

**ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA**  
**CAMPUS DI CESENA**  
**SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA**  
**CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

**Stampa 3D di un idrogelo PEG-peptide  
contenente cellule mesenchimali staminali  
per la realizzazione di costrutti tissulari  
osteo-cartilaginei.**

Elaborato in  
Biochimica

Relatore  
Dott. Emanuele D. Giordano

Presentato da  
Giulia Martinelli

Sessione II

Anno Accademico 2015/2016

# INDICE

|   |    |
|---|----|
| ABSTRACT .....  | 4  |
| 1 INGEGNERIA DEI TESSUTI.....   | 5  |
| 1.1 Cellule .....   | 6  |
| 1.1.1 Cellule staminali.....  | 6  |
| 1.1.2 Colture cellulari .....   | 9  |
| 1.2 Scaffold .....  | 10 |
| 1.3 Condizionamento biochimico e fisico .....                           | 13 |
| 1.4 Molecole segnale.....   | 14 |
| 1.5 Limiti.....   | 17 |
| 2 BIOMATERIALI.....   | 19 |
| 2.1 Biomateriali naturali .....   | 20 |
| 2.1.1 Biomateriali con struttura proteica .....                         | 21 |
| 2.1.2 Biomateriali con struttura polisaccadrica .....                   | 22 |
| 2.2 Biomateriali sintetici.....   | 23 |
| 2.2.1 Biomateriali a struttura peptidica .....                          | 23 |
| 2.2.2 Biomateriali a struttura ceramica .....                           | 24 |
| 2.2.3 Biomateriali a struttura polimerica .....                         | 24 |
| 2.3 Glicole polietilenico .....   | 26 |
| 3 TECNICHE DI MANIPOLAZIONE E APPLICAZIONI ALTERNATIVE<br>DEL PEG ..... | 28 |
| 3.1 Polimerizzazione .....  | 28 |
| 3.1.1 Polimerizzazione per condensazione .....                          | 28 |
| 3.1.2 Polimerizzazione per addizione.....                               | 28 |
| 3.2 Idrogeli .....  | 30 |
| 3.2.1 Idrogeli a base PEG .....   | 31 |
| 3.3 Biodegradazione del PEG .....                                       | 32 |
| 3.4 Bioattività del PEG.....  | 34 |
| 3.4.1 Peptidi per adesione cellulare (CAP).....                         | 34 |
| 3.4.2 Fattori di crescita (GF) .....                                    | 34 |
| 3.5 Dimensione pori e estensione porosità .....                         | 35 |
| 3.5.1 Particle leaching.....  | 36 |
| 3.5.2 Gas foaming.....  | 36 |
| 3.6 Vascolarizzazione.....  | 37 |
| 3.7 Applicazioni alternative del PEG: detossinazione e drug delivery    | 38 |
| 3.7.1 Detossinazione .....  | 38 |
| 3.7.2 Drug delivery .....   | 41 |
| 4 CASO DI STUDIO.....   | 46 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 4.1   | Introduzione al caso di studio .....                             | 46 |
| 4.2   | Cellule mesenchimali staminali .....                             | 46 |
| 4.3   | Tessuto osseo .....  | 48 |
| 4.4   | Tessuto cartilagineo.....  | 48 |
| 4.5   | Differenziamento osteogenico e condrogenico .....                | 49 |
| 4.6   | Tecnologia e tecniche della biostampa 3D.....                    | 50 |
| 4.6.1 | Inkjet-based bioprinting .....                                   | 52 |
| 4.6.2 | Pressure-assisted bioprinting e laser-assisted bioprinting ..... | 53 |
| 4.7   | Caso di studio.....  | 54 |
| 4.7.1 | La biostampa e il tessuto il coltura .....                       | 54 |
| 4.7.2 | Bioink .....   | 56 |
| 4.7.3 | Saggio istologico.....   | 57 |
| 4.7.4 | Risultati .....  | 57 |
| 4.7.5 | Conclusioni .....  | 62 |
| 5     | BIBLIOGRAFIA .....   | 65 |
| 6     | SITOGRAFIA .....   | 67 |

## ABSTRACT

La versatilità della struttura chimica del glicole polietilenico (PEG) e la sua eccellente biocompatibilità, hanno reso questo biomateriale un'ottima scelta per svariate applicazioni biomediche. Questa tesi compilativa si propone di descrivere questo interessante biomateriale nel campo dell'ingegneria dei tessuti, affrontando nel dettaglio un particolare caso di studio che vede il PEG impiegato come scaffold per la realizzazione di tessuti biologici (osseo e cartilagineo).

Dopo avere introdotto e illustrato i principi dell'ingegneria dei tessuti e dei biomateriali più utilizzati in questo ambito, si descriveranno le principali tecniche di manipolazione per la fabbricazione dello scaffold costituito da PEG e alcuni impieghi del PEG come supporto per la *drug delivery* e la *detossinazione*. Infine verrà trattato il caso di studio: biostampa 3D di uno scaffold composito PEG-peptide contenente cellule mesenchimali staminali.

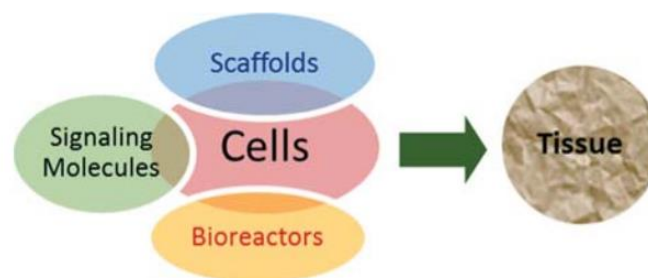
# 1 INGEGNERIA DEI TESSUTI

La terapia basata sulla sostituzione di organi danneggiati da traumi e/o malattie, presenta ancora limiti di varia natura. Infatti, sebbene le procedure di trapianto di organi da donatore abbiano raggiunto standard di ragionevole affidabilità, i costi, l'insufficienza di organi, le problematiche post-operatorie (p. es. rischio infettivo, rigetto) ne impediscono la diffusione estesa.

L'utilizzo di sostituti artificiali, che risolverebbe molte difficoltà, presenta ancora numerose limitazioni tecniche, che lo rendono confinato a limitate "prove di principio". In questo contesto è dunque in corso un'intensa attività di ricerca focalizzata sullo studio di cellule e tessuti che, opportunamente condizionati potrebbero riparare il danno, o sostituire la funzione d'organo. Si introducono dunque l'ingegneria dei tessuti e la medicina rigenerativa; scienze multidisciplinari che combinano esperienze maturate in ambito multidisciplinare (p. es. bioingegneria, biologia molecolare e cellulare, biotecnologie, medicina, scienza dei materiali) per affrontare la sfida posta dal problema aperto.

Per l'ingegnerizzazione *in vitro* di un tessuto sono necessari almeno tre elementi fondamentali:

- le cellule
- uno scaffold
- un condizionamento biochimico e fisico
- le molecole segnale



**FIG. 1-1** UNA SCHEMATICA ILLUSTRAZIONE DELLE QUATTRO COMPONENTI PRINCIPALI DELL'INGEGNERIA TESSUTALE

## 1.1 Cellule

Le cellule sono le unità funzionali di base di un organismo, nel quale esprimono differenti morfologie (fenotipo cellulare) a seconda della funzione svolta. Il fenotipo definitivo di una cellula si differenzia per progressiva proliferazione e specializzazione dei pochi elementi cellulari che originariamente popolano un embrione: le staminali embrionali [3]. La realizzazione di tessuti biologici *in vitro*, fondamento della loro ingegneria, presuppone quindi l'utilizzo di cellule con una plasticità almeno equivalente.

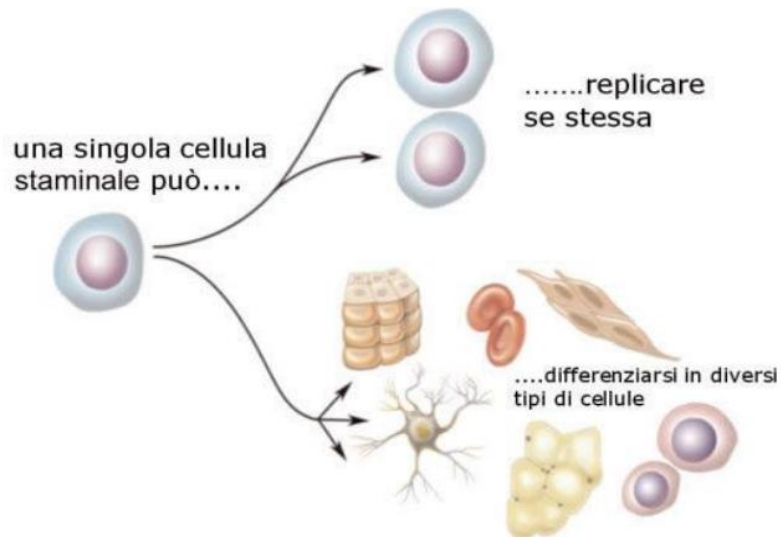
### 1.1.1 Cellule staminali

Le cellule staminali sono cellule primitive altamente indifferenziate in grado di dividersi per periodi indefiniti di tempo, che all'occorrenza possono essere indotte a differenziarsi per andare a sostituire cellule mature non più in grado di svolgere la propria funzionalità.

Le loro caratteristiche peculiari si riassumono in: plasticità, auto-rinnovamento e potenzialità.

La plasticità di queste cellule permette loro di differenziarsi in tutte le tipologie di cellule, non solo in quelle che appartengono al tessuto da cui vengono estratte.

L'auto-rinnovamento illimitato o prolungato riguarda la replicazione delle cellule staminali, che quindi, a differenza delle cellule differenziate, si riproducono per lunghi periodi di tempo senza differenziarsi. Tutte le cellule sono in grado di duplicarsi, ma la peculiarità delle staminali è che possono eseguire la duplicazione infinite volte. Quando si tratta di cellule differenziate, il numero di replicazioni si riduce a 20-40 volte prima che diventino senescenti. Ciò significa che le staminali potenzialmente non invecchiano mai, come se non possedessero memoria del loro stato precedente. In determinate condizioni ambientali vengono tuttavia indotte a specializzarsi, divenendo cellule progenitrici di transito, cioè a proliferazione limitata, dalle quali discendono popolazioni di cellule altamente differenziate che variano nelle circa duecento tipologie di cellule diverse presenti nel nostro organismo [3].



**FIG. 1-2 AUTO-RINNOVAMENTO E DIFFERENZIAMENTO DELLE CELLULE STAMINALI**

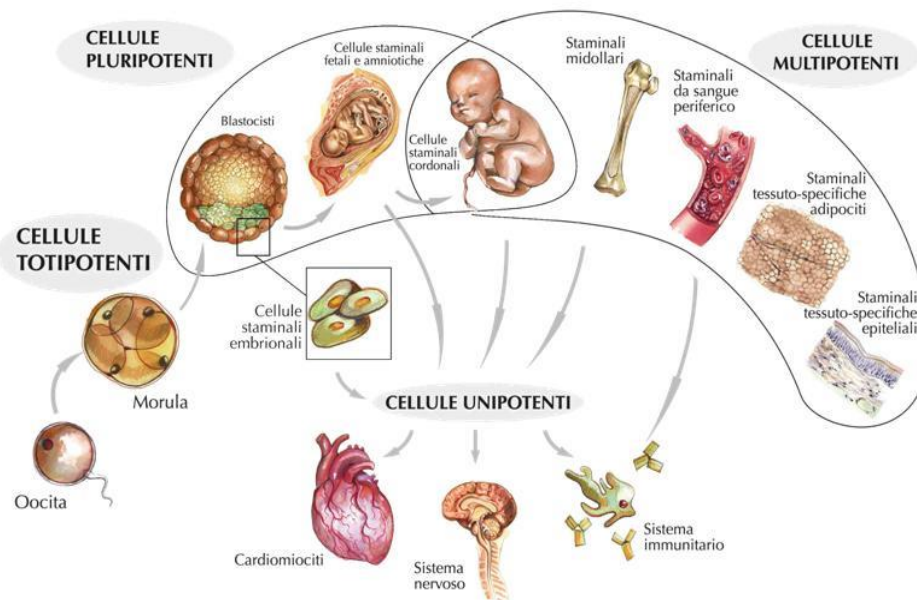
La potenzialità di sviluppo delle cellule staminali consiste nella loro capacità di differenziarsi in qualsiasi tipo di cellula. Questa proprietà ci permette di classificarle in diverse categorie:

- Cellule staminali totipotenti, vengono originate dallo zigote e sono potenzialmente in grado di dare origine a tutte le tipologie di cellula comprese quelle extra embrionali, la loro potenzialità di differenziamento e sviluppo è completa.
- Cellule staminali pluripotenti in grado di differenziarsi in qualsiasi tipo di cellula escluse quelle extra embrionali.
- Cellule staminali multipotenti possono replicarsi solo nei tipi di cellula specifici per il rispettivo foglietto germinativo (endo-, meso- ed ecto- derma).
- Cellule staminali unipotenti possono acquisire unicamente il fenotipo di una cellula già specializzata.

Reperire queste cellule in umano per scopi applicativi, implica la manipolazione di materiale che comporta conseguenze di carattere etico che impone la tassativa osservanza delle leggi che normano questo ambito [2].

In base alle fonti da cui vengono estratte le cellule staminali, esse si dividono in:

- Cellule staminali embrionali: provengono dagli embrioni nelle prime fasi di sviluppo, chiamati blastocisti, ottenuti dalla fecondazione in vitro per il trattamento dell'infertilità o anche specificatamente a scopo di ricerca.
- Cellule staminali embrionali clonate: si ottengono tramite pseudo-embrioni creati dall'inserimento del nucleo di una cellula somatica adulta (staminale o meno) in una cellula uovo privata del proprio nucleo, in questo caso dunque le cellule ottenute sono totipotenti.
- Cellule staminali fetali: le cellule derivate da feti che possiedono un comportamento simile alle cellule staminali adulte, seppure con maggiori capacità di differenziamento.
- Cellule staminali cordonali: si estraggono dal sangue dei vasi del cordone ombelicale, del sacco amniotico e della placenta.
- Cellule staminali adulte: presenti nei tessuti adulti, sono le più utilizzate nell'ingegneria tissutale.



**FIG. 1-3 CLASSIFICAZIONE DELLE CELLULE STAMINALI: LA POTENZIALITÀ DELLE STAMINALI DIPENDE DAL TESSUTO DA CUI VENGONO ESTRATTE.**



Il reperimento delle staminali non pone soltanto problemi di natura etica, ma spesso anche limitazioni pratiche e tecniche. Le cellule staminali sono presenti nell'embrione soltanto in un momento definito che per la specie umana si concentra circa nella seconda settimana dello sviluppo, prima che l'embrione si radichi nella mucosa uterina della madre. Alternativamente si possono usare embrioni congelati derivanti da procedure di fecondazione *in vitro*, oppure è possibile generare cellule staminali con la "clonazione terapeutica", interrompendo il processo nella fase dei tre foglietti embrionali. Per quanto riguarda le staminali adulte pluripotenti recentemente si è scoperta la loro presenza in piccole quantità in diversi tessuti: midollo osseo, cervello, mesenchima di vari organi. Queste cellule sono necessarie per la sostituzione di altre cellule che nel corso del tempo vanno incontro ad un processo di decadimento [2]. Sono state finora riscontrate in quasi tutti i tessuti dell'organismo in particolari siti chiamati nicchie staminali; si suppone che queste nicchie proteggano le cellule fornendo loro segnali di sopravvivenza e regolando la risposta a fattori ambientali. Due tipi importanti di cellule staminali adulte abbastanza facilmente accessibili sono localizzate nel midollo osseo: le ematopoietiche (precursori di: eritrociti, linfociti, neutrofilo, basofili, eosinofili [3]), e le stromali anche dette mesenchimali (generano osteociti, condrociti e adipociti).

### 1.1.2 Colture cellulari

La coltura cellulare è la tecnica utilizzata per mantenere in vita o far proliferare una popolazione cellulare *in vitro*, quindi all'interno di un ambiente artificiale [3]. Si riconoscono differenti tipologie di colture, relativamente alla provenienza delle cellule che si intende utilizzare, le principali sono:

- Coltura primaria (o a termine): le cellule vengono prelevate e isolate da un organismo vivente tramite biopsia, queste sono dunque in grado di effettuare un numero limitato di cicli cellulari in misura proporzionale all'età del donatore.
- Coltura di linea: le cellule provengono da ceppi clonati in grado di crescere e proliferare in maniera indefinita. Ciò è possibile a seguito

di mutazioni indotte che innescano meccanismi di trasformazione simili a quelli che determinano la proliferazione tumorale. Le cellule di linea possono perpetuarsi illimitatamente.

Le cellule primarie sono derivanti da espunti da organismi umani o animali. A seguito della biopsia si separano le cellule tramite digestione enzimatica (p. es. da parte di collagenasi o tripsina) dalla matrice extracellulare, e si disperdono le singole cellule nella soluzione di coltura. Difficilmente si ottiene una popolazione cellulare pura con questa tecnica e può accadere che le cellule si de-differenzino per diventare fibroblasti. Al contrario le cellule di linea non perdono il fenotipo durante il processo di proliferazione in coltura e sviluppano una popolazione cellulare omogenea. Queste cellule possono derivare da tessuti biologici, ma vengono sottoposte a specifici trattamenti di natura chimica o virale che ne alterano il codice genetico; tali trattamenti rendono le cellule di linea inadatte per applicazioni cliniche, ma anche un'ottima alternativa per ottenere un'elevata ripetibilità e riproducibilità degli esperimenti in laboratorio.

|   | <b>Cellule primarie differenziate</b>   | <b>Cellule di linea</b>                  |
|---|---|--|
| <b>Reperimento</b>                              | Da animali o umani                      | Da cell factories (prodotto industriale) |
| <b>Comportamento</b>                            | Complesso e non noto a priori           | Noto                                     |
| <b>Purezza</b>                                  | Popolazione cellulare eterogenea        | Popolazione cellulare omogenea           |
| <b>Stabilità</b>                                | Perdono il fenotipo                     | Non perdono il fenotipo                  |
| <b>Proliferazione</b>                           | 20-50 duplicazioni                      | Illimitato numero di duplicazioni        |
| <b>Ripetibilità e riproducibilità dei saggi</b> | Scarsa                                  | Elevata                                  |
| <b>Condizioni di coltura</b>                    | Complesse e non note a priori           | Note                                     |
| <b>Biocompatibilità.</b>                        | Possibilità di una applicazione clinica | Nulla (generazione di teratomi)          |

**FIG. 1-4 CONFRONTO TRA CELLULE PRIMARIE DIFFERENZIATE E CELLULE DI LINEA.**

## 1.2 Scaffold

La maggior parte delle cellule (con esclusione delle circolanti, come p. es. i linfociti) necessita di un contatto fisico con una matrice extracellulare (ECM) per poter svolgere le proprie funzioni. L'ECM è l'ambiente che fornisce l'essenziale struttura di supporto e trasporto, ed è fondamentale per molti processi cellulari quali: la migrazione, la proliferazione, il differenziamento e la morte cellulare. L'ECM ha un profondo effetto sul differenziamento delle cellule

staminali, durante lo sviluppo di un tessuto e la morfogenesi. Principalmente costituita da acqua, proteine e polisaccaridi, è un modello al quale ci si ispira per progettare la struttura di un supporto per un tessuto artificiale (uno scaffold).

Uno scaffold, o impalcatura, è una struttura bidimensionale o tridimensionale, naturale o artificiale, che ospita la componente cellulare e funge da supporto meccanico per la generazione di un costrutto biologico funzionale. Considerato che i tessuti biologici possiedono un'architettura e una organizzazione spaziale definite e strettamente correlate con la funzione che svolgono, la realizzazione di supporti in questo ambito richiede l'utilizzo di tecniche con un elevato grado di controllo sui parametri strutturali dello scaffold quali: distribuzione e geometria dei pori, rugosità delle superfici, orientamento di eventuali fibre o microfibre. L'architettura conseguente sarà organizzata gerarchicamente partendo da una scala nanometrica fino ad arrivare alla dimensione dei millimetri, mediante tecniche di lavorazione dette di micro e nano fabbricazione. A livello nanometrico si controlla la distribuzione di ligandi e siti di adesione, così da assicurare una corretta organizzazione citoscheletrica (per ottenere determinati risultati si modificano chimicamente le superfici usando micro stampi, fotolitografia o auto-assemblaggio). Mentre a livello micrometrico si deve dotare i tessuti di una struttura porosa adeguata alla perfusione di nutrienti e alla possibilità di sviluppare una rete capillare attraverso processi angiogenici. Le tecniche di lavorazione micrometriche consistono in sistemi dotati di micro aghi, micro siringhe e micro pistoni montati su stampanti; al momento della realizzazione il materiale viene estruso sotto forze di pressione o forze elettrostatiche [3].

