

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**SVILUPPO E CARATTERIZZAZIONE DI
MATERIALI BIOMIMETICI E BIOATTIVI
PER LA RIGENERAZIONE DENTALE**

Tesi in

Meccanica dei Tessuti Biologici LM

Relatore

Prof. Ing. Luca Cristofolini

Presentata da

Ilaria Fantigrossi

Correlatori

Ing. Elisa Figallo, Ph.D.

Ing. Claudia Fabbi

Sessione III

Anno Accademico 2014-2015

INDICE

CAPITOLO 1:INTRODUZIONE.....	4
1.1 STRUTTURA DENTARIA.....	4
1.1.1 COMPOSIZIONE DEI DIFFERENTI TESSUTI DENTALI	5
1.2 TESSUTO PARODONTALE.....	8
1.3.1 EZIOPATOGENESI	13
1.3.2 CLASSIFICAZIONE DELLE MALATTIE PARODONTALI	14
1.3.3 INCIDENZA STATISTICA	18
1.3.4 TRATTAMENTI ATTUALI.....	19
1.3.5 TERAPIE RIGENERATIVE PARODONTALI.....	20
1.4 PROGETTO SMILEY.....	25
1.5 SCOPO DEL LAVORO DI TESI.....	26
CAPITOLO 2:MATERIALI E METODI.....	28
2.1 SPECIFICA DI PRODOTTO.....	28
2.2 PROCESSO DI REALIZZAZIONE DELLO SCAFFOLD.....	31
2.2.1 SINTESI.....	32
2.2.2 LAVAGGI.....	33
2.2.3 RETICOLAZIONE	35
2.2.4 STESURA E SOVRAPPOSIZIONE	36
2.2.5 LIOFILIZZAZIONE	41
2.3 STANDARDIZZAZIONE PROCESSO DI PRODUZIONE SCAFFOLD:	
STEP LAVAGGI.....	44
2.3.1 PROCESSO DI FILTRAZIONE	45
2.3.2 TEST ESEGUITI	48
2.4 CARATTERIZZAZIONE CHIMICA E FISICA DELLO SCAFFOLD.....	50
2.4.1 TEST DI SWELLING.....	50
2.4.2 ANALISI MICROSCOPICA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM).....	52
2.4.3 ANALISI TERMOGRAVIMETRICA (TGA)	55
2.4.4 ANALISI SPETTROMETRICA DI EMISSIONE SU PLASMA (ICP).....	57

CAPITOLO 3:RISULTATI SPERIMENTALI.....	59
3.1 STANDARDIZZAZIONE PROCESSO DI PRODUZIONE SCAFFOLD:	
STEP LAVAGGI.....	59
3.1.1 TEST CON PH FISSO PER DIFFERENTI VELOCITA' DI CENTRIFUGAZIONE	60
3.1.2 TEST CON VELOCITA' DI CENTRIFUGAZIONE FISSA PER DIVERSI PH.....	61
3.1.3 TEST CON DIFFERENTI CONDIZIONI INIZIALI DI DILUIZIONE	63
3.1.4 TEST CON DIFFERENTI LOTTI DI COLLAGENE	64
3.2 CARATTERIZZAZIONE CHIMICA E FISICA DELLO SCAFFOLD.....	65
3.2.1 TEST DI SWELLING.....	65
3.2.2 ANALISI MICROSCOPICA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM)	67
3.2.3 ANALISI TERMOGRAVIMETRICA (TGA)	72
3.2.4 ANALISI SPETTROMETRICA DI EMISSIONE SU PLASMA (ICP).....	75
CAPITOLO 4:CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.....	77
BIBLIOGRAFIA.....	81
RINGRAZIAMENTI.....	87

CAPITOLO 1:

INTRODUZIONE

In questo capitolo saranno introdotti alcuni temi essenziali per definire il progetto di tesi svolto, attraverso la presentazione delle caratteristiche strutturali del dente e del tessuto di sostegno parodontale, le funzioni e l'interazione del parodonto con la struttura dentaria e i trattamenti terapeutici attualmente utilizzati in seguito allo sviluppo di patologie parodontali, sottolineando l'incidenza statistica nella popolazione mondiale. Verrà, infine, introdotto il progetto Smiley sviluppato presso Fin-Ceramica di Faenza, ed esposto lo scopo del lavoro di tesi.

1.1 STRUTTURA DENTARIA

Ciascun dente può esser suddiviso in una porzione superiore, detta *corona* che si sviluppa fuori dalla gengiva e in un'inferiore, definita *radice* dentaria, completamente infissa all'interno dell'alveolo dentario. Le due porzioni sono separate l'una dall'altra da uno strato intermedio, molto sottile, definito *colletto*.

La corona è ricoperta dallo *smalto* dentale, il tessuto più duro dell'intero organismo, sotto alla quale troviamo la *dentina*, più scura dello smalto, molto simile al tessuto osseo e nella quale si irradiano le fibre sensoriali del *thomes* che conferiscono sensibilità al tessuto.

Le radici che troviamo alla base di ogni dente sono composte esternamente da un tessuto chiamato *cemento*, di colore giallo, che ricopre la dentina nelle zone sub-

gengivali. Il punto di fissaggio tra lo smalto e il cemento è garantito dalla giunzione amelo-cementizia presente nel colletto.

Infine, nella cavità interna di ogni dente, è presente la camera pulpare occupata dalla *polpa dentaria*, tessuto connettivo molle riccamente vascolarizzato e innervato, attraverso il quale il dente trae nutrimento e sensibilità [1] (**Figura 1.1**).

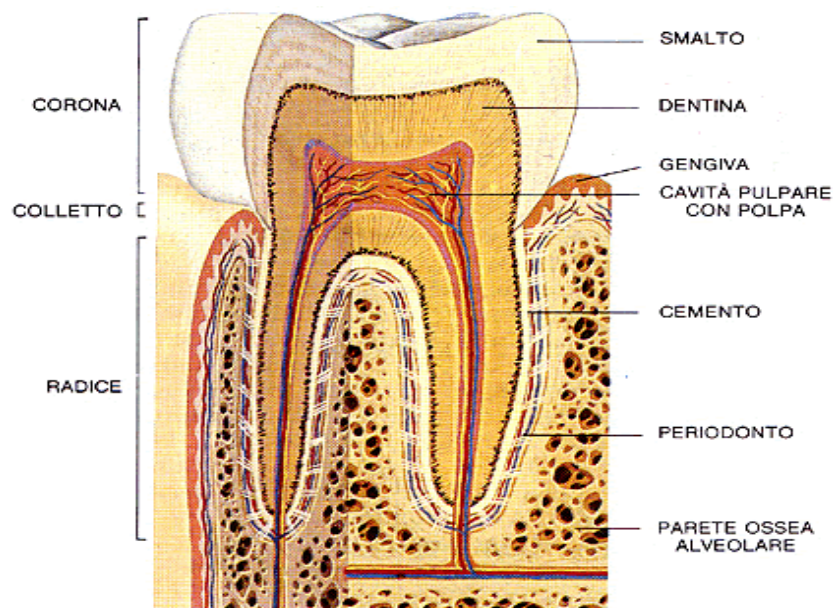


Figura 1.1: anatomia del dente.

1.1.1 COMPOSIZIONE DEI DIFFERENTI TESSUTI DENTALI

La composizione eterogenea dei tessuti dentali può essere suddivisa, in prima analisi, in tessuti duri (smalto, dentina e cemento) e molli (polpa dentaria) (**Figura 1.2**).

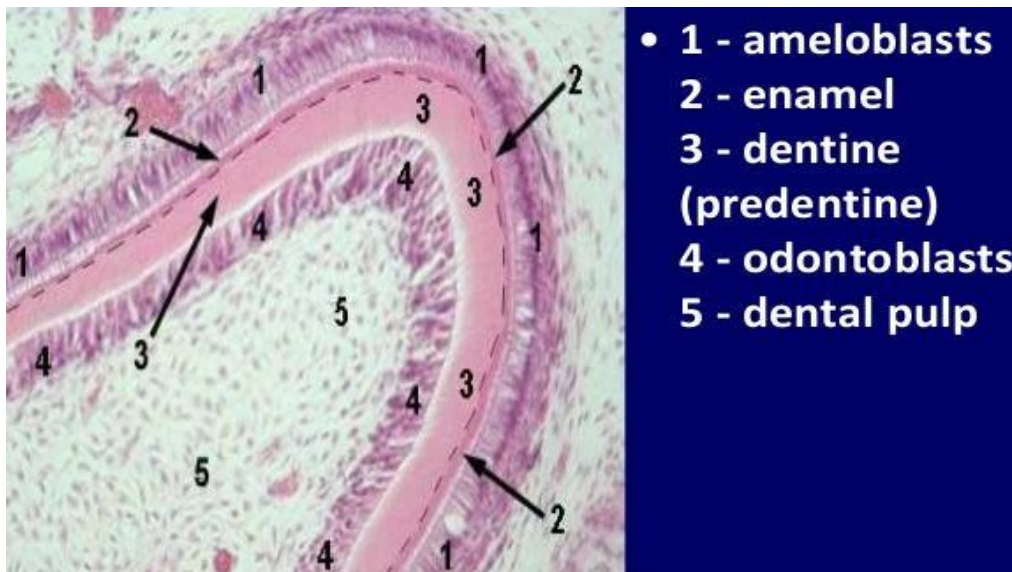


Figura 1.2: componenti del dente.

Lo smalto è la sostanza più dura e mineralizzata di tutto l'organismo; non contiene cellule ed è un derivato tessutale prodotto durante l'amelogenesi da cellule di origine epiteliale. Consiste essenzialmente di materiale inorganico in forma di piccoli cristalli, come fosfato di calcio e apatite. Circa il 96-97% dello smalto è costituito da un minerale chiamato idrossiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e il restante 3-4% è rappresentato da acqua e materiale organico. La capacità di scambio ionico del minerale di idrossiapatite garantisce la presenza nello smalto di tracce di altri elementi, quali Na, Mg, Zn, K, F e altri componenti ionici minori come il carbonato [2]. La presenza elevata di minerali garantisce allo smalto di resistere ai carichi masticatori notevoli ma è anche causa della fragilità e facile suscettibilità a screpolature e scheggiature [3].

La dentina è la componente principale del dente ed è costituita per circa il 70% da minerali (idrossiapatite e fosfato di calcio), 20% da materiali organici (principalmente proteine) e 10% da acqua. A differenza dello smalto, l'idrossiapatite che costituisce la dentina si presenta disposta irregolarmente in una matrice organica costituita prevalentemente da fibre di collagene. Lo strato di dentina funge pertanto da ammortizzatore oltre che da sostegno per la corona

dentale presentando una composizione adatta a dissipare forze o pressioni che potrebbero indurre fessure o distacchi di frammenti dello smalto [4].

Il cemento è un tessuto mineralizzato non vascolarizzato che ricopre la superficie totale della radice dei denti. Origina dalle cellule mesenchimali del sacco dentario e per la sua posizione intermedia, appartiene funzionalmente al parodonto, partecipando alla funzione di sostenere il dente nell'alveolo. Fornisce, infatti, il punto di ancoraggio delle fibre del legamento parodontale sulla superficie radicolare. Si distingue in:

- cemento cellulare: presenza di cementociti nella struttura; è caratterizzato dalla presenza di lacune con canalicoli (v. freccia **Figura 1.3-B**) dove risiedono i cementociti;
- cemento acellulare: assenza di cementociti nella struttura; si nota che questo tipo di cemento presenta linee incrementali di crescita (v. frecce **Figura 1.3-A**) che sono orientate parallelamente alla superficie radicolare.



Figura 1.3: (A) cemento acellulare; (B) cemento cellulare.

Studi biochimici hanno dimostrato che il cemento presenta una composizione simile all'osso: è costituito per circa il 50% da materiale inorganico (principalmente cristalli di idrossiapatite) immerso in una matrice organica

costituita in gran parte da collagene (principalmente collagene di tipo I), glicoproteine e proteoglicani. Come in altri tessuti duri, l'idrossiapatite presente nel cemento non è pura ma contiene altri elementi (ioni) incorporati nella fase minerale durante il processo di mineralizzazione, in maniera dipendente dalla loro concentrazione presente nell'ambiente fluido. Pertanto, si rilevano tracce di magnesio pari a 0,5-0,9% (circa la metà di quello presente nella dentina) e un alto contenuto di fluoro rispetto ad altri tessuti mineralizzati (fino allo 0,9% in peso) che mostra un generale incremento con l'avanzare dell'età e varia in base all'apporto nutrizionale dell'individuo [5].

La polpa dentaria, invece, è un tessuto connettivo molle formato principalmente da odontoblasti (in grado di produrre la dentina), fibroblasti, cellule mesenchimali indifferenziate e globuli bianchi (quali macrofagi e linfociti) [6].

1.2 TESSUTO PARODONTALE

Il tessuto parodontale [7] (**Figura 1.4**) è costituito da osso alveolare, legamento parodontale, cemento e gengiva, ovvero dall'insieme dei tessuti che si trovano attorno al dente e che presentano la duplice funzione di:

- mantenere attaccato il dente al tessuto osseo;
- conservare l'integrità dei tessuti coinvolti nella masticazione.

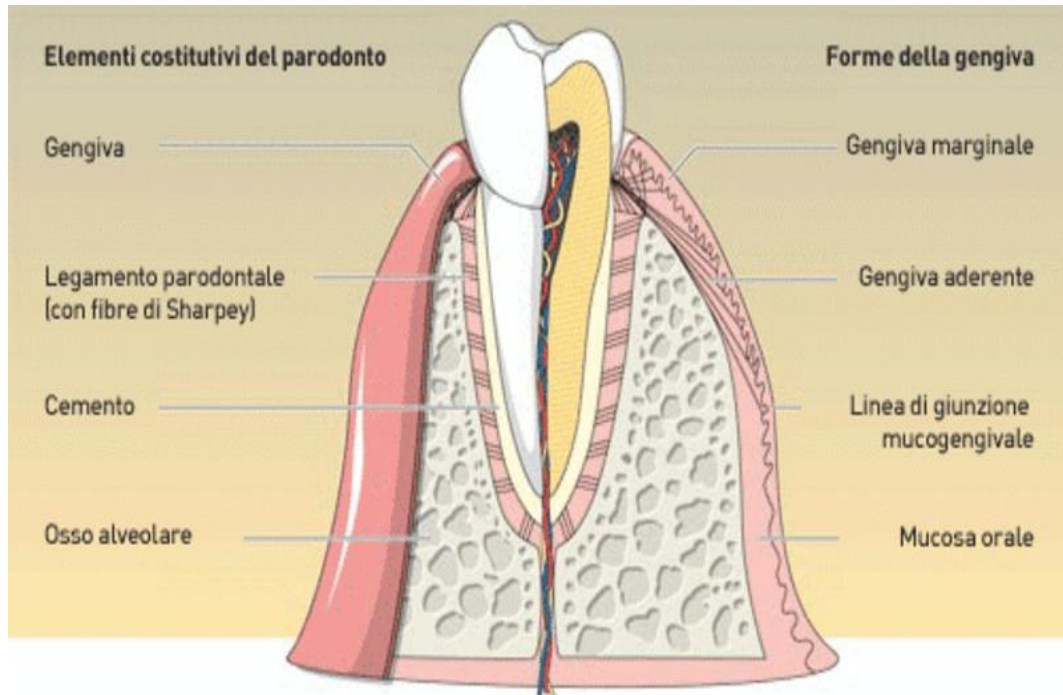


Figura 1.4: Elementi costitutivi del parodonto.

L'osso alveolare costituisce l'apparato di attacco dei denti e si sviluppa in concomitanza con essi a partire sia da cellule provenienti dal follicolo dentale che da cellule indipendenti dall'odontogenesi. È continuamente rinnovato in risposta alle esigenze funzionali: quando la radice del dente viene persa, non si ha più un carico masticatorio trasmesso dal dente all'osso alveolare che sulla base di ciò è predestinato ad andare incontro a riassorbimento senza nuova apposizione ossea, cioè a ridursi fino a scomparire. L'osso alveolare può essere riassorbito anche in caso di parodontopatia, cioè di infezioni batteriche provenienti dalla cavità orale che riescono ad infiltrarsi e riprodursi nella zona d'attacco del dente. Le pareti degli alveoli, in cui alloggiavano le radici dei denti, a contatto con il legamento parodontale, sono rivestite da osso compatto, mentre l'area compresa tra gli alveoli è occupata da osso spugnoso (trabecolare).

Il legamento parodontale è la struttura che s'interpone tra la radice del dente (o più esattamente il cemento radicolare) e l'osso alveolare, andando a costituire un robusto ancoraggio che mantiene la radice del dente sospesa all'interno dell'alveolo e permettendo un'elasticità tale da distribuire le forze masticatorie su

un'ampia superficie del processo alveolare. Inoltre, è responsabile della percezione del rapporto spaziale tra le arcate dentarie durante la masticazione e mediante numerosi propriocettori, garantisce l'adeguamento occlusale all'entità dei carichi masticatori, regolando per via riflessa i movimenti della mandibola tramite il nervo trigemino. È un tessuto connettivo molle composto da fibre elastiche collageniche, orientate diversamente a seconda della zona in cui si trovano e da diversi tipi cellulari (quali osteoblasti e cementoblasti, fibroblasti, e macrofagi). Le fibre collageniche (principalmente fibre di collagene di tipo I) sono immerse nella sostanza fondamentale, composta da glicosaminoglicani, glicoproteine e al 70% da acqua. Analisi microscopiche hanno dimostrato che tali fibre originano da una parte dall'osso e dall'altra dal cemento radicolare; le fibre dette *fibre di Sharpey* che originano dall'osso presentano un diametro maggiore, mentre quelle che originano dal cemento risultano più sottili e più numerose.

A livello del colletto il legamento parodontale assume una forma circolare, formando così una sorta di sigillo (sigillo dente-gengivale) che in condizioni ottimali e fisiologiche impedisce il passaggio sotto gengiva di saliva, cibo e liquidi, ma soprattutto batteri e residui della masticazione.

La gengiva è un tessuto di tipo molle che circonda i denti e ricopre il processo alveolare. Si estende dal margine gengivale libero, connesso alla corona dentale, fino alla giunzione mucogengivale e si divide in: gengiva libera (anche detta *gengiva marginale* che rappresenta la parte di tessuto che circonda il dente) e gengiva aderente (delimita la gengiva libera ed è situata all'altezza della giunzione amelo-cementizia del dente, cioè la zona del dente dove termina la corona dentale, superficialmente ricoperta di smalto ed inizia la radice dentale, ricoperta di cemento). Il tessuto gengivale ha il compito di isolare il parodonto dall'ambiente esterno ed è caratterizzato da un intenso turn-over metabolico che consente di rinnovare frequentemente gli strati superficiali cheratinizzati, impedendo che i batteri possano accumularsi sulla sua superficie.

1.3 PATOLOGIE PARODONTALI

Le patologie parodontali sono definite malattie *infettive multifattoriali sitospecifiche* [8], in quanto:

1. *infettive*: la causa necessaria che non può mai mancare è la presenza di batteri (placca batterica);
2. *multifattoriali*: esistono più concause che assieme possono potenziare e aggravare gli effetti della componente infettiva;
3. *sitospecifiche*: ogni dente ed ogni sua zona può essere colpito in maniera differente (grave, media, minima o nulla) e per questo è necessaria una diagnosi accurata dente per dente.

Le patologie parodontali si distinguono in *gingiviti*, che colpiscono solo i tessuti marginali, e in *parodontiti*, che invece coinvolgono anche i tessuti profondi (osso alveolare e legamento parodontale).

Le gingiviti interessano la gengiva marginale e sono caratterizzate da arrossamento del margine gengivale, edema, sanguinamento al sondaggio e talvolta, aumento di volume gengivale (**Figura 1.5** e **Figura 1.6**). Sono completamente reversibili con il trattamento e se non curate, possono precedere l'insorgenza della parodontite [9].



Figura 1.5: complesso dento-gengivale sano.



Figura 1.6: paziente di 21 anni affetto da gengivite. Sono evidenti l'arrossamento e il gonfiore del margine gengivale.

Le parodontiti sono caratterizzate dalla distruzione dell'apparato di supporto dei denti. Rispetto alle gengiviti, comportano sempre una lesione irreversibile dopo la guarigione e clinicamente si manifestano come perdita di attacco e di osso, formazione di recessioni gengivali (gengiva abbassata che si evidenzia con un dente più lungo) e formazione di tasche parodontali [10] (gengiva nella posizione corretta con osso e attacco spostati apicalmente lungo la radice, formando così uno spazio vuoto definito tasca), (**Figura 1.7**).

