

**ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSIT`A DI BOLOGNA  
CAMPUS DI CESENA  
SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA**

**CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

TITOLO DELL'ELABORATO:

**PEPTIDI AUTOASSEMBLANTI PER LA PRODUZIONE  
DI SCAFFOLD NELL'INGEGNERIA TISSUTALE**

Elaborato in:  
Biochimica

*Relatore:*  
Prof. EMANUELE DOMENICO GIORDANO

*Presentata da:*  
NICOLE D'ADEMO

---

ANNO ACCADEMICO 2012–2013  
SESSIONE III



# Indice

## Considerazioni Introduttive

<b>1. Capitolo1: Principi di ingegneria dei tessuti.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Capitolo 2: Scaffold a base di peptidi auto-assemblanti.....</b>	<b>6</b>
2.1 Peptidi.....	6
2.2 Peptidi auto-assemblanti.....	8
2.3 Scaffold e materiali per la loro realizzazione.....	9
2.3.1 Scaffold formati da peptidi auto-assemblanti.....	14
<b>3. Capitolo 3: Applicazione di peptidi auto-assemblanti per     la costruzione di scaffold tessuto-specifici.....</b>	<b>19</b>
3.1 Tessuto Cardiaco.....	19
3.1.1 Rigenerazione del tessuto cardiaco con scaffold di peptidi auto-assemblanti.....	21
3.2 Tessuto Cartilagineo.....	26
3.2.1 Riparazione della cartilagine con scaffold di peptidi auto-assemblanti.....	28
3.3 Tessuto Osseo.....	31
3.3.1 Rigenerazione del tessuto osseo con scaffold di peptidi auto-assemblanti.....	34

3.4 Tessuto Nervoso.....	36
3.4.1 Riparazione del tessuto nervoso con scaffold di peptidi auto-assemblanti.....	39
<b>4. Capitolo 4: Scaffold a base di peptidi auto-assemblanti come         Drug Delivery System.....</b>	<b>43</b>
4.1 Drug Delivery Systems.....	43
4.2 Applicazioni di scaffold di peptidi auto-assemblanti per il rilascio controllato di farmaci.....	45
<b>5. Conclusioni.....</b>	<b>49</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>50</b>
<b>Sitografia.....</b>	<b>53</b>



---

## Considerazioni introduttive

L'argomento trattato in questo elaborato riguarda la natura e le applicazioni di una nuova classe di biomateriali: i peptidi auto-assemblanti.

La perdita di funzione di un organo o di un tessuto rappresenta una problematica rilevante sia sotto il profilo clinico sia per i costi di gestione. I trapianti sono infatti tra le terapie più sofisticate e onerose economicamente, complicate da altri aspetti quali una strutturale insufficienza di donatori e la necessità che i soggetti trapiantati vengano sottoposti cronicamente a regimi terapeutici immunosoppressivi che aumentano eventuali effetti collaterali.

La terapia sostitutiva basata su organi artificiali è invece gravata dalla durata limitata dei dispositivi, nonché da un non trascurabile rischio infettivo.

La medicina rigenerativa, che sembra essere una soluzione adeguata per ovviare a tutte queste problematiche, è un settore emergente che combina aspetti della medicina, della biologia cellulare e molecolare, della scienza dei materiali e dell'ingegneria al fine di rigenerare, riparare o sostituire i tessuti danneggiati [1].

In questo panorama, il ruolo dei biomateriali sta diventando sempre più importante grazie alla loro varietà e alle loro funzioni emergenti. Tra i biomateriali innovativi più promettenti troviamo i peptidi auto-assemblanti..

Dopo un'introduzione sui principi dell'ingegneria tissutale, la tesi si focalizza sui peptidi auto-assemblanti e sulle loro applicazioni in campo biomedico, ponendo l'attenzione in particolar modo, sulla realizzazione di *scaffold* per la rigenerazione del tessuto osseo, cardiaco, cartilagineo e nervoso, e sulla loro applicazione per il rilascio controllato di farmaci.

# **Capitolo 1**

## **Principi di ingegneria dei tessuti**

"La *tissue engineering* è quel settore interdisciplinare che applica congiuntamente principi dell'ingegneria e delle scienze della vita per lo sviluppo di sistemi in grado conservare, migliorare e restituire, le funzioni di uno specifico tessuto/organo" [2].

L'ingegneria tissutale ricopre un ruolo fondamentale nella medicina rigenerativa; lo sviluppo di questa biotecnologia apre la strada a nuove possibilità di cura e a una migliore qualità della vita dei pazienti.

L'obiettivo ultimo è dunque quello di creare un nuovo settore di impresa che potrebbe rivoluzionare la medicina, consentendo di rigenerare organi e tessuti malati. Questo permetterebbe nuove possibilità di cura.

La progettazione di questi tessuti avviene attraverso l'utilizzo combinato di materiali, cellule, mediatori (bio)chimici e sistemi innovativi di coltura attraverso due tipologie di approccio:

- *in vitro seeding*: il biomateriale viene seminato con le cellule del paziente e posto in un bioreattore che simula l'ambiente biologico, creando condizioni colturali ottimali per la crescita cellulare. Una volta ultimato il tessuto verrà poi impiantato nel paziente.
- *tissue guided regeneration (in vivo)*: in questo approccio non viene realizzata la semina cellulare *in vitro* poiché la rigenerazione viene ottenuta direttamente nel paziente.

Tre elementi fondamentali per la realizzazione dei tessuti biologici sono:

**le cellule:** la scelta della corretta fonte cellulare è un punto cruciale per l'ingegnerizzazione di un tessuto. Le cellule impiegate possono essere di vario tipo:

- autologhe: prelevate dallo stesso individuo su cui sarà eseguito l'impianto. Questo tipo di cellule abbatte drasticamente i problemi di rigetto e di trasmissione di malattie;
- allogene: provenienti da un donatore della stessa specie.
- xenogene: ottenute da un donatore di un'altra specie;

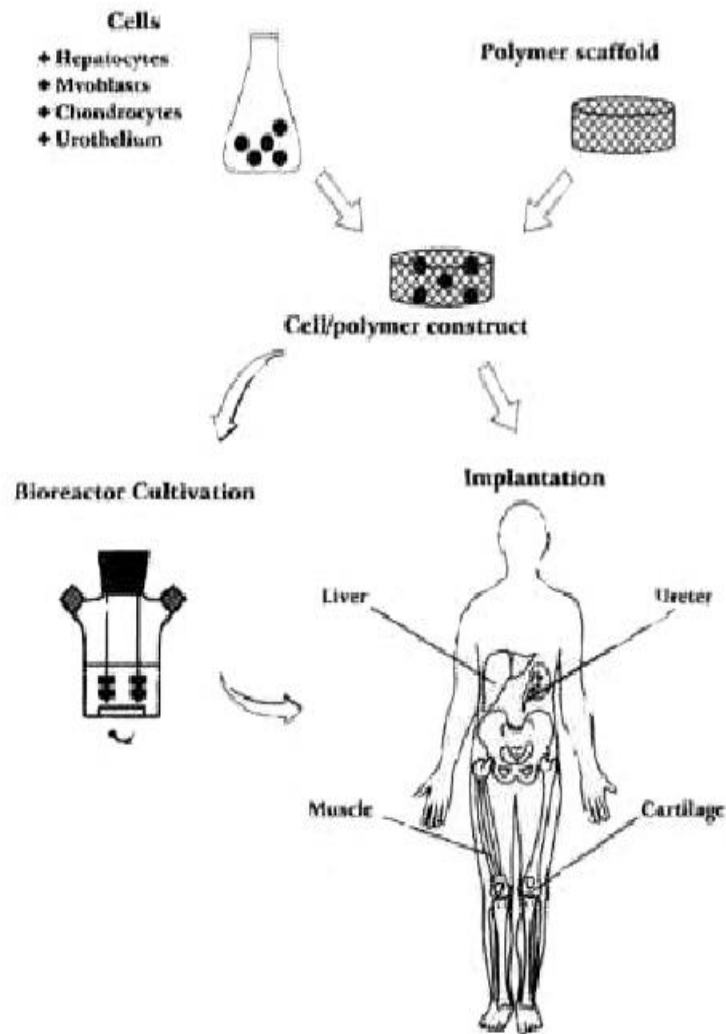
**lo scaffold :** fornisce un supporto tridimensionale alle cellule. Materiali, struttura e forma sono scelti a seconda della specifica applicazione;

**il bioreattore:** dispositivo progettato e realizzato per condurre colture cellulari dinamiche, ovvero per sollecitare cellule in coltura mediante l'applicazione di stimoli biofisici controllati e riproducibili. In ogni caso, nella loro varietà devono però adempiere ad almeno una delle seguenti funzioni fondamentali:

- la sopravvivenza dell'impianto attraverso l'apporto e il mantenimento di specifiche concentrazioni di nutrienti e gas;
- la distribuzione uniforme delle cellule nello scaffold tridimensionale;
- la somministrazione di adeguati stimoli per preparare il *graft* alle condizioni biologiche in vivo.

Come ovvio, un ulteriore importante requisito per un bioreattore è la capacità di mantenere le sue funzionalità per un periodo di tempo sufficiente allo sviluppo tessutale sullo *scaffold*;





**FIGURA 1** : procedimento per ottenere tessuto ingegnerizzato

Gli avanzamenti tecnologici e ingegneristici legati sia alle tecniche per il monitoraggio non invasivo e non distruttivo di importanti variabili di processo, sia ai costanti progressi compiuti in campi complementari come quello dei bioreattori, della biologia delle cellule staminali e dei biomateriali rendono oggi realistiche le complesse tecnologie relative a questo avanzato settore della medicina.

É evidente, quindi, che al di là dei notevoli progressi e del grande impatto che la medicina rigenerativa avrà nella terapia di malattie gravi, questa

nuova frontiera rappresenterà anche un notevole volano commerciale, e le aziende si sono adoperate per poter produrre e commercializzare parti del corpo su scala industriale. Molti sono gli interessi economici che ruotano intorno a all'ingegneria tissutale. Enormi investimenti sono stati messi in campo per produrre e commercializzare i prodotti di queste nuove tecnologie. Il grande successo di questa terapie utilizzate nell'ingegneria tissutale è testimoniato dal sorprendente tasso di crescita che si registra nel volume d'affari investito ogni anno in questi settori. Un recente rapporto pubblicato sulla rivista Tissue Engineering stima che gli investimenti siano cresciuti cinque volte negli ultimi cinque anni a livello mondiale,raggiungendo il valore di 2,4 miliardi di dollari [4].

Purtroppo però queste tecniche di ricostruzione e rigenerazione in vitro e in vivo si scontrano anche con importanti fattori limitanti.

Un primo aspetto limitante è costituito dall'efficienza con la quale si riesce a ottenere *differenziamento cellulare* nel costruito ingegnerizzato. Il concetto di differenziamento cellulare, in biologia, indica la maturazione di una cellula o di un tessuto da una forma primitiva o indifferenziata a una forma matura o differenziata, con funzioni specializzate, un processo che le cellule di un organismo pluricellulare complesso subiscono per ripartirsi i compiti [5]. La realizzazione di un tessuto artificiale prevede differenziamento delle cellule durante la loro espansione e maturazione in vitro su appositi *scaffold*. In ipotesi la formazione di neo-tessuto potrebbe realizzarsi a partire da cellule del paziente, in grado di dividersi e già differenziate. Alternativamente, l'utilizzo di cellule staminali indifferenziate necessita della conoscenza dei fattori in grado di indurre uno specifico differenziamento delle cellule [6].

Un altro importante problema da risolvere è la *vascolarizzazione* del costruito ingegnerizzato. Cellule e tessuti devono essere adeguatamente ossigenati e nutriti, e devono poter espellere i prodotti di rifiuto derivanti dall'attività metabolica. Questo aspetto richiede controllo sia in fase di crescita e maturazione in vitro, sia durante l'impianto e quindi nell'integrazione con l'organismo ricevente [6]. Dunque, la mancanza di un' adeguata struttura vascolare e l'incapacità di formarla determina che i tessuti non possano essere impiantati con successo. Un ulteriore fattore

limitante è rappresentato dalla complessità strutturale dei tessuti biologici, che rende difficile la produzione in laboratorio di tessuti anche molto semplici. Per risolvere questo problema si cerca di utilizzare adeguati supporti meccanici e di orientare la crescita e il differenziamento cellulare mediante fattori di crescita e stimoli forniti dall'ambiente di coltura [7,8].

Con il termine *fattore di crescita* ci si riferisce a proteine appunto capaci di stimolare la proliferazione e il differenziamento cellulare. La funzione principale dei fattori di crescita è il controllo esterno del ciclo cellulare, l'ingresso in mitosi, la sopravvivenza cellulare, la migrazione e il differenziamento cellulari [9]. Nonostante si conosca la natura chimica di molti di essi, non è semplice realizzare in maniera artificiale una miscela adeguata di molecole sintetiche e dunque molte volte occorre utilizzare additivi di origine animale non perfettamente caratterizzati sotto il profilo chimico e microbiologico. Questo approccio può essere adeguato alla realizzazione di prove di principio destinate al solo uso di laboratorio, ma non è eticamente proponibile come soluzione clinica. Un aspetto fondamentale nell'ingegneria dei tessuti è infine la *risposta dell'organismo* al materiale impiantato.

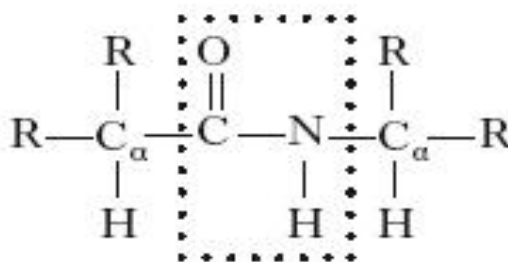
L'utilizzo di cellule autologhe garantisce una completa accettabilità delle componenti cellulari da parte del sistema immunitario del paziente.

## Capitolo 2

### Scaffold di peptidi auto-assemblanti

#### 2.1 Peptidi

I **peptidi** sono molecole di peso molecolare inferiore ai 5000 dalton, costituiti da una catena di pochi amminoacidi uniti tra di loro attraverso un legame peptidico [10]: un legame chimico di tipo ammidico che si forma tra il gruppo  $\alpha$ -carbossilico di un amminoacido e il gruppo  $\alpha$ -amminico di un altro amminoacido con la perdita di una molecola di acqua. Nel riquadro tratteggiato è rappresentato il legame peptidico.



