



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE  
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

**BIOMATERIALI  
PER LA RIGENERAZIONE  
RETINICA**

**Relatore: Prof. Andrea Bagno**

**Laureanda: Annalisa Peraro**

**ANNO ACCADEMICO 2022– 2023**

**Data di laurea: 21 Novembre 2023**



## Indice

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Indice delle abbreviazioni</b> .....                              | <b>6</b>  |
| <b>Abstract</b> .....  | <b>8</b>  |
| <b>Introduzione</b> .....  | <b>9</b>  |
| <b>1.1 L'occhio</b> .....  | <b>9</b>  |
| 1.1.1 <i>Struttura e composizione</i> .....                          | 9         |
| 1.1.2 <i>Formazione dell'immagine</i> .....                          | 10        |
| <b>1.2 La retina</b> .....   | <b>10</b> |
| 1.2.1 <i>Componente epiteliale</i> .....                             | 11        |
| 1.2.2 <i>Componente neurale</i> .....                                | 11        |
| <b>1.3 Degenerazione della retina: alcune cause e malattie</b> ..... | <b>12</b> |
| 1.3.1 <i>Glaucoma</i> .....  | 13        |
| 1.3.2 <i>Degenerazione maculare senile</i> .....                     | 13        |
| 1.3.3 <i>Retinopatia diabetica</i> .....                             | 14        |
| 1.3.4 <i>Retinite pigmentosa</i> .....                               | 14        |
| <b>1.4 Approcci terapeutici</b> .....                                | <b>14</b> |
| 1.4.1 <i>Trattamenti in uso</i> .....                                | 14        |
| 1.4.2 <i>Terapia genica: cenni</i> .....                             | 15        |
| 1.4.3 <i>Terapia cellulare: cellule staminali</i> .....              | 16        |
| 1.4.4 <i>L'importanza degli scaffold</i> .....                       | 17        |
| <b>Capitolo 2: L'ingegneria tissutale</b> .....                      | <b>19</b> |
| <b>2.1 Introduzione</b> .....  | <b>19</b> |
| <b>2.2 scaffold: proprietà e classificazione</b> .....               | <b>20</b> |
| 2.2.1 <i>Proprietà</i> .....   | 21        |
| 2.2.2 <i>Classificazione dei materiali</i> .....                     | 22        |
| 2.2.2.1 <i>Polimeri naturali</i> .....                               | 23        |
| 2.2.2.2 <i>Polimeri sintetici</i> .....                              | 23        |
| 2.2.2.3 <i>Materiali ibridi</i> .....                                | 23        |
| 2.2.2.4 <i>Polimeri termoresponsivi</i> .....                        | 24        |
| 2.2.2.5 <i>Idrogel</i> .....   | 24        |
| 2.2.2.6 <i>Membrane biologiche</i> .....                             | 25        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>2.3 Metodi di fabbricazione .....</b>                           | <b>26</b> |
| 2.3.1 Solvent casting/particle leaching (SC/PL) .....              | 26        |
| 2.3.2 Thermally induced phase separation (TIPS) .....              | 27        |
| 2.3.3 Self assembly .....  | 27        |
| 2.3.4 Freeze-drying .....  | 28        |
| 2.3.5 Gas foaming .....  | 28        |
| 2.3.6 Elettrospinning .....  | 29        |
| 2.3.7 3D printing .....  | 30        |
| <b>2.4 Nanotecnologie .....</b>                                    | <b>31</b> |
| <b>Capitolo 3: casi di studio .....</b>                            | <b>34</b> |
| <b>3.1 Idrogel alginato-aurina .....</b>                           | <b>34</b> |
| 3.1.1 Analisi in vitro .....                                       | 34        |
| 3.1.2 Analisi in vivo .....  | 37        |
| <b>3.2 Membrana in parilene .....</b>                              | <b>38</b> |
| 3.2.1 Analisi del paziente 125 .....                               | 39        |
| <b>3.3 Cerotto in PET ricoperto con vitronectina .....</b>         | <b>41</b> |
| 3.3.1 Studio in vivo sui suini .....                               | 42        |
| 3.3.2 Sopravvivenza del tessuto RPE nei soggetti umani 1 e 2 ..... | 43        |
| 3.3.3 Capacità visive migliorate nei soggetti umani 1 e 2 .....    | 44        |
| 3.3.4 Problemi e considerazioni .....                              | 46        |
| <b>Capitolo 4: 3D Bioprinting .....</b>                            | <b>47</b> |
| <b>4.1 Introduzione .....</b>                                      | <b>47</b> |
| <b>4.2 Tecniche di fabbricazione .....</b>                         | <b>47</b> |
| 4.2.1 Bioprinting basato su VP .....                               | 48        |
| 4.2.1.1 Stereolitografia .....                                     | 48        |
| 4.2.1.2 Digital Light Processing .....                             | 49        |
| 4.2.1.3 Two-photon polymerization .....                            | 49        |
| 4.2.2 Bioprinting ad estrusione .....                              | 50        |
| 4.2.3 Bioprinting basato su getto/jetting .....                    | 50        |
| <b>4.3 3D Bioprinting nell'oftalmologia .....</b>                  | <b>51</b> |
| <b>4.4 Vantaggi ed aspetti etici .....</b>                         | <b>52</b> |

|                          |           |
|--------------------------|-----------|
| <b>Conclusioni.....</b>  | <b>55</b> |
| <b>Bibliografia.....</b> | <b>57</b> |

## Indice delle abbreviazioni

**Agn:** Alginate, Alginato

**AM:** Amniotic Membrane, membrana amniotica

**AMD:** Age related Macular Degeneration, degenerazione maculare senile

**ATMP:** Advanced Therapies Medicinal Products

**BCVA:** Best Corrected Visual Acuity, massima acuità visiva corretta

**BrM:** Bruch's membrane, membrana di Bruch

**Cho:** choroid, coroide

**dECM:** Decellularized Extracellular Matrix, matrice extracellulare decellularizzata

**DLP:** Digital Light Processing, elaborazione digitale della luce

**DMD:** Digital Micromirror Device, dispositivo digitale a microspecchi

**DMEM:** Dubelcco's Modified Eagle's Medium

**DR:** Diabetic retinopathy, retinopatia diabetica

**ECM:** ExtraCellular Matrix, matrice extracellulare

**ETDRS:** Early Treatment for Diabetic Retinopathy Study, traduzione

**FDA:** Food and Drug Administration

**fRPC:** fetal Retinal Progenitor Cells, cellule progenitrici retiniche fetali.

**FTIR:** Fourier-transform Infrared Spectroscopy, spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier

**GA:** Geographic Atrophy, atrofia geografica

**GFAP:** Glial Fibrillary Acidic Protein, proteina fibrillare acida della glia

**HA:** Hyaluronic Acid, acido ialuronico

**HA-GM:** acido ialuronico con metacrilazione mediante reazione glicidil-idrossile

**hESC:** human Embryonic Stem Cells, cellule staminali embrionali umane

**HFIP:** esafluoro-isopropanolo.

**hiPSC:** human induced Pluripotent Stem Cells, cellule staminali pluripotenti indotte umane

**HLA:** Human Leukocyte Antigen, sistema antigenico dei leucociti umani

**INL:** Inner Nuclear Layer, strato nucleare interno

**iPSC:** induced Pluripotent Stem Cells, cellule staminali pluripotenti indotte.

**NP:** Nanoparticles, nanoparticelle

**NW:** Nanowires, nanofili

**ONL:** Outer Nuclear Layer, strato nucleare esterno;  
**OPL:** Outer Plexiform Layer, strato plessiforme esterno;  
**PCL:** Poly (caprolactone)  
**PEG-RGDS:** peptide Arg-Gly-Asp-Ser.  
**PET:** polietilentereftalato  
**PGA:** acido poliglicolico  
**PGS:** poli (glicerolo sebacato)  
**PIS:** segmento interno dei fotorecettori  
**PLA:** acido polilattico  
**PLGA:** acido polilattico-co-glicolico  
**PMMA:** polimetilmetacrilato  
**PNIPAAm:** Poli(N-isopropilacrilammide)  
**POS:** segmento esterno dei fotorecettori  
**PVR:** vitreoretinopatia proliferante  
**qPCR:** PCR quantitativa  
**RCP:** Retinal Progenitor Cells, cellule progenitrici retiniche  
**RGC:** Retinal Ganglion Cells, cellule gangliari retiniche  
**RP:** Retinitis Pigmentosa, retinite pigmentosa  
**RPE:** Retinal pigment epithelium, epitelio pigmentato retinico  
**SC/PL:** Solvent Casting/Particle Leaching  
**SEM:** microscopia elettronica a scansione  
**SLA:** Stereolitografia  
**TE:** Tissue Engineering, ingegneria tissutale  
**TIPS:** Thermally induced phase separation  
**Tr:** Taurina  
**VP:** Vat photopolimerization  
**2PP:** Two-photon polymerization

## Abstract

Questo elaborato si apre con una breve spiegazione degli aspetti anatomici e fisiopatologici legati alla retina e alla sua degenerazione. Segue la presentazione dei principali approcci terapeutici attuali, i quali si limitano a bloccare oppure a ritardare la degenerazione della retina; vengono poi analizzate le terapie alternative che si pongono l'obiettivo di sostituire o rigenerare i tessuti danneggiati, con la prospettiva di ripristinare le capacità visive.

Nonostante questi trattamenti innovativi siano in continua evoluzione, si riscontrano non poche criticità legate all'origine dei tessuti da utilizzare per la sostituzione di quelli compromessi e alla loro interazione con il ricevente. Una soluzione a questi aspetti problematici potrebbe arrivare dall'ingegneria tissutale, che lavora nel campo della "medicina rigenerativa", e ha come obiettivo la produzione di tessuti ingegnerizzati progettati proprio per essere perfettamente compatibili con il ricevente.

In particolare, l'ingegneria tissutale, applicata alla rigenerazione retinica, si pone come obiettivo di ottenere tessuti che imitino al meglio la membrana di Brunch, il tessuto epiteliale retinico, le cellule gangliari retiniche e i fotorecettori.

Lo studio prosegue con la descrizione delle strutture di supporto per la crescita cellulare (gli scaffold), la classificazione dei biomateriali e dei metodi che vengono impiegati per la fabbricazione di queste "impalcature"; sono inoltre presentati e descritti brevemente tre studi particolarmente interessanti per i risultati raggiunti; due di questi, in particolare, sono arrivati alla fase di trial clinico.

L'ultima parte del presente lavoro espone una nuova strategia per la produzione degli scaffold e dei tessuti per la medicina rigenerativa: la 3D bioprinting, che sembra possedere grandi potenzialità nel campo del trattamento di alcune malattie; segue, poi, l'esame dei principali vantaggi dell'uso di questa tecnica e le criticità etiche che non possono essere ignorate.

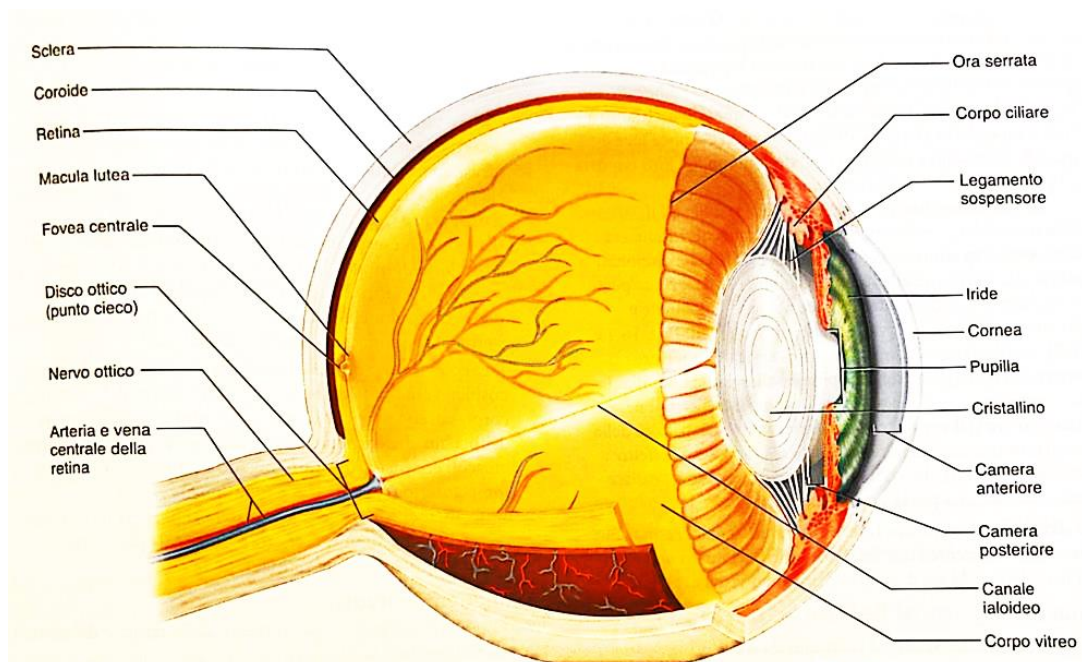


# Introduzione

## 1.1 L'occhio

### 1.1.1 Struttura e composizione

L'occhio è uno dei cinque più importanti organi sensoriali che possiedono gli esseri viventi. È costituito da mezzi diottrici quali cornea, umore acqueo, cristallino e il corpo vitreo, che permettono l'ingresso dei raggi luminosi regolandone anche l'inclinazione e la formazione delle immagini sulla retina. Analizzando l'anatomia del bulbo oculare nel dettaglio (Figura 1.1) si possono distinguere tre strati, o tonache. All'esterno si trova la tonaca fibrosa, che comprende sclera e cornea, ed è costituita per lo più da fibre di collagene. La sclera si compone di tessuto connettivo denso, con vasi sanguigni e nervi che danno protezione, forma e rigidità all'occhio. Segue la cornea, uno strato di tessuto connettivo trasparente che vanta una buona capacità rigenerativa grazie alla presenza di cellule staminali nell'epitelio. Più internamente si trova la tonaca vascolare che si divide in coroide, corpo ciliare e iride. La coroide, strato altamente vascolarizzato e pigmentato è posta appena all'esterno della retina.



**Figura 1.1** Sezione sagittale dell'occhio umano [1]

Il corpo ciliare circonda e dà sostegno al cristallino rendendolo leggermente piatto al centro grazie alla tensione esercitata da uno strato muscolare (legamento sospenditore) e secerne l'umore acqueo, un fluido sieroso presente nelle due camere dell'iride. Quest'ultima è posta tra cristallino e cornea ed è una lamina di muscolatura liscia divisa in due camere (anteriore e

posteriore) che comunicano tra loro grazie ad una zona centrale: la pupilla. L'iride presenta numerose cellule pigmentate che donano un colore marrone-bruno se sono ricche di melanina, più raramente conferiscono colori più chiari, come blu e verde.

Lo strato più interno del bulbo oculare comprende la retina e il nervo ottico che invia i segnali visivi al cervello. Segue poi il corpo vitreo, un gel trasparente che occupa lo spazio posteriore al cristallino e mantiene la pressione endoculare; permette poi il movimento dei muscoli senza lesioni oculari e il mantenimento della retina all'interno della cavità, caratteristica importante per la messa a fuoco delle immagini [1] [2, pp. 227–246].

### *1.1.2 Formazione dell'immagine*

La formazione di un'immagine inizia quando i raggi luminosi raggiungono l'occhio, poi si focalizzano sulla retina dando vita ad un'immagine invertita; la cornea rifrange i raggi verso l'asse ottico e poi il cristallino corregge lievemente l'immagine per metterla meglio a fuoco. Il cristallino può variare la sua forma consentendo l'accomodazione visiva, cioè i miglioramenti effettuati nella generazione dell'immagine, specie nella focalizzazione.

Il cristallino si appiattisce ed è mantenuto stirato sotto l'effetto del rilassamento del legamento sospenditore, per la visione di oggetti lontani, mentre viene ad assumere una forma convessa e si ispessisce, nell'osservazione di oggetti più vicini. Anomalie nella flessibilità del cristallino generano i classici problemi di astigmatismo, miopia, ipermetropia e presbiopia [1] [2].

## **1.2 La retina**

La retina è costituita da un tappeto di fotorecettori, cellule accessorie e fibre nervose, che si estende per lo più a partire dalla sezione posteriore interna dell'occhio. Rappresenta una membrana trasparente che è attaccata all'occhio unicamente grazie al disco ottico e l'ora serrata; il resto della retina è mantenuta in sede grazie alla pressione del corpo vitreo. Grazie alla retina l'energia luminosa che giunge all'occhio viene convertita in potenziali d'azione.

La retina presenta una zona posteriormente e al centro del cristallino: la macula lutea, un insieme di cellule al cui centro si trova la fovea. La fovea costituisce una zona con spessore ridotto al centro della macula; ad essa convergono tutte le fibre nervose dell'occhio a formare il nervo ottico [1] [2]

### *1.2.1 Componente epiteliale*

Esternamente la retina è composta da uno strato epiteliale pigmentato (retinal pigment epithelium, RPE) di cellule esagonali e microvilli; esso assorbe la luce diretta e non altera l'immagine visiva riflessa nell'occhio.

L'RPE è fondamentale per il mantenimento e la sopravvivenza dei fotorecettori con i quali è in stretto contatto. Grazie alla sua polarità, costituisce la parte più esterna della barriera emato-retinica e controlla il trasporto di nutrienti e sostanze di scarto; svolge anche una funzione importante per i fattori di crescita e protezione dalla luce.

La parte superiore del RPE è separata dalla coroide da una lamina, la membrana di Brunch (Brunch membrane, BrM), che è composta dalle principali proteine della matrice extracellulare (collagene ed elastina), insieme a laminina e fibronectina. Anche questa membrana funge da supporto e barriera per il controllo del trasporto dei nutrienti [3].

### *1.2.2 Componente neurale*

Nella retina è presente anche uno strato neurale più interno che si compone di 3 strati di cellule che possono essere ordinate dalle più esterne alle più interne: fotorecettori, cellule bipolari e gangliari (Figura 1.2).

Le cellule dei fotorecettori (principalmente coni e bastoncelli) sono in grado di assorbire la luce e generare un segnale chimico o elettrico. I fotorecettori sono costituiti da un segmento esterno (diretto all'epitelio retinico pigmentato) che rappresenta un ciglio specializzato nell'assorbimento della luce, e un segmento interno (verso l'interno dell'occhio) che comprende vari organuli e alla cui base si trova il corpo cellulare dove hanno luogo i processi sinaptici per i neuroni retinici che si trovano sotto.

Bastoncelli e coni differiscono per la diversa funzione nella visione e per la struttura del loro segmento esterno. Infatti, i bastoncelli sono responsabili della visione notturna (o scotopica) e producono immagini in gradazioni di grigio. Presentano un segmento esterno cilindrico composto da una "pila" di un migliaio di dischi membranosi, ciascuno dei quali contiene proteine globulari (pigmenti) importanti per la fototrasduzione: rodopsina, trasducina e fosfodiesterasi. I coni invece sono coinvolti nella visione diurna (o fotopica) e permettono una visione a colori. Presentano dei pigmenti chiamati fotopsine o conopsine.

