diversi. Ciò significa che la chimica base del collagene è uguale, ma la disposizione macroscopica è diversa. Per esempio nella pelle le fibre di collagene sono intrecciate, mentre nei tendini sono disposte parallele in direzione longitudinale. Alcuni tipi di collagene formano reticoli e si ritrovano nelle lamine basali (ECM degli epitelii).

TIPO	DISTRIBUZIONE NEI TESSUTI
Collageni che formano delle fibrille	
I	Pelle, ossa, tendini, vasi sanguigni, cornea
II	Cartilagine, dischi intervertebrali, corpo vitreo
III	Vasi sanguigni, pelle fetale
Collageni che formano dei reticolati	
IV	Membrane basali
VII	Al di sotto degli epitelii pavimentosi stratificati
Collageni associati alle fibrille	
IX	Cartilagine
XII	Tendini, legamenti e qualche altro tessuto

consentono di interagire con le cellule e con la ECM. È abbondante negli epiteli, dove contribuisce a formare la lamina basale, un setaccio selettivo per molecole e cellule (infatti separa il tessuto epiteliale da quello connettivo). Non è una barriera completa, in quanto le cellule della risposta immunitaria e quelle nervose possono attraversarla. In caso di ferita, la lamina basale è l'impalcatura a cui aderiscono le cellule per rigenerare il tessuto.



L'ECM può influenzare l'organizzazione del citoscheletro cellulare: ciò è dimostrato usando il coltura fibroblasti trasformati (simili al cancro). Si è visto che tali cellule producono meno fibronettina, per cui aderiscono poco al substrato di coltura e tendono a staccarsi (questo potrebbe essere l'origine delle metastasi per il tessuto tumorale in vivo). In generale, un citoscheletro tondo indica che la cellula non ha aderito, mentre un citoscheletro appiattito indica che la cellula ha aderito all'ECM. Quindi c'è interazione reciproca tra ECM e citoscheletro: il citoscheletro può esercitare forze che orientano le macromolecole della matrice che la cellula secerne e le macromolecole della matrice possono a loro volta organizzare il citoscheletro delle cellule che contattano. In linea di principio la matrice extracellulare può propagare un ordine da cellula a cellula, creando strutture orientate su larga scala. Le integrine fungono da adattatori principali di questo processo di ordine, mediando le interazioni tra cellula e matrice.

L'ECM influenza la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule. La maggior parte delle cellule deve attaccarsi alla matrice per crescere, proliferare e sopravvivere. Questo fenomeno, detto *dipendenza da ancoraggio*, è mediato soprattutto da integrine e dai segnali intracellulari che esse generano.

Le molecole della matrice extracellulare non sono statiche, ma subiscono un certo turnover, per cui sono degradate e risintetizzate. Esiste anche la possibilità di una degradazione più localizzata quando è richiesta la migrazione delle cellule (per es quando globuli bianchi devono migrare attraverso la lamina basale in risposta a un'infezione). I componenti della ECM sono degradati da enzimi proteolitici extracellulari (proteasi), che sono secreti localmente dalle cellule. Esistono due classi principali di proteasi:

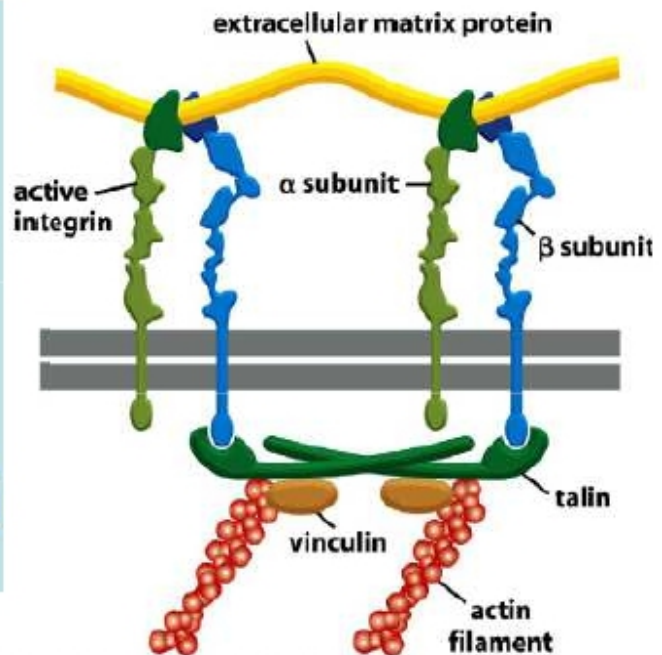
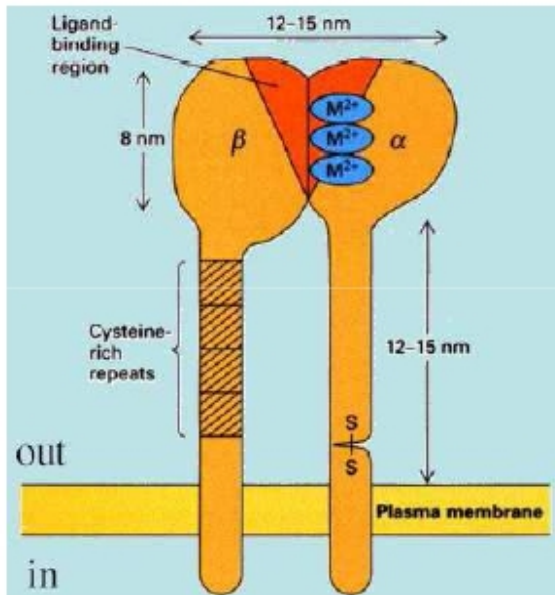
- *metalloproteasi*: attività mediata da Ca^{2+} o Zn^{2+} ;
- *serina proteasi*.

Esse cooperano per degradare le proteine della matrice (collagene, laminina, fibronettina). La proteolisi di proteine della matrice può contribuire alla migrazione cellulare in diversi modi:

- può aprire una strada attraverso la matrice;
- può esporre siti criptici sulle proteine tagliate che promuovono l'attacco della cellula;
- può promuovere il distacco della cellula in modo che essa si muova in avanti;
- può rilasciare proteine segnale extracellulari che stimolano la migrazione cellulare.

Il collegamento delle cellule alla ECM richiede proteine di adesione transmembranali che agiscono

Le integrine sono costituite da due catene diverse tra loro (α e β), per questo vengono dette *eterodimeri*. Esistono 24 integrine diverse. La catena α ha dei domini globulari la cui attività è mediata da ioni Ca^{2+} e presenta un legame solfuro. La catena β ha molte ripetizioni dell'amminoacido cisteina. È β che interagisce con l'ECM e media l'interazione con il citoscheletro. La testa della molecola di integrina si collega direttamente ad una proteina extracellulare (per esempio fibronectina); la coda intracellulare dell'integrina si collega alla talina, che a sua volta si collega all'actina filamentosa. Un insieme di altre proteine intracellulari di ancoraggio (α -actinina, filamina, vinculina) aiutano a rafforzare il legame.



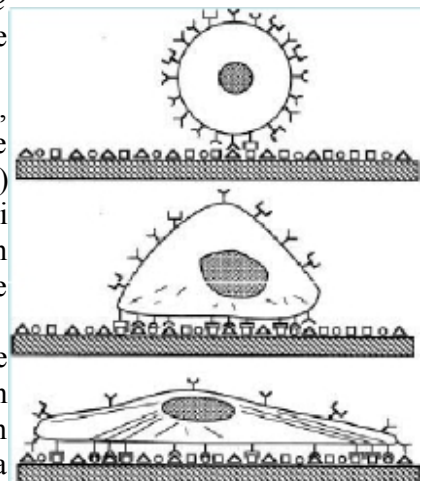
Le integrine non agiscono da sole, ma in *cluster*. Ciascuna integrina ha una interazione debole con la ECM, ma il cluster ha una adesione molto forte (*adesione cooperativa*). L'adesione matura mediata da cluster di integrine prende il nome di **adesione focale**.

Quando incontra un substrato con proteine di adesione (laminina, fibronectina), la cellula inizia a contattare il substrato mediante le integrine. A poco a poco la cellula si appiattisce (*spreading*) formando *contatti focali*. Quando le integrine si raggruppano, si raggiunge l'adesione forte e i contatti focali si sono evoluti in adesioni focali. Alla fine del processo la cellula è completamente appiattita sul substrato.

Il segnalamento tramite integrine inizia nei contatti focali, che danno una segnalazione chimica alla cellula. Le integrine non hanno un'attività enzimatica intrinseca; quando sono a contatto con il substrato di adesione cambiano la propria conformazione, cosa che richiama proteine di segnalazione dall'interno della cellula.

Queste proteine si trasmettono il segnale a cascata e il segnale raggiunge il nucleo. I possibili segnali che partono dalle integrine possono riguardare:

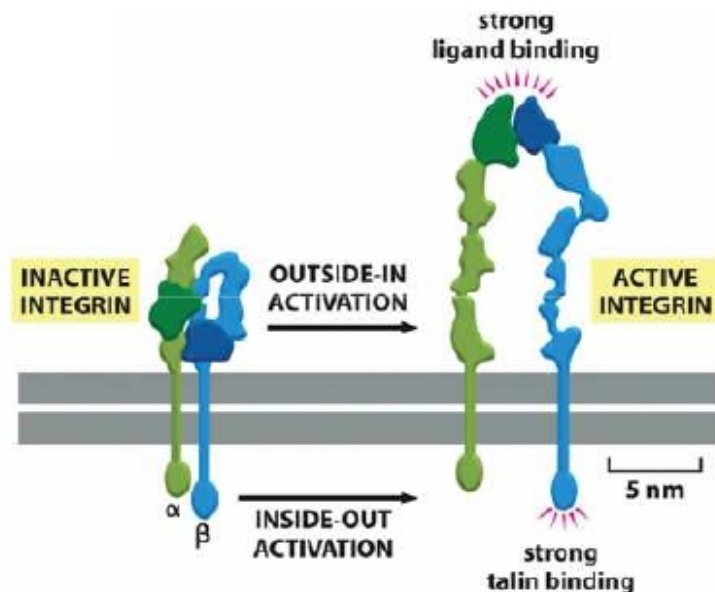
- sopravvivenza;
- trascrizione;
- proliferazione;
- migrazione;
- organizzazione del citoscheletro.



Vocabolario biochimico degli amminoacidi:

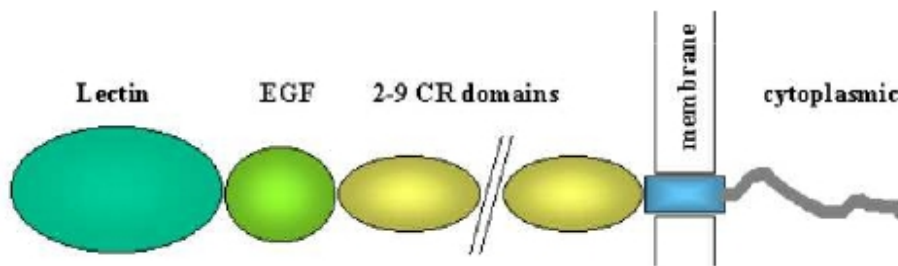
Amino acid	Three letter code	One letter code
alanine	ala	A
arginine	arg	R
asparagine	asn	N
aspartic acid	asp	D
cysteine	cys	C
glutamic acid	glu	E
glutamine	gln	Q
glycine	gly	G
histidine	his	H
isoleucine	ile	I
leucine	leu	L
lysine	lys	K
methionine	met	M
phenylalanine	phe	F
proline	pro	P
serine	ser	S
threonine	thr	T
tryptophan	try	W
tyrosine	tyr	Y
valine	val	V

Quando una integrina si lega a un ligando, esso provoca modificazioni conformazionali che si ripercuotono sull'intera proteina (regolazione allosterica). Nella conformazione inattiva le integrine sono ripiegate, mentre in quella attiva sono distese. Il passaggio da stato inattivo a stato attivo avviene grazie a un segnale che può giungere dall'esterno (*outside-in*) o dall'interno (*inside-out*).



Nome	Localizzazione principale	Associazione con giunzioni
Caderine Classiche		
E-Caderina	epiteli	Giunzioni aderenti
N-caderina	Neuroni, cuore, muscolo scheletrico, cristallino e fibroblasti	Giunzioni aderenti
P-caderina	Placenta, epidermide, epitelio mammario	Giunzioni aderenti
Caderine non classiche		
Desmocollina	pelle	desmosomi
Desmogleina	pelle	desmosomi

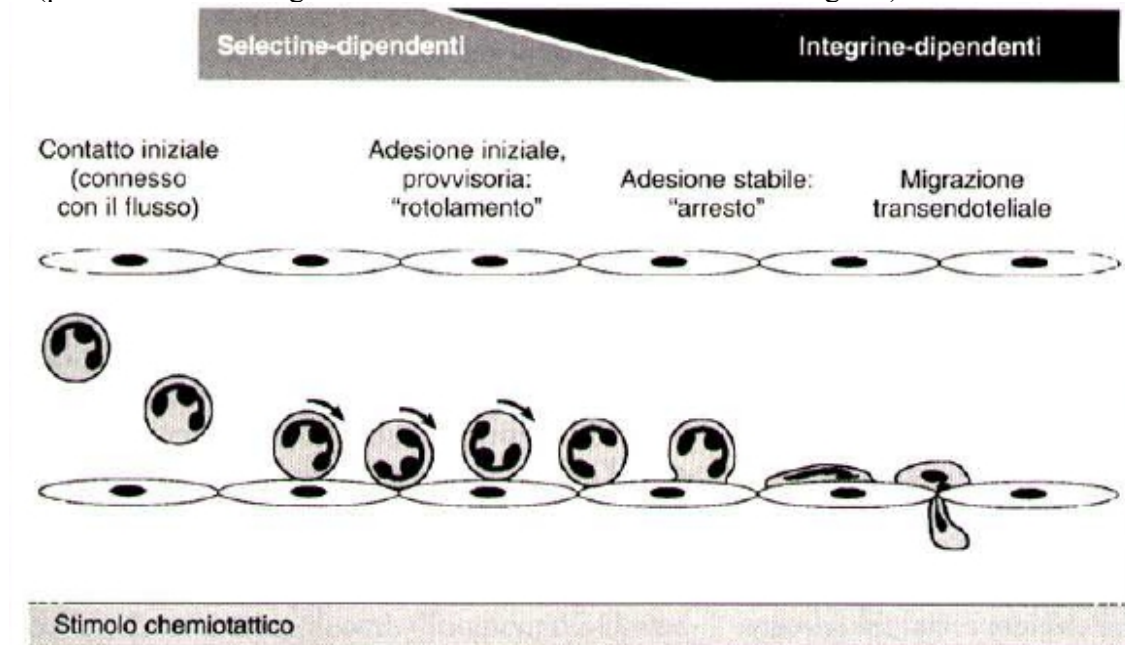
Le **selectine** sono glicoproteine transmembranaliali il cui dominio funzionale per l'adesione è a base di lectine. Instaurano legami eterofili con degli oligosaccaridi specifici. La loro attività dipende dagli ioni Ca^{2+} .



Ne esistono 3 tipi: L-selectine (globuli bianchi), P-selectine (piastrine e cellule endoteliali), E-selectine (cellule endoteliali).

Non determinano un legame stabile, bensì uno temporaneo.

Per esempio, durante una reazione infiammatoria le selectine legano le cellule del sistema immunitario ai siti di lesione. Hanno un ruolo importante nell'attacco dei globuli bianchi alle cellule endoteliali che rivestono i vasi sanguigni, rendendoli capaci di migrare fuori dai vasi e dentro i tessuti (processo effettuato grazie anche alla collaborazione con le integrine).



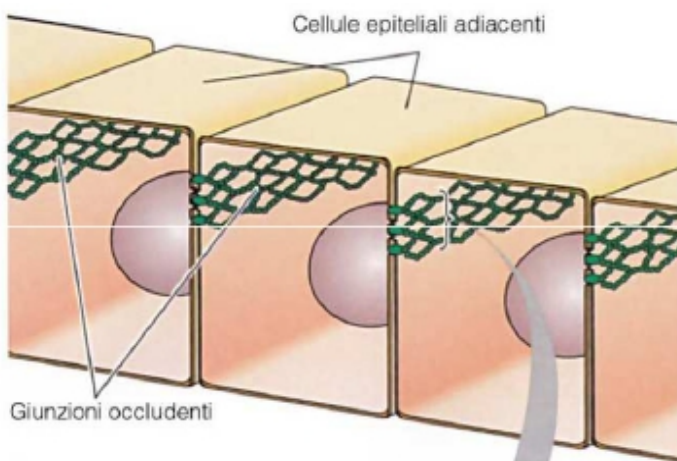
I macrofagi attivano le cellule epiteliali, quindi le loro selectine catturano i globuli bianchi (adesione debole). I globuli bianchi rotolano lungo la superficie del vaso sanguigno, spinto dal

GIUNZIONI CELLULARI

Giunzioni cellulari specializzate si trovano in tutti i punti di contatto cellula-cellula e cellula-matrice e sono particolarmente abbondanti negli epitelii. Si distinguono:

- **giunzioni occludenti:** saldano insieme le cellule di un epitelio e impediscono che molecole anche piccole possano filtrare da un lato all'altro. Si dividono in:
 - giunzioni strette (solo nei vertebrati);
 - giunzioni serrate (soprattutto negli invertebrati);
- **giunzioni di ancoraggio:** attaccano meccanicamente le cellule e i loro citoscheletri ad altre cellule o alla ECM. Si dividono in:
 - siti di attacco ai filamenti di actina:
 - giunzioni aderenti (cellula-cellula);
 - adesioni focali (cellula-matrice);
 - siti di attacco ai filamenti intermedi:
 - desmosomi (cellula-cellula);
 - emidesmosomi (cellula-matrice);
- **giunzioni comunicanti:** mediano il passaggio di segnali chimici o elettrici da una cellula interagente al suo partner. Si dividono in:
 - giunzione gap;
 - sinapsi chimiche;
 - plasmodesmi (solo vegetali).

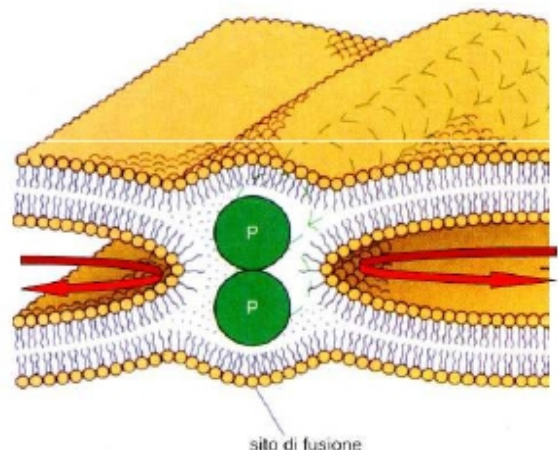
Le *giunzioni occludenti* o *sigillanti* hanno il ruolo di creare una barriera alla diffusione delle

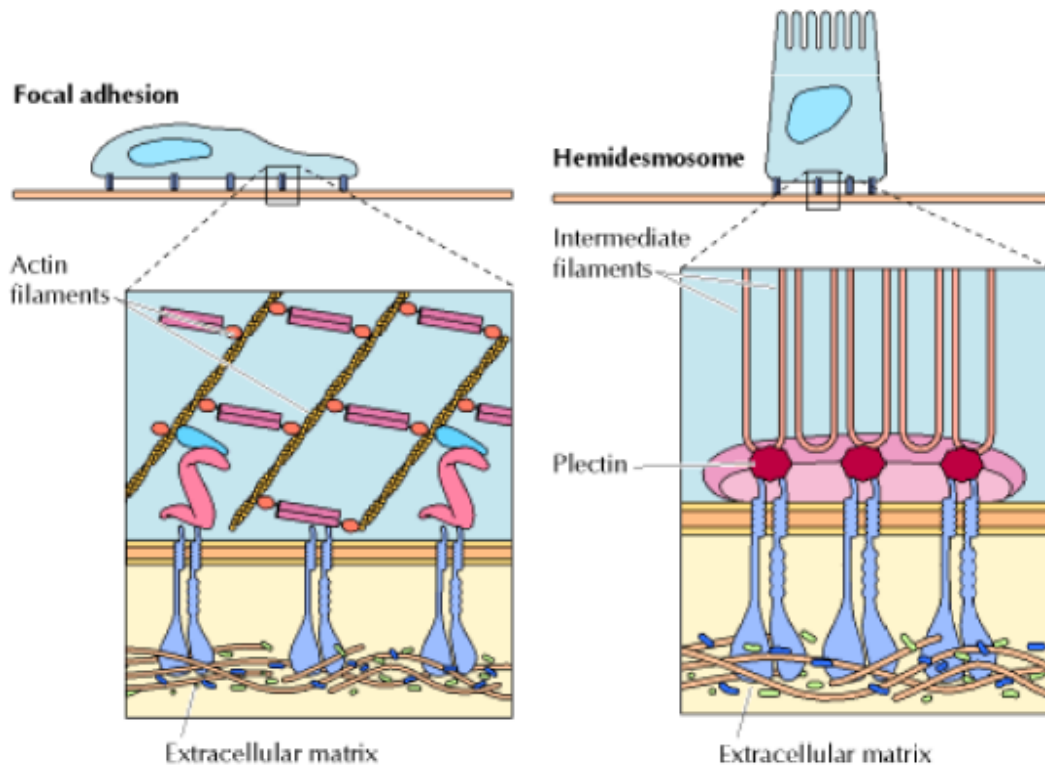


molecole nello spazio tra due cellule. Impediscono il movimento di molecole da un lato all'altro dello strato di cellule, ma impediscono anche il movimento di proteine di membrana da un lato all'altro di una singola cellula.