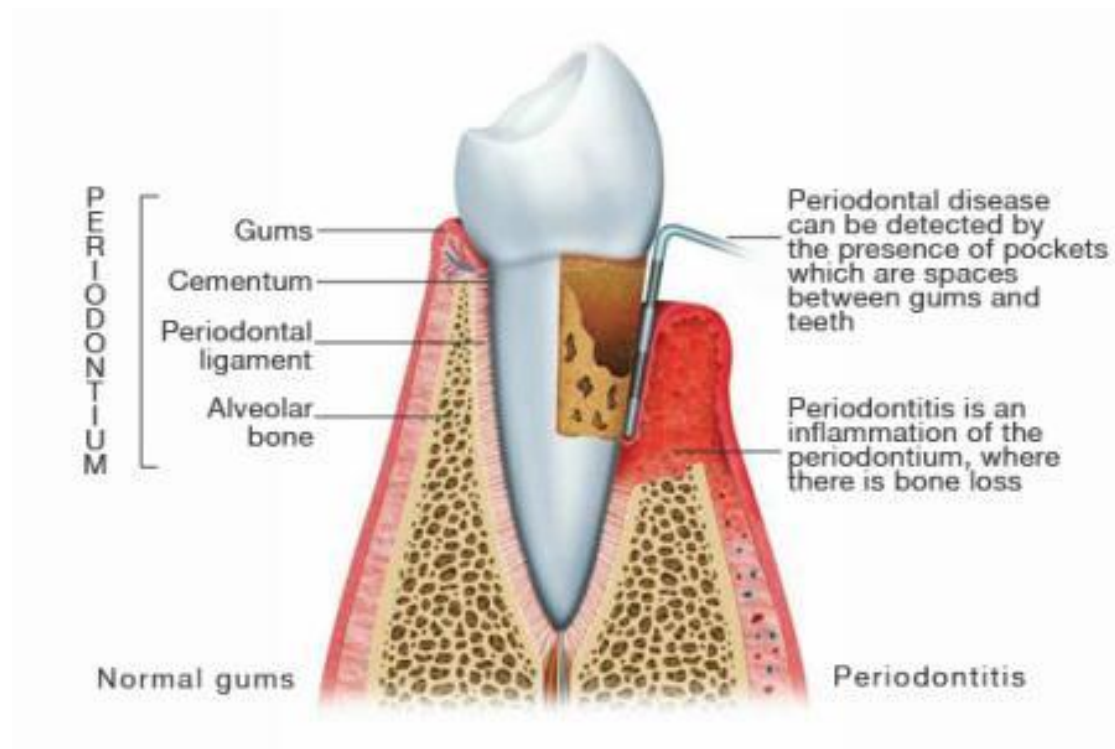


Figura 1.7: Parodontite

1.3.1 EZIOPATOGENESI

La presenza di un'abbondante e varia flora batterica, normalmente presente nel cavo orale, è la principale causa dell'insorgenza e sviluppo delle patologie parodontali. I denti sono gli unici tessuti mineralizzati parzialmente esposti all'ambiente esterno e come tali offrono una superficie idonea per la formazione di una biopellicola: un sottile velo di batteri, proteine, glucidi e acqua che rappresenta un terreno di coltura ideale per numerose specie batteriche. La perdita di equilibrio che vige tra batteri normalmente presenti e il sistema immunitario a livello locale e generale, è causa dell'insorgenza di fenomeni infiammatori che possono interessare inizialmente il solo tessuto gengivale come nella gengivite, fino a estendersi coinvolgendo anche i tessuti sottostanti, originando la parodontite.

La presenza di batteri patogeni non è l'unico fattore coinvolto nell'insorgenza della parodontopatia, ma susseguono anche cofattori locali (tartaro, affollamenti e dislocazioni dentarie, mal occlusioni, concavità e profondità delle strutture morfologiche degli elementi dentali) e cofattori generali (malattie sistemiche, diabete, tabagismo, neoplasie, farmaci, alterazioni salivari) che vanno a modificare la suscettibilità alla malattia da parte dell'individuo. Un'ultima possibile concausa allo sviluppo della patologia, è determinata dalla presenza di fattori ereditari probabilmente legati alla capacità di difesa individuale e al tipo di risposta infiammatoria [11].

1.3.2 CLASSIFICAZIONE DELLE MALATTIE PARODONTALI

Nel 1999 l'*American Academy of Periodontology* ha promosso un metodo scientifico internazionale per la definizione della nuova classificazione delle malattie parodontali. La nuova classificazione non è più basata sull'età di presentazione della malattia ma su una serie di criteri diagnostici clinici, radiografici e di laboratorio [12].

In linea generale, si distinguono 8 possibili condizioni e malattie parodontali:

1. Malattie gengivali
2. Parodontite cronica
3. Parodontite aggressiva
4. Parodontite associata a malattie sistemiche
5. Malattie parodontali necrotizzanti
6. Ascessi parodontali
7. Parodontite associata a lesioni endodontiche
8. Deformità e condizioni acquisite o di sviluppo

Nell'ambito specifico delle parodontiti si distinguono 4 tipi di malattie parodontali:

- *Parodontite Cronica*
 - È la forma più frequente fra le parodontiti;
 - È più frequente negli adulti, ma può presentarsi anche nei bambini;
 - La quantità di distruzione ossea è proporzionata alla quantità di tartaro presente.

Le forme croniche possono essere suddivise facendo riferimento alla perdita di attacco clinica media (CAL, *Clinical Attachment Loss*) misurata dalla giunzione amelo-cementizia fino alla profondità di penetrazione

della sonda parodontale¹. Si distinguono pertanto una forma lieve (CAL<3mm), moderata (CAL =3-4 mm) e grave (CAL>5mm) (Figura 1.8).

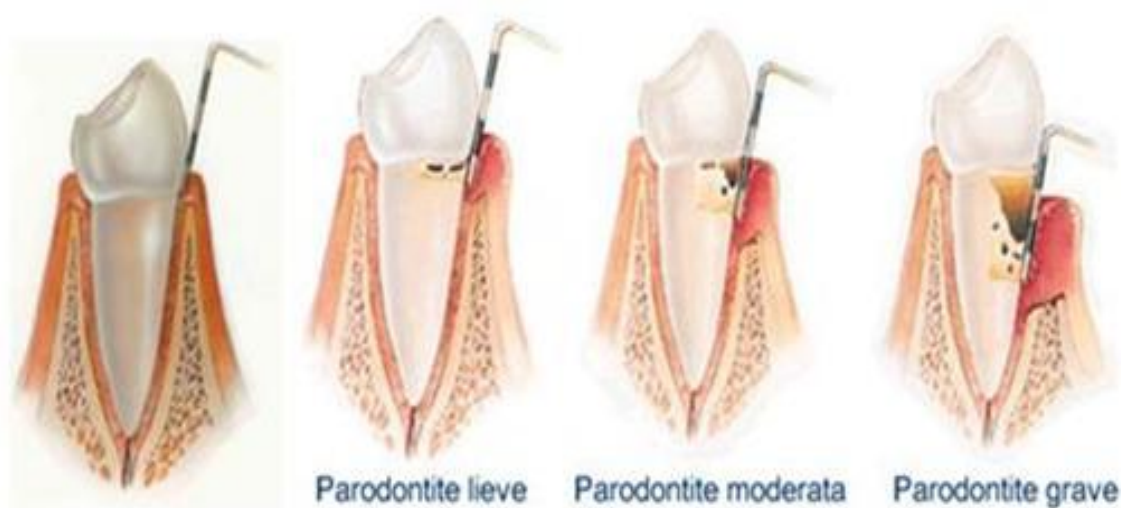


Figura 1.8: Classificazione Parodontite Cronica

- *Parodontite aggressiva*

Caratteristiche comuni delle parodontiti aggressive sono:

1. assenza di malattie sistemiche;
2. rapida progressione con distruzione ossea;
3. familiarità per la malattia.

Si distingue, inoltre, una forma *localizzata* che presenta insorgenza durante la pubertà ed è caratterizzata da un'elevata risposta anticorpale agli agenti infettivi e una forma *generalizzata* che presenta insorgenza

¹ sonda parodontale: strumento diagnostico millimetrato e standardizzato inserito tra il dente e la gengiva fino a raggiungere il fondo del solco gengivale.

sotto i 30 anni o oltre, con gravi episodi di distruzione e scarsa risposta anticorpale alla malattia.

- *Parodontite associata a malattie sistemiche*

In questo gruppo sono identificate tutte le malattie parodontali associate a malattie sistemiche che determinano in particolar modo una riduzione della risposta immunitaria del paziente. Esempi di questo tipo sono:

- Parodontiti associate a disordini ematologici come leucemia;
- Parodontiti associate a malattie genetiche come la sindrome di Down.

- *Malattie parodontali necrotizzanti*

Le malattie parodontali necrotizzanti si associano a una tipica necrosi dei tessuti parodontali, con dolore spontaneo, alitosi e spesso febbre. Si distinguono in:

- Gengivite ulcero-necrotica
- Parodontite ulcero-necrotica

La morfologia del difetto costituisce inoltre un fattore chiave per il risultato della terapia [13]. Ogni lesione ossea parodontale presenta un'anatomia unica; un primo livello di classificazione differenzia i difetti orizzontali, infraossei e di forcazione come illustrato nella **Figura 1.9** [14]. I difetti sono definiti orizzontali quando la base della tasca è coronale rispetto alla cresta alveolare mentre i difetti infraossei (**Figura 1.10**) sono apicali (difetti verticali).

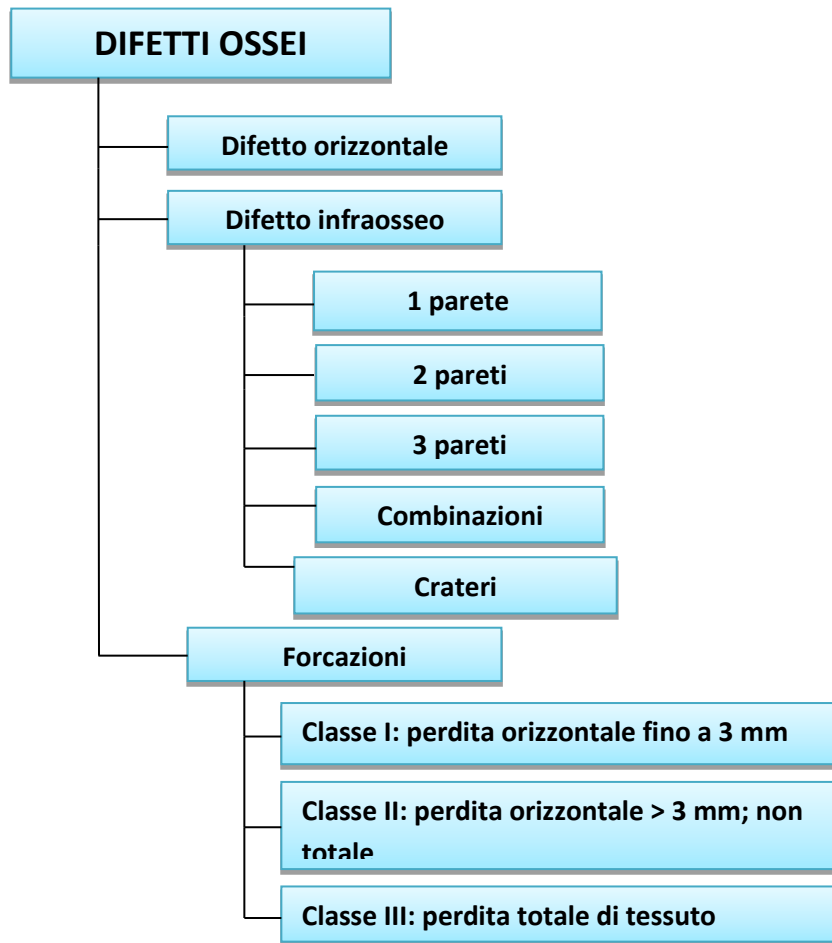


Figura 1.9: Classificazione difetti ossei parodontali



Difetto a 1 parete



Difetto a 2 pareti



Difetto a 3 pareti



Cratere interprossimale

Figura 1.10: Difetti infraossei

1.3.3 INCIDENZA STATISTICA

Dati epidemiologici concernenti le popolazioni dei paesi occidentali dimostrano che le gengiviti e le parodontiti sono molto diffuse nella popolazione. I dati più rilevanti sono stati pubblicati dalla più importante associazione internazionale per la ricerca in campo odontoiatrico, *The International and American Association for Dental Research*, relativi ad uno studio condotto dal ricercatore britannico Wagner Marcenes della *Queen Mary University* di Londra [15]. I risultati di tale studio hanno dimostrato che la parodontite rappresenta la sesta condizione patologica più diffusa nel mondo, colpendo circa 743 milioni di persone. In particolare, le parodontiti croniche colpiscono fino al 50% della popolazione mondiale e tra questa, il 5-20% è affetta da parodontite severa con una maggiore tendenza nell'intervallo di età compreso tra i 49-60 anni. Si registra, inoltre, una più alta prevalenza di sviluppo di patologie parodontali in Europa rispetto agli Stati Uniti, con un aumento d'incidenza fortemente legato all'avanzare dell'età. Per quanto riguarda la popolazione italiana, si evidenzia una frequenza piuttosto elevata nello sviluppo di gengivite, in bambini in età scolare (oltre il 70%) che tende a diminuire con l'aumento dell'età. La parodontite, invece, sembra avere un andamento opposto, colpendo circa il 30% dei soggetti di età compresa tra i 25-29 anni, il 40% dei soggetti tra i 30-34 anni e oltre il 50% dei soggetti di età compresa fra i 55-64 anni presenta almeno una tasca profonda (PD² ≥6mm) [16].

² PD: *Probing Depth*, si misura dal margine gengivale fino al punto più profondo di penetrazione della sonda parodontale.

1.3.4 TRATTAMENTI ATTUALI

La progressione delle malattie parodontali non adeguatamente trattate rappresenta la principale causa di perdita dentaria nei pazienti. A tal fine sono stati sviluppati vari approcci terapeutici in relazione ai livelli di gravità della patologia parodontale. La scelta tra rigenerazione parodontale per conservare il dente e l'estrazione dello stesso è stata definita una delle decisioni più complesse e discusse affrontate da un dentista nella pratica clinica quotidiana [17]. A tal proposito, diversi studi clinici hanno dimostrato che denti con compromissione parodontale dovrebbero essere trattati quanto più a lungo possibile con terapie conservative ed estratti solamente nel caso in cui non sia più possibile eseguire un trattamento parodontale ed endodontico [18]. Infatti, si è dimostrato, che nella stragrande maggioranza dei casi, l'estrazione di denti con compromissione parodontale non è in grado di risolvere i problemi di fondo che contribuiscono allo sviluppo della patologia [19].

Di seguito sono riportati gli approcci maggiormente utilizzati per il trattamento delle patologie parodontali, disposti in ordine di esecuzione (da quello maggiormente praticato a quello meno):

1. Procedura rigenerativa
2. Impianto dentale
3. Procedura di riduzione della tasca

1.3.5 TERAPIE RIGENERATIVE PARODONTALI

Le terapie rigenerative parodontali sviluppate negli ultimi decenni includono innesti di tessuti molli, sostituti ossei, trattamenti biologici della superficie radicolare, rigenerazione guidata dei tessuti/rigenerazione ossea (GTR/GBR), rilascio di fattori di crescita o terapie geniche [20].

I materiali d'innesto più comunemente utilizzati nella pratica clinica appartengono a quattro famiglie principali:

- innesti autologhi;
- allotrapianti;
- xenotrapianti;
- innesti sintetici o alloplastici.

Ciascun materiale deve essere biocompatibile, sicuro, anallergico, non tossico e non possedere alcun rischio di trasmissione di malattie [21]. L'attuale *gold standard* si basa sull'applicazione di innesti ossei autologhi direttamente ottenuti dallo stesso individuo durante l'intervento chirurgico. Questi materiali presentano le caratteristiche ideali di trapianto, sono facili da ottenere durante la chirurgia parodontale ma presentano un alto rischio di contaminazione dovuto a microrganismi presenti nella cavità orale, oltre al fatto che spesso si evidenzia un volume di tessuto osseo molto limitato.

Gli allotrapianti sono materiali d'innesto derivati da un donatore della stessa specie e si distinguono in:

- Innesti ossei congelati;
- Innesti ossei liofilizzati;
- Innesti ossei liofilizzati demineralizzati.

Gli xenotrapianti sono materiali d'innesto derivati da altre specie (in particolare roditori, gatti, cani, maiali e scimmie) e sono ampiamente utilizzati nella pratica clinica.

Infine, gli innesti ossei sintetici o materiali alloplastici includono vari tipi di ceramiche e polimeri. Tali biomateriali sono sia naturali sia sintetici, sono facili da ottenere (non richiedono un sito donatore) e non presentano alcun rischio di trasmissione di malattie. Tra i materiali più utilizzati per la rigenerazione ossea, troviamo [22]:

- Fosfato di Calcio (CaP): composizione minerale simile all'osso naturale, bioattivo (formazione di apatite ossea come idrossiapatite), capacità di promuovere la funzione ed espressione cellulare che porta alla formazione di una solida interfaccia con l'osso e capacità di legare proteine morfogenetiche dell'osso che inducono osteogenesi.
- Solfato di Calcio (CS): alta resistenza alla compressione e in aggiunta ad altri materiali d'innesto, può agire come barriera, riducendo i tempi chirurgici, i costi e migliorando la rigenerazione parodontale.
- Vetro Bioattivo (BG): bioattività, resistenza meccanica abbastanza elevata e induzione nella proliferazione dei cementoblasti *in vivo*.

Soluzioni correnti per promuovere il processo rigenerativo richiedono l'utilizzo di particolari membrane barriera che fungono da isolamento del materiale di riempimento osseo rispetto alle cellule gengivali, che presentando un'alta attività metabolica, potrebbero impedire alle cellule dell'osso di iniziare il processo rigenerativo [23] (**Figura 1.11**).

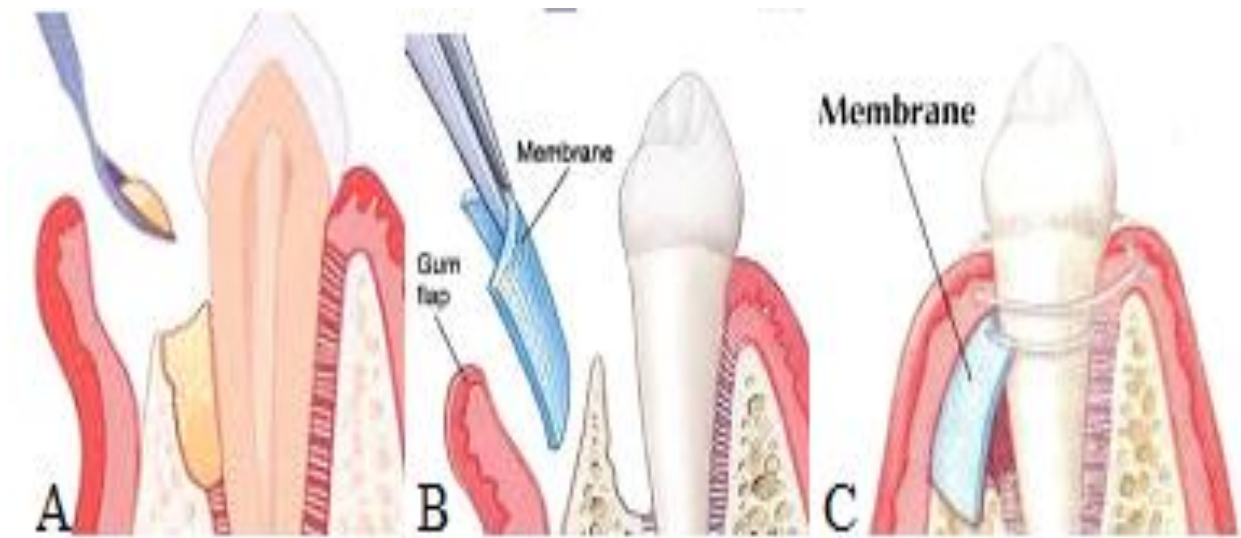


Figura 1.11: approccio rigenerativo, riempimento osseo (A) e posizionamento della membrana (B,C)

Si distinguono membrane barriera:

- non degradabili: realizzate in PTFE, teflon e rete di titanio.
 - Vantaggi: biocompatibili, mantengono la loro integrità strutturale.
 - Svantaggi: richiedono una seconda procedura chirurgica per esser rimosse, presentano un alto rischio d'infezione e il PTFE può causare da lievi a moderate reazioni citotossiche.

- sintetiche: realizzate in PLA,PLGA.
 - Vantaggi: non influenzano la rigenerazione ossea *in vivo*, le proprietà meccaniche e di mantenimento possono essere regolate e inducono una maggiore neovascolarizzazione.
 - Svantaggi: possono indurre reazioni di risposta tissutale durante la degradazione e moderate reazioni citotossiche che potrebbero ridurre l'adesione cellulare.

- naturali: realizzate in collagene o chitosano.
 - Vantaggi: molto biocompatibili, promuovono l'adesione e la proliferazione cellulare e permettono una buona integrazione con il tessuto connettivo.
 - Svantaggi: degradazione *in vivo* troppo rapida, i prodotti chimici usati per la reticolazione hanno effetti citotossici, presentano rischio di rottura peri-operatoria e una possibile alterazione delle proprietà meccaniche della membrana con l'umidificazione.