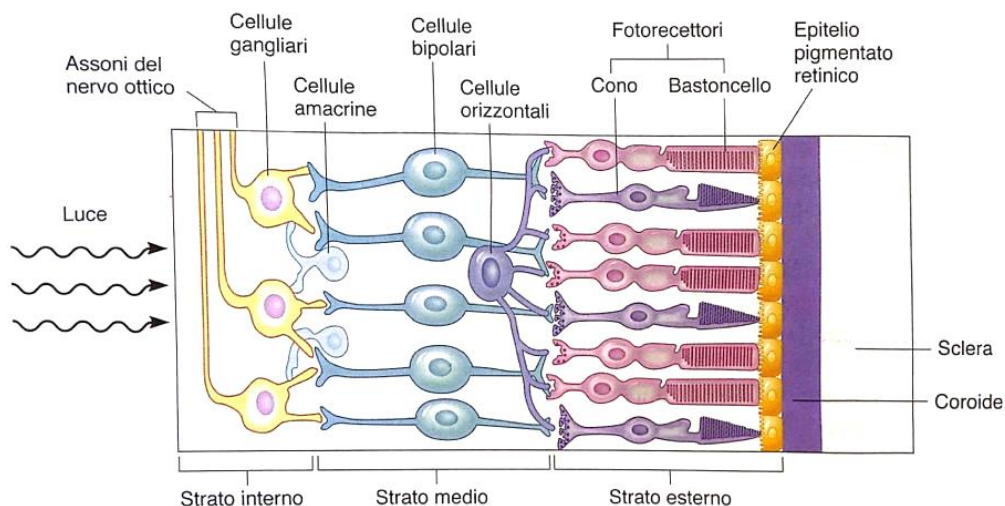
I pigmenti, tutti uguali nei bastoncelli, nei coni variano a seconda della lunghezza d'onda a cui meglio rispondono. La possibilità di vedere tutte le diverse tonalità di colore è data dalle diverse combinazioni di tre coni che corrispondono ai colori: blu, verde e giallo/arancio.

Le cellule bipolari presentano delle sinapsi collegate ai fotorecettori citati e sono considerate i neuroni di primo ordine; sono a loro volta collegate con sinapsi alle cellule gangliari.

Le cellule gangliari (Retinal Ganglion Cells, RGC) rappresentano i neuroni più grandi e di secondo ordine della retina. Esse assorbono la luce direttamente e trasmettono segnali ai nuclei del tronco encefalico tramite un unico nervo (il nervo ottico) che ha gli assoni collegati a queste. I pigmenti caratteristici delle cellule gangliari sono le melanopsine.

Le informazioni trasmesse tra i fotorecettori e il nervo ottico sono dunque portate attraverso le cellule bipolari e gangliari; tuttavia, agiscono anche altri due tipi di cellule che ne modulano il contenuto: le cellule orizzontali e le amacrine. Le cellule orizzontali e amacrine influenzano in maniera diversa la visione di un'immagine, il contrasto e l'intensità luminosa.

Data la notevole presenza di fotorecettori rispetto alle cellule gangliari, si può intuire che ognuna di queste ultime copre un campo recettivo esteso e dunque più bastoncelli convergono su una cellula bipolare, e a loro volta, più cellule bipolari convergono su un'unica cellula gangliare [1] [2] .



**Figura 1.2** Struttura della retina. Interessante osservare come i raggi luminosi incidano sui fotorecettori dalla loro base, non dalla testa. Questo accade perché l'apice presenta intensa attività metabolica e deve essere a stretto contatto con la rete vascolare che si trova nella coroide, accanto al RPE [2]

### 1.3 Degenerazione della retina: alcune cause e malattie

La degenerazione dell'epitelio pigmentato retinico e dei fotorecettori retinici è tra le principali conseguenze di malattie come la degenerazione maculare, la retinopatia diabetica e la retinite pigmentosa e, a lungo andare, può comportare la perdita totale della vista [3].

Si distingue dalle malattie suddette il glaucoma, caratterizzato dalla degenerazione delle cellule gangliari della retina, e dunque non correlato al RPE.

RPE, fotorecettori e cellule gangliari hanno tuttavia una caratteristica comune che rende più difficile la guarigione e l'interruzione della degenerazione: non sono in grado di autorigenerarsi.

### *1.3.1 Glaucoma*

Il glaucoma, patologia legata nella maggioranza dei casi ad una condizione di elevata pressione endoculare, si presenta quando i seni venosi della sclera si ostruiscono e impediscono il passaggio dell'umor acqueo per il suo assorbimento. Ciò causa un aumento di pressione tra le camere anteriore e posteriore che spinge il cristallino verso l'interno dell'occhio; il corpo vitreo viene schiacciato premendo, a sua volta, la retina sulla coroide. Questo determina una compressione sui vasi nutrienti della retina, che porta irreversibilmente alla morte cellulare gangliare e, dunque, all'atrofia del nervo ottico.

Tra i sintomi precoci della malattia si possono trovare: lampi di luce immaginari, diminuzione della visione e del campo visivo e presenza di aloni colorati attorno alle luci artificiali.

A tutt'oggi esistono solamente terapie farmacologiche e chirurgiche per arrestare la malattia, ma non risulta ancora possibile la ripresa totale della capacità visiva [4].

### *1.3.2 Degenerazione maculare senile*

La degenerazione maculare senile (Age-related Macular Degeneration, AMD) rappresenta la morte cellulare dei recettori della macula. Si manifesta, nei primi stadi della malattia, con la presenza e accumulo di detriti giallastri di materiale cellulare (drusen) tra l'epitelio pigmentato retinico e la membrana di Bruch. Il danno al RPE comporta dunque anche un danno alla BrM che perde la sua permeabilità e le sue proprietà diffusive, causando l'accumulo dei detriti.

Se la malattia procede a stadi successivi, si arriva a due diverse forme: la forma "secca" e la forma "umida". La forma secca, anche detta "atrofica", è caratterizzata dalla degenerazione del RPE e quindi dei fotorecettori sovrastanti. La forma umida o essudativa si distingue dalla prima per una crescita anomala di vasi sanguigni coroidali nel RPE. Questo causa un malfunzionamento della retina neurale a causa di emorragie e fibrosi che portano alla degenerazione della retina.

La forma più avanzata della AMD comporta una atrofia geografica (geographic atrophy, GA) e la neovascolarizzazione. La GA porta alla perdita della coroide e del RPE nella macula e al conseguente disfunzionamento dei fotorecettori [1] [4] [5] [6].

### *1.3.3 Retinopatia diabetica*

La retinopatia diabetica (diabetic retinopathy, DR) comprende una degenerazione della retina causata dagli effetti collaterali del diabete mellito sui vasi sanguigni retinici. La DR comporta nella retina aree di ischemia, edemi, e crescita anomala dei vasi sanguigni, con conseguente perdita della vista. Diagnosi precoce e controllo del diabete possono prevenire nel 90% dei casi la cecità.

Ad oggi, le terapie proposte mirano principalmente a rallentare le anomalie portate dal diabete mellito mediante laser, iniezioni di fattori anti-VEGF (fattori che mirano a bloccare la crescita anomala di altri vasi sanguigni), steroidi e chirurgia [1] [4].

### *1.3.4 Retinite pigmentosa*

La retinite pigmentosa (retinitis pigmentosa, RP) rappresenta una tra le principali distrofie retiniche ereditarie. È caratterizzata dalla perdita dei fotorecettori, sia bastoncelli che coni, e può portare alla completa cecità. I sintomi iniziano con una perdita progressiva dei bastoncelli che comporta una ridotta vista periferica e l'assenza totale di vista notturna. In seguito, quando si verifica anche la perdita dei coni, viene a mancare anche la capacità visiva diurna.

La manifestazione della malattia si caratterizza con la presenza di ammassi di pigmenti di conformazione osteoplastica, il restringimento dei vasi e una pupilla dall'aspetto pallido.

Nella maggior parte dei casi le terapie proposte sono semplicemente degli interventi chirurgici per tentare di compensare la riduzione del campo visivo e la dotazione di filtri per ridurre la fotofobia [7].

## **1.4 Approcci terapeutici**

### *1.4.1 Trattamenti in uso*

Per le malattie degenerative, brevemente ora descritte, vengono effettuati trattamenti laser e di chirurgia come la rimozione delle membrane neovascolari coroidali; ogni intervento chirurgico, tuttavia, comporta il rischio di rigetto e di trasmissione di altre malattie.

Per il glaucoma vengono effettuati spesso trattamenti che mirano a diminuire la pressione endoculare, mentre per la AMD si scelgono terapie come l'anti-VEGF (per inibire il fattore di crescita endoteliale vascolare).

Sono stati proposti e studiati approcci con agenti attivi inibitori, antagonisti, antiossidanti o fattori neutrofici, ma solo pochi di questi hanno portato a risultati soddisfacenti.

Alcune terapie utilizzate in associazione alle precedenti consistono in misure di neuroprotezione; l'obiettivo, in tal caso, è quello di proteggere, recuperare e rigenerare i tessuti danneggiati.

Vi è poi la terapia fotodinamica, che comprende la somministrazione di un farmaco fotosensibilizzante attivato mediante l'assorbimento di una luce di una determinata lunghezza d'onda. Sebbene questo approccio sembri possedere dei vantaggi rispetto ai precedenti, comporta il rischio di trombosi.

Alcuni accorgimenti possono favorire la prevenzione o, comunque rallentare la progressione, di queste malattie degenerative: seguire uno stile di vita sano, evitare il fumo e seguire diete ricche di antiossidanti (vitamina E, C, carotenoidi) e minerali (come lo zinco) [5] [8].

Le terapie citate finora però mirano solamente a ritardare la progressione della malattia, e non contemplano la possibilità di recupero (parziale o totale) della vista.

L'occhio sembra comunque essere il soggetto ideale per l'utilizzo di terapie avanzate (Advanced Therapy Medicine Products, ATMP) per vari motivi:

- 1) la sua dimensione contenuta, che quindi richiede piccole quantità di prodotti ATMP;
- 2) la sua struttura limita la dispersione degli agenti terapeutici fuori dal sito di interesse;
- 3) nell'occhio è limitato il movimento di cellule e molecole immunitarie trasportate dal sangue; dunque, la reazione immunitaria è inferiore ad altri organi.

Questi approcci comprendono diverse tipologie di terapie innovative: cellulare, genica, e ingegneria tissutale. L'avanzamento della ricerca ha portato alla scelta di queste cure per cercare di rigenerare le parti malate e danneggiate dell'organo [5].

#### *1.4.2 Terapia genica: cenni*

La terapia genica rappresenta un grande potenziale perché consente il rilascio di fattori terapeutici in un singolo trattamento anche in caso di malattie retiniche ereditarie. Essa consiste nell'introduzione di geni sani per sostituire proteine non funzionanti o danneggiate nelle cellule del paziente, oppure nell'estrazione dei geni malati e la loro successiva correzione.

Vengono utilizzati dei veicoli per il trasporto dei geni corretti, o vettori, che possono essere di due tipologie: virali e non virali. La terapia genica utilizza diversi metodi chirurgici per l'inserimento dei vettori; ognuno di essi, tuttavia, presenta delle limitazioni: rischio di danni al tessuto retinico e di risposta immunitaria, con conseguenti infiammazioni che possono portare più velocemente alla perdita della vista [5].

### 1.4.3 Terapia cellulare: cellule staminali

La terapia di sostituzione di cellule danneggiate costituisce una promettente alternativa alle terapie in precedenza esaminate, soprattutto per le fasi avanzate delle malattie degenerative, anche della retina.

Le RGC sono le prime cellule a formarsi da quelle retiniche progenitrici (retinal progenitor cells, RCP), cellule staminali multipotenti che si differenziano poi in varie cellule nervose: dunque, queste possono essere sfruttate per ottenere cellule RGC ex novo.

Le cellule staminali, sfruttate notevolmente nella terapia cellulare, sono cellule non-differenziate in grado di dividersi in coltura dando origine a cellule di diverso tipo dopo la differenziazione. Sono anche in grado di autorigenerarsi e proliferare su determinati materiali di supporto.

Per questo vengono utilizzate come una fonte di nuove cellule sia per quanto riguarda la rigenerazione di tessuti e organi, sia per la creazione di tessuti da utilizzare nel campo della ricerca scientifica.

È ancora in fase di sperimentazione e trials clinici l'utilizzo effettivo di queste cellule, poiché presentano alcune limitazioni (Tabella 1.1) che non possono essere ignorate. Tuttavia, con il progredire della ricerca scientifica si spera che questo settore venga sviluppato e migliorato sempre di più, date le sue grandi potenzialità [8] [9, pp. 330–335].

| CELLULE STAMINALI     | VANTAGGI   | SVANTAGGI  | ESEMPI    |
|-----------------------|--|--|-----------|
| Embrionali            | Differenziazione in qualsiasi tipo cellulare   | Rischio formazione di tumori<br>Considerazioni etiche                              | [10] [11] |
| Pluripotenti indotte  | Differenziazione in qualsiasi tipo cellulare<br>No rigetto<br>Derivazione diretta dal paziente | Contaminazione da cellule tumorigeniche<br>Immunogenicità<br>Considerazioni etiche | [10]      |
| Adulte / progenitrici | Risorsa per trapianti autologhi<br>No tumorigenesi né immunosoppressione                       | Espansione, sopravvivenza e integrazione povere                                    | [12] [13] |

**Tabella 1.1** Tipologie di cellule staminali con vantaggi, svantaggi ed esempi di studio [8] [9]

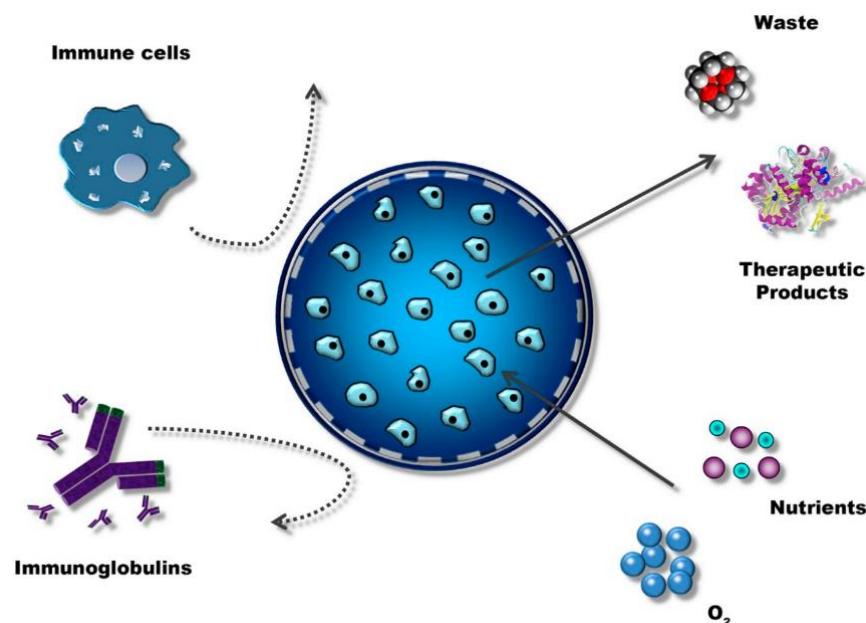
Come già detto, l'occhio rappresenta il target ideale per questo tipo di terapie. Un altro motivo che favorisce la scelta delle terapie cellulari rispetto ad altro tipo di trattamenti è il fatto che l'occhio permette un accesso per il controllo e il monitoraggio della terapia che non è eguagliabile per nessun altro organo ad eccezione della cute. Ciò garantisce una maggior precisione nella valutazione dell'efficacia.



La diretta sospensione delle cellule staminali è un sistema di trasporto spesso invasivo e rischioso per una possibile reazione immunitaria e richiede più trattamenti durante l'arco di vita del paziente; questo lo espone a ripetuti rischi per la sua salute.

Negli anni '60 fu presentata una nuova strategia terapeutica: la terapia cellulare di incapsulamento [10] che consiste nell'impiantare le cellule selezionate all'interno di membrane polimeriche prima del loro innesto nel paziente. Questo permette alla cellula di rimanere incapsulata nella membrana senza che finisca in siti diversi dal target e la protegge da possibili attacchi di cellule immunitarie e anticorpi, evitando il rigetto. D'altra parte, la membrana è semipermeabile e consente il trasporto di nutrienti e ossigeno alla cellula incapsulata (Figura 1.3).

Il materiale utilizzato per l'incapsulamento deve rispondere a specifiche caratteristiche: biocompatibilità; impiantabilità e recuperabilità; utilizzo di fonti cellulari non animali per evitare necrosi e perdita del controllo sulla crescita cellulare e immunogenicità; compatibilità cellulare con lo scaffold; utilizzo di tecniche che garantiscano alto controllo del dosaggio [14].



**Figura 1.3** Funzionamento della terapia cellulare di incapsulamento.

#### *1.4.4 L'importanza degli scaffold*

È noto che le cellule selezionate per la terapia cellulare necessitano di strutture di supporto per la crescita e proliferazione, spesso favorite anche dall'aggiunta di segnali e fattori biochimici specifici. Queste strutture sono chiamate scaffold e vengono selezionati i materiali più

promettenti in grado di favorire e guidare la differenziazione, la crescita e la sopravvivenza delle cellule coltivate [9].

Nel capitolo seguente apparirà più chiara l'importanza degli scaffold e verranno illustrati meglio i materiali e le tecniche per la loro produzione.

## Capitolo 2: L'ingegneria tissutale

### 2.1 Introduzione

Nonostante la crescente evoluzione negli approcci terapeutici, la sostituzione di organi e tessuti danneggiati da malattie e traumi costituisce tuttora un problema importante per la medicina moderna. Parte dei problemi deriva da insufficienza di donatori e da questioni legate alla compatibilità; il trapianto di tessuti presenta delle difficoltà che dipendono dalla tipologia di trapianto che si intende effettuare.

Nel caso di trapianto autologo, si riscontra una limitata disponibilità di tessuto, poiché questo viene prelevato da aree di tessuto sano del paziente stesso.

Nei trapianti, quando si utilizzano tessuti da donatore, come nel caso di allotrapianti e xenotrapianti (i donatori sono rispettivamente della stessa specie e diversa dal ricevente) si può verificare il rischio di rigetto. Questo può essere gestito con cure immunosoppressive che, tuttavia, possono causare a lungo andare l'insorgenza di intolleranza e, nei casi più gravi, la genesi di tumori.

Una soluzione alle problematiche descritte può arrivare dall'ingegneria tissutale (tissue engineering, TE), che viene utilizzata nell'ambito della cosiddetta "medicina rigenerativa": consiste nella applicazione di tecniche che permettono di coltivare in laboratorio (anche a livello industriale) linee cellulari e tessuti che presentano le caratteristiche del ricevente.

Una volta coltivate in vitro, le linee cellulari e i tessuti vengono innestati nel paziente, permettendo il ripristino delle funzionalità compromesse da patologie e traumi, senza la necessità di ricorrere a donatori esterni.

Come si può comprendere, questo approccio innovativo differisce notevolmente dagli attuali trapianti, poiché i tessuti ingegnerizzati sono perfettamente compatibili con il ricevente, di cui diventano parte integrante.