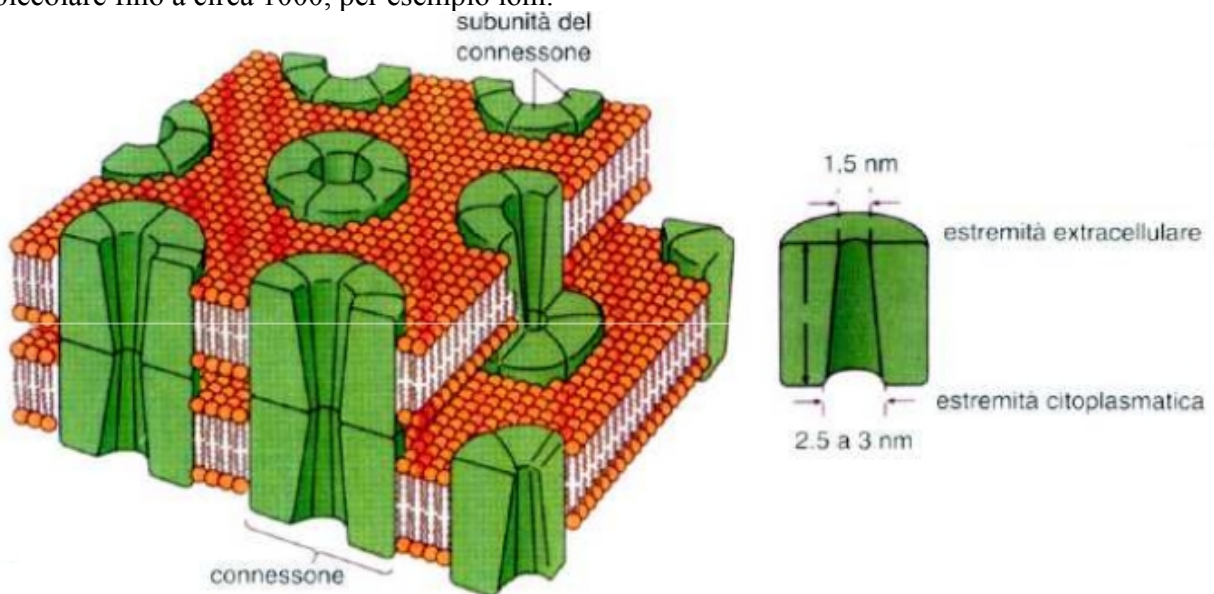
Per esempio le giunzioni occludenti nell'epitelio intestinale fanno in modo che le proteine che trasportano il glucosio all'interno della cellula stiano solo nella parte di membrana esposta al lume intestinale, mentre le proteine che lo trasportano all'esterno della cellula stiano dall'altro lato.

Le giunzioni occludenti impediscono il passaggio di fluidi tra le cellule andando a formare attorno al perimetro cellulare una cintura continua, detta *zonula*. Sono particolarmente presenti negli epitelii di rivestimento e negli epitelii intestinali. Gli spazi interstiziali sono annullati in corrispondenza dei *punti nodali*, punti in cui i lembi di membrana che si affrontano sono saldamente coesi. Le principali proteine di membrana coinvolte sono claudina e ocludina, che sporgono sulla faccia esterna delle membrane e sono unite da legami non covalenti. I fosfolipidi delle due membrane sono parzialmente fusi.





Le giunzioni comunicanti vengono dette **gap** e fanno comunicare direttamente una cellula con l'altra tramite canali proteici (diametro 1,5 nm). Permettono il passaggio di piccole molecole con peso molecolare fino a circa 1000, per esempio ioni.



Le cellule mantengono un gap di 2-3 nm tra le rispettive membrane e non viene sigillata la giunzione dei fluidi extracellulari circostanti. I canali sono detti *connessioni* e sono costituiti da 4-6 molecole di *connessina*. I canali possono aprirsi o chiudersi, a seconda della conformazione delle proteine che li compongono.

Un esempio di giunzione gap è la **sinapsi elettrica**, che permettono ai potenziali d'azione di diffondere rapidamente da una cellula all'altra senza il ritardo che si verifica nelle normali sinapsi chimiche. Ciò viene sfruttato da pesci e insetti in situazioni di pericolo. Nel corpo umano le sinapsi elettriche si trovano nei cardiomiociti, nelle cellule muscolari lisce dell'intestino e nel fegato.

quindi rese non vitali.

Esistono numerosissimi marker. Tra i più usati vi sono DAPI e falloidina.

DAPI è una colorazione fluorescente per il nucleo, che viene eccitata dalla luce ultravioletta e mostra una fluorescenza blu. Si lega alle sequenze ricche di A-T dei cromosomi. Può essere usato sia in vivo che in vitro.

La falloidina si lega all'actina.

La colorazione con ematossidina e eosina è una delle più usate per l'istologia. L'ematossidina tinge i nuclei di blu, mentre l'eosina dà una colorazione rosa o rossa al citoplasma.

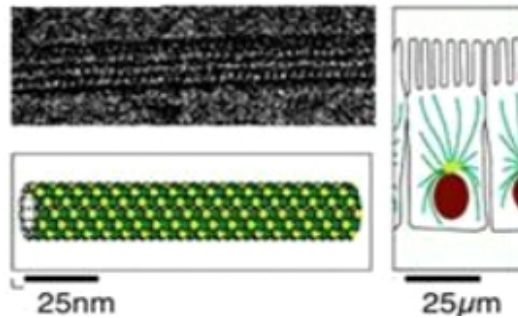
CITOSCHELETRO

Il citoscheletro è una rete organizzata di proteine fibrose che si trova nel citoplasma e dà forma alle cellule. È presente in tutte le cellule (eucariote o procariote) e gioca un ruolo importante in:

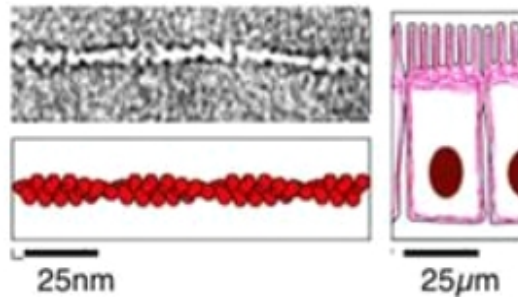
- movimenti della cellula (migrazione);
- trasporto intracellulare (movimento e organizzazione di vescicole e organelli);
- divisione cellulare.

Il citoscheletro è composto da tre proteine:

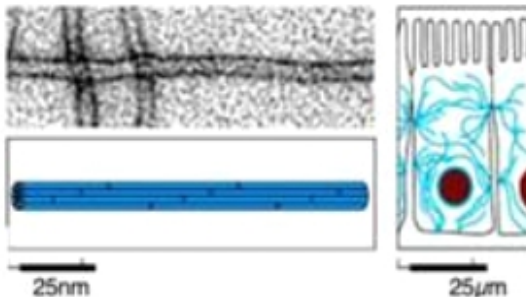
- microtubuli (sparsi all'interno del citoplasma);



- microfilamenti (filamenti di actina a contatto con la membrana);



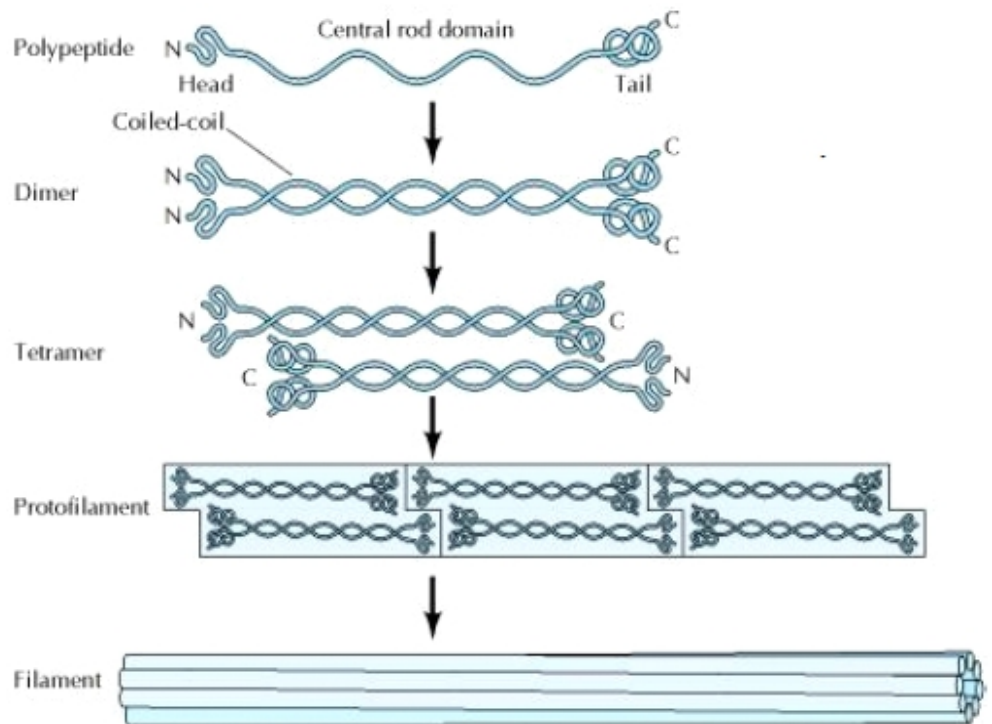
- filamenti intermedi (sparsi all'interno del citoplasma).



- determina la forma della cellula;
- permette i movimenti della superficie cellulare (consentendo alla cellula di migrare, inglobare particelle e dividersi).

Esistono vari tipi di **filamenti intermedi** (ne sono stati individuati più di 50), con un diametro medio di 10 nm. Le loro componenti sono diverse a seconda del tipo di cellula. Non sono filamenti dinamici, ma statici. Sono, però, estremamente deformabili (possono essere stirati molte volte oltre la loro lunghezza iniziale) grazie alla loro struttura gerarchica.

Ogni monomero dei filamenti intermedi consiste di una α elica con una testa (gruppo amminico) e una coda (gruppo carbossilico). I singoli polimeri si arrangiano in dimeri, con le α eliche intrecciate (coiled coil structure) e le teste associate con le teste, le code con le code.



I dimeri si associano in modo antiparallelo (testa con coda) per formare dei tetrameri. I tetrameri si associano estremità per estremità, formando i protofilamenti. I protofilamenti si uniscono lateralmente, formando i filamenti. Ciascun filamento è una struttura cava che contiene circa 8 protofilamenti.

Le funzioni dei filamenti intermedi comprendono:

- l'organizzazione della struttura tridimensionale interna della cellula;
- l'ancoraggio degli organelli;
- l'essere componenti strutturali della lamina nucleare e dei sarcomeri;
- la partecipazione in alcune giunzioni cellula-cellula e cellula-matrice.

Proprietà generali del citoscheletro:

- comportamento strutturale: gli elementi cooperano per fornire forza e forma alla cellula;
- comunicazione: gli elementi cooperano per realizzare una connessione con la membrana cellulare;
- supporto: gli elementi cooperano per realizzare una connessione tra i diversi filamenti;
- trasduzione di segnali: gli elementi sono in grado di modificare la propria struttura e di comunicare questi cambiamenti al nucleo;
- controllo e generazione di movimento: gli elementi partecipano al movimento della cellula e ad altre funzioni particolari, come la fagocitosi e la contrazione muscolare.

Recenti scoperte in biologia e in tissue engineering indicano che le interazioni della cellula con la matrice extracellulare giocano un ruolo fondamentale nella regolazione di proliferazione,

vengono espulse per diffusione attraverso la membrana. Può anche succedere che le molecole non abbandonino la membrana e in tal caso il segnale può essere inviato solo se la cellula bersaglio è vicina.

Il segnale raggiunge la cellula bersaglio mediante recettori specifici. Il singolo legame tra recettore e molecola è forte (a differenza di quanto si è visto per le integrine), per questo si parla di recettori ad elevata affinità.

Le molecole di segnalazione extracellulare spesso agiscono a concentrazioni molto basse, normalmente inferiori a 10^{-8} M.

Esistono due classi di recettori:

- *di superficie*: interagiscono con molecole che non attraversano la membrana cellulare perché grandi e/o idrofiliche;
- *intracellulari*: interagiscono con molecole piccole e idrofobiche che diffondono attraverso la membrana; spesso sono legati al nucleo, garantendo una segnalazione veloce.

Le molecole segnali extracellulari possono agire su distanze brevi o su distanze lunghe.

La segnalazione a breve distanza può essere ottenuta mediante:

- *segnalazione dipendente dal contatto*. Le molecole segnale rimangono attaccate alla superficie della cellula segnalante, quindi influenzano solo le cellule a contatto con essa;
- *segnalazione paracrina*: la cellula segnalante produce molecole che diffondono; tali molecole, però, hanno vita breve (per esempio proteine, che vengono degradate velocemente), quindi rimangono attive solo nell'intorno della cellula segnalante. Questo tipo di segnalazione è quella usata per i fattori di crescita. Un tipo di segnalazione paracrina è la *segnalazione autocrina*, sfruttata dalle cellule durante il periodo dello sviluppo. Un gruppo di cellule di uno stesso tessuto produce molecole di segnalazione, che poi riceve lui stesso;
- *giunzioni gap*: c'è passaggio diretto di piccole molecole da una cellula a un'altra (per esempio i cardiomiociti si sincronizzano con questo meccanismo).

La segnalazione a lunga distanza può essere ottenuta mediante:

- *segnalazione endocrina*: le cellule endocrine secernono ormoni che vanno in circolo nel sangue. È lenta e poco mirata;
- *segnalazione sinaptica*: quella che avviene con le sinapsi chimiche. È veloce e precisa a livello spaziale.

Ogni cellula decide il proprio comportamento in base ai segnali ricevuti ed è programmata per rispondere a segnali extracellulari multipli. Una cellula con segnalazione insufficiente va in apoptosi (suicidio cellulare programmato). Per questo anche gli scaffold devono fornire segnali alle cellule. Le molecole segnale vanno studiate a seconda del tipo di cellula: per esempio l'acetilcolina stimola la contrazione delle cellule muscolari scheletriche, mentre fa rilassare le cellule muscolari lisce.

I segnali hanno effetto solo finché il recettore è legato alla molecola segnale; quando si stacca, la cellula smette di rispondere al segnale. Le cellule hanno una serie di meccanismi di disattivazione. Fa eccezione lo sviluppo embrionale, durante il quale alcuni segnali hanno un effetto permanente.

Le piccole molecole di segnalazione idrofobiche possono diffondere attraverso la membrana e arrivare all'interno delle cellule bersaglio, dove incontrano i recettori. Alcuni di questi sono recettori nucleari, che sono collegati al DNA.

Le molecole idrofobiche hanno bassa solubilità, quindi resistono più a lungo ai fluidi biologici e trasmettono un segnale lungo (può durare anche giorni). Le molecole idrofiliche, invece, assorbono acqua, che poi le degrada: per questo hanno un tempo di segnalazione breve (a volte solo pochi secondi).

Tutte le molecole solubili in acqua si legano a recettori proteici specifici sulla superficie della cellula bersaglio. I recettori possono essere di 3 tipi:

- *recettori collegati a canali ionici*: la molecola di segnalazione, legandosi, cambia la

di crescita hanno un'azione localizzata perché sono facilmente degradabili, quindi sfruttano la segnalazione per effetto paracrina. Agiscono a piccole concentrazioni: 10^{-9} – 10^{-11} M. Vengono ricevuti da recettori con attività enzimatica intrinseca o collegati ad enzimi.

Principali fattori di crescita per il tessuto osseo e NGF:

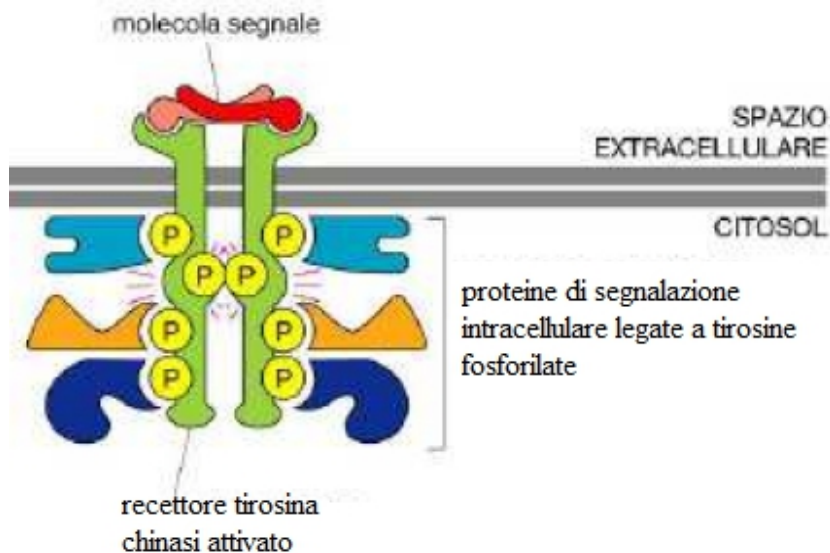
- **IGFs** (Insulin-Like Growth Factors): è il fattore di crescita più abbondante tra quelli prodotti dagli osteoblasti. Induce attività legate alla crescita dell'osso;
- **FGFs** (Fibroblast Growth Factors): stimola la rigenerazione dell'osso e la vascolarizzazione. Si lega con l'eparina, un componente della ECM. Per questo si funzionalizzano gli scaffold con eparina;
- **TGF – β** (Transforming Growth Factor – β): regola l'espressione di più geni associati all'attività degli osteoblasti. Alla famiglia appartengono le proteine morfogenetiche dell'osso (**BMPs**), che vengono usate negli scaffold per rigenerazione di osso e cartilagine;
- **NGF** (Nerve Growth Factor): stimola crescita di cellule nervose.

L'attività biologica dei fattori di crescita è mediata da recettori proteici ad elevata affinità localizzati nella membrana plasmatica. La maggioranza di tali recettori sono i **RECETTORI TIROSINA CHINASI**, che esplicano un'attività enzimatica tirosin chinasi, catalizza cioè il trasferimento di gruppi fosfato dall'ATP a substrati proteici, fosforilando residui di tirosina. L'attività enzimatica è regolata: è inibita in condizioni di riposo del recettore, mentre il legame col fattore di crescita rimuove tale inibizione.

