



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA



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

**“Idrogel per la medicina rigenerativa e l'ingegneria tissutale: tipologie,  
applicazioni e metodi di produzione”**

**Relatore: Prof. Andrea Bagno**

**Laureando: Giuseppe Ragusa**

**ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023**

**Data di laurea 19/07/2023**

## **Indice**

Abstract	pagina 1
<b>Introduzione</b>	pagina 2
<b>Capitolo 1: Storia e sviluppo degli idrogel</b>	pagina 4
1.1 Prima generazione di idrogel	pagina 4
1.2 Seconda generazione di idrogel	pagina 5
1.3 Terza generazione di idrogel	pagina 6
<b>Capitolo 2: Le diverse tipologie di idrogel</b>	pagina 7
2.1 Tipi di idrogel	pagina 8
2.1.1 Idrogel naturali	pagina 8
2.1.1.1 Chitosano	pagina 9
2.1.1.2 Alginato	pagina 9
2.1.1.3 Acido Ialuronico	pagina 9
2.1.1.4 Collagene	pagina 9
2.1.2 Idrogel sintetici	pagina 10
2.1.2.1 PEG	pagina 10
2.1.2.2 PVA	pagina 10
2.1.2.3 PPF	pagina 11
2.1.2.4 PHEMA	pagina 11
2.2 Classificazione in base al tipo di reticolazione	pagina 11
2.2.1 Idrogel reticolati fisicamente	pagina 11
2.2.1.1 Cristallizzazione	pagina 11
2.2.1.2 Interazioni ioniche	pagina 12
2.2.1.3 Legami ad idrogeno	pagina 13
2.2.1.4 Interazioni idrofobiche	pagina 13
2.2.2 Idrogel reticolati chimicamente	pagina 14
2.2.2.1 Fotopolimerizzazione	pagina 14
2.2.2.2 Formazione di gruppi funzionali reattivi	pagina 14
2.2.2.3 Metodo enzimatico	pagina 16
2.3 Classificazione in base allo stato fisico	pagina 17
2.3.1 Idrogel allo stato solido	pagina 17
2.3.2 Idrogel semisolidi	pagina 18
2.3.3 Idrogel liquidi	pagina 18
2.4 Classificazione in base alla composizione	pagina 18
2.4.1 Idrogel omo-polimerici	pagina 19
2.4.2 Idrogel co-polimerici	pagina 19
2.4.3 Reti interpenetranti (IPN)	pagina 19
2.4.4 Reti semi-interpenetranti (semi-IPN)	pagina 20
2.5 Idrogel sensibili agli stimoli o smart idrogel	pagina 20
2.5.1 Idrogel pH responsivi	pagina 20
2.5.1.2 Proprietà degli idrogel pH responsivi	pagina 21
2.5.2 Idrogel sensibili alla temperatura	pagina 21
2.5.2.1 Idrogel termo-reversibili	pagina 22
2.5.3 Idrogel glucosio-sensibili	pagina 22

2.5.3.1 Idrogel a base di glucosio ossidasi	pagina 23
2.5.3.2 Sistemi immobilizzati con concanavalina A	pagina 23
2.5.4 Idrogel a base di proteine	pagina 23
2.5.5 Idrogel antigene-responsivi	pagina 24
<b>Capitolo 3: Applicazioni degli idrogel in TERM</b>	pagina 25
3.1 Idrogel come vettori per il trapianto di cellule	pagina 25
3.2 Idrogel come barriere	pagina 26
3.3 Idrogel come sistemi per il rilascio controllato di farmaci	pagina 27
3.4 Idrogel utilizzati come scaffold	pagina 27
3.4.1 Biodegradazione	pagina 27
3.4.2 Biocompatibilità	pagina 28
3.4.3 Dimensione dei pori	pagina 29
3.4.4 Caratteristiche meccaniche	pagina 29
3.4.5 Caratteristiche della superficie	pagina 29
3.4.6 Vascolarizzazione	pagina 30
3.5 Idrogel come strumento di rigenerazione dei tessuti	pagina 31
3.5.1 Tessuto cardiaco	pagina 31
3.5.2 Tessuto cartilagineo	pagina 32
3.5.3 Tessuto osseo	pagina 32
3.5.4 Tessuto nervoso	pagina 33
3.5.5 Dischi intervertebrali	pagina 34
<b>Capitolo 4: Conclusioni e prospettive future di ricerca</b>	pagina 35
Bibliografia	pagina 37