Esistono delle specifiche che lo scaffold deve necessariamente soddisfare per poter essere utilizzato nell'ingegneria tessutale e nella medicina rigenerativa:

- Tridimensionalità e porosità: deve permettere la formazione di tessuto tridimensionale e avere pori di adeguate dimensioni.
- Deve promuovere l'adesione cellulare.
- Nel momento in cui la struttura della cellula cambia nel tempo, il materiale deve sapersi adattare al costante cambiamento del microambiente.

- Deve avere proprietà elastiche, in particolar modo la rigidità, la quale favorisce lo scambio di segnali, per ottimizzare il differenziamento, la proliferazione e l'espressione genica.
- Deve avere appropriate forma e dimensione per il tessuto rigenerato.
- Deve permettere lo sviluppo di vasi sanguigni e innervazioni nel costruito.
- Deve essere intrinsecamente non citotossico, non immunogenico e minimamente pro infiammatorio.

Lo scopo dello scaffold è quello di guidare lo sviluppo del tessuto fornendo un profilo strutturale temporaneo. Gli ultimi processi della generazione sono costituiti da una eventuale degradazione del biomateriale e una contemporanea produzione di matrice extracellulare da parte delle cellule poste in coltura.

La struttura di questi veicoli cellulari innovativi è rappresentata da biomateriali. Un biomateriale è un materiale per il quale si progetta un'interfaccia con sistemi biologici al fine di valutare, trattare, migliorare o sostituire qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo [3]. Questo argomento verrà approfondito nel capitolo che segue.

Il materiale deve essere:

- Biodegradabile se richiesto, con tempi di degradazione programmati e appropriati profili di degradazione morfologica e chimica.
- Iniettabile se richiesto, con caratteristiche reologiche (deformabile sotto l'azione di forze esterne).
- Dove necessario compatibile con le tecniche di lavorazione che contemporaneamente modellano sia il materiale che le cellule del costruito.
- Dove sono coinvolti diversi tipi di cellule, il materiale deve essere in grado di accogliere i variabili requisiti cellulari con un controllo spazio-temporale a seconda dei casi.
- Quando l'ambiente in vivo è sottoposto ad una forte sollecitazione, il materiale deve possedere sufficiente resistenza e tenacità.

- Nelle situazioni in cui il biomateriale incapsula cellule, sono richieste caratteristiche di diffusione ottimali.

### 1.3 Condizionamento biochimico e fisico

La crescita di un tessuto biologico è un processo dinamico nel quale l'ambiente fisico locale si modifica nel tempo, si introducono quindi sistemi di coltura dinamici per la corretta maturazione dei tessuti biologici, i bioreattori [3].

I bioreattori sono ambienti di coltura sterili, dinamici, controllabili e riproducibili (di dimensioni variabili comprese tra i pochi centimetri cubici fino a qualche litro), in cui si attuano i processi necessari per la realizzazione del costruito tessutale. Al fine di migliorare la struttura e le funzioni dei tessuti bioartificiali, il bioreattore deve possedere molteplici funzionalità:

- Deve poter generare un pattern di flusso del terreno di coltura, ciò è funzionale per l'ottenimento di una semina efficiente ed uniforme all'interno dello scaffold tridimensionale poroso. In particolare si garantisce:
  1. Una massimizzazione dell'impiego delle cellule prelevate dal donatore.
  2. Una minimizzazione del tempo di permanenza in sospensione per le suddette cellule.
  3. Una distribuzione spaziale funzionale delle cellule all'interno dello scaffold.
  4. Un'elevata densità iniziale della coltura per aumentare la velocità di sviluppo del tessuto.
- Deve garantire il trasporto di sostanze nutritive e gas dal terreno di coltura ai costrutti ingegnerizzati. In questo caso il bioreattore sopprime alla necessità della vascolarizzazione nel tessuto, permettendo lo scambio di nutrienti, metaboliti e fattori di crescita e rendendo possibile la comunicazione cellulare.

- Deve generare una adeguata stimolazione chimico-fisica sul costrutto. La sollecitazione meccanica o elettrica permette di simulare fedelmente le situazioni a cui sono sottoposti i tessuti durante la permanenza *in vivo*, inoltre favorisce e accelera lo sviluppo e la maturazione dei tessuti.
- Infine deve regolare e controllare i parametri chimici e fisici del terreno di coltura, come: temperatura, pH, concentrazioni di soluti, concentrazioni di ioni etc.

Quello che si ottiene è un complesso dispositivo bioartificiale regolato da sensori e unità di controllo. Al suo interno viene ricreato l'ambiente che simula le condizioni fisiologiche per la crescita dei tessuti.

L'impianto può essere composto da un'unità centrale di controllo e condizionamento del processo e da un numero variabile di unità di coltura. Ogni unità conterrà un componente monouso, predisposto al contenimento di un costrutto specifico e il relativo mezzo di coltura [3].

## 1.4 Molecole segnale

La stimolazione chimica atta ad aumentare la proliferazione e il differenziamento delle cellule staminali, consiste nell'utilizzare molecole segnale, tra cui fattori di crescita, ormoni, vitamine e citochine, all'interno delle colture [5]. Il bilanciamento di questi fattori regola tutte le funzioni cellulari, modificando inoltre anche la forma delle cellule e l'apoptosi (morte cellulare programmata).

Gli ormoni includono disparate categorie come i derivati degli aminoacidi, i peptidi, gli steroidi e i derivati degli acidi grassi.

Le citochine, anche a base peptidica, possono influenzare le risposte immunitaria e infiammatoria del metabolismo.

I fattori di crescita sono ormoni peptidici che inducono la proliferazione cellulare, quindi sono molecole biologicamente attive che stimolano la duplicazione, la crescita e il differenziamento all'interno del nostro organismo; considerata la loro interessante funzionalità sono diventate un valido strumento per la rigenerazione di tessuti *in vitro*.

Gli effetti dei fattori di crescita dipendono dalle concentrazioni degli stessi e vengono esercitati attraverso dei recettori presenti sulla superficie delle cellule. Possono legarsi alle proteine per regolare la loro attività e la loro stabilità. Per convertire un fattore di crescita nel suo stato bioattivo, è necessario un meccanismo di attivazione, da quel momento un singolo fattore può influenzare diversi tipi di cellule, inducendo risposte differenti in base alla tipologia cellulare su cui agisce.

Esistono moltissimi fattori di crescita, alcuni di questi sono: BMP, IGF, FGF, VEGF, TGF $\beta$ , PDGF.

Le BMP, *bone morphogenetic proteins*, appartengono alla superfamiglia TGF $\beta$ . Queste proteine giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo embrionale, regolano buona parte delle attività cellulari e inducono la cascata di eventi che determina l'osteochondrogenesi.

La famiglia delle TGF $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) comprende cinque isoforme (TGF $\beta$ 1-TGF $\beta$ 5), questi fattori di crescita hanno un ruolo rilevante nella condrogenesi e inducono la sintesi di BMP nelle cellule osteoprogenitrici, stimolando il differenziamento e inducendo la produzione di proteine extracellulari come: collagene, proteoglicani, osteopontina, osteonectina.

Il PDGF (*platelet derived growth factor*) è composto da due catene polipeptidiche che possono presentarsi come omodimero o eterodimero. Ha un ruolo nel differenziamento osteogenico e viene utilizzato maggiormente per le sue proprietà chemiotattiche.

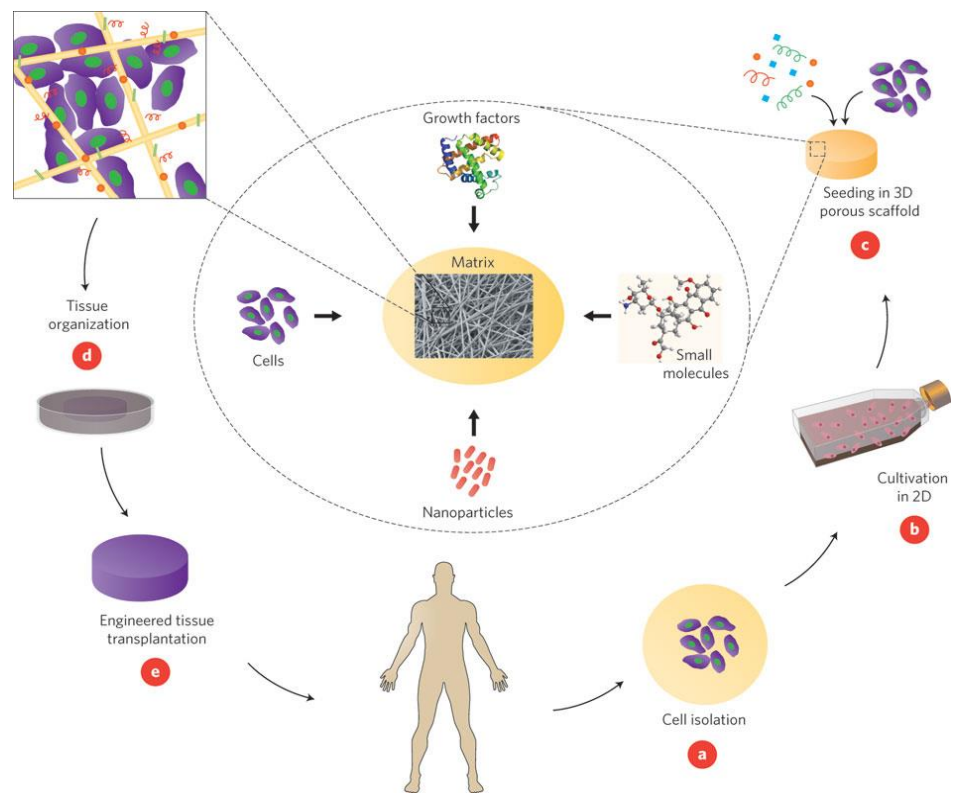
Gli FGF (*fibroblast growth factors*) influenzano i processi di proliferazione di cellule come osteoblasti, condrociti, miociti e cellule endoteliali. Regolano la mitogenesi, la produzione di protease e legano l'eparina.

Il VEGF (*vascular endothelial growth factor*) è una citochina che promuove l'angiogenesi, aumenta la permeabilità vascolare e la vasodilatazione.

Le funzioni dei fattori di crescita IGF (*insulin-like growth factor*) includono la crescita embrionale, la mineralizzazione della matrice ossea e lo sviluppo della cartilagine.

Considerata la presenza di questi elementi di base, i successivi passi da fare sono [3]:

- Scegliere il tipo di cellula
- Scegliere lo scaffold e il tipo di struttura
- Eseguire la semina delle cellule all'interno della matrice dello scaffold
- Porre la coltura in condizioni dinamiche
- Replicare e differenziare le cellule (se necessario)
- Indurre la secrezione da parte delle cellule della matrice extracellulare (ECM)
- Rimodellare e trasformare i materiali della ECM
- Impiantare il costrutto ottenuto nel paziente
- Permettere l'adattamento e l'assimilazione dell'impianto



**FIG. 1-5 SCHEMATIZZAZIONE DEI PASSAGGI FONDAMENTALI NELL'INGEGNERIA DEI TESSUTI.**



## 1.5 Limiti

Si è parlato dell'innovazione e dei vantaggi che l'ingegneria tessutale offre alla medicina moderna, ma è bene citare anche le limitazioni che presenta e le difficoltà che insorgono nel momento in cui si vuole ricreare un tessuto biologico. Principalmente si devono affrontare:

- La *vascolarizzazione* del tessuto per una corretta ossigenazione e l'allontanamento dei prodotti di scarto del metabolismo, sia nella fase *in vitro* che nella successiva integrazione nell'organismo. *In vitro* si attua la perfusione del medium attraverso colture dinamiche, per epiteli e tessuti di geometria non piana, tale approccio può essere difficoltoso; mentre *in vivo* è necessario connettere adeguatamente arterie e capillari. Il rischio è di sviluppare anossia e/o necrosi.
- Il *trasporto di molecole e sostanze* attraverso processi diffusivi e convettivi. Anche in questo caso le limitazioni variano a seconda delle dimensioni dei tessuti e dalle caratteristiche chimico-fisiche dei componenti presenti. Per riprodurre in laboratorio determinate specificità dei componenti si cerca di garantire la presenza di supporti meccanici mediante l'uso di scaffold micro strutturati. Nella situazione *in vivo* la microcircolazione è un efficiente sistema di movimentazione dei liquidi.
- Il *differenziamento cellulare*, quindi la possibilità di far crescere in laboratorio cellule differenziate di tessuti come la cute, la parete vascolare, la cartilagine, l'osso etc (Arrigoni 2006). Le cellule di partenza si possono ottenere dal paziente stesso e si induce la loro proliferazione *in vitro*, oppure si parte da cellule progenitrici o staminali che si faranno poi differenziare.
- La *coltura cellulare in vitro* senza componenti di origine animale. Le colture cellulari avvengono in presenza di fattori di crescita siti nel siero fetale di origine animale, difficilmente sintetizzabili in laboratorio. I problemi che ne sorgono riguardano la possibile presenza di agenti patogeni che possono far sì che si instauri xenozirosi (malattia infettiva). Esistono normative attualmente che non consentono l'impiego di prodotti di origine animale per la coltura *in vitro*. Mezzi di

coltura alternativi si possono ottenere dal DNA ricombinante, dal siero umano del paziente o dal lisato piastrinico.

- La *reazione dell'organismo* all'impianto di cellule e tessuti. Generalmente il materiale impiantato non è semplicemente passivamente accettato e si possono presentare reazioni immunitarie tali da impedire la funzionalità del materiale stesso. L'utilizzo di cellule autologhe garantisce solitamente la completa accettabilità delle componenti cellulari, ma si può comunque assistere alla formazione di tessuto fibrotico (costituito da cellule infiammatorie e fibroblasti) attorno all'impianto.

## 2 BIOMATERIALI

L'utilizzo di materiali tradizionali è inappropriato per la costruzione di scaffold, in quanto, tali materiali, non possiedono particolari specifiche necessarie per il contatto con tessuti biologici. Secondo la definizione elaborata da un gruppo di esperti durante la Consensus development conference on the clinical application of biomaterials, svoltasi a Chester nel marzo 1986, sotto il patrocinio della Società Europea di Biomateriali, un biomateriale è [4]:

*“Una sostanza non vivente utilizzata nella fabbricazione di un dispositivo medico che ha in qualche punto un'interfaccia con un tessuto vivente”*

Si deduce dalla definizione che un biomateriale non può essere un materiale vivente, come ad esempio un organo trapiantato, ma vengono inclusi nella categoria tessuti di origine biologica precedentemente trattati e non più viventi. La proprietà imprescindibile di un biomateriale, che lo contraddistingue da un materiale classico, è la biocompatibilità, che per definizione è *“la capacità di un materiale di determinare, da parte di un sistema vivente, una favorevole reazione alla sua presenza in una specifica applicazione”* [4]. Tradizionalmente si è sempre inteso il biomateriale biocompatibile come un oggetto inerte, ciò significa che il requisito fondamentale richiesto per la sua applicazione, a contatto con i tessuti biologici, prevede una minima o nulla reazione da parte dell'organismo. Nell'innovativo contesto della medicina rigenerativa, però, si è abbandonato questo pensiero; al contrario sono stati introdotti nuovi tipi di applicazioni che richiedono un'interazione tra biomateriale e tessuti non più passiva: sistemi di trasporto (carrier) di cellule o farmaci, supporti per la rigenerazione *in vitro* e *in vivo* di tessuti, fino a giungere alla progettazione di materiali biomimetici e materiali programmati per rispondere a stimoli fisiologici [1].

Le caratteristiche che riguardano questi biomateriali sono:

### **Biodegradazione**

*“La progressiva disgregazione di un materiale mediata da attività biologiche”*  
[4].

## **Bioassorbimento**

*“Il processo di dissoluzione o di rimozione, dovuto ad attività cellulare, di un materiale inserito in un ambiente biologico” [4].*

## **Bioattività**

*“Il materiale è in grado di indurre nei tessuti biologici una risposta, attivando processi chimici e biologici all’interfaccia” [4]*

Un materiale impiantato all’interno di un organismo, può andare incontro ad un processo di degradazione chimica e/o meccanica. Questo meccanismo provoca il rilascio di residui da parte del biomateriale, che possono scatenare una risposta infiammatoria indesiderata. La biodegradazione dello scaffold è un parametro di progettazione importante; il biomateriale che compone la struttura che ospita la coltura deve avere un tempo di degradazione programmato e strettamente sincronizzato con quello di formazione del nuovo tessuto.

I biomateriali vengono classificati in macrocategorie in base alla natura dei legami chimici che compongono la loro struttura. Si distinguono in: polimeri, metalli, ceramici, materiali compositi e materiali di derivazione biologica. In ingegneria dei tessuti, i biomateriali vengono anche classificati in base alla loro provenienza: biomateriali di origine naturale e biomateriali sintetici.

## **2.1 Biomateriali naturali**

I vari componenti che appartengono alla matrice extracellulare, come proteine e polisaccaridi, forniscono un punto di partenza per la progettazione e lo sviluppo di scaffold di origine naturale, che pertanto si distingueranno in scaffold a struttura proteica e scaffold a struttura polisaccaridica. Questi scaffold presentano sostanziali vantaggi, come il riconoscimento cellulare, la presenza di siti di adesione, biodegradabilità per azione enzimatica e spesso una migliore biocompatibilità rispetto ai materiali sintetici. La biocompatibilità può venire meno nel caso in cui non venga garantita la totale purezza delle proteine o dei polisaccaridi, che può condurre all’attivazione di una risposta immunitaria.

Gli svantaggi relativi a queste impalcature è che sono spesso caratterizzate da proprietà meccaniche piuttosto limitate che non sempre è possibile modificare o ottimizzare, inoltre i biomateriali costituenti vengono generalmente prelevati da tessuti umani o animali; l'utilizzo di tessuti biologici comporta una potenziale presenza di agenti patogeni e una disponibilità limitata in termini di quantità.

### 2.1.1 Biomateriali con struttura proteica

Il più importante biomateriale di questa categoria è il *collagene*; è la proteina principale che costituisce la struttura dei tessuti dei mammiferi, parte integrante della matrice extracellulare, e rappresenta circa il 6% del peso corporeo umano. Attualmente, sono stati individuati diciannove differenti tipi di collagene, il collagene di tipo I è il più abbondante in termini di quantità [5]. Queste proteine si presentano sotto forma di fibre all'interno di pelle, tendini, ossa, cartilagini e tessuti cardiovascolari; il loro scopo principale è quello di prevenire lesioni meccaniche permanenti, limitando le deformazioni dei tessuti. Il collagene si compone di tre aminoacidi fondamentali: glicina (GLY), prolina (PRO) e idrossiprolina (HYP), più un quarto aminoacido; la struttura si articola mediante questi elementi in una tripla elica, le cui catene sono unite da legami idrogeno. Gli scaffold tridimensionali di collagene sono stati utilizzati per la coltura di un'ampia varietà di cellule staminali. La biocompatibilità di questo materiale e la sua bioassorbibilità lo rendono adatto per la rigenerazione dei tessuti, ma il pregio maggiore di questo materiale è la sua abbondante presenza in natura.

La *fibrina*, nonostante non sia stata studiata approfonditamente come il collagene, può essere un potenziale scaffold per la coltura di cellule staminali. La fibrina è un derivato del fibrinogeno, il suo compito *in vivo* è quello di generare coaguli di sangue successivamente ad una lesione al sistema vascolare. In accordo con il suo ruolo biologico, e grazie alla possibilità di isolare il fibrinogeno nel sangue (sia animale che umano), viene applicata come sigillante nelle applicazioni cliniche e come biomateriale nell'ingegneria dei tessuti.