**Figura 2.1** Struttura chimica dei peptidi

Il legame tra il carbonio e l'azoto dell'unità peptidica è rigido perché possiede in parte le caratteristiche di un doppio legame. L'idrogeno del gruppo amminico sostituito è quasi sempre in posizione trans rispetto all'ossigeno del gruppo carbossilico. Gli atomi di carbonio  $\alpha$  sono legati all'unità peptidica da legami singoli, quindi hanno libertà di rotazione intorno a questi legami [10]. Queste rotazioni sono determinate dagli angoli  $\psi(C_\alpha-C)$  e  $\phi(N-C_\alpha)$  rispettivamente e i loro valori determinano la conformazione assunta in ogni punto dallo scheletro peptidico [3]. Quando la sequenza dei gruppi R è tale che ogni piano peptidico presenta angoli di

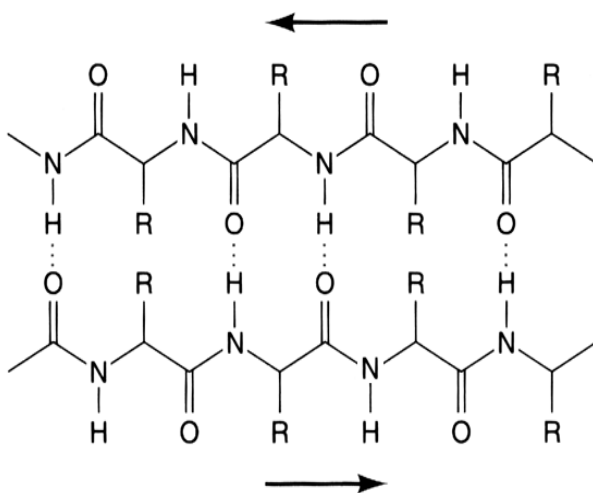
rotazione uguale a quello del piano precedente e del piano successivo, tale segmento assume un ripiegamento detto struttura secondaria.

I due tipi principali di struttura secondaria sono l'  $\alpha$  elica e le pieghe  $\beta$ .

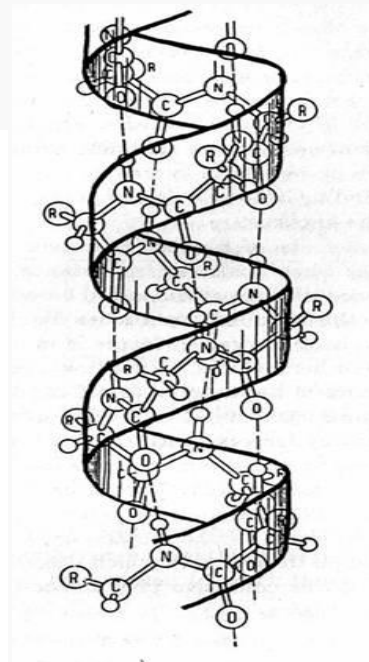
La struttura ad  $\alpha$  elica consiste in un ripiegamento elicoidale dello scheletro peptidico della proteina che si presenta spiralizzato attorno all'asse longitudinale con le catene laterali proiettate verso l'esterno.

La struttura  $\beta$  a pieghe consiste di più *filamenti*  $\beta$  disposti uno accanto all'altro e collegati tra loro da tre o più legami idrogeno per formare una struttura planare molto compatta. In base al numero di amminoacidi presenti, i peptidi si distinguono in oligopeptidi, fino a 20 amminoacidi, e polipeptidi, strutture costituite da un elevato numero di amminoacidi uniti fra loro. Le unità amminoacidiche sono definite, residui; il residuo amminoacidico che ha il gruppo amminico libero si chiama residuo ammino-terminale (o residuo N-terminale), quello dalla parte opposta con il gruppo carbossilico libero, è il residuo carbossi-terminale (o residuo C-terminale) [11].

I peptidi si ottengono si ottengono tramite processi di sintesi o di idrolisi parziale, chimica o enzimatica, di proteine.



**Figura 2.2** Diagramma di un foglietto  $\beta$



**Figura 2.3** Struttura  $\alpha$  elica

Negli ultimi anni, l'uso di peptidi come biomateriali sta evolvendo sempre di più. I vantaggi nell'usare peptidi sono molteplici; tra di essi troviamo la loro definizione chimica e le, loro accessibilità, praticità e semplicità. Sicuramente una delle proprietà più vantaggiose è che sono chimicamente definiti, cioè si conosce l'esatta composizione chimica e questo consente il perfezionamento delle loro strutture [12].

## 2.2 Peptidi auto-assemblanti

I peptidi auto-assemblanti sono una particolare classe di molecole che hanno la capacità, in condizioni di equilibrio termodinamico, di organizzarsi spontaneamente in strutture ordinate e stabili grazie alla formazione di legami non covalenti, come legami idrogeno e ionici, interazioni idrofobiche e forze di Van der Waals [13].

La classe dei peptidi auto-assemblanti è stata suddivisa negli anni '90 da Zhang in cinque tipologie principali:

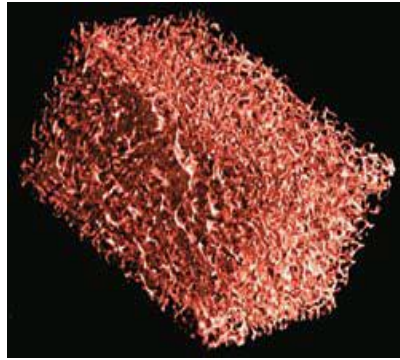
- Tipo I; o “Lego molecolari”: formano degli idrogel che possono essere utilizzati nella creazione di *scaffold*;
- Tipo II; o “interruttori molecolari”;
- Tipo III: “uncini molecolari” e “velcro molecolari”, sono peptidi utilizzati nei trattamenti superficiali;
- Tipo IV: gruppo al quale appartengono i nano-tubi peptidici e le “capsule molecolari” per il trasporto di geni e proteine;
- Tipo V: “cavità molecolari” per la biomineralizzazione;

I peptidi auto-assemblanti sintetici possono essere ottenuti per frammentazione di proteine naturali oppure per sintesi chimica. In ogni caso queste molecole possono aggregare spontaneamente in soluzione fisiologica in fogli di  $\beta$ -*sheet* caratterizzati da un lato idrofilico e da un lato idrofobico.

L'auto-assemblaggio è dovuto sia alla natura dei singoli amminoacidi, sia alla loro posizione nella sequenza dalla quale è possibile ottenere una determinata struttura secondaria. Questi peptidi hanno attirato l'interesse nel campo delle nanotecnologie per la loro applicazione in settori come le nanotecnologie biomediche, la coltura cellulare e l'elettronica molecolare. L'essenza di questa tecnologia consiste nella possibilità di formare attraverso il riconoscimento molecolare blocchi ordinati che sono in grado di svolgere specifiche attività biochimiche [14]. Le caratteristiche fisico-chimiche e meccaniche dei peptidi auto-assemblanti permettono inoltre di ottenere supporti nanostrutturati simili a quelli presenti nei tessuti biologici [15]. I peptidi auto-assemblanti, per aggregare, devono possedere due caratteristiche fondamentali: la complementarità (cioè la ripetizione di una determinata distribuzione di carica all'interno della sequenza) e la compatibilità strutturale. Alcuni fattori che influenzano l'auto-assemblaggio e che per questo devono essere tenuti sotto controllo sono la temperatura, pH, il tempo, la concentrazione e la sequenza peptidica [16].

## **2.3 Scaffold per l'ingegneria dei tessuti e materiali per loro la realizzazione**

Come già indicato, le strategie usate nell'ingegneria tissutale dipendono dall'uso di uno *scaffold*. Questi *scaffold* fungono da matrice extracellulare sintetica (ECM), organizzano un'architettura tridimensionale per le cellule e rilasciano sostanze bioattive, che orchestrano la crescita e la formazione del tessuto desiderato.



**Figura 2.4:** esempio di scaffold per il tissue engineering

Oltre a fornire una geometria 3D, gli scaffold devono anche favorire l'accrescimento la proliferazione e il differenziamento delle cellule seminate a bordo, nonché rispondere alle caratteristiche meccaniche specifiche per il tessuto che si intende rigenerare.

Fattori fondamentali da considerare nella progettazione di *scaffold* sono la permeabilità e la porosità. La *porosità* è definita come il rapporto tra il volume dei vuoti e il volume totale del materiale ed è una proprietà morfologica indipendente dal materiale con il quale viene realizzato lo *scaffold* [17]. La presenza dei pori, è necessaria in quanto permette la migrazione e la proliferazione di cellule all'interno della struttura tridimensionale, il passaggio di sostanze nutritive e la rimozione di prodotti di scarto del metabolismo e offre in un piccolo volume un'elevata superficie di adesione. Inoltre, un'adeguata struttura porosa consente il trasferimento di segnali intercellulari. Altre requisiti importanti che uno *scaffold* deve possedere sono: presentare una velocità controllata di biodegradazione, non essere citotossico, promuovere le interazioni tra cellula e substrato ed essere chimicamente compatibile con soluzioni acquose e condizioni fisiologiche

Anche la scelta della tecnica corretta da utilizzare per la creazione di *scaffold* è fondamentale in quanto la fabbricazione può alterare le proprietà dell'impianto e le sue caratteristiche di degradazione.

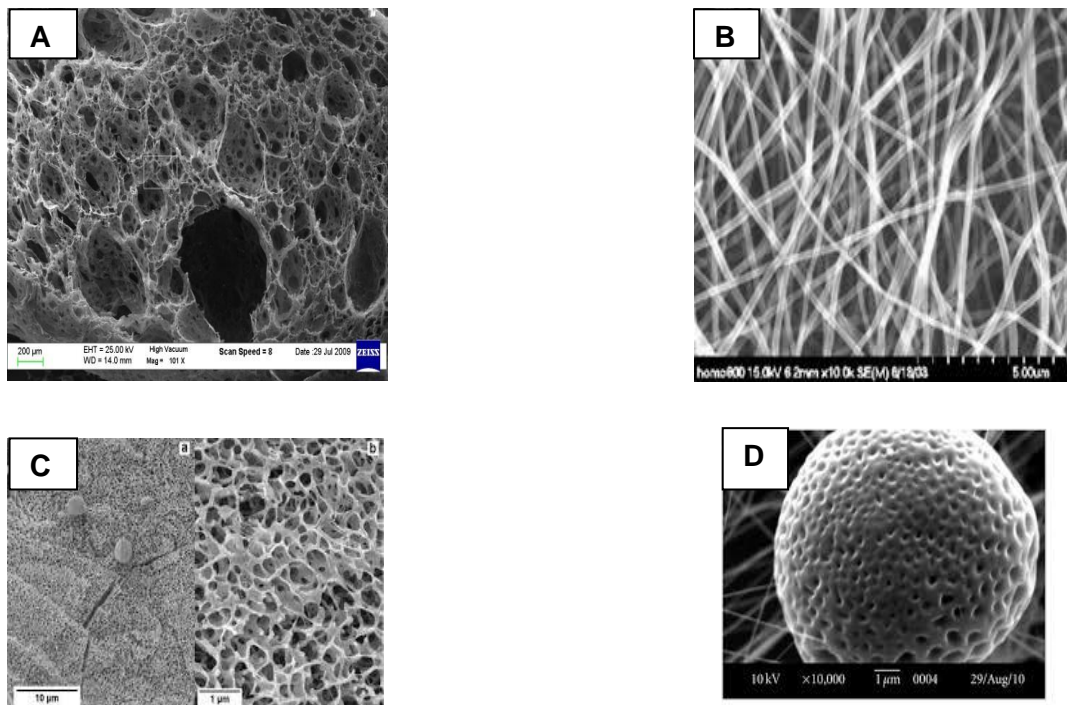
Un' altro fattore importante nella formazione degli *scaffold* è il materiale utilizzato per realizzarli; le caratteristiche principali che un materiale deve possedere sono la biocompatibilità, in modo da non provocare una risposta



indesiderata dell'organismo all'impianto, e la biodegradabilità, in modo da essere riassorbiti simultaneamente alla crescita cellulare per essere quindi gradualmente sostituiti dai nuovi tessuti senza rilasciare prodotti tossici per l'organismo.

Tra i vari tipi di *scaffold* abbiamo :

- *scaffold* altamente porosi e con struttura dei pori ben interconnessa,
- matrici di nanofibre realizzate con elettrospinning,
- matrici iniettabili come idrogel,
- microsfere porose,



**Figura 2.5:** Esempi di scaffold: A)3D porous matrix, B)nanofiber mesh, C)Hydrogel, D)Porous microsphere.

I materiali esistenti possono essere suddivisi in due classi: naturali e sintetici. I materiali naturali sono spesso utilizzati nell'ingegneria dei tessuti biologici. Le proteine come il collagene e la fibrina sono comunemente utilizzate come scaffold per rigenerare vari tessuti. Il collagene per esempio è stato ampiamente utilizzato per la riparazione di diversi tessuti come la cartilagine, nervi, vasi sanguigni, valvole cardiache, legamenti e tendini [7].

I materiali sintetici utilizzati come *scaffold* possono essere metallici, ceramici e polimerici. I materiali polimerici rispetto alle altre classi di materiali possiedono maggior biocompatibilità, biodegradabilità, la possibilità di modificare composizione e proprietà fisiche, e la facile lavorabilità. Gli svantaggi riguardano, invece, la presenza di sostanze che possono essere rilasciate nell'organismo durante il processo di degradazione, quali catalizzatori o monomeri [16]. I peptidi auto-assemblanti si trovano tra le due classi di materiali sopra descritti; essi non sono presenti in natura ma sono composti da blocchi naturali [16]. Riassumendo in una tabella le principali caratteristiche considerate al momento della realizzazione e progettazione avremo:

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

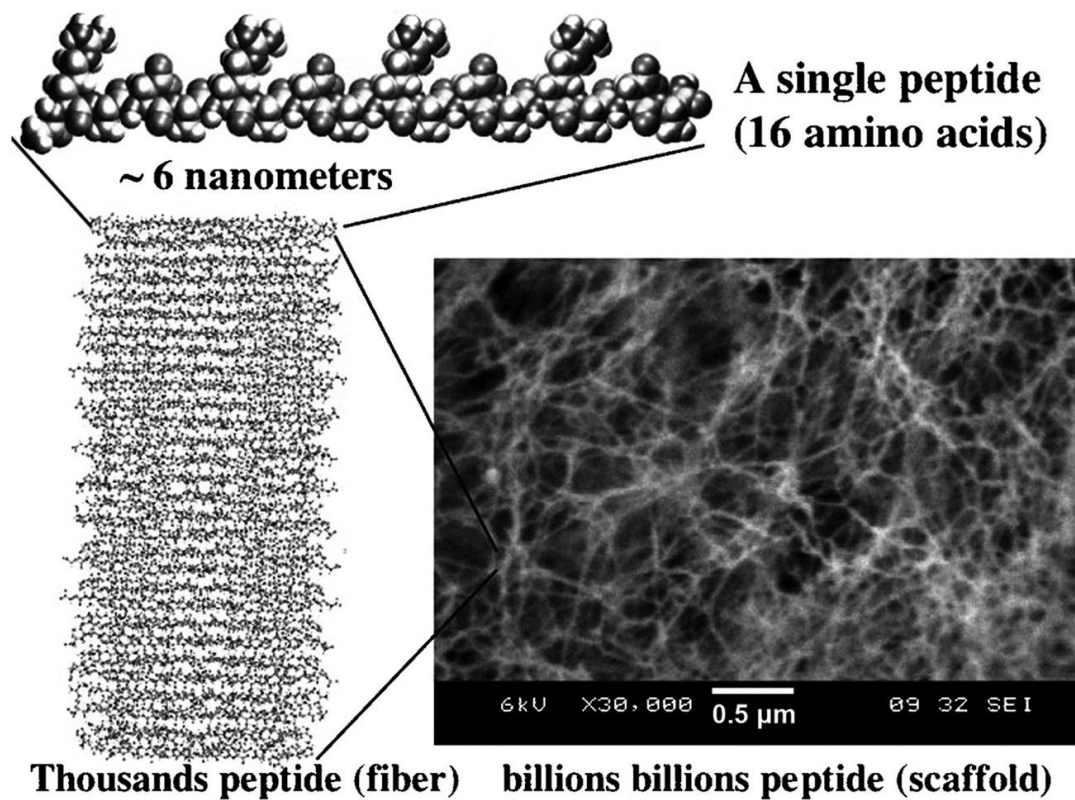
### 2.3.1 Scaffold di peptidi auto-assemblanti