I recettori per fattori di crescita sono una famiglia di proteine che condivide una comune struttura di base:

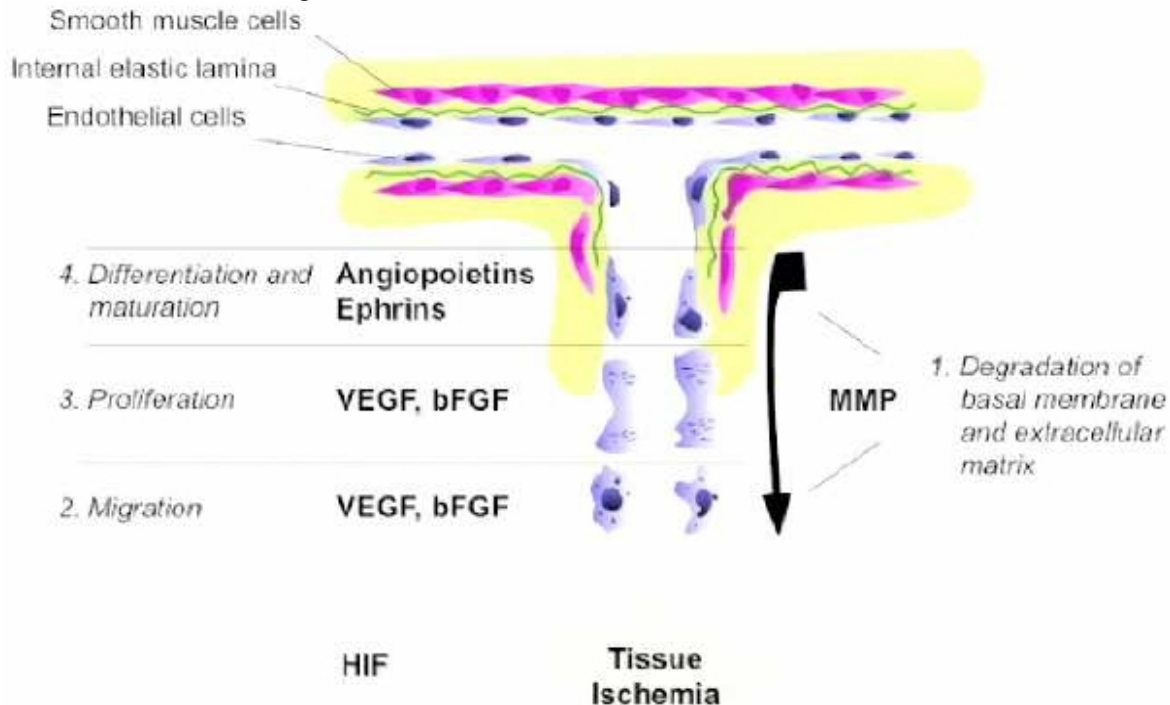
- 1) una porzione N-terminale extracellulare,
- 2) una regione idrofobica che attraversa la membrana plasmatica e
- 3) un dominio citoplasmatico sede dell'attività regolatoria e catalitica tirosin chinasi.

La maggior parte dei recettori per i fattori di crescita – con poche eccezioni – è costituita da una singola catena polipeptidica. I membri della famiglia di recettori con attività tirosin chinasi condividono una notevole omologia nelle regioni del dominio transmembrana e del dominio catalitico. I domini extracellulari sono invece molto variabili e presentano diverse combinazioni di motivi strutturali.



Il legame recettore-fattore di crescita induce l'attivazione della tirosin chinasi citoplasmatica attraverso un meccanismo di dimerizzazione. Va ricordato che le molecole dei recettori sono libere di muoversi nel doppio strato lipidico fluido della membrana plasmatica e quindi possono formare dimeri ed oligomeri reversibili. Questo processo avviene spontaneamente anche in assenza di fattori di crescita a seguito delle interazioni multiple casuali tra recettori adiacenti. I fattori di crescita sono

L'angiogenesi, cioè il processo di ramificazione di vasi già esistenti, parte da stimoli dovuti a cellule in sofferenza per ischemia di un tessuto (→ mancanza di ossigenazione). I fattori rilasciati sono **VEGF** e **bFGF**, che stimolano la degradazione di ECM, la proliferazione delle cellule e la loro migrazione. Si forma un primo tubo di cellule endoteliali, ma questo non si mantiene nel tempo se non si trasforma in un vaso completo. A questo provvedono i fattori di crescita **angiopoietine** e **efrine**, che stimolano la migrazione delle altre cellule del vaso.



Lo stimolo iniziale, dunque, è ipossico. Le cellule vanno in ipossia se sono troppo lontane (più di 100 – 200 μm) dal vaso.

Negli ultimi anni numerosi tumori e malattie neo-plastiche sono stati associati ad alterazioni dei geni che codificano i recettori ad attività tirosin chinasi. Quindi le tirosin chinasi coinvolte nella trasduzione del segnale di proliferazione sono diventate il bersaglio per lo sviluppo dell'ultima generazione di farmaci anti-neoplastici. Alcuni recettori hanno avuto una particolare attenzione: 1) quelli della famiglia dell'EGF per la loro iperespressione nei tumori epiteliali tra cui il carcinoma mammario; 2) i recettori della famiglia del VEGF protagonisti della neo-angiogenesi tumorale cioè del processo di vascolarizzazione indotta dal tumore, indispensabile per la crescita e la diffusione sistemica del tumore stesso. Tre sono gli approcci farmacologici:

- 1) farmaci che inibiscono l'attività tirosin chinasi
- 2) uso di anticorpi monoclonali capaci di interagire col recettore impedendone l'interazione con fattori di crescita.
- 3) Farmaci che inibiscono la trasduzione del segnale.

Difficoltà della terapia con fattori di crescita connesse con:

- Elevata attività biologica dei fattori di crescita (dose da pico- a nano-molare): occorre modulare la dose del rilascio a dosi molto basse che vanno poi verificate in fase di formulazione, attraverso analisi molto sensibili. Se si usano dosi "sottoterapeutiche", non hanno effetto; se le dosi sono eccessive o se la cinetica di rilascio è inappropriata, la produzione inerente di fattori di crescita da parte delle cellule locali e dei loro recettori viene abbassata (downregulation) oppure i recettori vengono internalizzati.
- Effetti pleiotropici (cioè mancanza di selettività di azione)
- Vita biologica breve (da minuti a ore), legata alla degradazione enzimatica.
- Necessità di somministrazione locale per un adeguato effetto terapeutico e limitate reazioni

I reticolati non si possono né fondere né sciogliere in un solvente.

Poiché le catene non sono tutte uguali tra loro, il peso molecolare di un polimero è una distribuzione di pesi molecolari, quindi si fa riferimento a un suo valor medio. Si possono considerare due tipi di valor medio, ponderale o numerale.

Il peso molecolare medio numerale (M_n) è la media ponderata rispetto al numero delle moli:

$$\langle M \rangle_n = \frac{\sum (N_i \cdot M_i)}{\sum N_i}$$

Il peso molecolare medio ponderale (M_w) è la media rispetto alla quantità

in peso delle specie: $\langle M \rangle_w = \frac{\sum (N_i \cdot M_i^2)}{\sum N_i \cdot M_i} = \frac{\sum (w_i \cdot M_i)}{\sum w_i}$

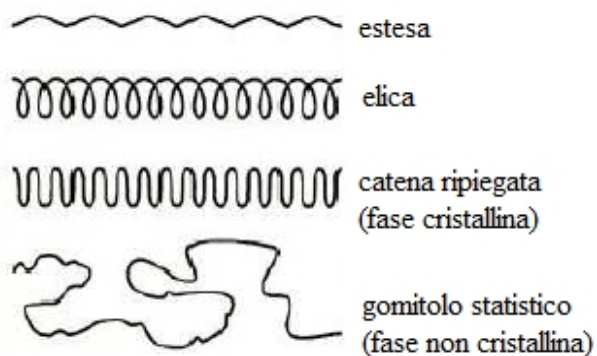
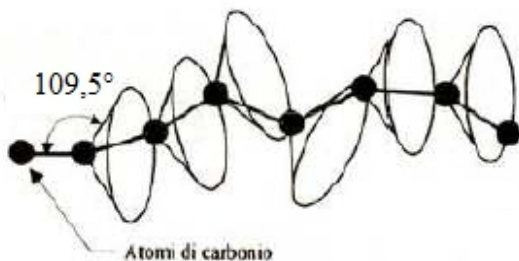
Si ha $M_w > M_n$ sempre.

L'indice di polidispersità α è sempre maggiore o uguale a 1 (nel caso ideale di catene tutte lunghe uguali) e fa capire quanto la distribuzione si amplia (indice alto → distribuzione ampia). Viene definito come: $\alpha = \frac{M_w}{M_n}$

La presenza di catene a peso molecolare basso diminuisce la rigidità del polimero e interferisce con l'impacchettamento delle catene per la cristallizzazione.

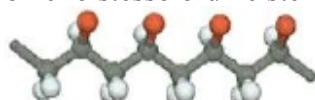
La struttura tridimensionale dei polimeri è definita da due parametri:

- **conformazione**: differenti disposizioni degli atomi nello spazio originate da rotazioni di gruppi atomici intorno a legami semplici. Il polimero può essere disordinato, compatto e organizzato oppure esteso. Le zone dove le catene sono ripiegate in modo ordinato corrispondono alla fase cristallina, mentre dove sono disordinate si ha una fase amorfa. La conformazione è importante per la degradazione del polimero: dove la catena è più aperta (fase non cristallina) la degradazione è più facile;

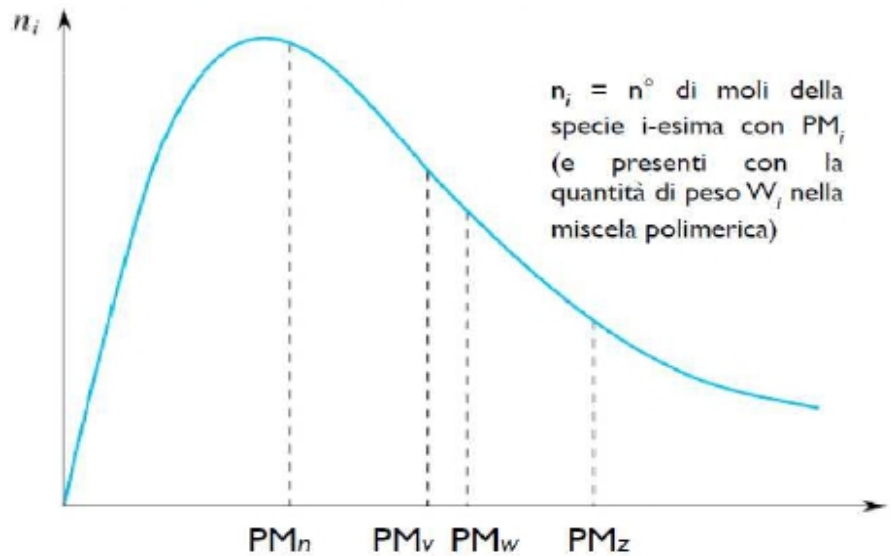


- **configurazione**: non può essere definita per tutti i polimeri, ma solo per quelli in cui l'atomo di C lega due sostituenti diversi. A seconda che i sostituenti si succedano in maniera ordinata o meno, esistono 3 configurazioni:

- *isotattica*: i sostituenti sono nello stesso ordine sterico;



curva di distribuzione dei PM



in base al comportamento alla degradazione si distinguono:

- *polimeri biostabili*: una volta impiantati non subiscono sostanziali trasformazioni chimiche e/o fisiche nel tempo;
- *polimeri bioinerti*: sono biostabili e in più presentano interazioni minime con i tessuti circostanti;
- *polimeri biodegradabili*: degradano a contatto con i tessuti, formando frammenti a basso peso molecolare; il fenomeno è mediato da cellule o enzimi;
- *polimeri bioerodibili*: sono biodegradabili e la degradazione inizia dalla superficie;
- *polimeri bioriassorbibili*: sono biodegradabili e i prodotti di degradazione possono essere metabolizzati.

Per esempio l'acido polilattico (PLA) è un polimero degradabile per idrolisi, la quale determina una diminuzione del peso molecolare fino alla formazione di acido lattico, che viene riassorbito.

I polimeri biodegradabili e/o bioriassorbibili offrono numerosi vantaggi:

- non necessitano di essere rimossi con operazioni;
- offrono un supporto temporaneo per la rigenerazione dei tessuti;
- sono carrier ideali per il rilascio controllato di farmaci;
- forniscono una migliore guarigione.

I polimeri per applicazioni biomediche devono avere i seguenti requisiti:

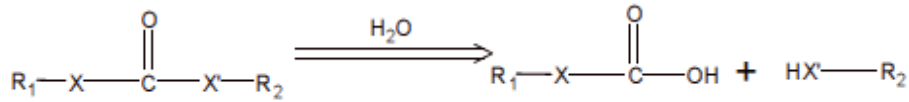
- biocompatibili e non tossici;
- processabili;
- sterilizzabili;
- completamente riassorbibili;
- stabilità meccanica;
- velocità di degradazione controllabile.

La velocità di degradazione è importante perché se il materiale degrada troppo lentamente è una barriera alla rigenerazione, mentre se degrada troppo in fretta può stimolare la risposta infiammatoria. I fattori che influenzano la degradazione sono:

- **composizione chimica**;
- **peso molecolare**;
- **polidispersità**;
- **morfologia** (cristallinità, presenza di microstrutture, orientazione delle catene)
- **sito di impianto**;
- **forma, dimensione**;
- **meccanismo di idrolisi** (mediata o no da enzimi);
- distribuzione delle unità ripetitive;
- presenza di gruppi ionici;
- presenza di componenti a basso peso molecolare (monomeri, oligomeri, solventi, ecc);
- presenza di difetti di catena;
- configurazione strutturale;
- metodologie/condizione di processazione;
- annealing;
- condizioni di stoccaggio;
- composti assorbiti;
- gruppi idrofilici in catena;
- terminali di catena idrofilici;
- gruppi idrolitici reattivi in catena.

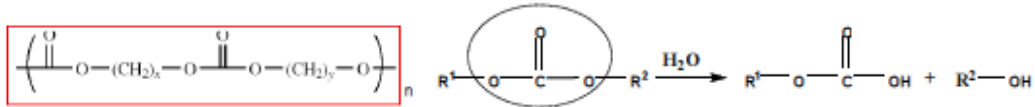
Per esempio il PCL – PEG – PCL:

2)

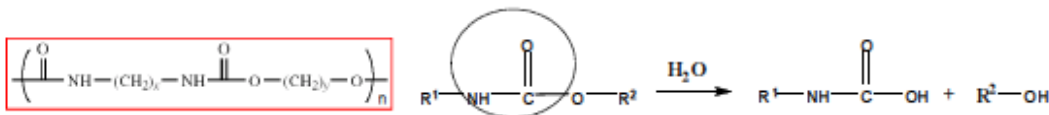


Dove X e X' contiene O, N, S legati direttamente ai carbonili

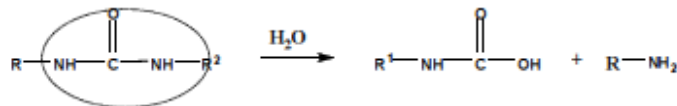
Policarbonati:



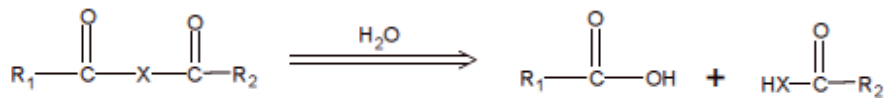
Poliuretani:



Poliuretani – Urea:

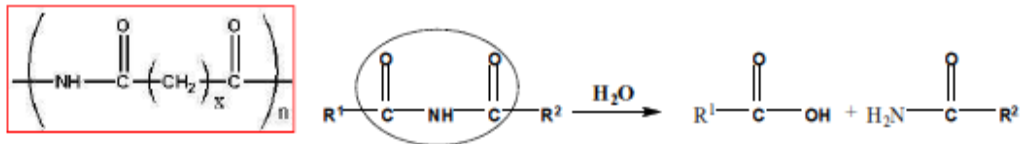


3)

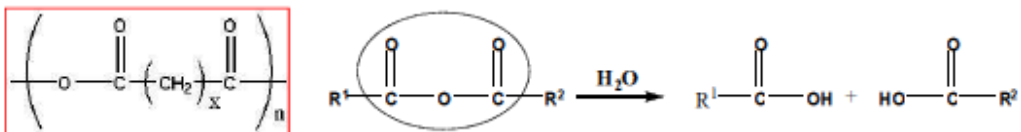


Dove X contiene O, N, S legato direttamente ai carbonili

Poliammidi:



Polianidridi:



Per testare il tempo di degradazione si gioca su pH (7,4), temperatura (37°C) e ambiente foto-protetto. Nel tempo si osserva il campione in vitro, valutandone il peso (che all'inizio non diminuisce, mentre il peso molecolare sì) e le caratteristiche meccaniche. In seguito si osserva cosa succede in vivo, in cui l'ambiente è più aggressivo (presenza di enzimi). L'idrolisi può essere catalizzata da ioni e può avvenire in maniera omogenea o eterogenea.

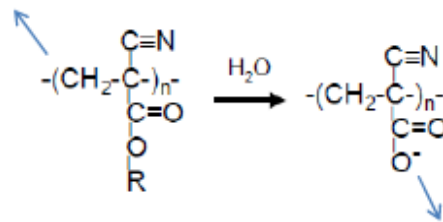
La **degradazione ossidativa** può essere provocata da diverse situazioni:

- ossidazione diretta, provocata dall'ospite: l'ospite genera specie molecolari che effettuano processi ossidativi direttamente nel polimero. Tali molecole reattive derivano dai processi di risposta infiammatoria;
- ossidazione prodotta da ioni metallici: è dovuta alla presenza di un ambiente ossidante

Le proteasi batteriche e dei funghi non sono rilevanti per la degradazione in vivo, ma sono importanti per altre applicazioni come la biodegradazione nell'ambiente.

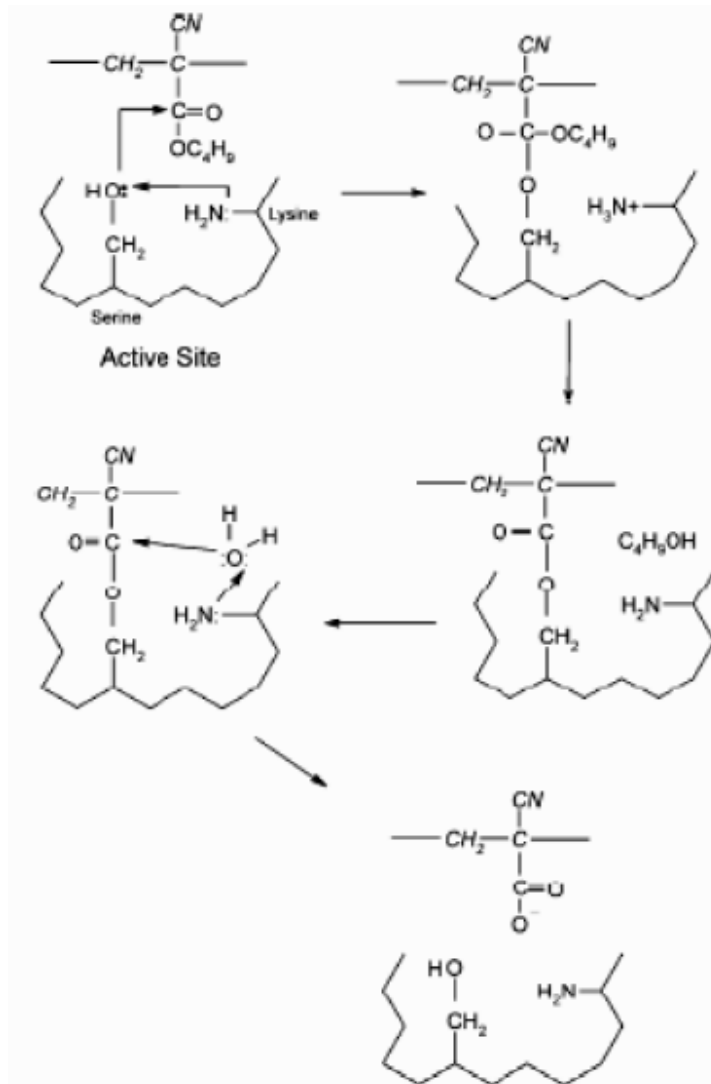
Esempio: degradazione mediata dall'esterasi.

Poli(alchil ciano-acrilati)



Acido poli(2-ciano-acrilico)

Meccanismo II:

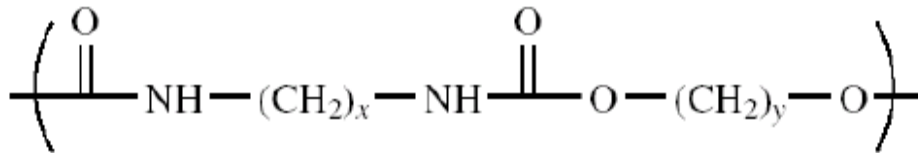


si ha idrolisi del gruppo laterale, catalizzata da esterasi, che porta alla formazione di un polimero solubile in acqua.

Tipiche sequenze per la funzionalizzazione dei biomateriali:

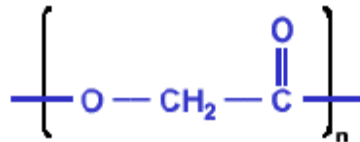
- recognition by collagenase: -Ala-Pro-Gly-/Leu-
- recognition by plasmin: -Val-Ala-/Asn-
- recognition by elastase: -Ala-Ala-Ala-Ala-Ala- (polyalanine sequence)

- poliuretani.