L'ultima proteina investigata dei biomateriali naturali, è la *seta*, secreta da vermi e insetti. Gli scaffold costituiti dalla seta possiedono range di degradazione ampi nel tempo e ottime proprietà meccaniche, ciò li rende una valida alternativa al collagene e alla fibrina per l'ingegnerizzazione di tessuti quali: osso, cartilagine e legamenti [6].

### 2.1.2 Biomateriali con struttura polisaccaridica

L'*agarosio* è un polisaccaride estratto dalle alghe, ha applicazioni simili a quelle del collagene, ma non è biodegradabile. La rigidità e la permeabilità di questo biomateriale possono essere modificate, permettendo di ottenere un sistema iniettabile e quindi uno scaffold applicabile *in situ*. Gli idrogeli di agarosio promuovono la condrogenesi e vengono utilizzati come matrici per la rigenerazione neuronale.

L'*Alginato* è un polisaccaride naturale idrosolubile, ottenuto dalla parete cellulare di diverse alghe. Si è dimostrato utile per applicazioni che richiedono l'incapsulamento cellulare, in particolare per l'incorporazione e proliferazione di: cardiomiociti, condrociti ed epatociti.

L'*Acido ialuronico* è un polisaccaride ad alto peso molecolare, è presente nella matrice extracellulare di molti tessuti molli (cartilagine, tendini, pelle) e *in vivo* svolge diversi compiti come l'idratazione di tessuti, la diffusione di nutrienti e il differenziamento cellulare. Viene impiegato nella rigenerazione della cartilagine, del derma e dell'epidermide, e per il differenziamento di osteoblasti e condrociti.

Il *Chitosano* è il più importante derivato della chitina, risulta dalla deacetilazione della chitina in condizioni alcaline o per mezzo di idrolisi enzimatica in presenza di chitina deacetilase. Si trova nell'esoscheletro di crostacei e insetti. Il chitosano è utilizzato per preparare idrogeli, rivestimenti per la drug delivery, fibre o spugne [5].

| Type of material                         | Application  | Citations  |
|--|--|--|
| <b>Protein based biomaterials</b>        |  |  |
| Collagen                                 | Bone, Cartilage, Heart, Ligament, Nerve, Vasculature | Baharvand et al. (2006); Battista et al. (2005); Chan et al. (2007); Chen et al. (2003); Daya et al. (2007); Gerech-Nir et al. (2003); Ma et al. (2004); Michelini et al. (2006); Noth et al. (2005); O'Connor et al. (2000); Sumanasinghe et al. (2006); Watanabe et al. (2007) |
| Fibrin                                   | Cartilage, Nerve, Vasculature                        | Catelas et al. (2006); Gurevich et al. (2002); Im et al. (2005); Liu et al. (2006); Willerth et al. (2006); Willerth et al. (2007); Worster et al. (2001)  |
| Silk                                     | Bone, Cartilage, Liver                               | Altman et al. (2002); Hofmann et al. (2007); Hofmann et al. (2006); Kim et al. (2005); Mauney et al. (2007); Meinel et al. (2005); Meinel et al. (2004a); Meinel et al. (2004b); Meinel et al. (2004c); Wang et al. (2005)   |
| <b>Polysaccharide based biomaterials</b> |  |  |
| Agarose                                  | Cartilage, Heart, Nerve                              | Ando et al. (2007); Awad et al. (2004); Chen et al. (2007b); Finger et al. (2007); Huang et al. (2004); Mauck et al. (2006); Moriyasu et al. (2006)  |
| Alginate                                 | Cartilage, Liver, Nerve, Vasculature                 | Ashton et al. (2007); Awad et al. (2004); Franzesi et al. (2006); Gerech-Nir et al. (2004); Hannouche et al. (2007); Jin et al. (2007); Maguire et al. (2006); Prang et al. (2006); Wayne et al. (2005)  |
| Hyaluronan                               | Adipose, Cartilage, Nerve, Skin, Vasculature         | Angele et al. (2007); Chen et al. (2007a); Flynn et al. (2007); Flynn et al. (2008); Gerech et al. (2007); Mehlhorn et al. (2007); Myers et al. (2007)   |
| Chitosan                                 | Bone, Cartilage, Nerve, Skin                         | Cho et al. (2007); Franzesi et al. (2006); Gravel et al. (2006); Mrugala et al. (2007); PP et al. (2005)   |

FIG. 2-1 CLASSIFICAZIONE DEI BIOMATERIALI NATURALI.

## 2.2 Biomateriali sintetici

Questi biomateriali vengono sintetizzati chimicamente. Il maggior vantaggio che riguarda questa categoria è la possibilità di modificare ampiamente le proprietà fisiche, la composizione chimica, il rate di degradazione, la porosità e la forma del materiale. Tuttavia, a differenza dei biomateriali naturali, mancano di siti di adesione cellulare e possono produrre residui (p. es. monomeri, catalizzatori, additivi) in seguito alla loro degradazione.

### 2.2.1 Biomateriali a struttura peptidica

I biomateriali a struttura peptidica sono costituiti da una breve sequenza di aminoacidi dalla quale è possibile progettare una particolare classe di scaffold, i peptidi auto-assemblanti. In questi scaffold viene combinata la funzionalità di materiali a base proteica con la riproducibilità e la versatilità degli scaffold sintetici. I peptidi auto-assemblanti, in condizioni di equilibrio termodinamico, sono in grado di organizzarsi spontaneamente in strutture bi o tridimensionali stabili mediante legami ionici e idrogeno [25]. Vengono impiegati come substrati per la crescita neuronale e formazione di sinapsi e rigenerazione di tessuti cartilaginei, fungono inoltre da nanofibre iniettabili per formare matrici di sostegno per cardiomiociti e cellule endoteliali.

## 2.2.2 Biomateriali a struttura ceramica

Le ceramiche sono materiali inorganici, spesso porosi e particolarmente fragili a causa dei legami chimici che costituiscono la loro struttura. I vetri bioattivi e l'idrossiapatite sono i biomateriali che meglio rappresentano questa categoria. L'idrossiapatite in particolare è una versione sintetica dell'idrossiapatite biologica che costituisce le ossa, di conseguenza presenta un'ottima biocompatibilità e proprietà meccaniche favorevoli alla rigenerazione del tessuto osseo.

| Type of material                  | Application                                   | Citations   |
|-----------------------------------|---|---|
| <b>Polymer based biomaterials</b> |   |   |
| PLGA                              | Adipose, Bone, Cartilage, Muscle, Nerve       | Bhang et al. (2007); Chastain et al. (2006); Choi et al. (2005, 2007); Graziano et al. (2007); Kim et al. (2003); Kim et al. (2006); Levenberg et al. (2005); Levenberg et al. (2003); Neubauer et al. (2005); Sun et al. (2007); Teng et al. (2002); Tomita et al. (2005); Uematsu et al. (2005); Xin et al. (2007); Yoon et al. (2007)  |
| PEG                               | Adipose, Bone, Cartilage, Liver, Heart, Nerve | Benoit and Anseth (2005); Benoit et al. (2007); Buxton et al. (2007); Ford et al. (2006); Hwang et al. (2006); Mahoney and Anseth (2006, 2007); Nuttelman et al. (2004); Royce Hynes et al. (2007); Salinas et al. (2007); Shin et al. (2004); Stosich et al. (2007); Underhill et al. (2007); Varghese et al. (2008)   |
| <b>Peptide based biomaterials</b> | Bone, Nerve                                   | Garreta et al. (2007); Garreta et al. (2006); Gelain et al. (2006); Hamada et al. (2008); Hosseinkhani et al. (2006); Silva et al. (2004)   |
| <b>Ceramic based biomaterials</b> | Bone, Cartilage                               | Arinze et al. (2003); Arinze et al. (2005); Bruder et al. (1998); Dennis and Caplan (1993); Dyson et al. (2007); Gao et al. (2001); Hanada et al. (1997); Kitamura et al. (2004); Kotobuki et al. (2005); Krut et al. (2006); Lennon et al. (1995); Marcacci et al. (2007); Meseguer-Olmo et al. (2007); Ohgushi et al. (1996); Shimaoka et al. (2004); Toquet et al. (1999); Turhani et al. (2005); Yamada et al. (2003); Yang et al. (2006) |

FIG. 2-2 CLASSIFICAZIONE DEI BIOMATERIALI SINTETICI.

## 2.2.3 Biomateriali a struttura polimerica

I materiali polimerici sono composti principalmente organici formati dalla ripetizione di unità uguali o diverse chiamate monomeri, le sequenze di queste unità danno vita a delle macromolecole.

Nel panorama attuale della produzione industriale i polimeri hanno assunto ormai una grande importanza, in quanto vantaggiosi sia per le ottime proprietà che per i bassi costi che li riguardano [2].



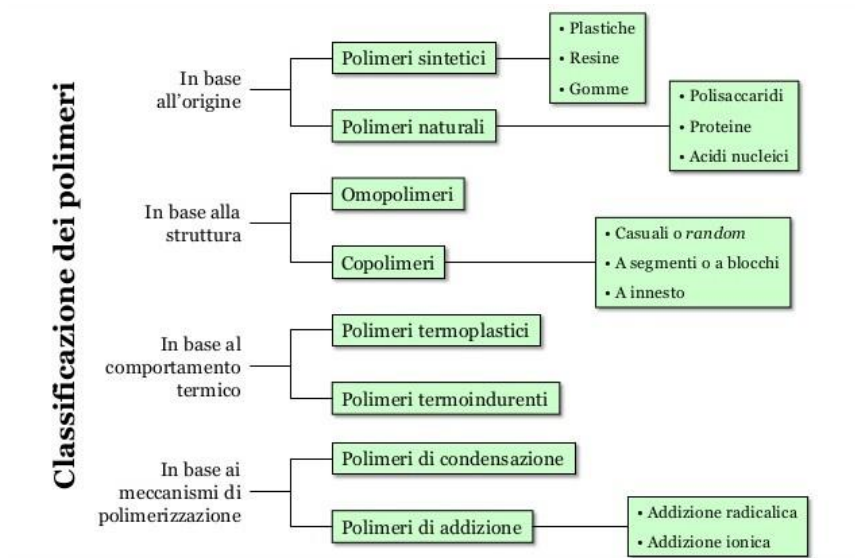


FIG. 2-3 CLASSIFICAZIONE DEI BIOMATERIALI POLIMERICI

Alcuni materiali polimerici utilizzati nell'ingegneria dei tessuti sono l'acido polilattico (PLA), l'acido poliglicolico (PGA) e il glicole polietilenico (PEG) che sarà trattato approfonditamente successivamente.

Il PLA e il PGA sono poliesteri alifatici termoplastici ad alto peso molecolare, che nel momento in cui vengono degradati per idrolisi in ambiente biologico, inducono la formazione di metaboliti naturali (acido lattico e acido glicolico rispettivamente) eliminati dall'organismo ospite sotto forma di CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O [5]. La loro struttura chimica è simile, eccetto per il gruppo metilico pendente del PLA; ciò influenza il differente comportamento cinetico durante la degradazione. Questi materiali vengono largamente impiegati come scaffold per l'ingegneria del tessuto muscolo scheletrico, quindi per la ricostruzione di ossa e cartilagine [7].

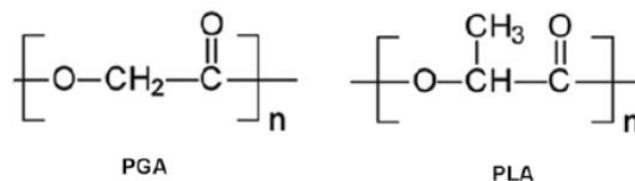


FIG. 2-4 FORMULE STRUTTURALI DEL PGA E DEL PLA

## 2.3 Glicole polietilenico

Il glicole polietilenico (PEG), anche detto ossido di polietilene (PEO), o poliossietilene (POE) è un polimero di natura sintetica. Il PEG viene sintetizzato dalla polimerizzazione anionica/cationica dell'ossido di etilene in presenza di acqua o glicole etilene e catalizzatori alcalini; dalla sua struttura base si possono ottenere diversi derivati: lineari, ramificati (multi braccio o stella), mono o bifunzionali. La forma lineare possiede una bassa stabilità meccanica, quindi spesso è preferibile utilizzare il PEG con struttura reticolata. Questo tipo di matrice è ottenibile mediante la congiunzione di gruppi funzionali alle estremità della catena del glicole [5]. La struttura di base del PEG è il PEG diolo, con due gruppi terminali ossidrilici che possono essere convertiti in altri gruppi funzionali (carbossile, amino, tiolo, azide, acetilene e acrilato). I due gruppi funzionali terminali possono essere uguali (forma simmetrica) o diversi (forma asimmetrica), che sono versatili rispettivamente per la formazione di un idrogel e per la coniugazione di molecole.

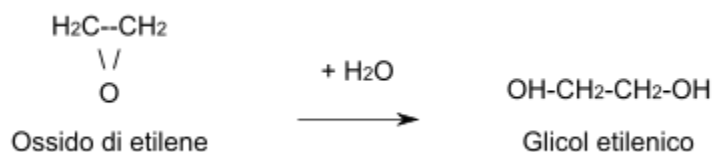


FIG. 2-5 FORMULA CHIMICA DEL GLICOLE ETILENICO

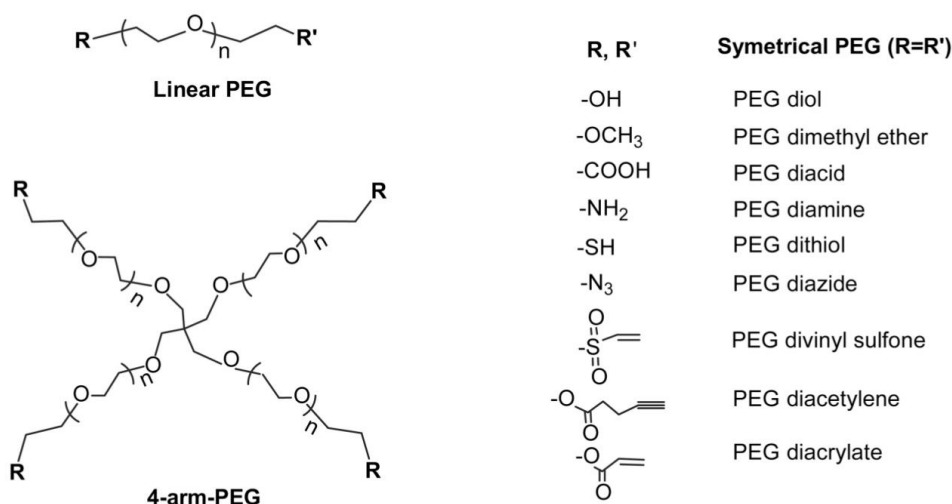


FIG. 2-6 FORMULA STRUTTURALE DEL PEG LINEARE E DEL PEG RAMIFICATO A QUATTRO BRACCIA CON VARI GRUPPI FUNZIONALI TERMINALI

In chimica tutte le nomenclature suddette sono equivalenti e si riferiscono al biomateriale PEG, la differenza che le contraddistingue generalmente risiede nel peso molecolare medio delle miscele polimeriche:

- POE con un peso molecolare medio inferiore a 20000 g/mol
- PEG con un peso molecolare medio di 20000 g/mol
- PEO con un peso molecolare medio superiore a 20000 g/mol

A seconda della dimensione delle macromolecole che compongono il polimero variano le caratteristiche fisiche del materiale, di conseguenza anche le applicazioni possibili e preferibili. Un più alto peso molecolare, come quello del PEO, favorisce ad esempio la capacità del biomateriale di resistere all'assorbimento di proteine. La lunghezza delle catene va a modificare altresì lo stato fisico del materiale ad una determinata temperatura, infatti il polimero si presenterà in uno stato liquido tendente allo stato solido ceroso con l'aumentare del peso molecolare. In generale i PEG si comportano come sostanze non volatili, la loro struttura determina un carattere anfifilico che li rende facilmente solubili in solventi organici polari e non polari quali acqua, metanolo, benzene; gli stessi risultano invece insolubili in idrocarburi alifatici. All'interno dell'organismo oligomeri di PEG costituiti da un basso peso molecolare (<400 Da) diventano substrati per l'alcool deidrogenasi, ciò li rende metaboliti tossici; questo non accade per catene del polimero di massa superiore ai 1000 Da, in questo caso il PEG rimane privo di tossicità. Normalmente il glicole polietilenico viene rapidamente eliminato dall'organismo, senza subire alterazioni strutturali. Ciò che determina la clearance è comunque il peso molecolare del polimero; al di sotto dei 20 kDa il materiale viene filtrato a livello glomerulare da parte dei reni, con l'aumentare del peso molecolare, aumenta il tempo di eliminazione e il PEG scompare più lentamente. Il carattere immunogenico del polietilenglicole rimane irrisorio anche per catene con un alto peso molecolare (Yamaoka T., 1994; Caliceti P., 2003).

I vari utilizzi di questo biomateriale sono stati approvati dal Food and Drug Administration (FDA) e spaziano in diversi campi industriali, da quello farmaceutico e cosmetico, al ceramico, tessile, al settore alimentare etc, ma in questo elaborato verranno descritte le applicazioni inerenti alla medicina rigenerativa e all'ingegneria tessutale.

## 3 TECNICHE DI MANIPOLAZIONE E APPLICAZIONI ALTERNATIVE DEL PEG

### 3.1 Polimerizzazione

La polimerizzazione dei polimeri è un processo di sintesi mediante il quale è possibile legare i singoli monomeri tra loro, per creare la struttura del materiale; questo meccanismo può suddividersi in polimerizzazione per condensazione e polimerizzazione per addizione [2].

#### 3.1.1 Polimerizzazione per condensazione

La reazione di polimerizzazione per condensazione, o policondensazione, richiede particolari monomeri di partenza, i quali devono presentare determinati gruppi funzionali come: il gruppo alcolico, il gruppo amminico e il gruppo carbossilico. Ciascuno monomero deve avere almeno due gruppi funzionali, la presenza di più di due gruppi determina nel polimero risultante, una ramificazione delle catene e un aumento del peso molecolare [26]. La reazione di condensazione avviene attraverso l'eliminazione di una molecola di piccole dimensioni e genera prodotti secondari (p.es. acqua, metanolo, cloruro di sodio, acido cloridrico) che possono generare problemi nel momento in cui la polimerizzazione avviene in ambiente biologico. La velocità di reazione è molto più lenta rispetto a quella della poliaddizione, ma viene coinvolta tutta la massa di sostanze reagenti presenti nella reazione. I polimeri sintetizzati per condensazione sono polimeri naturali, spesso a struttura lineare con un peso molecolare inferiore rispetto ai polimeri ottenuti per addizione.

#### 3.1.2 Polimerizzazione per addizione

La polimerizzazione per addizione, o poliaddizione, è suddivisa in tre fasi: inizio, propagazione e terminazione. In questa reazione tutta la molecola di monomero diventa parte del polimero finale, non ci sono quindi prodotti residui conseguenti. La molecola di partenza presenta un centro attivo che determina il tipo di poliaddizione, se radicalica, anionica o cationica. La poliaddizione è attivata mediante calore, luce o grazie ad una sostanza chimica

chiamata iniziatore. Al termine della reazione si ottiene un modesto numero di catene polimeriche ad elevatissimo peso molecolare.

La struttura delle catene polimeriche va ad influenzare le proprietà del materiale, in particolare distinguiamo catene: lineari, ramificate e reticolate. I polimeri che sono costituiti dalle prime due tipologie di catena hanno proprietà meccaniche inferiori rispetto ai polimeri reticolati, questo perché i legami che compongono la struttura delle catene lineari e ramificate sono legami deboli di Van der Waals, dipolo-dipolo etc; di conseguenza nel momento in cui viene applicata una sollecitazione al materiale, avviene uno scorrimento di tipo viscoso delle catene, l'una rispetto all'altra. Da qui deriva il comportamento viscoelastico dei polimeri suddetti. Parallelamente le catene reticolate (unite da legami covalenti) costituiscono polimeri la cui massa è assimilabile ad un'unica macromolecola tridimensionale, rigida e con proprietà meccaniche superiori. In generale la struttura di questi materiali è scarsamente cristallina, mentre per quanto riguarda le proprietà si può dire che spesso i polimeri si comportano come isolanti, sia termici che elettrici e si possono distinguere in termoplastici e termoindurenti a seconda della loro reazione ad una variazione di temperatura [2].