Negli ultimi decenni i peptidi auto-assemblanti sono emersi come potenziali candidati per la costruzione di *scaffold* nell'ingegneria tissutale [18]. L'elevata capacità e l'efficacia terapeutica di questi *scaffold* è stata stabilita in diversi modelli animali [19] successivamente sono stati ampiamente impiegati per la rigenerazione di diversi tessuti. I peptidi auto-assemblanti essendo biocompatibili, biodegradabili e possedendo molti dei fondamentali requisiti per la creazione di uno *scaffold* vengono ampiamente utilizzati nell'ingegneria tissutale. Permettono dunque di ottenere strutture bi- o tri-dimensionali utilizzabili per promuovere interazioni multidimensionali e incrementare la densità cellulare. Tali matrici possono essere fabbricate in varie forme, quali stringhe, foglietti o nastri, aventi differenti spessori. La concentrazione peptidica incide sulla geometria finale e sulle dimensioni delle matrici macroscopiche. In particolare un peptide di 16 residui (Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys)<sub>2</sub> (pept1) ha dimostrato elevata propensione a formare strutture beta-sheet. In seguito all'addizione di sale, il peptide fornisce spontaneamente membrane, di composizione semplice e completamente atossiche, che risultano particolarmente resistenti alla digestione proteolitica (tripsina, alfa-chimotripsina, papaina, proteasi K e pronasi). Il tipo di sale utilizzato sembra svolgere un ruolo importante nell'indurre il processo di assemblaggio: l'ordine di efficacia della formazione di membrane è:  $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$ . Le membrane, secondo il modello proposto dagli autori, vengono a formarsi per l'accatastarsi di foglietti con struttura beta-sheet; ciascun foglietto si lega al precedente, alternativamente tramite ponti ionici tra i gruppi carichi delle catene laterali (residui Glu e Lys) o tramite interazioni idrofobiche tra le catene laterali dei residui di alanina. A tale scopo le tecniche spettroscopiche possono dare utili indicazioni sulla conformazione dei peptidi e sulle interazioni intermolecolari e intramolecolari esistenti in questi sistemi complessi (formazione e forza dei legami ad idrogeno, interazioni tra catene laterali cariche, interazioni tra catene laterali idrofobiche). Tra i peptidi più utilizzati per la costruzione di *scaffold* troviamo anche il peptide EAK16-II che è

costituito da una sequenza di 16 amminoacidi e fu descritto nel lievito da Zhang e collaboratori; RAD16-II che consiste nell'alternanza di amminoacidi idrofili e idrofobi ed è altamente solubile in acqua; il KLD12, P11-4 e molti altri [20]. Negli ultimi decenni, *scaffold* di peptidi auto-assemblanti sono stati impiegati nella rigenerazione di diversi tessuti: nervoso, osseo, cardiaco e cartilagineo. Inoltre ricombinare peptidi con fattori di crescita (p. es. il fattore di crescita endoteliale vascolare - VEGF) risulta un requisito fondamentale per il successo e la rapida rigenerazione dei tessuti, in quanto questi stimolano la proliferazione e la crescita delle cellule. Importante è anche progettare nuove strategie per incorporare più fattori di crescita sugli *scaffold*. Nella tabella vengono elencati alcuni dei peptidi auto-assemblanti più utilizzati in applicazioni biomedicali.

Peptide	Sequence	Origin of the sequence	Application	Outcome of the study
RADA16-1-BMHP1	Ac-RADARADARADARADAGGPFSTKT-CONH2	Bone marrow homing peptide 1(BMHp1)	Transplantation as neuroprosthetics with combination of electrospun fibers/ SAP scaffolds	Reconstruction and neurological recovery of chronically injured spinal cord
RADA 16-1-BMHP1	Ac-(RADA)4-GGPFSSTKT-NH2	BHMP	3-D culture of neural stem cells (NSCs)	Functional motifs enhanced the NSC proliferation and differentiation
RADA16-1-BMHP2	Ac-(RADA)4-GGSKPPGTSS-NH2	BHMP	3-D culture of neural stem cells (NSCs)	Functional motifs enhanced the NSC proliferation and differentiation
RADA16-1-RGD	Ac-(RADA)4-GPRGDSGYRGDSG-NH2	Collagen VI	3-D culture of neural stem cells (NSCs)	Functional motifs enhanced the NSC proliferation and differentiation
RAD A16-1	(RADA)4	*	3-D culture of neural stem cells (NSCs)	Functional motifs enhanced the NSC proliferation and differentiation
MMP-2	(C16-GTAGLIGQS)	Matrix metallo proteinase-2(MMP2)	Hybrid scaffold of electrospun Poly caprolactone (PCL) fibers and selfassembling PAs	Significant improvement in human mesenchymal stem cells (hMSCs )attachment and spreading
RGDS+MMP-2	(C16-GTAGLIGQSRGDS)	Cell adhesion ligand RGDS	Hybrid scaffold of electrospun Poly caprolactone (PCL) fibers and selfassembling PAs	Significant improvement in human mesenchymal stem cells (hMSCs )attachment and spreading
RADA16	Ac(RADA 4)CONH2	*	Osteogenic differentiation of MCT3T3-E1 cells	Designer peptide sequences have accelerated the cell attachment and migration
ALK	Ac(RADA)4GGALKRQGRTLYG F -CONH2	Osteogenic growth peptide	Osteogenic differentiation of MCT3T3-E1 cells	Designer peptide sequences have accelerated the cell attachment and migration
DGR	Ac(RADA)4GGDGRGDSVAYGC ONH2	Osteopontin	Osteogenic differentiation of MCT3T3-E1 cells	Designer peptide sequences have accelerated the cell attachment and migration
PRG	Ac(RADA)4GPRGDSGYRGDSC ONH2	2-unit RGD motifs	Osteogenic differentiation of MCT3T3-E1 cells	Designer peptide sequences have accelerated the cell attachment and migration
HBPA	H3C(CH2)14COAAAAGGGLRK KLGKA	Heparin-binding peptide(HBPA)	Vascular endothelial growth factor (VEGF) and Fibroblast growth factor (FGF-2) delivery through HBPA scaffolds for Islet transplantation	Increased vascular density and hence islet engraftment

rP11-4 peptide	QQRFEWEFEQQ	Recombinant peptide	Cytocompatibility studies using Human dermal fibroblasts	rP11-4 hydrogel was shown to be noncytotoxic
Fmoc FF/RGD	FF/RGD	RGD sequence	3-D culture of human dermal fibroblasts	Cells grown on FF/RGD showed extended and spread morphology
SAPNF	RADA	*	Potential substrates for Islet transplantation	Enhanced viability and stimulation of SAPNF-treated islets
d-EAK6	EAK16	D-form self-assembling peptide	Haemostasis study in rabbit liver wound healing model	Rapid haemostasis observed upon addition of d-EAK16
YIG	AcN-YIGSR-GG-(RADA)-CONH2	Laminin 1	Functionalized SAP scaffolds to study Human aortic endothelial cell functions	Endothelial cell phenotype and basement membrane deposition was promoted
RYV	AcN-RYVVLPR-GG-(RADA)4-CONH2	Laminin 1	Functionalized SAP scaffolds to study Human aortic endothelial cell functions	Endothelial cell phenotype and basement membrane deposition was promoted
TAG	AcN-TAGSCLRKFSTM-GG-(RADA)4-CONH2	Collagen IV	Functionalized SAP scaffolds to study Human aortic endothelial cell functions	Endothelial cell phenotype and basement membrane deposition was promoted
RADA-16-I + RGD RADA-16-I + YIG	AcNGRGDSPGGRADARADARADARADA-CONH2 AcNYIGSRGGRADARADARADARADA-CONH2	Collagen Laminin	Hepatocyte sandwich culture on functionalized RADA-16-I peptides	Maintenance of adult hepatocyte cell phenotype on the peptide modified membranes
IKVAV -PA	C16H31O-A3G4D2 IKVAV	Domain present on $\alpha$ 1 chain of laminin	Subcutaneous injection of peptides to study angiogenesis in rat model	Significant induction of angiogenesis was observed
KVAV -PA	C16H31O-A3G4D2 IKVAV	Domain present on $\alpha$ 1 chain of laminin	To study the differentiation of Bone marrow stem cells (BMSCs) into neurocytes	Induced the BMSCs adhesion and differentiation into neurocytes
FGL -PA	C22H45-NHAAAGGGEVYVVAENQQGKSKA-COOH	One of the Fibroblast growth factor receptor modulator	<i>In vitro</i> biocompatibility using neural stem cells	Improved neuronal differentiation was observed
P24	(S[PO4])KIPKASSVPTLSAISTLYLDDD	Peptide derived from Bone morphogenetic protein 2(BHMP2)	Study ectopic bone formation using collagen scaffolds loaded with the novel peptide	Excellent osteoinductive and osteogenic properties similar to BMP-2
KLDL3	AcN-KLDLKLKLDL-CNH2	*	Growth factor delivery for chondrocytes and bonemarrow stromal cells using SAP scaffolds	Capable of the growth factor delivery and promote cartilage repair <i>in vivo</i>
KLD-12	AcN-KLDLKLKLDL-CNH2	*	Biocompatibility of peptide hydrogel using MSCs and rabbits as scaffold for Intervertebral discs	Showed good biocompatibility in host rabbits and MSCs
RADA-16 RGDA-16	Ac-RADARADARADACONH2 Ac-RADARGDARADARADARADACONH2	RGD sequence	Compare the two peptide scaffolds using the preosteoblast cell-line (MC3T3-E1)	RGDAmix has promoted cell attachment, spreading and proliferation



**Figura 2.6:** Auto-assemblaggio del peptide RAD16-I e *scaffold*. A Sinistra) nanofibre del peptide RAD16-I (le dimensioni sono  $\approx 6$  nm di lunghezza, larghezza 1,3 nm e 0,8 nm di spessore); A destra) Immagine SEM del relativo *scaffold*.



## **Capitolo 3**

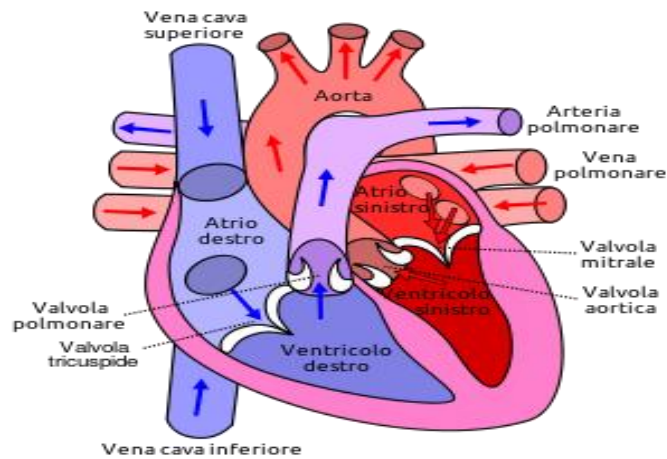
### **Applicazioni di peptidi auto-assemblanti per la costruzione di *scaffold* nei tessuti**

#### **3.1 Tessuto Cardiaco**

Il cuore è la pompa che spinge il sangue attraverso l'albero vascolare. E' posto al centro della cavità toracica, più precisamente nel mediastino medio. Istologicamente esso è composto da due foglietti epiteliali, uno esterno chiamato pericardio e uno interno chiamato endocardio, tra i quali è frapposta la muscolatura, denominata miocardio. All'interno è suddiviso in quattro cavità distinte, due superiori (atrio destro e sinistro) a pareti sottili e due inferiori (ventricolo destro e sinistro) di forma più allungata e con pareti più spesse ai quali spetta il vero e proprio compito di eiezione del sangue in circolo. Possiamo distinguere due tipi di circolazione. La prima, che confluisce nell'atrio destro, viene chiamata piccola circolazione e convoglia il sangue ricco di anidride carbonica proveniente dal corpo. Passando poi per il ventricolo destro, il sangue viene pompato verso i polmoni dove rilascerà l'anidride carbonica per arricchirsi di ossigeno. Nella seconda, chiamata grande circolazione, il sangue ossigenato proveniente dai polmoni entra nell'atrio sinistro, passa nel ventricolo sinistro e da qui viene pompato verso tutto il corpo a pressione elevata.

Questo meccanismo di pompaggio segue un'unica direzione e per impedire il reflusso sanguigno esistono quattro valvole cardiache. Le valvole cardiache si suddividono in due tipologie: le valvole atrioventricolari le semilunari. Le valvole atrioventricolari comprendono la *valvola tricuspide*, posta tra l'atrio destro e il ventricolo destro, e la *valvola mitrale*, tra l'atrio sinistro e il ventricolo sinistro [21].

Le valvole che regolano il flusso sanguigno tra ventricoli e arterie sono: la *valvola polmonare*, tra ventricolo destro e arteria polmonare, e la *valvola aortica*, tra ventricolo sinistro e aorta



**Figura 3:** Anatomia del cuore.

Le malattie cardiache rimangono fra le principali cause di mortalità malgrado gli avanzamenti e miglioramenti negli approcci terapeutici.

Una delle problematiche del tessuto cardiaco più diffuse è l'infarto miocardico acuto. Con infarto del miocardio (IMA) si intende la sindrome coronarica acuta dovuta all'ostruzione di una arteria coronaria a seguito della fessurazione del cappuccio fibroso di una placca ateromatosa con formazione di un trombo occludente e conseguente necrosi del tessuto miocardico, incapace di sopportare condizioni di ipossia anche per brevi tempi.