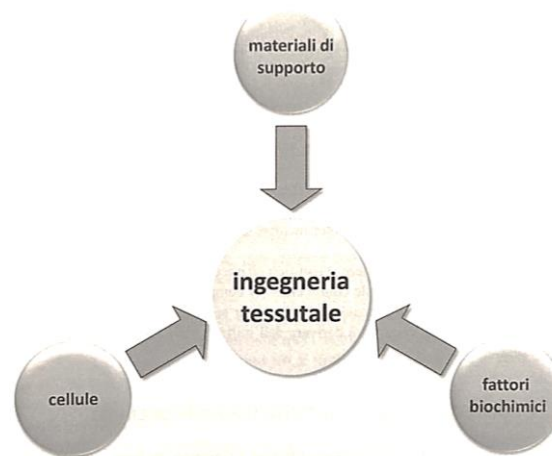
In linea di principio, le tecniche della TE prevedono di seminare cellule autologhe su un supporto (scaffold di natura sintetica o naturale) eventualmente funzionalizzato con segnali biochimici (Figura 2.1). I fattori biochimici sono delle particolari molecole in grado di promuovere alcune funzioni cellulari e quindi anche la formazione di nuovo tessuto e possono essere:

- fattori di adesione, cioè proteine che promuovono la formazione dei legami cellula-cellula e cellula-matrice;
- fattori di crescita, che sono invece proteine in grado di stimolare la proliferazione e il differenziamento cellulare.

L'obiettivo centrale nel campo dell'ingegneria tissutale retinica è quello di ottenere un substrato che più si avvicini alla membrana di Brunch, che svolge un ruolo centrale per la sopravvivenza del RPE e dei fotorecettori; altro scopo, poi, è quello di ottenere matrici per la crescita del RPE, delle RGC e dei fotorecettori [15] [16] [17] .

La TE applicata all'oftalmologia comprende due principali metodi per rigenerare la retina danneggiata:

- il primo riguarda la rigenerazione del tessuto retinico e ha dunque, come target, lo stesso RPE e la BrM;
- il secondo comprende la rigenerazione dello strato neurale della retina e dunque dei fotorecettori stessi.



**Figura 2.1** Le principali componenti richieste per la TE [9].

## 2.2 scaffold: proprietà e classificazione

Per la formazione di nuovo tessuto in vitro è necessario creare un ambiente favorevole nel quale le cellule siano in grado di riprodursi, integrarsi e organizzarsi in modo opportuno; sotto questo aspetto, diventano fondamentali i materiali di supporto [9]. Gli scaffold devono aumentare il trasporto e favorire l'integrazione delle cellule e del tessuto retinico; infatti, spesso l'RPE trapiantato sotto forma di cellule isolate, senza uno scaffold, fallisce nella sua adesione con la BrM e si creano degli aggregati anomali rispetto al monostrato tipico [4].

Più in generale, infatti, sebbene i trapianti cellulari siano capaci di ripristinare parte delle funzioni visive, si nota una bassa sopravvivenza e integrazione cellulare nel sito dell'innesto e nascono non poche difficoltà nel mantenimento delle cellule iniettate nell'area di interesse.

### *2.2.1 Proprietà*

Una caratteristica importante dei biomateriali utilizzati per gli scaffold è la necessità che essi imitino il più possibile l'ECM nativa, servendo anche da riserva di fattori di crescita.

Nel caso dei biomateriali utilizzati per la rigenerazione del RPE, è importante che imitino il più possibile la BrM e le sue caratteristiche (quali la presenza di un monostrato con giunzioni strette, la presenza di microvilli apicali e la possibilità di fagocitosi dei fotorecettori).

Questi biomateriali devono rispondere però ad una serie di altre caratteristiche importanti. Prima di tutto, i biomateriali devono essere biocompatibili, in quanto devono evitare il rigetto e limitare reazioni avverse, infiammazione e fibrosi. Devono anche mantenere la vitalità delle cellule trapiantate e garantire una funzionalità adeguata. Inoltre, i biomateriali devono essere biodegradabili e biorisorbibili: a contatto con l'ambiente biologico devono garantire una cinetica di degradazione che coincida con la sintesi di nuova ECM per lasciare gradualmente posto alla formazione del nuovo tessuto. Una degradazione troppo lenta, infatti, ostacolerebbe la creazione del nuovo tessuto; una degradazione troppo rapida, invece, non darebbe il tempo al nuovo tessuto di formarsi in modo completo e di raggiungere una adeguata resistenza meccanica.

Nel caso di scaffold ottenuti con materiali polimerici, ad incidere sul tempo di degradazione sono: la composizione chimica, la struttura, il peso molecolare e il grado di polimerizzazione del materiale.

Anche i prodotti di degradazione devono essere non tossici e tali da poter essere metabolizzati ed eliminati dal corpo senza reazioni avverse.

Lo scaffold deve possedere determinate proprietà meccaniche, in concordanza con il sito in cui verrà impiantato, per garantire una mecano-trasduzione adeguata e prevenire danni al tessuto circostante. Deve resistere alla manipolazione durante l'innesto e presentare una flessibilità adeguata ad evitare il distacco della retina o distorsioni nella visione. Deve avere una morfologia superficiale adeguata, che imiti il più possibile quella del tessuto sano, e garantire un rimodellamento e una integrazione ottimali.

La geometria dello scaffold influisce anche sulla crescita delle cellule, poiché le guida ad una corretta distribuzione. È necessario, quindi, un alto grado di porosità per permettere una buona diffusione di cellule, nutrienti e gas e delle sostanze di rifiuto. La dimensione dei pori è altrettanto importante in quanto, se sono troppo piccoli, possono ostacolare l'integrazione delle cellule nella matrice.

Esistono delle tecniche di modificazione della superficie, applicate appositamente per migliorare il trapianto cellulare e controllare la differenziazione, allo scopo di raggiungere

un'ottimale rigenerazione della retina. Queste tecniche consistono per lo più nel modificare le proprietà idrofiliche e idrofobiche, la topologia della superficie, le proprietà adesive, etc.

Anche la topografia della superficie copre un ruolo importante per favorire la differenziazione e l'orientamento delle cellule e per modificare la chimica superficiale del materiale.

Nel caso di scaffold pensati per il trattamento del glaucoma, il biomateriale deve inoltre favorire la capacità di migrazione delle RGC sane, allungare gli assoni nella testa del nervo ottico ed essere in grado di rigenerare assoni anche a lunghe distanze nel nervo ottico danneggiato; inoltre, è chiamato a guidare la crescita delle RGC verso il nervo ottico.

Un aspetto che sembra secondario, ma è altrettanto importante, è la lavorabilità del materiale, che deve essere abbastanza semplice e non richiedere costi eccessivi [4] [9] [16] [8] [6].

### 2.2.2 Classificazione dei materiali

I biomateriali utilizzati nell'ingegneria tissutale possono essere distinti in due tipologie principali: i polimeri naturali e i polimeri sintetici; di seguito si vedranno diversi esempi di materiali utilizzati nella TE retinica (Tabella 2.1).

| MATERIALE   | VANTAGGI   | SVANTAGGI   |
|---|--|---|
| Polimeri naturali di origine umana: chitosano, collagene, fibrina, acido ialuronico | -Facilmente reperibili<br>-Biocompatibili<br>-Degradazione abbastanza rapida   | -Possibile trasmissione di malattie e reazione immunitaria<br>-Variabilità intergruppo delle proprietà meccaniche   |
| Polimeri naturali di origine vegetale/batterica: acido ialuronico, alginato         | -Facilmente reperibili<br>-Prodotti di degradazione non tossici  | -Capacità limitata di interazione cellulare, di legare con i fattori di crescita e proteine senza adeguata modifica<br>-Variabilità intergruppo delle proprietà meccaniche                              |
| Polimeri sintetici: PLGA, PGS, PCL, PMMA, PGA, Parilene                             | Proprietà meccaniche e composizione ottimali   | -Degradazione lenta<br>-Prodotti acidi di degradazione.<br>-Metodi di polimerizzazione citotossica, possono rimanere molecole citotossiche<br>-Mancanza dei fattori di crescita, devono essere aggiunti |
| dECM  | -Biocompatibilità<br>-Adesione cellulare, attivazione di integrine per segnalazione<br>-Funzionalizzazione con fattori di crescita e cellule della ECM | -Disponibilità<br>-Possibili reazioni avverse<br>-Variabilità intergruppo delle proprietà meccaniche  |

**Tabella 2.1:** Materiali e loro vantaggi / svantaggi. PLGA: acido poli(lattico-co-glicolico); PGS: poli(glicerol sebacato); PCL: poli(caprolattone); PMMA: poli(metil metacrilato); PGA: acido poliglicolico; dECM: matrice extracellulare decellularizzata [4].

### *2.2.2.1 Polimeri naturali*

I polimeri naturali sono facili da reperire e includono: collagene di tipo I, III e IV, gelatina, alginato, fibrinogeno, chitosano, laminina, fibronectina, matrigel, fibroina della seta e vitronectina. Questi materiali presentano proprietà molto simili alla ECM, e ciò permette loro di essere degli ottimi candidati per la costruzione di scaffold che imitino più possibile le proprietà del tessuto ospite.

Hanno grandi vantaggi a livello di biocompatibilità, biodegradabilità e taluni contengono nella loro struttura delle sequenze segnale per promuovere l'adesione delle cellule e controllarne le funzioni. Tuttavia, presentano alcuni limiti dovuti, ad esempio, alla difficoltà nel controllo delle proprietà meccaniche che li rendono più difficili da utilizzare nelle procedure chirurgiche [9] [16].

### *2.2.2.2 Polimeri sintetici*

I polimeri sintetici potrebbero essere una scelta privilegiata in quanto presentano:

- 1) proprietà meccaniche migliori e maggior resistenza nelle procedure di innesto;
- 2) maggiore possibilità di controllo e modifica delle proprietà;
- 3) tempi di degradazione maggiori, dunque possono meglio sostenere e guidare la crescita e differenziazione cellulare.

La Food and Drug Administration (FDA) ha approvato una serie di polimeri sintetici (vedi Tabella 2.1).

Nonostante i vantaggi che i materiali sintetici possiedono, ci sono alcuni importanti limiti di cui tenere conto: talvolta accade che interagiscano in modo indesiderato e inaspettato con le cellule, non possiedano proprietà di adesione cellulare e questo richiede ulteriori modifiche superficiali perché creino legami con le cellule.

La scelta di polimeri sintetici è correlata, poi, ad una maggior risposta avversa poiché l'organismo li percepisce come un corpo esterno e cerca di liberarsene dando origine anche a infiammazioni e creazioni di tessuto fibrotico. Dai limiti suddetti deriva l'idea di creare impalcature composite: gli scaffold ibridi [9] [16].

### *2.2.2.3 Materiali ibridi*

I materiali ibridi combinano le proprietà di entrambi i materiali, naturali e sintetici, compensandone gli eventuali svantaggi. La creazione di scaffold ibridi è diversa dal semplice rivestimento del materiale sintetico con materiali naturali; questo approccio, infatti, permette di

ottenere un supporto che presenta le proprietà meccaniche ottimali del sintetico, da un lato, e la miglior biocompatibilità e integrazione dei polimeri naturali dall'altro [9] [16].

#### *2.2.2.4 Polimeri termoresponsivi*

I polimeri termoresponsivi sono materiali a risposta intelligente sotto stimolo termico: mostrano, infatti, delle proprietà idrofobiche e idrofiliche variabili vicino ad una temperatura critica. Un esempio ne è il PNIPAAm o poli(N-isopropilacrilammide) [16].

Al di sotto di certe temperature, le superfici delle strutture composte da questi materiali diventano idrofiliche e, al contrario, sopra le stesse temperature diventano idrofobiche. Questo effetto viene sfruttato per la creazione di veri e propri fogli di cellule, poiché queste si legano più facilmente alle superfici idrofobiche del polimero.

Anche lo spessore di questi supporti influenza molto la capacità delle cellule di legare con la struttura; infatti, esse difficilmente aderiscono se lo spessore del polimero supera i 30 mm.

Un vantaggio importante dei fogli cellulari preparati su questi polimeri consiste nel poter essere raccolti, una volta pronti, modificando la temperatura senza la necessità di adoperare enzimi proteolitici, che normalmente vengono utilizzati per separare le cellule o i tessuti. Questo permette anche di mantenere tutte le componenti della matrice extracellulare coinvolte nei processi di adesione e rende possibile il posizionamento immediato dell'innesto nel sito di interesse senza il bisogno di suture e, dunque, il rischio di danni al tessuto RPE [18], [19].

#### *2.2.2.5 Idrogel*

Molti polimeri selezionati come biomateriali sono spesso impiegati sotto forma di reti polimeriche, gli idrogel. Essi sono dei colloidi composti da catene polimeriche in grado di trattenere rilevanti quantità di acqua. Possiedono caratteristiche e proprietà molto simili alla ECM. Questo permette il loro utilizzo come carriers per le cellule dal momento che consentono ad ossigeno e nutrienti di permeare nel tessuto imitando, meglio di altri materiali, la matrice extracellulare.

Sono composti in grande quantità da acqua (anche fino al 90%), e questo li rende delle strutture caratterizzate da alto grado di trasparenza e facili da maneggiare e iniettare. L'utilizzo di idrogel iniettabili può essere sfruttato per la creazione di innesti di tessuti molli in siti che presentano danni irregolari o che sono inaccessibili, senza interventi chirurgici invasivi. Gli idrogel, inoltre, possono facilmente diventare reticolati mediante interazioni ioniche, ed essere sfruttati per l'incapsulamento di diversi tipi cellulari [20].



#### 2.2.2.6 Membrane biologiche

Le membrane biologiche sono sicuramente biocompatibili e, per questo, offrono una migliore adesione rispetto ai materiali precedentemente descritti. Esse possono legare facilmente molecole della matrice e fattori di crescita.

La BrM è forse il migliore tra i materiali utilizzati come scaffold, poiché questo è proprio il tessuto normalmente coinvolto nella degenerazione retinica; nella maggioranza dei casi la scarsa sopravvivenza e proliferazione delle cellule RPE dipende, infatti, da un malfunzionamento di questa membrana dovuto all'avanzamento dell'età.

Ci sono studi che hanno portato a miglioramenti della BrM danneggiata attraverso il rivestimento di quest'ultima con miscele di diversi materiali, quali laminina, fibronectina e vitronectina.

La BrM rivestita presenta le caratteristiche e funzionalità più adatte, anche per quanto riguarda la fagocitosi dei fotorecettori. Tuttavia, questi perfezionamenti risultano comunque insufficienti al confronto dei tessuti di BrM giovani e sani.

Anche l'ECM decellularizzata (dECM) del tessuto target può essere sfruttata per l'ingegneria tissutale e sta trovando applicazione nel mondo degli scaffold poiché rappresenta un ottimo ambiente di crescita per le cellule ed il loro sviluppo.

La decellularizzazione può avvenire tramite l'uso di sostanze chimiche o con enzimi che mirano a rimuovere dal tessuto tutte le cellule facendo rimanere intatta l'ECM e le sue componenti. Alcuni studi riportano, infatti, che dopo questo trattamento, nella retina neurale rimangono inalterati il collagene e l'acido ialuronico (HA) presenti, e tutti i fattori di crescita importanti per la proliferazione delle cellule progenitrici retiniche.

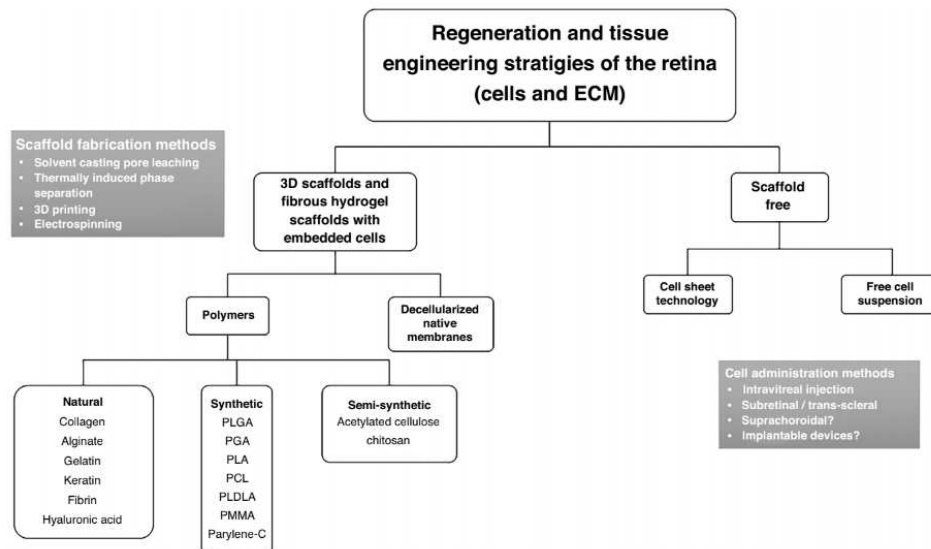
Quanto sopra descritto e la presenza della differenziazione dei fotorecettori, sembrerebbero fare della dECM un materiale molto adatto alla preparazione, ad esempio, di idrogel per il rilascio delle cellule retiniche nella cavità oculare sottoretinica.

Tuttavia, i risultati ottenuti non mostrano di fatto un miglioramento né che detta membrana sia dotata di particolari caratteristiche che la rendano preferibile ai materiali descritti precedentemente.

La membrana amniotica (Amniotic Membrane, AM), che forma lo strato più interno delle membrane fetali, può rappresentare un'altra alternativa nel campo dei biomateriali. Nei test in vivo essa è stata privata dell'epitelio, poi applicata come sostituto della BrM e osservata nella ricrescita delle cellule RPE. Nelle zone dove è presente questa membrana si verifica anche una pigmentazione che viene mantenuta durante lo sviluppo cellulare.

D'altra parte, si rendono necessari studi più approfonditi, soprattutto per quanto riguarda l'orientamento corretto e il trattamento della membrana, nonché dei limiti principali che essa comporta, come il rischio di trasmissione di malattie e la variabilità nelle sue proprietà [4].

In Figura 2.2 sono riportati i materiali e le strategie utilizzati per la rigenerazione retinica.



**Figura 2.2:** Sintesi dei biomateriali per la rigenerazione retinica, metodi e strategie [6].

## 2.3 Metodi di fabbricazione

A causa della scarsa disponibilità di membrane biologiche, vengono preferiti scaffold costruiti con materiali naturali e sintetici, sui quali le tecniche di fabbricazione si concentrano (Figura 2.3).

### 2.3.1 Solvent casting/particle leaching (SC/PL)

Il metodo di SC/PL consiste nel dissolvere il polimero, contenente particelle rilasciabili (porogeni) in un appropriato solvente. Per creare la struttura porosa dello scaffold, la soluzione polimerica con le particelle del solvente viene depositata nello stampo desiderato. Il polimero, in seguito, viene immerso in un solvente non tossico che scioglie i porogeni, generando così la porosità. Porosità e dimensione dei pori dipendono da numero, forma e dimensione delle particelle porogene; con questo metodo si possono raggiungere porosità anche del 93% e diametro medio dei pori fino a 500 nm.

Un limite di questo metodo è che può essere effettuato solo per ottenere scaffold relativamente sottili, e risulta difficile controllare la grandezza dei pori per ottenere porosità specifiche. Inoltre, i prodotti così ottenuti presentano scarse proprietà meccaniche; per di più, i solventi organici potrebbero non essere compatibili con la successiva semina di cellule [6].