Il tipo di manipolazione e fabbricazione del polimero, ci permette di alterare su richiesta la maggior parte delle proprietà chimiche e meccaniche, ciò è cruciale per la progettazione di materiali per applicazioni biomediche avanzate. Mediante la regolazione delle interazione cellula-materiale, si può controllare anche il comportamento cellulare. Quando un biomateriale entra in contatto con l'ambiente biologico, le molecole di acqua circondano la sua struttura; le proteine vengono assorbite dalla superficie del materiale e le cellule si attaccano a queste proteine formando un'adesione focale (FA) grazie ai recettori di superficie (p. es. integrine) e ai ligandi extracellulari (p. es. RGD). L'adesione cellulare avviene grazie alle proteine extracellulari come fibronectina, collagene e laminina. L'interazione tra recettore e ligando dirige la motilità cellulare, la sua morfologia e le sue funzionalità, mediando il complesso scambio bidirezionale di segnali tra le cellule e la ECM. La variazione delle proprietà meccaniche del materiale modula le risposte del tessuto; per esempio un substrato polimerico dovrebbe essere rigido a sufficienza per resistere alle forze di trazione cellulari e mantenere l'interazione con il tessuto,

parallelamente la rigidità non deve essere eccessiva per non ostacolare la vitalità cellulare. Anche le caratteristiche chimiche sono strettamente correlate alla risposta cellulare; la composizione chimica di un polimero determina la sua cristallinità, il carattere idrofobo o idrofilo, e la degradazione. Aumentando la cristallinità, quindi migliorando la struttura delle catene, il materiale avrà una resistenza maggiore alla penetrazione d'acqua e alla degradazione idrolitica.

### 3.2 Idrogeli

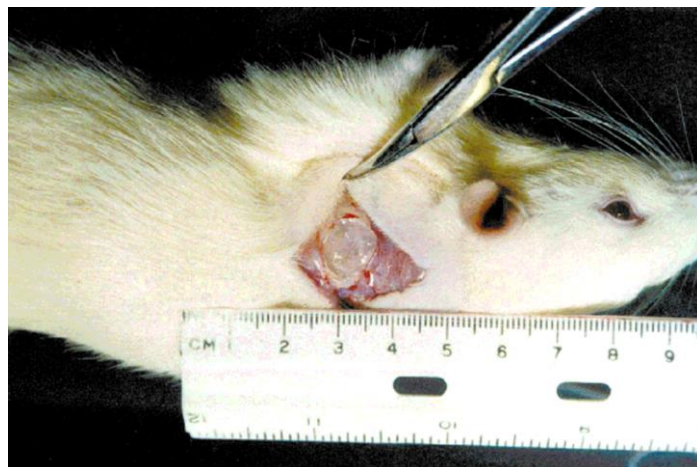
I gel polimerici sono materiali con la capacità di rigonfiarsi all'interno di un solvente, senza sciogliersi. Questa capacità di rigonfiamento si modifica al variare di condizioni ambientali come il pH, la luce, o campi elettrici presenti [1]. I gel che attuano questo comportamento in solventi acquosi sono noti con il nome di idrogeli, che quindi si presenteranno come strutture polimeriche reticolate in larga parte costituite da acqua.



**FIG. 3-1 IDROGELO COMPLETAMENTE IDRATATO A SINISTRA E IDROGELO ANIDRO A DESTRA**

Gli idrogeli sono stati largamente esaminati come scaffold bidimensionali e tridimensionali grazie alla loro attitudine ad imitare il naturale ambiente cellulare, sia chimicamente che fisicamente. Sono costituiti da una struttura polimerica permeata d'acqua che si presenta allo stato solido e possiede una buona somiglianza con i tessuti naturali molli. La quantità d'acqua assorbita dalla struttura permette il passaggio e la diffusione di soluti attraverso l'idrogelo stesso.

Generalmente gli idrogeli possiedono una buona biocompatibilità e un'alta permeabilità per l'ossigeno, i nutrienti e altri metaboliti idrosolubili, ciò li rende ottimali come scaffold per l'incapsulazione cellulare. Un altro vantaggio di questi materiali è che spesso sono iniettabili e possono essere formati *in situ* tramite fotopolimerizzazione, permettendo così una distribuzione di cellule al loro interno omogenea.



**FIG. 3-2 FORMAZIONE DEL GEL IN SITO, FOTOGRAFIA SCATTATA 24 ORE DOPO L'INEZIONE SUBCUTANEA DELLA SOLUZIONE ACQUOSA DEL COPOLIMERO PEG-PLGA-PEG (33 WT. %) NEI RATTI**

### 3.2.1 Idrogeli a base PEG

Il PEG è il polimero sintetico maggiormente utilizzato per la sintetizzazione di questi idrogeli, in accordo con le sue particolari proprietà, come la solubilità in acqua e in altri solventi organici, la non citotossicità, la bassa adesione delle proteine e la non immunogenicità. Inoltre il gruppo idrossile finale del PEG può essere facilmente modificato con diversi gruppi funzionali come il carbossile, il tiolo e l'acrilato, o trattato come sito di attacco per altre molecole o agenti bioattivi. Gli idrogeli ottenuti dal PEG vengono preparati tramite tre possibili metodi: reticolazione del PEG con radiazioni, polimerizzazione con radicale libero del PEG acrilato e specifiche reazioni chimiche come la condensazione, la reazione di addizione di Michael, click chemistry e la reazione enzimatica.

Per costruire l'idrogelo PEG, il metodo più comune è la fotopolimerizzazione, che usa la luce per convertire soluzioni liquide di PEG in idrogeli solidi a temperatura e pH fisiologici. Questo metodo è vantaggioso per fabbricare idrogeli *in situ* e una varietà di strutture tridimensionali per l'incapsulamento

cellulare e di agenti biologici. I PEG acrilati sono il tipo di macromero maggiormente usato per la fotopolimerizzazione, includendo PEG diacrilato (PEGDA), PEG dimetacrilato (PEGDMA) e PEG multi reticolato (n-PEG) acrilato (n-PEG-Acr) [8].

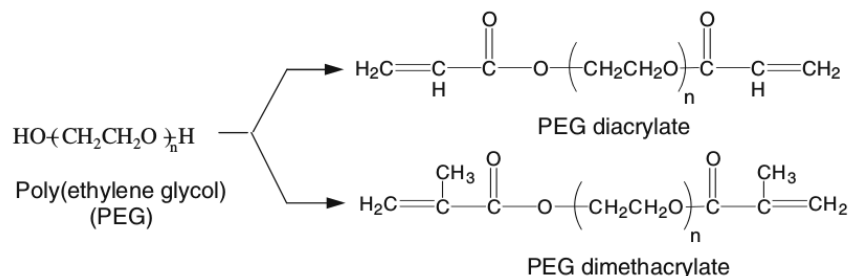


FIG. 3-3 STRUTTURE CHIMICHE DI MACROMERI PEG E DEI SUOI DERIVATI

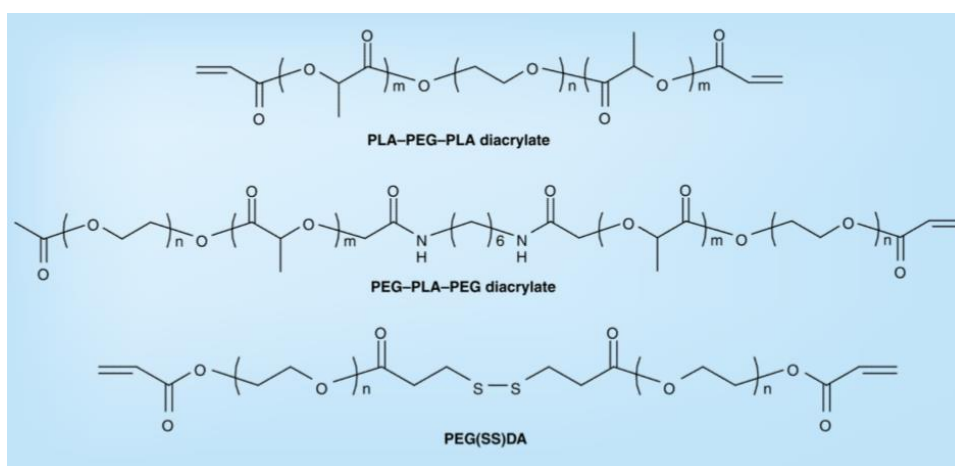
### 3.3 Biodegradazione del PEG

La biodegradabilità è un requisito importante che a volte può essere imprescindibile per una buona funzionalità dello scaffold. È molto importante garantire che la velocità di biodegradazione coincida con la nuova rigenerazione dei tessuti presso il sito delle lesione. Quando è presente la richiesta di biodegradabilità, gli scaffold vengono modificati incorporando nella loro struttura legami scindibili e/o frazioni scindibili. La degradazione è ottenuta successivamente grazie a processi biologici, che riguardano principalmente l'idrolisi e la digestione enzimatica (Ratner BD. Biomaterials science: An introduction to materials in medicine. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2004:p.851). Incorporando segmenti degradabili, si favorisce la biodegradazione: alcuni poliesteri, il polipropilene fumarato (PPF), l'acetale e il disolfuro. I poliesteri preferibilmente valutati per le loro caratteristiche di biodegradabilità sono: acido polilattico (PLA), acido poliglicolico (PGA), poli( $\epsilon$ -caprolattone) e i loro copolimeri. Tali materiali possono essere utilizzati per modificare polimeri idrofili come il PEG, per creare macromeri acrilati o polimeri anfifilici al fine di fabbricare idrogeli biodegradabili per mezzo di reticolazione chimica o fisica. Nella figura 3-4 vengono mostrati i triblocchi (ABA e BAB) di copolimeri PLA-PEG-PLA e PEG-PLA-PEG, sono stati sintetizzati con gruppi acrilati per generare PEG diacrilato modificato con il PLA. Questi macromeri contenenti poliesteri possono essere fotopolimerizzati per formare idrogeli degradabili per idrolisi. La reazione di addizione di



Michael è stata utilizzata per formare idrogeli PEG con una biodegradazione maggiore. Per esempio, il PEGDA, o PEG acrilato multi-braccio, può reagire con molecole contenenti tiolo tramite reazione di Micheal per creare una rete con legame prossimale tioetere e legame estere acrilato. La presenza del legame tioetere stabilisce una carica positiva sul carbonio carbonilico del gruppo estere acrilato, migliorando così la sua reattività verso anioni idrossili nucleofili nella fase primaria della degradazione per idrolisi. Un' altra strategia per migliorare la biodegradazione di idrogeli PEG è quella di incorporare disolfuro nella struttura del PEG diacrilato, PEG(SS)DA (figura 3-4). I legami di disolfuro possono essere scissi dalle molecole contenenti tiolo, come cisteina e glutazione. In questo modo, gli idrogeli risultanti possono essere degradati da peptidi o proteine contenenti cisteina, ciò permette di controllare il rate di degradazione.

Un altro metodo efficace per incorporare naturalmente la capacità di biodegradazione in questi materiali è quella di aggiungere componenti della matrice extra cellulare, come: acido ialuronico, laminina, fibronectina e collagene [12]. Questi elementi portano gli scaffold ad imitare l'ambiente naturale della crescita del tessuto durante la proliferazione cellulare.



**FIG. 3-4 STRUTTURE DI MACROMERI, PLA-PEG-PLA E PEG-PLA-PEG DIACRILATI E PEG (SS) DA PER PREPARARE IDROGELI SINTETICI DEGRADABILI. PEG: POLI (ETILENE GLICOLE); PEG (SS) DA: PEG DIACRILATO CONTENENTE DISOLFURO; PLA:POLI (ACIDO LATTICO)**

## 3.4 Bioattività del PEG

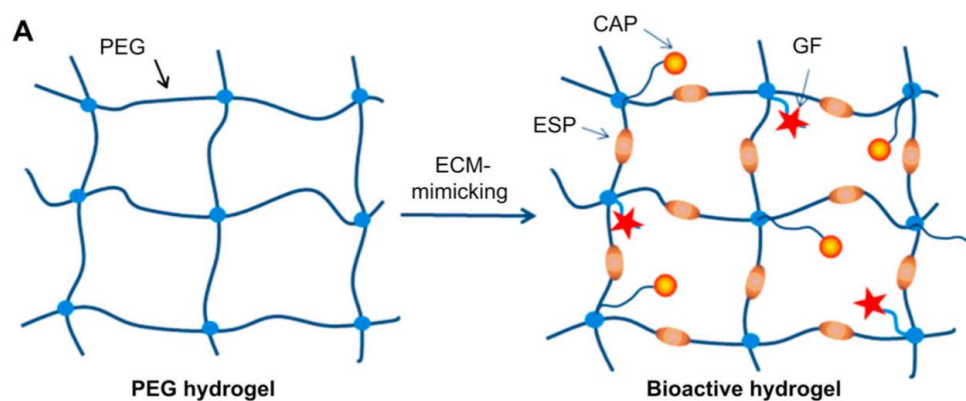
La maggior limitazione degli idrogeli sintetici a base PEG come scaffold, è la mancanza di bioattività specifica per le cellule, un esempio è l'adesione cellulare. Per ovviare a questa limitazione, vengono incorporate all'idrogelo molecole bioattive con l'obiettivo di mediare le funzioni cellulari. Il principio è quello di legare questi elementi bioattivi (peptidi per adesione cellulare (CAP), peptidi sensibili agli enzimi (ESP) e fattori di crescita) alla rete dell'idrogelo, durante o dopo la sua formazione, per imitare le biofunzionalità della matrice extracellulare. Per legare queste molecole bioattive, sono state sviluppate diverse strategie [13].

### 3.4.1 Peptidi per adesione cellulare (CAP)

Questi peptidi derivano principalmente da quattro proteine della ECM, tra cui FN (p. es. RGD, KQAGDV, redV e PHSRN), LN (p. es. YIGSR, LGTIPG), collagene ed elastina. Il peptide che promuove l'adesione cellulare più comune è Arg-Gly-Asp (RGD). Ci sono due forme di peptide RGD, la forma lineare e quella ciclica (cRGD). La sequenza ciclica ha il vantaggio di aumentare l'affinità con le integrine e potenziare l'attività biologica fino a 240 volte in più rispetto alla forma lineare [8]; comporta anche diverse modifiche della struttura: modifica del modulo, dimensione matrice, rapporto di rigonfiamento.

### 3.4.2 Fattori di crescita (GF)

I fattori di crescita si legano a specifici recettori sulla superficie delle cellule bersaglio. Il modo più semplice per legare i GF all'idrogelo PEG è quello di inserirli all'interno della matrice direttamente durante la formazione dell'idrogelo, tuttavia, questo approccio provoca un rapido rilascio nella fase di rigonfiamento iniziale. Presupposto che le proteine vengano generalmente trasportate in canali acquosi nell'idrogelo mediante diffusione, è molto difficile controllare il rilascio nel corso di un lungo periodo di tempo. Il dosaggio di fattore di crescita che deve essere rilasciato nel tempo, è spesso dipendente dalla formazione del tessuto. I GF vengono incorporati nell'idrogelo durante la sua fabbricazione mediante legami covalenti o non covalenti (adsorbimento, interazione elettrostatica) [8].



**FIG. 3-5 MODIFICAZIONE BIOATTIVA DELL'IDROGEL PEG CON MOLECOLE BIOATTIVE COME, PEPTIDI PER ADESIONE CELLULARE (CAP), PEPTIDI SENSIBILI AGLI ENZIMI (ESP) E FATTORI DI CRESCITA (GF)**

### 3.5 Dimensione pori e estensione porosità

La struttura degli scaffold di PEG deve essere altamente porosa ed interconnessa, in modo da ottenere una superficie dell'impalcatura maggiore al suo volume. Questa modifica strutturale serve a facilitare la crescita cellulare, l'omogeneità della distribuzione cellulare all'interno della matrice e la neovascolarizzazione all'interno dello scaffold. I parametri importanti relativi alla conformazione dei pori, per la funzionalità dello scaffold rispetto alla sopravvivenza cellulare sono: la dimensione, il volume, la distribuzione, la forma, la rugosità delle pareti e la loro interconnettività. Per esempio, l'interconnettività deve garantire che le cellule siano almeno a 200  $\mu\text{m}$  dal passaggio di sangue, per provvedere al trasferimento di nutrienti e ossigeno. Anche la dimensione dei pori è un parametro critico; se sono troppo piccoli potrebbero ostruire e inibire l'interazione cellulare, la produzione di ECM e la neovascolarizzazione, mentre se la loro dimensione è eccessivamente grande potrebbero risentirne le proprietà meccaniche dello scaffold. Le dimensioni medie ottimali dei pori sono ad esempio: 5  $\mu\text{m}$  per garantire la neovascolarizzazione, per la crescita dei fibroblasti 5-15  $\mu\text{m}$ , per gli epatociti 20  $\mu\text{m}$ , per la rigenerazione di pelle di mammifero adulto 20-125  $\mu\text{m}$  e 200-350  $\mu\text{m}$  per l'osteconduzione [12]. Esistono diverse tecnologie di fabbricazione per introdurre l'adeguata porosità all'interno di uno scaffold.

### 3.5.1 Particle leaching

La particle leaching, o porogen leaching, è una tecnica molto utilizzata per la formazione di pori funzionali all'interno di uno scaffold. Una soluzione di polimero viene dissolta in un solvente dove sono state distribuite uniformemente particelle di sale (porogen) con una specifica dimensione [14]. Successivamente si fa evaporare il solvente, in modo da ottenere un composto di materiale con all'interno particelle di sale distribuite omogeneamente. La matrice del polimero viene immersa in un'altra soluzione acquosa per consentire la lisciviazione del sale, quindi la sua dissoluzione. Si ottiene così una matrice tridimensionale altamente porosa, dove la dimensione dei pori dipende dal diametro delle particelle di sale utilizzate inizialmente.

Il vantaggio di questa tecnica è che la dimensione dei pori, e quindi anche le proprietà meccaniche dello scaffold, può essere facilmente regolata controllando la dimensione e la geometria del porogen. Lo svantaggio principale è che si utilizzano solventi organici citotossici, per tale motivo, successivamente alla fabbricazione, lo scaffold deve essere ripetutamente lavato per assicurare una completa rimozione del solvente.

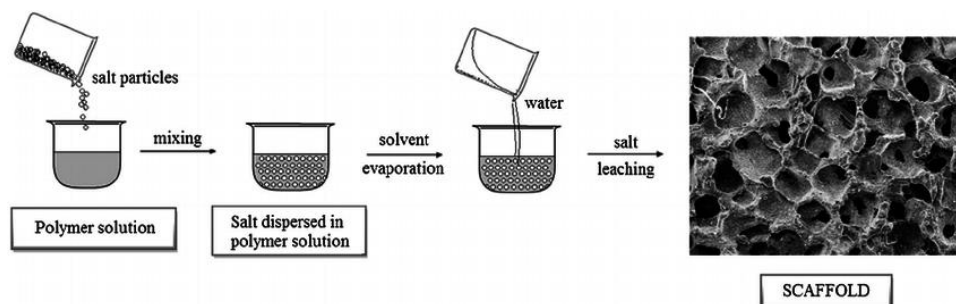


FIG. 3-6 TECNICA DI PARTICLE LEACHING PER LA FABBRICAZIONE DI SCAFFOLD POROSI

### 3.5.2 Gas foaming

Il gas foaming è un'altra tecnica di biofabbricazione di scaffold porosi. Uno scaffold polimerico viene saturato con un agente schiumogeno (p. es. diossido di carbonio, azoto o acqua a pressioni elevate), la pressione di questo agente viene diminuita, portando alla diminuzione della solubilità del gas nel polimero; il risultato di questa instabilità termodinamica sarà la formazione di bolle di gas all'interno del polimero. Questa tecnica ci permette di ottenere una dimensione dei pori compresa tra i 100 e i 500  $\mu\text{m}$ . Il vantaggio di questa

manipolazione è che si utilizzano agenti schiumogeni relativamente inerti e non vengono coinvolti solventi citotossici, tuttavia spesso solo il 10-30 % dei pori sono interconnessi, ciò comporta limitazioni di diffusione per le cellule incapsulate nello scaffold [14]. La limitata interconnessione è dovuta alla formazione di sottili strati di materiale tra bolle adiacenti, per ovviare a questo problema si possono integrare cristalli di sale nella massa del polimero idrofobo prima della fase di espansione del gas; dopo l'espansione si dissolvono i cristalli in acqua. Il PEG diacrilato schiumato con bicarbonato di ammonio mostra una completa interconnessione anche senza la necessità di particolari precauzioni [15].