Un'altra procedura rigenerativa utilizzata nella pratica clinica consiste nell'applicazione dei principi della biomimetica attraverso l'uso di fattori di crescita o di amelogenine (EMD). In condizioni fisiologiche l'amelogenina si consolida in una matrice insolubile che presenta la capacità di stimolare vari tipi di cellule coinvolte nel processo di cicatrizzazione dei tessuti duri e molli (cellule staminali mesenchimali, osteoblasti, fibroblasti, cellule del legamento periodontale e cementoblasti) avviandole a una fase di rigenerazione [24] (es. prodotto Straumann® Emdogain® (**Figura 1.12**); gel formato dalle proteine

idrofobe della matrice dello smalto, estratte dallo smalto embrionale di origine suina).



Figura 1.12: gel Straumann® Emdogain®

I fattori di crescita che giocano un ruolo fondamentale nella rigenerazione parodontale, appartengono a due importanti famiglie: TGF (*Trasforming Growth Factor*) e BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) [25]. Tuttavia, molte di queste proteine presentano una breve emivita nel corpo e non assicurano un trattamento efficace tale da garantire il successo della terapia rigenerativa. Per questo motivo, un approccio alternativo che si è diffuso ultimamente, è definito terapia genica e consiste nel rilascio del gene codificante il fattore di crescita specifico (tramite vettori virali o tecniche non virali che utilizzano elettroporazione o metodi ad ultrasuoni) anziché del fattore di crescita stesso [26].

Come risultato dello stato d'arte nessuna soluzione attuale si basa sulla rigenerazione di tutto il tessuto parodontale. A tal proposito, si è evidenziata una possibile applicazione rigenerativa in grado di superare tale limite tramite la realizzazione del progetto Smiley eseguito in questo lavoro di tesi.

1.4 PROGETTO SMILEY

Il progetto Smiley (realizzato presso la Fin-Ceramica Faenza S.p.A) evidenzia un approccio rigenerativo per il trattamento di parodontiti avanzate tramite la realizzazione di uno scaffold tri-strato utilizzato per la rigenerazione dell'osso alveolare, legamento parodontale e cemento (**Figura 1.13**).

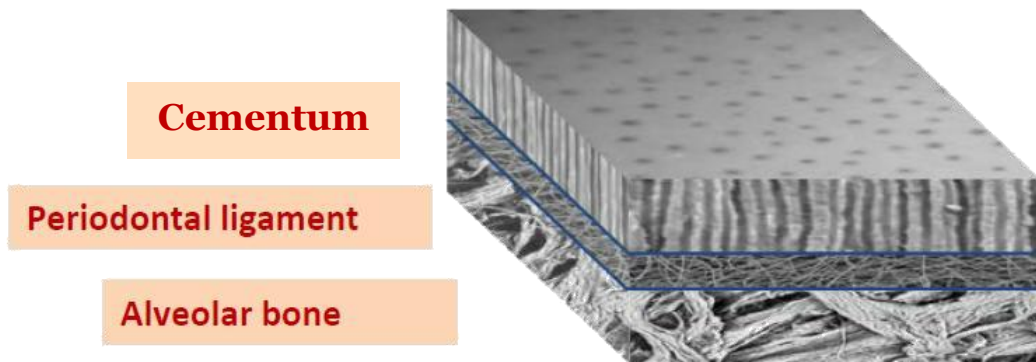


Figura 1.13: Scaffold parodontale tri-strato

Lo scaffold parodontale tri-strato è un materiale poroso, nanostrutturato e biomimetico costituito da 3 *layer* che mimano l'anatomia del comparto parodontale. Il materiale deve mimare l'ambiente 3D della matrice extracellulare, fornire supporto strutturale, essere biocompatibile e offrire un incremento del rapporto tra area superficiale e volume tale da permettere la migrazione cellulare, l'adesione, la proliferazione e guidare la differenziazione cellulare nei vari tessuti parodontali. Date le evidenti differenze chimiche e strutturali dei diversi tessuti del comparto parodontale, ogni layer deve essere in grado di mimare la matrice extracellulare del tessuto da sostituire in maniera indipendente.

A tal proposito, lo strato inferiore dello scaffold, utilizzato per la rigenerazione dell'osso alveolare, è costituito dal 60% in peso da collagene di tipo I e dal 40% in peso da idrossiapatite sostituita con magnesio (Mg-HA), mentre lo strato intermedio, utilizzato per la rigenerazione del legamento parodontale, è composto al 100% da collagene di tipo I. Infine, lo strato superiore, utilizzato per la rigenerazione del cemento, presenta la stessa composizione chimica dello strato inferiore con uno spessore notevolmente ridotto tale da mimare le caratteristiche strutturali del cemento *in vivo*.

1.5 SCOPO DEL LAVORO DI TESI

Lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di sviluppare un prototipo tri-strato che favorisca la rigenerazione del tessuto parodontale, mimando i differenti tessuti mineralizzati del parodonto per il trattamento, in particolare, delle parodontiti avanzate.

Lo scaffold sarà costituito da tre strati:

- strato inferiore di collagene biomineralizzato con idrossiapatite, di spessore pari a ~ 2 mm;
- strato intermedio di collagene di spessore pari a ~ 2 mm;
- strato superiore di collagene biomineralizzato con idrossiapatite, di spessore pari a ~ 0,5 mm.

Le prime attività si baseranno sulla definizione di un metodo che permetta la standardizzazione della fase dei lavaggi inerente al processo di produzione dello scaffold parodontale. Tale fase risulta, infatti, altamente operatore-dipendente e pertanto l'acqua contenuta prima e dopo il lavaggio, non essendo controllata, influenza diversamente le caratteristiche del prodotto finale. Infatti, essendo la porosità dello scaffold, fortemente dipendente dal contenuto d'acqua presente nel semilavorato, la standardizzazione risulta utile per garantire la riproducibilità del processo e uno sviluppo su larga scala.

Per garantire l'assottigliamento dello strato intermedio collagenico (tale da rispettare le caratteristiche strutturali del legamento parodontale *in vivo*) saranno testate diverse condizioni di liofilizzazione.

Il prototipo realizzato deve garantire una buona adesione tra gli strati, necessaria per evitare la delaminazione sia durante la fase d'impianto sia nel post-operatorio, oltre ad essere facile da suturare e presentare caratteristiche ideali quali la flessibilità e la possibilità di taglio nelle forme desiderate durante l'intervento. A tal proposito, le attività seguenti si baseranno sulla caratterizzazione chimica e fisica dello scaffold.

Una valutazione preclinica dello scaffold in termini di rigenerazione parodontale sarà possibile solo attraverso test eseguiti inizialmente su modelli animali al fine di progettare protocolli sempre più sicuri ed efficaci da applicare successivamente sull'uomo.

CAPITOLO 2:

MATERIALI E METODI

In questo capitolo saranno illustrati i processi utilizzati per la realizzazione dello scaffold parodontale tri-strato e le attività principalmente eseguite per garantire una standardizzazione del processo di produzione dello scaffold. Saranno, infine, descritti i metodi impiegati per la caratterizzazione chimica e fisica del prodotto.

2.1 SPECIFICA DI PRODOTTO

La definizione delle caratteristiche essenziali dello scaffold risulta importante per evidenziare le specifiche del prodotto tali da garantire la rigenerazione completa del tessuto parodontale per il trattamento, in particolare, delle parodontiti avanzate. Pertanto, un'attenta valutazione delle caratteristiche chimiche e fisiche del prodotto, risulta essenziale per la regolazione delle molteplici variabili cliniche e biologiche che possono influenzare la rigenerazione del parodonto. La rigenerazione completa del tessuto parodontale risulta, infatti, ancora oggi, un'operazione molto critica a causa delle diverse sollecitazioni meccaniche alle quali è sottoposto il tessuto e alla presenza di un alto rischio d'infezione dovuto al contatto continuo con l'ambiente esterno della cavità orale [27].

Lo scaffold realizzato deve fornire un supporto efficiente alle cellule permettendo loro di migrare al suo interno, di fissarsi alla struttura e quindi di proliferare e differenziarsi. Inoltre, deve offrire un ambiente che permetta alle cellule di mantenere il loro fenotipo e di sintetizzare le proteine e le molecole necessarie al

loro sviluppo. Deve presentare, infine, un'estesa superficie d'impianto, una resistenza meccanica sufficiente, una forma tridimensionale adeguata e una completa biodegradabilità [28].

La biomimesi geometrica è definita una delle specifiche più importanti nella produzione dello scaffold, che deve attenersi alla morfologia sia macro, sia microscopica, contrassegnata dalla presenza di concavità e pori interconnessi. Il motivo per cui le concavità costituiscono un fattore così critico è l'alta concentrazione di cellule che esse promuovono, favorendo così l'accumulo di citochine e biomolecole attive. In tal modo, le cellule formano una vera e propria rete, scambiandosi informazioni e cooperando rapidamente per la rigenerazione dei tessuti parodontali. L'altra caratteristica cruciale è rappresentata dalla porosità del materiale, necessaria per garantire la migrazione cellulare e l'angiogenesi, oltre che un'ampia superficie per le interazioni cellulari. Le dimensioni dei pori determinano il tipo di tessuto indotto: in quelli con diametro di 15-50 micron si organizza tessuto fibrovascolare, in quelli di dimensioni di 50-150 micron si genera tessuto osteoide e infine negli spazi superiori ai 150 micron si genera tessuto osseo mineralizzato [29]. Tramite test di swelling è possibile valutare il grado di porosità dello scaffold considerando l'assorbimento della soluzione salina, inglobata nella struttura, come misura indiretta della porosità.

Il prodotto è composto di tre strati che mimano la chimica e la microstruttura del tessuto parodontale, realizzati in modo tale da garantire una buona coesione e integrazione per evitare una possibile delaminazione sia durante la fase di impianto, sia nel post-operatorio. Si deve, inoltre, garantire un prodotto facile da suturare, flessibile, e che permetta una possibilità di taglio nelle forme desiderate durante l'intervento.

In **Tabella 2.1** sono riassunte le specifiche richieste, i metodi di analisi utilizzati con i limiti delle specifiche imposte per il prodotto.

SPECIFICA RICHIESTA	PARAMETRI MISURATI	METODO DI ANALISI	LIMITI DELLE SPECIFICHE
Composizione chimica	Contenuto d'acqua wt%	Analisi TermoGravimetrica (TGA)	$\leq 16 \%$
	wt% Mg-HA strati mineralizzati scaffold	Analisi TermoGravimetrica (TGA)	$30 \pm 5 \%$
	Ca/P strati mineralizzati scaffold	Analisi Spettrometrica di emissione su plasma (ICP-OES)	$1.2 \div 1.7$
	(Mg + Ca)/P strati mineralizzati scaffold	Analisi Spettrometrica di emissione su plasma (ICP-OES)	$1.2 \div 1.7$
	Mg/Ca% strati mineralizzati scaffold	Analisi Spettrometrica di emissione su plasma (ICP-OES)	$0.4 \div 2$
Dimensione	Spessore scaffold	Analisi Microscopica Elettronica a Scansione (SEM) e Test di swelling	$0,6 \pm 0,1 \text{ cm}$
Sterilizzazione raggi gamma	Sterilità	ISO 11737-1 (carica microbiologica) ISO 11737-2 (Sterilità)	Sterile

Tabella 2.1: Specifiche richieste e metodi di analisi utilizzati

2.2 PROCESSO DI REALIZZAZIONE DELLO SCAFFOLD

Il processo sviluppato per la produzione dello scaffold prevede la sintesi e sovrapposizione di tre strati che mimano l'architettura e la composizione dell'osso alveolare, del legamento parodontale e del cemento, successivamente liofilizzati secondo diverse condizioni. Le fasi principali del processo sono riassunte in **Figura 2.14**.

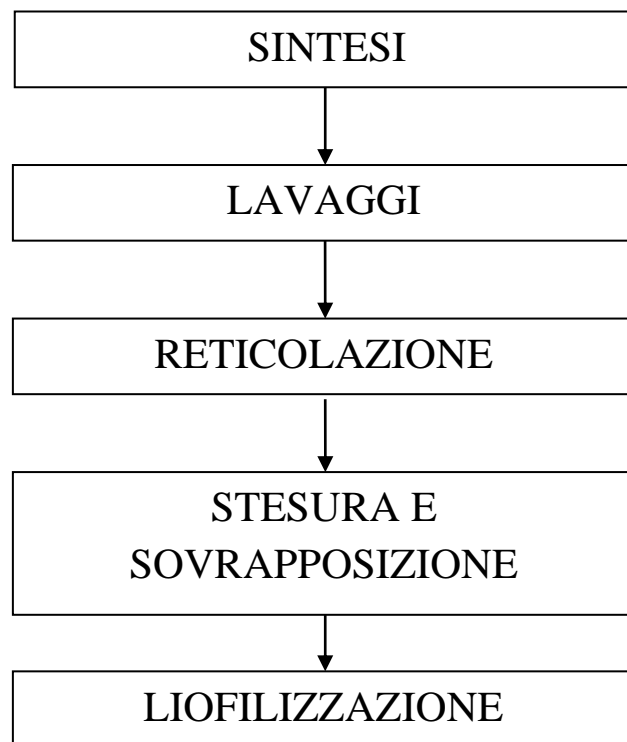


Figura 2.14: Fasi principali per la produzione dello scaffold.

2.2.1 SINTESI

La quantità di collagene utilizzata nella fase di sintesi è calcolata, secondo quanto definito da specifica, in base al valore di residuo secco del lotto di collagene utilizzato. In questo lavoro di tesi è stato adoperato collagene di tipo I estratto da tendine equino (Opocrin Spa, Modena).

Nella preparazione dello strato che mima il legamento parodontale, una volta diluito il gel di collagene con acqua altamente purificata (equivalente da specifica ad un valore di conducibilità inferiore a $0,1 \mu\text{S}/\text{cm}$), si aggiunge la soluzione di NaOH da $0,1 \text{ M}$ necessaria per la precipitazione del collagene al punto isoelettrico, cioè ad un valore di pH compreso tra 5,5 e 6,5.

Per la preparazione dello strato che mima l'osso alveolare e il cemento, il gel di collagene diluito con acqua altamente purificata, viene aggiunto ad una soluzione di acido fosforico e successivamente gocciolato (impostando il flusso di gocciolatura, come da specifica, tramite una pompa peristaltica) in una sospensione basica composta da calcio idrossido e cloruro di magnesio (**Figura 2.15**). La formazione dei cristalli d'idrossiapatite avviene grazie alla reazione tra acido fosforico e calcio idrossido durante la precipitazione delle fibre di collagene. Il processo descritto, che prende il nome di nucleazione, determina la formazione di nuclei di cristallizzazione aventi una disposizione reciproca tale da configurare il reticolo cristallino dell'idrossiapatite e garantendo la sua coordinazione con i gruppi funzionali presenti nelle fibre di collagene [30].



Figura 2.15: Gocciolatura della soluzione acida contenente collagene nella sospensione basica.

2.2.2 LAVAGGI

Le fasi di lavaggio sono necessarie per rimuovere i reagenti che non hanno preso parte alla reazione e i prodotti in eccesso.

Gli strati precedentemente sintetizzati vengono filtrati con l'ausilio di un setaccio di acciaio in maglie da 600 μm utilizzando un quantitativo di acqua per ogni singolo lavaggio calcolato in base ad un rapporto definito con il gel di collagene di partenza.

In **Figura 2.16** e in **Figura 2.17** è possibile vedere come avviene il lavaggio e filtraggio rispettivamente dello strato che mima il legamento parodontale e dello strato che mima il cemento e l'osso alveolare.

Essendo tale operazione altamente operatore dipendente, l'acqua contenuta prima e dopo il lavaggio non è controllata e pertanto sono stati eseguiti di seguito alcuni test al fine di garantire una standardizzazione utile per promuovere una riproducibilità del processo.



Figura 2.16: Lavaggio e filtraggio strato legamento parodontale.



Figura 2.17: Lavaggio e filtraggio strato cemento e osso alveolare.

2.2.3 RETICOLAZIONE

La reticolazione è il processo mediante il quale si creano legami a livello di gruppi funzionali reattivi delle catene polimeriche (o eventualmente tra due punti diversi della stessa catena). Questi legami possono essere di tipo covalente o ionico, quindi legami forti. In funzione della quantità relativa di tali legami, le proprietà chimico-fisiche del polimero variano sensibilmente tanto da modificare radicalmente le applicazioni pratiche per le quali il polimero può essere impiegato.

Allo scopo di limitare la cinetica di degradazione del collagene in ambiente fisiologico, aumentandone quindi la stabilità chimico-meccanica, è stato utilizzato come agente reticolante, in questo lavoro di tesi, il BDDGE (1,4-butanediol diglycidyl ether). Il BDDGE è un diepossido simmetrico capace di reagire attraverso l'apertura del suo anello epossidico sia con i gruppi carbossilici (reazione predominante a pH acido), sia con i gruppi amminici (reazione predominante a pH basico) portando alla formazione di legami "cross-link" nelle catene del collagene e di conseguenza alla stabilizzazione della sua struttura (**Figura 2.18**) [31]. Il collagene acquisisce così una migliore resistenza alla biodegradazione e una ridotta solubilità.

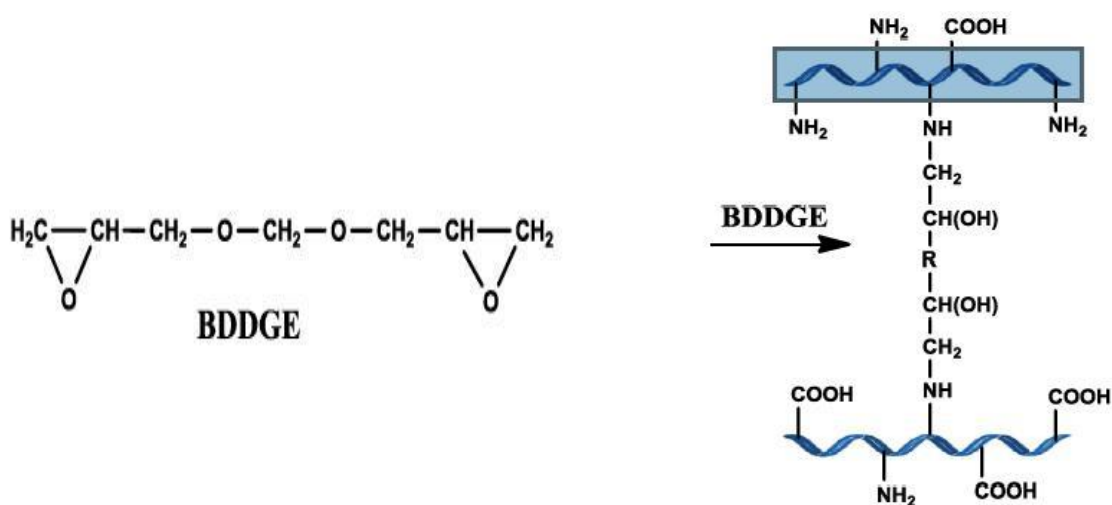


Figura 2.18: Struttura chimica del BDDGE (a sinistra) e schema del processo di reticolazione tra il BDDGE e i gruppi amminici presenti nel collagene (a destra).

2.2.4 STESURA E SOVRAPPOSIZIONE

Durante la fase di stesura si è eseguita la sovrapposizione degli strati utilizzando sia piastre in acciaio che teflonate per confrontare gli esiti a fine liofilizzazione.

Per ogni condizione sono stati realizzati quattro campioni sovrapposti come riportato di seguito:

1. stesura strato di osso alveolare (di spessore pari a ~ 2 mm, **Figura 2.19**);

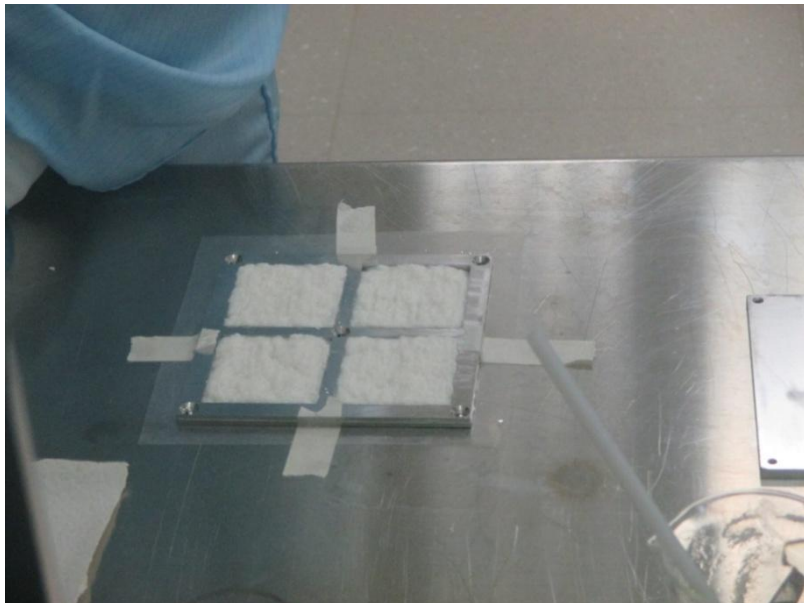


Figura 2.19: Stesura strato osso alveolare su piastra in acciaio

2. stesura strato di legamento parodontale (di spessore pari a ~ 2 mm) sopra lo strato precedente, **Figura 2.20**;

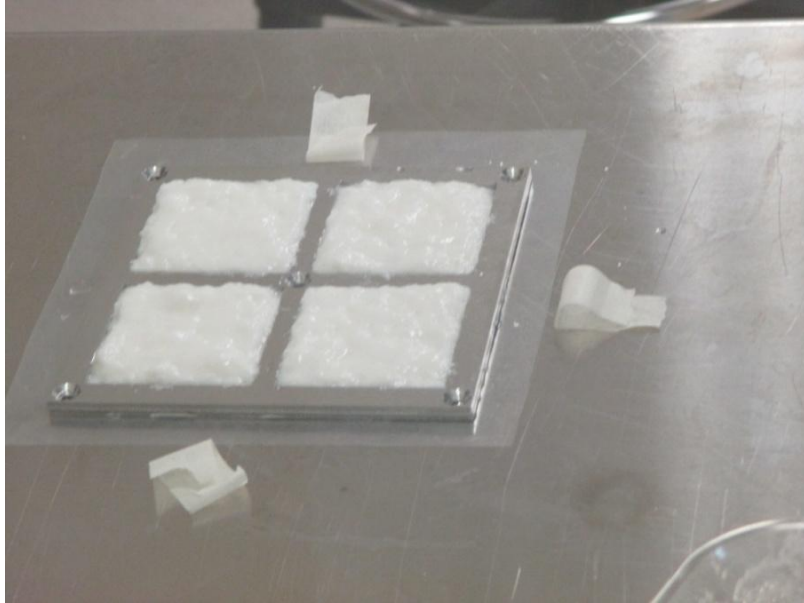


Figura 2.20: sovrapposizione strato legamento parodontale sopra strato di osso alveolare precedente.