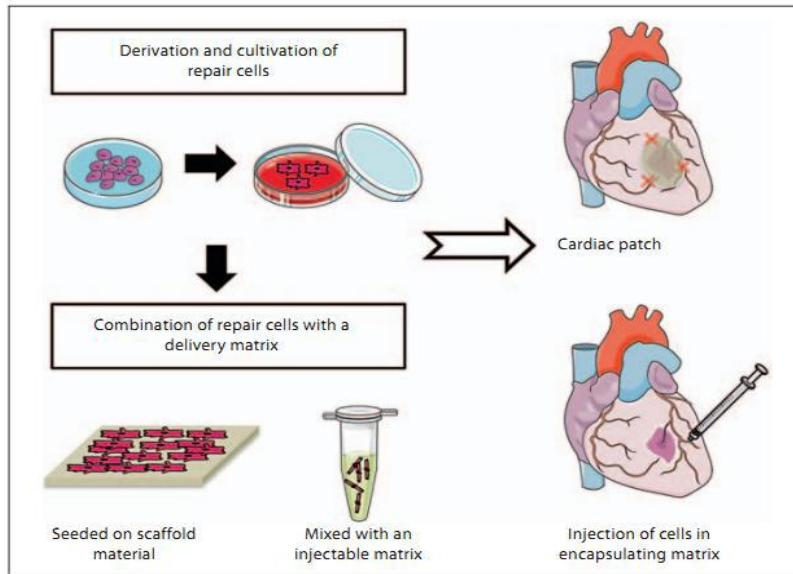
Nei sopravvissuti a un IMA intervengono spesso complicanze elettriche (fibrillazione, tachicardia, blocchi ventricolari o atriali) e/o anatomiche, come l'aneurisma ventricolare, che riduce la contrattilità cardiaca globale e predispone all'insorgenza di uno scompenso cardiaco; in presenza di aneurisma ventricolare è più probabile che si verifichino aritmie ventricolari, che possono mettere in pericolo la vita del soggetto; all'interno dell'aneurisma ventricolare si formano più facilmente trombi parietali, che possono rappresentare il punto di partenza di emboli [22].

Anche l'assottigliamento della zona infartuata e perinfartuale determina deterioramento delle funzionalità del cuore. Per rimediare a questi problemi sono in fase di sviluppo terapie cellulari basate su cellule staminali impiantate su appositi *scaffold* nell'intento di rigenerare il tessuto miocardico [23].

In quest'ottica di sta facendo strada il concetto di un'ingegnerizzazione in vivo, che prevede che la struttura di supporto senza cellule a bordo venga impiantata nel paziente, dove ci si attende che recluti le cellule staminali e ne guidi la crescita verso il fenotipo di interesse. Questo approccio risulta di notevole valore applicativo, in quanto non comporta la manipolazione in laboratorio di cellule staminali e quindi elimina tutte le difficoltà tecniche e normative connesse [24].

### **3.2.1 Rigenerazione del tessuto cardiaco con *scaffold* di peptidi auto-assemblanti**

Esperimenti destinati alla creazione di colture di cardiomiociti su supporti tridimensionali (*scaffold*) per lo studio dello sviluppo e delle funzionalità del tessuto cardiaco in *vitro* Sono già stati realizzati con successo. Tali colture, se funzionali, potranno essere successivamente impiegate per la rigenerazione del muscolo cardiaco in *vivo*. In figura 3.1 sono riportati due approcci per l'ingegneria del tessuto muscolare cardiaco, ovvero la semina di cellule seminate su *scaffold* o la loro sospensione in una matrice iniettabile. Nel primo approccio il costrutto formato può essere posizionato come patch nella zona lesa e nel secondo venire invece iniettato.

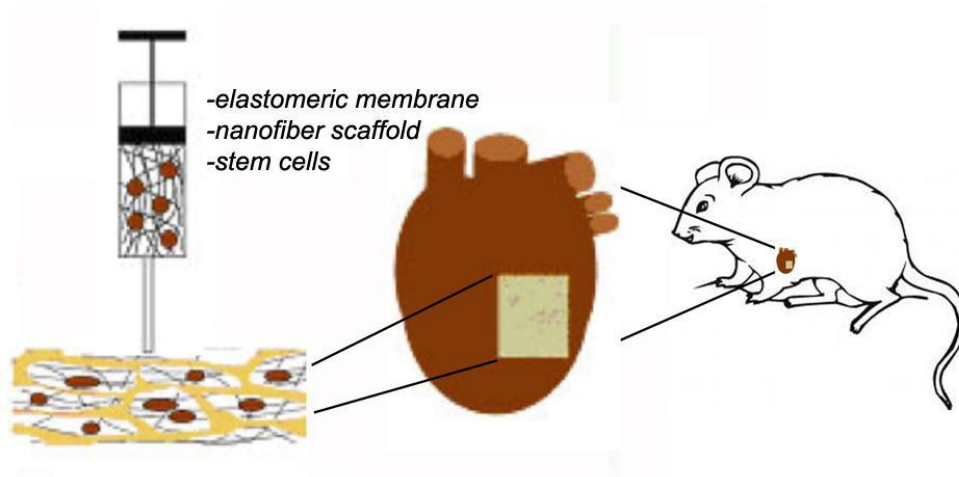


**Figura 3.1** : In alto schema di cellule seminate su *scaffold*; in basso cellule iniettate in matrice

La scelta del materiale per la costruzione dello *scaffold* è un parametro fondamentale che può determinare il successo della rigenerazione del tessuto. *Scaffold* ideali per il tessuto cardiaco dovrebbero 1) avere buona contrattilità, flessibilità e robustezza, 2) essere ampiamente vascolarizzati o raggiungere un'adeguata vascolarizzazione rapidamente dopo l'impianto, 3) essere elettrofisiologicamente stabili e non immunogenici.

Recentemente i peptidi auto-assemblanti sono emersi come potenziali candidati tra le varie categorie di biomateriali per la rigenerazione del tessuto cardiaco grazie alle loro caratteristiche [25]. Il peptide più utilizzato per la rigenerazione del tessuto cardiaco è il peptide RAD16-II .

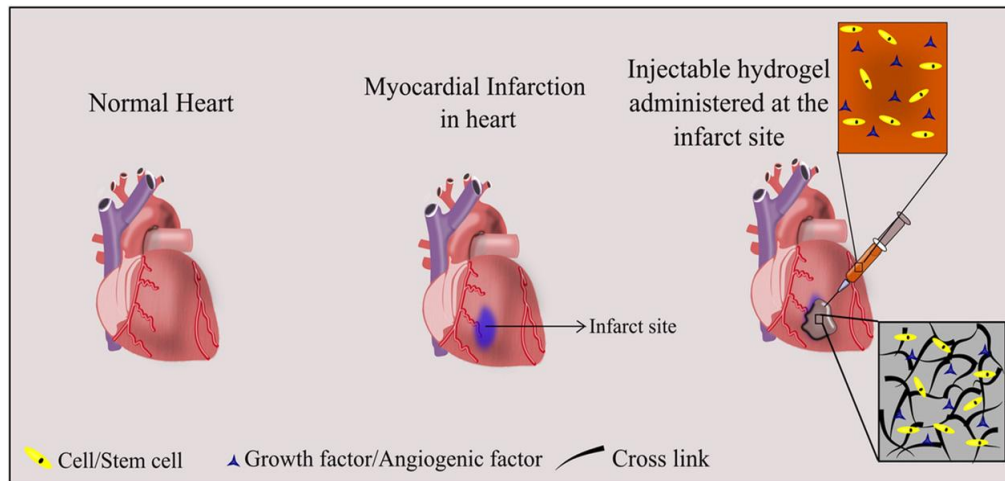
Uno studio recente fatto da tutti i gruppi di ricerca di RECATABI (*Regeneration of Cardiac Tissue Assisted by Bioactive Implants*) ha dimostrato la possibilità di sviluppare un impianto bioattivo funzionale per migliorare la rigenerazione del miocardio infartuato. La metodologia utilizzata è rappresentata nella seguente figura.



Uno *scaffold* (in figura giallo) con proprietà meccaniche simili al tessuto cardiaco è stato riempito con peptide auto-assemblante e cellule staminali per ottenere un impianto bioattivo; successivamente è stato innestato nel tessuto cardiaco danneggiato per indurre la migrazione delle cellule staminali nel tessuto ischemico e per indurre la rigenerazione del tessuto.

L'impianto bioattivo si è integrato con successo alla zona infartuata, suggerendo la possibilità di rimodellare aree necrotiche del tessuto danneggiato e di rigenerare il tessuto cardiaco [23].

In uno studio condotto su maiali, l'uso di peptidi auto-assemblanti ha determinato riparazione del tessuto cardiaco dopo un infarto. In questo caso i peptidi auto-assemblanti venivano iniettati attraverso un catetere senza interventi chirurgici, quindi con una procedura meno invasiva. La loro iniezione nelle aree del cuore danneggiate determinava la formazione in situ di uno *scaffold*, favorendo una nuova crescita e una riparazione delle cellule.

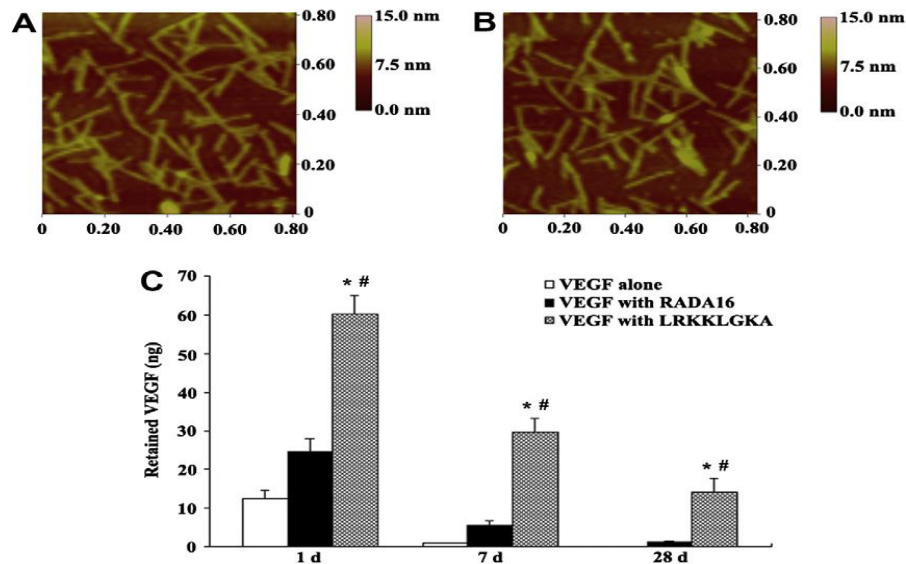


**Figura 3.3:** Idrogeli di peptidi auto-assemblanti iniettato in zona infartuata

Gli animali trattati non hanno mostrato effetti collaterali, come infiammazioni, lesioni o battito cardiaco aritmico [26].

Strategie che arricchiscono la realizzazione di uno *scaffold* includono l'uso combinato di fattori di crescita e fattori di adesione, poichè come già citato nei paragrafi precedenti, questi migliorano la crescita, la proliferazione e la migrazione cellulare.

La bontà di questa procedura è stato verificato da Guo e collaboratori, i quali hanno iniettato peptide RADA16 o LRKCLGKA insieme al fattore di crescita VEGF, coinvolto nella vasculogenesi e nell'angiogenesi, nel miocardio di ratti.



**Figura 3.2:** Uso combinato del fattore di crescita VEGF con peptidi RADA16 (A) e LRKKLKGA (B). Il fattore di crescita non ha impedito l'auto-assemblamento dei peptidi. Conservazione del fattore di crescita VEGF a distanza di 28 settimane.

A distanza di 4 settimane dall'impianto è stato possibile verificare che l'utilizzo combinato dei peptidi e del VEGF ha permesso di ottenere risultati migliori rispetto all'utilizzo del solo VEGF. In particolare, le analisi effettuate hanno dimostrato che la dimensione della zona infartuata veniva ridotta dal trattamento, indicando l'occorrere di fenomeni rigenerativi [27].

Altri fattori di crescita potenzialmente utilizzabili insieme ai peptidi autoassemblanti includono:

- gli IGFs (Insulin-like Growth Factors) antiapoptotici;
- il TGF- $\beta$  (Trasforming Growth Factors- $\beta$ ), impiegato per promuovere la differenziazione delle cellule staminali embrionali in cardiomiociti.
- i FGFs (Fibroblast Growth Factors), che regolano il processo di proliferazione, differenziamento e migrazione cellulare in tessuti diversi. E' stato osservato che il rilascio di FGF è in grado di stimolare l'angiogenesi.

## 3.2 Tessuto Cartilagineo

Il tessuto cartilagineo è un tessuto connettivo di sostegno costituito da cellule dette condrociti, immerse in una sostanza amorfa intercellulare, formata da fibre di collagene e da una matrice amorfa gelatinosa. La cartilagine forma l'abbozzo per la maggior parte delle ossa dello scheletro umano, nonché nelle metafisi durante l'accrescimento corporeo (cartilagine di coniugazione), le quali successivamente verranno mineralizzate e sostituite da tessuto osseo.

Nell'adulto la cartilagine permane in corrispondenza delle superfici articolari, nei dischi intervertebrali, nello scheletro del padiglione dell'orecchio esterno, a livello della sinfisi pubica e nei menischi articolari. Inoltre costituisce parte dello scheletro di sostegno delle vie aeree superiori e inferiori. Si forma inoltre in seguito a fratture in qualsiasi fase della vita. In tutte le zone in cui è localizzata, fatta eccezione per le superfici articolari, la cartilagine è rivestita da un involucro costituito da tessuto connettivo denso fibroso detto pericondrio. La cartilagine non è vascolarizzata e non è innervata, la diffusione avviene invece attraverso la matrice. Le cartilagini vengono classificate in base alla quantità e alla costituzione della sostanza amorfa e in base alle fibre in essa presenti.

Le principali caratteristiche di questo tessuto sono la solidità, la flessibilità e la capacità di deformarsi limitatamente [28].

Si distinguono tre tipi di cartilagine:

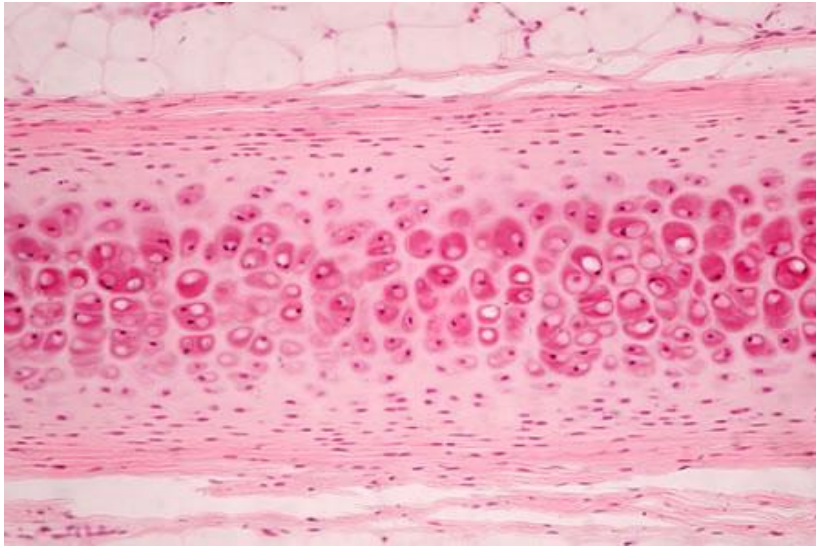
- cartilagine ialina
- cartilagine fibrosa
- cartilagine elastica

La cartilagine ialina è la più diffusa nel nostro corpo, è piuttosto elastica e resistente alla compressione. Costituisce le cartilagini costali, tracheali, bronchiali.