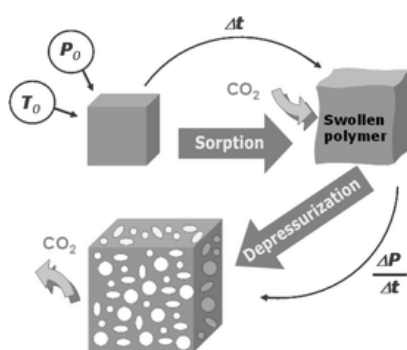
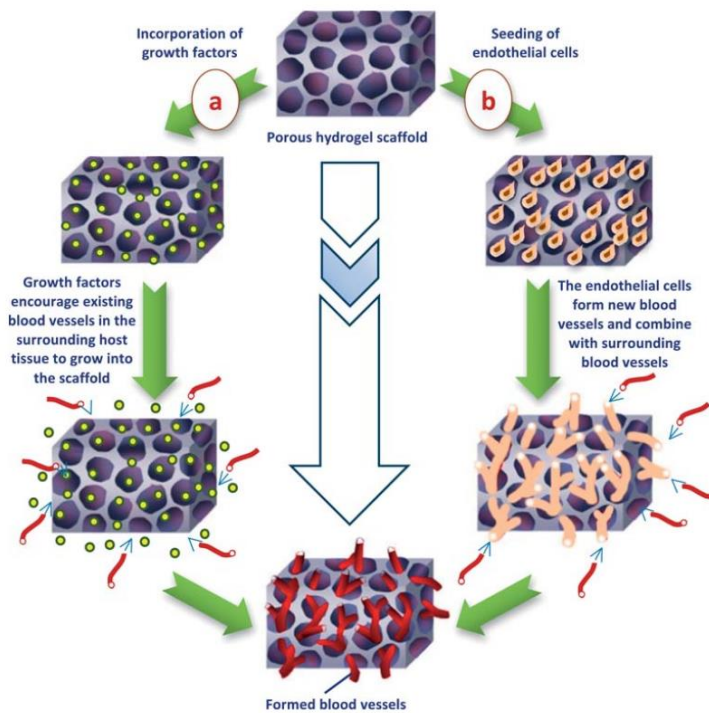


FIG. 3-7 FASI DI FABBRICAZIONE DEL GAS FOAMING

### 3.6 Vascolarizzazione

La vascolarizzazione del tessuto è essenziale per fornire un mezzo dove possa avvenire lo scambio di nutrienti e l'eliminazione dei prodotti di scarto, attraverso la perfusione. La formazione di vasi sanguigni nei tessuti adulti (neovascolarizzazione) è quindi un fattore chiave per la progettazione. La vascolarizzazione è influenzata dall'architettura fisica dello scaffold. Tipicamente le cellule necessitano di un diametro tra i 100 e i 200  $\mu\text{m}$  del vaso affinché possano ricevere ossigeno e nutrienti in maniera sufficiente per sostenere le loro funzioni. In generale esistono due approcci principali per incoraggiare la vascolarizzazione del tessuto nello scaffold. Nel primo vengono incorporati fattori di crescita vascolari nella matrice dello scaffold per favorire il processo di formazione nei tessuti circostanti. Il secondo metodo invece prevede la semina all'interno dello scaffold di cellule endoteliali. Per il PEG ci si avvale generalmente del primo metodo per introdurre vascolarizzazione all'interno della sua architettura [12].



**FIG. 3-8 METODI PER INDURRE LA FORMAZIONE DI UNA RETE VASCOLARE ALL'INTERNO DI UNO SCAFFOLD**

### 3.7 Applicazioni alternative del PEG: detossinazione e drug delivery

La scelta di utilizzare questo materiale piuttosto che altri deriva dalle versatili caratteristiche del glicole polietilenico, che lo rendono un ottimo candidato per la costruzione di scaffold. Oltre ad avere diverse applicazioni nell'ingegneria dei tessuti, il PEG viene impiegato anche per altri e importanti scopi, quali: l'utilizzo come materiale detossinante e supporto per il drug delivery.

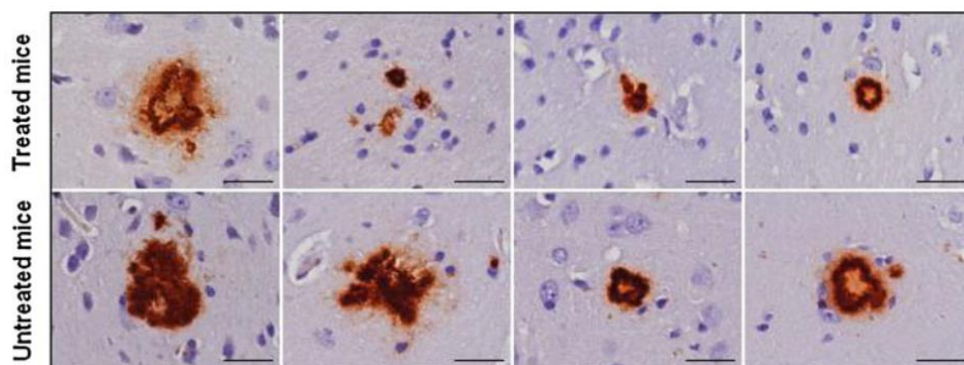
#### 3.7.1 Detossinazione

La detossinazione è un impiego particolare che prevede l'utilizzo del biomateriale come una sorta di filtro, atto ad intercettare e portare all'eliminazione determinate sostanze nocive per l'organismo. Relativamente al PEG, un'applicazione interessante è quella che vediamo nel caso del trattamento di detossinazione del cervello soggetto alla patologia dell'Alzheimer.

La malattia di Alzheimer (AD) è una malattia neurodegenerativa debilitante tra le più comuni, che colpisce maggiormente la fascia della popolazione al di sopra dei 65 anni. Attualmente l'eziologia di questa patologia non è interamente compresa e conosciuta e gli studi che la riguardano sono ancora pienamente attivi. E' causata dall'aggregazione e accumulo di un peptide di 39-43 aminoacidi (beta amiloide o A $\beta$ ) nel parenchima cerebrale e cerebrovascolare. Insieme ad altre componenti in quantità minore, formano le placche senili. L'approccio farmacologico indicato consiste nell'ostacolare l'interazione A $\beta$ -A $\beta$  e interrompere il processo di aggregazione. I ligandi peptidici capaci di legarsi alla regione KLVFF (aminoacidi 16-20) nelle molecole A $\beta$ , sono stati investigati come possibili farmaci adeguati. Il peptide retro inverso (RI) del suddetto pentapeptide, ffv $\beta$ lk, ha dimostrato di sapersi legare con moderata affinità alle fibrille artificiali realizzate con molecole A $\beta$ . Si è ipotizzato quindi che fosse possibile sintetizzare un "detox gel", ossia un gel detossinante, mediante legami covalenti della versione tetrameric (RI) del peptide ffv $\beta$ lk alle catene polimeriche del glicole polietilenico, con l'obiettivo di catturare i peptidi A $\beta$  dell'ambiente circostante.

Tjernberg (1996) dedusse che il segmento KLVFF della sequenza nativa della A $\beta$  fosse di importanza critica nella polimerizzazione delle fibrille; i peptidi che incorporano questa sequenza legano A $\beta$  e bloccano la formazione delle fibrille A $\beta$ -40-42. I peptidi composti da D-aminoacidi di questa sequenza, hanno dimostrato di essere efficaci nel prevenire la formazione delle fibrille amiloidi con una maggior resistenza alla proteasi. La tecnologia della retro inversione invece comporta l'inversione della sequenza primaria del peptide e il rimpiazzo degli L-aminoacidi con D-aminoacidi. Questo interessante sviluppo basato sull'inversione del legame del peptide e della chiralità ha costituito una maggior possibilità di progettare terapie all'avanguardia basate sui peptidi (Kokkoni et al. 2006). I ricercatori hanno capito che il peptide retro inverso (RI), ffv $\beta$ lk, della sequenza nativa KLVFF, lega fibrille artificiali a base di A $\beta$  con affinità moderata e che l'aumento del numero di copie dei peptide ha un effetto additivo sull'affinità per A $\beta$  (Zhang et al. 2003). E' stato introdotto un recente concetto basato sul "sink periferico" per inibire l'accumulazione di placche nel cervello. Questo modello si basa sulla constatazione che i peptidi A $\beta$  possono uscire dal loro sito di appartenenza verso la periferia

(Strazielle et al. 2000). Pertanto, potrebbe essere possibile sbilanciare il processo verso la rimozione piuttosto che verso l'accumulo di A $\beta$  nel SNC, basata sulla premessa che A $\beta$  si equilibra fra SNC e la periferia. La terapia che si andrà ad approfondire è quella relativa al "detox gel" che lega le proprietà degli agenti leganti A $\beta$  alle caratteristiche dell'idrogel a base PEG. Viene quindi esplorato l'approccio che prevede l'utilizzo del "sink periferico" per eliminare i peptidi amiloidi dalle zone interessate. Questi gel contengono la versione tetrameric del peptide ffvlk che si lega efficacemente ed irreversibilmente ai peptidi A $\beta$ -42 (Sundaram et al. 2008). Quindi essenzialmente questi detox gel sono costituiti da peptidi RI legati covalentemente alle catene polimeriche del glicole polietilenico; il PEG è stato scelto come blocco strutturale per questo nuovo tipo di idrogel perché è non tossico, non immunogenico e altamente idrosolubile. Incorporando il peptide retro inverso all'idrogel a base PEG si aumenta l'emivita della molecola e si previene l'immunogenicità. Legare peptidi o proteine al PEG prevede l'utilizzo di un processo chiamato PEGilazione, che generalmente migliora la cinetica del farmaco, aumenta il tempo di circolazione e diminuisce la tossicità. Il modello descritto si riferisce alla sperimentazione su cavie affette da AD (APPSWE-Tg2546) (Hsiao et al. 1996). Il detox gel viene iniettato per via sottocutanea nei topi e attira i peptidi di beta amiloide. I risultati mostrano che il trattamento con il detox gel porta ad una riduzione dell'amiloide nel cervello, migliorando simultaneamente i parametri di memoria relativi senza alcuna risposta immunitaria osservabile.



**FIG. 3-9 IMMUNOISTOLOGIA DI SEZIONI DI CERVELLI TRATTATI DI TOPI APPSWE (TG2546) A SEGUITO DELL'INIEZIONE SUBCUTANEA DI PEPTIDE RI CONTENENTE DETOX GEL (TREATED MICE), E NESSUNA INIEZIONE (UNTREATED MICE). NEL COMPLESSO, GLI ANIMALI TRATTATI HANNO PLACCHE DI DIMENSIONE INFERIORE RISPETTO A QUELLE PRESENTI NELLE SEZIONI NON TRATTATE**



I risultati sono promettenti in quanto vi è una riduzione delle dimensioni delle placche presenti nelle sezioni di cervello dei topi trattati con il detox gel, rispetto ai topi di controllo non trattati. Quattro su quattro animali del gruppo non trattato possiedono placche di dimensioni complessive maggiori in media rispetto ad un solo animale su cinque del gruppo trattato.

Un altro fattore da considerare è che nei soggetti affetti da questa patologia è frequente la tendenza alla perdita di peso col progredire della malattia (Morgan e Gordon 2008; Holcomb et al. 1998). E' stato osservato un fenomeno simile nei controlli effettuati sui topi non trattati con il detox gel, mentre sulle altre cavie si è notato un aumento del peso nel tempo. Ciò testimonia un esito favorevole poiché indica un'inversione verso la normale fisiologia. I dati ottenuti sui livelli di A $\beta$ -42 hanno mostrato una riduzione del 30% nei topi trattati con il gel. Questo suggerisce una clearance dell'A $\beta$  dovuta alla capacità sequestrante del detox gel; i risultati indicano anche un aumento del 50% dei livelli circolanti di A $\beta$ -42 nel gruppo trattato rispetto a quello dove non è avvenuta l'iniezione. Questa osservazione conferma l'efflusso di A $\beta$ -42 dal cervello alla periferia (Demattos et al. 2002) confermando così la nostra ipotesi del "sink periferico". Inoltre la dimensione delle placche cerebrali trattate si presenta ridotta in confronto alle placche non trattate, con conseguente aumento della memoria nei soggetti trattati.

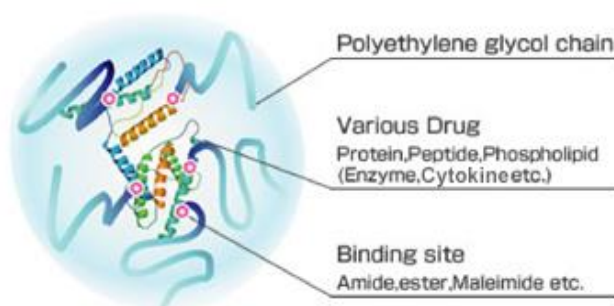
L'immunogenicità è uno dei principali effetti avversi osservati in altri studi che utilizzano l'immunoterapia per il trattamento dell'Alzheimer. Esaminando le risposte del sistema immunitario durante l'utilizzo del detox gel, osserviamo che la formulazione non ha provocato risposte immunitarie (Bayer et al. 2005; ORGOGOZO et al. 2003) [16].

### 3.7.2 Drug delivery

La drug delivery, è la distribuzione del farmaco all'interno dell'organismo. Spesso questo processo è utilizzato nell'ingegneria tissutale per promuovere e velocizzare la rigenerazione dei tessuti. Esistono diverse modalità di somministrazione dei farmaci e la maggior parte di queste richiede l'utilizzo di mezzi e supporti; ciò implica che ci sia un'interazione tra il biomateriale e i tessuti biologici; questa interazione non deve comportare rigetto, l'innescamento di risposte immunitarie o la perdita di funzionalità [17]. E' importante che non

ci sia un rapido riconoscimento dei farmaci o dei carrier da parte del sistema immunitario, perché questo comporterebbe un'immediata clearance per rimuovere le molecole ritenute estranee o dannose. La soppressione o la diminuzione di queste interazioni con componenti del sangue (opsonizzazione), porta alla conseguente riduzione della clearance del sangue da trasportatori di farmaci e simili; questo fenomeno viene detto effetto "stealth". I veicoli utilizzati nel drug delivery possono essere rivestiti con un polimero idrofilo per consentire l'inibizione della già citata opsonizzazione e la promozione dell'idrosolubilità. I supporti stessi possono essere costituiti da diversi materiali, come miscele di polimeri, compositi a base di polimeri e materiali ceramici o vetri bioattivi. Nel caso dei polimeri il farmaco viene depositato all'interno della matrice durante la fase della polimerizzazione attraverso tecniche come, l'inclusione, la miscelazione meccanica, compressione diretta o granulazione per via umida. Le dimensioni della struttura e dei pori alterano la distribuzione e la cinetica.

Il PEG è il polimero idrofilo non ionico più comunemente usato nelle applicazioni "stealth", inoltre ha la capacità di ridurre la tendenza delle particelle ad aggregarsi, permettendo così la formazione di formulazioni più stabili sia durante lo stoccaggio che durante la distribuzione. La capacità del PEG di influenzare le proprietà farmacocinetiche è attualmente utilizzata in un'ampia varietà di applicazioni consolidate ed emergenti nella farmaceutica.



**FIG. 3-10 RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DEL PEG COME SUPPORTO PER LA DRUG DELIVERY**

Questa capacità di schermare il farmaco per tempi prolungati all'interno della circolazione sanguigna, aumenta la probabilità che il farmaco raggiunga il suo sito d'azione prima di essere riconosciuto come estraneo ed eliminato dal corpo. Di conseguenza la maggior parte dei farmaci coniugati, nonché formu-

lazioni micellari e liposomiali, sul mercato o in via di sperimentazione chimica avanzata, sono prodotti contenenti PEG. L'effetto del rivestimento di PEG sulle microsfele di poly(lactic-co-glycolic acid) è stato riportato nel 1994 da Gref et al.. Gli autori hanno dimostrato che il 66% delle particelle non rivestite, sono state rimosse dal fegato solo cinque minuti dopo l'iniezione, mentre meno del 30% delle nanosfele ricoperte con PEG (di peso 20 kDa) sono state catturate dal fegato, due ore dopo l'iniezione [18]. Gli idrogeli a base di polietilenglicole (PEG) sono ampiamente utilizzati in una varietà di applicazioni biomediche, comprese le matrici per il rilascio controllato di farmaci a basso peso molecolare, acidi nucleici, peptidi e proteine.

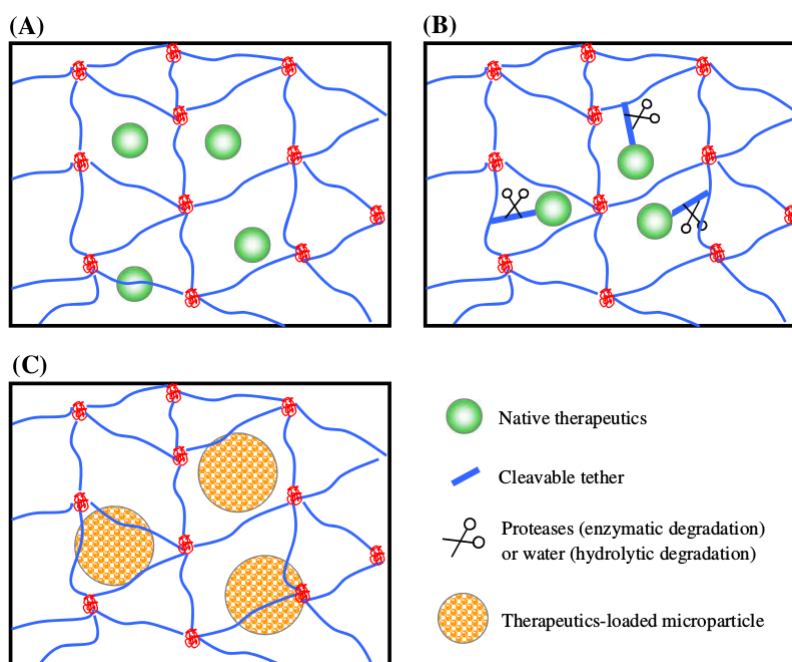
A causa della diversità nella chimica e nella dimensione delle molecole trasportate, i criteri di progettazione per il rilascio controllato in questi idrogeli può differire ampiamente da un'applicazione all'altra. Tuttavia, la *disponibilità* e la *stabilità* di queste terapie sono parametri fondamentali per la progettazione di idrogeli PEG per questo tipo di utilizzi. Il parametro della *disponibilità* riguarda la capacità dello scaffold di rilasciare farmaci nella giusta dose, mentre la *stabilità* si riferisce alla qualità di preservare la bioattività cellulare durante il rilascio. [17]

I meccanismi con cui i farmaci vengono rilasciati dagli idrogeli PEG dipendono da molteplici fattori, che includono:

- Le modalità di caricamento del farmaco
- La dimensione del farmaco
- Le caratteristiche molecolari
- Il profilo del dosaggio e del rilascio richiesti

Generalmente, i meccanismi di rilascio molecolari per questi idrogeli prevedono: diffusione controllata, gonfiore controllato e consegna chimicamente controllata. Per il rilascio di molecole a basso peso molecolare come i farmaci sintetici, piccoli peptidi o proteine, l'alta permeabilità degli idrogeli PEG non permette una semplice manipolazione delle cinetiche di rilascio. Un modo semplice per controllare queste cinetiche è modificare la permeabilità del gel, regolando la densità della reticolazione del polimero. Tuttavia questo approccio si basa sull'esclusione dimensionale e non è efficace quando si tratta di

rilascio di piccole molecole. Non è auspicabile, per la maggior parte delle applicazioni di ingegneria tissutale, aumentare la densità di reticolazione del gel, in quanto ciò rappresenterebbe una diminuzione dell'idrofilia e di conseguenza anche della citocompatibilità. Pertanto, è necessario sfruttare altri meccanismi di controllo, allo scopo di mantenere gli ambienti idrofili che caratterizzano gli idrogeli PEG; ad esempio, una varietà di idrogeli “intelligenti” che modificano il loro rapporto di rigonfiamento volumetrico in risposta a stimoli esterni. Rispondendo quindi a determinati stimoli fisiologici come pH, temperatura e forza ionica, questi idrogeli possono passare da uno stato collassato ad uno rigonfio. Nel primo caso i farmaci incapsulati sono protetti da fattori nocivi esterni come la degradazione proteolitica, e verranno successivamente rilasciati in condizioni di stato rigonfiato sotto determinati stimoli. Un'altra strategia per questo tipo di distribuzione è la tecnica “pro-farmaco”. In questo approccio, i farmaci vengono legati covalentemente agli idrogeli PEG, attraverso i gruppi funzionali pendenti.