## **Abstract**

L'ingegneria tissutale per la medicina rigenerativa (TERM) è un campo di ricerca interdisciplinare che, negli ultimi decenni, ha conosciuto una crescita esponenziale dal punto di vista delle scoperte e delle applicazioni. Uno degli obiettivi principali è quello di creare dei costrutti ingegnerizzati in grado di sostituire o ripristinare i tessuti biologici non funzionanti o danneggiati, tramite l'utilizzo e l'applicazione di cellule, fattori biochimici e biomateriali; tra questi ultimi, una classe importante è quella degli idrogel. Essi sono polimeri (naturali e sintetici) biodegradabili, dotati di notevole biocompatibilità, in grado di assorbire rilevante quantità di acqua perché estremamente idrofilici. A partire dagli anni '60 del Novecento, gli idrogel vengono utilizzati in un ampio spettro di applicazioni biomedicali, ad esempio per la creazione di matrici tridimensionali per l'ingegneria tissutale, come vettori per il rilascio controllato di farmaci e come riempitivi iniettabili in chirurgia minimamente invasiva. La notevole versatilità degli idrogel è dovuta alle loro proprietà fisiche e biologiche che possono essere modulate per controllare la funzionalità delle cellule e la morfogenesi dei tessuti. Il loro utilizzo nella rigenerazione di organi e nella riparazione di tessuti ha permesso di sostituire alcuni interventi di chirurgia a cielo aperto con procedure chirurgiche meno invasive, riducendo così i tempi di recupero, i costi e il rischio di infezioni. Infatti, possono essere utilizzati come vettori per l'iniezione diretta di cellule staminali nel sito in cui è presente la patologia oppure per produrre scaffold tridimensionali, all'interno dei quali sono immobilizzate cellule sane del tessuto danneggiato da ricostruire. Con la presente tesi si vuole analizzare il percorso di evoluzione di questi materiali da metà del Novecento fino ad ora, capendo quali sono le diverse tipologie di idrogel, i diversi metodi di produzione e le applicazioni presenti e future, con uno sguardo alle problematiche attuali e alle possibili soluzioni.