### 2.3.2 *Thermally induced phase separation (TIPS)*

La TIPS consiste nel destabilizzare termodinamicamente soluzioni polimeriche omogenee per indurre la separazione, ottenendo una fase ricca di polimeri e una povera.

Un sistema omogeneo multicomponente può diventare termodinamicamente instabile e liberare energia, che viene poi sfruttata per creare i pori.

La separazione di fase si può ottenere attraverso due strade:

- separazione di fase solido-liquido, che viene indotta diminuendo la temperatura del sistema e ottenendo così la cristallizzazione e poi la separazione del polimero dal solvente;
- separazione di fase liquido-liquido, nella quale l'abbassamento della temperatura porta alla formazione di strutture bicomponenti.

La rimozione del solvente restituisce uno scaffold con una struttura porosa aperta. La TIPS consente la creazione di una rete polimerica interconnessa; si può combinare con altre tecniche e produce strutture porose senza bisogno di porogeni; non permette, però, di aggiustare la dimensione e l'orientamento dei pori [6] [21].

### 2.3.3 *Self assembly*

L'autoassemblaggio (self-assembly) consiste nella produzione di materiale in cui le molecole si organizzano spontaneamente in strutture sfruttando sia legami non covalenti che legami covalenti (legami a idrogeno, forze di van der Waals e interazioni idrofobiche). Questi legami vengono combinati per ottenere delle strutture più complesse, nelle quali però è sempre l'unità strutturale a regolare e controllarne l'organizzazione.

In questa tecnica vengono ampiamente utilizzate due molecole naturali, collagene ed elastina, quando l'obiettivo è quello di riprodurre le caratteristiche della ECM.

Molto spesso, però, viene fatto uso anche di particolari materiali, i peptidi autoassemblanti. Questi particolari peptidi hanno un'importanza cruciale, poiché presentano code idrofobiche e diversi residui che migliorano le interazioni e l'adesione con altre molecole. Inoltre, grazie alla regolazione di parametri come pH, luce, temperatura e concentrazione di ioni, viene controllato e modificato il processo dell'assemblaggio, che può essere completato anche con l'integrazione di particolari sequenze di proteine o fattori di crescita.

Il fatto, però, che questo metodo preveda una disposizione delle molecole dipendente dalle loro interazioni spontanee comporta un limite, in quanto diventa più difficile controllare e regolare le dimensioni delle fibre che si vogliono ottenere.

Oltre a questo, è necessario tenere conto degli alti costi richiesti per la sintesi dei biomateriali utilizzati nella tecnica dell'autoassemblaggio [17][22].

#### *2.3.4 Freeze-drying*

Nel processo di freeze-drying, la soluzione che contiene il polimero viene fatta raffreddare ad una temperatura inferiore a quella di congelamento e, dunque, raggiunge la solidificazione; viene però preservata l'attività dei fattori biologici presenti nello scaffold [21].

Vengono distinte tre fasi:

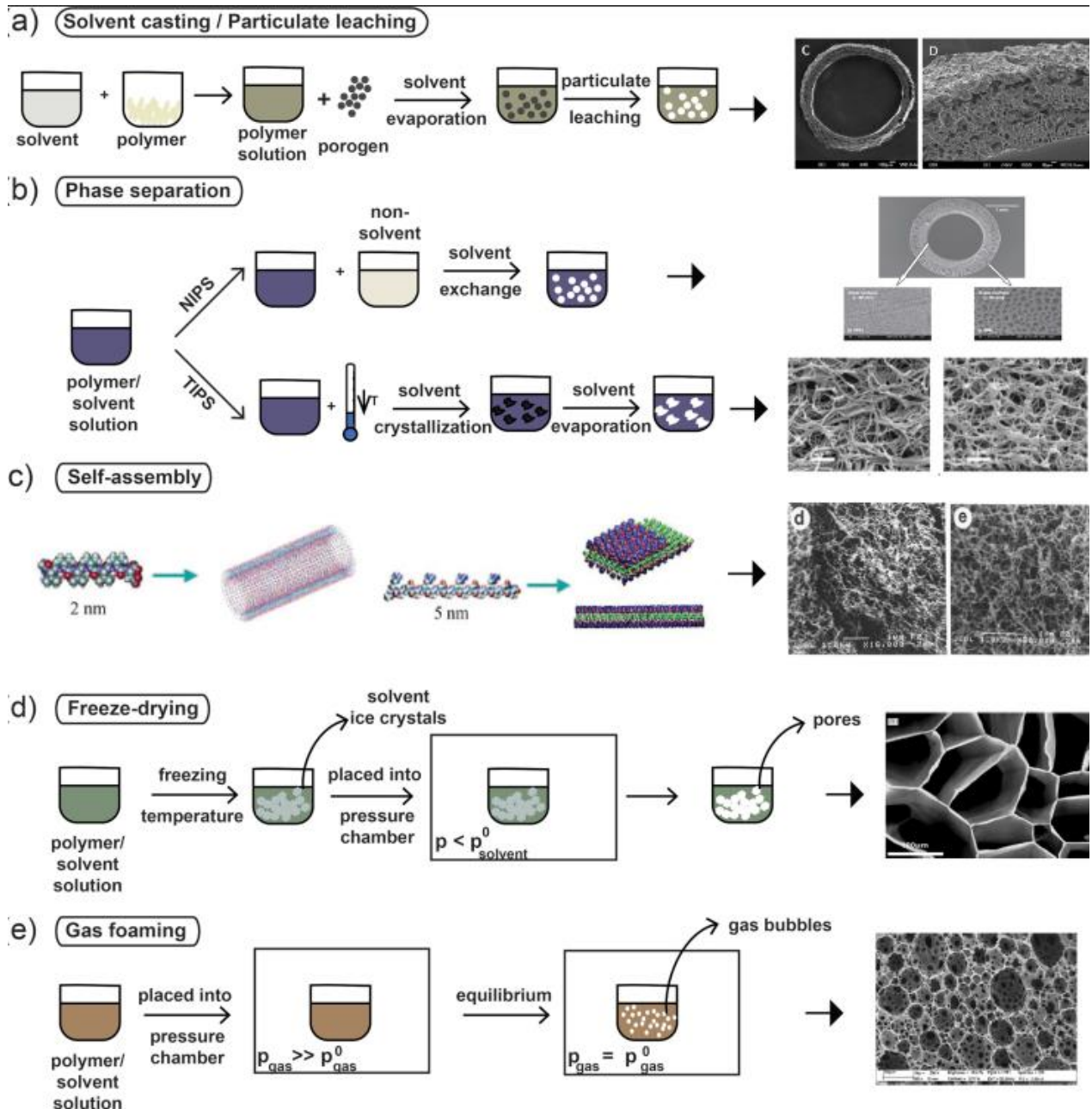
- 1) raffreddamento della soluzione a basse temperature (tra -70 e -80 ° C);
- 2) asciugatura primaria (durante la quale la pressione viene ridotta fino a pochi millibar) e rimozione del ghiaccio per sublimazione;
- 3) asciugatura secondaria, in cui viene rimossa l'acqua rimanente per desorbimento.

Questo metodo viene usato anche in combinazione con l'elettrospinning (processo di cui si parlerà in seguito) per migliorare le proprietà e le caratteristiche della matrice.

Grazie a questa tecnica si possono ottenere scaffold porosi direttamente, senza il bisogno di additivi o altri trattamenti secondari e, inoltre, il materiale ottenuto diventa più appropriato per l'applicazione biomedica in quanto non vengono utilizzati solventi organici. Tuttavia, questo metodo risulta difficile da sfruttare nella formazione di sistemi vascolarizzati [17].

#### *2.3.5 Gas foaming*

Nella tecnica del gas foaming, un gas come la CO<sub>2</sub> viene adoperato per creare delle strutture porose, evitando così l'impiego di solventi organici. Purtroppo, però, questo processo presenta degli svantaggi, quali un'eccessiva produzione di calore, una porosità assente nella superficie e un'inferiore quantità di colonizzazione cellulare poiché i pori non sono interconnessi [21].



**Figura 2.3:** Alcuni metodi di fabbricazione degli scaffold [22].

### 2.3.6 Elettrospinning

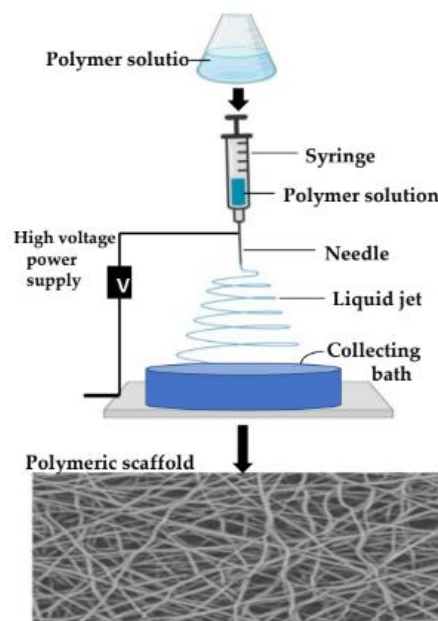
L'elettrofilatura (elettrospinning) permette di ottenere strutture con diametro delle fibre, porosità e morfologia variabili, incorporando anche molecole bioattive, per migliorare la funzionalità del materiale. Queste caratteristiche dipendono da parametri quali viscosità, conducibilità, tensione superficiale della soluzione polimerica, campo elettrico e distanza tra punta e collettore.

Questo processo prevede l'utilizzo di una siringa con un ago metallico, un collettore rotante e un alimentatore ad alta tensione (Figura 2.4).

L'alimentatore ad alta tensione genera una differenza di potenziale che viene applicata tra la punta dell'ago e il raccoglitore, dando origine così ad un campo elettrico. Con l'aumento della tensione elettrostatica, la soluzione polimerica inizia a formare una struttura conica (cono di Taylor) e, una volta raggiunto un valore critico, l'intensità del campo elettrico diventa maggiore della tensione superficiale del polimero e questo viene espulso e depositato sul collettore. Durante il deposito del polimero si verifica anche l'evaporazione del solvente.

Un grande vantaggio dell'elettrospinning consiste nel fatto che crea sul polimero una topografia che sostiene e aiuta l'adesione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule; il tutto favorisce un trasporto più efficiente dei nutrienti e dei metaboliti. Con l'elettrospinning si possono inoltre ottenere supporti con estesa area di superficie per l'adesione cellulare.

Alcuni difetti di questa tecnica sono però: proprietà meccaniche del prodotto inadeguate, l'utilizzo di solventi tossici, una produzione piuttosto lenta, controllo scarso nella microstruttura, difficoltà a formare strutture 3D [5] [6] [17].



**Figura2.4:** Illustrazione dell'elettrospinning [5].

### 2.3.7 3D printing

La stampa 3D è stata introdotta da pochi anni nel mondo della TE; presenta dei vantaggi rispetto agli approcci convenzionali, in quanto permette un buon controllo degli aspetti strutturali, come la porosità e le dimensioni dello scaffold; essa consente un'ottima precisione e riproducibilità.

Esistono ad oggi due tipologie diverse di approcci della stampa 3D nella TE:

- fabbricazione di strutture acellulari 3D, sulle quali successivamente vengono coltivate e fatte crescere le cellule;
- la bio-stampa (bioprinting), che produce scaffold già caricati di cellule mediante l'utilizzo di bioinchiostri.

Tra i limiti di questa tecnica ci sono i costi dei macchinari e la disponibilità limitata di materiali adatti alla stampa [6].

## 2.4 Nanotecnologie

La nanotecnologia è una scienza che viene sfruttata in molti campi, tra cui l'elettronica, la scienza ambientale, chimica e in ambito medico per l'ingegneria tissutale.

Le proprietà chimiche, fisiche, ottiche ed elettroniche delle strutture ottenute dalla nanotecnologia (nanostrutture) dipendono molto dalle loro caratteristiche morfologiche e compositive. Grazie a queste proprietà, i prodotti delle nanotecnologie sono anche stati introdotti recentemente come agenti di miglioramento del contrasto nelle tecniche di imaging a fluorescenza, nel settore fotoacustico, nel campo degli ultrasuoni e nella tomografia computerizzata [23].

Gli elementi chiave di questa branca sono i nanomateriali, cioè materiali di dimensione inferiore ai 100 nm; su questa scala, le proprietà cambiano e migliorano. Si verifica, infatti, un aumento dell'area superficiale; questo comporta la presenza di atomi instabili caratterizzati da elevata energia superficiale; essi si legano dunque più facilmente con atomi esterni [24].

I nanomateriali possono essere classificati in base alle dimensioni:

- 1) zero-dimensionali, di cui fanno parte le nanoparticelle (nanoparticles, NP) poiché tutte e tre le dimensioni sono sulla scala del nanometro;
- 2) mono-dimensionali, in cui una sola dimensione è nella scala del nanometro. Appartengono a questa categoria nanotubi, nanofili (nanowires, NW) e nanofibre;
- 3) bi-dimensionali, in cui solamente una delle tre dimensioni è oltre il range e comprendono nanostrati e nanofilms;
- 4) tre-dimensionali (3D), costituiti da gruppi di nanostrutture diverse poiché mettono insieme nanomateriali 0D, 1D e 2D. Ne fanno parte nanocompositi, fasci di nanotubi o di nanofili.

I nanomateriali presentano buone potenzialità, come le nanoparticelle in oro che sono state studiate per inibire la neovascolarizzazione nei casi di degenerazione della macula [23][25].

Le nanoparticelle vengono sfruttate molto anche come carrier per la prevenzione, il monitoraggio e il trattamento della DR e hanno mostrato grandi vantaggi nella diagnosi precoce,

un'invasività minima nei trattamenti e nel trasporto dei farmaci attraverso la barriera emato-retinica [24].

Per quanto riguarda i materiali monodimensionali, si considerino in particolare i nanofili, che possiedono struttura, morfologia e proprietà di fotoassorbimento e separazione di carica che li fanno somigliare molto a quelle dei fotorecettori. La struttura consente loro non solo di percepire la luce, ma anche di trasferire segnali elettrici ai bastoncelli e ai coni. Per costruire nanofili con queste caratteristiche ottiche risultano essere migliori i materiali siliconici; tuttavia, sono utilizzati anche altri tipi di materiali (Tabella 2.2).

Le nanostrutture ibride portano con sé solamente i vantaggi dei nanomateriali, in quanto unendo diverse tipologie di materiali è possibile migliorare le proprietà e le caratteristiche della struttura, come superficie di adesione, capacità di accumulo di carica e biocompatibilità. Per questo motivo, nel campo della nanoscienza queste strutture sembrano essere la scelta migliore tra quelle descritte sopra [23].

| NANOSTRUTTURA        | NANOMATERIALE  | CELLULA/TESSUTO TARGET  |
|----------------------|--|---|
| Nanoparticelle       | Oro, nanodischi d'oro<br>Argento<br>Magnetite<br>Ossido di ferro supermagnetico  | Retina<br>RPE<br>Mitocondri e nucleo delle cellule retiniche<br>Barriera emato-retinica |
| Nanofili             | PCL<br>Fosforo di Gallio<br>Silicio n-type<br>Nanotubi d'oro   | Cellule retiniche<br>Fotorecettori  |
| Nanostrutture ibride | NP in oro rivestite in ossido di titanio<br>NP in oro rivestite con NW in silicio<br>Nanotubi in carbonio rivestiti in oro<br>Ossido di iridio combinato con ossido di grafene ridotto | Fotorecettori<br>RGC<br>Cellule bipolari<br>Spazio sottoretinico                        |

**Tabella 2.2:** Alcuni materiali sperimentati per le nanostrutture e i target di utilizzo per la rigenerazione retinica. Tabella creata da una sintesi e rielaborazione dell'originale [23]

C'è poi un altro tipo di nanomateriale da considerare: le nanofibre. Il vantaggio di queste, rispetto a tutti gli altri nanomateriali, è che presentano alta porosità, aree di superficie ampie, proprietà meccaniche e morfologiche modificabili e aggiustabili in base alla necessità.

Le nanofibre possono essere utilizzate per la distribuzione locale, orale e intradermica di farmaci; quelle più corte possono essere iniettate direttamente nelle aree malate.

La loro versatilità di utilizzo le rende un promettente approccio per superare alcune difficoltà spesso riscontrate da altre terapie, in quanto l'occhio presenta molte barriere naturali che lo proteggono da sostanze estranee e quindi anche da numerosi farmaci iniettabili direttamente [17].



Nonostante l'evoluzione e il continuo aggiornamento nel campo della nanomedicina e dei nanomateriali, ci si trova ancora alle fasi iniziali. Prima di arrivare all'utilizzo clinico è necessario uno studio più approfondito sulle conseguenze, la farmacocinetica e farmacodinamica di questi trattamenti [24].

## Capitolo 3: casi di studio

Negli ultimi 20 anni sono state svolte numerose sperimentazioni per cercare i migliori biomateriali da utilizzare per la rigenerazione retinica; tuttavia, la maggior parte di questi studi si ferma al modello in vitro o a quello animale. Di seguito si presentano alcuni casi di studio, tra quelli di maggior interesse, il primo effettuato su animali, gli ultimi due, invece, hanno raggiunto l'approvazione per il trial clinico.

### 3.1 Idrogel alginato-aurina

Lo studio tratta lo sviluppo di un idrogel iniettabile a base di alginato e aurina per il trattamento dell'AMD e la rigenerazione del RPE [26].

L'alginato (più precisamente alginato di sodio, Agn) è un polisaccaride estratto dalle alghe brune, che presenta eccellenti proprietà antinfiammatorie e di biocompatibilità. Se viene esposto a cationi bivalenti come  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  è in grado di formare delle strutture di idrogel altamente reticolate, e questo può essere sfruttato per la preparazione di scaffold in cui incorporare anche molecole bioattive per migliorarne le prestazioni.

In questo studio è stata aggiunta all'alginato una molecola impiegata per diverse funzioni biologiche: la aurina (acido 2-aminoetano solfonico, Tr). Si tratta di una sostanza naturale che si trova in diversi tessuti, come cervello, muscoli e tessuti oculari, dove svolge funzioni di osmoregolazione, antiossidazione e mantenimento dell'omeostasi intracellulare. Essa modula anche la proliferazione cellulare e protegge la struttura del tessuto retinico rimuovendo dalle aree di infiammazione le componenti citotossiche.

Sono state valutate le proprietà meccaniche dell'idrogel osservando la porosità e il tasso di rigonfiamento, mentre per le proprietà chimico-fisiche è stata effettuata un'analisi a spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR). Quest'ultima è una tecnica di analisi per la composizione della materia che sfrutta le radiazioni elettromagnetiche dell'infrarosso; l'elaborazione del segnale viene poi eseguita nel dominio delle frequenze.