3. sovrapposizione strato di cemento (di spessore pari a ~ 0,5 mm) sopra il bistrato appena formato, **Figura 2.21**.



Figura 2.21: sovrapposizione strato cemento sopra il bistrato precedente.

La preparazione dello strato che mima il cemento avviene tramite una tecnica di filtraggio a vuoto, abbinata a un successivo rullaggio, per ottenere uno strato di spessore ridotto tale da mimare le caratteristiche strutturali del cemento *in vivo*. In particolare, lo strato viene pesato e diluito in acqua (circa 40 volte il peso del composto), per favorire l'apertura delle fibre di collagene e successivamente inserito in un filtro a membrana (Millipore Express PLUS) in polietersulfone, di 90 mm di diametro e dimensione dei pori pari a 0,22 μm . Il filtraggio a vuoto viene eseguito tramite il collegamento del filtro ad una pompa da vuoto (Vacuubrand ME 1C) che permette di ottenere, infine, uno strato compatto e omogeneo (**Figura 2.22**).

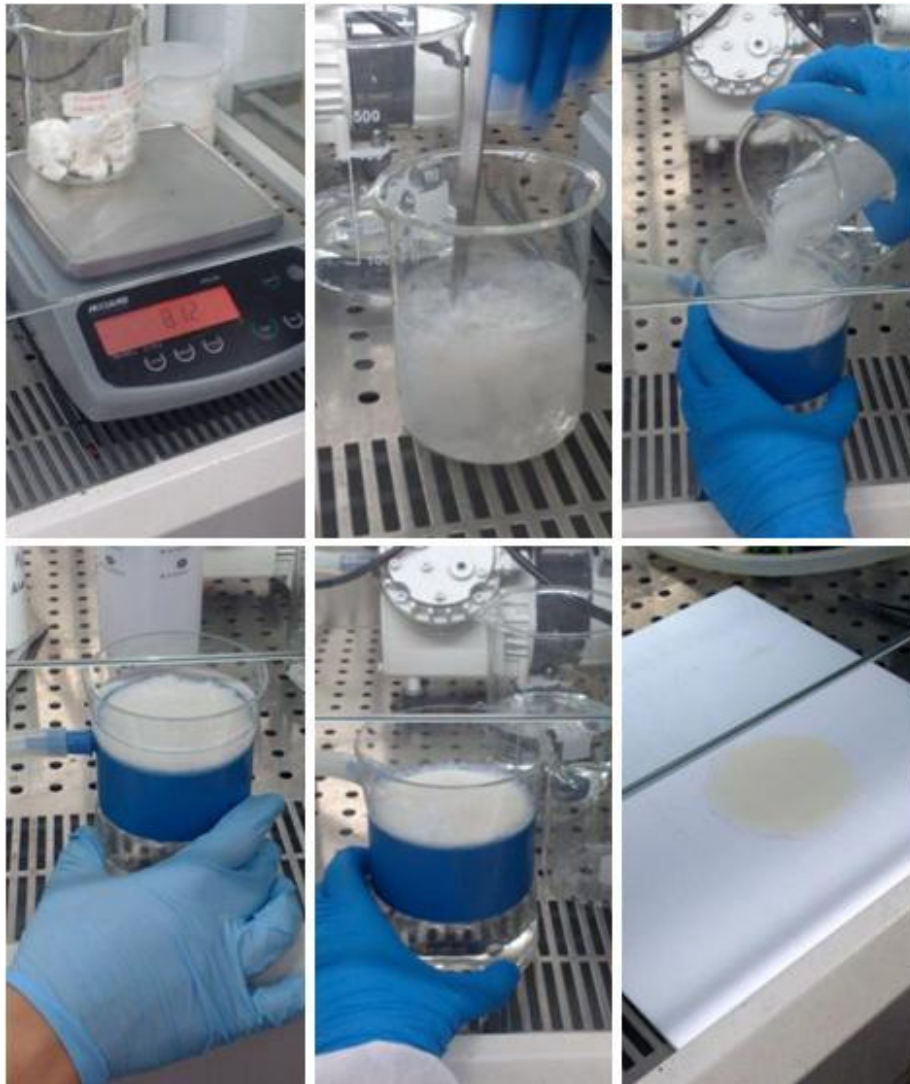


Figura 2.22: Fasi del processo di filtraggio a vuoto per la preparazione dello strato di cemento

Per ridurre ulteriormente lo spessore, il materiale ottenuto viene sottoposto a rullaggio, dopo esser stato inserito tra due fogli di mylar, in modo da impedire l'adesione del campione al rullo e il trasferimento di impurezze. In **Figura 2.23** è mostrato lo strato di cemento ottenuto.



Figura 2.23: Strato di cemento.

Sono state eseguite le seguenti condizioni di stesura:

1. 4 campioni stesi su una piastra di acciaio (52x52 mm) sopra i quali è stato posto un foglio di mylar, **Figura 2.24**;



Figura 2.24: campioni stesi su piastra di acciaio con foglio di mylar sopra.

2. 4 campioni stesi su mylar sopra i quali è stato posto un foglio di mylar, **Figura 2.25**;

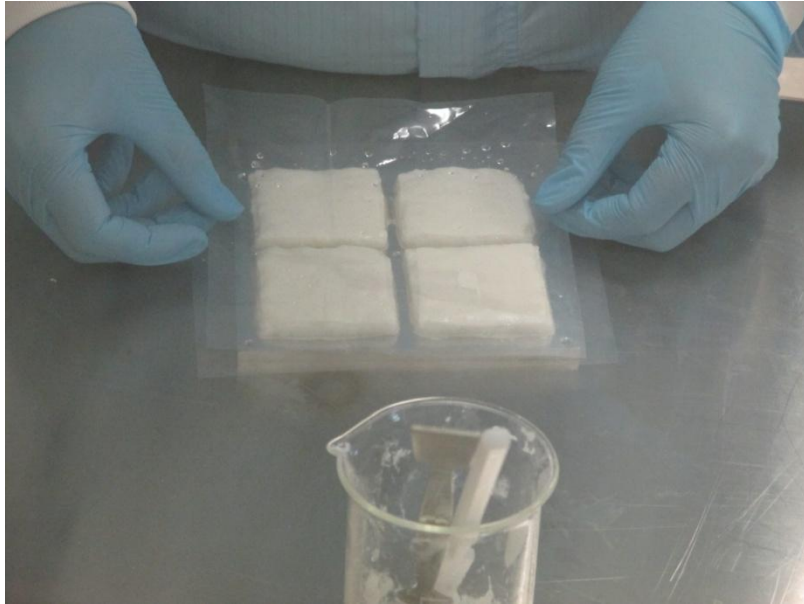


Figura 2.25: campioni stesi su mylar con foglio di mylar sopra.

3. 4 campioni stesi su una piastra teflonata (piastra d'acciaio con foglio in teflon da 0,3 mm), **Figura 2.26**;
4. 4 campioni stesi su una piastra teflonata sopra i quali è stato posto un foglio di mylar, **Figura 2.26**.

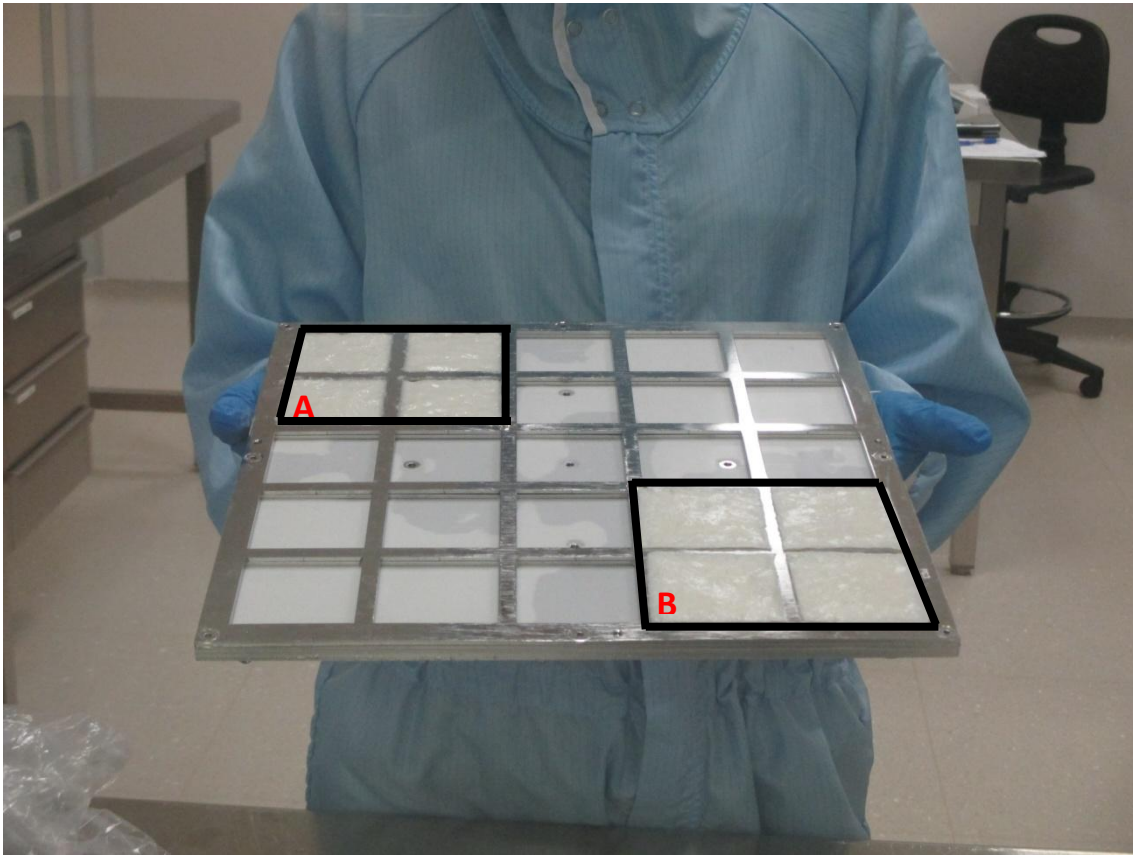


Figura 2.26: campioni stesi su piastra teflonata con foglio di mylar sopra (A) e senza foglio di mylar sopra

2.2.5 LIOFILIZZAZIONE

Subito dopo la fase di stesura si procede con la liofilizzazione dei campioni tramite l'inserimento delle piastre nel liofilizzatore (LIO 2000P) (**Figura 2.27**).

La liofilizzazione (o crioessiccamento) è un processo tecnologico che permette l'eliminazione dell'acqua da una sostanza organica con il minimo deterioramento possibile della struttura e dei componenti della sostanza stessa.



Figura 2.27: Liofilizzatore

Il processo di liofilizzazione adottato per questo lavoro di tesi, può essere descritto in 5 fasi principali (**Figura 2.28**):

1. Condizionamento delle piastre (*Pre-freezing*): da temperatura ambiente fino a -35°C per la piastra superiore e a -25°C per quella inferiore;
2. Congelamento (*Freezing*): finchè il campione non raggiunge la temperatura impostata nella piastra corrispondente;
3. Generazione del vuoto (*Vacuuming*): pari a 0,2929 mbar;
4. Essiccamento primario (*Primary Drying*): si raggiunge la temperatura di $+5^{\circ}\text{C}$ per entrambe le piastre con velocità pari a 2°C/h ;
5. Essiccamento secondario (*Secondary Drying*): si avvia quando la differenza di temperatura tra le piastre è pari a 2°C e avviene a 1°C/h per un'ora.

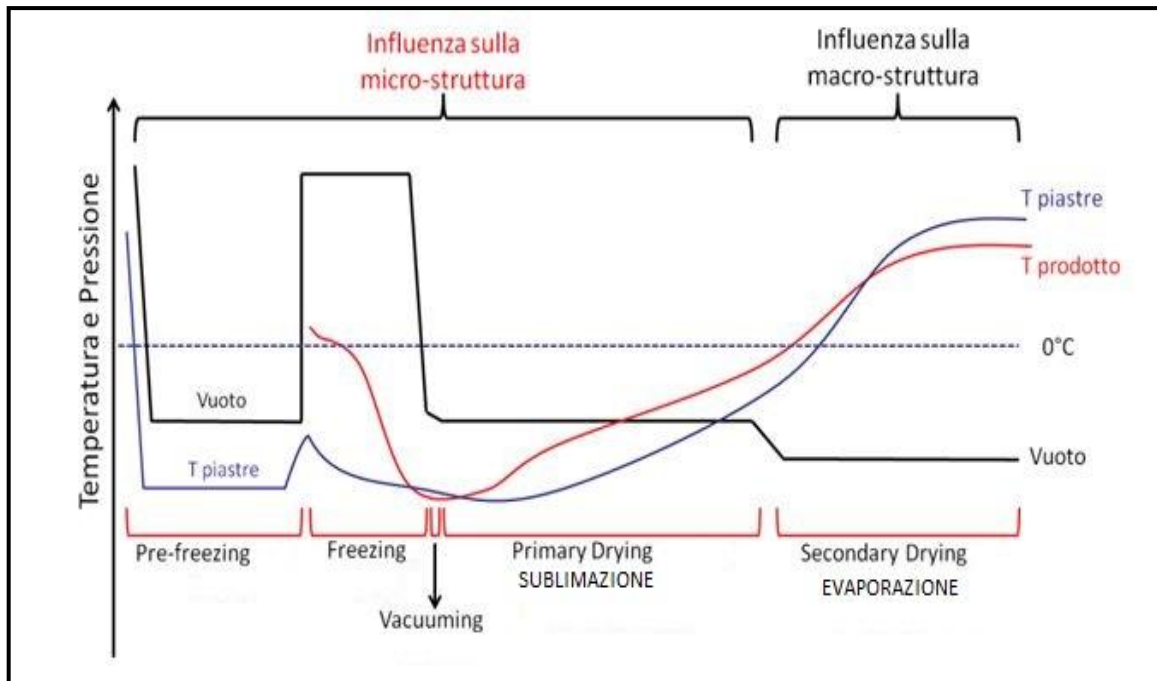


Figura 2.28: Ciclo di liofilizzazione

La grandezza, morfologia e distribuzione dei cristalli di ghiaccio che si formano nella fase di congelamento, influenza la micro-organizzazione tridimensionale delle fibre di collagene, quindi, la micro-struttura del prodotto. Al contrario, le fasi di generazione del vuoto e di essiccamento primario, se correttamente controllate, permettono la sublimazione dei cristalli di ghiaccio, mantenendo inalterato il micro-arrangiamento nel prodotto finito [32].

Durante l'essiccamento secondario, infine, si favorisce l'evaporazione dell'acqua residua coordinata dalle fibre, modulando le caratteristiche meccaniche e morfologiche macroscopiche, quali flessibilità e resistenza alla trazione. L'inizio della fase di generazione del vuoto è vincolato al raggiungimento della temperatura di -35°C per i campioni posizionati nel piano superiore del liofilizzatore e di -25°C per quelli posizionati nel piano inferiore, dopo una fase di pre-condizionamento della camera di liofilizzazione. Infine, l'inizio dell'essiccamento primario avviene quando la pressione raggiunge $0,2929$ mbar.

2.3 STANDARDIZZAZIONE PROCESSO DI PRODUZIONE SCAFFOLD: STEP LAVAGGI

La definizione di un metodo che permetta la standardizzazione della fase dei lavaggi risulta importante per garantire una ripetibilità e una riproducibilità su larga scala del processo di produzione dello scaffold parodontale tri-strato.

Infatti, essendo tale fase altamente operatore-dipendente, l'acqua contenuta prima e dopo il lavaggio non risulta controllata ed influenza diversamente le caratteristiche del prodotto finale. In particolare, la porosità dipende notevolmente dal contenuto d'acqua presente nel semilavorato.

Un metodo per ridurre il tempo di esecuzione dei lavaggi e garantire una riproducibilità del processo, consiste nell'utilizzo di una centrifuga (REMI R-8D) utilizzata come procedura automatica di filtrazione. Sono stati pertanto eseguiti alcuni test che hanno permesso di trovare i giusti parametri di controllo tali da assicurare una centrifugazione ottimale in termini di prodotto finale indipendentemente dal contenuto d'acqua presente nel campione.

Per l'esecuzione dei test sono state identificate 3 variabili critiche :

1. velocità di centrifugazione (RPM);
2. pH;
3. lotto di collagene,

definendo come parametri in output:

- la resa ³;
- la percentuale di acqua presente nel prodotto (H₂O wt%)⁴.

Riportiamo di seguito i test eseguiti:

³ **resa**: grammi di collagene secco/ grammi di collagene presente nel gel iniziale.

⁴ **H₂O wt%**: 1- grammi di collagene secco /grammi di collagene a fine filtrazione.

- test con pH fisso per differenti velocità di centrifugazione;
- test con velocità di centrifugazione fissa per diversi pH;
- test con differenti condizioni iniziali di diluizione;
- test con differenti lotti di collagene.

I primi due test sono stati eseguiti per trovare la velocità di centrifugazione e il valore di pH ottimali da impostare come parametri fissi per confrontare l'effetto sul prodotto finale con differenti condizioni iniziali di diluizione. Gli stessi parametri sono stati poi utilizzati per valutare nell'ultimo test l'effetto della materia prima utilizzata (lotto di collagene) sul prodotto finale.

2.3.1 PROCESSO DI FILTRAZIONE

Tutti i test sono stati eseguiti utilizzando una quantità nota di strato collagenico precipitato. Per ogni condizione sono state eseguite 4 repliche utilizzando 4 falcon di volume pari a 50 ml ciascuna (**Figura 2.29**).



Figura 2.29: Falcon

In **Figura 2.30** riportiamo il diagramma di flusso dei principali step eseguiti nei test precedenti:



Figura 2.30: principali fasi del processo di filtrazione

- **Centrifugazione:** le falcon vengono centrifugate alla velocità corrispondente per 3 minuti (tempo minimo necessario per garantire una centrifugazione ottimale, definito da test precedenti) (**Figura 2.31**);



Figura 2.31: Posizionamento delle falcon nel rotore della centrifuga.

- **Separazione:** a fine centrifuga, l'acqua viene separata dal collagene filtrato utilizzando una pipetta in vetro;

- **Essiccamento:** le falcon vengono posizionate in una stufa alla temperatura di 70°C per permettere l'evaporazione dell'acqua residua presente nel collagene filtrato.

Attraverso l'utilizzo di una bilancia analitica (METTLER TOLEDO-modello XS105DU) viene monitorato il peso secco del campione, durante la fase di essiccamento, finché non si evidenzia alcun cambiamento significativo (Figura 2.32).