## Introduzione

Quando si parla di idrogel si fa riferimento a reti tridimensionali costituite da polimeri idrofilici di origine naturale e sintetica, capaci di gonfiarsi e trattenere elevate quantità di acqua. Grazie alle proprietà chimiche, fisiche e biologiche regolabili, all'elevata biocompatibilità e versatilità nella fabbricazione, nel corso degli anni sono diventati materiali molto promettenti in campo biomedico. Sono stati compiuti progressi significativi nella sintesi e nella fabbricazione di idrogel sia da fonti naturali che sintetiche per diverse applicazioni, tra cui l'ingegneria tissutale per la medicina rigenerativa, la ricerca sulle cellule staminali e la veicolazione di farmaci e cellule. Gli idrogel di origine naturale a base di collagene, chitosano, acido ialuronico e alginato, sono molto interessanti per applicazioni in ambito biomedico in quanto si tratta di materiali con elevata biocompatibilità e biodegradabilità. Tuttavia, presentano limitazioni dovute alle scarse proprietà meccaniche e al ridotto controllo della loro degradazione. D'altra parte, gli idrogel sintetici come quelli a base di polietilene glicole (PEG), l'alcol polivinilico (PVA) e il poliidrossietilmetacrilato (PHEMA) presentano degradazione e microstruttura regolabili, buone proprietà meccaniche e una ridotta biocompatibilità. È grazie alle proprietà così diverse di ciascuna di queste due classi di idrogel che si è arrivati a produrre biomateriali basati sulla combinazione di polimeri naturali e sintetici, in grado di garantire ottime proprietà meccaniche, elevata biocompatibilità e la possibilità di regolare la cinetica degradazione. Nel corso degli anni sono stati utilizzati diversi approcci per la sintesi degli idrogel, strutture tridimensionali ottenibili tramite reticolazione fisica o chimica. Gli idrogel reticolati fisicamente sono di facile produzione, non necessitano di agenti reticolanti durante la loro sintesi e nella maggior parte dei casi la reticolazione viene innescata da stimoli esterni come variazioni di pH e temperatura. Grazie a queste caratteristiche, nel corso degli anni c'è stato un crescente interesse nell'utilizzare questa classe di idrogel per la rigenerazione dei tessuti poiché la reticolazione avviene spesso in soluzioni acquose e in assenza di reticolanti chimici, potenzialmente tossici. Negli idrogel reticolati chimicamente la rete tridimensionale si genera in seguito alla formazione di legami covalenti che si instaurano tra i gruppi funzionali delle catene polimeriche. Il risultato è un idrogel con proprietà meccaniche superiori, maggior resistenza a sforzi di tipo meccanico e variazioni di volume maggiori rispetto a quelle a cui vanno incontro gli idrogel reticolati fisicamente. Gli idrogel possiedono molte proprietà che li rendono adatti per la produzione di scaffold in ingegneria tissutale, tra cui la citocompatibilità, un contenuto di acqua simile a quello dei tessuti, la capacità di fornire supporto per la veicolazione delle cellule e la possibilità di essere iniettati in maniera minimamente invasiva. L'ingegneria

tissutale e la medicina rigenerativa sono campi interdisciplinari in rapida evoluzione e hanno come obiettivo quello di creare dei sistemi che vadano a sostituire o ripristinare tessuti e organi danneggiati. In quest'ambito gli idrogel sono quindi dei materiali che si prestano bene a questi scopi in quanto agiscono da impalcature, imitando la matrice extracellulare dei tessuti per fornire segnali biologici, meccanici e spaziali per regolare la risposta dei tessuti. Nel seguente elaborato viene fornita una panoramica sulla storia e sul progresso nella ricerca sugli idrogel nel corso degli ultimi decenni. L'obiettivo è quello di analizzare le diverse tipologie di idrogel, sia di origine naturale che sintetica, fornendo un'analisi dettagliata della struttura, della composizione e dei diversi metodi di produzione. Inoltre, sono state riportate le specifiche di progettazione che gli idrogel devono rispettare per poter essere utilizzati in applicazioni di ingegneria tissutale per la medicina rigenerativa, un ambito di ricerca che si è evoluto molto rapidamente nel corso degli ultimi vent'anni.

## 1. Storia e sviluppo degli idrogel

Il termine 'idrogel', secondo Lee, Kwon e Park, risale ad un articolo pubblicato nel 1894 [1]. Tuttavia, il materiale descritto in quell'articolo non era un idrogel come si intende oggi, ma un gel colloidale a base di sali inorganici. In ogni caso, il primo biomateriale reticolato descritto con le tipiche proprietà di un idrogel, una tra tutte l'elevata affinità con l'acqua, è stato il poli-idrossietil-metacrilato (pHEMA). Si tratta di un idrogel sviluppato intorno agli anni '60 del Novecento, con l'obiettivo di essere utilizzato in applicazioni a contatto diretto con i tessuti umani. Successivamente, a partire dagli anni '70, ha preso spazio un nuovo concetto di idrogel: una generazione di materiali in grado di rispondere a stimoli specifici come variazioni di pH, temperatura. Gli scopi, gli obiettivi e il numero di materiali impiegati sono cambiati e si sono ampliati costantemente nel corso degli anni, tant'è che la storia degli idrogel è stata suddivisa in tre diverse generazioni (Figura 1.1) [2].