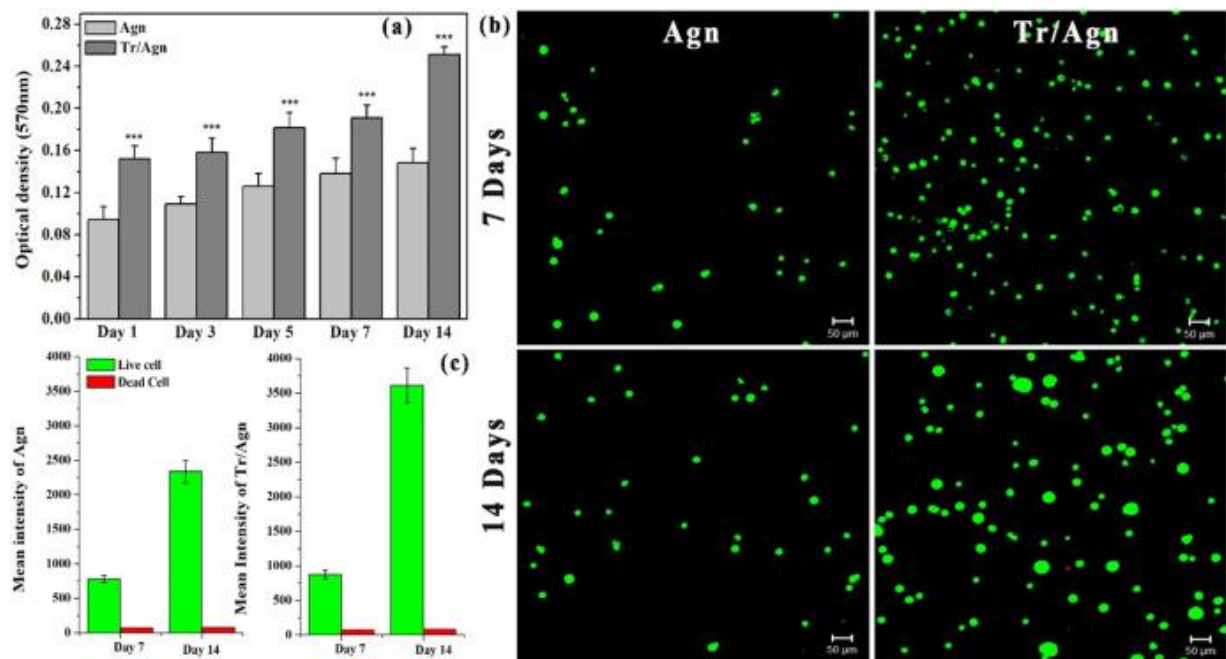
#### 3.1.1 Analisi in vitro

Per valutare l'efficacia di questo biomateriale a base Agn-Tr, cellule RPE di coniglio sono state prelevate e incapsulate all'interno dell'idrogel; si è osservato, poi, come questo ne influenzava la proliferazione, la migrazione e l'espressione genica. Per l'analisi della proliferazione è stato effettuato il saggio MTT, che utilizza la capacità delle cellule vive e metabolicamente attive di trasformare sali di tetrazolio in un prodotto blu, il formazano. Si può eseguire, dunque, l'analisi

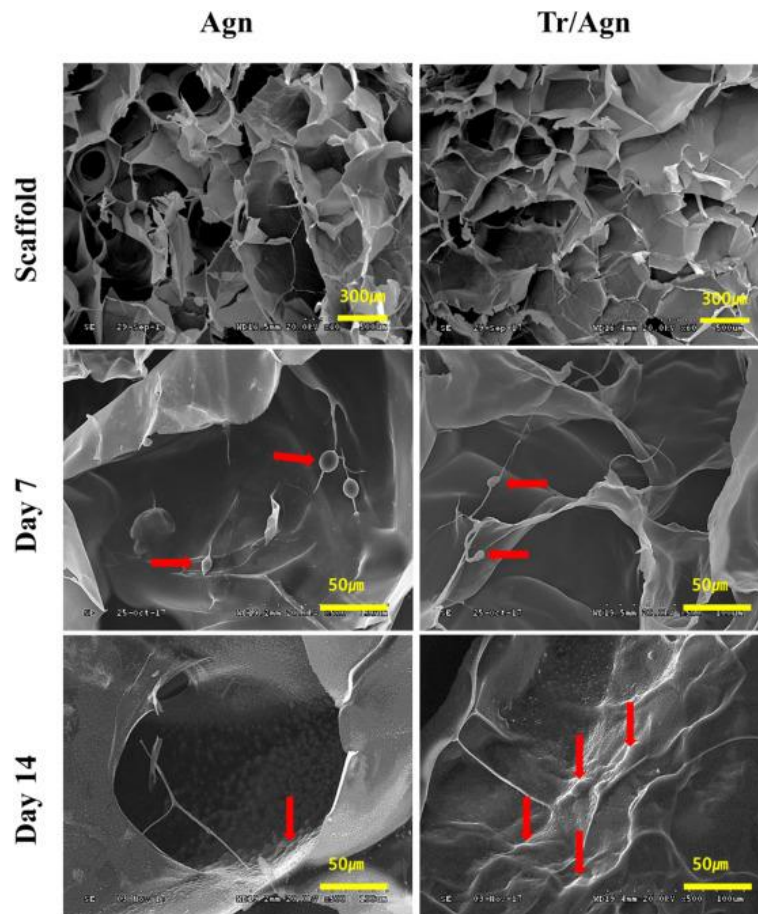
della densità dell'occhio correlando la quantità di questo prodotto con le cellule vive presenti nell'idrogel (Figura 3.1). Si osserva che la presenza di Tr aumenta la proliferazione delle cellule nell'idrogel a base Agn-Tr, rispetto al solo Agn, confermando il ruolo bioattivo della taurina all'interno di questo materiale.

Un'analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM) della morfologia superficiale dei due idrogel dimostra anche una maggiore influenza positiva della Tr sull'adesione e migrazione cellulare (Figura 3.2).

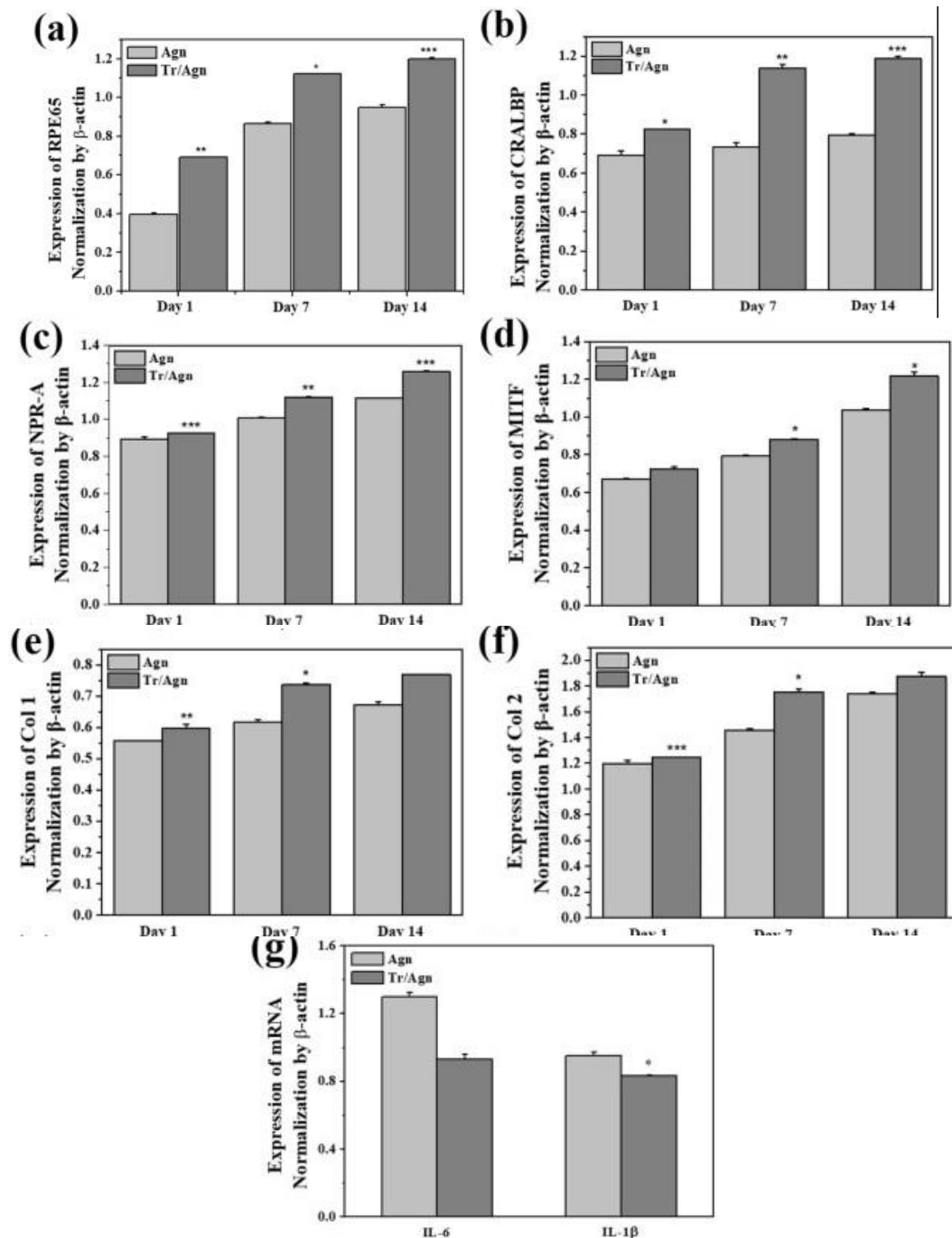
Dall'analisi dell'espressione genica del tessuto RPE si nota un netto miglioramento dovuto alla presenza della Tr nell'idrogel (Figura 3.3, a-f) e, in aggiunta, è possibile osservare la sua azione antinfiammatoria poiché le interleuchine IL-6 e IL- $\beta$  (molecole coinvolte nelle reazioni immunitarie) risultano avere un'espressione inferiore nel caso della presenza di questa molecola bioattiva (Figura 3.3, g).



**Figura 3.1:** Influenza della taurina sulla proliferazione cellulare a 7 giorni e a 14 giorni dall'inizio della coltura. (a) Densità ottica: confronto tra idrogel Agn e idrogel Agn-Tr. (b) Colorazione in verde delle cellule vive, in rosso per le cellule morte. (c) Analisi quantitativa delle cellule vive/morte con idrogel Agn confrontando l'intensità media con idrogel Agn-Tr.



**Figura 3.2:** Immagini SEM delle superfici porose degli idrogel Agn e Agn-Tr (senza cellule, a 7 e 14 giorni dall'inizio della coltura). Le frecce rosse indicano le cellule che hanno aderito alla superficie dello scaffold.



**Figura 3.3:** Variazioni dell'espressione dei geni (a-f) e delle interleuchine (g) del tessuto retinico a 1, 7 e 14 giorni da inizio cultura. Si notano differenze tra idrogel di puro Agn e idrogel Agn-Tr.

Dopo i risultati positivi e promettenti ottenuti dall'analisi in vitro, si è passati ai test in vivo, per studiare l'interazione del materiale con l'organismo.

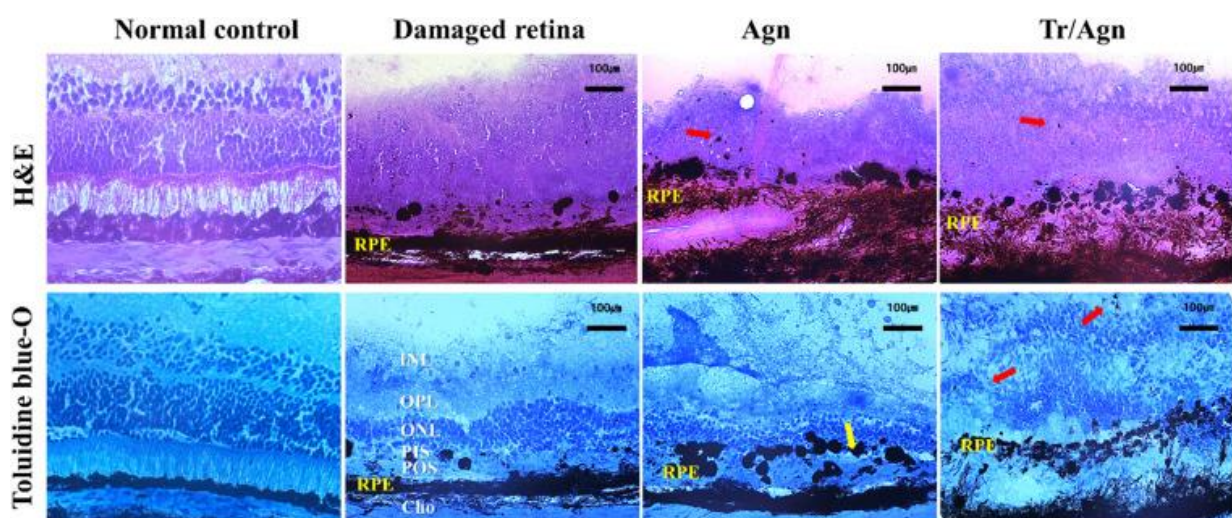
### 3.1.2 Analisi in vivo

Nell'analisi in vivo è stata valutata la biocompatibilità degli idrogel. Questi, contenenti le cellule di RPE, sono stati innestati per via sottocutanea in alcuni topi che non hanno mostrato

particolari reazioni avverse all'impianto (come edema o essudato) o necrosi cellulare, indicando un buon livello di biocompatibilità dello scaffold.

Per la valutazione dell'efficacia dell'idrogel nella rigenerazione di tessuto RPE, è stata indotta una morte progressiva delle cellule RPE tramite l'iniezione di ioduro di sodio nella retina di diversi conigli. L'analisi istologica dei tessuti RPE dei conigli, dopo l'iniezione, mostra che:

- l'Agn puro porta ad una proliferazione e distribuzione delle cellule migliori rispetto all'idrogel Agn-Tr; tuttavia, rimangono delle regioni ancora danneggiate (Figura 3.4);
- la presenza della Tr assieme ad Agn porta ad una rigenerazione del tessuto più completa e compatta.



**Figura 3.4:** Immagini con colorazioni H&E e toluidina blu-O dei cambiamenti istologici nel tessuto retinico di coniglio, con impianto Agn e con impianto Agn-Tr. Le frecce rosse indicano la presenza di cellule ectopiche, un potenziale problema se queste migrano in altre zone. Le frecce gialle indicano le cellule RPE rigenerate. Cho: coroide, INL: strato nucleare interno; OPL: strato plessiforme esterno; ONL: strato nucleare esterno; PIS: segmento interno dei fotorecettori e POS: segmento esterno dei fotorecettori.

### 3.2 Membrana in parilene

Il successivo studio clinico [27] riguarda l'applicazione di un impianto formato da due componenti:

- un monostrato di cellule RPE differenziate a partire da cellule staminali embrionali allogeniche;
- membrana di parilene ultrasottile utilizzata come scaffold.

Questo impianto, progettato per coprire tutta la superficie della macula, con circa 100.000 cellule, è stato innestato in 15 soggetti affetti da GA (grado avanzato di una AMD, in questo caso senza neovascolarizzazione) di età media attorno ai 78 anni.

Tutti i pazienti dello studio sono stati sottoposti ad analisi di tipizzazione molecolare per l'identificazione dei geni appartenenti al sistema HLA (human leukocyte antigens), in tal modo si è potuta valutare la compatibilità con le cellule staminali differenziate. L'HLA rappresenta una parte importante del sistema immunitario umano e comprende due classi principali (classe 1 e 2) di molecole coinvolte nel riconoscimento ed eliminazione di cellule estranee, infettate da virus o tumorali.

I risultati dei test genetici hanno mostrato che tutte le persone sottoposte al trial presentavano più della metà degli antigeni HLA non corrispondenti a quelli delle cellule staminali e non è stato effettuato alcun tentativo per ottenere delle migliori corrispondenze.

Per favorire l'integrazione dell'impianto i soggetti hanno ricevuto un breve ciclo di immunosoppressione postoperatoria di soli 60 giorni con tacrolimus a basso dosaggio.

### *3.2.1 Analisi del paziente 125*

Il soggetto 125, una donna di 84 anni deceduta a causa di una polmonite dopo 2 anni dall'inserimento dell'impianto, è stato sottoposto ad alcune analisi post mortem per valutare l'innesto RPE e i cambiamenti conseguenti. Prima di tutto, l'impianto ha mantenuto la sua pigmentazione durante tutto il periodo del trial e nel sito di innesto non furono trovate zone di lesioni o anomalie anatomiche.

In Figura 3.5 (A, B) sono visibili le regioni di depigmentazione (zone di colore più chiaro rispetto al tessuto circostante) prima dell'operazione, mentre nelle immagini raccolte dopo un anno si nota, in corrispondenza dell'innesto, la presenza di cellule pigmentate; queste si possono vedere anche nella parte inferiore della membrana: ciò suggerisce una certa disorganizzazione nella struttura della retina (Figura 3.6 A).

Le analisi istologiche non hanno evidenziato una proliferazione cellulare effettiva nell'impianto, né la presenza di nuclei dei fotorecettori; sono state rilevate, tuttavia, delle regioni positive alla colorazione della rodopsina, associata, in genere, proprio ai fotorecettori. Si sono osservate anche delle piccole inclusioni, collegate alla presenza di fagosomi con rodopsina, che suggeriscono una buona funzionalità delle cellule RPE impiantate (Figura 3.6 G).

Il buon funzionamento dello scaffold è confermato anche dalle immagini ad immunofluorescenza (Figura 3.6 B, C) che mostrano cellule immunoreattive al gene RPE65 e alla  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi, un enzima che nella retina indica una polarizzazione del RPE.

L'analisi istologica ha mostrato però la presenza di gliosi diffusa nella retina di entrambi gli occhi del paziente (Figura 3.7 A, D), che può essere ricondotta ad una reazione al biomateriale

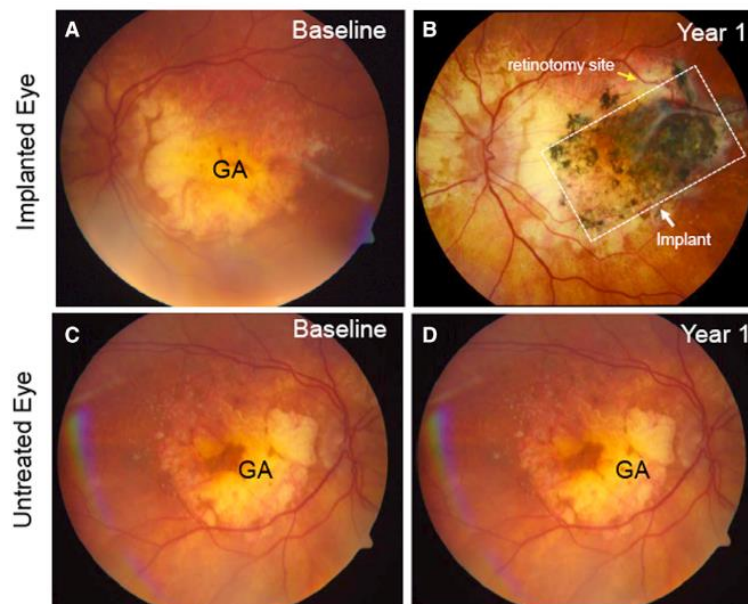
(una specie di reazione di difesa che coinvolge le cellule della glia). Tuttavia, non è stata rilevata la presenza di gliosi nello strato sottostante all'impianto.

Nonostante la gliosi, una mancanza di corrispondenza HLA e un'immunosoppressione a breve termine, non sono mai state rilevate prove di infiammazione intraoculare, infiltrato infiammatorio, retinite o reazioni immunitarie eccessive (solo un soggetto ebbe una risposta anticorpale debole).