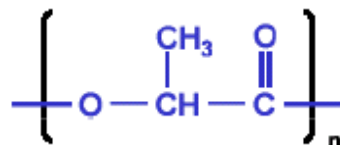
I **poli(α-idrossiacidi)** sono poliesteri. Ve ne sono di 3 tipi:

- *acido poliglicolico* (PGA): ha un gruppo estereo (idrofilico) e un gruppo CH₂, che ne costituisce la componente idrofobica. La struttura finale è quella di un materiale che tende ad assorbire acqua, quindi degrada velocemente;



PGA ha le seguenti caratteristiche:

- idrofilo;
- adatto a produrre fibre;
- altamente cristallino (46-50%);
- alto punto di fusione (225-230°C) e bassa solubilità in solventi organici;
- alta rigidità (E = 12.5 GPa) a causa dell'elevata cristallinità;
- subisce scissione idrolitica casuale (degradano prima le zone amorphe, poi quelle cristalline);
- degrada in monomeri non tossici (acido glicolico);
- perde rapidamente le proprietà meccaniche (2-4 settimane dopo impianto) e viene completamente riassorbito nel giro di 6 mesi;
- *acido polilattico* (PLA): ha un gruppo CH₃, che ne inibisce l'assorbimento di acqua. È idrolizzabile, ma degrada più lentamente rispetto a PGA. Il C è chirale perché ha due sostituenti diversi, quindi la catena polimerica può essere isotattica, sindiotattica o atattica, quindi il polimero può essere semicristallino o amorfo;



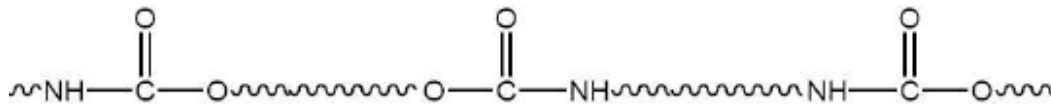
PLA ha le seguenti caratteristiche:

- è presente in numerosi prodotti commerciali (approvato da FDA);
- scarsamente idrofilo;
- molecola chirale (stereoisomeri D e L);
- a seconda degli stereoisomeri presenti in catena può essere amorfo o semicristallino;
- D-PLA e LPLA:
 - assorbiti più lentamente di PGA perché più idrofobi;
 - semicristallini;
 - resistenza meccanica;
 - usati per suture e applicazioni ortopediche;
- D,L-PLA:
 - amorfo;
 - usato per rilascio di farmaci;
- *policaprolattone* (PCL): ha 5 CH₂, quindi è un materiale abbastanza idrofobo, ma è comunque idrolizzabile.

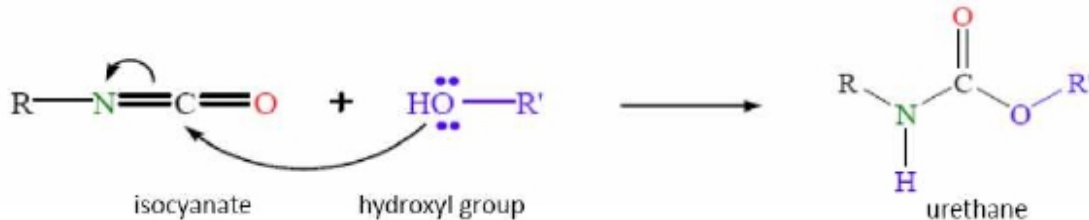
Il **poli(etilene glicolo)** (PEG) viene usato per gli idrogeli. Ha un peso molecolare generalmente inferiore a 40 000: se il suo peso molecolare è maggiore viene chiamato polietilenoossido (PEO). È altamente idrofilo ed è solubile in acqua. Viene adoperato come polimero per rivestimenti anti-fouling (cioè evita l'adesione delle proteine) e per trasportare farmaci e molecole bio-attivi (per es peptidi, proteine, acidi nucleici), proteggendoli dal riconoscimento da parte del sistema immunitario e dall'attacco enzimatico (in questo caso l'agente è inglobato in particelle rivestite di PEG oppure è legato covalentemente a PEG). Il forte adsorbimento di acqua sul polimero limita l'adsorbimento di proteine e il riconoscimento da parte del sistema immunitario mediato dai macrofagi; per questo c'è scarsa adesione cellulare e proteica sul polimero. Viene degradato per ossidazione.



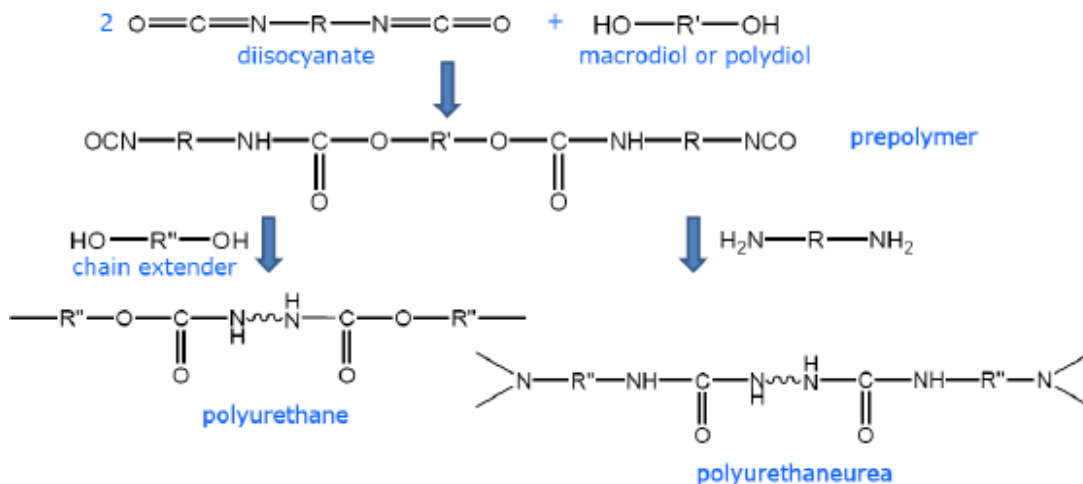
I **poliuretani** sono polimeri caratterizzati dalla ripetizione dell'unità uretanica lungo la catena.



L'unità (o gruppo) uretanico si ottiene dalla reazione di un isocianato con un ossidrilico alcolico.



Questa reazione, però, non prosegue. Per ottenere un poliuretano bisogna effettuare una sintesi a due stadi. Per prima cosa si fa reagire un eccesso di diisocianato con un macrodiolo: si ottiene un prepolimero. In seguito i prepolimeri reagiscono tra loro grazie alla presenza di estensori di catena, che possono essere dioli o diammine. Se si usa un diolo il prodotto finale è un poliuretano; se si usa una diammina il prodotto finale è la poliuretaneurea.



A seconda dei gruppi R, R' e R'' si ottengono materiali con proprietà diverse.

Alcuni tipici diisocianati:
 (quelli aromatici non si usano più perché sono tossici).

In genere la massa molecolare media dei macrodioli usati è compresa tra 400 e 5000 g/mol.

I poliuretani rientrano nella categoria dei copolimeri lineari a blocchi e in genere si distinguono:

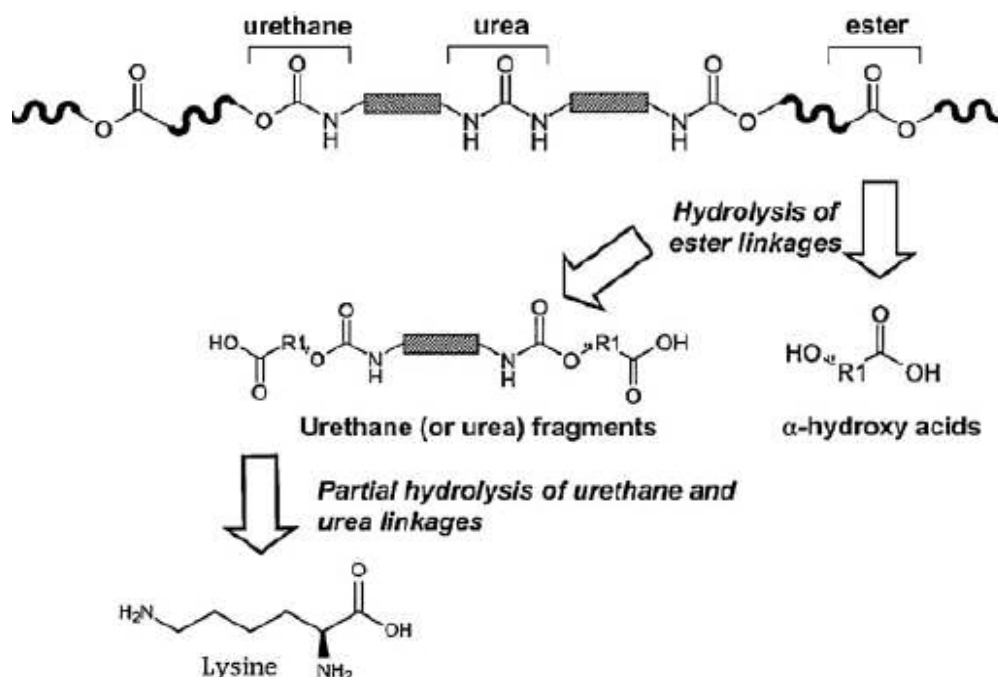
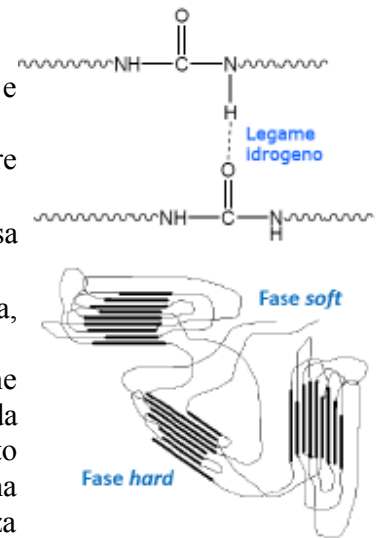
- segmenti *soft* → macrodioli con temperatura di transizione vetrosa inferiore a 0°C;
- segmenti *hard* → diisocianati, gruppi uretanici ed estensori di catena, una struttura rigida con Tg maggiore della temperatura fisiologica.

I legami ad idrogeno tra i gruppi uretanici dei segmenti hard di catene polimeriche adiacenti inducono la formazione di domini discreti, che fungono da cross-links fisici quando il materiale è sottoposto a sforzo (comportamento elastomerico). Nel complesso il materiale è costituito da due fasi, una soft e una hard. La natura e la struttura chimica dei segmenti soft e hard influenza profondamente la separazione di fase e di conseguenza le proprietà meccaniche del polimero (per es gli estensori di catena diamminici conferiscono maggior rigidità rispetto a quelli diolici). Le proprietà meccaniche dipendono anche dal rapporto tra le fasi hard e soft: in genere, un maggior contenuto di fase hard aumenta la rigidità e abbassa l'elongazione a rottura.

Le possibili degradazioni dei poliuretani sono:

- idrolitica: dovuta alla reazione di alcuni gruppi funzionali (in genere gruppi estere) del polimero con l'acqua, il principale componente dell'ambiente cellulare;
- enzimatica: dovuta alle cellule coinvolte nel processo infiammatorio post impianto. Esse producono enzimi che catalizzano alcune reazioni degradative (principalmente idrolitiche);
- ossidativa: mediata da macrofagi durante il processo infiammatorio e tipica del poliuretano a contatto con componenti metalliche, i cui prodotti di corrosione possono catalizzare processi ossidativi;
- environmental stress cracking (ESC): è il risultato di uno stress residuo sulla superficie del polimero, che può essere stato indotto durante la fabbricazione del dispositivo. In questo caso si creano delle microfessure sulla superficie del polimero anche in aree del dispositivo dove lo stress è basso.

Dopo lo sviluppo di poliuretani biostabili, è cresciuto l'interesse verso poliuretani biodegradabili: tali polimeri devono degradare velocemente o con tempi compatibili con la rigenerazione del tessuto in esame e non devono produrre prodotti di degradazione citotossici. La suscettibilità dei poliuretani alla biodegradazione dipende dal componente macrodiolo, che in genere è un poliesteri: in questo caso si degradano mediante meccanismi di idrolisi.



tempo fittizio come:

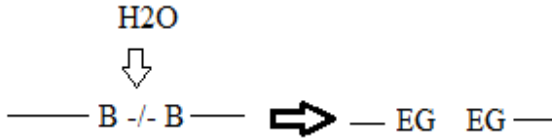
$$t_{ref} = b_T t$$

dove:

t → tempo di prova

$$b_T = e^{\left[\frac{E_a}{R}\left(\frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T}\right)\right]} \rightarrow \text{fattore di shift. Dipende dalla temperatura T e dall'energia di attivazione della degradazione } E_a.$$

Come si calcola E_a :



BB è un legame che può essere rotto per idrolisi. Quando la molecola si spezza, nel punto di rottura compaiono due gruppi EG (end group). Sia k la costante cinetica della reazione:

$$\frac{-d[BB]}{dt} = k[BB][H_2O]$$

Per ogni BB che scompare, si ottengono 2 EG (da cui deriva il 1/2 nella seguente formula):

$$\frac{-d[BB]}{dt} = \frac{1}{2} \frac{d[EG]}{dt} = k'$$

Se M è il peso molecolare si ha: $\frac{M_n(0)}{M_n(t)} = \frac{[EG]_t}{[EG]_0}$

Da cui: $\frac{M_n(0)}{M_n(t)} = \frac{2k'}{[EG]_0} t + 1$

Si ottiene linearità, confermata dai casi sperimentali. Vale:

$$k' = k[BB]_0[H_2O]_0 = A e^{\left(\frac{-E_a}{RT}\right)} [BB]_0[H_2O]_0 \rightarrow \ln k' = \ln(A[BB]_0[H_2O]_0) - \frac{E_a}{RT}$$

MIGRAZIONE CELLULARE

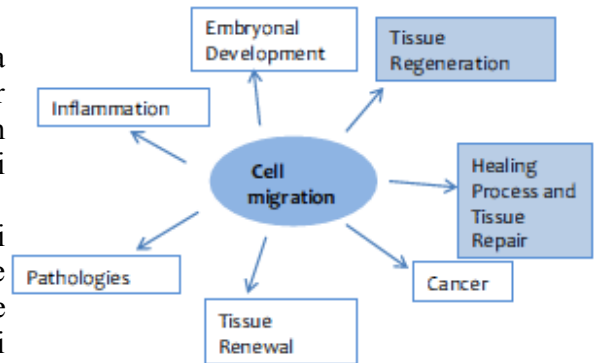
La migrazione cellulare gioca un ruolo centrale in una grande varietà di fenomeni biologici ed è cruciale per applicazioni tecnologiche come la tissue engineering, in quanto è fondamentale per la colonizzazione degli scaffold.

La migrazione rapida, lenta o inesistente su particolari substrati può essere spiegata mediante differenze quantitative nelle proprietà fisiche, chimiche e meccaniche, che influiscono su come le forze intercellulari sono generate e trasmesse all'ambiente. Differenze qualitative nel comportamento migratorio derivano da differenze quantitative in parametri che governano l'integrazione tra componenti molecolari.

La migrazione cellulare è molto importante anche nel determinare la struttura e la crescita di tessuti bioartificiali costruiti su scaffold. Per progettare scaffold con proprietà ottimali per ogni applicazione è fondamentale conoscere il meccanismo di migrazione cellulare e i fattori che lo modulano.

La *migrazione cellulare* è il processo mediante il quale le cellule si muovono da un luogo a un altro; possono essere adottate diverse modalità di moto, come la mesenchimale, l'ameboide o la migrazione collettiva. La mobilità cellulare si osserva in organismi unicellulari, è fondamentale per lo sviluppo e il mantenimento di organismi multicellulari ed è coinvolta nella risposta immunitaria e in patologie.

La migrazione **mesenchimale** riguarda una singola cellula ed è caratterizzata da un ciclo ben



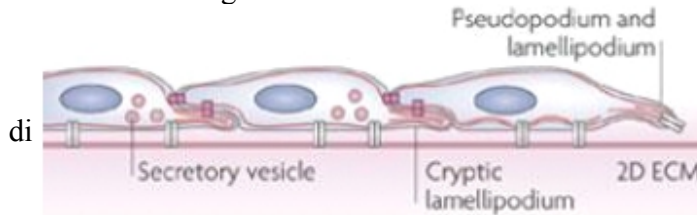
posteriore creano una pressione che spinge il citoplasma nella bolla crescente.

Il movimento ameboide può anche essere determinato dalla formazione di bolle multiple. Infatti un'elevata contrazione della cellula crea una pressione che viene rilasciata mediante bolle nella membrana: ogni bolla crea una piccola forza motrice, spingendo la cellula nella direzione di crescita della bolla stessa.

La migrazione **collettiva** presenta tre caratteristiche:

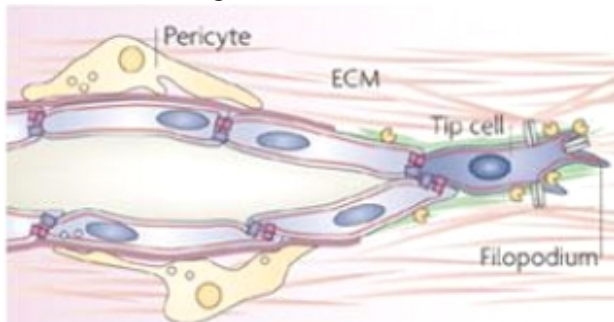
- le cellule rimangono fisicamente e funzionalmente connesse, in modo tale che durante il movimento si preserva l'integrità delle giunzioni cellula-cellula;
- l'organizzazione supracellulare del citoscheletro di actina genera le forze di trazione e protusione per la migrazione e mantiene le giunzioni cellula-cellula;
- spesso i gruppi di cellule in movimento modificano strutturalmente il tessuto sul percorso di migrazione (modifica dell'ECM).

Alcuni casi di migrazione collettiva:

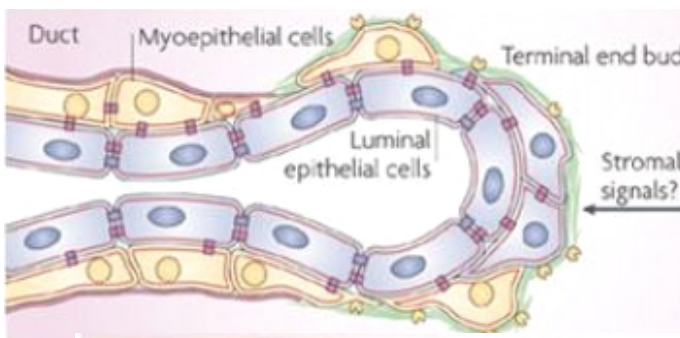


monstrato di cellule che si muove su un substrato bidimensionale. La migrazione è guidata da pseudopodi e lamellipodi ricchi actina e le cellule sono connesse mediante giunzioni aderenti. Le cellule interagiscono con la membrana basale, depositata in precedenza da vescicole di secrezione,

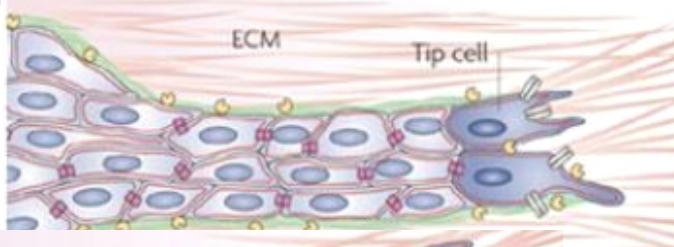
mediante le integrine nei contatti focali.



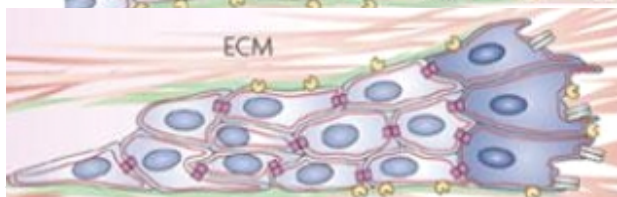
Vascularizzazione in vasi di nuova formazione o in via di riparazione. Una cellula di punta con protusione di filopodi guida la migrazione e una membrana basale depositata sia da cellule endoteliali che da periciti serve come guida.



Sviluppo della ghiandola mammaria.



Invasione di masse di cellule malamente differenziate nel cancro.



Invasione collettiva di cellule di cancro staccate

stoppa la migrazione, ma permette alle cellule di ripolarizzarsi e di migrare in una nuova direzione. La tipica sequenza di attività della cellula implicate in CIL è:

1. contatto cellula-cellula;
2. inibizione delle attività protusive della cellula nella zona di contatto;
3. generazione di nuove protusioni lontano dal sito di contatto;
4. migrazione nella direzione delle nuove protusioni.