**FIG. 3-11 METODI PER INSERIRE IL FARMACO NELL'IDROGEL PEG:**

- A. I FARMACI SONO CARICATI NELL'IDROGEL IN SITU.
- B. I FARMACI VENGONO LEGATI ALLA MATRICE TRAMITE LEGAMI DEGRADABILI PER IDROLISI O AZIONE ENZIMATICA.
- C. I FARMACI VENGONO PRE CARICATI IN STRUTTURE, E POI CARICATI NEL PEG

L'incorporazione di linker biodegradabili tra il sito e il farmaco permette un tasso di rilascio e liberazione pre determinato. Esistono una varietà di meccanismi di degradazione tra cui quella idrolitica e quella enzimatica. Sebbene questo ultimo tipo di degradazione sia un mezzo efficace per controllare la disponibilità del farmaco con tassi di rilascio determinati, preservando l'idrofilia del PEG, lo svantaggio che lo caratterizza è che la coniugazione covalente dei farmaci potrebbe diminuire la bioattività dei farmaci stessi, soprattutto quando le terapie bersaglio sono proteine e peptidi fragili. Inoltre la chimica dei linker deve essere progettata con cura ed essere biocompatibile in modo da non generare risposte immunitarie indesiderate a causa della presenza di resti di linker parzialmente degradati.

Recentemente è stata suggerita un'ulteriore alternativa per controllare la disponibilità del farmaco in idrogeli altamente idratati. Sono stati scoperti ligandi che formano legami reversibili per indirizzare le terapie e copolimerizzandoli all'interno di questi idrogeli li si può rendere inerti rispetto all'affinità con determinati farmaci. L'uso di questi idrogeli affini, oltre a rendere facile il controllo del rilascio dei farmaci in ambienti altamente permeabili, permette di eliminare la necessità di modificazioni chimiche dirette su terapie fragili come le proteine. Ad esempio la ciclodestrina può essere legata nell'idrogelo a base PEG per il rilascio controllato di farmaci idrofobi a basso peso molecolare. L'eparina, un glicosaminoglicano altamente solfato (GAG), è stata ampiamente utilizzata per fabbricare idrogeli affini, grazie alla sua affinità reversibile ad una vasta gamma di fattori di crescita.

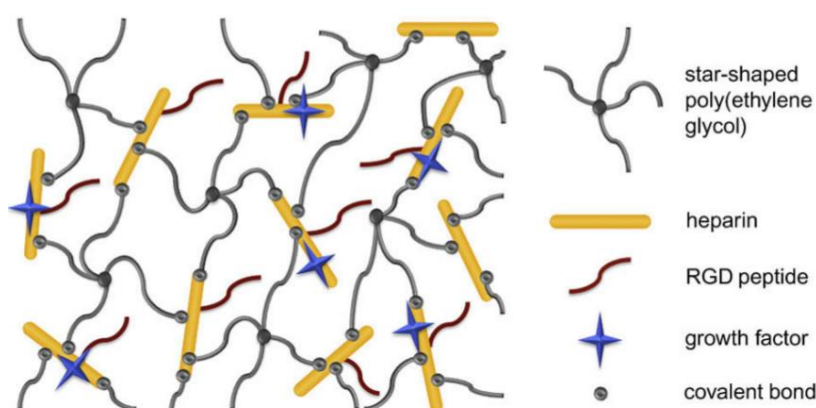


FIG. 3-12 SCHEMATIZZAZIONE DI UNO SCAFFOLD CON DIVERSE MODIFICHE STRUTTURALI

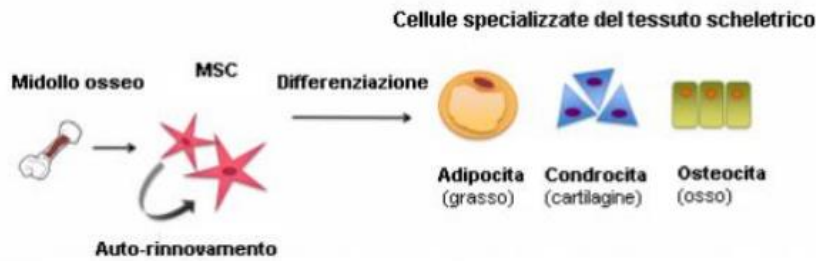
## 4 CASO DI STUDIO

### 4.1 Introduzione al caso di studio

In questo ultimo capitolo dell'elaborato si tratterà in modo dettagliato un caso particolare di applicazione del glicole polietilenico; un'applicazione innovativa del PEG come scaffold per il differenziamento di cellule staminali mesenchimali, per ottenere tessuti ossei e cartilaginei. La tecnica di fabbricazione dello scaffold utilizzata è quella della biostampa 3D a getto di inchiostro. Questo tipo di manipolazione è uno degli approcci di produzione additiva più promettenti per la fabbricazione di tessuti, presenta infatti diversi vantaggi tra cui: alta velocità, alta risoluzione e costo ragionevole. L'innovazione di questo studio riguarda la possibilità di eseguire contemporaneamente i passaggi che riguardano la fabbricazione dello scaffold e l'incapsulamento cellulare, in un'unica fase combinata; i vantaggi di questa semplificazione sono una minima manipolazione del materiale biologico, un minor tempo di fabbricazione e la possibilità di realizzare strutture molto complesse dei costrutti. Sono stati utilizzati anche peptidi acrilati coniugati allo scaffold di PEG per aumentare la sua biocompatibilità, mentre l'intasamento della testina di stampa (problema frequente di questa tecnologia) è stato fortemente limitato grazie alla bassa viscosità del polimero PEG. I tessuti osseo e cartilagineo biostampati hanno dimostrato di avere un'ottima mineralizzazione e una buona deposizione della matrice, comportando proprietà meccaniche significativamente migliori rispetto a quelle di tessuti formati sulla base di idrogeli naturali.

### 4.2 Cellule mesenchimali staminali

Le cellule mesenchimali staminali o stromali (MSC) sono cellule staminali adulte multipotenti che, al momento il differenziamento, possono specializzarsi in condrociti, osteociti o adipociti [27].



**FIG. 4-1 SCHEMATIZZAZIONE DEL PROCESSO DI DIFFERENZIAMENTO DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI**

La maggior parte delle staminali mesenchimali adulte si trova nel midollo osseo, insieme ad altre svariate tipologie di cellule staminali ematopoietiche (HSC). Essendo le MSC solo lo 0.001 - 0.01 % delle cellule appartenenti al midollo osseo, isolare la frazione cellulare di interesse, si rivela essere un compito complicato, ma attuabile grazie alla capacità adesiva delle MSC. Nonostante alcune difficoltà, le MSC sono comunque preferibili a cellule adulte differenziate o a cellule staminali embrionali, in quanto non implicano rilevanti problematiche etiche o tecniche. Lo svantaggio di utilizzare cellule autologhe differenziate è il numero limitato di cellule utili prelevabili durante la biopsia, la quale oltretutto diminuisce significativamente il fenotipo cellulare durante la distribuzione sul monostrato. In confronto le cellule mesenchimali staminali provenienti dal midollo osseo umano, sono relativamente più abbondanti. Per molti anni il midollo osseo è stato considerato come la principale fonte di MSC, tuttavia l'invasività delle procedure di prelievo e la progressiva riduzione del numero di cellule con l'avanzare dell'età, hanno portato i ricercatori allo studio di nuove fonti, come il sangue venoso periferico, il sangue del cordone ombelicale, la placenta e il tessuto adiposo; quest'ultimo in particolare è considerato la fonte di staminali più promettente in quanto permette di ottenere un elevato numero di cellule attraverso lipoaspirazione, mantenendo lo stesso potenziale di differenziamento delle mesenchimali provenienti dal midollo. Queste cellule staminali possiedono fattori di crescita che inibiscono l'apoptosi, stimolano il differenziamento e non inducono una risposta da parte del sistema immunitario locale.

### 4.3 Tessuto osseo

Il tessuto osseo è un tessuto connettivo che si distingue per la sua durezza e le sue caratteristiche meccaniche: resistenza alla compressione, alla trazione e alla torsione. Questo particolare comportamento meccanico conferisce al tessuto osseo le proprietà ideali per svolgere funzioni strutturali e di sostegno, mentre la sua composizione rappresentata in prevalenza da fosfati di calcio, lo rende un'importante riserva di calcio e fosforo.

La struttura di questo tessuto si basa sulla presenza di matrice intercellulare e cellule caratteristiche, gli *osteociti*. La matrice è composta per un 22% da materiale organico e per circa il 69% di componente inorganica. L'elasticità e la resistenza alla trazione dell'osso sono dovute alla componente organica che si divide in una parte fibrosa ed una interfibrillare. Il 90% delle fibre che organizzano la parte fibrosa sono di collagene di tipo I e sono immerse nella soluzione amorfa interfibrillare, formata da glicoproteine e proteoglicani. La matrice minerale inorganica dell'osso si compone di: fosfato di calcio, carbonato di calcio, fosfato di magnesio e fluoruro di calcio. La componente più importante (ca. 85%) consiste in cristalli aghiformi di lunghezza pari a 20-40 nm e spessore 1.5-3 nm di *idrossiapatite*  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ . All'interno del tessuto osseo esistono quattro tipologie di cellule: osteoprogenitrici o preosteoblasti, osteoblasti, osteociti, osteoclasti. Il processo di formazione dell'osso ha origine con la proliferazione dei preosteoblasti, che si trasformano in osteoblasti; questi secernono collagene, proteoglicani e glicoproteine. Terminata la deposizione della sostanza ossea intercellulare, gli osteoblasti diventano osteociti e rimangono intrappolati nella matrice ossea calcificata. In risposta ad alterazioni nel contesto ambientale, gli osteociti sono in grado di tornare osteoblasti. In ultimo, gli osteoclasti sono cellule giganti polinucleate, coinvolte nella demolizione della struttura dell'osso, che viene sostituita da un trabecolato osseo [2].

### 4.4 Tessuto cartilagineo

Il tessuto cartilagineo, come il tessuto osseo, appartiene ai tessuti scheletrici, o tessuti connettivi di sostegno, ed è dotato di proprietà funzionali quali la resistenza alla tensione e l'elasticità. La cartilagine è composta da *condrociti* e una matrice extracellulare, nel quale sono immersi. La matrice amorfa del



tessuto cartilagineo, diversamente da altri tessuti connettivi, è solida e si compone di: collagene, proteoglicani e glicoproteine. I condrociti sono contenuti in cavità presenti all'interno della sostanza intercellulare, note come *lacune*. Nei mammiferi, durante lo sviluppo dell'organismo, la cartilagine forma la struttura primaria della quasi totalità dello scheletro e successivamente viene sostituita dall'osso, ad esclusione delle zone in corrispondenza delle articolazioni. Negli individui adulti permane all'interno delle articolazioni e forma inoltre la struttura di sostegno di: orecchio esterno, naso, laringe, trachea e bronchi. Contrariamente a quanto succede negli altri tessuti connettivi, nella cartilagine non sono presenti vasi e nervi, mentre è costituita sulla sua superficie da un rivestimento fibroso compatto, chiamato *pericondrio*. Le funzioni metaboliche del tessuto connettivo avvengono per diffusione attraverso la matrice gelificata che lo compone [2]. Le cartilagini sono classificabili in base alla quantità relativa di sostanza amorfa e fibre riscontrabili, ne esistono tre tipi: *cartilagine ialina*, *cartilagine elastica* e *cartilagine fibrosa*.

## 4.5 Differenziamento osteogenico e condrogenico

Affinchè si possano generare tessuti con successo, è necessario riprodurre un ambiente favorevole dove le cellule possano sopravvivere e proliferare; inoltre, essendo molte tipologie di cellule ancoraggio-dipendenti, è importante fornire un supporto meccanico che funga da substrato, lo scaffold. Gli stimoli che inducono il differenziamento provengono dunque sia dallo scaffold, che dall'ambiente biochimico in cui sono immerse le cellule. Relativamente all'ambiente colturale si utilizzano elementi chimici in grado di attivare particolari geni caratteristici, tali da differenziare la cellula, quali fattori di crescita, enzimi e farmaci. Il differenziamento osteogenico *in vitro* si verifica quando le cellule staminali mesenchimali vengono trattate con desametasone,  $\beta$ -glicerofosfato e acido ascorbico. Dopo pochi giorni di coltura le cellule cominciano a sintetizzare alti livelli di collagene di tipo I e fosfatasi alcalina (ALP), enzima necessario per il processo di calcificazione.

Esprimono inoltre la presenza di:

- *Osteonectina*: proteina dotata di alta affinità per il  $\text{Ca}^{2+}$ . Agisce come elemento di nucleazione dei cristalli minerali, creando così le condizioni per avviare la precipitazione del fosfato di calcio e quindi la mineralizzazione.
- *Osteopontina*: proteina coinvolta nel processo di aggregazione cellulare.
- *Osteocalcina*: proteina prodotta tardivamente nello sviluppo dell'osso, rappresenta un fattore chemiotattico per i precursori degli osteoclasti, influenza quindi la loro attività nell'ambito del rimodellamento osseo.

Le cellule staminali mesenchimali differenziano invece in condrociti se collocate in colture contenenti desametasone, ascorbato-2-fosfato, insulina, acido selenioso, transferrina, piruvato di sodio, fattore di crescita TGF- $\beta$ 1. In queste condizioni di coltura le cellule staminali perdono il fenotipo fibroblastoide e cominciano ad esprimere molecole della EMC cartilaginea; in particolare si può osservare un marcato aumento della biosintesi di glicosaminoglicani (GAG) e altri componenti della cartilagine articolare matura: aggregani, fibromodulina e collagene di tipo II. Allo stesso tempo si può notare un calo proliferativo progressivamente con la perdita del fenotipo staminale [1].

## 4.6 Tecnologia e tecniche della biostampa 3D

I metodi di fabbricazione standard per gli scaffold, come l'elettrospinning, il gas foaming, particle leaching, hanno dimostrato di essere all'altezza per applicazioni rigenerative semplici e riguardanti una sola tipologia di tessuto. E' necessaria flessibilità da parte della tecnologia di fabbricazione, affinché sia possibile riprodurre strutture biomimetiche tridimensionali complesse, adatte a sostenere la formazione di tessuti multicellulari e multifunzione. Per affrontare questo tipo di problematiche è stato approfondito lo studio di tecniche additive (additive manufacturing AM), in particolare la stampa 3D, come metodi di fabbricazione di costrutti tessutali. Il bioprinting quindi, mediante il supporto di modelli digitali 2D e 3D disegnati in CAD (*Computer-Aided Design*), è in grado di generare strutture impiegabili nella sostituzione o rigene-

razione dei tessuti, mediante una deposizione progressiva di strati. La complessità della morfologia e dell'architettura dei tessuti può essere delineata per mezzo di tecnologie per l'imaging come la risonanza magnetica (MRI) o la tomografia computerizzata (CT). Il modello digitale di partenza in CAD, disegnato a partire dai dati ottenuti da MRI e CT, viene poi convertito nelle istruzioni necessarie per guidare i componenti dell'hardware nella realizzazione fisica del costrutto [20].

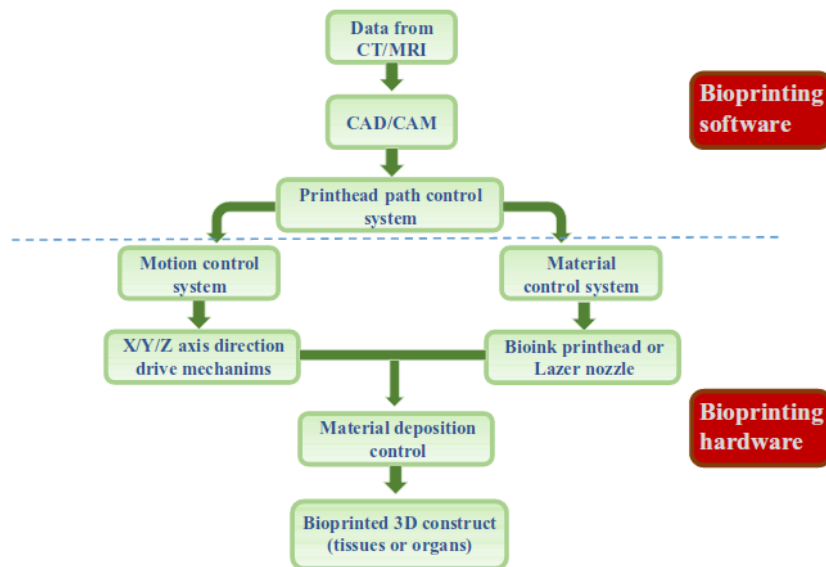


FIG. 4-2 SCHEMA GENERALE DELLA TECNICA DI BIOSTAMPA 3D

Gli elementi costitutivi delle tecnologie di bioprinting sono:

- Bioprinter: il dispositivo mediante il quale avviene l'erogazione del bioink.
- Bio-inchiostro (*Bioink*): può essere costituito da cellule, aggregati cellulari, proteine, fattori di crescita o altri materiali biologici e viene stampato in maniera alternata e stratificata con la bio-carta.
- Bio-carta (*Biopaper*): la struttura base su cui viene depositato il bioink, strato per strato; l'insieme di biopaper e bioink va a definire il costrutto finale desiderato da cui si otterrà il tessuto.
- Bioreattore: ambiente nel quale si posizionano i costrutti al fine di farli maturare e proliferare.

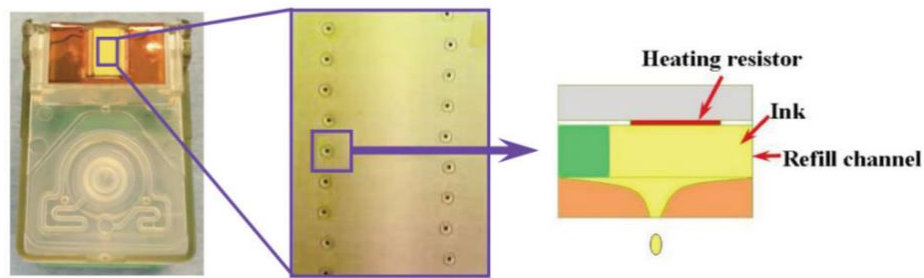
#### 4.6.1 Inkjet-based bioprinting

Nei casi di complessità maggiore della struttura da riprodurre, la biostampa ci permette di stampare contemporaneamente le cellule e lo scaffold, con una simultanea polimerizzazione del substrato mediante calore o luce ultravioletta. Il metodo in particolare è la biostampa a getto di inchiostro (*Inkjet Bioprinting*) che prevede una precisa deposizione di gocce di bioink su una struttura chiamata biopaper, stampando uno strato dopo l'altro della struttura (*layer-by-layer*) in modo da riprodurre il tessuto in tutta la sua complessità. La stampa a getto di inchiostro è una tecnologia che non richiede il contatto con il materiale stampato, ciò permette di evitare attriti che potrebbero lesionare le cellule una volta depositate. Le gocce di inchiostro espulse dalla testina sono di dimensione inferiore ai 30  $\mu\text{m}$  di diametro, questo fornisce una risoluzione di stampa eccellente.