La cartilagine elastica costituisce l'impalcatura del padiglione auricolare e dell'epiglottide. Come informa il suo nome, è la tipologia di cartilagine più elastica e flessibile.

La cartilagine fibrosa è diffusa nei tendini, nei dischi intervertebrali e nei menischi delle ginocchia risulta essere particolarmente resistente a sollecitazioni meccaniche.



**Figura 3.5:** Cartilagine ialina. Colorazione con ematossilina-eosina.

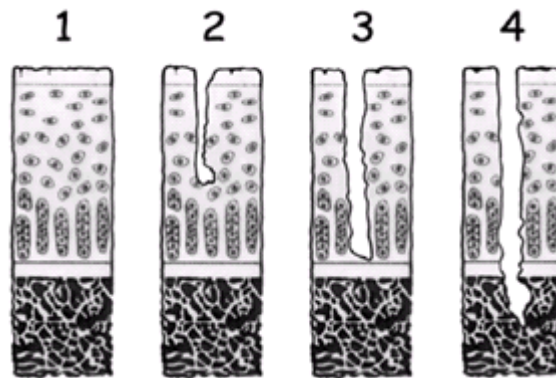
Le principali problematiche che colpiscono la cartilagine sono lesioni dovute a traumi e artrosi. L'artrosi è una delle cause più comuni di disturbi dolorosi, colpisce circa il 10% della popolazione adulta generale, e il 50% delle persone che hanno superato i 60 anni di età. Causa limitazioni nel movimento fino alla compromissione della motilità dell'articolazione. Le articolazioni maggiormente colpite sono quelle delle vertebre cervicali e lombari, dell'anca, delle ginocchia e del piede [29].

Esistono diverse tipologie di osteoartrosi:

- Primaria, se è causata da fattori genetici;
- Secondaria;
- Localizzata (monoarticolare);
- Generalizzata (pluriarticolare);

Le lesioni traumatiche sono state classificate secondo la loro profondità dall'*International Cartilage repair society (ICRS)* in 4 gradi

- un grado 0 (normale);
- un grado 1 (quasi normale: lesione superficiale);
- un grado 2 (anormale: lesione estesa fino a <50% dello spessore della cartilagine);
- un grado 3 (molto anormale: difetto >50%);
- un grado 4 (molto anormale: lesione osteocondrale);



**Figura 3.6:** rappresentazione grafica dei diversi gradi di danno cartilagineo secondo la ICRS:

### 3.2.1 Riparazione della cartilagine con *scaffold* di peptidi auto-assemblanti

La disponibilità di riparazione della cartilagine articolare rappresenta un importante traguardo se pensiamo alla frequenza dei traumi e lesioni in seguito a incidenti stradali o sportivi e alla grande percentuale di patologie infiammatorie, reumatiche e degenerative cui la cartilagine va incontro con l'avanzare dell'età.

A quanto sopra menzionato si aggiunge la capacità di guarigione naturale limitata della cartilagine articolare. Risulta dunque necessario l'intervento clinico per impedire un'ulteriore degradazione della cartilagine articolare [29]. Gli sforzi della chirurgia in campo osteocondrale, sono rivolti all'elaborazione di tecniche che permettano di ripristinare un mantello cartilagineo articolare con caratteristiche biologiche e morfo-funzionali analoghe a quelle della cartilagine sana. La tecnica di trapianto di cellule

autologhe, soprattutto di condrociti è diventato un valido approccio nella riparazione di danni alla cartilagine articolare.

La scelta del materiale adatto alla costruzione dello *scaffold* risulta uno dei punti più critici nella strategia della rigenerazione cartilaginea. Numerosi materiali sono stati utilizzati quali *scaffold* per la coltivazione di condrociti [30].

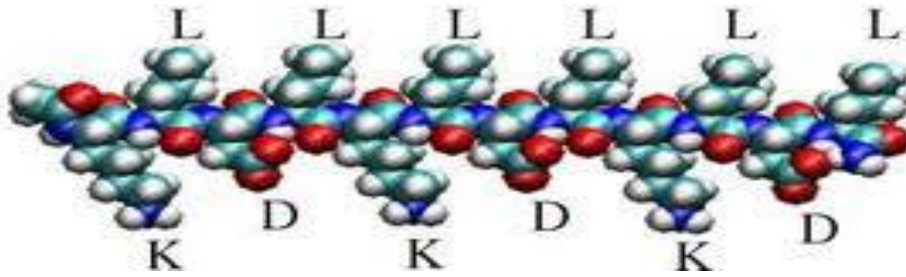
In questo scenario i peptidi auto-assemblanti si sono mostrati ottimi candidati per la riparazione di lesioni cartilaginee. Sono risultati materiali idonei per la proliferazione e il mantenimento del fenotipo condrocitico. Una serie di studi ha dimostrato che i condrociti in coltura perdono il loro fenotipo, e quando sono invece coltivati in idrogeli di peptidi autoassemblanti mantengono la loro morfologia e la loro capacità di differenziarsi. [referenza]

Il trattamento clinico si articola nelle fasi seguenti:

- Prelievo dei condrociti, per la coltura in vitro ed espansione su scaffold tridimensionale;
- mappatura;
- preparazione del sito di lesione;
- creazione di un area di impianto vitale per il funzionamento dello scaffold;

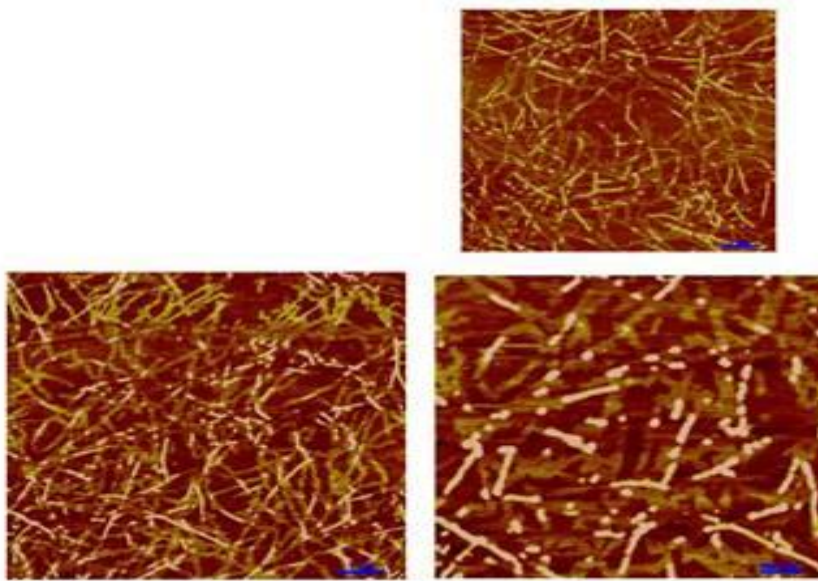
Una volta innestato, lo *scaffold* ricopre tutta l'area lesionata e stimola la proliferazione cellulare da parte dei tessuti circostanti per restituire continuità anatomica della zona trattata [31].

Un peptide ampiamente utilizzato è stato il KLD-12 con sequenza di ACN-KLDLKDLKLDL-CNH<sub>2</sub>; negli studi effettuati ha fornito un ambiente adeguato per la conservazione dei condrociti e del fenotipo; addizionato a fattori di crescita ha favorito l'integrazione con il tessuto circostante in vivo e la rigenerazione del tessuto.



**Figura 3.7:** (A) Modello molecolare di un peptide auto-assemblante KLD-12. I residui alternati idrofobi e idrofili promuovono la creazione dei piani  $\beta$ -sheet. La lisina carica positivamente (K) e acido aspartico carico negativamente (D) sono sul lato inferiore del  $\beta$ -sheet, mentre la leucina idrofoba (L) è sul lato superiore. Questa struttura molecolare facilita l'auto-assemblaggio tramite interazioni intermolecolari.

La natura del peptide utilizzato e la flessibilità della progettazione ha presentato vantaggi nel controllo del degrado dello *scaffold*, ha stimolato l'attaccamento delle cellule e migliorato l'interazione tra cellule e *scaffold*. Inoltre è stato dimostrato come l'applicazione di un carico meccanico al peptide ha stimolato lo sviluppo di un ECM ricca di proteine e proteoglicani [32]. Alcuni esperimenti sono stati ha dimostrato che piccoli peptidi lipofili e idrofili dopo essere stati iniettati in topi sotto forma di gel nell'articolazione dove è presente la cartilagine danneggiata, riescono ad autoassemblarsi formando una matrice molto solida, lo *scaffold*. La matrice riesce a legare il fattore di crescita TGF- $\beta$ 1. Mantenendo alta e molto localizzata la concentrazione di TGF- $\beta$ 1 si riesce a stimolare la formazione di nuova cartilagine a partire dalle cellule del midollo osseo. Nel giro di un mese, stando agli esperimenti sugli animali, la cartilagine si rigenera. La nuova cartilagine in questo modo inoltre, è più simile a quella normale, perché è ricca di fibre di collagene di tipo due.



**Figura 3.8:** Immagini AFM di scaffold del peptide KLD12 utilizzato per produrre culture cellulari 3-D per la rigenerazione del tessuto cartilagineo.

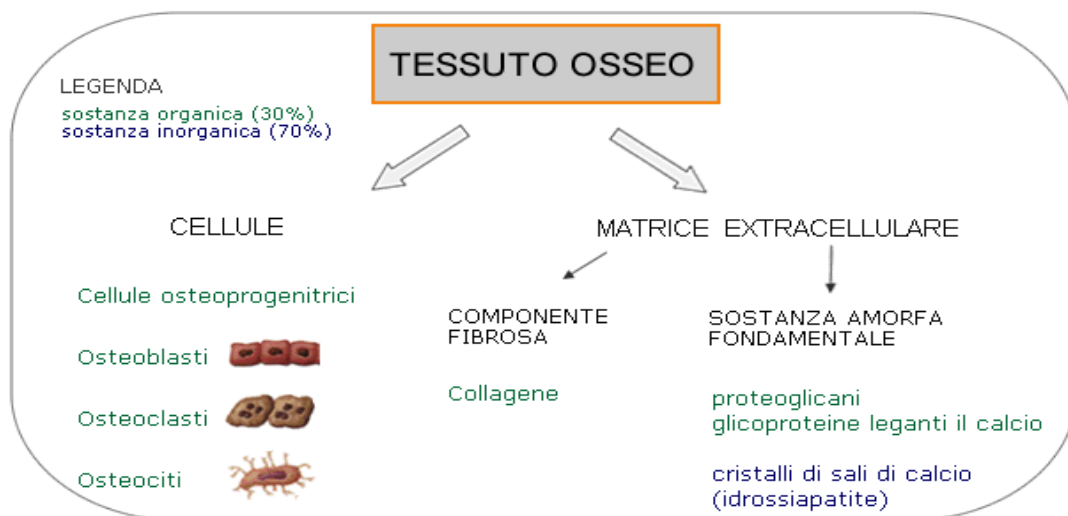
### 3.3 Tessuto Osseo

Il tessuto osseo è un tipo particolare di tessuto connettivo specializzato nella funzione di sostegno. E' costituito da cellule disperse in una matrice extracellulare formata da una componente fibrosa, abbondante, costituita principalmente da fibre di collagene di tipo I e da sostanza amorfa di origine glicoproteica [33].

All'interno del tessuto osseo e della stessa matrice cellulare troviamo componenti organiche e extraorganiche. Tra le componenti organiche oltre al collagene, i proteoglicani, alcune proteine non collageniche, le citochine e i fattori di crescita. Tra le componenti inorganiche troviamo minerali come fosforo, calcio, fluoro e magnesio. La presenza di minerali e di fibre di collagene conferiscono all'osso durezza e resistenza alla pressione, alla trazione e alla torsione. In particolare il collagene conferisce alle ossa elasticità, che si traduce in una resistenza alla trazione. La parte minerale da durezza e rigidità.

Le cellule che compongono il tessuto osseo sono cellule osteoprogenitrici. Possono essere suddivise in:

- osteoblasti, responsabili della formazione di matrice ossea e della sua mineralizzazione. Hanno forma sferoidale;
- osteociti, responsabili del rimodellamento osseo. Hanno una forma stellata con un corpo a forma di lente biconvessa dal quale si diramano numerosi prolungamenti citoplasmatici ramificati;
- osteoclasti, si occupano del riassorbimento osseo. Sono trasportati dalla corrente circolatoria fino al sito dove dovranno agire con un processo di riassorbimento;



**Figura 3.9:** Componenti del tessuto osseo

Dal punto di vista macroscopico si distinguono:

- un tessuto osseo di tipo fibroso o non lamellare.
- un tessuto osseo di tipo lamellare.

Il tessuto osseo fibroso, è un osso immaturo e si rinviene normalmente nell'embrione, nei neonati e durante la guarigione delle fratture. Una volta depositato, il tessuto fibroso viene prontamente riassorbito e rimpiazzato con tessuto osseo di tipo lamellare.

L'osso non lamellare risulta più elastico e meno consistente di quello lamellare, a causa della minore quantità di minerali e della mancanza di un orientamento preferenziale delle fibre di collagene.

Il tessuto osseo lamellare forma l'osso maturo. Rispetto al precedente, è un tessuto più organizzato, con un orientamento ordinato e parallelo delle fibre collagene, che si dispongono in strati sovrapposti, detti lamelle ossee.

Il tessuto osseo lamellare è a sua volta suddivisibile in osso spugnoso ed in osso compatto.

- spugnoso (o trabecolare): adatto a resistere a sollecitazioni di tipo compressivo. Si trova soprattutto nelle ossa brevi, in quelle piatte e nelle epifisi delle ossa lunghe. Ha una struttura alveolare e contiene il midollo osseo;
- compatto: particolarmente rigido e resistente alla compressione, tensione e torsione. Si trova nelle diafisi delle ossa lunghe e riveste il tessuto spugnoso delle ossa brevi e piatte [35].

Le malattie ossee danneggiano lo scheletro rendendo le ossa deboli e soggette a fratture. La malattia ossea più frequente è l'osteoporosi, una condizione nella quale lo scheletro è soggetto a perdita di massa ossea e dunque resistenza causata da fattori nutrizionali, metabolici o patologici. Lo scheletro è quindi soggetto a un maggiore rischio di fratture patologiche. Altre malattie ossee comprendono il morbo di Paget e l'osteogenesi imperfetta.