La sequenza può essere modificata da diversi fattori. Essa si osserva soprattutto quando due cellule individuali (per es due fibroblasti) si scontrano. Nei cluster di cellule, CIL inibisce la formazione di protusioni in quelle più interne.

PROGETTAZIONE SCAFFOLD: COMPOSIZIONE CHIMICA

Si è già detto che lo scaffold deve essere biodegradabile; un'altra caratteristica fondamentale è che sia bioattivo. Ciò significa che la sua composizione deve dare precise informazioni alle cellule. Per costruire uno scaffold istruttivo si osserva l'ECM naturale.

L'ECM naturale si presenta come un network eterogeneo di macromolecole biologiche con una gerarchia strutturale: i costituenti molecolari dell'ECM si legano specificatamente alle cellule, ad altre molecole della matrice e ai fattori solubili. La comunicazione è regolata a livello spaziale e in una determinata sequenza temporale. L'ECM influenza direttamente le cellule (tramite ligandi di adesione cellulare) e indirettamente (tramite le sue proprietà fisico-chimiche). La segnalazione avviene durante l'omeostasi del tessuto sano, durante l'embriogenesi e durante i processi di rigenerazione. I segnali molecolari dell'ECM sono:

- macromolecole insolubili idratate (per es collagene, elastina, laminina, fibronectina, proteoglicani idrofili);
- macromolecole solubili (fattori di crescita, chemocine, citochine);
- proteine della superficie delle cellule adiacenti.

Per studiare le interazioni cellula-matrice sono necessari dei modelli, che si dividono in 2 tipi:

- *monocomponenti*: contiene le proteine tipiche del tessuto interessato;
- *multicomponenti*: matrici derivate da cellule o tessuti. Ne è un esempio la matrice da membrana basale Matrigel: è un idrogel derivato dal sarcoma di topo. Non è un modello specifico, in quanto non può essere usato per tutti i tessuti, ed è un modello animale. Un altro esempio è il processo che si usa per ottenere una ECM cardiaca umana: si fa una biopsia del tessuto cardiaco, dalla quale si estraggono le cellule. Si mettono in coltura i fibroblasti cardiaci e si vede che dopo qualche settimana depongono una ECM con la stessa composizione di quella cardiaca. Se la biopsia era di un cuore patologico, i fibroblasti producono ECM patologica. Con questa tecnica, dunque, si possono ricavare modelli sia di tessuto sano che di tessuto malato.

Si inseriscono dei segnali biomimetici nei materiali per gli scaffold sulla base dello studio della ECM naturale e/o di suoi modelli. L'ECM:

- è costituita da proteine ed eteropolisaccaridi;
- degrada per interazione con le cellule (rimodellamento);
- ha proprietà meccaniche variabili a seconda del tessuto;
- ha la capacità di rilasciare fattori di crescita in risposta a stimoli biologici;
- ha una struttura fibrillare (proteine fibrose);
- contiene una grossa quantità di acqua (liquido interstiziale).

Segnali biomimetici per gli scaffold:

- presenza di network di nanofibre. L'effetto può essere ottenuto mediante:
 - *elettrospinning* (o elettrofilatura): è applicabile a tutti i polimeri. Si processa il materiale tramite una siringa e con una imposizione di una differenza di potenziale tra essa e il

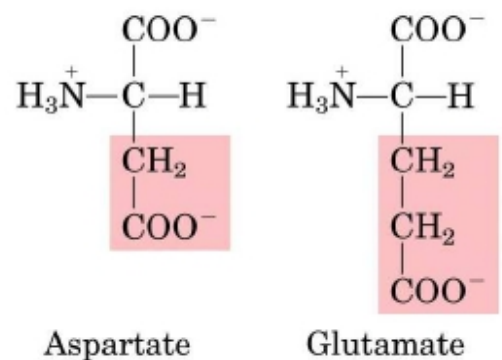
idrogeli possono essere:

- fisici → interazioni secondarie tra catene;
- chimici → catene legate covalentemente.;
- presenza di ligandi insolubili. Senza ligandi, le cellule non sopravviverebbero sullo scaffold. Servono sia peptidi che interagiscano con le integrine, sia peptidi che interagiscano con altri tipi di recettori (per es quelli proteoglicanici, eparin-binding-peptides);
- materiali biodegradabili. Una degradazione biomimetica è attivata dagli enzimi;
- rilascio di molecole bioattive. Si possono inserire fattori di crescita all'interno o sulla superficie dello scaffold. Lo scaffold li può rilasciare per diffusione oppure per degradazione;
- proprietà meccaniche compatibili all'applicazione. Le caratteristiche meccaniche dell'ECM influenzano le funzioni cellulari. Per esempio si sono poste delle cellule mesenchimali su substrati con stessa composizione chimica, ma diversa rigidità. Le cellule su un substrato soft si sono differenziate in neuroni, quelle su un substrato intermedio in muscoli e quelle su un substrato rigido in osso. Non è chiaro se si siano differenziate tutte le cellule o se il substrato abbia stimolato solo le progenitrici;
- principi di morfogenesi. Servono fattori che stimolino la rigenerazione, cioè che stimolino le cellule staminali e inibiscano i fattori di riparazione. Le cellule staminali presenti spesso sono quelle dei tessuti adulti, che si trovano in regioni ben precise dei tessuti, dette *nicchie*. Le nicchie sono costituite da una ECM propria alla quale aderiscono le cellule. Sono presenti sia cellule staminali che cellule di supporto alla nicchia, che producono ECM e fattori di crescita. Sono presenti anche fattori solubili che derivano dalle cellule vicine e dalla circolazione sanguigna. Le cellule staminali nella nicchia possono essere quiescenti o attive, a seconda degli stimoli che ricevono. Una cellula attiva può o proliferare o differenziarsi. La cellula non risponde solo a stimoli locali, ma anche a stimoli sistemici (tramite la circolazione). ESAME!!!
- vascolarizzazione. Per indurre la formazione di una rete vascolare, lo scaffold deve avere una porosità adeguata, rilasciare fattori di crescita adatti, essere funzionalizzato con peptidi o proteine che stimolino adesione, proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali.

La strategia di base per ottenere materiali biomimetici e scaffold è quella di funzionalizzarli con legandi insolubili (integrine). Per le cellule ancoraggio dipendenti, la formazione dell'adesione è importante per la sopravvivenza. Una perdita di adesione provoca apoptosi: è importante che i legandi insolubili siano ben ancorati al substrato.

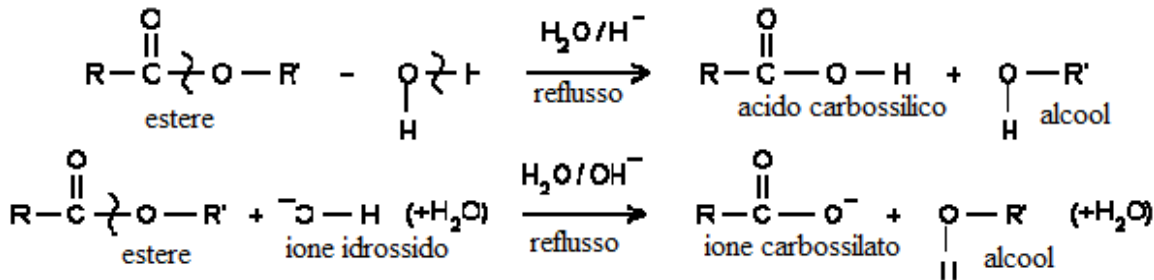
Le interazioni integrina – ligando sono determinate da vari fattori:

- il tipo di integrina;
- il tipo di ligando (sequenza amminoacidica). Tutti i ligandi hanno in comune un residuo esposto di acido aspartico o glutammico;
- presenza di cationi divalenti (le integrine dipendono dalla presenza di Ca^{2+}). Gli amminoacidi acidi hanno un gruppo carico negativamente a pH fisiologico e favoriscono l'interazione con i cationi;
- stato di attivazione dell'integrina.

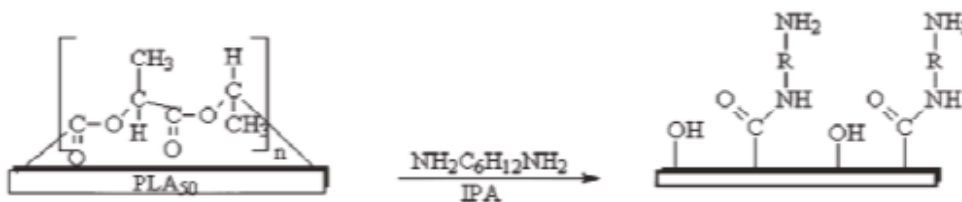


La funzionalizzazione degli scaffold può essere ottenuta mediante l'inserimento di peptidi o di proteine. C'è differenza tra i due! Le proteine hanno un alto peso molecolare, quindi forniscono tante informazioni (per esempio la fibronectina ha tante possibilità di interazione con le cellule), quindi non sono specifiche e vanno bene per tutte le cellule. Un peptide,

- treatments superficiali (chimici e fisici) per la modifica dei substrati polimerici: è l'ideale perché non si modifica il materiale in bulk, ma solo l'interfaccia. Ne esistono diversi:
 - etching*: idrolisi per trattamento in soluzione acida o basica. Si generano gruppi carbossilici o alcolici sulla superficie;



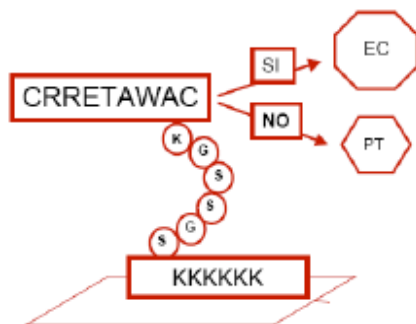
- amminolisi*: (per poliesteri) si usa una diammina per degradare il materiale. Si ottengono gruppi amminici e alcolici. Il trattamento può degradare la massa del polimero, quindi bisogna tenere sotto stretto controllo la temperatura e la concentrazione del reagente;



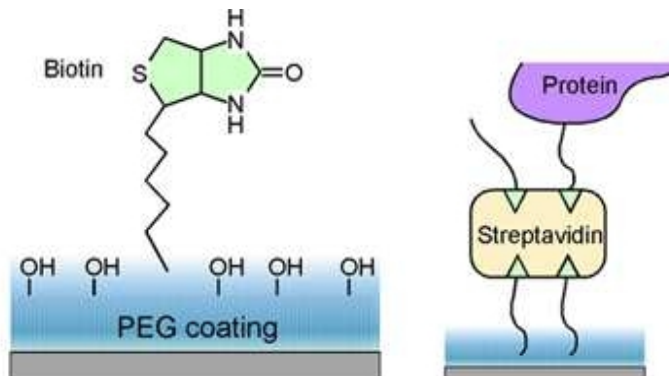
- trattamento al plasma*: si inserisce il campione in un reattore al plasma (→ gas stimolato da campi elettrici intensi). La superficie del campione reagisce formando radicali: se il gas non è inerte, i radicali si legano ad esso. Se il gas è inerte si introduce acido acrilico, che reagisce con i radicali. Sulla superficie si ottengono gruppi carbossilici.

Dopo la funzionalizzazione della superficie bisogna attaccare il peptide. Ciò può essere fatto per interazione elettrostatica, interazione di affinità o interazione covalente.

- Interazione elettrostatica: si usa un peptide con gruppi carichi. Per esempio la lisina (K) interagisce con carica negativa: uno spacer separa la lisina dal peptide bioattivo. Il CRRETAWAC favorisce l'interazione con le cellule endoteliali e sfavorisce quella con le piastrine.

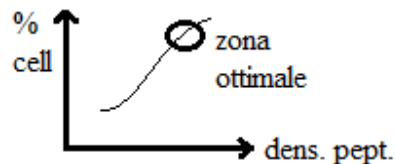


- Interazione avidina/streptavidina – biotina: la forza di legame tra biotina e streptavidina è la più forte tra le interazioni non covalenti. La biotina si lega al substrato, la streptavidina si lega ad essa e può legarsi ad altre molecole.
- Interazione covalente: dopo la

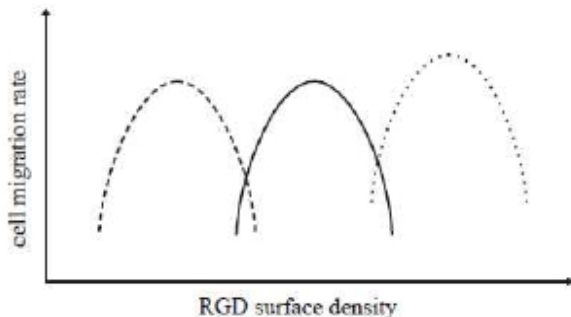


studio su RGD, ma il concetto vale per tutti):

- **attività del peptide:** è la sua capacità di interagire con le integrine. Al di fuori del contesto proteico, l'RGD può perdere la conformazione che presenta all'interno della proteina, perdendo dunque "attività". La sua attività viene preservata aggiungendo amminoacidi di affiancamento che ne facilitino l'assunzione di una conformazione simile a quella presente nelle proteine di adesione dell'ECM. Per esempio: $RGD < RGDS < GRGDSP$;
- **selettività del peptide:** la selettività di uno stesso peptide verso l'una o l'altra integrina dipende dalla conformazione. Dipende, quindi, anche dagli amminoacidi di affiancamento;
- **accessibilità del peptide:** anche se il peptide ha la conformazione adeguata, esso deve essere esposto correttamente. Per questo si usano sequenze *spacer* che consentono al peptide di essere esposto verso le cellule. La lunghezza degli spacer deve essere adeguata; se è eccessiva, si può raggomitolare (\rightarrow no adesione cellule) oppure le cellule avvertono di essere troppo distanti dal substrato (\rightarrow invio di segnali negativi \rightarrow cellula riduce adesione). Bisogna trovare la lunghezza ottimale tramite prove sperimentali (da studi, la lunghezza ottimale è 35 Å);
- **densità superficiale del peptide:** in genere all'aumentare della densità di peptide, l'adesione cellulare aumenta con un andamento sigmoidale. Si cerca di lavorare nella zona di densità ottimale;



- **distribuzione superficiale del peptide:** può essere omogenea o eterogenea. La presenza del peptide distribuito sulla superficie a formare aggregati (cluster) è risultata favorire l'adesione cellulare, fatto spiegabile tramite ragioni di biomimeticià (anche le integrine formano cluster).



La densità del peptide influenza anche la migrazione cellulare. Le densità superficiali di peptide che favoriscono il contatto focale, favoriscono anche la migrazione cellulare. Oltre un certo valore di densità superficiale di ligando, la cellula è stimolata ad avere un comportamento statico. Le condizioni che favoriscono il contatto focale, favoriscono anche la migrazione (presenza di peptidi in cluster, attivazione integrine, ecc).

Diverse integrine hanno un diverso effetto sulla migrazione cellulare, per esempio $\beta 1$ e $\alpha \beta 3$ danno segnali di migrazione. Questo significa che alcuni peptidi danno un'informazione specifica di migrazione. La direzione della migrazione cellulare è governata dalla distribuzione superficiale del peptide, in quanto le cellule si muovono verso una concentrazione crescente di peptide.

Non ci deve essere troppo peptide, altrimenti le cellule non migrano e non producono ECM.

Lo scaffold deve mantenere le caratteristiche di bioriconoscimento in vivo, dove c'è azione di *fouling* (il dispositivo assorbe le proteine dei fluidi biologici). Quando succede, le cellule "vedono" le proteine assorbite e non i peptidi inseriti da noi. Per questo si devono usare strategie anti-fouling: per esempio si inserisce uno spacer di polietilenglicol, formando molecole brush-like (a spazzola). Queste molecole devono essere fitte e lunghe per impedire l'adsorbimento delle proteine (rispettivamente, l'adsorbimento primario e quello secondario).

Per rafforzare la funzionalizzazione si possono anche inserire sequenze peptidiche per i

degradazione sono rimossi da attività cellulari. Vengono gradualmente rimpiazzati dal tessuto biologico;

- bioattivi → favoriscono interazioni dirette di tipo biochimico con il tessuto biologico, che può crescere sulla superficie del materiale stesso. Possono essere realizzati con l'immobilizzazione di biomolecole (proteine, peptidi, polisaccaridi). Se funzionalizzati con specifiche sequenze peptidiche (per es RGD) favoriscono l'adesione e la proliferazione cellulare; se funzionalizzati con sequenze peptidiche che sono attaccate dagli enzimi, si favorisce la biodegradazione durante la risposta infiammatoria.

La scelta di polimeri biodegradabili/biorisorbibili presenta molti vantaggi:

- non necessitano di essere rimossi con operazioni;
- offrono un supporto temporaneo per la rigenerazione dei tessuti;
- sono i carrier ideali per il rilascio controllato di farmaci;
- forniscono una migliore guarigione.

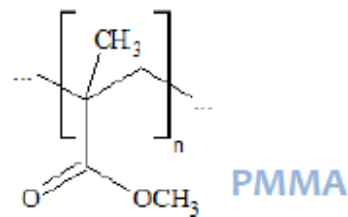
I requisiti dei polimeri per applicazioni biomediche sono:

- biocompatibili e non tossici (neanche i prodotti di degradazione devono essere tossici);
- processabili;
- sterilizzabili;
- completamente riassorbibili;
- stabilità meccanica;
- velocità di degradazione controllabile (deve essere appropriata alla velocità di rigenerazione del tessuto; inoltre, a una maggior velocità di degradazione corrisponde il rilascio di una maggior quantità di prodotti di degradazione a basso peso molecolare, potenzialmente tossici).

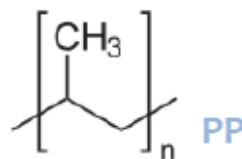
Alcuni polimeri usati per gli scaffold:

- sintetici:

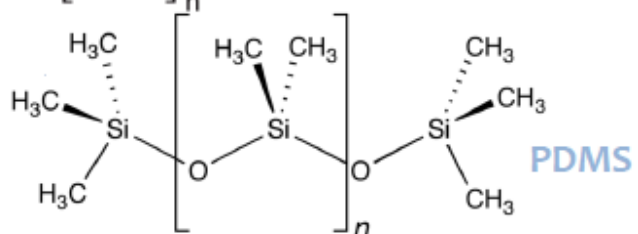
• Polycarbonates



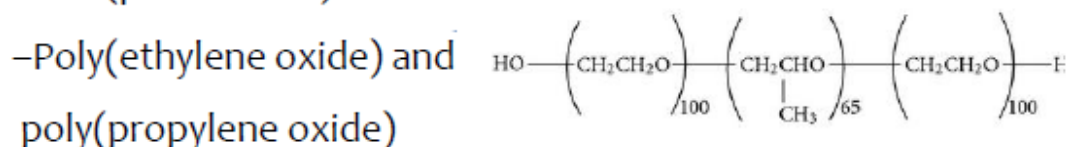
• Polyester



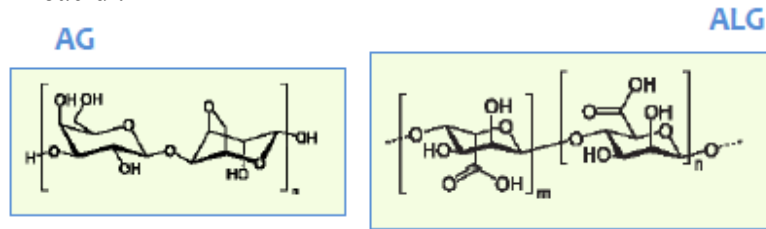
• Polysiloxane



• Pluronic (polaxomers)



- Polioidrossialcanoati, ottenuti per fermentazione batterica (rischio trasmissione patologie);
- alginato (ALG), viene estratto dalle alghe;
- agarosio (AG), insieme a ALG viene usato per gli idrogeli;
- poliamminoacidi.



Natural polymer	Curing method	Primary degradation method	Primary degradation products
Agarose	Entanglement	Enzymatic agarases	Oligosaccharides
Alginate	Cross-linking	Alginate lyases	Mannuronic acid and gulutonic acid
Hyaluronic acid	Entanglement	Enzymatic hyaluronidase	B(1-4) linked glucuronic acid and glucosamine
Chitosan	Cross-linking	Enzymatic chitosinase	Glucosamines
Collagen	Cross-linking	Enzymatic collagenase or lysozyme	Various peptides depending on sequence
Gelatin	Cross-linking	Enzymatic collagenases	Various peptides depending on sequence
Silk	Entanglement	Proteolytic proteases	Various peptides depending on sequence

I materiali bioartificiali combinano una componente sintetica e una naturale.