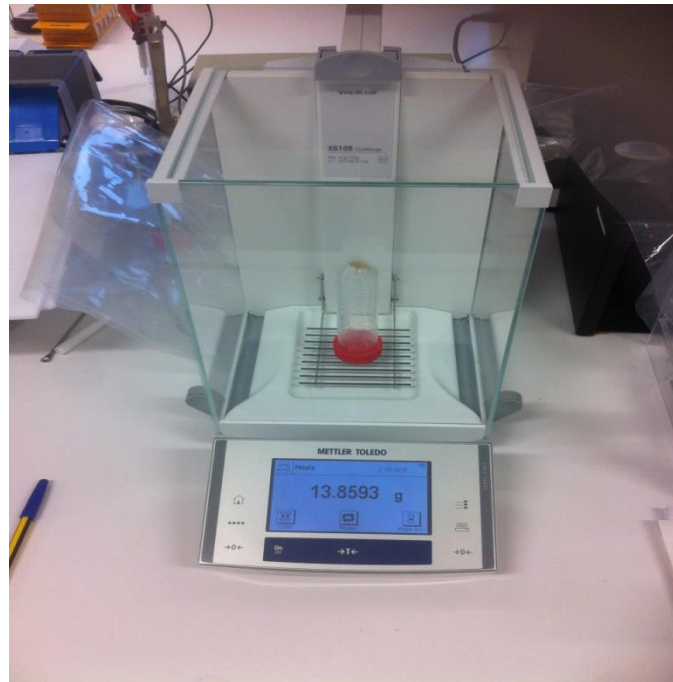


Figura 2.32: Monitoraggio peso secco del campione tramite bilancia analitica.

2.3.2 TEST ESEGUITI

1. pH fisso per differenti velocità di centrifugazione

Questo test è stato eseguito analizzando la resa e la percentuale d'acqua presente nel prodotto finale a partire da collagene precipitato a pH 5,5 e utilizzando le seguenti velocità di centrifugazione:

- 2000 RPM
- 4500 RPM
- 6000 RPM

I risultati sono stati valutati statisticamente tramite test ANOVA.

2. Velocità di centrifugazione fissa per diversi pH

Questo test è stato eseguito fissando come velocità di centrifugazione quella risultata ottimale dal test precedente e analizzando la resa e la percentuale d'acqua presente nel prodotto finale a partire da collagene precipitato a pH 5,5 e 6,5. I risultati sono stati valutati statisticamente tramite t-test.

3. Test con differenti condizioni iniziali di diluizione

Dai risultati del test precedente è stato possibile fissare il valore di pH ottimale, utilizzando come velocità di centrifugazione quella risultata ideale dal primo test. A tal proposito, sono stati confrontati gli effetti sul prodotto finale con diverse condizioni iniziali di diluizione.

In particolare, riportiamo di seguito i dettagli delle tre condizioni di diluizione utilizzate:

- **condizione 0:** stessa condizione di riferimento utilizzata nei test precedenti;
- **condizione 1:** si utilizza una quantità di collagene pari a $2/3$ di quella presente nella condizione 0 e un quantitativo d'acqua tale da raggiungere lo stesso volume di riferimento;
- **condizione 2:** si utilizza una quantità di collagene pari a $1/3$ di quella presente nella condizione 0 e un quantitativo d'acqua tale da raggiungere lo stesso volume di riferimento.

I risultati sono stati valutati statisticamente tramite test ANOVA.

4. Test con differenti lotti di collagene

Questo test è stato eseguito confrontando gli effetti della materia prima utilizzata (differenti lotti di collagene) sul prodotto finale. Il test è stato eseguito utilizzando gli stessi valori prefissati di pH e velocità di centrifugazione. Infine, dove è stato possibile, sono state eseguite alcune repliche per migliorare l'analisi statistica dei dati (t-test tra campioni appartenenti allo stesso lotto e test ANOVA tra campioni appartenenti a lotti differenti).

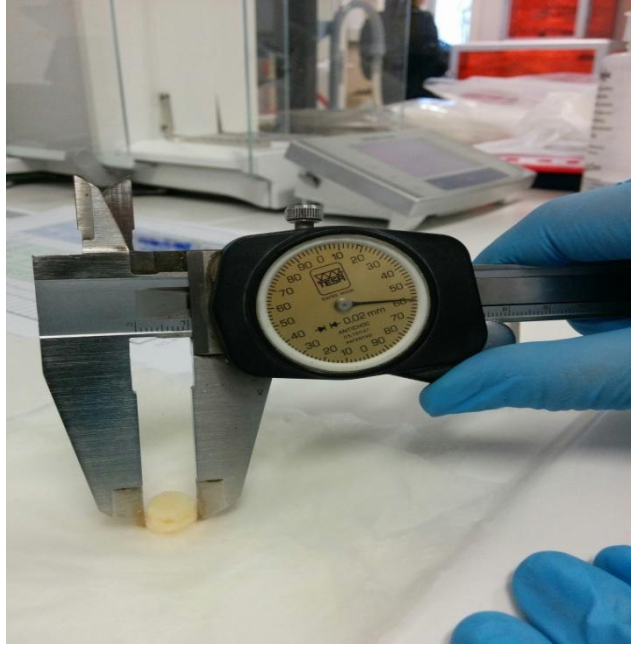
2.4 CARATTERIZZAZIONE CHIMICA E FISICA DELLO SCAFFOLD

In questo paragrafo saranno illustrati i metodi utilizzati per la caratterizzazione chimica e fisica dello scaffold al fine di soddisfare le specifiche essenziali affinché il prodotto risulti idoneo per una successiva applicazione clinica. La biomimesi è un parametro fondamentale per lo scaffold, sia per quanto riguarda la microstruttura che per quanto riguarda la chimica. In questo lavoro di tesi è stata valutata la microstruttura, cioè la porosità e lo spessore del campione, tramite test di swelling e analisi di microscopia elettronica a scansione (SEM). Infine, al fine di valutare la composizione chimica del campione e i rapporti stechiometrici tra gli elementi presenti nella componente minerale dello strato mineralizzato, sono state eseguite rispettivamente un'analisi termogravimetrica (TGA) e un'analisi spettrometrica di emissione su plasma (ICP).

2.4.1 TEST DI SWELLING

Tramite questo test è possibile valutare le modifiche dello scaffold sia per quanto riguarda la porosità che per quanto riguarda la geometria del campione. Il processo avviene poiché le molecole del liquido, penetrando all'interno della matrice organica dello scaffold, determinano il rigonfiamento dello stesso [33].

Per eseguire il test sono stati realizzati 48 provini cilindrici, con diametro di circa 10 mm, appartenenti a 4 lotti distinti (12 provini per ogni lotto). In particolare, i 4 lotti si riferiscono alle quattro condizioni di liofilizzazione definite in precedenza. Prima dell'esecuzione del test, per ogni provino, sono stati misurati l'altezza e il diametro tramite un calibro (**Figura 2.33**) e valutato il peso mediante una bilancia analitica.



In seguito ogni provino è stato posto su una petri e imbibito con soluzione salina PBS (*Phosphate buffered saline*) tramite una pipetta Gilson (Figura 2.34).



Figura 2.34: Swelling provino con soluzione PBS

Al termine dello swelling, sono stati misurati nuovamente l'altezza, il diametro e il peso di ogni provino.

Il test di swelling permette di valutare in modo indiretto la porosità dello scaffold poiché dipende da quanta soluzione salina è in grado di inglobare la struttura.

In particolare, la percentuale di porosità dello scaffold è calcolata come segue:

$$\text{Porosità} = (V_p/V_s) \times 100$$

dove:

- V_p rappresenta il volume dei pori: calcolato come rapporto tra la differenza del peso bagnato e secco dello scaffold e la densità della soluzione salina utilizzata;
- V_s rappresenta il volume bagnato dello scaffold dopo lo swelling.

2.4.2 ANALISI MICROSCOPICA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM)

Il microscopio elettronico a scansione sfrutta come sorgente di radiazioni un fascio di elettroni con energia fino a 30 keV che colpiscono il campione. Essendo la lunghezza d'onda degli elettroni di molto inferiore rispetto a quella dei fotoni, il potere risolutivo di un microscopio elettronico a scansione è nettamente superiore rispetto a quello di un microscopio ottico. Si raggiungono pertanto ingrandimenti e risoluzioni 1000 volte superiori rispetto alla microscopia ottica.

Il fascio di elettroni non è fisso ma viene pilotato in sequenza effettuando una scansione del campione in forma di una successione di linee parallele [34].

In questo lavoro di tesi, le analisi sono state eseguite utilizzando il microscopio elettronico a scansione ESEM FEI Quanta 200, Oregon, USA, **Figura 2.35**.



Figura 2.35: microscopio elettronico a scansione ESEM
FEI Quanta 200

Quando una superficie è investita da un fascio di elettroni ad alta energia, si generano diversi tipi di segnali, tra i quali i più importanti per la microscopia elettronica sono: l'emissione di elettroni secondari e la riflessione di elettroni retrodiffusi (*back-scattered*) appartenenti al raggio primario (**Figura 2.36**) [35]. In particolare, dalla rilevazione degli elettroni secondari (emessi da spessori superficiali del campione, cioè ~10nm) è stato possibile valutare la morfologia superficiale dello scaffold, mentre dalla rilevazione degli elettroni retrodiffusi è stato possibile trarre informazioni compositive e morfologiche provenienti da profondità massime di alcuni μm .

Interazione elettroni-materia

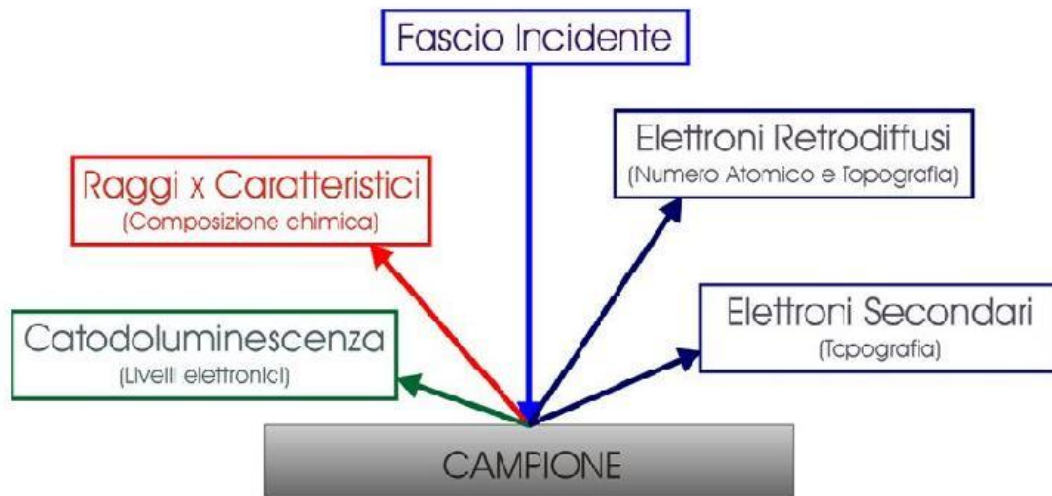


Figura 2.36: Segnali prodotti dall'interazione del fascio elettronico con il campione.

Sono stati analizzati 4 campioni (uno per ogni lotto). Ogni campione è stato ottenuto dallo scaffold del lotto specifico mediante l'utilizzo di un bisturi chirurgico garantendo un taglio perpendicolare senza compressione tra gli strati. I campioni sono stati in seguito fissati su appositi supporti circolari in alluminio, precedentemente coperti con un nastro di carbonio (*stubs*). Infine, ogni campione è stato rivestito di un sottile film metallico di nanoparticelle d'oro (spessore di 20 nm) prodotto per sputtering, necessario per ottenere immagini SEM da campioni non conduttori, come quelli considerati.

Le immagini sono state acquisite a 5, 10 e 15 KeV ad alto vuoto.

2.4.3 ANALISI TERMOGRAVIMETRICA (TGA)

La termogravimetria è una metodica di analisi termica quantitativa nella quale si esegue la registrazione continua delle variazioni di massa di un campione (senza però identificare la natura dei componenti), in atmosfera controllata e in funzione della temperatura o del tempo. In particolare, lo strumento misura la perdita di peso di un materiale, quando viene riscaldato, in conseguenza delle eventuali decomposizioni che esso subisce in seguito allo sviluppo di prodotti gassosi.

Il risultato dell'analisi è un termogravigramma (**Figura 2.37**) che riporta in ascissa la temperatura e sulle ordinate la variazione di massa percentuale [36].

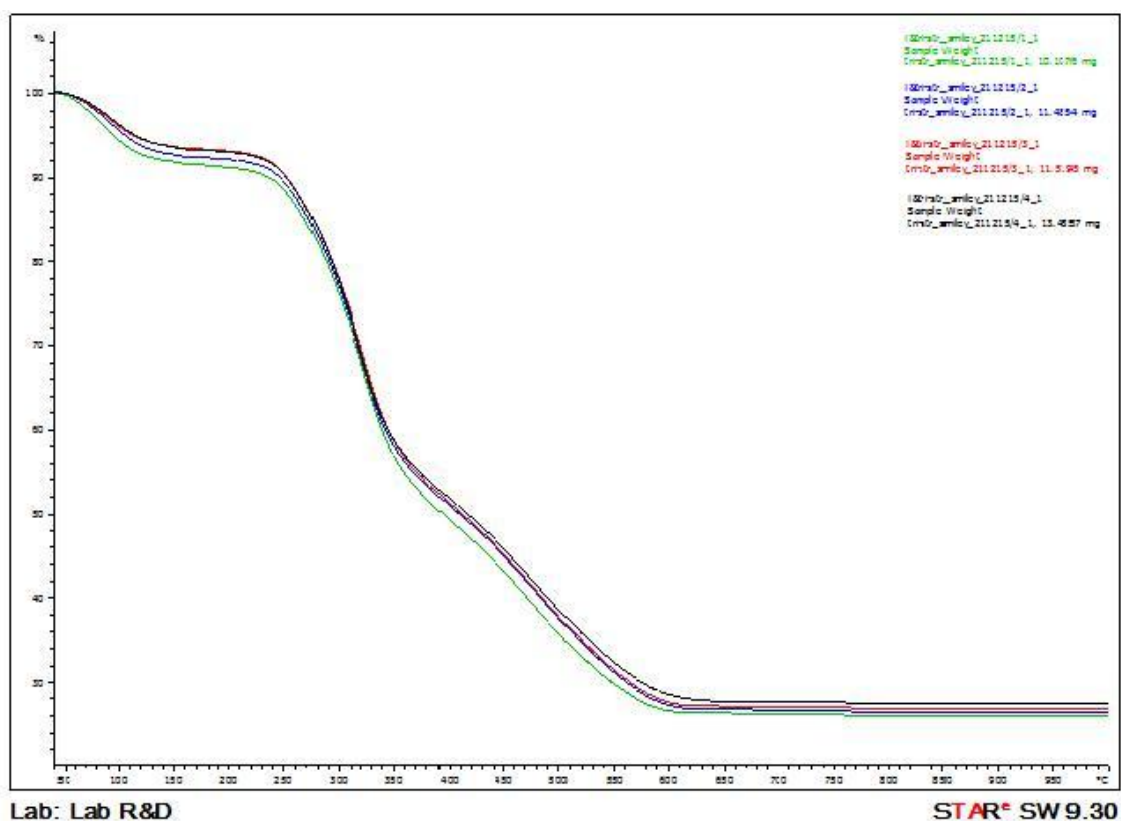


Figura 2.37: Termogravigramma

Per l'analisi dei campioni è stato utilizzato un metodo che permette di impostare le seguenti rampe di calore:

- da 40°C a 150°C con velocità pari a 20°C/min: permette di valutare la percentuale d'acqua residua presente nel campione;
- da 150°C a 700°C con velocità pari a 5°C/min: permette di valutare la percentuale di materiale organico (collagene) presente nel campione;
- da 700°C a 1000°C con velocità pari a 20°C/min: permette di rilevare la percentuale di minerale residuo presente nel campione.

I campioni sono stati pesati (circa 10 mg), inseriti negli appositi crogioli di allumina e chiusi con il rispettivo tappo in alluminio (**Figura 2.38**).

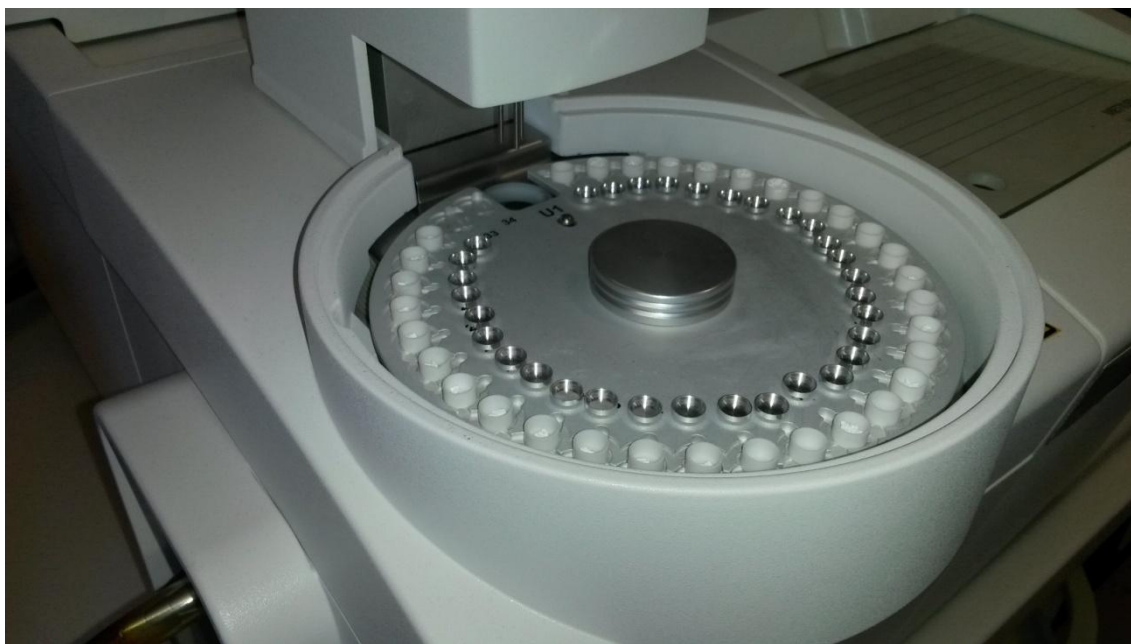


Figura 2.38: Crogioli TGA (TGA/DSC 1 STAR System - METTLER TOLEDO)

Sono stati analizzati tutti i lotti realizzati eseguendo 3 repliche per ogni lotto. Per migliorare l'analisi inerente alla percentuale di minerale presente negli strati superiore e inferiore dello scaffold, è stata ripetuta la prova considerando separatamente i singoli strati. Infine, i risultati sono stati valutati statisticamente tramite test ANOVA.

2.4.4 ANALISI SPETTROMETRICA DI EMISSIONE SU PLASMA (ICP)

L'analisi quantitativa degli elementi presenti nei campioni è stata eseguita utilizzando come tecnica la spettrometria di emissione su plasma. Si dice stato di plasma un gas ionizzato, costituito da un insieme di atomi, di ioni positivi e di elettroni, globalmente neutro. Lo stato di plasma si può realizzare portando qualunque gas a temperature molto elevate (fino a circa 10000°C) e può essere usato come mezzo di eccitazione molto efficace per l'emissione di molti elementi chimici, permettendo quindi un'accurata valutazione quantitativa degli elementi presenti nel campione.

In

Figura 2.39 è riportato lo schema di funzionamento di questa metodica. In particolare, una volta posti i campioni in soluzione, tramite una pompa peristaltica, vengono aspirati nella camera di nebulizzazione dove fuoriescono sotto forma di un getto finissimo da un foro capillare. Tale getto viene quindi investito da un forte flusso trasversale di argon tale da disperdere il liquido in minutissime goccioline (aerosol). Una parte essenziale dell'apparecchiatura è costituita dalla "torcia" alla cui sommità ci sono le spire della bobina a radiofrequenza che circondano il tubo di quarzo nel quale fluisce la corrente di argon con il campione. Alle temperature della scarica al plasma, le sostanze contenute nel campione si trasformano in atomi che subiscono quindi un'eccitazione. Le righe analitiche emesse dai diversi elementi cadono

solitamente nel campo dell'ultravioletto/visibile e sono rilevate mediante uno spettrometro. Costruendo preventivamente le curve di taratura di ciascun elemento per mezzo di soluzioni standard, si può eseguire l'analisi quantitativa degli elementi presenti nel campione analizzato [37].