Ossa deboli possono causare fratture dolorose e debilitanti. Ogni anno, 1,5 milioni di americani sono soggetti a fratture a causa della debolezza delle ossa. Negli Stati Uniti infatti le cure per il trattamento di fratture ossee da osteoporosi ammontano quasi a 18 miliardi dollari. Per tutte queste

problematiche la messa a punto di sostituti per il tessuto osseo risulta essere fondamentale.

### **3.3.1 Rigenerazione del tessuto osseo con *scaffold* di peptidi auto-assemblanti**

Sebbene il tessuto osseo abbia un' alta capacità di auto-guarigione, la riparazione di grandi difetti ossei resta una sfida. E' stato quindi sperimentato l'uso di peptidi auto-assemblanti per la coltivazione cellulare.

I peptidi auto-assemblanti sono stati utilizzati in applicazioni sia in vitro sia in vivo. Recenti studi hanno dimostrato l'esistenza di numerosi vantaggi nell'utilizzare questa classe di materiali per la rigenerazione del tessuto osseo.

In particolare uno dei peptidi più utilizzati nella rigenerazione ossea, per le sue proprietà vantaggiose, è il peptide RAD16-I conosciuto anche con il nome PuraMatrix™. La sua composizione amminoacidica lo rende molto stabile in soluzione acquosa e anche a temperatura ambiente per lunghi periodi di tempo.

Anche per queste caratteristiche, questa classe di biomateriali viene molto utilizzata per la crescita e la proliferazione di vari tipi di cellule . L'applicazione risulta essere promettente in quanto è stato dimostrato che è possibile inglobare fattori di crescita e peptidi adesivi come le sequenze RGD per favorire e aumentare l'adesione e la proliferazione.

Nel contributo di Garreta et al.[34] si dimostra che fibroblasti embrionali primari di topo (MEF) coltivati in PuraMatrix™ si differenziano in cellule dell'osso. *Scaffold* 2D e 3D sono stati utilizzati in questo lavoro. La configurazione tridimensionale ha fornito risultati migliori per quanto riguarda la proliferazione, l'adesione, la sintesi di collagene I e la mineralizzazione della matrice. Si è inoltre evidenziato che l'arricchimento del supporto con motivi funzionali come il RAD (sequenza amminoacidica Arg-Ala-Asp) simile all'RGD ha incrementato ulteriormente il popolamento



da parte delle cellule. La loro introduzione ha incrementato l'omogeneità della distribuzione cellulare all'interno dello *scaffold* ma anche la successiva formazione di osso.

Uno studio simile è stato effettuato anche da Zhang et al [35]. In questo lavoro i ricercatori hanno progettato un nuovo peptide a partire dal peptide RADA16 ; per aumentare il potenziale di adesione di queste strutture sono stati impiegati segnali ALK, che mediano la crescita osteogenica, DGR che media l'adesione dell'osteopontina e due unità RGD. Il supporto così ottenuto presenta due fondamentali vantaggi, la facile progettazione e l'aumento dell'adesione e proliferazione rispetto a un semplice *scaffold* realizzato solo in RADA16. L'inclusione di questi segnali promuove la differenziazione osteogenica di cellule MC3T3-E1 e di conseguenza la rigenerazione dell'osso. Misawa et al [36] hanno analizzato peptidi auto-assemblanti anche in vivo, iniettando PuraMatrix in piccoli difetti ossei nel cranio di topi , utilizzando controlli a base di Matrigel™. Il Matrigel™ è un materiale a base di laminina, collagene e fattori di crescita molto utilizzato in colture cellulari. I risultati osservati si sono dimostrati migliori in caso di utilizzo di Puramatrix™, che determinava la formazione di un osso più robusto.

Hartgerink et al [37] hanno svolto uno studio che utilizzava un peptide anfifilico che auto-assembla in soluzioni acquose formando nanofibre e che promuove la nucleazione di cristalli di HA e l'adesione cellulare favorendo la mineralizzazione della matrice dove i cristalli di HA sono disposti parallelamente agli assi della fibra.

Mata et al [38] hanno invece sintetizzato un peptide la cui sequenza simula quella delle sialoproteine dell'osso favorendo la mineralizzazione. Lo *scaffold* è stato poi testato in vivo su femore di topi e a distanza di 4 settimane ha dimostrato una formazione di osso maggiore rispetto a cavie trattate con matrice ossea allogenica.

Le strutture auto-assemblanti evidenziano però alcuni limiti. Possono essere iniettate localmente per piccoli difetti, ma è molto difficile costruire patch in grado di coprire aree più grandi. Hanno inoltre resistenza meccanica bassa rispetto a quella del tessuto osseo.

Per ovviare a queste problematiche sono state progettate nuove matrici che aggiungono all' idrogel un materiale sintetico tridimensionale biodegradabile. Ad esempio, d un gel di alginato è stato unito del fosfato tricalcico (TCP) che ha aumentato la rigidità [39]. Tuttavia per piccoli difetti ossei *scaffold* di peptidi auto-assemblanti risultano essere molto adeguati, ma non abbastanza per riparare difetti piu' consistenti.

### 3.4 Tessuto Nervoso

Il tessuto nervoso ha la funzione di ricevere, trasmettere ed elaborare gli stimoli. E' costituito da un Sistema Nervoso Centrale (SNC), che comprende encefalo, midollo spinale e tonaca neurale dell'occhio, e un Sistema Nervoso Periferico (SNP), formato dai gangli e dai nervi. E' composto essenzialmente da due tipi di cellule: i neuroni e le cellule della glia. I neuroni sono cellule solitamente dotate di un lungho prolungamenti assonali, con la capacità di trasmettere l'impulso elettrico.

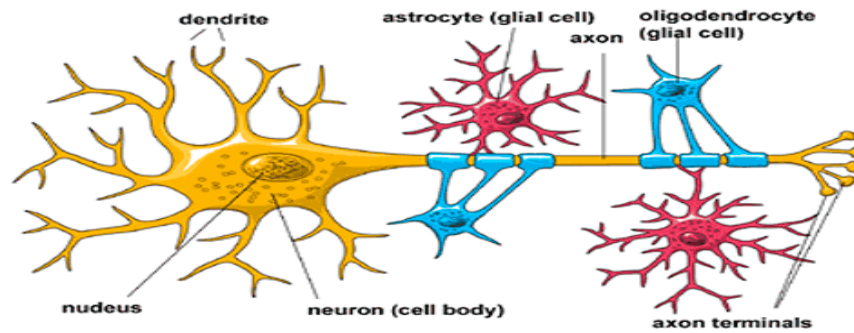
.Possiamo distinguere 3 tipi di neurone:

- sensitivi o afferenti: portano gli impulsi dai recettori periferici al sistema nervoso centrale;
- motori o efferenti: portano gli impulsi dal sistema nervoso centrale agli effettori periferici;
- di connessione: trasmettono i segnali all'interno del sistema nervoso centrale;

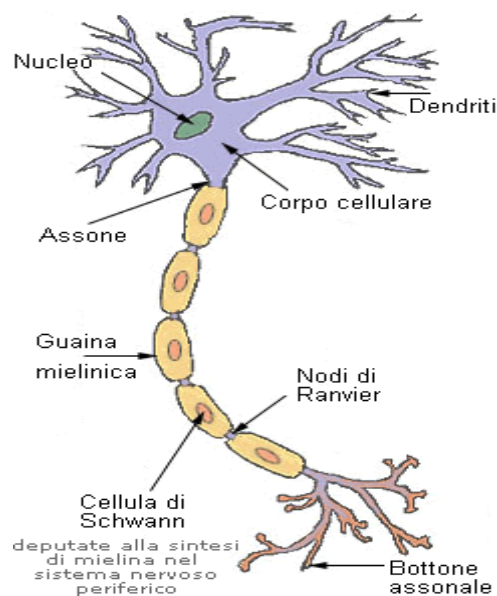
I neuroni constano di un corpo cellulare, detto soma o pirenoforo dal quale si dipartono due tipologie di prolungamenti: i dendriti, relativamente corti con la funzione di ricevere stimoli provenienti dall'esterno e gli assoni, di notevoli dimensioni con il compito di ritrasmettere l'informazione nervosa giunta al corpo cellulare. Le cellule della glia cellule di varia forma , con la funzione di supporto strutturale e funzionale rispetto ai neuroni, che assicurano loro nutrimento, protezione dalle lesioni, e svolgono altri compiti fisiologici come per esempio l'isolamento elettrico degli assoni. Esempi di cellule della glia sono:

- gli astrociti, cellule dotate di numerosi prolungamenti che ancorano fisicamente i neuroni assicurando loro il rifornimento di sangue;
- gli endoteliali, delimitano le cavità del sistema nervoso centrale e, favoriscono la circolazione del liquido cerebrospinale;
- gli oligodendrociti e le cellule di Schwann, isolano elettricamente gli assoni rivestendoli di una sostanza grassa chiamata mielina, producendo la cosiddetta guaina mielinica. La guaina è un isolante che permette una migliore propagazione dei segnali elettrici;
- i microglia o cellule della microglia, poco numerosi e localizzati in vicinanza dei pirenofori o dei vasi. La funzione loro predominante è quella fagocitaria per la distruzione o la rimozione di frammenti di neuroni in degenerazione;

L'impulso nervoso, che si è propagato lungo un assone sotto forma di potenziale d'azione, viene trasmesso a un altro neurone o a organi effettori (muscoli e ghiandole) attraverso giunzioni specializzate, dette sinapsi. I neuroni che trasferiscono l'impulso nervoso verso la sinapsi prendono il nome di neuroni presinaptici; quelli che lo trasferiscono a valle della sinapsi sono chiamati neuroni postsinaptici. I due neuroni sono separati da uno spazio extracellulare, detto fessura sinaptica. Il terminale assonico del neurone presinaptico è una struttura complessa, chiamata bottone sinaptico, contenente un mediatore chimico (neurotrasmettitore) che si accumula in piccole vescicole. Attivato il potenziale d'azione, il neurotrasmettitore viene liberato dal bottone sinaptico, diffonde nella fessura sinaptica e si lega con siti recettori della membrana postsinaptica. Una volta trasmesso il segnale, lo spazio sinaptico si prepara a ricevere l'impulso successivo.



**Figura 3.10:** Struttura di un neurone.



**Figura 3.11:** Struttura di una cellula della glia.

I danni al sistema nervoso centrale colpiscono circa 2 milioni di persone all'anno. Tra le maggiori lesioni rientrano i traumi al cervello e alla spina dorsale. Non sono meno frequenti le malattie neurodegenerative come ictus cerebrale, morbo di Parkinson, Alzheimer e sclerosi multipla. In alcune malattie viene lesa in modo significativo soltanto la sostanza grigia; se così è, i disturbi muscolari e sensoriali rimangono confinati ai tessuti che scambiano segnali con i neuroni del livello colpito del midollo spinale, senza alterare molto le funzioni al di sotto di tale livello. Se viene distrutta anche la sostanza bianca, la lesione interrompe i segnali in verticale,

impedendo ai messaggi che hanno origine nel cervello di propagarsi al di sotto dell'area danneggiata e bloccando anche il flusso di segnali sensoriali.

La lesione meccanica provoca danni che aumentano l'entità del danno funzionale. Gli assoni danneggiati si trasformano in monconi privi di collegamenti e le loro estremità cominciano lentamente a disintegrarsi. Invece di neuroni o di altre cellule, si crea una cavità piena di liquido, le cellule gliali iniziano a proliferare in modo anomalo, andando così a formare la cicatrice gliale. Il deterioramento del tessuto porta successivamente ad un rigonfiamento dei vasi sanguigni che dunque essendo ormai lesionati, non riescono più a svolgere uno dei compiti fondamentali cioè apportare sostanze nutritive e ossigeno alle cellule. Per risolvere questi problemi si cerca di riparare il tessuto nervoso attraverso la rigenerazione degli assoni danneggiati, inducendo così il loro allungamento e la riconnessione con le appropriate cellule bersaglio. È importante sottolineare che dal punto di vista delle lesioni, il sistema nervoso periferico (SNP) e il sistema nervoso centrale (SNC) rispondono diversamente .

Nel caso del SNC, a differenza del SNP raramente si è osservato una riparazione del tessuto danneggiato. Ciò comporta che malattie e lesioni a carico del SNC sono spesso degenerative e accompagnate da disfunzioni permanenti. Nel SNC mancano alcuni componenti fondamentali che invece sono presenti nel SNP come per esempio le cellule di Schwann.

Esse sono in grado di fornire nutrimento, provvedere alla mielinizzazione degli assoni rigenerati, sintetizzare fattori neurotrofici per favorire la sopravvivenza neuronale e la crescita assonale. Nel SNC, vi è invece sovrabbondanza di molecole che inibiscono la rigenerazione degli assoni.

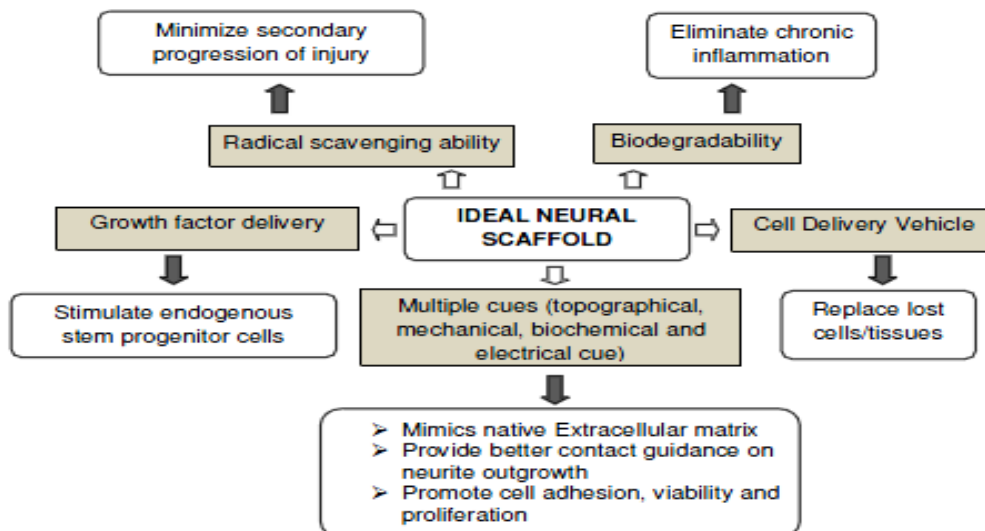
### **3.4.1 Rigenerazione del tessuto nervoso con *scaffold* di peptidi auto-assemblanti**

Sono stati valutati molti materiali da utilizzare per la rigenerazione del tessuto nervoso a causa delle caratteristiche differenti e complicate di quest'ultimo rispetto ad altri tessuti. Differenze nelle proprietà meccaniche,

nella struttura e nella composizione dell'ECM hanno effetti sulle funzioni cellulari.