La colorazione per CD34 (Figura 3.7 C, F), marcatore di cellule endoteliali, ha evidenziato la presenza di canali vascolari proprio inferiormente all'impianto. Questo suggerisce che il tessuto RPE del donatore potrebbe promuovere la formazione di una rete vascolare altamente localizzata per sostenere la funzione dell'innesto, attraverso il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), un prodotto secretorio delle cellule RPE.

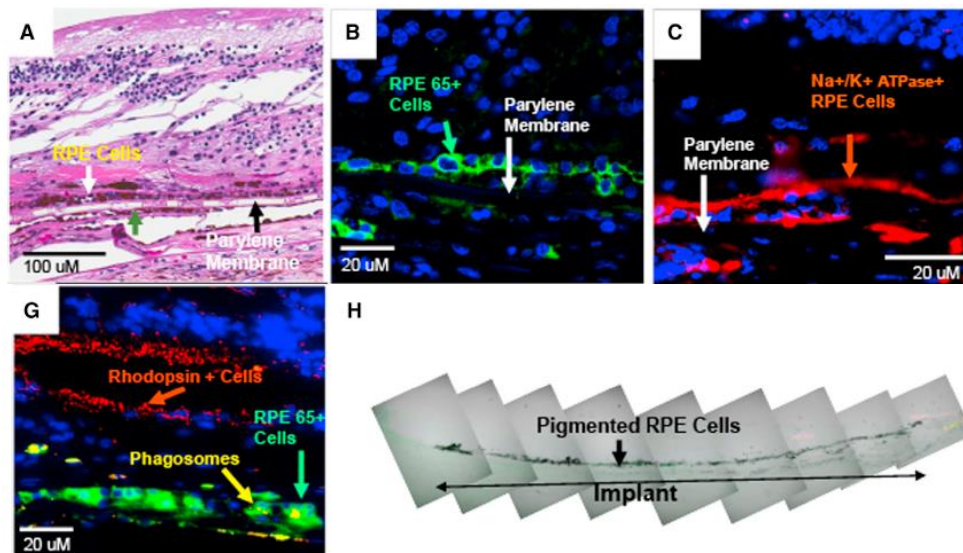
Ci sono, però, altri fattori, non visibili nelle analisi effettuate, che potrebbero aver contribuito alla sopravvivenza delle cellule RPE:

- (1) l'uso del parilene, che è un materiale biocompatibile;
- (2) un approccio chirurgico che minimizza le dimensioni dell'incisione retinica, e quindi diminuisce la probabilità di lesioni da intervento;
- (3) il fatto che i soggetti fossero affetti da NNAMD (AMD senza neovascolarizzazione) in cui la barriera ematoretinica è meno compromessa rispetto alla AMD.



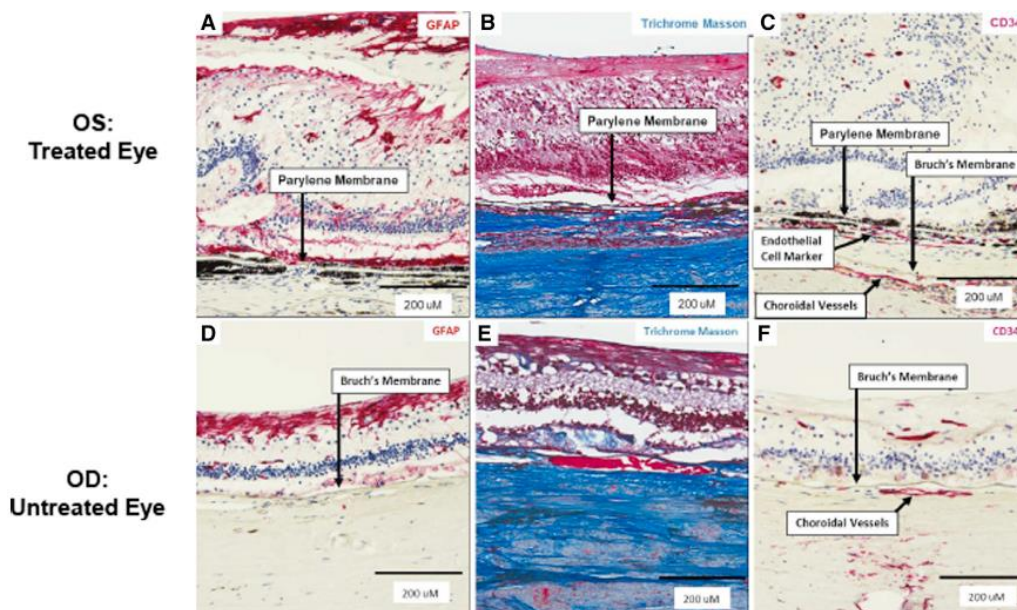
**Figura 3.5:** Fondo oculare dell'occhio trattato (A, B) e non trattato (C, D) del paziente 125 prima dell'operazione e a distanza di un anno. La freccia bianca indica l'impianto mentre la freccia gialla indica il sito della retinotomia.





**Figura 3.6:** Analisi istologica paziente 125 a 2 anni dall'innesto.

(A) Colorazione H&E della retina con l'innesto: si nota un monostrato di cellule RPE (freccia bianca) associato al substrato di parilene (freccia nera). Si notano delle cellule cresciute anche inferiormente (freccia verde).  
 (B) e (C) Immunofluorescenze che mostrano la presenza di cellule immunoreattive a RPE65 e  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi.  
 (G) Immunofluorescenza che mostra la presenza di cellule con rodopsina e strutture simili a fagosomi.  
 (H) Immagine in contrasto di fase della zona dell'innesto che indica la presenza di cellule pigmentate lungo tutto il substrato di parilene.



**Figura 3.7:** Istopatologia dell'innesto del soggetto 125 dopo 2 anni. (A) e (D) Gliosi evidenziata da colorazione rossa per la presenza di proteina acida fibrillare gliale (GFAP) solo sopra alla membrana. (B) e (E) Colorazione tricromica di Masson evidenzia presenza di collagene (blu) sotto l'innesto. (C) e (F) Colorazione al marcatore CD34 evidenzia presenza di strutture vascolari e vasi nativi sotto la BrM.

### 3.3 Cerotto in PET ricoperto con vitronectina

Questo trial si pone come obiettivo lo studio di un patch (un cerotto) per il trattamento di soggetti con AMD umida grave [28]. Il cerotto è costituito da un monostrato di tessuto RPE derivato da cellule staminali embrionali, supportato da una membrana basale sintetica di

polietilentereftalato (PET, un polimero termoplastico) e rivestita da vitronectina (una glicoproteina presente nel plasma sanguigno e nella matrice extracellulare).

Prima dell'approvazione della sperimentazione su uomo, furono effettuati i necessari test su topi per osservare la tumorigenicità dello strato cellulare e su suini per studiare la fattibilità chirurgica, la sicurezza della somministrazione, la biodistribuzione e la tossicità del cerotto. Il trial clinico è poi stato approvato ed eseguito su 10 persone; tuttavia, vengono mostrati solo gli esiti raccolti dalle analisi dei primi due pazienti.

I risultati riguardano una donna di 60 anni (soggetto 1) e un uomo di 84 (soggetto 2), entrambi con una diagnosi di AMD umida, una emorragia sub-maculare e una capacità visiva in peggioramento.

### *3.3.1 Studio in vivo sui suini*

Sono stati selezionati per questo scopo una ventina di suini poiché le dimensioni dei loro occhi, molto simili a quelle degli uomini, sono ottimali per gli scopi della ricerca.

Un primo studio ha mostrato un buon mantenimento delle cellule RPE umane trapiantate e, in aggiunta, si è notata anche una buona sopravvivenza dei fotorecettori. Nessuno dei soggetti coinvolti ha mostrato significativi segni di rigetto o reazioni avverse, nonostante sia stata applicata solamente una breve immunosoppressione a base di prednisone orale nel periodo prossimo e seguente l'operazione.

Uno studio successivo risulta interessante poiché l'intervento di inserimento dello scaffold con le cellule staminali è stato eseguito con la stessa procedura del successivo trial clinico su pazienti. È stato utilizzato uno strumento chirurgico specifico con un supporto sulla punta atto all'inserimento dei cerotti nello spazio sotto retinico; questo è avvenuto correttamente in 20 suini, la metà dei quali ha ricevuto l'innesto con le cellule staminali, mentre la restante parte ha ricevuto solamente il substrato di materiale sintetico.

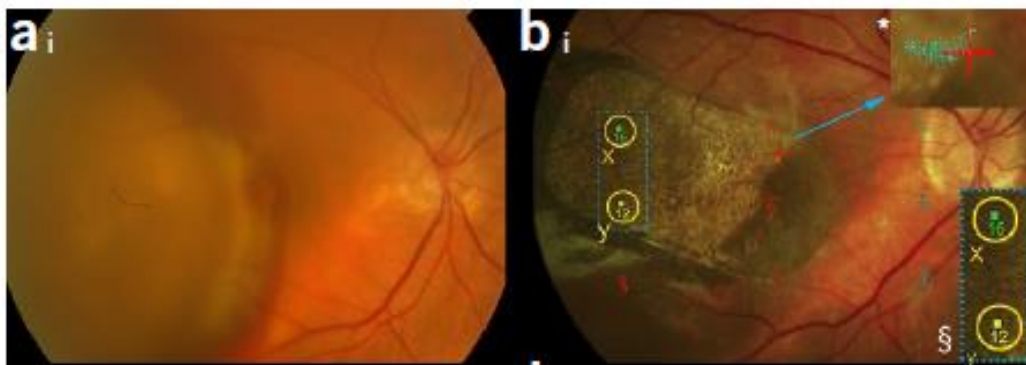
I soggetti che hanno ricevuto l'impianto con le cellule hanno mostrato una buona copertura di tessuto dopo 6 settimane ma, a lungo termine, si sono registrate delle complicazioni in due animali: un caso di distacco della retina e uno di rottura della capsula del cristallino.

In generale, però, è stata registrata una risposta immunitaria minima all'innesto e la presenza delle cellule RPE staminali ha favorito un mantenimento dei fotorecettori e una minore atrofia retinica rispetto alla sola membrana. L'impianto della membrana senza cellule ha portato, invece, ad una reazione da corpo estraneo ed una sopravvivenza cellulare più bassa.

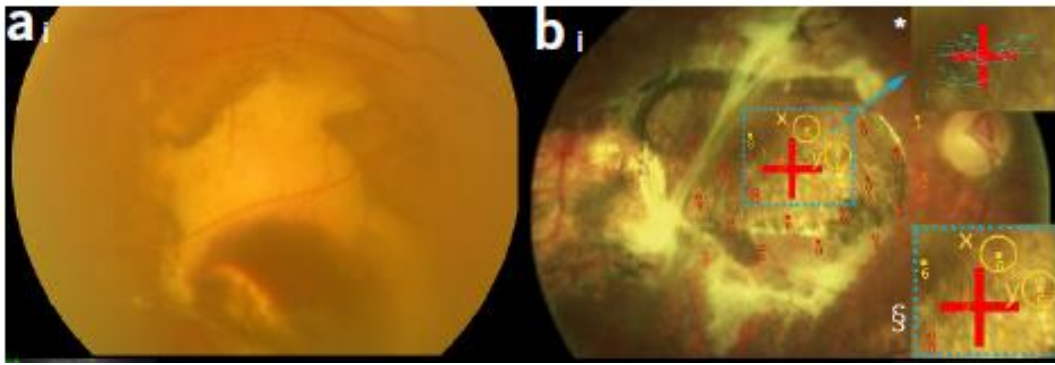
L'analisi quantitativa della catena della polimerasi (o qPCR) sulla biodistribuzione delle cellule nei suini a 26 settimane dall'impianto, non ha mostrato in nessun caso prove che le cellule migrassero o sopravvivevano lontano dal sito di somministrazione.

### 3.3.2 Sopravvivenza del tessuto RPE nei soggetti umani 1 e 2

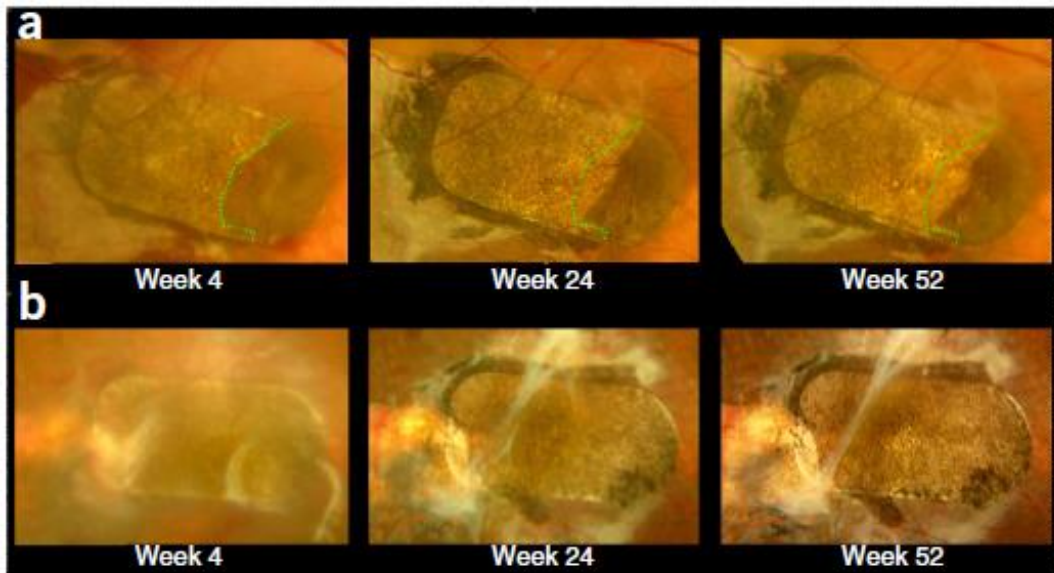
Dopo gli interventi chirurgici di impianto dei cerotti, si è focalizzata l'attenzione nei due soggetti presentati in precedenza. Il cerotto RPE si è mantenuto intatto per tutto il periodo di osservazione (12 mesi), come dimostrato dalle analisi eseguite e dalle fotografie colorate (Figure 3.8, 3.9 e 3.10), in cui si nota la presenza e l'espansione delle cellule RPE pigmentate. Sono visibili aree più scure contigue al cerotto, che potrebbero rappresentare la migrazione delle cellule RPE dal sito dell'innesto verso aree adiacenti. Questa migrazione è avvenuta nei primi 6 mesi dall'intervento chirurgico, prima della stabilizzazione (Figura 3.10).



**Figura 3.8:** Soggetto 1. Immagini pre e post-operatorie dell'innesto con risultati strutturali e funzionali a 12 mesi dall'intervento. (a, i) Fondo oculare che mostra estesa emorragia sub-RPE e sottomaculare sotto la fovea prima dell'operazione. (b, i) Fondo oculare dopo 12 mesi che mostra l'innesto ricoperto da cellule pigmentate. Si vedono anche i risultati della microperimetria (test diagnostico utilizzato per valutare la sensibilità e la funzione della retina, in particolare della macula): due aree di sensibilità indicate con x e y, dove i cerchi indicano l'entità dello stimolo visivo (ciascuno stimolo è indicato nell'immagine con un puntino luminoso). Si nota che questo coincide con una parte dell'impianto.



**Figura 3.9:** Soggetto 2. Immagini pre e post-operatorie dell'innesto con risultati strutturali e funzionali a 12 mesi dall'intervento. (a, i) Fondo oculare che mostra estesa emorragia sub-RPE e sottomaculare sotto la fovea prima dell'operazione. (b, i) Fondo oculare dopo 12 mesi che mostra l'innesto ricoperto da cellule pigmentate. È presente un'estesa fibrosi associata probabilmente anche al distacco della retina, che tuttavia è stata riattaccata con successo. Si vedono anche i risultati della microperimetria: due aree di sensibilità indicate con x e y, dove i cerchi indicano l'entità dello stimolo visivo (ciascuno stimolo è indicato nell'immagine con un puntino luminoso). Si nota che questo coincide con una parte dell'impianto.



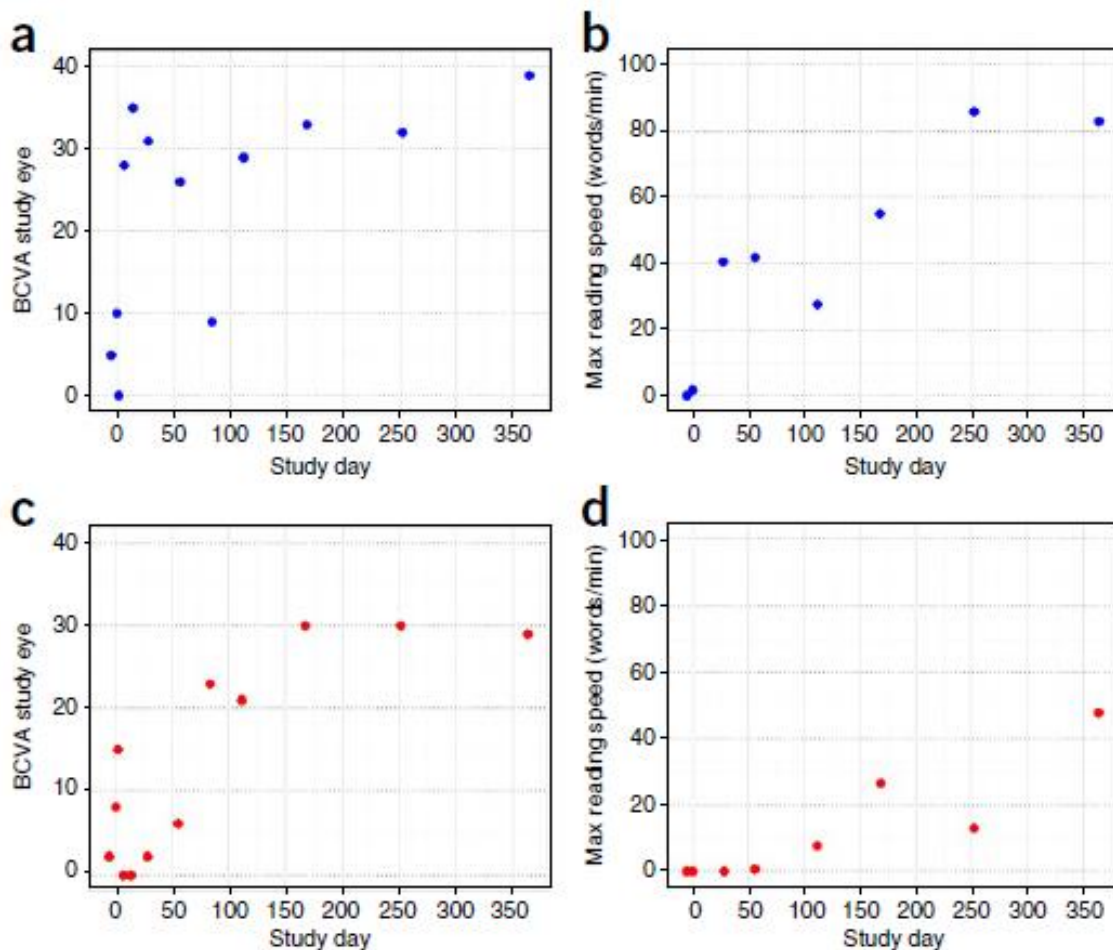
**Figura 3.10:** Sequenze di fotografie a colori dell'innesto nei soggetti 1 e 2.  
a) Sequenza del soggetto 1 a 4, 24 e 52 settimane: si nota l'espansione delle aree pigmentate (zone più scure) attorno al cerotto e la loro stabilità. Il tratteggio colorato indica una regressione del tessuto RPE nativo.  
b) Sequenza del soggetto 2 a 4, 24 e 52 settimane: si nota l'espansione delle aree pigmentate (zone più scure) attorno al cerotto e una relativa stabilità. È chiaramente visibile anche una progressiva fibrosi.  
In entrambi i soggetti, comunque, l'espansione si è stabilizzata dopo 24 settimane.