Uno scaffold viene reso funzionale tramite:

- **composizione chimica:** influenza l'adesione cellulare, la velocità di degradazione e le proprietà meccaniche. Le funzioni cellulari dipendono dal legame mediante le integrine, o dall'assenza di legame;
- **struttura:** le proprietà dello scaffold dipendono da:
 - percentuale di porosità (influenza il numero di cellule che possono essere contenute e la forza del materiale);
 - diametro dei pori (influenza il numero di cellule che possono aderire e la possibilità delle cellule di infiltrarsi nei pori);
 - diametro dei pori interconnessi;
 - orientazione dei pori (può guidare la crescita cellulare);
 - forma dello scaffold, che deve essere adatta al difetto;
- **velocità di degradazione:** non deve essere troppo rapida (altrimenti si perde il sostegno strutturale), né troppo lenta (altrimenti costituisce una barriera alla rigenerazione). I materiali sintetici sono facilmente modulabili, mentre per quelli naturali si cerca di ottimizzare la velocità mediante la reticolazione;
- **proprietà meccaniche:** sono correlate alla composizione chimica, alla struttura e in parte alla velocità di degradazione. Lo scaffold deve sopportare i carichi nel sito d'impianto e non

I metodi per la produzione di scaffold si dividono in convenzionali e non convenzionali. I metodi *convenzionali* sono semplici, poco costosi e poco ripetibili, in quanto non consentono un controllo stretto sulla morfologia e porosità del materiale.

Fabrication technique	Requirement for materials	Reproducibility	Scaffold architecture	Materials	Problems	Ref.
Impregnate/ Foaming and Sintering	Whithstand high temperature	Sensitive to sintering	Pore size: 200-1000µm, Porosity:>50%, Foam dependent	HA, TCP	Brittle	Lee and Kim, 1996; Wells et al., 1996; Meenan et al., 2000.
Solvent casting and particulate leaching	Soluble in non-toxic solvent	User and materials dependent	Pore size: 50-1000µm, Porosity: 30-90%	PLA, PLGA, collagen and so on	Particulate remanet	Chen et al., 2001; Miko et al., 1994
Phase separation emulsion in combination with freezing drying	Soluble in non-toxic solvent	Emulsion formation sensitive to stirring	Pore size: <200µm, Porosity: 70-95%	PLGA, PLA, PLLA and collagen	Pore size difficult to control	Whang et al., 1995; Zhao et al., 2002

Fabrication technique	Requirement for materials	Reproducibility	Scaffold architecture	Materials	Problems	Ref.
Fiber knitting/ non-woven bonding	Fiber	Machine control, solvent sensitive	Interconnected channels, 20-100 µm in diameter	PVA, PLA, PLGA	Lack of rigidity	Cooper et al., 2005; Ouyang et al., 2003.
Solid free form	Low melting point and thermoplastic	Computer control	Interconnected channels, complex shape and structure >150 µm, Costumer based	PEG, PLA, PLGA, Collagen, starch, HA, TCP	Costly	Calvert et al., 1998; Chu et al., 2002; Das et al., 2003; Hoque et al., 2005; Khall et al., 2005

I **metodi delle schiume** (foam methods) sfruttano polveri di materiali ceramici e introducono porosità nel sistema o tramite una sospensione o tramite un sol-gel. Nel primo caso, si inserisce un agente che crea porosità nella sospensione di polvere di vetro (per esempio H₂O₂, che ad alte temperature si dissocia in ossigeno, formando i pori). Con la sinterizzazione del materiale, l'agente porogeno viene rimosso. Lo stesso risultato si può avere introducendo nella sospensione dei monomeri e un catalizzatore, che formano un polimero in situ. Ad alte temperature il polimero viene rimosso. Un altro metodo ancora è quello di inserire una proteina (per esempio albumina), che forma dei coaguli, i quali verranno bruciati durante la sinterizzazione, lasciando al loro posto dei pori. Questi metodi producono porosità poco interconnesse. Si può sfruttare l'effetto sol-gel, ovvero il passaggio da una soluzione a un gel. In questo caso, la soluzione è un'emulsione di particelle di vetro e liquido. Controllando alcuni fattori (pH, T, durata reazione, concentrazione reagenti, invecchiamento, essiccazione) si forma un gel, dal quale si rimuove la parte liquida; infine si sinterizza. Anche in questo caso si ottengono pori poco interconnessi.

Il **metodo degli amidi** (starch consolidation) sfrutta la capacità degli amidi di assorbire tanta acqua. Dopo aver bruciato gli amidi e sinterizzato il materiale, si ottiene uno scaffold con porosità poco interconnesse in corrispondenza dei punti dove prima c'era l'amido.

Nel metodo di **burn-out di fasi organiche**, il porogeno è un componente organico (polimero), che

rimosso).

I *metodi non convenzionali* hanno tecniche di fabbricazione rapida. Si parte da un'immagine del paziente e se ne crea un modello. Si scompone il modello in strati, che vengono realizzati uno per uno. Infine si compone lo scaffold. È molto costoso perché si sfruttano vari passaggi e richiede tanto tempo. Si ottengono scaffold molto riproducibili e con elevata risoluzione (centinaia di nm). Le tecniche si dividono in 3 tipi: basate su laser, su augello o su stampaggio. Consentono di realizzare scaffold cellularizzati.

FUNZIONALIZZAZIONE SCAFFOLD CON PROTEINE

Le proteine si dividono in proteine dell'ECM e in proteine provenienti da altre fonti.

Tra le proteine dell'ECM si usano:

- collagene (e il suo derivato gelatina);
- fibronettina;
- elastina;
- fibrina;
- laminina;
- vitronettina.

Il **collagene** è la proteina più abbondante nei mammiferi (20-30% delle proteine totali). Grazie alle sue sequenze peptidiche è bioattiva (cioè comunica con le cellule, per esempio con le sequenze RGD e DGEA) e grazie alla sua struttura gerarchica ha delle buone caratteristiche meccaniche; inoltre è biodegradabile (degradazione da parte dell'enzima collagenasi). Tutte queste caratteristiche lo rendono un buon materiale per gli scaffold. Il collagene viene estratto dagli animali e poi purificato: è un processo delicato perché non si deve variare la sua struttura a tripla elica, cosa che rende questa proteina molto costosa (1 grammo costa circa 1000 euro). Va processato, ma non si possono usare alte temperature (altrimenti la proteina si denaturerebbe); viene processato in soluzione (mezzo acquoso a pH acido e alla temperatura di circa 4°C). Si possono ottenere scaffold porosi in collagene. Essendo idrofilico, il collagene tende a cambiare la sua struttura a pH fisiologico (si gonfia); inoltre si degrada facilmente. Per ovviare a questi due problemi viene rafforzato tramite reticolazione.

La **gelatina** è una proteina derivata dal collagene denaturandolo. Viene ricavata da materiale animale di scarto, quindi è poco costosa. Ha una buona biocompatibilità, è biodegradabile e non immunogenica. Ha basse proprietà meccaniche perché il collagene non ha più la struttura a tripla elica. Inoltre, mentre il collagene si scioglie solo a pH acido, la gelatina è solubile in breve tempo (qualche ora) anche a pH fisiologico. Per evitare che si sciolga e per migliorarne le proprietà meccaniche, la gelatina deve essere reticolata.

Esistono due tipi di gelatina, a seconda del processo con il quale viene ricavata.

Il *processo alcalino* sfrutta una base e si protrae per 30-100 giorni. Il collagene si denatura e si ottiene una proteina con struttura random coil. Questo processo viene usato per la gelatina di origine bovina e porta alla produzione di gelatina di tipo B, anche detta *gelatina acida* a causa delle sue proprietà. Questo tipo di gelatina, infatti, ha 5 come punto isoelettrico (→ pH a cui non c'è carica nel materiale). A pH fisiologico ha una carica negativa, dunque si comporta da acido.

Il *processo acido* viene usato su collagene suino; è un trattamento veloce (al massimo di qualche giorno) che sfrutta acidi molto forti (solforico, cloridrico). Si ottiene gelatina di tipo A, anche detta *gelatina basica* con punto isoelettrico pari a 9. In ambiente fisiologico ha carica positiva.

La gelatina viene lavorata in soluzione acquosa e la reticolazione è essenziale.

La **fibronettina** ha una struttura con due catene simili legate da due ponti disolfuro. Ha una serie di

- proteine adesive dei molluschi.

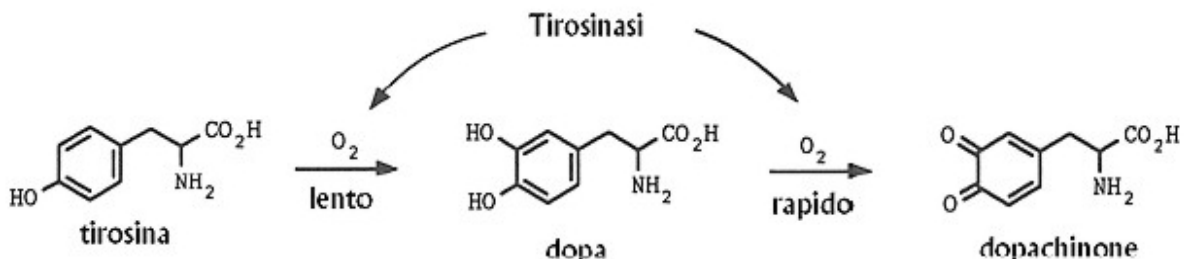
La **cheratina** è una proteina fibrosa molto resistente ed è la principale componente di corna, unghie e capelli. Ha una notevole resistenza meccanica grazie alla sua struttura reticolata (presenza di ponti disolfuro). Diversi tipi di cheratina hanno un diverso grado di reticolazione. La cheratina contiene la sequenza amminoacidica LDV, che stimola le interazioni con le integrine cellulari. È economica. Poiché è reticolata, la cheratina è difficile da lavorare. Bisogna svolgere un trattamento come quello della permanente. Per prima cosa si esegue un trattamento riducente che rompe i legami di reticolazione (i ponti disolfuro vengono trasformati in gruppi tiolo); in seguito si esegue un trattamento con un agente ossidante per riformare i legami con la forma desiderata.

La **seta** è una proteina fibrosa. Ne esistono vari tipi: la più usata è quella prodotta dalla specie *bombyx mori*. Un filo di seta è formato da diverse proteine: la parte esterna è composta da *sericina* (che va levata in quanto non ha una buona biocompatibilità), mentre l'interno da *fibroina della seta*, presente in diversi tipi (a catena lunga o a catena breve). Grazie alla sua struttura, la seta ha eccezionali proprietà meccaniche, essendo resistente e flessibile. La flessibilità è legata alla presenza di α eliche e β turn, mentre la resistenza è fornita da foglietti β antiparalleli (conformazione possibile grazie alla presenza di gruppi laterali con poco ingombro sterico). L'unità ripetitiva della fibroina è:
-G-S-G-A-G-A-



Dopo l'estrazione della proteina, si possono ricostruire i β sheet tramite trattamento in metanolo.

Le **proteine adesive delle cozze** mantengono l'adesione su qualsiasi tipo di substrato in ambiente acquoso e non statico, una condizione paragonabile a quella fisiologica. Una delle componenti principali di tali proteina è l'amminoacido **DOPA** (3,4-diidrossifenil-L-alanina), che presenta gruppi catecolo. Il DOPA si forma per ossidazione enzimatica della tirosina; a sua volta, il DOPA viene ossidato, con la formazione di DOPACHINONE (scompaiono i gruppi OH, restano gruppi carbossilici). In natura questo processo dipende dal pH marino, che è alcalino (circa 8). I substrati inorganici (anche quelli metallici) sono legati da DOPA mediante legami H; i substrati organici (anche i polimeri) sono legati da DOPACHINONE, che ha i gruppi C=O molto reattivi.



Si sintetizzano peptidi adesivi che contengano DOPA: vengono usati come gel iniettabili o come rivestimento reattivo per attaccare le molecole.

I tessuti animali sono la fonte principale di proteine e ciò può determinare vari problemi:

- possibile trasmissione di malattie;

- ruoli strutturali (cellulosa, chitina);
- riconoscimento cellulare e comunicazione intercellulare (mucopolisaccaridi).

Si possono usare polisaccaridi dell'ECM oppure estranei ad essa (derivati da funghi, alghe, piante o crostacei).

Componenti dell'ECM:

Componenti glucidici				
GAG	Unità disaccaride	Altri	Peso molecolare	Localizzazione nei tessuti
Acido ialuronico	•Acido D-glucuronico •N-acetil-D-glucosammina	-	Da 4000 a 8· 10 ⁵	Vari tessuti connettivi, pelle, corpo vitreo, cartilagine, liquido sinoviale.
Condroitin Solfato	•Acido D-glucuronico •N-acetil-D-galattosammina	D-galattosio D-xilosio	Da 5000 a 50000	Cartilagine, pelle, cornea, osso, arterie
Dermatan solfato	•Acido D-glucuronico o L-iduronico •N-acetil-D-galattosammina	D-galattosio D-xilosio	Da 15000 a 40000	Pelle, sangue, vasi, cuore, valvole cardiache
Cheratan solfato	•D-galattosio •N-acetil-D-glucosammina	D-galattosammina D-mannosio L-fucosio Acido sialico	Da 4000 a 19000	Cartilagine, cornea, disco intervertebrale
Eparan solfato				

I polisaccaridi derivati dalle alghe, come agar e alginato, non contengono sequenze adesive per le cellule, ma conferiscono altre proprietà come l'iniettabilità. Chitina, amido e cellulosa aumentano l'adesione cellulare grazie all'interazione con recettori non integrinici.

I polimeri naturali sono vantaggiosi per le loro proprietà di bio-riconoscimento, ma hanno scarse proprietà meccaniche e scarsa stabilità in ambiente acquoso. Per questo vengono sempre usati in combinazione con i polimeri sintetici, che hanno funzione strutturale e si degradano meno in fretta.

In certi casi si usa direttamente l'ECM come materiale base per uno scaffold (ne è un esempio il Matrigel). Si sfrutta la matrice del tessuto desiderato togliendone la componente cellulare. La tecnica di decellularizzazione si compone di due fasi: nella prima, si provoca la lisi delle cellule; nella seconda, si applica un detergente (enzimi) per eliminare i detriti cellulari. In questo modo si allontanano le cellule lasciando inalterata l'ECM. Gli svantaggi di questa tecnica sono il rischio di trasmissione di patologie, la possibile risposta immunitaria e il fatto che si ha uno scaffold già sagomato e non modificabile. Per ovviare a quest'ultimo problema, dopo la decellularizzazione l'ECM può essere trattata in una soluzione di enzimi. Si ottiene un gel che può essere processato, miscelato o usato come coating; rimane il rischio di trasmissione di malattie.

Si può usare l'ECM del paziente stesso: si prelevano cellule del tessuto desiderato che depongono l'ECM, che poi viene gelificata.

In certi casi si modifica solo la bagnabilità dello scaffold per favorire l'adesione cellulare.

TE in vivo con scaffold senza cellule → meglio funzionalizzare con peptidi (segnale per specifiche cellule).

- necessità di somministrazione locale, altrimenti potrebbero dare luogo a proliferazione incontrollata e quindi allo sviluppo di tumori;
- limitata stabilità chimico-fisica durante la messa a punto del sistema di rilascio e in fase di stoccaggio. Richiedono condizioni blande di trattamento (solventi acquosi, pH miti, T ambiente, ecc) altrimenti potrebbero disattivarsi.

Lo scaffold che include il fattore di crescita lo deve anche proteggere dalla degradazione. Una misura della suscettibilità dei fattori di crescita alla degradazione enzimatica è il tempo per il quale il 50% di essi diventa inattivo nel plasma sanguigno (2-20 minuti).

La progettazione del sistema di rilascio deve considerare il tempo di degradazione dei fattori di crescita e il tempo necessario a stimolare le cellule per avere una certa risposta biologica.

Un tempo i fattori di crescita venivano presi dagli animali, adesso invece si producono come proteine ricombinanti.

I sistemi di rilascio sono di 2 tipi:

- fattori di crescita adsorbiti sulla superficie di scaffold o microparticelle integrate in uno scaffold;
- fattori di crescita dispersi all'interno di scaffold o microparticelle integrate in uno scaffold.

In entrambi i tipi il fattore può essere libero o coniugato (cioè legato covalentemente).

L'*adsorbimento* è controllato dalle proprietà superficiali del materiale:

- bagnabilità superficiale;
- rugosità;
- carica e densità di carica;
- gruppi funzionali;
- area superficiale specifica (Area/Volume).

Le proprietà del mezzo contenente il fattore che ne influenzano l'adsorbimento sono:

- pH;
- forza ionica;
- presenza di altre proteine disciolte nel mezzo;
- concentrazione.

Per l'*adsorbimento diretto* lo scaffold viene immerso in una soluzione di fattori di crescita. Se la superficie non ha una buona idrofilicità, il fattore viene adsorbito ma viene denaturato perché i gruppi idrofobici interagiscono con il substrato, cambiandone la conformazione. Inoltre si adsorbe poco fattore che in vivo viene rilasciato tutto subito (*burst release*).

Per migliorare la situazione si può trattare la superficie variandone la bagnabilità ed evitando la denaturazione dei fattori. Meglio ancora è funzionalizzare lo scaffold con matrice dell'ECM, in particolare con GAGs: i fattori non vengono denaturati, ne viene caricata una dose maggiore e il rilascio è più progressivo. Spesso si usa eparina, che attira anche fattori endogeni.

Per caricare una maggior dose di fattore si può sfruttare la tecnica layer-by-layer, mettendo il fattore come layer. In questo modo si possono anche caricare diversi tipi di fattori. Il rilascio arriva ad un plateau che dipende dal numero di layers.

Se i fattori di crescita sono *dispersi nel materiale* bisogna usare condizioni di preparazione blande: per questo di solito si usano idrogeli con composizione simile all'ECM (collagene, laminina, eparina, ecc). Il rilascio dei fattori copre un periodo che va dai giorni alle settimane (si prolunga il rilascio tramite interazioni tra fattori e matrice: ioniche, elettrostatiche, idrofobiche o di affinità). È possibile incorporare i fattori prima della reticolazione oppure dopo.

L'uso di microparticelle polimeriche biodegradabili consente forme di dosaggio a unità multipla che facilitano la modulazione della dose: ogni microparticella contiene una certa quantità di fattore di crescita, quindi la dose di fattori dipende dalla quantità di microparticelle utilizzate. Inoltre si possono combinare microparticelle contenenti diversi fattori di crescita.

sono necessarie angiopoietina-1 e PDGF per stimolare la migrazione delle cellule degli altri strati dei vasi sanguigni. Per mimare questo meccanismo si possono usare varie strategie. Se si mettono diversi fattori di crescita in un idrogel non si riesce a modularne il rilascio, cosa che è possibile se invece si pone un fattore di crescita in microparticelle e uno direttamente nell'idrogel.

Sistemi commerciali con rilascio di fattori di crescita:

- colla di fibrina: usata come emostatico, sigillante e adesivo (approvata dalla FDA) e come veicolo per cellule e fattori di crescita;
- emdogain: miscela di proteine che induce le cellule mesenchimali a differenziare in tessuto parodontale;
- GEM 21S: matrice osteoconduttiva che contiene una proteina bioattiva (PDGF, agente naturale per la guarigione delle ferite). Promuove rigenerazione ossea, del cemento e del legamento parodontale;
- INFUSE bone graft: spugna di collagene contenente BMP-2;
- OP-1 implant: materiale osteoinduttivo che contiene una proteina osteogenica umana ricombinante e collagene bovino.

La terapia cellulare prevede l'inserimento di cellule in un mezzo fisiologico senza scaffold (in certi casi si usa un idrogel per aumentare la ritenzione delle cellule). Si vogliono usare le cellule per modulare il rilascio dei fattori terapeutici mediato dall'attività cellulare. La terapia cellulare viene usata in caso di malattie che facciano perdere un tipo di cellule in modo selettivo. Iniettando cellule si hanno risultati positivi legati al rilascio di fattori di crescita multipli e a dosi terapeutiche (effetto paracrino) da parte delle cellule iniettate, non per la loro integrazione con i tessuti.

Nella terapia genica le cellule sono modificate geneticamente per esprimere i geni che comportano la produzione di determinati fattori.

Spesso si usano piastrine prelevate dal paziente stesso (trattamento autologo): se attivate rilasciano varie combinazioni di fattori di crescita.

RILASCIO CONTROLLATO DI FARMACI

Un **farmaco** è una sostanza chimica (anche di natura biologica) la cui azione si espleta tramite il legame con specifici recettori; tramite il legame il farmaco induce modifiche funzionali, manipolando le normali funzioni regolatorie (sfrutta un recettore biologico per funzioni non biologiche). Le interazioni farmaco – recettore implicano una reazione chimica più o meno forte (in certi casi meno forte è meglio, in quanto l'azione del farmaco non deve avere una durata indefinita). Le interazioni più comuni sono quelle di tipo idrofilico/idrofobico (di tipo debole), ma possono anche essere covalenti o elettrostatiche (legame ionico o legame idrogeno).