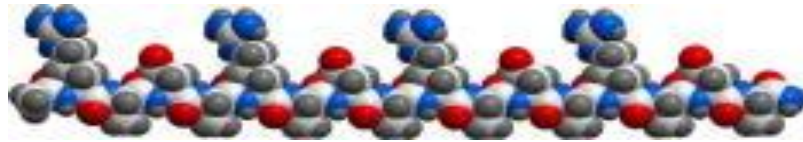
Tra i materiali capaci di imitare le caratteristiche del sistema nervoso troviamo i peptidi auto-assemblanti. Favorendo la sopravvivenza, la crescita e la differenziazione di molti tipi cellulari, in particolare cellule neurali, sia in vitro sia in vivo, risultano essere particolarmente favoriti nella rigenerazione del tessuto nervoso [40].

Le caratteristiche ideali di uno *scaffold* per la rigenerazione neurale sono riportate nella figura qui di seguito.



**Figura 3.12:** Caratteristiche ideali dello scaffold per la rigenerazione dei tessuti nervosi

Il peptide più utilizzato nella costruzione di *scaffold* per la rigenerazione del tessuto nervoso è il RAD 16-I (sequenza H-Ala-Arg-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Asp-NH<sub>2</sub>) coniugato a una sequenza adesiva della laminina (Isoleucina-Lisina-Valina-Alanina-Valina (IKVAV)), in grado di promuovere e dirigere la crescita di neuriti.

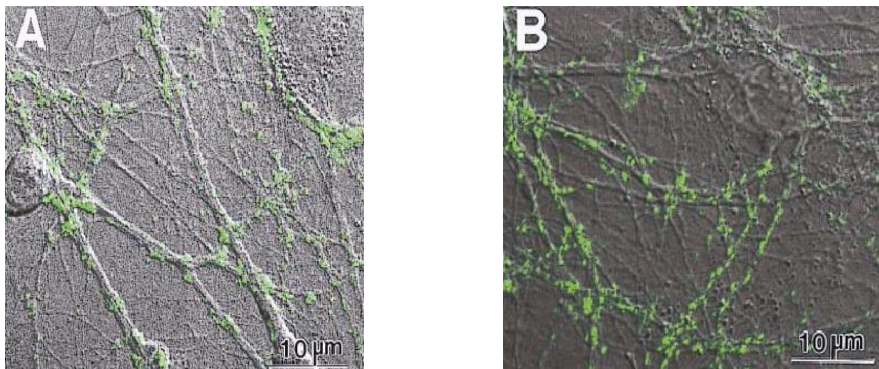


**FIGURA 3.13:** modello molecolare del peptide RADA 16-I

In uno studio condotto su topi è stato realizzato uno *scaffold* a partire dal RADA16, sintetizzando un peptide di 31 amminoacidi. Lo *scaffold* è stato successivamente modificato inserendo un motivo funzionale FRM, il quale permette di migliorare l'interazione cellula- *scaffold*. Le sue caratteristiche sono state valutate con microscopio a forza atomica, ed è stata esaminata la sua biocompatibilità.

E' stato verificato che il peptide contenente il motivo FRM promuove il processo di assemblaggio e stimola la proliferazione e la migrazione verso l'impalcatura 3D [41].

Anche l'utilizzo di PuraMatrix favorisce il processo di differenziamento e crescita neuronale e la formazione di connessioni sinaptiche.



**Figura 3.14:**Neuroni dell'ippocampo di ratto formano sinapsi attive (A) sulla superficie peptidica, (B) su Matrigel.

Nella riparazione del sistema nervoso centrale, la cicatrice gliale è il principale ostacolo alla rigenerazione assonale dopo una lesione al midollo spinale. Inibire la sua formazione è perciò necessario.

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

Un idrogel proveniente dall'auto-assemblaggio di molecole peptidiche che non contengono solo l'epitopo di germinazione neuronale IKVAV, ma che contengono anche un residuo Glu, quattro residui Ala, tre residui Gly, e una coda di 16 atomi di C. Favorisce l'auto-assemblaggio e crea una parte idrofoba. Inoltre, incorporando la sequenza IKVAV, queste nanofibre inibiscono ancor più la formazione della cicatrice gliale, migliorando la differenziazione delle cellule e favorendo l'allungamento dell'assone [42].

Uno studio condotto negli ultimi anni ha sviluppato nuovi peptidi funzionalizzanti, derivanti dall'incorporazione della sequenza BMHP1 per la rigenerazione delle lesioni croniche del midollo spinale.

E' stato così realizzato uno *scaffold* composito nanostrutturato, costituito da microguide elettrofilate tubulari riempite con il peptide RADA16 funzionalizzato e imbibito di proteine stimolanti la rigenerazione.

In questo studio è stato sviluppato un metodo per sostituire la cisti e la cicatrice gliale tipiche delle lesioni croniche del midollo spinale, con un substrato permissivo alla ricrescita nervosa [43]. Altre protesi neurali assemblando peptidi auto-assemblanti sono state realizzate da altri ricercatori. Sono state impiantate in cisti di ratti con lesione midollare indotta in stato post acuto e dopo vari mesi è stata osservata una cospicua ricostruzione della colonna vertebrale. La cisti è stata sostituita da un tessuto comprendente cellule neurali e stromali. A ciò si è accompagnato un notevole miglioramento nell'attività delle fibre motrici ascendenti e discendenti e nella prestazione locomotoria complessiva. Inserendo matrici nanostrutturate nelle neuro protesi è possibile ricreare un framework anatomico, strutturale e istologico, che permette la sostituzione di larghe porzioni di tessuti favorendo rigenerazione assonale e recupero neurologico [44].



## **CAPITOLO 4**

### ***Scaffold* di peptidi auto-assemblanti come Drug Delivery System**

#### **4.1 Drug Delivery**

Il drug delivery riguarda lo sviluppo di sistemi alternativi per l'indirizzamento dei farmaci nell'organismo avente l'obiettivo di circoscriverne l'effetto biologico su una determinata tipologia di cellule, migliorando l'efficacia e riducendo la tossicità di una terapia [45].

Rappresenta dunque una delle opportunità più rilevanti e una nuova prospettiva terapeutica per la somministrazione alternativa di farmaci soprattutto per malati cronici in quanto necessitano di dosi elevate e continue di medicinale, subendo i negativi effetti collaterali derivanti dal loro utilizzo prolungato. La somministrazione del farmaco per via parentale è uno dei metodi più largamente utilizzati; questo include anche somministrazione endovenosa, sottocutanea e intramuscolare. Per specifici trattamenti localizzati sono utilizzati altri metodi di somministrazione che coinvolgono procedure chirurgiche anche molto invasive. La somministrazione di farmaci per via parentale è spesso associata a una cattiva biodisponibilità del farmaco. Per ovviare a questi inconvenienti la somministrazione viene effettuata ad alte concentrazioni e con alto dosaggio. Tuttavia alte concentrazioni possono provocare effetti collaterali o risposte immunitarie. Un approccio promettente consiste nell'utilizzare mezzi di rilascio, in questo metodo il farmaco somministrato è incapsulato in un materiale.

La somministrazione di farmaci tramite l'impiantazione o l'iniezione di sistemi di rilascio del farmaco permette dunque di ottenere vantaggi rispetto alle terapie convenzionali. Uno dei vantaggi consiste nella possibilità di somministrare l'intero quantitativo di farmaco necessario per una terapia in una sola volta e in modo controllato. E' possibile inoltre indirizzare il rilascio

del farmaco solamente in una specifica zona evitando il contatto potenzialmente nocivo tra il farmaco ed organi non interessati. Nonostante i notevoli sviluppi negli ultimi decenni rimane di fondamentale importanza utilizzare materiali con un elevato grado di biocompatibilità, sensibili alle condizioni ambientali e capaci di imitare i naturali sistemi di rilascio.

Importanti sono anche le dimensioni dei materiali utilizzati i quali devono possedere dimensioni macro o (>1mm), micro (100- 0.1 µm) e nano (100 – 1 nm). Le micro particelle di interesse biomedico hanno dimensioni comprese tra 5 nm e 2 µm, la cui velocità di rilascio dipende dalla capacità di diffusione del farmaco.

Attuali terapie disponibili in commercio che utilizzano drug delivery sono riassunti in Tabella, molti dei quali sono effettuati con sistemi auto-assemblanti

Delivery system	Material composition	Product name	Therapeutic	Type of drug: indications	
Micelles	Leucine- glutamate copolymer	Basulin	Insulin	Peptide hormone: diabetes	
Vesicles	Lipid	Abelcet	Amphotericin B	Small molecule: antifungal	
		Allovecin-7	HLA-B7 plasmid	DNA: anticancer	
		AmBisome	Amphotericin B	Small molecule: antifungal	
		Amphocil	Amphotericin B	Small molecule: antifungal	
		Amphotec	Amphotericin B	Small molecule: antifungal	
		DaunoXome	Daunorubicin	Small molecule: anticancer	
		Depocyt	Cytarabine	Small molecule: anticancer	
		Depodur	Morphine sulfate	Small molecule: pain	
		Doxil	Doxorubicin	Small molecule: anticancer	
		MiKasome	Amikacin	Small molecule: antibiotic	
		Myocet	Doxorubicin	Small molecule: anticancer	
		Stealth	Doxorubicin	Small molecule: anticancer	
		Microspheres	Crosslinked albumin	LeuProMax	Leuprolide
PLA (polylactic acid)	Lupron Depot			Leuprolide acetate	Peptide hormone: cancer and Alzheimer's
PL-ethylphosphate	Paclimer			Paclitaxel	Small molecule: anticancer
PLG (polylactide-glycolide)	Eligard			Leuprolide acetate	Peptide hormone: cancer and Alzheimer's
PLGA-glucose	Risperdal Consta		Risperidone	Peptide: schizophrenia	
	Trelstar LA		Triptorelin pamoate	Peptide hormone: prostate cancer	
	Sandostatin LAR		Octreotide	Peptide: anti-growth hormone	
	Polybutylene terephthalate		Locteron	rh IGN-a	Protein: chronic hepatitis C
Gels	Hydroxyl methacrylate	Vantas	Histrelin	Peptide hormone: prostate cancer	
	PLGA	Oncogel	Paclitaxel	Small molecule: anticancer	
Implants	Collagen	CollaRx	Gentamicin	Small molecule: antibiotic	
		PLGA	Durin	Leuprolide	Peptide hormone: cancer and Alzheimer's
		Zoladex	Goserelin acetate	Peptide hormone: prostate/breast cancer	
	Polyanhydride	Gladel Wafer	Carmustine	Small molecule: anticancer	
		Silicon rubber	Implanon	Levonorgestrol	Small molecule: birth control
	Jadelle		Levonorgestrol	Small molecule: birth control	
Titanium mechanical device	Viadur	Leuprolide acetate	Peptide hormone: cancer and Alzheimer's		

L'utilizzo di peptidi auto-assemblanti per la somministrazione di farmaci risulta una strategia molto efficace, è importante però che possiedano sia strutture altamente porose sia una capacità controllata di rilascio del farmaco.

I requisiti da possedere sono:

- Capacità di carico: la quantità di farmaco che può essere incapsulato nello *scaffold*;
- Distribuzione del farmaco: il farmaco deve essere disperso omogeneamente;
- Affinità di legame: sufficientemente bassa per permettere la fuoriuscita del farmaco;
- Cinetica di rilascio: controllata per consentire il rilascio di una dose di farmaco in un dato periodo di tempo;
- Stabilità: occorre mantenere la struttura e l'attività di rilascio per un periodo di tempo prolungato;

## **4.2 Scaffold di peptidi auto-assemblanti per il rilascio controllato di farmaci**

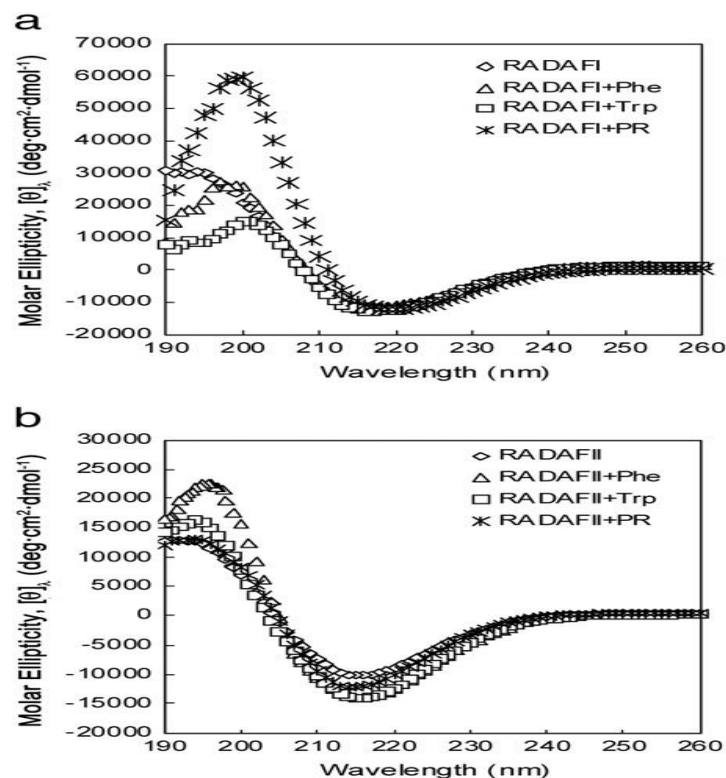
I vantaggi nell'usare *scaffold* di peptidi auto-assemblanti per la somministrazione di farmaci sono molteplici: la biocompatibilità, la somiglianza fisico-chimica compositiva alla matrice extracellulare e la biodegradabilità. Data la loro caratteristica deformabile possono conformarsi alla superficie alla quale vengono applicati e presentano a volte anche proprietà bioadesive, importanti soprattutto nei casi nei quali si richiede un'immobilizzazione al sito desiderato.

Gli svantaggi sono legati principalmente alla bassa resistenza alla trazione, alle dimensioni dei pori che spesso possono causare un veloce rilascio del farmaco e alla talvolta limitata deformabilità.