### 3.3.3 Capacità visive migliorate nei soggetti umani 1 e 2

Il paziente 1 ha riconosciuto che la sua vista è migliorata rispetto allo stato preoperatorio e che poteva vedere le lettere e leggere direttamente con visione centrale; tuttavia, ha descritto una distorsione fastidiosa, simile a quella sperimentata dai pazienti che hanno avuto un precedente distacco di retina o AMD umida.

Il secondo paziente ha descritto la sua capacità visiva come in continuo miglioramento, ma ha anche descritto una vista, comunque, più debole rispetto a prima di contrarre la malattia. Questo potrebbe essere dovuto ad una durata della malattia maggiore rispetto al primo soggetto, e con una neuroretina più danneggiata.

È stata effettuata un'analisi per verificare la migliore acuità visiva corretta (Best-Corrected Visual Acuity, BCVA) utilizzando la tabella per il trattamento precoce della retinopatia diabetica (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study, ETDRS) e la velocità di lettura, misurandola con il test MNRead dell'Università del Minnesota (Figura 3.11). Nel soggetto 1 la BCVA è migliorata in 12 mesi da 10 a 39 lettere e la velocità è passata da 1,7 a 82,8 parole/minuto; nel soggetto 2 invece, la BCVA è aumentata da 8 a 29 lettere e la velocità di lettura da 0 a 47,8 parole/min.



**Figura 3.11:** Esiti dei test di acuità visiva corretta e velocità di lettura nei soggetti 1 e 2.

- (a) BCVA nei 12 mesi per il paziente 1.
- (b) Velocità di lettura nei 12 mesi per il paziente 1.
- (c) BCVA nei 12 mesi per il paziente 2.
- (d) Velocità di lettura nei 12 mesi per il paziente 2.

#### *3.3.4 Problemi e considerazioni*

Nel corso del trial si sono verificati due eventi avversi gravi nel soggetto 2, che però non sono dovuti all'innesto:

- 1) peggioramento del diabete di tipo 2 a causa del trattamento immunosoppressivo a base di prednisone e steroidi intraoculari. Ha richiesto una cura con farmaci ed un aumento di insulina per riportare la glicemia a livelli normali;
- 2) distacco della retina, dovuto forse ad una vitreoretinopatia proliferativa (PVR), cioè ad una formazione di cicatrici sul tessuto retinico. Si sono resi necessari diversi interventi chirurgici per il trattamento della PVR che non hanno intaccato l'innesto.

I risultati di questi primi due casi a 12 mesi sono preziosi perché il miglioramento della capacità visiva, i dati di imaging e la mancanza di importanti problemi di sicurezza rappresentano grandi progressi a sostegno della terapia rigenerativa basata su cellule staminali embrionali e scaffold di PET e vitronectina. Tuttavia, si rende necessario l'approfondimento con studi ulteriori ed altri test clinici in quanto i dati raccolti si basano su un numero molto ristretto di soggetti e questo rappresenta una evidente limitazione dello studio.

## Capitolo 4: 3D Bioprinting

Lo sviluppo e l'adozione di tecnologie all'avanguardia, come la biostampa 3D (3D bioprinting), stanno rivoluzionando la ricerca scientifica con crescenti applicazioni anche in campo medico. Queste innovazioni offrono un grande potenziale per trattamenti più efficaci, migliori terapie e risultati per i pazienti, e un uso più efficiente delle risorse sanitarie.

### 4.1 Introduzione

Il termine “biostampa 3D” si riferisce ad un particolare metodo di produzione additiva che consiste nella deposizione di bioinchiostri in un'organizzazione spaziale particolare, creando diversi strati, uno sovrapposto all'altro. Per “produzione additiva” si intendono tutte le tecniche di fabbricazione che non prevedono l'asporto di materiale per ottenere il prodotto finito (come con l'uso di frese e torni).

L'approccio innovativo della biostampa 3D consente la creazione di dispositivi protesici ingegnerizzati, che sono costruiti su misura in base alle caratteristiche e necessità del paziente, sfruttando bioinchiostri che contengono elementi funzionali, fattori di crescita e cellule viventi. Questa nuova tecnologia richiede, però, delle particolari attenzioni, soprattutto per la selezione dei biomateriali, che devono avere adeguata stampabilità, biocompatibilità e proprietà meccaniche e strutturali. In particolare, il bioinchiostro deve, essere selezionato tenendo conto del tipo di cellule e della loro sensibilità, perché queste possono variare in base al tessuto o all'organo (o ad una parte di questi) che si vuole riprodurre. Per i tessuti con un'organizzazione strutturale semplice, come la pelle, la biostampa 3D sta avendo notevoli progressi per la produzione di innesti cutanei, e viene già sfruttata nell'industria cosmetica. Ci sono però anche organi più complessi (come cuore, occhio, etc.) che presentano più ostacoli nella riproduzione della composizione [29].

### 4.2 Tecniche di fabbricazione

Come già accennato, la scelta del bioinchiostro risulta un aspetto importante per ottenere un prodotto con caratteristiche ottimali e, nell'oftalmologia, questo viene creato utilizzando principalmente soluzioni a base di idrogel o dECM, poiché sono tra i biomateriali in grado di garantire proprietà biomimetiche. Tuttavia, anche il tipo di tecnica selezionata per la biostampa influisce sul risultato e dipende dal tipo di tessuto che si intende ottenere.

Di seguito si descrivono i principali metodi di 3D bioprinting, che vengono realizzati solamente dopo aver definito un modello 3D tramite particolari software o acquisizione di modelli esistenti.

#### 4.2.1 Bioprinting basato su VP

Questa tecnica di stampa indica un processo che fa uso della fotopolimerizzazione in vasca (photopolymerization vat, VP) e prevede la fabbricazione di strutture tridimensionali utilizzando una reazione di fotopolimerizzazione con una bioresina liquida foto-indurente, che viene esposta a radiazioni luminose di specifiche lunghezze d'onda all'interno di una vasca.

Questa tecnica consiste in tre diversi metodi: la stereolitografia (SLA), l'elaborazione digitale della luce (Digital Light Processing, DLP) e la polimerizzazione a due fotoni (two-photon polymerization, 2PP) (Figura 4.1).

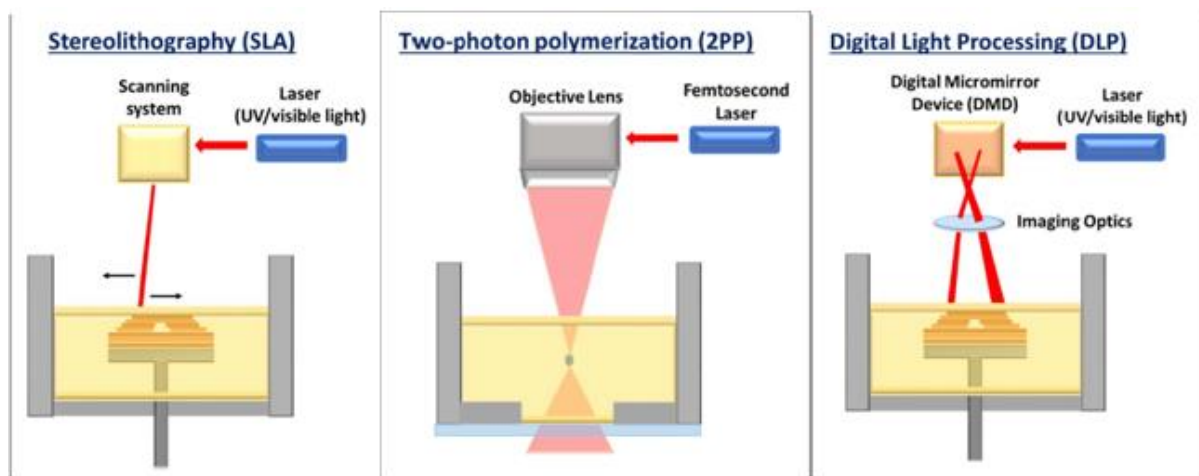


Figura 4.1: Rappresentazione schematica delle tecniche di 3D bioprinting basate su VP [30].

##### 4.2.1.1 Stereolitografia

La *SLA* prevede l'uso di una sorgente laser (o UV) controllata da un computer che esegue la scansione della superficie della bioresina secondo uno schema predefinito (vedi Figura 4.1). Questa scansione fa polimerizzare il materiale ad una certa profondità costruendo, strato dopo strato, la struttura 3D. A seconda della posizione della sorgente, la *SLA* può operare in modalità top-down o bottom-up. Nella modalità top-down, il laser è posizionato direttamente sopra la vasca contenente la bioresina liquida e la piattaforma di stampa; viene polimerizzato uno strato e, completata l'operazione, la piattaforma di stampa viene abbassata nella vasca per passare ad uno strato successivo, ripetendo, poi, la lavorazione fino al completamento della struttura 3D. Nella modalità bottom-up invece, che è più lenta, il laser è posizionato sul fondo della vasca e dopo la prima polimerizzazione la piattaforma di stampa viene sollevata per aggiungere, ogni volta, un nuovo piano, fino ad ottenere la struttura completa.

I due metodi devono garantire un buon legame tra la struttura stampata e la piattaforma di costruzione, allo scopo di ottenere una corretta adesione degli strati; entrambi, inoltre, dovranno



assicurare la rimozione manuale delle strutture di supporto che vengono usate come sostegno temporaneo durante il processo.

La SLA presenta dei vantaggi dal punto di vista strutturale, come un'alta risoluzione, una viscosità variabile a seconda del materiale e un'elevata densità cellulare; d'altra parte, bisogna anche considerare che l'esposizione delle cellule ai raggi UV può essere dannosa per il DNA e causare, dunque, effetti citotossici [31] [30].

#### *4.2.1.2 Digital Light Processing*

La *DLP* è un diverso approccio per la polimerizzazione delle bioresine foto-indurenti, in cui è presente un dispositivo costituito da una serie di micro-specchi (Digital Micro-Mirror Device, DMD), che possono variare la loro inclinazione (in posizione di "On" e "Off") per controllare la proiezione della sorgente luminosa. Questa fa solidificare la resina agendo su un solo strato per volta: si può controllare la profondità della solidificazione modificando l'intensità e la durata dell'esposizione.

Questa strategia rende la *DLP* molto più rapida rispetto ad altre tecniche di biostampa, poiché vengono solidificati strati completi e, grazie al controllo preciso dei DMD, può essere sfruttata per ottenere oggetti dalle strutture dettagliate [30], [31] .

#### *4.2.1.3 Two-photon polymerization*

L'ultima tecnica compresa nelle produzioni a VP è la *2PP*. Questa strategia sfrutta una sorgente luminosa laser nel range dell'infrarosso con un'esposizione di durata misurata in femtosecondi (unità di misura pari a  $10^{-15}$  secondi). Il laser che agisce sulla resina è estremamente controllato e viene focalizzato grazie ad una lente immersa in un olio, mentre la polimerizzazione si verifica quando la molecola del materiale viene eccitata dal suo stato fondamentale assorbendo due fotoni in un intervallo di tempo estremamente breve.

Dato il meccanismo attraverso il quale avviene la stampa è possibile, anche per questa tecnica, ottenere oggetti con una straordinaria precisione e velocità; tuttavia, è necessario considerare che l'elevata potenza del tipo di laser richiesto può danneggiare l'integrità del materiale, portarlo alla degradazione e alla produzione di bolle, compromettendone, quindi, la complessiva qualità [30], [31] .

#### *4.2.2 Bioprinting ad estrusione*

I sistemi di biostampa basati sull'estrusione erogano filamenti continui di un bioinchiostro di cellule e idrogel attraverso un micro-ugello, sfruttando una pressione pneumatica o delle forze meccaniche (pompa a pistone o a vite) per spingere il materiale (Figura 4.2). La quantità di prodotto estruso può essere regolata semplicemente controllando rispettivamente il livello di pressione o lo spostamento del pistone della pompa. Questa tecnica consente di ottenere strutture complesse con elevate densità cellulari e tessuti eterogenei poiché è in grado di incorporare più tipi di cellule contemporaneamente. D'altra parte, però, le cellule stampate attraverso l'estrusione vengono sottoposte a forti stress di taglio che possono comprometterne la sopravvivenza.

È possibile migliorare le prestazioni dell'estrusione progettando dei bioinchiostri con biomateriali adeguati alla tipologia di stampa e che non danneggino la vitalità delle cellule e, dall'altro lato, selezionando in maniera opportuna le dimensioni dell'ugello e i parametri di stampa (come la pressione) [31], [32].

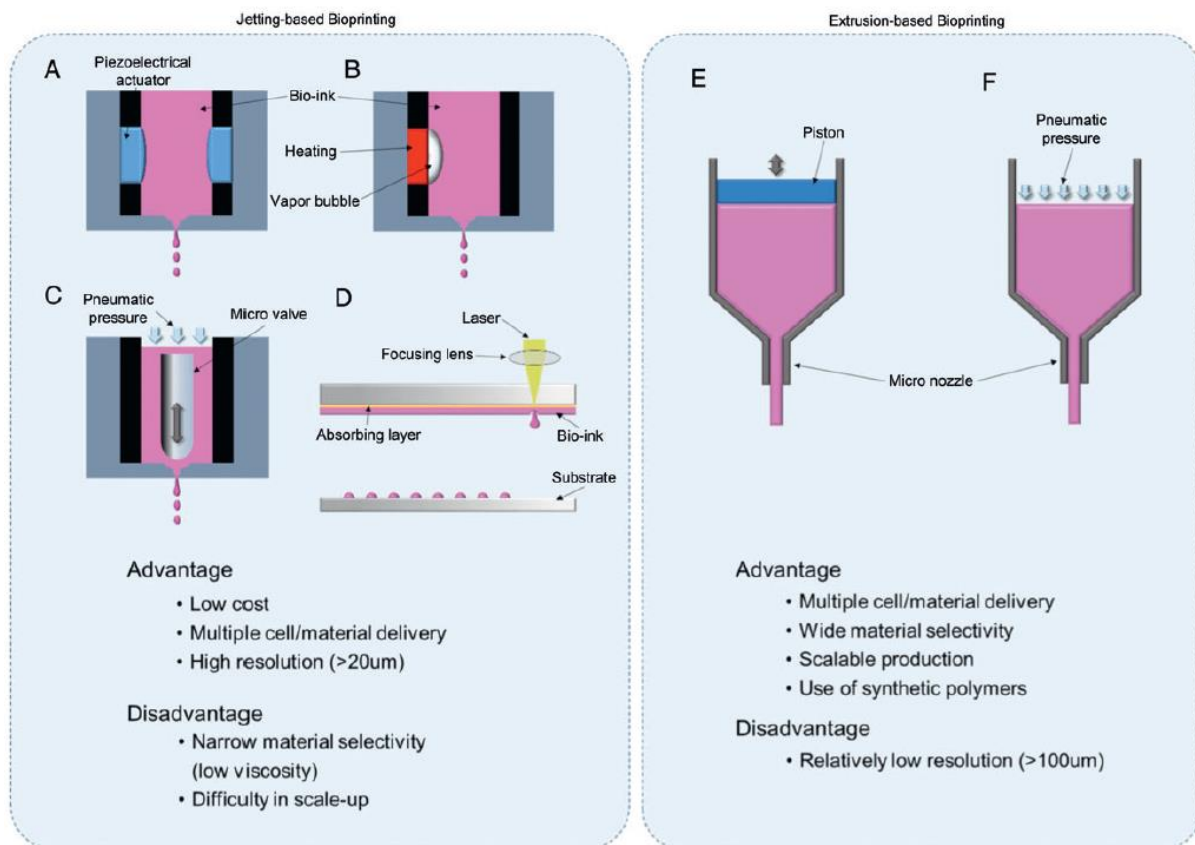
#### *4.2.3 Bioprinting basato su getto/jetting*

La stampa basata sullo jetting comprende diverse tecniche, tra cui: biostampa a getto d'inchiostro, biostampa con microvalvole, biostampa assistita da laser e biostampa acustica. Questi metodi sfruttano una tecnologia definita "drop on demand" (DOD) che consente l'espulsione di goccioline solamente quando un certo segnale raggiunge il valore predefinito; questo consente di avere una modellazione precisa della struttura senza bisogno di un contatto diretto con essa.

Sono diversi i meccanismi impiegati per ottenere le goccioline che verranno depositate: il metodo termico, in cui un elemento funge da generatore di calore e fa vaporizzare il materiale creando le goccioline; il metodo piezoelettrico, che sfrutta la vibrazione di un attuatore piezoelettrico; il metodo a pressione pneumatica, dove la gocciolina viene generata dall'apertura e chiusura di una microvalvola sotto pressione pneumatica costante.

A causa della pressione applicata o delle collisioni del materiale con il substrato dopo l'emissione, le cellule potrebbero danneggiarsi, anche se solamente in piccola parte.

Uno dei principali vantaggi delle tecniche di stampa a getto è relativo alle dimensioni dell'ugello che, essendo molto ridotte, consentono di ottenere un'elevata risoluzione migliorando anche le interazioni tra le cellule che formano il bioinchiostro [31], [32].



**Figura 4.2:** Schematizzazioni delle tecniche di stampa a jetting ed estrusione. La bioprinting basata sul jetting genera goccioline di picolitri contenenti cellule e molecole biologiche tramite: (A) attuttore piezoelettrico, (B) pressione termica, (C) pressione pneumatica e valvola, (D) energia laser focalizzata. La bioprinting basata sull'estrusione eroga filamenti continui di un materiale attraverso un micro-ugello utilizzando il pistone (E), la pressione pneumatica (F) [32].

### 4.3 3D Bioprinting nell'oftalmologia

L'occhio è un organo complesso, costituito da strutture tissutali organizzate in modo specifico e tra loro eterogenee: ad alcune, infatti, relativamente semplici, come la cornea (che può essere biostampata con poca difficoltà) si affiancano strutture più complesse, come la retina. In quest'ultima, l'utilizzo della 3D bioprinting risulta più impegnativo a causa della complessità strutturale, della vasta variabilità di tipi cellulari che la compongono e della presenza di parti direttamente legate al sistema nervoso (il nervo ottico).