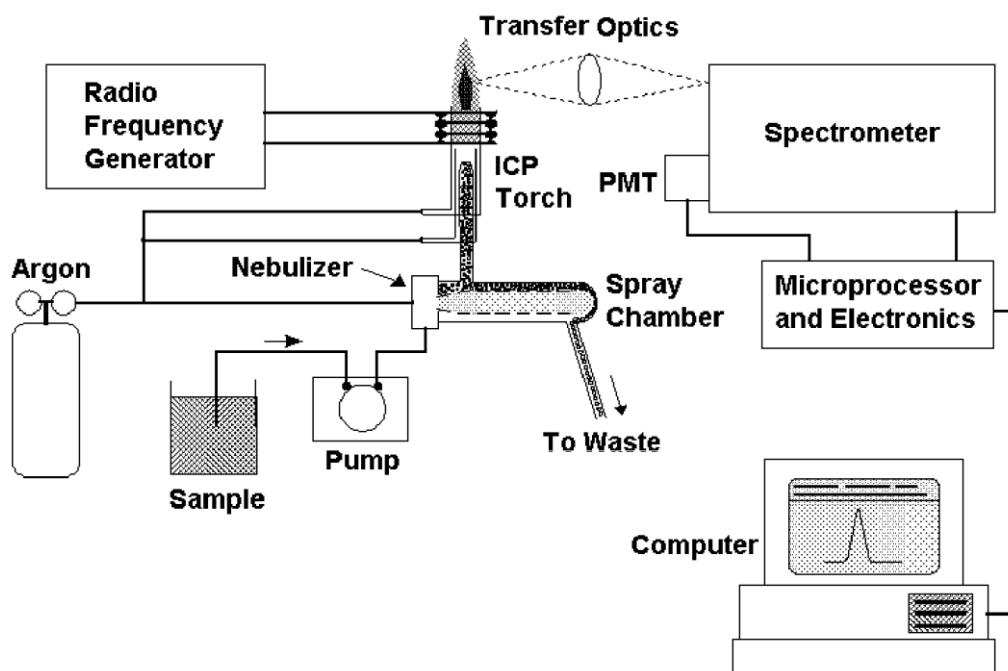


Figura 2.39: Schema di funzionamento analisi ICP

La nostra analisi si è basata sulla valutazione quantitativa di Ca, Mg e P presenti negli strati mineralizzati dello scaffold. Una volta ottenuti tali risultati, sono stati calcolati i seguenti rapporti stechiometrici, confrontandoli con i limiti definiti da specifica:

- $\text{Ca/P: } \frac{\text{conc.molare Ca}}{\text{conc.molare P}}$;
- $(\text{Ca+Mg})/\text{P: } \frac{\text{conc.molare Ca} + \text{conc.molare Mg}}{\text{conc.molare P}}$;
- $\text{Mg/Ca \%: } \frac{\text{conc.molare Mg}}{\text{conc.molare Ca}} * 100$.

CAPITOLO 3:

RISULTATI SPERIMENTALI

In questo capitolo saranno esposti i risultati ottenuti dai diversi test eseguiti sia per garantire una ripetibilità e una riproducibilità su larga scala del processo di produzione dello scaffold, sia per valutare le caratteristiche chimiche e fisiche del prodotto tali da soddisfare le specifiche richieste. In particolare, saranno riportati i risultati relativi al processo automatico di filtrazione tramite centrifuga e quelli necessari alla valutazione della microstruttura del prodotto (test di swelling e analisi SEM). Infine, saranno valutati i risultati relativi alla composizione chimica dello scaffold, ottenuti tramite analisi termogravimetrica e analisi spettrometrica di emissione su plasma.

3.1 STANDARDIZZAZIONE PROCESSO DI PRODUZIONE SCAFFOLD: STEP LAVAGGI

La standardizzazione della fase dei lavaggi inerente al processo di produzione dello scaffold, ha permesso di fornire risultati promettenti nell'utilizzo di un processo automatico di filtrazione tale da limitare al minimo l'intervento dell'operatore e garantire una riproducibilità del processo influente sulle caratteristiche del prodotto finale. Riportiamo di seguito i risultati ottenuti dai diversi test.

3.1.1 TEST CON PH FISSO PER DIFFERENTI VELOCITA' DI CENTRIFUGAZIONE

Questo test è stato eseguito confrontando l'effetto delle diverse velocità di centrifugazione (2000, 4500 e 6000 RPM) sui parametri in output, cioè la resa e la percentuale di acqua presente nel prodotto (H₂O wt%), a partire da collagene precipitato a pH 5,5. In **Tabella 3.2** sono riportati i risultati del test.

RPM	RESA (%)	MEDIA ± DS H ₂ O wt%
2000	91%	97% ± 0,71%
4500	93%	95% ± 0,89%
6000	85%	94% ± 0,38%

Tabella 3.2: confronto risultati relativi al test con pH fisso per differenti velocità di centrifugazione

Dall'analisi statistica (ANOVA) eseguita sulla percentuale di acqua contenuta nei campioni, risulta che la differenza delle condizioni è statisticamente significativa ($p\text{-value} < 0,05$). Dalla tabella, si osserva un valore di resa maggiore relativo alla velocità di centrifugazione pari a 4500 RPM. Test eseguiti utilizzando 2000 RPM come velocità di centrifugazione, hanno evidenziato una separazione non ottimale del collagene dall'acqua filtrata. Infine, utilizzando la velocità di centrifugazione pari a 6000 RPM, si è ottenuto il valore di resa più basso tra le varie condizioni, giustificato dalla presenza di diverse fibre di collagene in sospensione e da perdite di materiale presenti sulle pareti della falcon (**Figura 3.40**). Dai risultati sulla resa è stata fissata, pertanto, la velocità di centrifugazione pari a 4500 RPM per l'esecuzione dei test successivi.

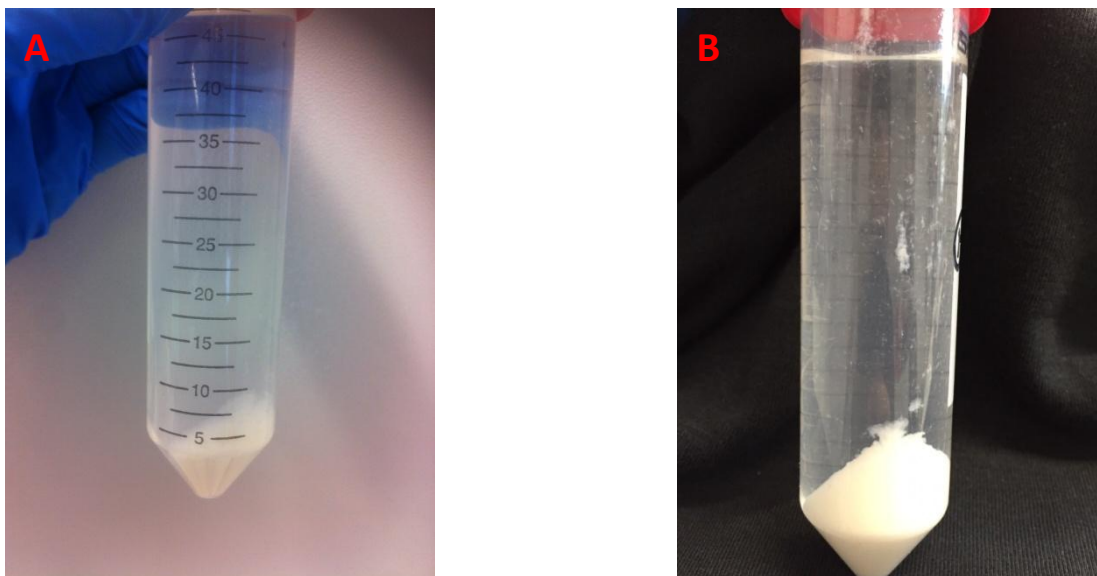


Figura 3.40: confronto test centrifuga eseguito a 4500 RPM (A) e a 6000 RPM (B).

3.1.2 TEST CON VELOCITA' DI CENTRIFUGAZIONE FISSA PER DIVERSI PH

Questo test è stato eseguito confrontando l'effetto dei due valori di pH (5,5 e 6,5) sui parametri in output, cioè la resa e la percentuale di acqua presente nel prodotto (H_2O wt%), fissando come velocità di centrifugazione quella risultata ottimale dal test precedente (4500 RPM). In **Tabella 3.3** sono riportati i risultati del test.

pH	RESA (%)	MEDIA \pm DS H_2O wt%
5,5	93%	95% \pm 0,89%
6,5	99%	95% \pm 0,22%

Tabella 3.3: confronto risultati relativi al test con velocità di centrifugazione fissa per diversi valori di pH

Dall'analisi statistica (t-test) eseguita sulla percentuale di acqua contenuta nei campioni, risulta che la differenza delle condizioni è statisticamente significativa ($p\text{-value} < 0,05$). Dalla tabella, si osserva un valore di resa maggiore relativo al collagene precipitato a pH 6,5. Test eseguiti utilizzando collagene precipitato a pH 5,5 evidenziano un prodotto qualitativamente più omogeneo con un'alta presenza di fibre in sospensione a fine centrifuga. Mentre, collagene precipitato a pH 6,5 evidenzia una struttura più aggrovigliata (**Figura 3.41**) tale da trattenere un minor quantitativo d'acqua e garantire una separazione più efficiente del collagene dall'acqua filtrata, a fine centrifuga. Dai risultati sulla resa è stato fissato, quindi, un valore di pH pari a 6,5 per la precipitazione del collagene nei test successivi.

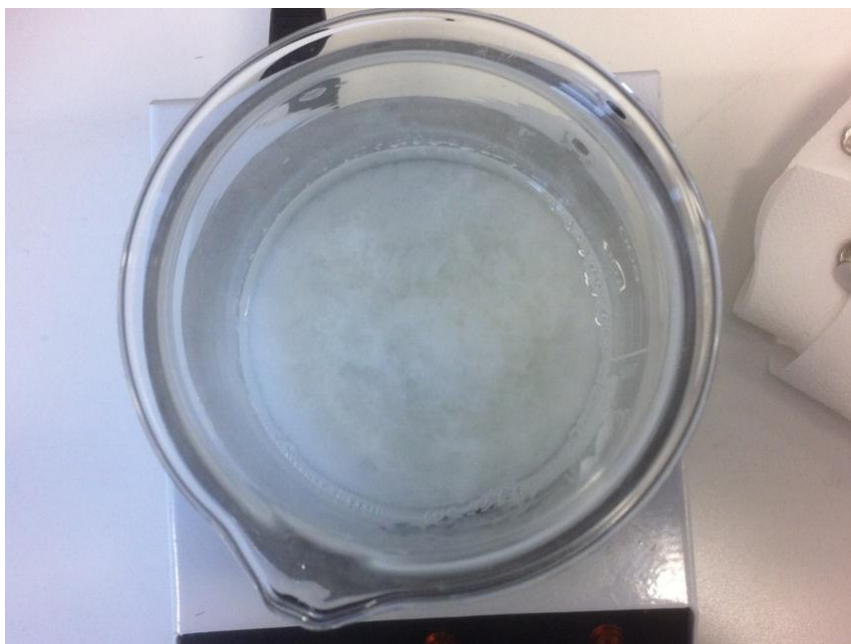


Figura 3.41: collagene precipitato a pH 6,5

3.1.3 TEST CON DIFFERENTI CONDIZIONI INIZIALI DI DILUIZIONE

Questo test è stato eseguito confrontando l'effetto delle tre condizioni di diluizione utilizzate (**0**: riferimento; **1**: 2/3 di collagene rispetto alla condizione 0; **2**: 1/3 di collagene rispetto alla condizione 0) sui parametri in output, cioè la resa e la percentuale di acqua presente nel prodotto (H_2O wt%), utilizzando come velocità di centrifugazione 4500 RPM e fissando come valore di pH, per la precipitazione del collagene, quello risultato ottimale dal test precedente (6,5). In **Tabella 4.3** sono riportati i risultati del test.

Condizione diluizione	RESA (%)	MEDIA \pm DS H_2O wt%
0	95%	96,93% \pm 0,81%
1	97%	98,37% \pm 0,79%
2	97%	99,9% \pm 0,01%

Tabella 4.3: confronto risultati relativi al test con differenti condizioni iniziali di diluizione

Dall'analisi statistica (ANOVA) eseguita sulla percentuale di acqua contenuta nei campioni, risulta che la differenza delle condizioni è statisticamente significativa (p -value $<$ 0,05). Dalla tabella, si osserva che non risulta una dipendenza rilevante della resa dalla condizione iniziale di diluizione. Si dimostra, invece, una dipendenza lineare ($R^2 >$ 0,99) tra la percentuale di acqua presente nel prodotto finale e la condizione di diluizione iniziale considerata. In particolare, più il composto di partenza risulta diluito, tanto più il prodotto finale conterrà un maggior quantitativo di acqua. Tale risultato evidenzia un aspetto molto importante specialmente in ambito produttivo poiché, una volta definita tale relazione, dalla conoscenza della diluizione di partenza, sarà possibile conoscere

a priori la percentuale di acqua presente nel composto finale, influente sulle caratteristiche del prodotto (ad esempio, la porosità).

3.1.4 TEST CON DIFFERENTI LOTTI DI COLLAGENE

Questo test è stato eseguito confrontando l'effetto della materia prima utilizzata (RS%⁵ di collagene del lotto specifico) sui parametri in output, cioè la resa e la percentuale di acqua presente nel prodotto (H₂O wt%), utilizzando gli stessi valori prefissati di pH e velocità di centrifugazione. In

Tabella 3.5 sono riportati i risultati del test.

RS (%)	RESA (%)	MEDIA ± DS H ₂ O wt%
1,11	98%	96% ± 0,5%
1,18	89%	97% ± 1,3%
1,20	88%	97% ± 1,2%

Tabella 3.5: confronto risultati relativi al test con differenti lotti di collagene

Dall'analisi statistica (ANOVA) eseguita sulla percentuale di acqua contenuta nei campioni, risulta che la differenza delle condizioni non è statisticamente significativa (p-value > 0,05). Dalla tabella, si evidenzia un andamento decrescente della resa con l'aumentare della concentrazione iniziale del collagene in gel. Tale risultato evidenzia un altro aspetto molto influente in ambito produttivo che necessita pertanto di ulteriori approfondimenti per una conferma dei risultati.

⁵ RS%: Residuo Secco percentuale

3.2 CARATTERIZZAZIONE CHIMICA E FISICA DELLO SCAFFOLD

Riportiamo di seguito i risultati dei test utilizzati per eseguire la caratterizzazione chimica e fisica dello scaffold necessaria per soddisfare le specifiche essenziali affinché il prodotto risulti idoneo per una successiva applicazione clinica.

3.2.1 TEST DI SWELLING

Dai risultati di questo test è stato possibile confrontare gli esiti delle quattro condizioni di liofilizzazione eseguite attraverso la valutazione della variazione geometrica e di peso dei campioni analizzati, considerando l'assorbimento di soluzione salina come misura indiretta della porosità.

La quantità di soluzione salina assorbita da ogni provino è stata valutata in base alla differenza di peso che si registra rispettivamente prima e dopo lo swelling. Sulla base di ciò, è stato valutato di seguito il rapporto tra la quantità di soluzione salina assorbita e la misura del peso bagnato di ogni provino, per tutte le condizioni di liofilizzazione considerate. Dai risultati, si osserva che tutti i campioni risultano idrofilici, in quanto swellano completamente entro un minuto ed estremamente porosi, poiché sono in grado di assorbire una quantità di soluzione salina notevole (**Tabella 3.6**). Dall'analisi statistica (ANOVA) eseguita sul rapporto della quantità di soluzione salina assorbita e la misura del peso bagnato di ogni provino, risulta che la differenza delle condizioni di liofilizzazione non è statisticamente significativa ($p\text{-value} > 0,05$).

Condizione di liofilizzazione	Tempo di swelling	Media \pm DS soluzione salina assorbita/peso provino bagnato dopo swelling (%)
Piastra teflonata con mylar sopra	~ 45''	85,4 \pm 2,7 %
Piastra teflonata senza mylar sopra	~ 45''	85,2 \pm 1,7 %
Mylar sopra e sotto	~ 45''	87,1 \pm 1,5 %
Piastra acciaio con mylar sopra	~ 45''	85 \pm 2,2%

Tabella 3.6: Confronto risultati test di swelling per provini liofilizzati secondo le diverse condizioni

La valutazione della variazione geometrica dei campioni analizzati è stata eseguita confrontando le altezze dei provini bagnati, dopo lo swelling, per le diverse condizioni di liofilizzazione considerate. Dai risultati, si osserva che tutti i campioni presentano altezze che rispettano le specifiche richieste ($0,6 \pm 0,1$ cm) per il prodotto (**Tabella 3.7**). Dall'analisi statistica (ANOVA) eseguita sulle altezze dei campioni bagnati, risulta che vi è differenza significativa (p -value $< 0,05$) tra i provini liofilizzati secondo le diverse condizioni.

Infine, è stata valutata la porosità dello scaffold (come rapporto tra il volume dei pori e il volume bagnato dopo lo swelling) confrontando gli esiti delle quattro condizioni di liofilizzazione considerate. Dall'analisi statistica (ANOVA) eseguita sulla porosità, risulta che non vi è differenza significativa (p -value $> 0,05$) tra i provini liofilizzati secondo le diverse condizioni. Si evidenzia una porosità media del $94 \pm 2,9$ %.

Condizione di liofilizzazione	Media \pm DS altezza campioni bagnati (mm)
Piastra teflonata con mylar sopra	3,29 \pm 0,25
Piastra teflonata senza mylar sopra	3,36 \pm 0,22
Mylar sopra e sotto	3,79 \pm 0,31
Piastra acciaio con mylar sopra	4,06 \pm 0,17

Tabella 3.7: confronto altezze campioni bagnati liofilizzati secondo le diverse condizioni

3.2.2 ANALISI MICROSCOPICA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM)

Dalla valutazione delle immagini ottenute tramite analisi SEM è stato possibile confrontare gli esiti delle quattro condizioni di liofilizzazione eseguite. In particolare, l'analisi si è incentrata sulla valutazione del grado di assottigliamento del legamento parodontale, definendo quale tra le quattro condizioni di liofilizzazione risultasse la più idonea per riprodurre le dimensioni del legamento parodontale *in vivo*. Lo spessore del legamento parodontale varia in relazione all'età dell'individuo (0,11-0,40 mm, con un valore medio di \sim 0,25 mm) [38]. L'analisi delle immagini SEM ha dimostrato che per tutte le condizioni di liofilizzazione si ottengono spessori del legamento parodontale riproducibili con le dimensioni fisiologiche *in vivo*, ma il grado di assottigliamento maggiore si ottiene utilizzando la condizione inerente a campioni liofilizzati su piastra teflonata con mylar sopra (**Tabella 3.8**). Dall'analisi statistica (ANOVA) eseguita sullo spessore del legamento parodontale, risulta che vi è differenza significativa (p-value $<$ 0,05) tra i campioni liofilizzati secondo le diverse condizioni.

CONDIZIONE DI LIOFILIZZAZIONE	MEDIA \pm DS SPESSORE LEGAMENTO PARODONTALE
Piastra teflonata con mylar sopra	0,15 \pm 0,02 mm
Piastra teflonata senza mylar sopra	0,19 \pm 0,02 mm
Mylar sopra e sotto	0,18 \pm 0,01 mm
Piastra acciaio con mylar sopra	0,23 \pm 0,03 mm

Tabella 3.8: Confronto spessore legamento parodontale dei campioni liofilizzati secondo le diverse condizioni

Nelle figure seguenti (**Figura 3.42**, **Figura 3.43**, **Figura 3.44**, **Figura 3.45**) sono mostrate le immagini SEM dei campioni liofilizzati secondo le diverse condizioni. In particolare, si nota la struttura del legamento parodontale (strato intermedio dello scaffold) come distribuzione di un fascio di fibre collageniche.