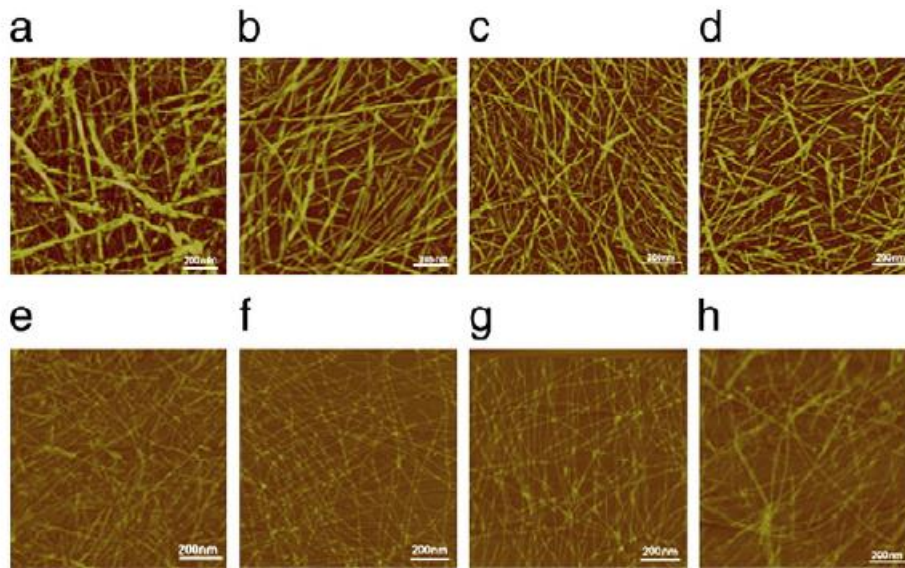
Gli idrogeli utilizzati vengono solitamente preparati all'esterno del corpo riempiti di farmaci e successivamente impiantati. Lo svantaggio di utilizzare questa tecnica è che il materiale preformato deve essere impiantato. Questo problema può essere superato trasformando il gel in micro o nano particelle .

In alcune applicazioni vengono formati in situ e hanno anche la capacità di legare e immagazzinare biomolecole e rilasciarle .Questo rende gli idrogeli di peptidi auto-assemblanti particolarmente indicati come sistemi di rilascio di farmaci. Inoltre le dimensioni di questi ultimi permettono un efficace controllo della struttura e della funzione.

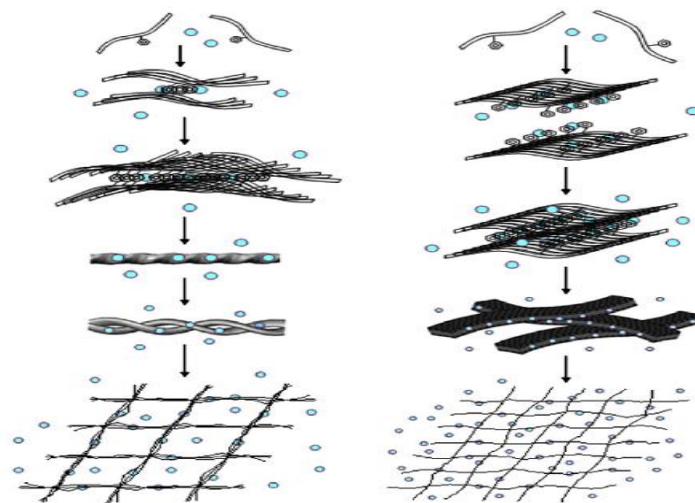
In una ricerca condotta da Zhao e altri collaboratori [46] sono stati utilizzati due peptidi RADAFI e RADAFII sintetizzati con una strategia di sintesi peptidica in fase solida combinati con altre molecole ospiti. Le molecole utilizzate sono state fenilalanina (Phe), triptofano (Trp) e rosso fenolo(PR); peptidi e molecole sono state mescolate in acqua.



**Figura 4.1:** Spettri CD per la struttura secondaria del peptide (a) RADAFI e RADAFII con vari ospiti: ( $\diamond$ ) nessun ospite; ( $\Delta$ ) Phe; ( $\square$ ) Trp; (\*) PR.



**Figura 4.2:** Immagini AFM (a) RADAFI scaffold, (b) RADAFI scaffold caricato Phe, (c) RADAFI scaffold caricato Trp, (d) RADAFI scaffold caricato PR, (e) RADAFII scaffold, (f) RADAFII scaffold caricato Phe, (g) RADAFII scaffold caricato Trp, and (h) RADAFI scaffold caricato PR.



**Figura 4.3.** Rappresentazione schematica che riassume la nanofabbricazione di scaffold di peptidi (a sinistra) RADAFI e (a destra) RADAFII dopo l'aggiunta di ospiti

Gli studi e le analisi effettuate hanno dimostrato che i sistemi a base di peptidi auto assemblanti sono utili come veicoli di farmaci, in grado di contenere e rilasciare il farmaco in zone localizzate e soprattutto in modo controllato. E' stata inoltre dimostrata la possibilità di modularne la funzione di rilascio anche andando a variare le caratteristiche e la struttura dell'assemblaggio. Il fatto che essi siano facilmente iniettabili crea inoltre i presupposti per terapie più mirate e meno invasive.

La nanotecnologia ha rappresentato una svolta fondamentale nel campo della medicina consentendo anche la somministrazione di farmaci a cellule specifiche usando nanoparticelle.

Il consumo di farmaco e i suoi effetti collaterali possono essere ridotti depositando l'agente attivo soltanto nella regione di interesse.

## **Conclusioni**

Una nuova classe emergente di biomateriali da utilizzare per la costruzione di *scaffold* con varie applicazioni in diversi tessuti è rappresentata dai peptidi auto-assemblanti.

Come il loro nome rivela, i peptidi auto-assemblanti in grado di auto-configurarsi in strutture tridimensionali e altamente organizzate e di simulare una volta iniettati nel sito d'interesse le funzioni dell'ECM proprie del tessuto stesso. Inoltre possiedono elevata biocompatibilità e biodegradabilità, aspetti fondamentali per la rigenerazione del tessuto.

Nelle applicazioni del tessuto nervoso, l'uso di questi peptidi ha consentito la formazione di *scaffold* che favoriscono crescita, differenziamento e proliferazione neuronale, portando anche a un recupero dell'attività sinaptica post-traumatica. Allo stesso modo l'uso di questi peptidi nei tessuti cardiaco, osseo e cartilagineo ha favorito la proliferazione cellulare e con l'apporto anche di fattori di crescita ha portato alla rigenerazione del tessuto interessato. L'uso di peptidi auto-assemblanti dimostra ottimi risultati anche nelle applicazioni di drug delivery; la loro struttura, le loro dimensioni, la cinetica del rilascio e la possibilità di variarne le caratteristiche a seconda della necessità ha permesso che essi rappresentino ottimi candidati per la somministrazione cronica di farmaci.

## **Bibliografia**

[2] Vacanti, 1995

[3] Stefani M., Taddei N., Chimica Biochimica e Biologia applicata, Zanichelli 2004

[6] Denise De Zanet, "*bioreattori per l'ingegneria tissutale della cartilagine*", Tesi di laurea in ingegneria biomedica, Università degli studi di Padova 2009-2010.

[7] Mantero S., Remuzzi A., Raimondi M. T., Ahluwalia A. "*Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa*". Bologna: Pàtron Editore, Sett 2009.

[8] Meyer U., Nazer N., Buchter A., Wiesmann H. P. "*Design and performance of a bioreactor system for mechanically promoted three-dimensional tissue engineering*." British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2006: 44: 134-140.

[12] Joel H. Collier, Tatiana Segura "*Evolving the use of peptides as component of biomaterials*." Biomaterials, 2011: 4198-4204

[16] Manasa Nune, Priyadharshini Kumaraswamy, Uma Maheswari Krishnan and Swaminathan Sethuraman "*Self-Assembling Peptide Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering: Novel Approaches and Strategies for Effective Functional Regeneration*"  
Current Protein and Peptide Science, 2013, 14, 70-84

[17] Francesco Dal Dosso, Tesi di laurea in ingegneria biomedica, *Bioprinting metodi, applicazioni, prospettive*, Università degli studi di Padova, 2009/2010

[18] Steven Maude, Eileen Ingham, Amalia Aggeli. "*Biomimetic self-assembling peptides as scaffolds for soft tissue engineering*" Nanomedicine, 2013; 8(5), 823-847

[19] Stuart Kyle, Amalia Aggeli, Eileen Ingham, Michael J. McPherson. "*Recombinant self-assembling peptides as biomaterials for tissue engineering*." Biomaterials 2010; 31, 9395-9405.

[20] John B. Matson and Samuel I. Stupp "*Self-assembling peptide scaffolds for regenerative medicine*." Chem Commun (Camb). 2012 January 4; 48(1): 26-33.

[23] C. Castells, M. T. Fernandez Muiños, C. E. Semino "*Nanometric Biomaterials in Cardiac Regeneration*." XVIII Congreso de la Sociedad Española de Investigaciones Quirúrgicas. October 18-19, León, Spain, 2012.



- [25] Janani Radhakrishnan, Uma Maheswari Krishnan, Swaminathan Sethuraman  
Hydrogel based injectable scaffolds for cardiac tissue regeneration. " *Biotechnology Advances* xxx (2014)
- [27] Hai-dong Guo , Guo-hong Cui , Jia-jun Yang , Cun Wang , Jing Zhu , Li-sheng Zhang , Jun Jiang , Shui-jin Shao " *Sustained delivery of VEGF from designer self-assembling peptides improve cardiac function after myocardial infarction.* " *Biochemical and Biophysical Research Communications* 424 (2012) 105–111
- [29] Ramille N. Shaha,, Nirav A. Shahc, Marc M. Del Rosario Limd, Caleb Hsieha,, Gordon Nubere, and Samuel I. Stupp " *Supramolecular design of self-assembling nanofibers for cartilage regeneration.* " *PNAS* February 23, 2010 vol. 107 no. 8 ,3293–3298
- [30] B. Grigolo<sup>1</sup>, L. Roseti<sup>1</sup>, M. Fiorini<sup>1</sup>, L. De Franceschi<sup>1</sup>, A. Facchini<sup>2</sup> " *Tissue engineering applications: cartilage lesions repair by the use of autologous chondrocytes.* " Laboratorio di Immunologia e Genetica, Istituto di Ricerca Codivilla Putti, Istituti Ortopedici Rizzoli; Dipartimento di Medicina Interna e Gastroenterologia, Università degli Studi di Bologna
- [32] J. Kisiday, M. Jin, B. Kurz, H. Hung, C. Semino, S. Zhang, and A. J. Grodzinsky " *Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: Implications for cartilage tissue repair.*" 9996–1000, *PNAS* ,July 23, 2002 ,vol. 99 , no. 15
- [35] C.E.Semino " *Self-assembling peptides: from bio-inspired materials to bone regeneration.*" *Journal of dental research*,2008;87,606-616
- [36] Akihiro Horii<sup>1,2</sup>, Xiumei Wang<sup>1</sup>, Fabrizio Gelain<sup>1,3</sup>, Shuguang Zhang<sup>1\*</sup> " *Biological Designer Self-Assembling Peptide Nanofiber Scaffolds Significantly Enhance Osteoblast Proliferation, Differentiation and 3-D Migration.* " *Plos ONE*,2007;2,e190
- [37] J.D. Hartgerink, E. Beniash, S.I. Stupp, " *Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers.*" , *Science*, vol. 294, pp. 1684–1688, 2001.
- [38] A.Mata Y.Geng K.J.Henrikson C.Aparicio " *Bone regeneration mediated by biomimetic mineralization of a nanofiber matrix* " *biomaterials* vol 31.pp.6004 6012 2010
- [39] Anuradha Subramanian, Uma Maheswari Krishnan and Swaminathan Sethuraman, " *Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration*" , *Journal of Biomedical Science* 2009.
- [40] Andrea Caprini, Diego Silva, Ivan Zanoni, Carla Cunha,

Carolina Volonte, Angelo Vescovi, Fabrizio Gelain " *A novel bioactive assessing its activity over murine neural stem cells and its potential for neural tissue engineering.*" *New Biotechnology* ,Volume 30, Number 5 ,June 2013

[41] Zhenwei Zou, Ting Liu, JingFeng Li, Pindong Li, Qian Ding, Gang Peng, Qixin Zheng, Xianlin Zeng, Yongchao Wu, Xiaodong Guo " *Biocompatibility of functionalized designer self-assembling nanofiberscaffolds containing FRM motif for neural stem cells.*", Society for materials, 2013

[42] Ilaria Mazzonetto, Tesi di laurea in ingegneria biomedica, " *Materiali biomimegtici per l'ingegneria dei tessuti neurali*" Università di Padova, 2010-2011

[46] Ying Zhao , Masayoshi Tanaka , Takatoshi Kinoshita , Masahiro Higuchi , Tianwei Tan " *Self-assembling peptide nanofiber scaffolds for controlled release governed by gelator design and guest size.* " *Journal of Controlled Release* 147 (2010) 392–399

## **Sitografia**

- [1] <http://www.biotechnomed.it/>
- [4] <http://www.sanita.regione.lombardia.it/>
- [5] [http://it.wikipedia.org/wiki/Differenziazione\\_cellulare](http://it.wikipedia.org/wiki/Differenziazione_cellulare)
- [9] [http://it.wikipedia.org/wiki/Fattore\\_di\\_crescita](http://it.wikipedia.org/wiki/Fattore_di_crescita)
- [10] <http://it.wikipedia.org/wiki/Peptide>
- [13] <http://webusers.fis.uniroma3.it/iucci/gio/Peptide.pdf>
- [14] [http://en.wikipedia.org/wiki/Self-assembling\\_peptide](http://en.wikipedia.org/wiki/Self-assembling_peptide)
- [15] [http://www.ausniguarda.it/Lesione\\_midollare/Ricerca/Intervento\\_Di\\_Vescovi\\_A\\_L\\_Convegno.kl](http://www.ausniguarda.it/Lesione_midollare/Ricerca/Intervento_Di_Vescovi_A_L_Convegno.kl)
- [21] <http://it.wikipedia.org/wiki/Cuore>
- [22] [http://www.sapere.it/sapere/medicina-e-salute/enciclopedia-medica/Cuore-\(cardiologia\)/aneurisma-ventricolare-.html](http://www.sapere.it/sapere/medicina-e-salute/enciclopedia-medica/Cuore-(cardiologia)/aneurisma-ventricolare-.html)
- [24] <http://www.unipi.it/>
- [26] <http://www.sciencedaily.com/releases/2013/02/130220153705.htm>
- [28] <http://it.wikipedia.org/wiki/Miocardio>
- [31] <http://ww.ior.it/laboratori/lab-di-biomec-inn-tec/Biotecnologie/trattamento-lesioni-condrali>
- [33] [http://it.wikipedia.org/wiki/Tessuto\\_osseo](http://it.wikipedia.org/wiki/Tessuto_osseo)
- [34] <http://www.news-medical.net/health/Bone-Disease.aspx>
- [43] <http://www.revertonlus.org/index.php/progetti/lesioni-croniche-al-midollo-spinale/>
- [44] [http://www.cptorino.it/ilcoordinamento/II\\_livello/da\\_medici/trapianto\\_nanostrutture.htm](http://www.cptorino.it/ilcoordinamento/II_livello/da_medici/trapianto_nanostrutture.htm)
- [45] [http://en.wikipedia.org/wiki/Drug\\_delivery](http://en.wikipedia.org/wiki/Drug_delivery)