Ci sono tuttavia alcuni studi (Tabella 4.1) che hanno cercato di riprodurre, almeno in parte, questa componente oculare e hanno compreso nei bioinchiostri dei polimeri naturali come collagene, gelatina, alginato o acido ialuronico, la cui somiglianza con la matrice extracellulare umana (ECM) e la bioattività intrinseca rappresentano vantaggi rilevanti rispetto agli altri materiali [29]. Ci sono però ancora alcuni passi da compiere per raggiungere uno stato ottimale della 3D bioprinting per l'ingegneria tissutale retinica, ad esempio utilizzare un maggior

numero di cellule di tipo diverso, ottenere un maggior numero di strati, creare materiali con cellule in grado di trasmettere segnali.

| <b>Materiale</b>   | <b>Tecnica</b>  | <b>Cellule</b>                          | <b>Funzione</b>  | <b>Risultati</b>  |
|--|---|---|--|---|
| Terreno DMEM   | Bioprinting piezoelettrico a getto d'inchiostro                           | - (RGC)<br>-Cellule gliali della retina | Studiare l'effetto della tecnica scelta sulla vitalità delle cellule.                      | -Proprietà di sopravvivenza/rigenerazione mantenute simili ai controlli;<br>-Sedimentazione cellulare verificata nell'area dell'ugello  |
| -Alginato e terreno di coltura<br>- PLA disciolto in HFIP e matrigel per elettrofilatura | 3D bioprinting a getto d'inchiostro termico combinata con elettrofilatura | RGC                                     | Sviluppare uno scaffold per fornire cellule progenitrici retiniche correttamente orientate | -Buona vitalità cellulare, orientamento adeguato delle cellule nel modello e guida corretta degli assoni all'interno dell'impalcatura;<br>-Mantenimento delle proprietà elettrofisiologiche funzionali delle cellule dopo la stampa |
| Vetro rivestito con ossido di indio-stagno (ITO)   | Litografia a due fotoni   | iPSC umane                              | Sviluppare uno scaffold per fornire cellule progenitrici retiniche correttamente orientate | - Differenziazione di iPSC in cellule progenitrici della retina e incorporazione di queste ultime nello scaffold;<br>-Formazione di strutture neurali parallele ai pori verticali degli scaffold                                    |
| -DMEM F12<br>-Alginato e Pluronic  | Bioprinting a getto d'inchiostro basata su microvalvole                   | -ARPE-19<br>-Y79                        | Replicazione del tessuto. Retina composta da due strati.                                   | -Struttura formata da un monostrato con cellule ARPE-19 (per BrM e RPE) e un secondo con una linea cellulare di Y79<br>- struttura ottenuta stabile<br>-vitalità non compromessa<br>-Densità cellulare aumentata nel tempo          |
| -HA-GM<br>-PEG-RGDS  | Bioprinting 3D laser assistito  | -RPE<br>-fRPC                           | Replicazione equivalente tissutale. Retina composta da due strati                          | -Struttura composta da due strati: uno che assembla la retina (fRPC) e l'altro che assembla l'RPE.<br>- Buona vitalità cellulare<br>Differenziazione di fRPC in PR (cellule fotorecetrici) all'interno della matrice                |

**Tabella 4.1:** Studi correnti sulla 3D bioprinting per l'ingegneria tissutale retinica. DMEM: Dubelcco's Modified Eagle's Medium. RGC: cellule retiniche gangliari. PLA: acido polilattico. HFIP: esafluoro-isopropanolo. iPSC: cellule staminali pluripotenti indotte. ARPE-19: linea di cellule epiteliali retiniche pigmentate. Y79: linea cellulare del retinoblastoma umano. HA-GM: acido ialuronico con metacrilazione mediante reazione glicidil-idrossile. PEG-RGDS: peptide Arg-Gly-Asp-Ser. fRPC: cellule progenitrici retiniche fetali. Tabella in riferimento all'originale [29].

#### 4.4 Vantaggi ed aspetti etici

L'utilizzo della 3D bioprinting può portare a molti vantaggi in riferimento alla qualità del prodotto desiderato. Per quanto concerne la qualità dello scaffold, si può osservare:

- una coltura cellulare migliore. Spesso la coltura dei tessuti retinici in vitro è ostacolata dal rischio di apoptosi o alla dedifferenziazione cellulare. Sotto questo punto di vista, gli scaffold ottenuti con la biostampa 3D possono essere valutati come alternativa ai classici supporti, poiché migliorano la vitalità e il mantenimento del fenotipo, favorendo anche la sopravvivenza cellulare, l'adesione, la proliferazione e l'integrazione delle cellule;
- complessità delle matrici. La biostampa consente una progettazione e fabbricazione di scaffold con strutture complesse, rendendo più facile la replicazione delle funzionalità della retina. Si ottiene questo risultato agendo con un controllo attento del numero di strati che si desidera costruire, del loro spessore e della loro disposizione spaziale;
- incorporazione di diversi tipi di cellule. La retina è composta da più di 60 tipi di cellule, ciascuna con funzioni specifiche. Questa tecnica di stampa consente l'incorporazione di diversi tipi di cellule nello scaffold, rendendo possibile un'imitazione più precisa del tessuto target;
- controllo sull'orientamento delle cellule. La biostampa 3D può garantire un certo grado di controllo sull'orientamento della stampa e questo costituisce un aspetto essenziale per una corretta funzionalità retinica;
- rigidità. La biostampa può consentire l'utilizzo di varie tipologie di materiali e miscele, migliorando i livelli di rigidità che possono essere ottenuti per renderli più simili a quelli del tessuto retinico.

D'altro canto, la biostampa 3D potrebbe essere utilizzata per creare organi o tessuti oculari biostampati con la finalità di modelli per test farmacologici, per scopi di ricerca più in generale. Tuttavia, sebbene questa tecnica offra applicazioni promettenti in vari settori, solleva anche delle questioni etiche legate alla fonte delle cellule utilizzate nel bioinchiostro e ai potenziali rischi dell'uso di cellule autologhe del paziente (cellule in cui è possibile la migrazione dal sito di innesto ad altre zone causando effetti indesiderati).

Una soluzione al problema delle cellule autologhe potrebbe essere l'impiego di cellule allogeniche, come cellule di origine animale. In entrambi i casi, però, bisogna considerare che l'utilizzo di cellule "non self" reca con sé la probabilità di una risposta infiammatoria o di rigetto.

Per quanto riguarda le cellule di origine animale, inoltre, il loro impiego comporta un alto rischio di trasmissione di malattie zoonotiche dall'animale all'uomo.

Pure le cellule staminali non sono prive di criticità, anche in considerazione dei problemi di natura etica connessi all'utilizzo di staminali di origine embrionale.

Un altro aspetto etico degno di considerazione riguarda la variabilità intersoggetto delle risposte e delle complicazioni (anche irreversibili) che l'innesto può causare nei soggetti sottoposti ai trial; per questo è estremamente importante acquisire il consenso informato da parte dei soggetti reclutati.

A parte la non comprovata biocompatibilità dei tessuti bio-stampati, bisogna considerare che essi dovrebbero essere in grado di ripristinare le funzionalità del tessuto o, addirittura, di crearne di nuove. Anche questo rappresenta una questione etica da tenere presente, soprattutto in riferimento a parti del corpo particolarmente delicate e complesse, quali la retina. In aggiunta alle questioni etiche, esiste un altro problema connesso alla possibilità di accesso a questa terapia, che è limitata ad un ristretto numero di pazienti a causa dei costi della bio-stampa: l'accesso a questa terapia sarebbe consentito solamente ad una fascia di popolazione che ha disponibilità economiche adeguate [29].

## Conclusioni

Questo studio si è posto lo scopo di analizzare lo stato dell'arte della ricerca scientifica sui biomateriali per la rigenerazione della retina.

Lo scritto si apre con una panoramica generale sull'anatomia e le patologie principali che colpiscono la retina, e il tipo di approccio terapeutico applicato attualmente.

Tra i tipi di interventi alternativi analizzati, l'ingegneria tissutale si è distinta perché nel campo della rigenerazione retinica mira a produrre tessuti che emulano in maniera ottimale la membrana di Brunch, il tessuto epiteliale retinico e i fotorecettori.

Tra i biomateriali utilizzati per la produzione di questi tessuti, si distinguono i polimeri ibridi, in quanto sono in grado di unire l'ottima interazione dei polimeri naturali e le loro caratteristiche simili al tessuto ospite, con le proprietà meccaniche dei polimeri sintetici.

Spesso questi materiali vengono impiegati in forma di idrogel, colloidali costituiti in grande quantità da acqua, e particolarmente adatti per la creazione di innesti di tessuti molli in siti che presentano danni irregolari o che sono inaccessibili, senza interventi chirurgici invasivi.

Oltre ai polimeri ibridi, vengono utilizzate anche alcune membrane biologiche che offrono una migliore adesione cellulare in quanto possono legare facilmente le molecole della matrice e i fattori di crescita.

Tra gli studi effettuati finora sull'utilizzo degli scaffold, due risultano particolarmente interessanti in quanto hanno mostrato direttamente i risultati dell'applicazione su uomo. Il primo studio ha utilizzato una membrana di supporto in parilene con cellule staminali embrionali allogene; questa membrana ha mostrato buona proliferazione e funzionalità cellulare e la presenza di rodopsina che è associata in genere ai fotorecettori. Non vi sono state infiammazioni o reazioni immunitarie eccessive: il materiale, dunque, risulta adeguato alla rigenerazione del tessuto retinico. Il secondo trial ha impiegato, invece, un cerotto in PET rivestito da vitronectina e cellule staminali embrionali, mostrando la presenza e l'espansione di cellule del tessuto retinico. Questo studio è rilevante soprattutto perché ha mostrato nei soggetti coinvolti un chiaro progresso nella visione e nella lettura, in seguito ai test eseguiti prima e dopo l'innesto.

L'elaborato si conclude con una breve analisi della 3D bioprinting, che si distingue tra i metodi di fabbricazione degli scaffold perché è in grado di produrre strutture già caricate di cellule e altre molecole biologicamente attive, mediante l'utilizzo di bioinchiostri.

Nonostante questa tecnica presenti grandi vantaggi in riferimento alla qualità del materiale prodotto e al suo potenziale utilizzo anche nel campo della ricerca, essa presenta alcune criticità

dal punto di vista etico e sociale: la fonte delle cellule (p. es., staminali di origine embrionale) e il consenso informato del paziente, da un lato, l'alto costo per l'accesso alla terapia, dall'altro. Con la continua evoluzione scientifica c'è una buona probabilità che questi problemi trovino presto le soluzioni adeguate.



## Bibliografia

- [1] K. S. Saladin, R. De\_Caro, G. Albertin, K. S. Saladin, R. De\_Caro, and G. Albertin, *Anatomia umana / Kenneth S. Saladin ; edizione italiana a cura di Raffaele De Caro ; con la collaborazione di Giovanna Albertin ... [et al.]*, 3. ed. Padova: Piccin, 2022.
- [2] A. F. Barbuti, V. Taglietti, A. F. Barbuti, A. F. Barbuti, and V. Taglietti, *Fondamenti di fisiologia generale e integrata / [a cura di Vanni Taglietti ; A. F. Barbuti ... [et al.]*. Napoli: EdiSES, 2019.
- [3] S. S. Rohiwal, Z. Ellederová, T. Ardan, and J. Klima, “Advancement in nanostructure-based tissue-engineered biomaterials for retinal degenerative diseases,” *Biomedicines*, vol. 9, no. 8. MDPI AG, Aug. 01, 2021. doi: 10.3390/biomedicines9081005.
- [4] N. C. Hunt, D. Hallam, V. Chichagova, D. H. Steel, and M. Lako, “The Application of Biomaterials to Tissue Engineering Neural Retina and Retinal Pigment Epithelium,” *Advanced Healthcare Materials*, vol. 7, no. 23. Wiley-VCH Verlag, Dec. 05, 2018. doi: 10.1002/adhm.201800226.
- [5] H. Khalili, H. H. Kashkoli, D. E. Weyland, S. Pirkalkhoran, and W. R. Grabowska, “Advanced Therapy Medicinal Products for Age-Related Macular Degeneration; Scaffold Fabrication and Delivery Methods,” *Pharmaceuticals*, vol. 16, no. 4. MDPI, Apr. 01, 2023. doi: 10.3390/ph16040620.
- [6] M. Abedin Zadeh, M. Khoder, A. A. Al-Kinani, H. M. Younes, and R. G. Alany, “Retinal cell regeneration using tissue engineered polymeric scaffolds,” *Drug Discovery Today*, vol. 24, no. 8. Elsevier Ltd, pp. 1669–1678, Aug. 01, 2019. doi: 10.1016/j.drudis.2019.04.009.
- [7] “R-Bruninx\_2020\_75\_2\_0”.
- [8] S. Behtaj, A. Öchsner, Y. G. Anissimov, and M. Rybachuk, “Retinal Tissue Bioengineering, Materials and Methods for the Treatment of Glaucoma,” *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 17, no. 3. Korean Tissue Engineering and Regenerative Medicine Society, pp. 253–269, Jun. 01, 2020. doi: 10.1007/s13770-020-00254-8.
- [9] C. Di\_Bello, A. Bagno, and C. Di\_Bello, *Biomateriali : dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche / Carlo Di Bello, Andrea Bagno*, 2. ed. in Collana di ingegneria biomedica. Bologna: Pàtron, 2016.

- [10] H. Riazifar, Y. Jia, J. Chen, G. Lynch, and T. Huang, “Chemically Induced Specification of Retinal Ganglion Cells From Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells,” *Stem Cells Transl Med*, vol. 3, no. 4, pp. 424–432, Apr. 2014, doi: 10.5966/sctm.2013-0147.
- [11] S. D. Schwartz *et al.*, “Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt’s macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies,” *The Lancet*, vol. 385, no. 9967, pp. 509–516, Feb. 2015, doi: 10.1016/S0140-6736(14)61376-3.
- [12] F. Tamalu, C. Chiba, A. T. Ishida, and T. Saito, “Functional differentiation of ganglion cells from multipotent progenitor cells in sliced retina of adult goldfish,” *Journal of Comparative Neurology*, vol. 419, no. 3, pp. 297–305, Apr. 2000, doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(20000410\)419:3<297::AID-CNE3>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(20000410)419:3<297::AID-CNE3>3.0.CO;2-X).
- [13] E. Salero *et al.*, “Adult human RPE can be activated into a multipotent stem cell that produces mesenchymal derivatives,” *Cell Stem Cell*, vol. 10, no. 1, pp. 88–95, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.stem.2011.11.018.
- [14] G. Orive *et al.*, “3D cell-laden polymers to release bioactive products in the eye,” *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 68. Elsevier Ltd, pp. 67–82, Jan. 01, 2019. doi: 10.1016/j.preteyeres.2018.10.002.
- [15] S. Bagewadi, S. Parameswaran, S. Krishnakumar, S. Sethuraman, and A. Subramanian, “Tissue engineering approaches towards the regeneration of biomimetic scaffolds for age-related macular degeneration,” *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 9, no. 30. Royal Society of Chemistry, pp. 5935–5953, Aug. 14, 2021. doi: 10.1039/d1tb00976a.
- [16] D. S. Rajendran Nair *et al.*, “Tissue engineering strategies for retina regeneration,” *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 11, no. 5. MDPI AG, pp. 1–19, Mar. 01, 2021. doi: 10.3390/app11052154.
- [17] E. Uzel, M. E. Durgun, İ. Esentürk-Güzel, S. Güngör, and Y. Özsoy, “Nanofibers in Ocular Drug Targeting and Tissue Engineering: Their Importance, Advantages, Advances, and Future Perspectives,” *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 4. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), Apr. 01, 2023. doi: 10.3390/pharmaceutics15041062.

- [18] Y. Haraguchi, T. Shimizu, M. Yamato, and T. Okano, "Scaffold-free tissue engineering using cell sheet technology," *RSC Advances*, vol. 2, no. 6, pp. 2184–2190, Mar. 14, 2012. doi: 10.1039/c2ra00704e.
- [19] E. Bertolotti, A. Neri, M. Camparini, C. Macaluso, and V. Marigo, "Stem cells as source for retinal pigment epithelium transplantation," *Prog Retin Eye Res*, vol. 42, pp. 130–144, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2014.06.002>.
- [20] E. Y. Shin *et al.*, "Injectable taurine-loaded alginate hydrogels for retinal pigment epithelium (RPE) regeneration," *Materials Science and Engineering C*, vol. 103, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.109787.
- [21] G. F. Trinchese, E. Calabrese, G. Calabrò, and F. Lisanti, "Gli scaffold in medicina rigenerativa," *LO SCALPELLO-OTODI Educational*, vol. 33, no. 3, pp. 230–236, Dec. 2019, doi: 10.1007/s11639-019-00330-2.
- [22] L. Papadimitriou, P. Manganas, A. Ranella, and E. Stratakis, "Biofabrication for neural tissue engineering applications," *Materials Today Bio*, vol. 6. Elsevier B.V., Mar. 01, 2020. doi: 10.1016/j.mtbio.2020.100043.
- [23] R. Sharma, D. Sharma, L. D. Hazlett, and N. K. Singh, "Nano-Biomaterials for Retinal Regeneration," *Nanomaterials*, vol. 11, no. 8. MDPI, Aug. 01, 2021. doi: 10.3390/nano11081880.
- [24] Y. Liu and N. Wu, "Progress of nanotechnology in diabetic retinopathy treatment," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 16. Dove Medical Press Ltd, pp. 1391–1403, 2021. doi: 10.2147/IJN.S294807.
- [25] L. A. Kolahalam, I. V Kasi Viswanath, B. S. Diwakar, B. Govindh, V. Reddy, and Y. L. N. Murthy, "Review on nanomaterials: Synthesis and applications," *Mater Today Proc*, vol. 18, pp. 2182–2190, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.07.371>.
- [26] E. Y. Shin *et al.*, "Injectable taurine-loaded alginate hydrogels for retinal pigment epithelium (RPE) regeneration," *Materials Science and Engineering C*, vol. 103, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.109787.
- [27] A. H. Kashani *et al.*, "Survival of an HLA-mismatched, bioengineered RPE implant in dry age-related macular degeneration," *Stem Cell Reports*, vol. 17, no. 3, pp. 448–458, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.stemcr.2022.01.001.

- [28] L. Da Cruz *et al.*, “Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration,” *Nat Biotechnol*, vol. 36, no. 4, pp. 328–337, Apr. 2018, doi: 10.1038/nbt.4114.
- [29] S. Ruiz-alonso *et al.*, “Current insights into 3D bioprinting: An advanced approach for eye tissue regeneration,” *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 3. MDPI, pp. 1–28, Mar. 01, 2021. doi: 10.3390/pharmaceutics13030308.
- [30] W. L. Ng *et al.*, “Vat polymerization-based bioprinting - process, materials, applications and regulatory challenges,” *Biofabrication*, vol. 12, no. 2. Institute of Physics Publishing, 2020. doi: 10.1088/1758-5090/ab6034.
- [31] Y. Wang *et al.*, “Application of Bioprinting in Ophthalmology,” *Int J Bioprint*, vol. 8, no. 2, pp. 147–158, 2022, doi: 10.18063/ijb.v8i2.552.
- [32] Y. J. Seol, H. W. Kang, S. J. Lee, A. Atala, and J. J. Yoo, “Bioprinting technology and its applications,” *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, vol. 46, no. 3. European Association for Cardio-Thoracic Surgery, pp. 342–348, 2014. doi: 10.1093/ejcts/ezu148.