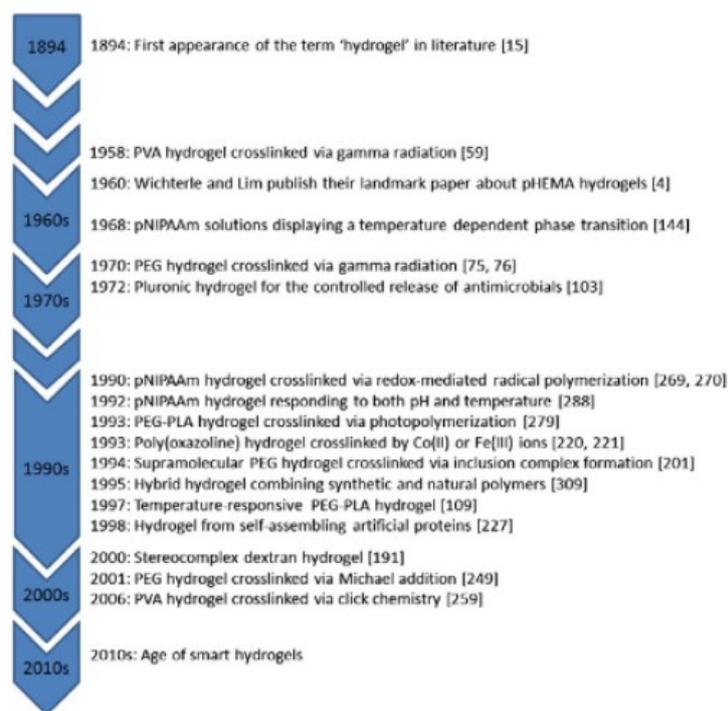


Figura 1.1. Timeline che mostra gli eventi più importanti nella storia della ricerca sugli idrogel.

### 1.1 Prima generazione di idrogel

Come detto in precedenza, il termine 'idrogel' apparve per la prima volta intorno al 1900 per descrivere un gel colloidale. Nel 1960, Wichterle e Lim furono i primi a parlare di idrogel come si conoscono oggi; nei successivi vent'anni la ricerca rimase essenzialmente concentrata su reti di polimeri sintetici reticolati chimicamente e di semplice realizzazione, con applicazioni in

ricerca oftalmica e per la somministrazione di farmaci. La semplice struttura della rete 3D si rivelò adatta anche per la caratterizzazione e la modellazione di diverse proprietà chimico-fisiche, come diffusività dei soluti e densità delle reticolazioni. Venivano preparati principalmente mediante polimerizzazione di monomeri idrosolubili in presenza di un reticolante multifunzionale o per reticolazione di polimeri idrofilici.

Gli idrogel di prima generazione venivano preparati tramite reazioni di polimerizzazione per addizione a catena, per lo più utilizzando monomeri vinilici; questo tipo di polimerizzazione consiste, in breve, nell'aggiunta di un radicale libero ad un monomero di vinile. Ciò avviene tramite rottura di un legame  $\pi$ , arrivando ad avere un nuovo radicale, per poi terminare con la ricombinazione di due specie radicali. Tra 1950 e 1955, vennero identificate le condizioni fondamentali e necessarie affinché materiali sintetici potessero trovarsi in contatto con i tessuti viventi. Queste includono: l'assenza di impurità nel materiale, proprietà meccaniche simili a quelle dei tessuti circostanti, sufficiente permeabilità alle sostanze idrosolubili (sali, ossigeno, proteine) e resistenza alla degradazione da parte di sistemi enzimatici. In base a questi requisiti, Witcherle e Lim prepararono il loro primo idrogel mediante polimerizzazione a radicale libero del 2-idrossietilmetacrilato (HEMA) in soluzione acquosa, usando come reticolante l'etilenglicole dimetilacrilato. Questo tipo di idrogel trovò largo impiego per lenti a contatto morbide negli anni '70 ma presentò anche degli svantaggi come, per esempio, l'insufficiente trasporto di ossigeno e la fragilità meccanica, stimolando così la ricerca per migliorarne le proprietà. In particolare, da quegli anni in poi venne utilizzato l'N-vinilpirrolidone (NVP) per aumentare la biocompatibilità. Dagli anni '70 in poi il pHEMA fu utilizzato per il rilascio controllato di farmaci di diverso tipo: antiaritmici, contraccettivi, vasocostrittori, antinfiammatori e citostatici.