Figura 3.42: Immagine SEM campione liofilizzato su piastra teflonata con mylar sopra

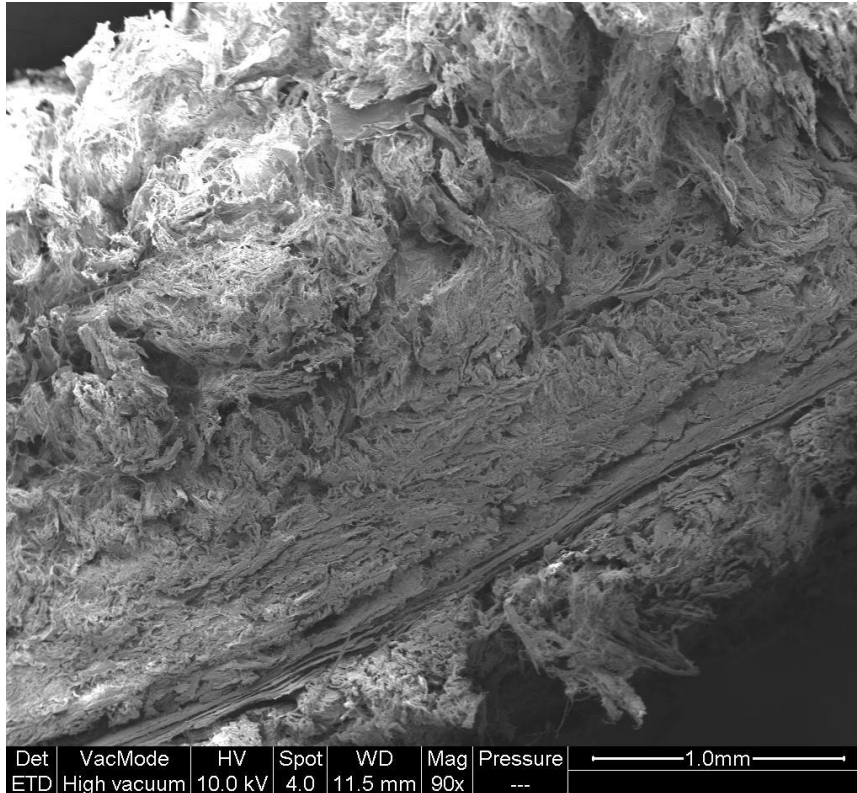


Figura 3.43: Immagine SEM campione liofilizzato su piastra teflonata senza mylar sopra

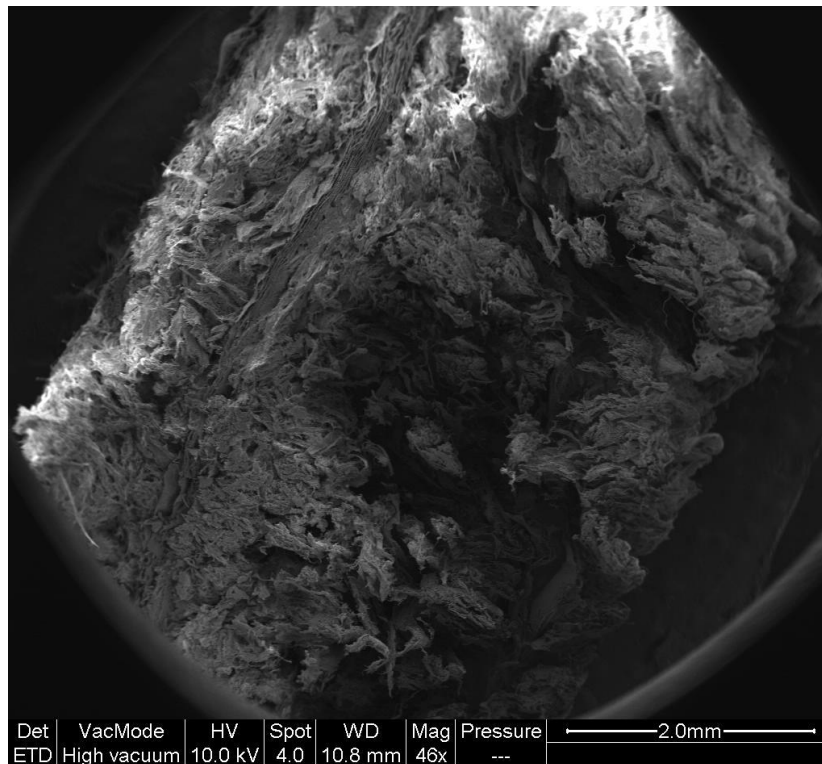


Figura 3.44: Immagine SEM campione liofilizzato su mylar con mylar sopra

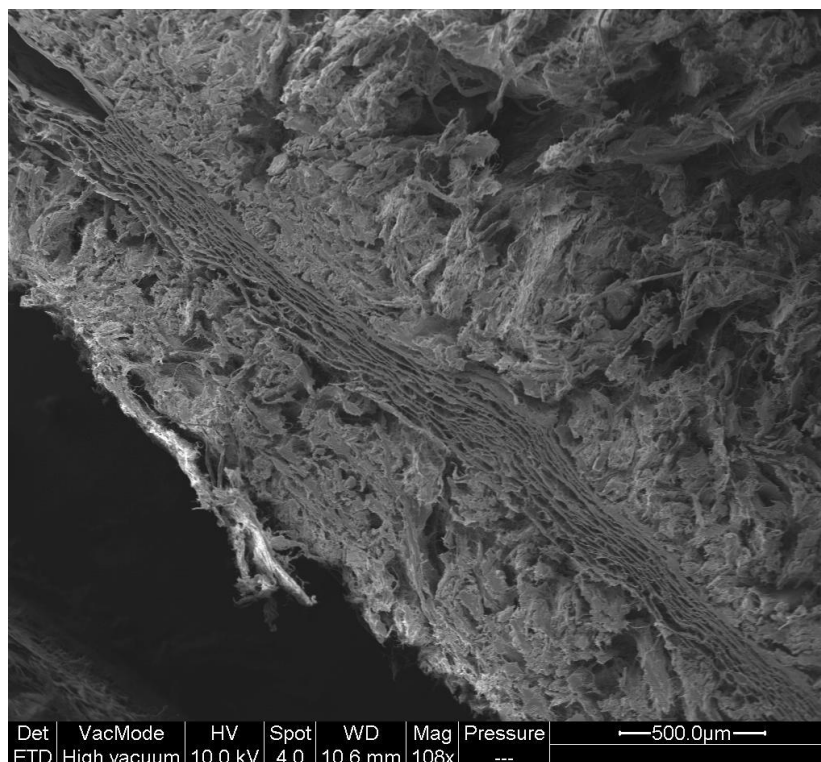


Figura 3.45: Immagine SEM campione liofilizzato su piastra acciaio con mylar sopra

L'ultima valutazione è stata eseguita considerando lo spessore totale dello scaffold (valore limite della specifica richiesto per il prodotto: 6 ± 1 mm). L'analisi delle immagini SEM ha dimostrato che per tutte le condizioni di liofilizzazione si ottengono valori di spessore dello scaffold in specifica (**Tabella 3.9**). Considerando gli spessori fisiologici del comparto parodontale, si ottiene il risultato migliore utilizzando la condizione inerente a campioni liofilizzati su piastra teflonata senza mylar sopra (**Figura 3.46**). Dall'analisi statistica (ANOVA) eseguita sullo spessore dell'intero scaffold, risulta che vi è differenza significativa ($p\text{-value} < 0,05$) tra i campioni liofilizzati secondo le diverse condizioni.

CONDIZIONE DI LIOFILIZZAZIONE	MEDIA ± DS SPESSORE SCAFFOLD
Piastra teflonata con mylar sopra	4,66 ± 0,13 mm
Piastra teflonata senza mylar sopra	3,30 ± 0,07 mm
Mylar sopra e sotto	4,41 ± 0,07 mm
Piastra acciaio con mylar sopra	4,17 ± 0,11 mm

Tabella 3.9: Confronto spessore scaffold di campioni liofilizzati secondo le diverse condizioni

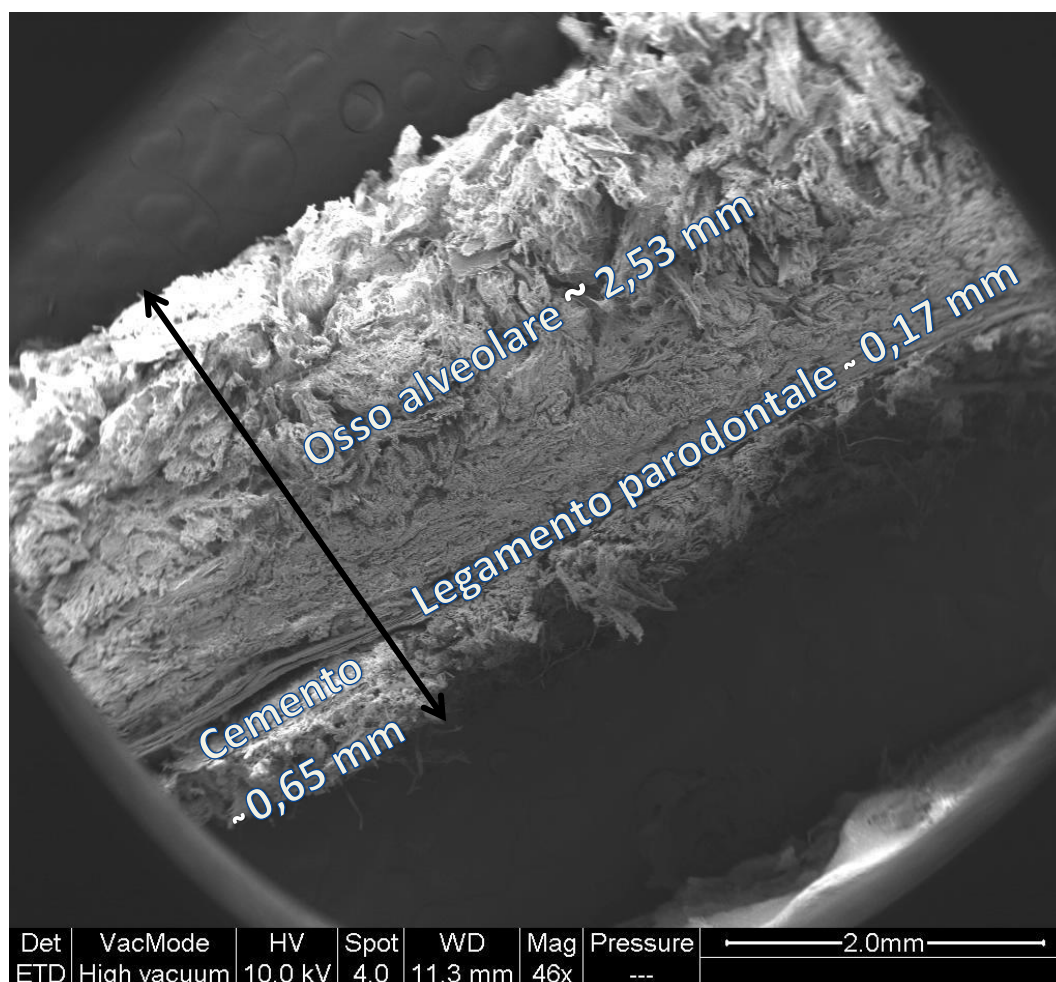


Figura 3.46: Immagine SEM campione liofilizzato su piastra teflonata senza mylar sopra

3.2.3 ANALISI TERMOGRAVIMETRICA (TGA)

Dai risultati dell'analisi termogravimetrica è stato possibile rilevare la percentuale di acqua e di residuo minerale presente nei campioni liofilizzati nelle diverse condizioni (Tabella 3.10). Si osserva che per tutte le condizioni di liofilizzazione si ottengono risultati entro i valori limite richiesti da specifica.

Parametri	Limiti da specifica	Condizione di liofilizzazione	Valore medio \pm deviazione standard
% acqua	≤ 16 %	Piastra teflonata con mylar sopra	$7,21 \pm 0,78$ %
		Piastra teflonata senza mylar sopra	$6,53 \pm 0,79$ %
		Mylar sopra e sotto	$6,19 \pm 0,12$ %
		Piastra acciaio con mylar sopra	$6,30 \pm 0,05$ %
% residuo minerale	30 ± 5 wt%	Piastra teflonata con mylar sopra	$26,64 \pm 0,70$ %
		Piastra teflonata senza mylar sopra	$27,93 \pm 1,73$ %
		Mylar sopra e sotto	$26,52 \pm 0,45$ %
		Piastra acciaio con mylar sopra	$27,16 \pm 0,34$ %

Tabella 3.10: confronto % acqua e % residuo minerale dei campioni liofilizzati nelle diverse condizioni

Dall'analisi statistica (ANOVA) eseguita sulla percentuale di acqua e di residuo minerale, risulta che non vi è differenza significativa ($p\text{-value} > 0,05$) tra i campioni liofilizzati secondo le diverse condizioni. In **Figura 3.47** si riportano le analisi termogravimetriche eseguite sui campioni.

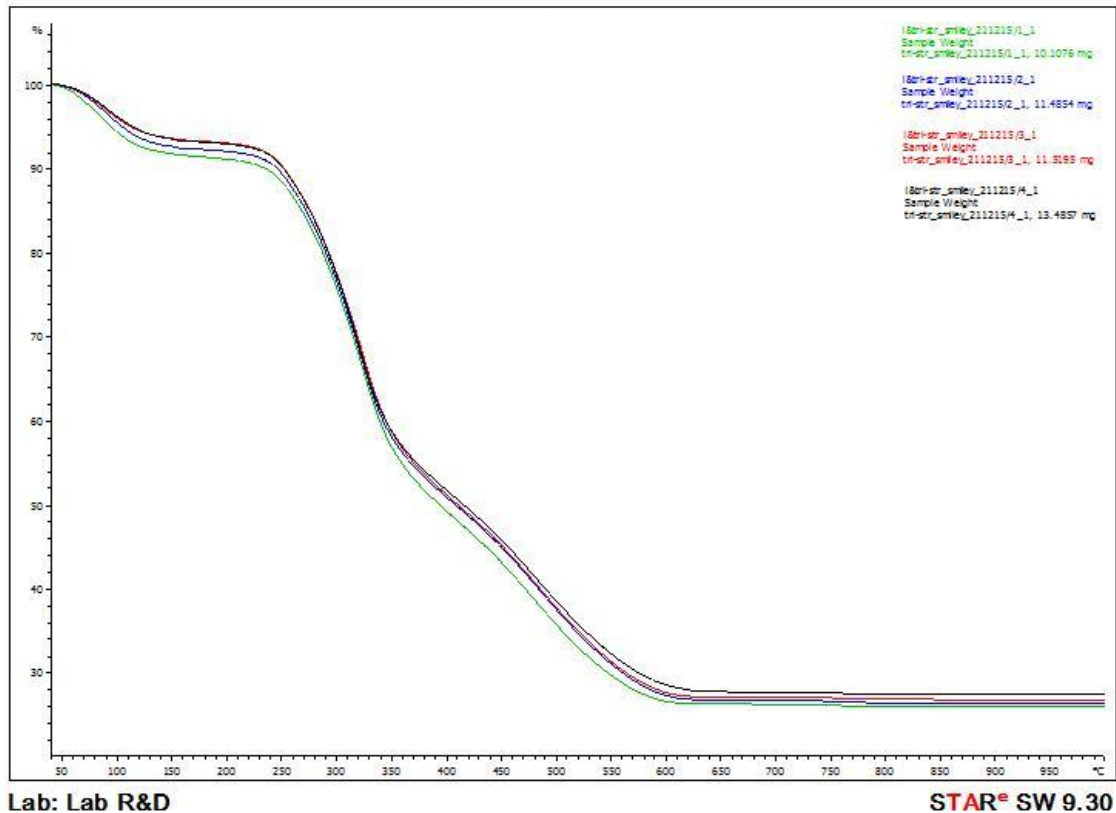


Figura 3.47: Confronto analisi termogravimetriche eseguite su campioni liofilizzati secondo le diverse condizioni

Per migliorare l'analisi inerente alla percentuale di minerale presente negli strati superiore e inferiore dello scaffold, è stata ripetuta la prova considerando separatamente i singoli strati. Dall'analisi statistica (ANOVA) eseguita sulla percentuale di acqua e di residuo minerale degli strati di cemento, risulta che vi è differenza significativa ($p\text{-value} < 0,05$) tra i campioni liofilizzati secondo le

diverse condizioni. In **Figura 3.48** si riportano le analisi termogravimetriche eseguite sugli strati di cemento.

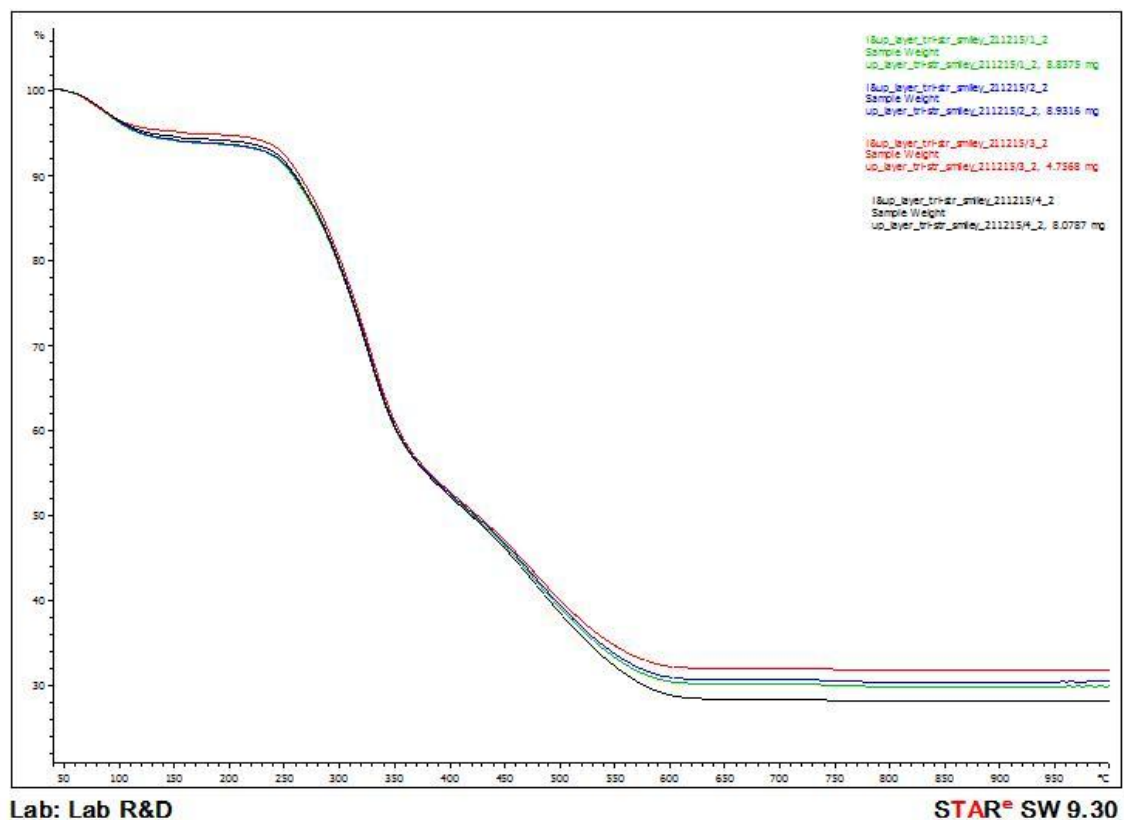


Figura 3.48: Confronto analisi termogravimetriche eseguite su strato di cemento di campioni liofilizzati secondo le diverse condizioni

Infine, dall'analisi statistica (ANOVA) eseguita sulla percentuale di acqua e di residuo minerale degli strati di osso alveolare, risulta che non vi è differenza significativa ($p\text{-value} > 0,05$) tra i campioni liofilizzati secondo le diverse condizioni. In **Figura 3.49** si riportano le analisi termogravimetriche eseguite sugli strati di osso alveolare.

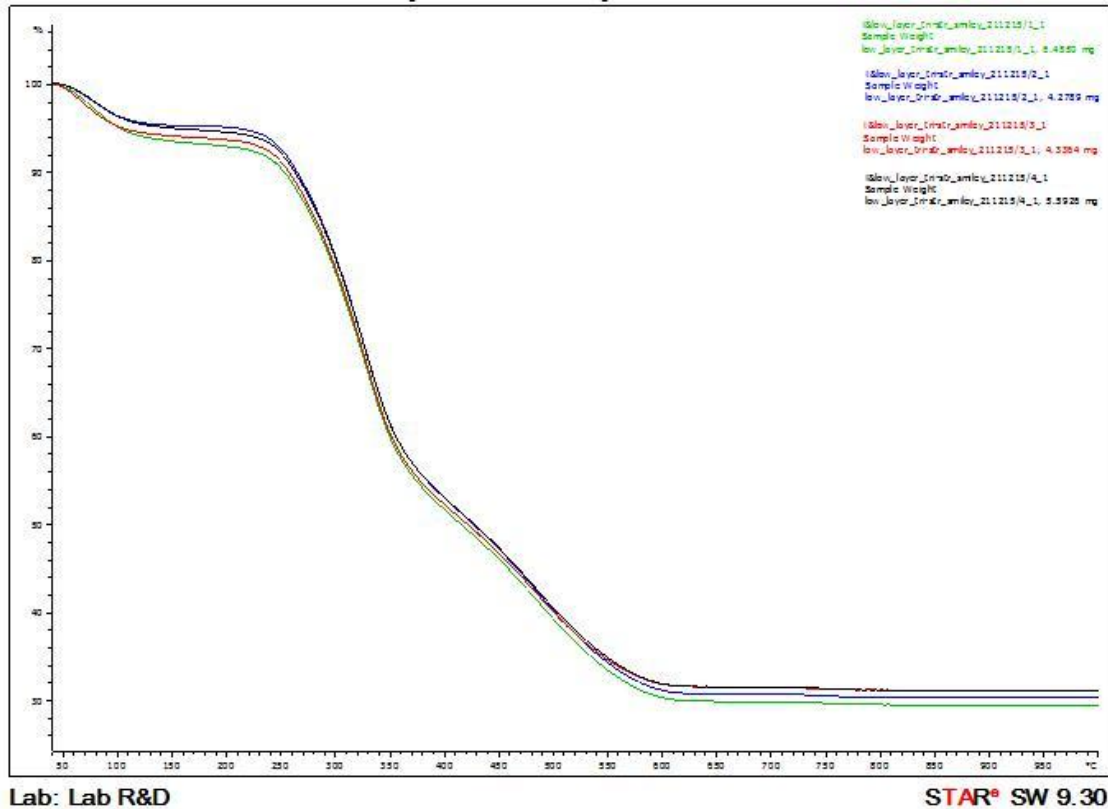


Figura 3.49: Confronto analisi termogravimetriche eseguite su strato di osso alveolare di campioni liofilizzati secondo le diverse condizioni

3.2.4 ANALISI SPETTROMETRICA DI EMISSIONE SU PLASMA (ICP)

Dai risultati di questa analisi è stato possibile valutare quantitativamente la concentrazione di Ca, Mg e P presenti negli strati mineralizzati dello scaffold. Una volta ottenuti tali risultati, sono stati calcolati di seguito i rapporti stechiometrici, confrontandoli con i limiti definiti da specifica (**Tabella 3.11**). Si osserva che per tutte le condizioni di liofilizzazione si ottengono risultati entro i valori limite richiesti da specifica.