La biostampa a getto di inchiostro si può riprodurre secondo due differenti metodologie: CIJ (*Continuous Ink-Jet*) e DOD (*Drop-on-Demand*).

Nel primo caso il flusso di goccioline prodotte dall'ugello microscopico del bioprinter è continuo, viene deviato mediante un campo elettrico nei punti in cui non è richiesta la deposizione del bio-inchiostro e raccolto per poi poter essere riutilizzato. Nel DOD invece le gocce vengono espulse solo nei punti dove richiesto da progetto.

La goccia di bioink può essere emessa per effetto termico o per mezzo di un attuatore piezoelettrico. Nella tecnologia termica un elemento resistivo adiacente all'ugello viene riscaldato provocando l'evaporazione dell'inchiostro a contatto e la successiva formazione di una bolla che espandendosi provoca l'espulsione del bioink. Durante il processo di stampa, la stampante riscalda l'inchiostro per meno di 2  $\mu\text{s}$  con una temperatura crescente tra i 4 e i 10°C, questo approccio è compatibile con i sistemi biologici, e permette pertanto una vitalità media cellulare del 90%. Nella tecnologia piezoelettrica, invece, le gocce vengono generate per mezzo di una variazione di pressione prodotta da un attuatore piezoelettrico. Al contrario dell'approccio termico, il metodo piezoelettrico non utilizza calore e produce gocce di dimensioni regolari e sempre uguali; tuttavia incorre nel rischio di danneggiare le membrane cellulari se utilizzato frequentemente [22].



**FIG. 4-3 GLI ORIFIZI DISTACCATI SULLA TESTINA DI STAMPA PERMETTONO UN POSIZIONAMENTO ACCURATO DELLE GOCCE AD UN'ALTA FREQUENZA. NELLA TECNOLOGIA TERMICA LE GOCCE VENGONO ESPULSE A SEGUITO DEL RISCALDAMENTO DEL RESISTORE A CONTATTO CON IL BIOINK**

I sistemi a getto di inchiostro sono a basso costo e grazie all'utilizzo di più testine di stampa permettono la realizzazione di costrutti contenenti più tipologie cellulari. Un inconveniente spesso legato a questo metodo di fabbricazione è il frequente intasamento dell'orifizio dal quale viene espulso il bioink. Per evitare la sedimentazione a livello dell'ugello si può progettare adeguatamente la dimensione del diametro dell'orifizio e optare per un biomateriale poco viscoso come bio-inchiostro.

#### 4.6.2 Pressure-assisted bioprinting (PAB) e laser-assisted bioprinting (LAB)

La tecnologia di stampa a pressione si basa sulla tecnica della micro-estrazione per creare i costrutti tridimensionali desiderati. I biomateriali normalmente utilizzati sono soluzioni o paste che vengono estrusi coordinando il movimento di una pressione pneumatica (o una pressione generata da un pistone o una vite) attraverso un ugello posizionato su di un substrato stazionario; anche in questo caso l'applicazione procede nella costruzione in modo stratificato, ma non vengono prodotte gocce dalla testina di stampa, bensì un filamento continuo. Il vantaggio di utilizzare l'estrazione a pressione è di poter impiegare materiali con viscosità elevata e di poter promuovere una maggior cell viability rallentando la velocità del processo; la velocità di espulsione del bio-inchiostro è regolata dalla pressione applicata e una velocità solitamente inferiore ai 3 m/s è ottimale per la sopravvivenza cellulare.

La biostampa a laser utilizza il laser come fonte energetica per depositare il materiale sul substrato. Il sistema LAB è caratterizzato da tre componenti principali: una sorgente laser impulsiva, un “nastro” contenente le cellule sospese all’interno di un gel e un substrato ricevente. Il laser irradia il nastro donatore causando l’evaporazione dei materiali biologici in soluzione, i quali in questo modo raggiungono il substrato di ricezione sotto forma di goccioline. Il substrato ricevente contiene un mezzo di coltura per permettere l’adesione cellulare e la conseguente proliferazione. L’impulso laser ha generalmente la durata del nanosecondo, con una lunghezza d’onda prossima a quella dei UV. Questo tipo di biostampa possiede la più alta risoluzione rispetto alle altre tecnologie, per questo motivo può essere applicata per la riproduzione della micro vascolarizzazione. Nonostante ciò, le radiazioni emesse generano fattori di rischio per la vitalità delle componenti cellulari stampate.

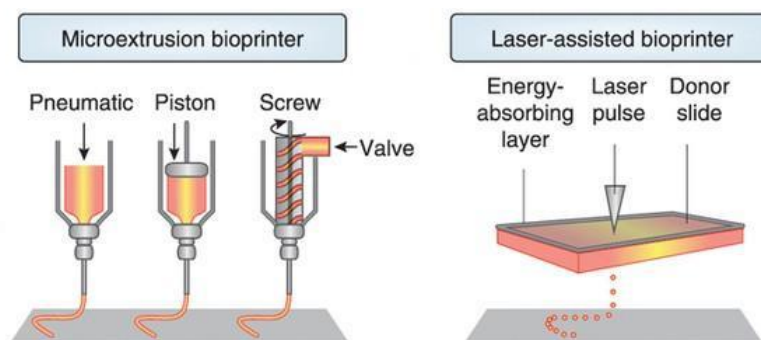


FIG. 4-4 TECNOLOGIE DI BIOSTAMPA A PRESSIONE E A LASER

## 4.7 Caso di studio

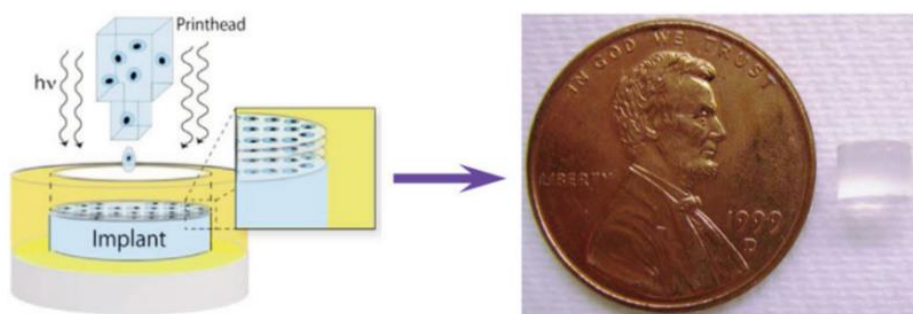
### 4.7.1 La biostampa e il tessuto di coltura

In questo studio sono state utilizzate cellule staminali mesenchimali, estratte da midollo osseo proveniente da un soggetto maschio di 22 anni. Le cellule sono state espanse in un medium di crescita a 37°C con aria contenente un 5% di CO<sub>2</sub>. Il medium di coltura è stato cambiato tre volte a settimana. Per formare il bio-inchiostro sono stati disciolti i componenti nella soluzione tam-

pone PBS (*Phosphate Buffered Saline*, tampone fosfato salino, è una soluzione salina isotonica che contiene cloruro di sodio, sodio fosfato e potassio fosfato).

Lo scaffold contenente le cellule è stato stampato in modo stratificato mediante biostampa tridimensionale a getto di inchiostro, con metodo termico di espulsione del bioink, sottoforma di cilindro con un diametro interno di 4 mm. La distanza tra la testina e lo stampo è stata regolata a 1-2 mm. E' stato utilizzato per la progettazione dei modelli digitali Adobe Photoshop (Adobe systems. San Jose, CA).

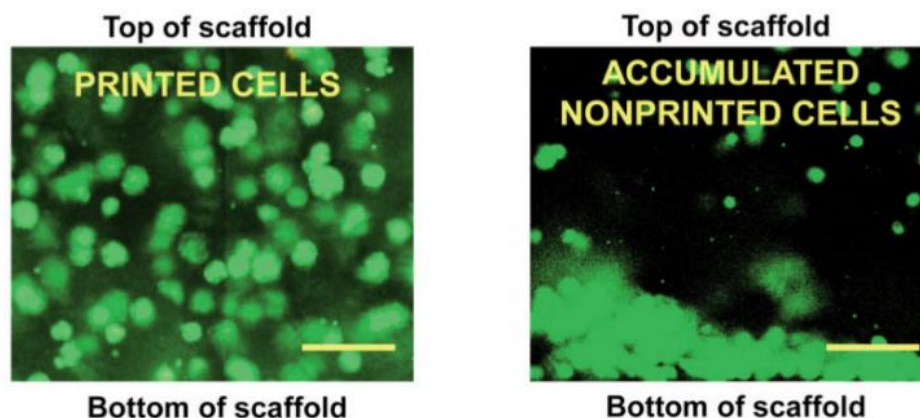
I costrutti di tessuto stampati sono poi stati trasferiti in una piastra da 24 pozzezzetti contenenti 1 ml di medium per l'osteogenesi o 1 ml di medium per la condrogenesi con 10 ng/ml di fattore di crescita TGF- $\beta$  (Humanzyme, Chicago, IL). Il tessuto è rimasto in coltura per 21 giorni prima della valutazione, durante la permanenza il medium è stato cambiato tre volte a settimana. La vitalità cellulare è stata determinata 24 ore dopo la stampa.



**FIG. 4-5 A SINISTRA UNA SCHEMATIZZAZIONE DELLA BIOSTAMPA 3D DELLE MSC E DELL'IDROGEL PEG-PEPTIDE CON LA SIMULTANEA POLIMERIZZAZIONE DELLO SCAFFOLD. A DESTRA LO SCAFFOLD CILINDRICO STAMPATO DI DIAMETRO E ALTEZZA DI 4 MM**

La piattaforma di stampa possiede una risoluzione di 300 dpi con 3.6 kHz di frequenza di emissione. I cinquanta ugelli sfalsati sulla testina di stampa compensati per l'ordine di emissione, permettono un accurato posizionamento dei punti con un'alta frequenza di emissione. I costrutti di tessuto sono stati stampati strato per strato con una contemporanea fotopolimerizzazione dello scaffold. Ogni costrutto di diametro di 4 mm e 4 mm di spessore contiene nominalmente 0.23 ml di bio-inchiostro con 1380 MSC, dove lo spessore stimato

per ogni strato stampato è di 18  $\mu\text{m}$ . In questo modo vengono stampati 222 strati per ottenere il costruito finale. L'intero processo di stampa è stato realizzato in meno di 4 minuti per ogni costruito. Si è osservata una distribuzione uniforme delle cellule stampate all'interno dello scaffold 3D con la contemporanea fotopolimerizzazione. Al contrario, se non ci fosse stata la fotopolimerizzazione o se si fosse eseguita una fabbricazione manuale dei costrutti, le cellule si sarebbero depositate sul fondo dello scaffold a causa della gravità.



**FIG. 4-6** A SINISTRA È RAPPRESENTATA LA DISTRIBUZIONE OMOGENEA DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI STAMPATE SULL' IDROGEL TRIDIMENSIONALE, MENTRE A DESTRA SI NOTANO LE CELLULE ACCUMULATE ALLA BASE DELLO SCAFFOLD A CAUSA DELLA GRAVITÀ

#### 4.7.2 Bioink

I bio-inchiostri si presentano sotto forma di idrogel, durante la stampa sono semiliquidi, e si solidificano successivamente per effetto di raggi UV. Molti scaffold costituiti da biomateriali di origine naturale possono essere fabbricati utilizzando un inchiostro poco viscoso su di un supporto (biopaper) più viscoso, ne sono un esempio l'alginato e la fibrina. Tuttavia questi scaffold sono sprovvisti delle proprietà meccaniche necessarie per ingegnerizzare il tessuto muscolo scheletrico e l'integrazione tra il tessuto artificiale e quello naturale è scarsa. Nel caso del PEG il modulo di compressione è superiore ai 500 kPa, che è più di cento volte quello che caratterizza gli idrogeli naturali. Nonostante la combinazione dei biomateriali naturali con il PEG possa effettivamente migliorare la sua biocompatibilità, non è consigliabile effettuare la coniugazione in quanto ciò causerebbe il drammatico aumento della viscosità dell'inchiostro, rendendo inefficiente la tecnica della stampa 3D. A differenza



di altre tecniche di addizione come la micro estrusione o la biostampa assistita dal laser, un inchiostro particolarmente viscoso potrebbe facilmente intasare la testina di espulsione limitando le sue applicazioni. La combinazione con i peptidi biomimetici migliora la biocompatibilità e la biodegradabilità del PEG, pur mantenendo la bassa viscosità del materiale.

Il bioink utilizzato è costituito da un 10% peso/volume (w/v) di PEGDMA, 1 mM di GRGDS acrilati e 1 mM di peptidi MMP; come riferimento nei test è stato utilizzato un bioink contenente il PEGDMA da solo in PBS. La soluzione così preparata è stata sterilizzata e mescolata con una concentrazione di  $6 \times 10^6$  cellule/ml di MSC.

### 4.7.3 Saggio istologico

I costrutti di tessuto sono stati poi fissati usando il 10% di formaldeide e inclusi nella paraffina seguendo la procedura standard istologica, i blocchi di paraffina sono poi stati tagliati in sezioni di 5  $\mu\text{m}$ . Sono state prelevate sezioni rappresentative da utilizzare come campioni per la condrogenesi e l'osteogenesi. I campioni osteogenici sono stati colorati con il colorante Alizarina Rossa S per visualizzare il deposito di calcio, mentre le sezioni rappresentative di costrutti condrogenici differenziati sono state colorate con Safranina-O/ verde per visualizzare le cellule e la produzione di proteoglicani.

### 4.7.4 Risultati

#### 4.7.4.1 Viscosità del bio inchiostro preparato

La viscosità dell'inchiostro di 10% w/v PEGDMA e soprattutto del 10% w/v PEGDMA miscelato con peptidi, è simile a quella dell'inchiostro regolare. La viscosità del 10% PEG mischiato con 1.5% w/v GelMA è  $3.66 \pm 0.11$ , che è più del doppio di quella del regolare inchiostro. La viscosità del 5% GelMA è  $6.87 \pm 0.13$ . La viscosità aumenta leggermente dopo la miscelazione con le cellule. Per quanto riguarda la prova di stampa, il PEG e il PEG-peptide sono stati stampati in modo continuativo senza gravi intasamenti, mentre il PEG-GelMA (5% GelMA) si è rivelato non stampabile.

|                         | Regular ink | PEG         | PEG-peptide | PEG-GelMA         | GelMA            |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------------|------------------|
| No cells                | 1.63 ± 0.02 | 1.85 ± 0.01 | 1.69 ± 0.04 | 3.66 ± 0.11       | 6.87 ± 0.13      |
| With cells <sup>a</sup> | N/A         | 2.07 ± 0.03 | 1.84 ± 0.05 | 3.87 ± 0.03       | 6.99 ± 0.06      |
| Printability            | Good        | Good        | Good        | Poor <sup>b</sup> | N/A <sup>c</sup> |

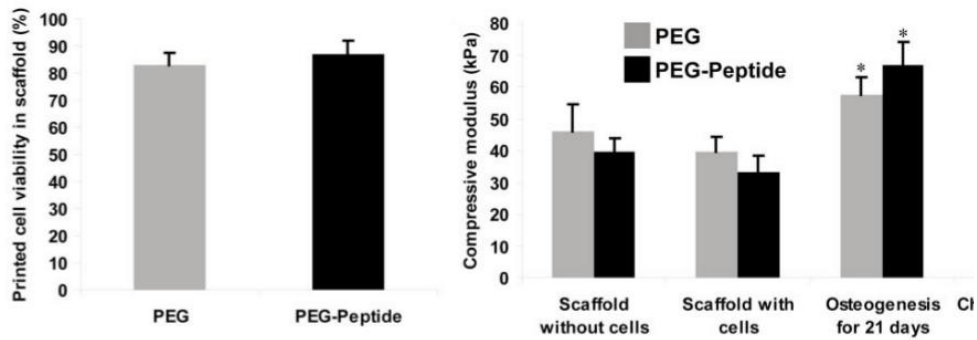
**FIG. 4-7 VALORI DELLA VISCOSITÀ PER L'INCHIOSTRO TIPICAMENTE UTILIZZATO E PER GLI INCHIOSTRI VALUTATI IN QUESTO CASO (10% W/V PEGDMA (PEG), 10% W/V PEGDMA CON L'AGGIUNTA DI PEPTIDI (PEG-PEPTIDE), 10% W/V PEGDMA CON 1.5% W/V GELMA (PEG-GELMA), 5% W/V GELMA).**

- a. LE CELLULE IN QUESTIONE SONO MSC:  $6 \times 10^6$  CELLULE/ML.
- b. SCARSA STAMPABILITÀ DOVUTA AD UN FREQUENTA INTASAMENTO DELLA TESTINA DI STAMPA.
- c. NON STAMPABILE

#### 4.7.4.2 Modulo di compressione dei costrutti stampati

Il modulo di compressione dello scaffold di PEG-peptide si è rivelato leggermente inferiore rispetto a quello dello scaffold di solo PEG dopo la stampa. Lo scaffold contenente le cellule ha mostrato un ridotto modulo di compressione rispetto allo scaffold sprovvisto di cellule, ma entrambi gli idrogeli hanno dimostrato un aumento significativo del modulo di compressione durante il differenziamento osteogenico e condrogenico al concludersi dei 21 giorni. L'aumento di rigidità dello scaffold con le MSC costituito da PEG e peptide è stato del  $(100.93 \pm 2.55)\%$  nel differenziamento osteogenico e del  $(81.73 \pm 2.79)\%$  in quella condrogenica, valori che si sono dimostrati superiori alla rigidità del semplice scaffold PEG nel caso osteogenico  $(44.36 \pm 1.28\%)$  e in quello condrogenico  $(37.88 \pm 1.10\%)$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ).

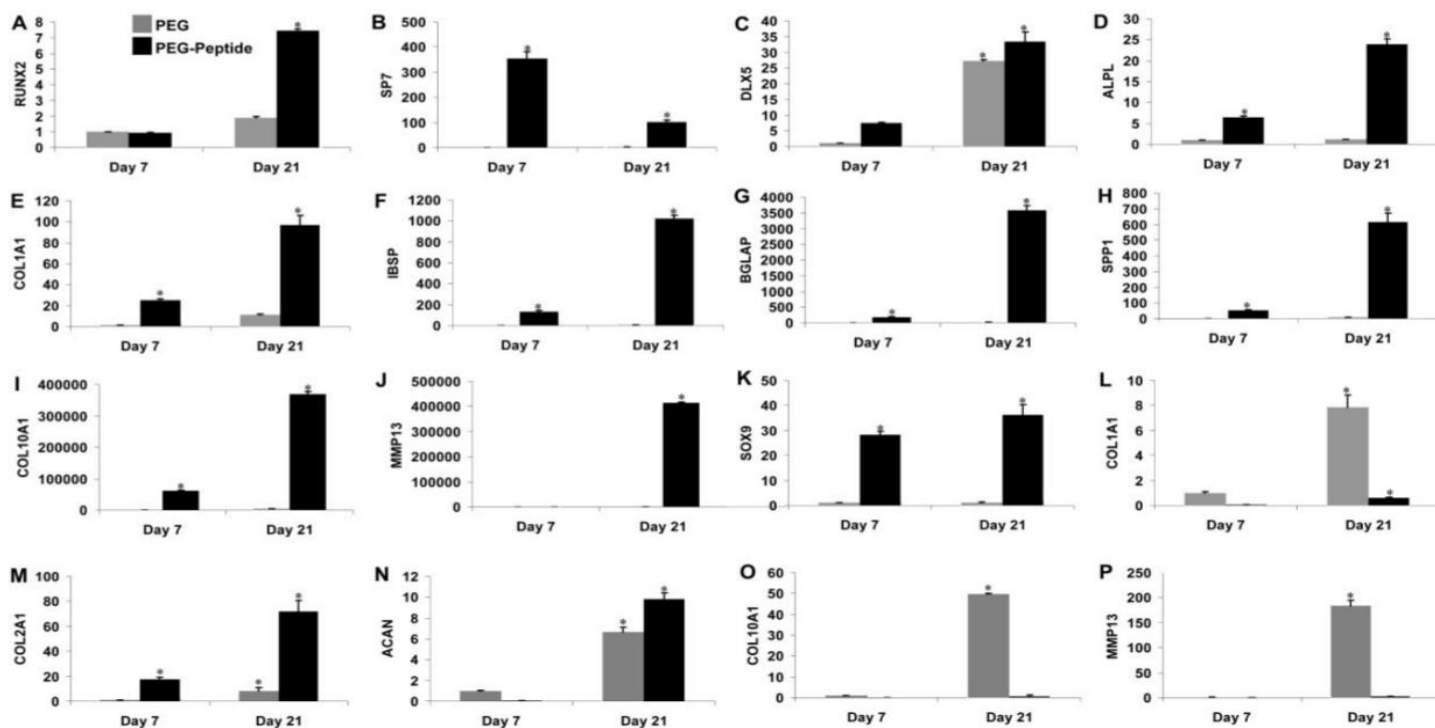
Le mesenchimali stampate, mostrano un'eccellente vitalità negli scaffold di PEG e PEG-peptide 24 ore dopo la stampa.