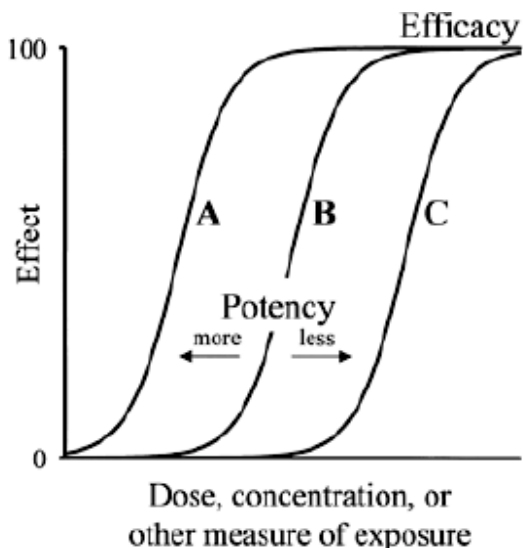
Un farmaco idrofobico si può fondere con la membrana e quindi entrare nella cellula.

Proprietà del farmaco:

- **specificità**: indica quanto un farmaco sia specifico per il proprio recettore. Dipende dalla dimensione, dalla carica e dalla forma della molecola. Non è necessario che sia elevata;
- **affinità**: forza del legame tra farmaco e recettore. È correlata al tipo di legame;
- **selettività**: azione che risulta dal legame tra farmaco e recettore. Dipende dal recettore, non dal farmaco.

Esistono diversi tipi di interazione tra farmaco e recettore:

- agonista: farmaco che espleta la sua azione in seguito a un legame che attiva uno specifico recettore;



L'**efficacia** è il valore del plateau: più è alto, più il farmaco è efficace.

La **potenza** è l'effetto del farmaco a una certa concentrazione. Più la curva è spostata verso alte dosi, minore è la potenza del farmaco.

Per quanto detto prima, gli antagonisti non competitivi sono meno efficaci degli agonisti.

Si definisce **TD 50** la dose di farmaco richiesta per ottenere tossicità nel 50% degli individui testati.

Si definisce **LD 50** la dose di farmaco letale sul 50% degli individui testati.

Bisogna specificare su quali animali si sono testati i valori di TD 50 e LD 50. Gli effetti tossici possono essere a breve o a lungo termine.

Si dice **emivita** ($t_{1/2}$) di un farmaco il tempo richiesto per ridurre del 50% la quantità di un farmaco nel plasma o nel sangue. Un farmaco si considera completamente eliminato dopo un tempo pari a 5 volte l'emivita.

Il **volume di distribuzione** è il rapporto tra la quantità di farmaco nel corpo e la concentrazione di farmaco nel plasma.

La **clearance** indica il volume virtuale di plasma che un dato organo è in grado di depurare da una certa sostanza nell'unità di tempo.

La **biodisponibilità** è la concentrazione del farmaco nella circolazione sistemica. La **biodisponibilità in un tessuto** è la concentrazione del farmaco in uno specifico tessuto rispetto a quanto inizialmente somministrato.

Esistono diverse vie di somministrazione:

- orale → non si può evitare il filtraggio del fegato, cosa che comporta una bassa biodistribuzione (10-50%);
- intravena → biodistribuzione iniziale del 100%;
- intramuscolare;
- sottocutanea;
- inalazione;
- transdermica → si passa attraverso il derma per raggiungere il circolo sanguigno;
- topica → si passa attraverso il derma con effetto localizzato;
- nasale → usata per mandare farmaci al cervello, altrimenti difficilmente raggiungibile;
- intra articolare → infiltrazione.

Le vie di eliminazione sono il fegato (via feci, è il principale) e il rene (via urine). Il farmaco viene eliminato in seguito a una trasformazione operata da enzimi, dal fegato o dal tratto gastro-intestinale. Tale trasformazione può essere un'ossidazione oppure una coniugazione. L'**ossidazione** (applicata a farmaci piccoli) rende il farmaco più idrosolubile mediante l'aggiunta di gruppi ossidrilici, cosa che garantisce una facile eliminazione attraverso l'urina. La **coniugazione** (applicata a farmaci grandi e liposolubili) rende un farmaco più idrosolubile attraverso la coniugazione con

opsonine sulla sua superficie e fa loro assumere la conformazione attivata. Le opsonine vengono riconosciute dai macrofagi, che eliminano le particelle. Per ovviare a questo problema si usa la *pedilazione*, cioè si riveste la superficie del carrier con PEG. Il PEG rallenta o impedisce l'adsorbimento delle opsonine attraverso un fenomeno di stabilizzazione sterica. Le catene di PEG, mobili e flessibili, rendono energeticamente sfavorevole l'adsorbimento delle proteine, impedendo il conseguente riconoscimento da parte dei macrofagi.

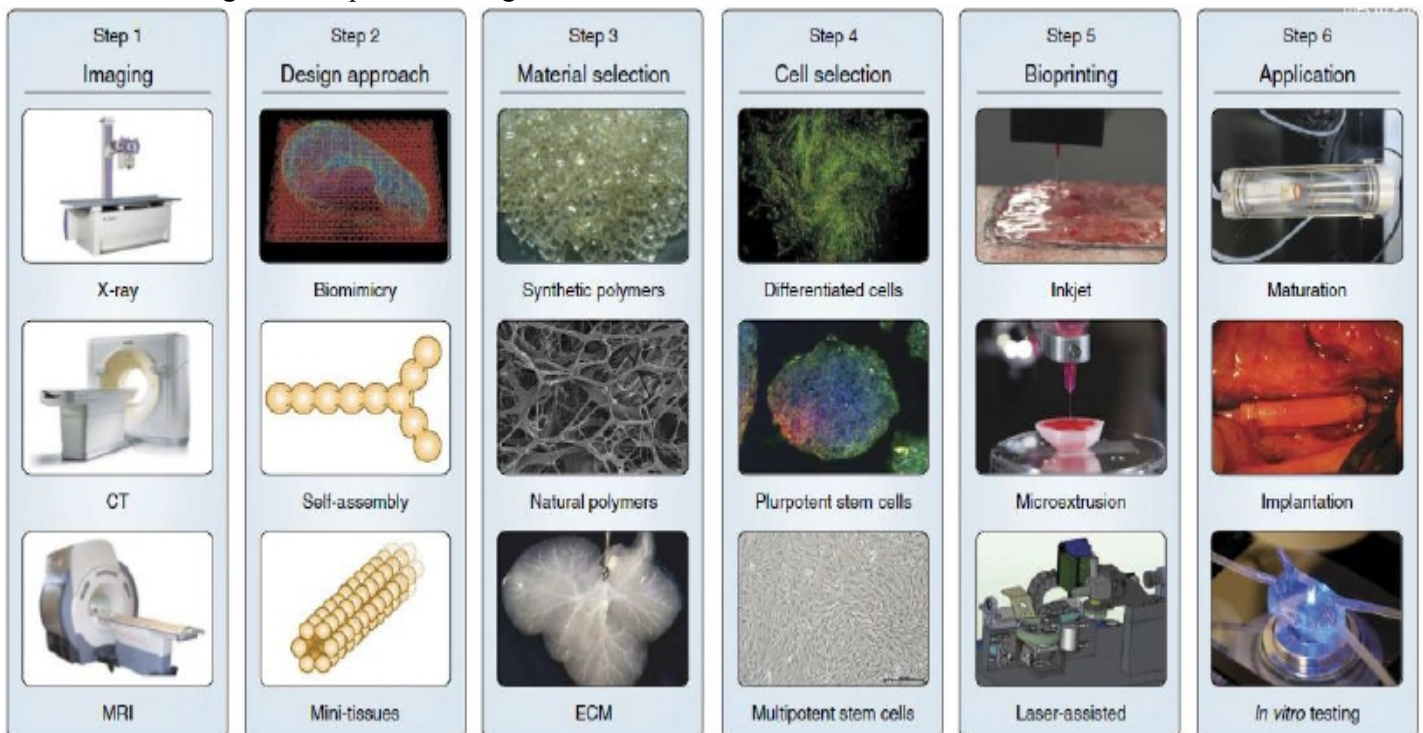
ORGAN PRINTING

L'organo printing consiste nell'applicazione di tecnologie rapide per prototipi (come la deposizione layer-by-layer di cellule o matrice) per ingegnerizzare nuovi tessuti o organi. Ha un approccio bottom-up, cioè si fabbricano strati successivi a partire dal fondo. Permette di avere elevati risoluzione e controllo e di costruire un organo con una geometria qualsiasi. Bisogna conoscere bene la modalità di sviluppo dei tessuti, in quanto una volta depositate, le cellule devono sviluppare il tessuto.

L'idea dell'organo printing è nata dal lavoro di Thompson, che ha dimostrato che quando il tessuto cardiaco viene tagliato in anelli, tali anelli si fondono in un unico tubo in grado di battere in modo sincronizzato. Il tessuto si riarrangia permettendo la rigenerazione senza stimoli esterni. Analogamente, se degli aggregati di cellule sono posti vicini in una matrice 3D, essi si fondono.

La procedura dell'organo printing può essere suddivisa in 3 parti:

- *preprocessing*: si disegna al computer la struttura da riprodurre (uso di CAD). La forma dell'organo può essere derivata da imaging o da modelli matematici;
- *processing*: fase di deposizione mediante stampaggio guidato dal computer o posizionamento layer-by-layer;
- *postprocessing*: fase in cui le cellule maturano e generano il tessuto. Bisogna perfondere l'organo stampato e fornirgli stimoli biomeccanici.



Preprocessing → step 1,2;
 processing → step 3,4,5;
 postprocessing → step 6.

Le cellule nella terapia cellulare possono essere:

- ➔ autologhe (dallo stesso individuo);
- ➔ allogeniche (da un individuo diverso);
- ➔ singeniche (da un donatore identico a livello genetico);
- ➔ xenogeniche (da specie differente).

Le cellule differenziate presentano diversi inconvenienti, come:

- limitata disponibilità di cellule differenziate autologhe;
- morbidità;
- limitata capacità proliferativa.

Le cellule staminali, invece, permettono di ottenere cellule differenziate allo scopo di mantenere l'omeostasi del tessuto o di compensare difetti insorti nel tessuto per patologie o traumi. Hanno elevato potenziale rigenerativo.

Una **cellula staminale** è una cellula non differenziata, capace di autorinnovamento (self renewal) e che può proliferare indefinitamente (in realtà un limite è l'ageing, cioè l'invecchiamento, che fa perdere funzionalità). Supporta lo sviluppo durante l'embriogenesi, l'omeostasi tissutale e la rigenerazione tissutale.

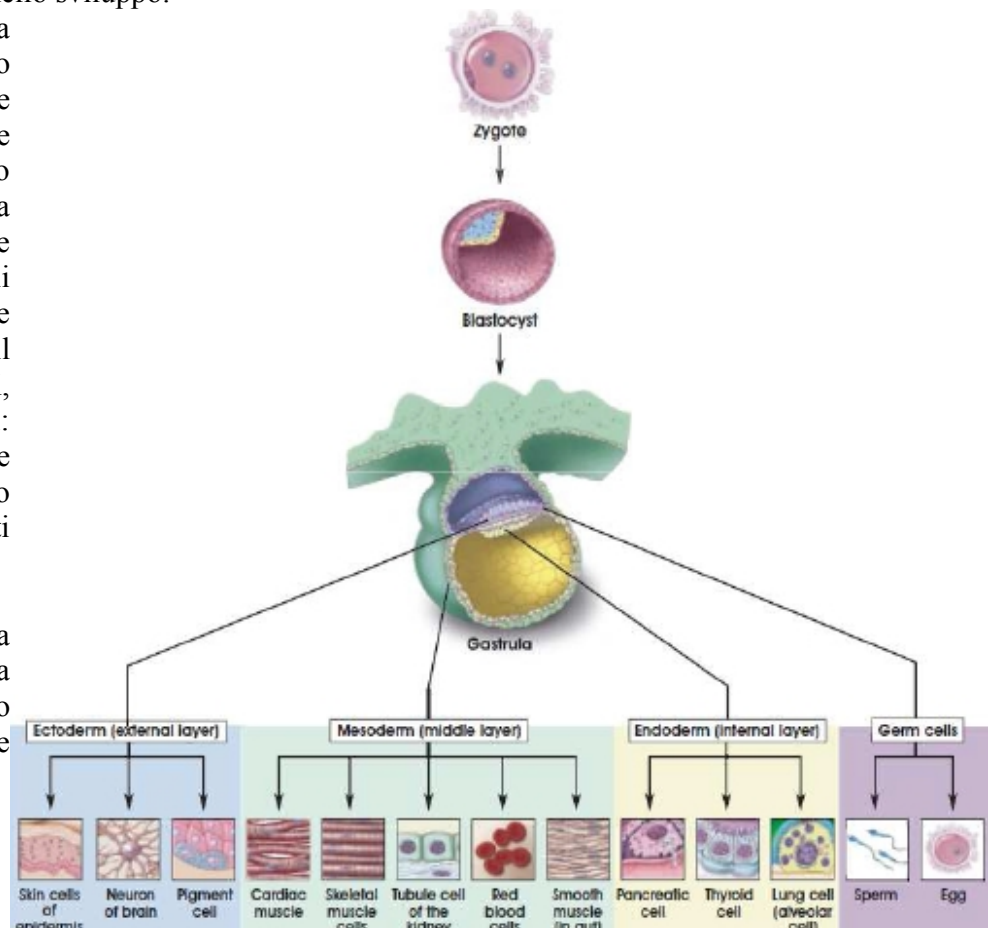
La **potenza** indica la possibilità di differenziamento:

- cellule *totipotenti* → possono dare origine a tutte le cellule dell'embrione e a quelle che supportano il suo sviluppo nell'utero. Si trovano nello zigote (cellula uovo fecondata);
- cellule *pluripotenti* → possono dare origine alle cellule dei tre strati germinali:
 - cellule staminali embrionali (ES);
 - cellule germinali embrionali (EG);
 - cellule del carcinoma embrionale (EC);
- cellule *multipotenti* → possono dare origine a un numero finito di cellule (per es cellule staminali dell'adulto);
- cellule *unipotenti* → si differenziano in un solo tipo cellulare maturo (cellule progenitrici).

La potenza si perde avanzando nello sviluppo.

Al quinto giorno dopo la fecondazione della cellula uovo si sviluppa la **blastocisti** tramite un primo differenziamento: le cellule dell'embrione si separano dalle cellule di supporto. La massa cellulare interna contiene un centinaio di cellule staminali embrionali, mentre l'altra parte (*trofoblasto*) costituisce il supporto. Nei giorni successivi, le ES si dispongono in 3 strati: endoderma, mesoderma e ectoderma. Da ciascuno strato derivano le cellule di tessuti diversi.

Le ES si possono ricavare dalla massa cellulare interna della blastocisti e possono differenziare in tutte le cellule dell'organismo.



- difficili da gestire;
- difficoltà di ottenere colture pure;
- possibilità di formazione di tumori e distruzione del tessuto;
- bisogna essere sicuri che il differenziamento sia perfetto;
- problemi di rigetto se non sono autologhe;
- problema etico.

Per quanto riguarda il problema etico, bisogna stabilire quando inizia la vita umana. Secondo alcuni inizia dallo zigote, per altri da quando il feto riesce a sopravvivere fuori dal ventre materno (7 mesi), per altri ancora alla nascita. Ogni paese ha una legge che regola questo aspetto. Nel Regno Unito la blastocisti non viene considerata un essere umano perché da sola non può sviluppare la vita, ma le serve anche il grembo materno. In Italia si possono generare solo 3 embrioni con la fecondazione in vitro e vanno tutti impiantati (cosa che comporta alti costi, pesante stimolazione ormonale per la donna e l'assenza di embrioni in più per la ricerca). Prima dell'entrata in vigore di questa legge si potevano fecondare più embrioni, quindi ne sono avanzati un po' che adesso sono intoccabili. Anche se non si possono produrre embrioni per l'estrazione di cellule staminali, si possono comunque acquistare all'estero. Negli Stati Uniti è possibile la ricerca responsabile e scientificamente condivisibile: è in atto un trial su Geron, una tecnica che usa ES pre differenziate in cellule neuronali che vengono iniettate per rimarginare danni recenti alla spina dorsale.

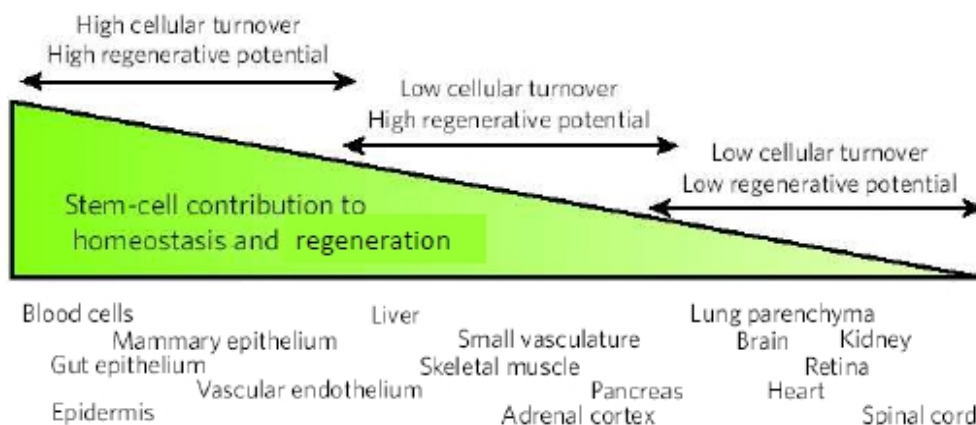
Zeemerman ha ottenuto un cerotto contrattile di tessuto cardiaco a partire da ES (esperimento su topi). Per fare lo stesso in umano si potrebbero usare iPS.

CELLULE STAMINALI DELL'ADULTO

Le cellule staminali dell'adulto sono presenti in tutti i tessuti: sono cellule non differenziate che vanno incontro ad un autorinnovamento a lungo termine (cioè con un numero infinito di cicli). In seguito a determinati stimoli possono differenziare, ma sono multipotenti, quindi possono differenziare solo in un numero finito di cellule (tutte le cellule mature di un dato tessuto).

Alcuni studi recenti stanno valutando la plasticità delle cellule staminali dell'adulto, ovvero la loro capacità di dare origine anche a cellule di altri tipi di tessuti.

La presenza di cellule staminali dell'adulto è legata alla capacità di rigenerazione di un dato tessuto, ma se ne sono trovate anche in tessuti che non rigenerano (→ tessuti perenni).

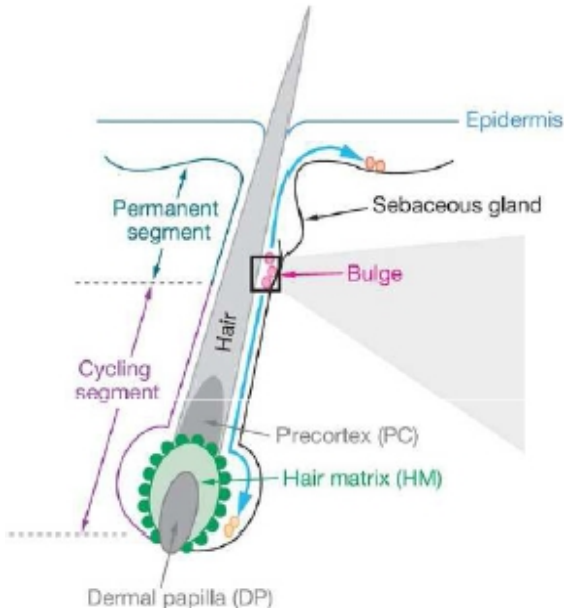


Le cellule staminali possono dare origine ad altre cellule staminali oppure differenziarsi in cellule progenitrici (cioè cellule staminali già indirizzate a diventare un particolare tipo di cellula). L'autorinnovamento delle cellule progenitrici è a breve termine.

Le prove della presenza di cellule staminali nei tessuti adulti sono state trovate mediante diverse esperienze, sia in vivo su animali che in vitro su uomo.