Condizione di liofilizzazione	Strato analizzato	Risultati ottenuti		Valori da specifica
Piastra teflonata con mylar sopra	Strato di cemento	Ca/P	1,57	1,2 -1,7
		(Ca+Mg)/P	1,59	1,2 -1,7
		Mg/Ca %	0,72 %	0,4 – 2 %
	Strato di osso alveolare	Ca/P	1,54	1,2 -1,7
		(Ca+Mg)/P	1,56	1,2 -1,7
		Mg/Ca %	1,18%	0,4 – 2 %
Piastra teflonata senza mylar sopra	Strato di cemento	Ca/P	1,58	1,2 -1,7
		(Ca+Mg)/P	1,59	1,2 -1,7
		Mg/Ca %	0,77%	0,4 – 2 %
	Strato di osso alveolare	Ca/P	1,53	1,2 -1,7
		(Ca+Mg)/P	1,55	1,2 -1,7
		Mg/Ca %	1,06%	0,4 – 2 %
Mylar sopra e sotto	Strato di cemento	Ca/P	1,55	1,2 -1,7
		(Ca+Mg)/P	1,57	1,2 -1,7
		Mg/Ca %	0,85%	0,4 – 2 %
	Strato di osso alveolare	Ca/P	1,53	1,2 -1,7
		(Ca+Mg)/P	1,55	1,2 -1,7
		Mg/Ca %	0,94%	0,4 – 2 %
Piastra acciaio con mylar sopra	Strato di cemento	Ca/P	1,56	1,2 -1,7
		(Ca+Mg)/P	1,58	1,2 -1,7
		Mg/Ca %	0,71%	0,4 – 2 %
	Strato di osso alveolare	Ca/P	1,52	1,2 -1,7
		(Ca+Mg)/P	1,53	1,2 -1,7
		Mg/Ca %	1,03%	0,4 – 2 %

Tabella 3.11: Risultati analisi ICP strati mineralizzati di campioni liofilizzati secondo le diverse condizioni

CAPITOLO 4:

CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

L'attività di ricerca condotta in questo lavoro di tesi ha evidenziato alcune tematiche essenziali per la realizzazione di un prototipo tri-strato utilizzato come approccio rigenerativo per il trattamento delle parodontiti avanzate.

Sulla base dei risultati ottenuti, inerenti sia al processo di produzione dello scaffold, sia alla caratterizzazione chimica e fisica del prodotto, possiamo trarre le seguenti conclusioni:

1. La standardizzazione della fase dei lavaggi inerente al processo di produzione dello scaffold ha fornito risultati promettenti nell'utilizzo di un processo automatico di filtrazione tramite centrifuga tale da limitare al minimo l'intervento dell'operatore e garantire una riproducibilità del processo su larga scala, riducendo gli scarti;
2. La definizione di una relazione lineare tra la percentuale di acqua presente nel prodotto finale e la condizione di diluizione iniziale ha evidenziato un aspetto molto critico in ambito produttivo da utilizzare come parametro di controllo per influire sulle caratteristiche finali del prodotto;
3. La dipendenza della resa dalla materia prima utilizzata ha accentuato un altro aspetto molto influente in ambito produttivo da approfondire con ulteriori test per eseguire una valutazione più accurata. In particolare, si è

evidenziato un andamento decrescente della resa con l'aumentare della concentrazione iniziale del collagene in gel;

4. La realizzazione dello scaffold ha previsto la sovrapposizione di tre strati che mimano l'anatomia del comparto parodontale, costituito rispettivamente da: osso alveolare, legamento parodontale e cemento. Sono state eseguite quattro diverse condizioni di liofilizzazione per la valutazione, in particolare, del grado di assottigliamento del legamento parodontale. In particolare, si è osservato che in tutte le condizioni di liofilizzazione sono stati ottenuti spessori del legamento parodontale riproducibili con le dimensioni fisiologiche *in vivo*. Il grado di assottigliamento maggiore è stato ottenuto utilizzando la condizione inerente a campioni liofilizzati su piastra teflonata con mylar sopra. Quest'ultima condizione è risultata, quindi, preferibile per ridurre l'ingombro del prodotto nel sito d'impianto ma sarà necessaria una caratterizzazione cellulare *in vitro* per la valutazione della capacità funzionale dello scaffold;
5. La valutazione dello spessore totale dello scaffold, eseguita tramite analisi SEM, ha presentato valori idonei (entro i limiti definiti da specifica: 6 ± 1 mm) per tutte le condizioni di liofilizzazione considerate. Considerando gli spessori fisiologici del comparto parodontale, si ottiene però il risultato migliore utilizzando la condizione inerente a campioni liofilizzati su piastra teflonata senza mylar sopra;
6. Il prodotto realizzato ha denotato una porosità media del $94 \pm 2,9$ % oltre che un'elevata idrofilicità;

7. La valutazione della percentuale di acqua presente nello scaffold, eseguita tramite analisi termogravimetrica, ha presentato valori in specifica ($\leq 16\%$) per tutte le condizioni di liofilizzazione considerate;

8. La valutazione della percentuale di residuo minerale (eseguita tramite analisi termogravimetrica) e la valutazione quantitativa dei rapporti stechiometrici di Ca, Mg e P (eseguita tramite analisi spettrometrica di emissione su plasma) negli strati mineralizzati dello scaffold, ha evidenziato valori in specifica (rispettivamente: % residuo minerale 30 ± 5 wt% ; Ca/P: 1,2-1,7; (Ca+Mg)/P: 1,2-1,7; Mg/Ca %: 0,4-2%) per tutte le condizioni di liofilizzazione considerate.

La caratterizzazione chimica e fisica del prototipo realizzato risulta quindi promettente come approccio rigenerativo per il trattamento delle parodontiti avanzate poiché è in grado di riprodurre sia dal punto di vista strutturale, sia dal punto di vista chimico, le caratteristiche del comparto parodontale.

Nonostante i numerosi aspetti valutati in questo lavoro di tesi, sarà necessario approfondire ulteriormente l'attività di ricerca e sviluppo sul prodotto finale. In particolare, si dovrà:

- valutare il tempo di degradazione dello scaffold al fine di definire la permanenza *in situ* del prodotto dopo l'impianto;

- definire una possibilità di taglio del prodotto al fine di ottenere campioni di diverse dimensioni, adatte al sito d'impianto.

Dal punto di vista del processo di produzione dello scaffold, si dovrà:

- introdurre il processo automatico di filtrazione tramite centrifuga tale da garantire una riproducibilità del processo e uno sviluppo su larga scala;
- eseguire ulteriori test tali da definire una relazione precisa tra la percentuale di acqua presente nel semilavorato (prima della fase di liofilizzazione) e la condizione di diluizione iniziale. In tal modo sarà possibile tenere sotto controllo le caratteristiche finali del prodotto, quali la porosità;
- approfondire mediante ulteriori test la dipendenza della resa del prodotto finale dalla materia prima utilizzata in modo da ridurre la variabilità e ottimizzare il processo produttivo.

Sarà necessaria inoltre una caratterizzazione cellulare in vitro per valutare la citotossicità e la capacità proliferativa dello scaffold realizzato.

Un'ulteriore caratterizzazione funzionale dello scaffold sarà possibile attraverso l'utilizzo di specifiche molecole bioattive capaci di stimolare vari tipi di cellule coinvolte nel processo di rigenerazione parodontale.

Una valutazione preclinica dello scaffold in termini di rigenerazione parodontale e progressivo bio-riassorbimento sarà possibile solo attraverso test eseguiti inizialmente su modelli animali al fine di progettare protocolli sempre più sicuri ed efficaci da applicare successivamente sull'uomo.

BIBLIOGRAFIA

- ❖ [1] J.K. Avery. *Oral Development and Histology*. Thieme, New York, 2002;
- ❖ [2] J.A. Weatherell, *Composition of Dental Enamel*, Oxford Journals, Vol. 31 No 2 (1975), pp. 115-119;
- ❖ [3] S. Habelitz, S.J. Marshall, G.W. Marshall Jr, M. Balooch, *Mechanical properties of human dental enamel on the nanometer scale*, Archives of Oral Biology Vol. 46 (2001), pp. 173–183;
- ❖ [4] M. Goldberg, A. B. Kulkarni, M. Young, A. Boskey, *Dentin: Structure, Composition and Mineralization. The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization*, Front Biosci (Elite Ed), Vol. 3 (January 2011), pp. 711-735;
- ❖ [5] P. F. Goncalves, E. A. Sallum, A.W. Sallum, M.Z. Casati, Sergio de Toledo, F. Humberto Nociti Junior, *Dental cementum reviewed: development, structure, composition, regeneration and potential functions*, Braz J Oral Sci, Vol. 4 No 12 (2005);
- ❖ [6] A. Linde, *The extracellular matrix of the dental pulp and dentin*, Journal of Dental Research, Vol. 64 (1985), pp. 523-529;
- ❖ [7] Antonio Nanci & Dieter D. Bosshardt, *Structure of periodontal tissues in health and disease*, Periodontology 2000, Vol. 40 (2006), pp. 11-28;

- ❖ [8] Ray C. Williams, *Periodontal Disease*, New England Journal of Medicine, Vol. 322 No 6 (1990);
- ❖ [9] John W. Stamm, *Epidemiology of gingivitis*, Journal of Clinical Periodontology, Vol. 13 No 5 (1986), pp. 360-366;
- ❖ [10] Savage Amir, Eaton KA, Moles DR, Needleman I., *A systematic review of definitions of periodontitis and methods that have been used to identify this disease*, Journal of Clinical Periodontology, Vol. 36 (2009), pp. 458-467;
- ❖ [11] Borrell LN, Papapanou PN, *Analytical epidemiology of periodontitis*, Journal of Clinical Periodontology, Vol. 32 (2005), pp. 132-158;
- ❖ [12] Colin B. Wiebe, Edward E. Putnins, *The Periodontal Disease Classification System of the American Academy of Periodontology – An Update*, J Can Dent Assoc, Vol. 7 (2000), pp.66-594;
- ❖ [13] A. Sculean, S. Aroca-Sotelo, Robert R. Azzi, W. Bolz, *Periodontal Regenerative Therapy*, Quintessence Publishing (2010);
- ❖ [14] Panos N. Papapanou and Maurizio S. Tonetti, *Diagnosis and epidemiology of periodontal osseous lesions*, Periodontology 2000, Vol. 22 No 1 (2000), pp. 8-21;
- ❖ [15] Ray Croucher, Wagner Segura Marcenes, Maria Cynesia M.B. Torres, Francis Hughes, Aubrey Sheiham, *The relationship between life-events and periodontitis. A case-control study*, Journal of Clinical Periodontology, Vol. 24 No 1 (1997), pp. 39-43;
- ❖ [16] Quaderni del Ministero della Salute, *Odontoiatria di comunità: criteri di appropriatezza clinica, tecnologica e strutturale*, (2011);

- ❖ [17] Nikolaos Donos, Lars Laurell and Nikolaos Mardas, *Hierarchical decisions on teeth vs. implants in the periodontitis-susceptible patient: the modern dilemma*, Periodontology 2000 Vol. 59 No 1 (2012), pp. 89-110;
- ❖ [18] N.U. Zitzmann, G. Krastl, H. Hecker, C. Walter and R. Weiger, *Endodontics or implants? A review of decisive criteria and guidelines for single tooth restorations and full arch reconstructions*, International Endodontic Journal, Vol. 42 No 9 (2009), pp. 757-774;
- ❖ [19] Pierpaolo Cortellini, Gabrielle Stalpers, Aniello Mollo, Maurizio S. Tonetti, *Periodontal regeneration versus extraction and prosthetic replacement of teeth severely compromised by attachment loss to the apex: 5-year results of an ongoing randomized clinical trial*, Journal of Clinical Periodontology, Vol. 38 No 10 (2011), pp. 915-924;
- ❖ [20] Fa-Ming Chen and Yan Jin, *Periodontal Tissue Engineering and Regeneration: Current Approaches and Expanding Opportunities*, Tissue Engineering Part B, Vol. 16 (2010), pp. 219-255;
- ❖ [21] Simion M., Dahlin C., Trisi P., Piattelli A., *Qualitative and quantitative comparative study on different filling materials used in bone tissue regeneration: a controlled clinical study*, Journal Article, Vol. 14 (1994), pp. 198-215;
- ❖ [22] Li Shue, Zhang Yufeng and Ullas Mony, *Biomaterials for periodontal regeneration. A review of ceramics and polymers*, Landes Bioscience, Vol. 2 No 4 (2012), pp. 271-277;

- ❖ [23] Zitzmann NU, Naef R, Scharer P., *Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration*, The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, Vol. 12 (1997), pp. 844-852;

- ❖ [24] J. Maycock, S.R. Wood, S.J. Brookes, R.C. Shore, C. Robinson & J. Kirkham, *Characterization of a Procine Amelogenin Preparation, EMADOGAIN, a Biological Treatment for Periodontal Disease*, Connective Tissue Research, Vol. 43 (2002), pp. 472-476;

- ❖ [25] W.V. Giannobile, *Periodontal Tissue Engineering by Growth Factors*, Department of Periodontology, Vol. 19 No 1 (1996);

- ❖ [26] Shelley R. Winn, Yunhua HU, Charles Sfeir, Jeffrey O Hollinger, *Gene therapy approaches for modulating bone regeneration*, Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 42 (2000), pp. 121-138;

- ❖ [27] M. Taba Jr, Q. Jin, J.V. Sugai, W.V. Giannobile, *Current concepts in periodontal bioengineering*, Orthod Craniofacial, Vol. 8 (2005), pp. 292-302;

- ❖ [28] Hidetoshi Shimauchi, Eiji Nemoto, Hiroshi Ishihata, Masatsugu Shimomura, *Possible functional scaffolds for periodontal regeneration*, Japanese Dental Science Review, Vol. 49 (2013), pp. 118-130;

- ❖ [29] Vassilis Karageorgiou, David Kaplan, *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis*, Biomaterials, Vol. 26, (2005), pp. 5474-5491;

- ❖ [30] Sang-Hoon Rhee, Jae Do Lee, Junzo Tanaka, *Nucleation of Hydroxyapatite Crystal through Chemical Interaction with Collagen*, Journal of the American Ceramic Society, Vol. 83 No 11 (2000), pp. 2890 -2892;

- ❖ [31] Li Buay Koh, Mohammad Mirazul Islam, Debbie Mitra, Cristopher W. Noel, Kimberley Merrett, Silvia Odorcic, Per Fagerholm, William. Bruce Jackson, Bo Liedberg, Jaywant Phopase and May Griffith, *Epoxy Cross-Linked Collagen and Collagen-Laminin Peptide Hydrogels as Corneal Substitutes*, J. Funct. Biomater., Vol. 4 (2013), pp. 162-177;

- ❖ [32] Alan P. Mackenzie, *Factors affecting the mechanism of transformation of ice into water vapor in the freeze-drying process*, Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 125 (1965), pp. 522-547;

- ❖ [33] W. Wilson, C.C. Van Donkelaar, J. M. Huyghe, *A comparison between Mechano-Electrochemical and Biphasic Swelling Theories for soft Hydrated Tissues*, Journal of Biomechanical Engineering, Vol. 127 (2005);

- ❖ [34] Joseph I. Goldstein, Dale E. Newbury, Patrick Echlin, David C. Joy, A.D. Roming, Jr. and Eric Lifshin, *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, Plenum Press New York (1992);

- ❖ [35] L. Reimer and C. Tollkamp, *Measuring the backscattering coefficient and secondary electron yield inside a scanning electron microscope*, The Journal of Scanning Microscopies, Vol. 3 No 1 (1980), pp. 35-39;

- ❖ [36] A. Broido, *A simple, sensitive graphical method of treating thermogravimetric analysis data*, Journal of Polymer Science, Vol. 7 No 10 (1969), pp. 1761–1773;

- ❖ [37] Montaser A., Golightly D.W., *Inductively coupled plasmas in analytical atomic spectrometry*, VCH Publishers New York (1987);

- ❖ [38] Wouter Beertsen, Christopher A.G. McCulloch & Jaroslav Sodek, *The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue*, *Periodontology 2000*, Vol. 13 (1997), pp. 20–40.

RINGRAZIAMENTI

Finalmente giungo per la seconda volta a scrivere i ringraziamenti della mia tesi, forse ancora più emozionata rispetto alla prima volta.

Colgo l'occasione per ringraziare il mio relatore, il prof. Luca Cristofolini, per i suoi consigli, la sua disponibilità e per avermi dato la possibilità di svolgere questo lavoro di tesi.

Ringrazio l'Ing. Elisa Figallo per avermi seguita accuratamente nel corso di questi mesi, per avermi aiutata a maturare professionalmente e soprattutto per la disponibilità e la pazienza che ha sempre mostrato in questo periodo.

Ringrazio l'Ing. Claudia Fabbi per la sua disponibilità nel rendermi partecipe alle numerose attività svolte all'interno dell'Azienda, seguendomi e trovando sempre la parola giusta per chiarire ogni mio dubbio.

Un ringraziamento speciale va a miei genitori per essere stati sempre presenti in ogni momento, dimostrandomi che la distanza è solo una questione di chilometri e facendomi sentire "a casa" semplicemente con una chiamata, un messaggio o una risata. Grazie per avermi sostenuto, per la pazienza nell'avermi sopportato, per la fiducia datami, per esser stati sempre pronti con la valigia in mano ad accompagnarmi dappertutto e soprattutto per avermi cresciuta con così tanto amore.

Ringrazio mia nonna Marisa per aver condiviso con lei tutti questi anni universitari, dandomi un grosso sostegno e aiutandomi con tanto amore in tutto ciò che le era possibile. Grazie nonna per ogni chiacchierata e sorriso condiviso e per avermi insegnato come la convivenza, nonostante la differenza d'età e con il rispetto altrui, possa diventare un'esperienza stupenda.

Ringrazio tutta la mia pazza famiglia latinense (i miei zii, Laura, Fabio e il piccolo Alessio, Paolo, Marialisa, Luigi e Marchetto) per lo spirito e l'iniziativa nell'affrontare ogni situazione, per ogni risata condivisa, seppur solo

telefonicamente e per aver condiviso ogni momento importante della mia vita. Un ringraziamento speciale va alla mia zia avventuriera (Cucca) per il suo modo di vivere unico e umoristico che ci ha accompagnato in ogni momento o viaggio trascorso insieme e che spero ci accompagnerà per tante altre nuove avventure.

Ringrazio tutta la mia famiglia romagnola (i miei zii, Claudio, Giacomo, Gabriele) e toscana (mia nonna Maria, tutti i miei zii e cugini) per aver condiviso dei momenti indimenticabili durante le riunioni di tutti i familiari e per avermi fatto capire quanto sia importante, semplicemente con un sorriso, sentirsi in famiglia.

Grazie a mio cugino Stefano (ormai lo considero trentino acquisito), a Tatiana e al piccolo Samuele, per avermi fatto sentire il loro sostegno nonostante i rari momenti trascorsi insieme e per ogni chiacchierata sia sportiva, sia filosofica, sia semplicemente di vita.

Un ringraziamento speciale va alla mia migliore amica Chiara che mi è stata vicina in ogni momento, seppur a 400 km di distanza, condividendo tutto di me e della mia vita. Grazie per ogni tua parola di conforto, per le lunghe chiacchierate al telefono, per le nostre avventure stupende, per ogni lacrima, pazzia e risata condivisa e per esser sempre stata l'amica di sempre.

Grazie a tutti i miei amici di Latina, quelli di sempre e quelli nuovi, ai *runners* latinensi, romani e ciociari, per avermi fatto vivere spensieratamente ogni momento condiviso, con il sorriso e la gioia di vivere.

Grazie ai miei amici romagnoli ed emiliani, i vecchi amici della triennale e quelli nuovi, per essermi stati sempre vicini, nonostante le mie mille idee, spesso anche fuori dal normale, e per aver trascorso con me momenti fantastici e indimenticabili, colmi di sorrisi e soprattutto di pazzie. Un ringraziamento speciale va alla Licia e Marco, per essermi stati sempre affianco in questi anni e per avermi fatto sentire veramente me stessa.

Grazie ad Alessandra, una scoperta per questi mesi intensi di tirocinio, una vera amica colma di gioia di vivere e di sorrisi, capace di trasmettere la sua carica e

forza in ogni momento. Grazie per avermi sostenuto in questi mesi, per le nostre risate e avventure e per avermi fatto trascorrere un'estate indimenticabile.

Grazie ad Andrea, per la pazienza nell'avermi sopportato in questi anni, per il suo sostegno e per ogni esperienza condivisa, ma soprattutto per le lunghe chiacchierate fino a notte inoltrata.

Ringrazio il mio gruppo sportivo di Forlì, per aver condiviso con me questa passione (la corsa) nonostante i mille problemi e dolori, per essermi stati sempre di fianco, sostenendomi nel momento del bisogno, per avermi dato la giusta carica per credere in me stessa e per avermi fatto rinascere come non avrei mai creduto.

Infine, ringrazio me stessa, per aver compreso che la vita deve essere vissuta e non pensata e che non esiste mai meta così tanto alta per ciò che si desidera.