**FIG. 4-8 IL PRIMO GRAFICO RIPORTA LA VITALITÀ CELLULARE IN PERCENTUALE DELLE MSC STAMPATE SUI DIVERSI SCAFFOLD DI PEG E PEG-PEPTIDE, SI PUÒ NOTARE LA MIGLIORATA CELL VIABILITY NELLO SCAFFOLD CONTENENTE I PEPTIDI, IN QUANTO LA LORO PRESENZA HA AUMENTATO LA BIOCOMPATIBILITÀ DEL PEG. NEL SECONDO GRAFICO È RAPPRESENTATO IL MODULO DI COMPRESSIONE DEGLI SCAFFOLD IN DIVERSE CONDIZIONI**

#### 4.7.4.3 Espressione genica delle cellule stampate

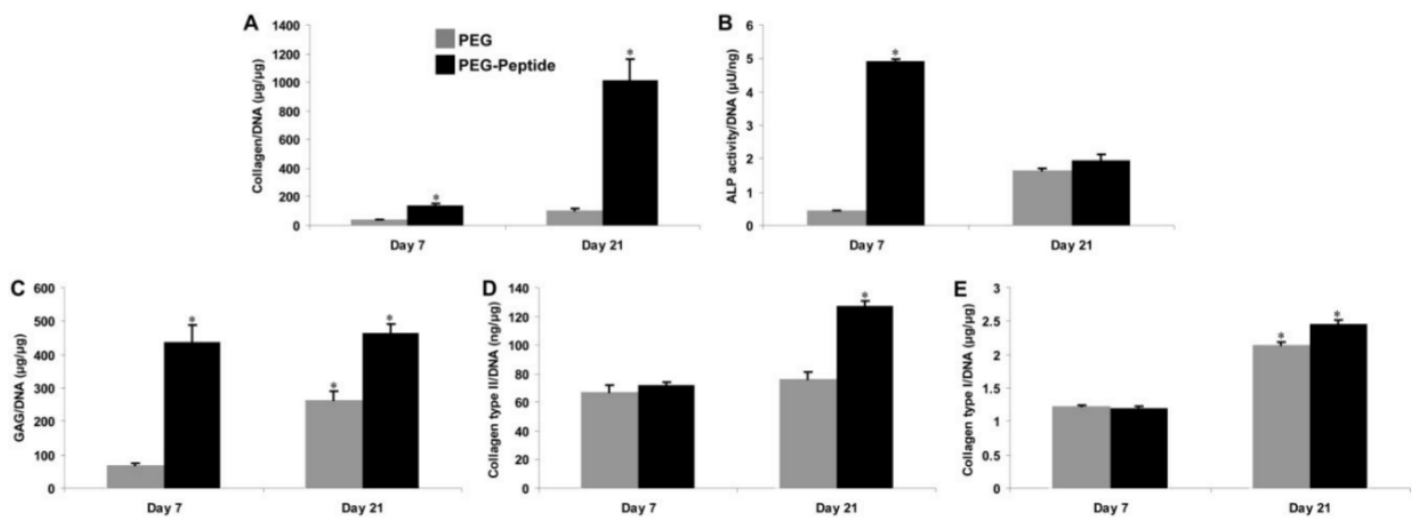
Nella valutazione osteogenica si è notato che l'espressione genica nello scaffold di PEG-peptide è aumentata notevolmente dal giorno 7 al giorno 21 ed è rimasta significativamente più alta rispetto all'espressione nello scaffold di solo PEG al ventunesimo giorno. Sono stati registrati alcuni risultati positivi anche a seguito del differenziamento condrogenico nel PEG-peptide. Questi risultati dimostrano un differenziamento migliorato nel substrato composto a conclusione del periodo di coltura, in particolar modo nel caso del differenziamento osteogenico.



**FIG. 4-9** ESPRESSIONE GENICA DELLE MSC STAMPATE NELLO SCAFFOLD DI PEG (BARRETTE GRIGIE) E NELLO SCAFFOLD DI PEG-PEPTIDE (BARRETTE NERE) IN CULTURA PER 21 GIORNI, SOTTO DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO (A-J) E CONDROGENICO (K-P). L'ESPRESSIONE SI È NORMALIZZATA DAL SETTIMO GIORNO. SI PUÒ NOTARE UN MANCATO MIGLIORAMENTO NEL DIFFERENZIAMENTO CONDROGENICO NEL PEG-PEPTIDE NEI GRAFICI O-L-P

#### 4.7.4.4 Analisi biochimica dei costrutti stampati di osso e cartilagine

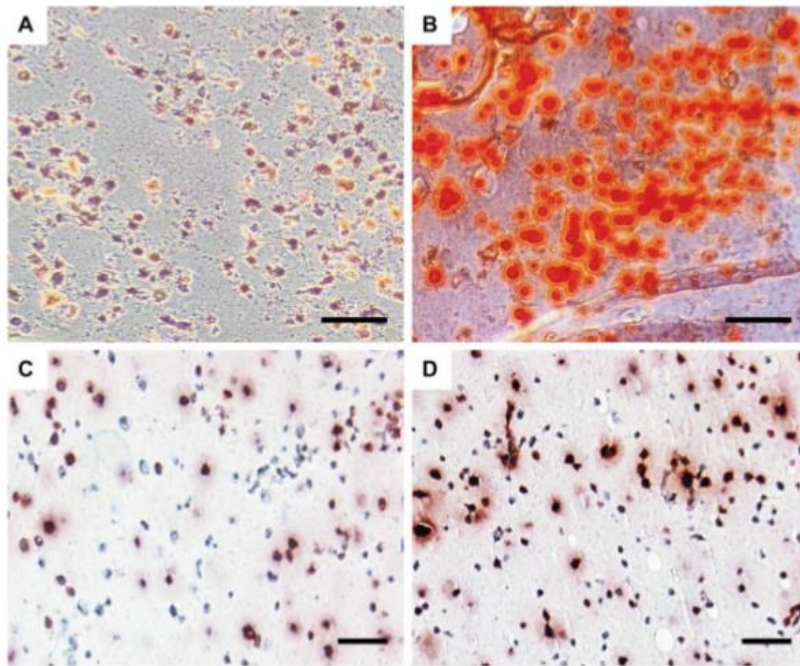
Nel differenziamento osteogenico, la produzione di collagene/DNA negli scaffold PEG-peptide è aumentata significativamente dal giorno 7 al giorno 21 e si è dimostrata significativamente più alta della produzione negli scaffold PEG al giorno 7 e 21 ( $p < 0,05$ ). Nel differenziamento condrogenico, la produzione di GAG/DNA nel gruppo PEG-peptide si mostra significativamente più alta di quella del gruppo PEG al giorno 7 e 21 ( $p < 0,05$ ). La produzione di collagene II/DNA nel PEG-peptide è aumentata significativamente dal giorno 7 al 21 ed è maggiore di quella nel PEG scaffold al giorno 21 ( $p < 0,05$ ). La produzione di collagene I / DNA in entrambi gli scaffold è aumentata in modo significativo dal giorno 7 al 21 ( $p < 0,05$ ).



**FIG. 4-10** DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO (A-B) E CONDROGENICO (C-E). A- PRODUZIONE DI COLLAGENE NORMALIZZATA PER IL CONTENUTO DI DNA (MG/MG) NEL TESSUTO OSSEO. B- ATTIVITÀ DELLA ALP NORMALIZZATA PER IL CONTENUTO DI DNA (MU/MG) NEL TESSUTO OSSEO. C- PRODUZIONE DI GAG NORMALIZZATA PER IL CONTENUTO DI DNA (MG/MG) NEL TESSUTO CARTILAGINEO- D- PRODUZIONE DI COLLAGENE DI TIPO II NORMALIZZATA (NG/MG) NEL TESSUTO CARTILAGINEO. E- PRODUZIONE DI COLLAGENE DI TIPO I NORMALIZZATA (MG/MG) NEL TESSUTO CARTILAGINEO

#### 4.7.4.5 Analisi istologica della deposizione di minerali nell'osso e della produzione di proteoglicani nel tessuto cartilagineo

Il colorante Alizarina Rossa S ha mostrato una maggiore deposizione di calcio nelle MSC incorporate negli scaffold PEG-peptide piuttosto che in quelli costituiti dal solo PEG, sotto differenziamento osteogenico nel corso dei 21 giorni. Il colorante Safranina O ha rivelato la produzione di proteoglicani nelle MSC sotto differenziamento condrogenico al termine dei 21 giorni. Le MSC nel PEG-peptide scaffold hanno mostrato una maggior produzione di proteoglicani in confronto a quella nei PEG scaffold al giorno 21.



**FIG. 4-11 IL COLORANTE ALIZARINA S MOSTRA LE MSC DURANTE LA DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO NEL PEG (A) E NEL PEG-PEPTIDE (B) DOPO 21 GIORNI DI CULTURA. IL COLORANTE SAFRANINA-O MOSTRA INVECE LE MSC NELLA DIFFERENZIAMENTO CONDROGENICO NELLO SCAFFOLD DI PEG (C) E IN QUELLO DI PEG-PEPTIDE (D) AL TERMINE DEI 21 GIORNI DI CULTURA**

#### 4.7.5 Conclusioni

Nonostante il tessuto osseo possieda la capacità di auto-guarigione, la dimensione critica di alcune lesioni successive a traumi o patologie, non permette un completo recupero senza un opportuno intervento clinico. La disponibilità di auto innesti di osso e allotrapianti è estremamente limitata e gli impianti inerti possono fallire nel tempo a seguito dell'usura dovuta al carico ripetuto. A differenza delle ossa, la cartilagine, senza i vasi sanguigni, i nervi e i vasi linfatici, non può guarire dalle lesioni derivanti dall'artrosi o dall'invecchiamento. Gli approcci clinici per la riparazione della cartilagine sono altamente invasivi e spesso non ripristinano la salute della cartilagine a lungo termine. Pertanto, l'osso e la cartilagine ingegnerizzati che possono eventualmente essere rimodellati in un nuovo tessuto nativo, sono diventati sempre più richiesti e necessari. L'approccio AM di estrusione senza cellule per la fabbricazione degli scaffold è comune nell'ingegneria dei tessuti dell'osso, tuttavia attualmente i trattamenti termici e chimici dello scaffold durante la fabbricazione limitano in modo significativo l'affinità di questi approcci con i sistemi viventi biologici. Le attuali strategie per affrontare le lesioni della cartilagine,

non possono ancora progettare nuovi tessuti con struttura mimetica rispetto all'organizzazione spaziale delle cellule, la composizione della matrice extracellulare e le proprietà fisiche. Altri gruppi hanno fabbricato manualmente i tessuti osseo e cartilagineo utilizzando alginato o fibrina. Tuttavia, il modulo di compressione di questi scaffold si è rivelato inferiore a 5 kPa anche dopo una coltura di lunga durata, troppo debole quindi per poter sopportare gli sforzi ai quali sono sottoposti osso e cartilagine; inoltre, le cellule depositate con distribuzione casuale nello scaffold fabbricato manualmente, portano alla formazione di tessuto disomogeneo. L'idrogelo PEG-peptide stampato nel caso di studio presentato ha dimostrato eccellenti qualità meccaniche con cellule uniformemente distribuite e sviluppate in un tessuto omogeneo. Miscelare una matrice di origine naturale nell'idrogelo PEG come la gelatina, può migliorare la biocompatibilità del gel PEG e promuovere il differenziamento delle mesenchimali incorporate. La gelatina possiede la caratteristica di legame vincolante delle cellule naturali, come la sequenza RGD e i siti di degradazione sensibili alla MMP. Tuttavia, la viscosità del bio-inchiostro aumenta sensibilmente miscelando un 1.5 % di GelMA alla soluzione PEG, ciò crea un ostacolo maggiore per la stampa a getto di inchiostro a causa dell'intasamento frequente delle testine. Il 5% della soluzione GelMA non è efficacemente stampabile, nonostante il 10% di GelMA sia la concentrazione comune per applicazioni di ingegneria tessutale. Al contrario, la viscosità del 10% di PEG era simile a quella dell'inchiostro normalmente utilizzato, mentre la viscosità del 10% di PEG-peptide si è mostrata praticamente identica alla viscosità dell'inchiostro preso di riferimento. La lieve riduzione della viscosità dopo la miscelazione dei peptidi è stata probabilmente dovuta all'ulteriore diluizione della concentrazione PEG con la soluzione peptide, mentre si è verificato solo un lieve aumento della viscosità dopo la miscelazione con le cellule. L'idrogelo PEG-peptide sviluppato nel caso di studio ha dimostrato una biocompatibilità migliorata nonché eccellenti proprietà meccaniche. La vitalità cellulare ha mostrato una minima tossicità in entrambi gli scaffold PEG e PEG-peptide. Gli scaffold contenenti le cellule esibiscono una rigidità inferiore rispetto agli scaffold privi di cellule. Il modulo di compressione del PEG-peptide è risultato inferiore al PEG successivamente alla stampa, tuttavia, il modulo di PEG-peptide contenente le cellule è aumentato significativamente e si è mostrato superiore a quello del PEG alla fine della coltura.

L'incremento del modulo in scaffold PEG-peptide è stato del 100% in osteogenesi e 82% in condrogenesi dal giorno 7 a 21. Al contrario, l'aumento del modulo del PEG è stata del 44% nel osteogenesi e il 38% nella condrogenesi dal giorno 7 a 21. Questa osservazione ha confermato l'effetto positivo dello scaffold PEG-peptide sul differenziamento condrogenico e la produzione di ECM delle MSC.

Per quanto riguarda l'espressione genica manifestata nello scaffold di PEG-peptide, si è notato che lo scaffold composito ha stimolato consistentemente il differenziamento osteogenico delle cellule mesenchimali staminali durante il periodo di coltura. Tuttavia i dati relativi al differenziamento condrogenico sono piuttosto contrastanti, considerati singolarmente mostrano un elevato sviluppo condrogenico, ma l'espressione di COL10A1 e MMP13 indicano un'ipertrofia cellulare (un effetto indesiderato del differenziamento condrogenico).

Nel caso del differenziamento osteogenico, la produzione di collagene nelle MSC incorporate nello scaffold PEG-peptide aumenta di sette volte dal giorno 7 al 21 e si dimostra dieci volte maggiore del collagene contenuto nello scaffold PEG. L'attività della fosfatasi alcalina nello scaffold composito è maggiore rispetto a quella nel PEG al settimo giorno, ma non c'è una sostanziale differenza tra i substrati alla conclusione del tempo di coltura. L'elevata attività dell'ALP nel PEG-peptide nel primo periodo mostra un'accelerato differenziamento osteogenico delle MSC in contrasto con i valori ottenuti dal singolo PEG. Per quanto riguarda i depositi di calcio, si è valutata una grande quantità di deposizione di calcio nelle MSC incorporate nello scaffold di PEG-peptide, ciò mostra un consistente effetto osteogenico condotto dal substrato composito. Si valuta anche un effetto positivo condrogenico da parte dello scaffold di PEG-peptide al concludersi del periodo di coltura, a seguito delle produzioni elevate di GAG e collagene di tipo II. Si può osservare una maggiore deposizione di GAG mediante la colorazione con Safranina O all'interno dello scaffold PEG-peptide.



## 5 BIBLIOGRAFIA

- [1] Cigada A., Contro R., Di Bello C., Tanzi M. C., “Biomateriali: dagli impianti protesici alla medicina rigenerativa”, Patron, Bologna 2005
- [2] Di Bello C., “Biomateriali introduzione allo studio dei materiali per uso biomedico”, Patron, Bologna 2004
- [3] Mantero S., Remuzzi A., Raimondi M. T., Ahluwalia A., “Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa”, Patron, Bologna 2009
- [4] Pietrabissa R., “Biomateriali per protesi e organi artificiali”, Patron, Bologna 2005
- [5] Bronzino J. D., “Tissue engineering and artificial organs”, CRC press book 2006
- [6] Willerth S. M., Sakiyama-Elbert S. E., “Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery”, 2008
- [7] Mauli Agrawal C., Ray R. B., “Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering”, 2000
- [8] Zhu J., “Bioactive Modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering”, 2010
- [9] Masko A. M., “Degradable poly(ethylene glycol) hydrogels for 2D and 3D cell culture”, 2011
- [10] Wang X., Boire T. C., Bronikowski C., Zachman A., Crowder S. W., Sung H., “Decoupling polymer properties to elucidate mechanisms governing cell behavior”, 2012
- [11] Zhu J., Marchant R. E., “Design properties of hydrogels tissue-engineering scaffolds”, 2011
- [12] El-Sherbiny I. M., Yacoub M. H., “Hydrogel scaffolds for tissue engineering: progress and challenges”, 2013
- [13] Slaughter B. V., Khurshid S. S., Fisher O. Z., Khademhosseini A., Pappas N. A., “Hydrogels in regenerative medicine”, 2009

- [14] Bajaj P., Schweller R. M., Khademhosseini A., West J. L., Bashir R., “3D biofabrication strategies for tissue engineering and regenerative medicine”, 2014
- [15] Bencherif S. A., Braschler T. M., Renaud P., “Advances in the design of macroporous polymer scaffolds for potential applications in dentistry”, 2013
- [16] Sundaram R. K., Kasinathan C., Stein S., Sundaram P., “Novel detox gel depot sequesters  $\beta$ -Amyloid peptides in a mouse model of Alzheimer’s disease”, 2011
- [17] Lin C., Anseth K. S., “PEG hydrogels for the controlled release of biomolecules in regenerative medicine”, 2008
- [18] Knop K., Hoogenboom R., Fischer D., Schubert U. S., “Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives”, 2010
- [19] Gao G., Yonezawa T., Hubbell K., Dai G., Cui X., “Inkjet-bioprinted acrylated peptides and PEG hydrogel with human mesenchymal stem cells promote robust bone and cartilage formation with minimal printhead clogging”, 2014
- [20] Ringeisen B. R., Spargo B. J., Wu P. K., “Cell and organ printing”, Springer 2010
- [21] Li J., Chen M., Fan X., Zhou H., “Recent advances in bioprinting techniques: approaches, applications and future prospects”, 2016
- [22] Cui X., Boland T., D’Lima D. D., Lotz M. K., “Thermal inkjet printing in tissue engineering and regenerative medicine”, 2012
- [23] Gutowska A., Jeong B., Jasionowski M., “Injectable gels for tissue engineering”, 2001
- [24] Nguyen K. T., West J. L., “Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications”, 2001

## 6 SITOGRAFIA

[25] [<http://webusers.fis.uniroma3.it/iucci/gio/Peptide.pdf> ]

[26] [<http://www.chimicamo.org/chimica-organica/polimerizzazione-per-condensazione.html>]

[27] [<http://www.staminafoundation.org/section/biologia-staminali-mesenchimali>]

[28] [<http://www.eurostemcell.org/it/factsheet/le-cellule-staminali-mesenchimali-le-%E2%80%98altre%E2%80%99-cellule-del-midollo-osseo>]

[29] [<https://replicatore.wordpress.com/2014/06/28/cose-la-biostampa-3d/>]

[30] [<http://www.molecularlab.it/protocolli/reagent.asp?name=PBS>]

[31] [[http://www.scienzattiva.eu/wp-content/uploads/2014/06/C\\_Drug\\_delivery.pdf](http://www.scienzattiva.eu/wp-content/uploads/2014/06/C_Drug_delivery.pdf)]