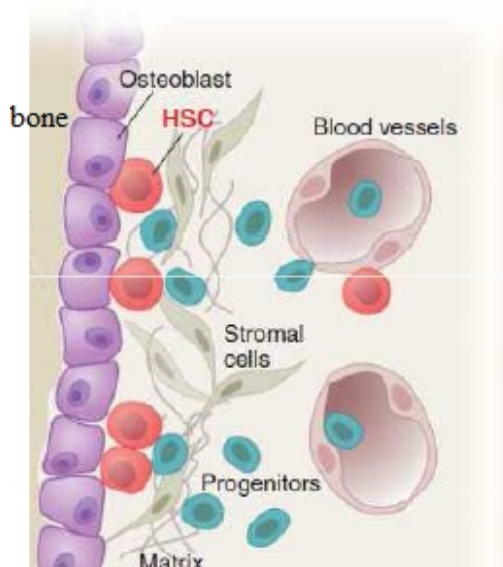
Per esempio si sono modificati geneticamente dei topi in modo che le loro cellule esprimano la

NICCHIA DELLE CELLULE STAMINALI DELL'EPIDERMIDE



Il bulge contiene le cellule staminali. Le progenitrici scendono fino al bulbo pilifero e lì diventano pelo. Se c'è un danno, le cellule staminali diventano progenitrici e migrano nella regione del danno.

NICCHIA DEL MIDOLLO OSSEO



Nel midollo osseo esistono dei microambienti in cui c'è un continuo signaling tra osteoblasti, cellule stromali, cellule staminali ematopoietiche, che ad esempio condizionano la capacità della cellula staminale ematopoietica di andare incontro ad una divisione asimmetrica.

Le nicchie, dunque, hanno una funzione importante nel mantenere la staminalità; inoltre, sono correlate all'invecchiamento. Quando invecchiamo diminuisce la capacità rigenerativa di organi e tessuti per una riduzione della capacità rigenerativa delle cellule staminali (come se ci fosse una riserva di cellule staminali che si va a depauperare progressivamente con l'età). In realtà, la nicchia in cui le cellule staminali risiedono ha un ruolo fondamentale nel mantenere l'efficienza in termini rigenerativi. Se si effettua un eterotrapianto e si inseriscono le cellule staminali di un individuo invecchiato in un microambiente giovane, le cellule ringiovaniscono. In realtà è sufficiente esporre una cellula staminale vecchia a una circolazione sanguigna giovane. L'invecchiamento riguarda sia le cellule che le molecole prodotte da esse: il tessuto non è più funzionale e si ha una maggior incidenza di tumori. L'invecchiamento è dovuto sia a fattori ambientali che a danni subiti dalle cellule (errori di replicazione del DNA). Cellule staminali vecchie possono provocare diversi tipi di alterazioni: potrebbero formare cellule progenitrici non funzionali; dare luogo a divisioni simmetriche in 2 cellule progenitrici (con riduzione della riserva di cellule staminali); potrebbe esserci un malfunzionamento delle cellule staminali; le cellule staminali potrebbero trasformarsi in

modificare per indirizzare il differenziamento sono:

- stimoli chimici;
- stimoli topografici;
- proprietà meccaniche.

I biomateriali devono incorporare dei segnali istruttivi per modulare le funzioni cellulari come proliferazione, differenziamento e morfogenesi. Per ottenere la bioattività, la superficie dei materiali può incorporare molecole di segnalazione, oppure lo scaffold può essere caricato con molecole solubili che vengono rilasciate e agiscono in maniera paracrina.

Le cellule possono essere impiantate a diversi livelli: o differenziate in modo parziale o differenziate in modo completo. Inoltre possono essere impiantate con o senza un supporto.

Problemi al rifornimento di cellule staminali:

- necessità di mantenere grandi quantità di cellule indifferenziate;
- tempo di raddoppiamento lungo per la maggior parte delle cellule staminali;
- quando coltivate in vitro le cellule staminali sono soggette al limite di Hayflick (c'è un limite al numero di volte in cui una cellula si può autorinnovare).

Attualmente nell'ambito della ricerca si usano idrogeli di origine animale per impiantare le cellule staminali estratte, ma per la prospettiva di un uso in umano si cercano materiali non di origine animale. Si vogliono ottenere materiali artificiali con le proprietà di un gel e con elementi di controllo che impediscano il differenziamento.

Se si usano le cellule staminali per il rilascio di un fattore o per l'espressione di un gene, si devono usare dei materiali adatti a veicolare le cellule nell'organismo e tali da mantenerle indifferenziate e con un'interfaccia tra cellule e organismo minima.

Le cellule staminali possono essere iniettate all'interno di una soluzione fisiologica, ma c'è il rischio che le cellule impiantate vengano perse a causa della citotossicità o della mancata integrazione delle cellule nel tessuto. Inoltre i siti di danni o patologie spesso presentano un ambiente ostile a stabilimento e proliferazione di cellule sane. Per superare questi limiti le cellule possono essere iniettate già aggregate in strutture più complesse: si risolve il problema della localizzazione delle cellule e si evita che esse subiscano uno stress troppo elevato.

I rischi correlati all'uso di cellule staminali sono la loro tumorigenicità (una proliferazione incontrollata porta alla formazione di teratomi) e la possibilità che si differenzino in altri tessuti e non nel tessuto voluto. Questi rischi possono essere ridotti usando materiali che forniscano i giusti stimoli alle cellule.

Stimoli biochimici: come si è già visto si sono sviluppate varie tecnologie per incorporare la funzione di drug delivery negli scaffold. Grazie alle nanotecnologie, inoltre, è possibile disperdere nanoparticelle nel volume del materiale. Le nanoparticelle presentano numerosi vantaggi:

- la velocità di rilascio del fattore può essere controllata scegliendo opportunamente il materiale della nanoparticella;
- il fattore può essere protetto dalla degradazione esterna;
- l'incapsulazione in una nanoparticella può risolvere problemi di incompatibilità di solventi tra il carico e il materiale dello scaffold.

Stimoli topografici: le cellule staminali sono influenzate dalla topografia per quanto riguarda le dimensioni, la conformazione e la simmetria.

Proprietà meccaniche: influenzano la biologia delle cellule staminali. Per esempio cellule staminali cresciute su tessuti rigidi tendono a promuovere la formazione di cellule ricche di fibre di actina.

SCAFFOLD PER TE DELL'OSSO (facoltativo)

Requisiti degli scaffold:

- biocompatibilità;
- biodegradabilità;
- osteoconduttività: lo scaffold deve fungere da impalcatura per le cellule ossee;
- osteoinduttività: lo scaffold deve indurre il differenziamento di cellule mesenchimali e preosteoblasti in osteoblasti;
- proprietà meccaniche;
- porosità: i pori devono essere interconnessi e tali che al loro interno possano aderire le cellule senza occluderli (macroporosità); inoltre devono esserci microporosità per favorire la crescita di vasi sanguigni;
- dimensione pori: 100-900 μm ;
- fabbricazione;
- possibilità di commercializzazione.

I materiali usati per gli scaffold possono essere ceramici, polimeri e loro compositi. Per la loro somiglianza all'osso umano si studiano i ceramici a base di fosfato di calcio. Ultimamente la ricerca è volta nella direzione dei vetri bioattivi, vetri che si legano al tessuto osseo o a altri tessuti. I vetri bioattivi possono avere diverse composizioni, i cui componenti di base sono SiO_2 , Na_2O , CaO e P_2O_5 . La capacità del vetro di formare legami si basa sulla rottura dei legami del Si, con la deposizione di uno strato ricco di CaP sulla superficie del vetro, che poi cristallizza in idrossiapatite. Le proprietà meccaniche dei vetri bioattivi non sono ottimali, per questo spesso vengono aggiunte componenti ceramiche. Inoltre la velocità di degradazione è molto bassa.

Gli svantaggi dell'uso di materiali ceramici o di vetri bioattivi sono la loro fragilità, la scarsa stabilità meccanica e la non prevedibilità del processo di degradazione (dipende da fattori in vivo, come l'attività degli osteoclasti).

I polimeri sintetici, invece, possono essere prodotti in condizioni controllate, quindi hanno proprietà fisiche e meccaniche predicibili e riproducibili (anche per quanto riguarda la velocità di degradazione). Per lo più si usano poliesteri alifatici, tra i quali il PCL è quello che degrada più lentamente. Velocità di degradazione: $\text{PGA} > \text{PDLLA} > \text{PLLA} > \text{PCL}$.

Si usano anche polimeri naturali, come polisaccaridi e peptidi. Sono biocompatibili e biodegradabili tramite degradazione enzimatica (quindi non predicibile). Non hanno elevate proprietà meccaniche: per migliorarle e per aumentare la stabilità in ambiente acquoso questi polimeri vengono reticolati.

Spesso si mima l'osso naturale formando materiali compositi dall'unione di polimeri e ceramici.

Tecniche di fabbricazione:

- solvent casting/particulate leaching: si prepara una soluzione di polimero e vi si aggiunge un agente porogeno. Si deposita la soluzione in un disco di Petri e si fa evaporare il solvente, ottenendo un film compatto. Tale film viene posto in acqua per allontanare il porogeno. Con questa tecnica si possono ottenere solo membrane spesse fino a 3 mm, ma non strutture 3D. La dimensione dei pori dipende dal porogeno;
- separazione di fase: può essere indotta da temperatura, diffusione di liquido o vapore oppure da una reazione;
- fiber bonding: si pongono delle fibre in un disco di Petri ed esse si legano tra loro, formando una struttura 3D con porosità interconnesse. Non si riescono a controllare la dimensione dei pori e le proprietà meccaniche;
- high pressure processing: la pressione viene prima alzata, poi abbassata, facendo penetrare l'anidride carbonica nel materiale e creando le porosità. Si possono ottenere scaffold con il 93% di porosità e con dimensione dei pori nel range di 100 μm , ma con basse proprietà meccaniche, una superficie non porosa e pori non interconnessi;
- foam methods;

Il SNP è formato da nervi che si diramano dal cervello e dal midollo spinale. I nervi formano la rete di comunicazione tra il SNC e le parti del corpo. In base alla loro funzione i neuroni vengono classificati in:

- *neuroni motori* (efferenti): SNC → periferia. Hanno dendriti corti e assoni lunghi;
- *neuroni sensoriali* (afferenti): periferia → SNC. Hanno dendriti lunghi e assoni corti.

Un neurone è formato da:

- corpo cellulare (soma): svolge le funzioni vitali della cellula ed elabora le informazioni. Non ha i centrioli;
- dendriti: rami che ricevono i segnali dalle altre cellule;
- assone: trasmette il segnale elettrico prodotto dal soma. Può avere una guaina mielinica oppure no;
- sinapsi: terminali d'uscita. Rilasciano i neurotrasmettitori.

La trasmissione del segnale è unidirezionale: si parla di polarizzazione della trasmissione del segnale.

Le funzioni dei neuroni sono:

- ricevere informazioni;
- processare informazioni;
- condurre il segnale;
- trasmettere il segnale;
- coordinare l'attività metabolica in modo da mantenere l'integrità della cellula.

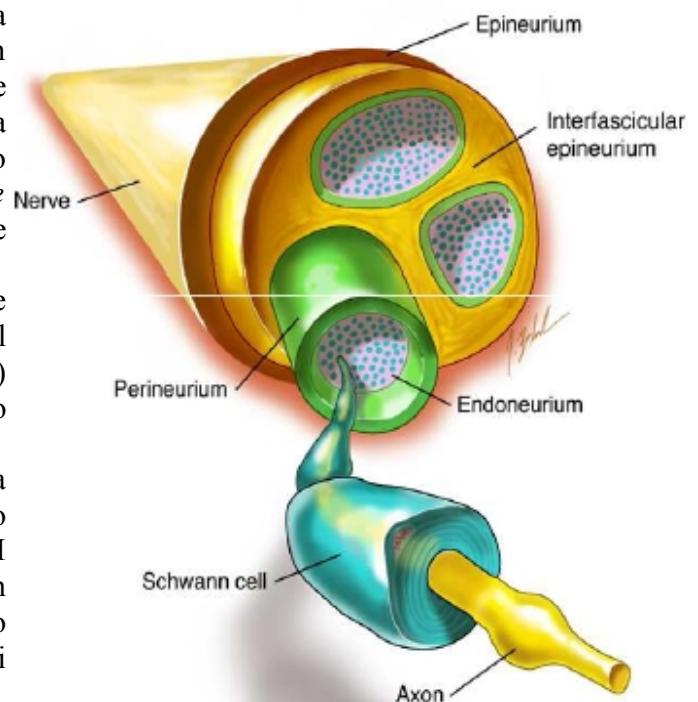
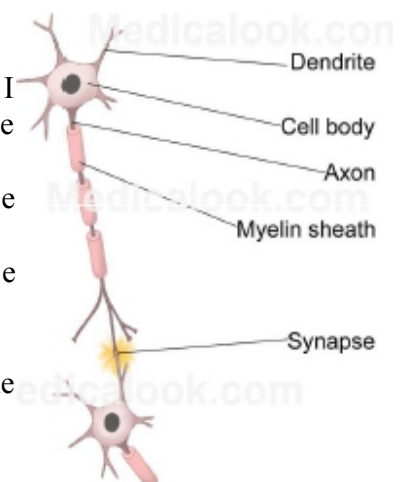
La *guaina mielinica* è una membrana plasmatica molto estesa che si avvolge a spirale intorno agli assoni. Nel SNP è prodotta dalle cellule di Schwann. È composta al 40% da acqua; la massa secca è composta per il 70-85% da lipidi e per il 15-30% da proteine. È un isolante elettrico che consente agli impulsi di essere trasmessi velocemente. La guaina mielinica è interrotta dai nodi di Ranvier: l'impulso elettrico salta da un nodo all'altro a una velocità di 120 m/s (*conduzione saltatoria*). Inoltre la guaina mielinica protegge meccanicamente gli assoni e fornisce apporti nutritivi.

Gli assoni normalmente hanno un diametro dell'ordine di 1-20 μm: conducono gli impulsi elettrici lontano dal corpo cellulare. Il citoplasma al loro interno (axoplasma) contiene nutrienti. Gli assoni mielinici raggiungono lo spessore di 2000 nm.

I nervi sono fasci di fibre cilindrici, costituiti da migliaia di assoni. L'*epinervio* è uno strato di tessuto connettivo denso che copre la superficie esterna del nervo. I *fascicoli* sono insiemi di 10-100 assoni racchiusi da un *perinervio*, uno strato di tessuto connettivo formato prevalentemente da fibre di collagene. I fascicoli contengono sia assoni mielinici che amielinici.

Gli assoni mielinici sono circondati da:

- tubo endoneurale (membrana basale delle cellule);
- strato di Schwann (neurolemma): citoplasma delle cellule gliali che circonda l'assone e la guaina mielinica;
- guaina mielinica.



- un adeguato apporto di nutrienti.

In caso di neurotmesi non si può attuare una completa rigenerazione spontanea funzionale e strutturale a causa della formazione di tessuto cicatriziale, di mancata connessione tra i due target o della formazione di un neuroma. Bisogna intervenire chirurgicamente; vi sono due approcci:

- approccio manipolativo: si usa se gap < 2 mm. Consiste nell'unione dei due monconi mediante sutura a livello di epinervio (rischio di mancate connessioni) o di perinervio (rischi: materiale estraneo nell'epinervio, formazione di tessuto cicatriziale);
- bridge operation: si usa se gap > 2 mm. Si inseriscono dei ponti tra i due monconi. Tali ponti possono essere un muscolo in una vena, un autograft, un allograft, uno xenograft o una guida artificiale.

Le strutture a ponte dirigono la crescita neuronale, forniscono supporto meccanico e impediscono infiltrazioni di altri tessuti.

Come ponte si può usare un segmento di vena riempito con un muscolo scheletrico, che evita il collasso della vena stessa sul nervo. Il muscolo e la vena sono presi entrambi dal sito del danno al nervo. La tecnica ha le seguenti caratteristiche:

- c'è abbondanza di entrambi i tessuti donatori;
- il condotto è flessibile;
- non ci sono costi aggiuntivi;
- adatto solo per difetti < 3 cm.

Gli autograft rappresentano il gold standard per la rigenerazione dei nervi periferici. Funzionano come substrato guida e forniscono fattori trofici. I problemi connessi sono la limitata quantità di nervi donatori, il poco successo (solo il 40-50% dei pazienti mostra benefici funzionali), la necessità di un secondo intervento per ottenere il nervo donatore, possibili deformità secondarie.

Allograft e xenograft hanno la limitazione di richiedere un'immunodepressione a lungo termine per evitare il rigetto. Questo rende i pazienti soggetti a infezioni e alla formazione di tumori.

Si può avere un approccio ingegneristico usando degli scaffold con l'introduzione di cellule e/o fattori di crescita o biomolecole.

I condotti guida per nervi (NGC, nerve guidance channel) sono graft artificiali che fanno da ponte tra i monconi di nervo e dirigono e supportano la rigenerazione dell'assone. Funzioni dei NGC:

- fornire una guida fisica per gli assoni;
- impedire la crescita di tessuto cicatriziale nel gap;
- promuovere una buona rigenerazione del nervo periferico.

Gli NGC hanno i seguenti vantaggi:

- riducono l'invasione di cellule e la cicatrizzazione del tessuto;
- concentrano i fattori neurotrofici;
- forniscono una guida per prevenire la formazione di un neuroma e un'eccessiva diramazione.

Lo scaffold deve avere i seguenti requisiti:

- biocompatibilità;
- biodegradabilità;
- non si deve gonfiare troppo durante la degradazione per evitare l'occlusione del lume per la rigenerazione e la compressione dell'assone rigenerato;
- permeabilità ai nutrienti e allo scambio di gas;
- proprietà biomeccaniche (modulo di Young simile a quello del tessuto nervoso);
- flessibilità;
- superficie interna liscia per prevenire la dispersione dei fascicoli attraverso il lume;
- peptidi, fattori di crescita e cellule di Schwann per stimolare la rigenerazione nervosa;
- facile da fabbricare e da sterilizzare;
- semplice da impiantare nel corpo tramite tecniche microchirurgiche.

questo ruolo sono le cellule di Schwann, le cellule staminali neurali, cellule staminali embrionali, cellule mesenchimali.

Le cellule di Schwann sono le cellule gliali principali nel SNP e giocano un ruolo essenziale per la sopravvivenza e la funzionalità dei neuroni. In risposta a un danno ai nervi, le cellule di Schwann subiscono un rapido cambio di fenotipo e la loro lamina basale fornisce un condotto per la ricrescita dell'assone. Producono anche una grande quantità di diversi fattori di crescita. Inoltre possiedono la capacità di fagocitosi nell'iniziale processo di pulizia dei detriti. Le loro fonti possono essere allogeniche, singeniche o autologhe. Il loro uso comporta alcuni limiti: tanto tempo per la proliferazione ex vivo (almeno 3 settimane), il processo è costoso in termini di tempo e fatica, ci possono essere contaminazioni. Le cellule possono essere inserite negli NGC tramite iniezione nel lume in assenza di una struttura di supporto, tramite un idrogel o tramite inserimento direttamente nelle fibre degli NGC.

Le NSC (neural stem cell) sono cellule multipotenti che si trovano nel sistema nervoso durante tutta la fase dello sviluppo e anche durante la vita adulta. Possono differenziarsi in neuroni, astrociti, oligodendrociti e cellule di Schwann. Possono proliferare illimitatamente e subire una rapida espansione in seguito a un danno dei nervi. Le proprietà delle NSC includono il differenziamento multipotenziale, una forte plasticità, un'alta abilità di migrazione, facili isolamento e coltura in vitro e bassa immunogenicità.

Per quanto riguarda la terapia molecolare, i fattori di crescita più usati per la TE del nervo sono:

- fattori neurotrofici:
 - NGF (nerve growth factor): aumenta il numero di assoni mielinici e lo spessore della loro guaina;
 - BDNF (brain-derived neurotrophic factor): favorisce la crescita dell'assone, ma deve essere somministrato localmente e in alte concentrazioni;
 - NT-3 (neurotrofina – 3);
 - NT-4/5 (neurotrofina- 4/5);
- altri fattori di crescita con azione neurotrofica:
 - GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor);
 - CNTF (ciliary neurotrophic factor);
 - FGF (fibroblast growth factor): promuove angiogenesi;
 - (IGF)-I (insulin-like growth factor);
 - VEGF (vascular endothelial growth factor);
 - LIF (leukemia inhibitory factor);
 - PDGF (platelet-derived growth factor);
 - ormoni tiroidei.

I fattori di crescita devono essere somministrati localmente per garantire un effetto adeguato con poche reazioni avverse, in quanto i fattori hanno un'alta attività biologica, emivite brevi, lenta penetrazione nei tessuti e potenziale tossicità ad alti livelli sistemici. La somministrazione può avvenire tramite:

- fattori solubili nel lume vuoto degli NGC;
- iniezioni ripetute;
- dalle pareti degli NGC;
- microsfe;
- da matrici nel lume degli NGC;
- strategie basate sui geni.