Un altro tipo di polimeri della prima generazione furono quelli costituiti da polimeri idrofilici reticolati in modo covalente o tramite reazione tra gruppi funzionali o per mezzo di radicali liberi. Un esempio di polimeri ampiamente studiati e appartenenti a questa categoria sono l'alcool polivinilico (PVA) e il polietilenglicole (PEG) [3].

## **1.2 Seconda generazione di idrogel**

All'inizio degli anni '70 l'attenzione si spostò da reti relativamente semplici e gonfie di acqua, ad idrogel in grado di rispondere a cambiamenti dell'ambiente circostante, come variazioni di pH, di temperatura o di concentrazioni di biomolecole. Questi cambiamenti delle condizioni ambientali vennero utilizzati per evocare eventi specifici come la formazione di gel e il rilascio di farmaci. I più studiati in questa categoria furono gli idrogel sensibili a variazioni di

temperatura, in cui gli entanglements fisici, i legami ad idrogeno e le interazioni idrofobiche costituiscono la maggior parte dei legami crociati. L'equilibrio di queste interazioni fisiche è dipendente dalla temperatura e governa il comportamento di gelificazione termosensibile degli idrogel; infatti, ciò permise che potessero essere utilizzati come sistemi di formazione in situ, trattandosi di fluidi che possono essere iniettati nei tessuti in modo minimamente invasivo, prima della gelificazione. Gli idrogel che si formano in situ offrono diversi vantaggi rispetto ai sistemi che vengono prodotti nella loro forma finale prima di essere impiantati; infatti, garantiscono, grazie alla loro natura inizialmente fluida, un corretto adattamento alla forma, con conseguente buona compatibilità con il tessuto circostante. Un altro fattore importante a cui gli idrogel sono in grado di rispondere sono le variazioni di pH; sfruttando queste variazioni in diverse parti del corpo fu possibile stabilire il rilascio controllato del contenuto dell'idrogel nel sito desiderato [3].

### **1.3 Terza generazione di idrogel**

Gli idrogel reattivi al pH e alla temperatura venivano reticolati principalmente attraverso interazioni idrofobiche e ioniche. A metà degli anni '90, sono state riconosciute e sfruttate come metodi di reticolazione altre interazioni fisiche, le quali permisero di migliorare e regolare le proprietà meccaniche, termiche e di degradazione degli idrogel. Di fatti, si parla di stereocomplessi polimerici, i quali sono definiti da interazioni stereoselettive che si instaurano tra due polimeri stereoregolari complementari, ottenendo così un composto con proprietà diverse rispetto ai polimeri di partenza; un esempio può essere quello della reazione tra PLLA e PDLA, due polimeri complementari e otticamente attivi, aventi la stessa struttura chimica ma chiralità opposta. Con il passare degli anni e l'aumento della conoscenza in chimica organica sono state sviluppate anche delle varietà di idrogel reticolati chimicamente che prendono il nome di idrogel intelligenti, dando così la possibilità di personalizzare alcune proprietà come la stabilità meccanica e la velocità di rilascio di farmaci e biomolecole [3].

## 2. Le diverse tipologie di idrogel

Gli idrogel sono reti tridimensionali formate da polimeri idrofilici reticolati, sia attraverso legami covalenti che tramite legami fisici intermolecolari e intramolecolari. Sono in grado di assorbire enormi quantità di acqua e rigonfiarsi, potenzialmente senza dissolversi; questa caratteristica è dovuta alla presenza di gruppi idrofilici come i gruppi carbossilico, ammidico, amminico e idrossilico, distribuiti lungo l'asse delle catene polimeriche. Quando presentano rigonfiamento sono morbidi e gommosi, risultando così molto simili ad alcuni tessuti biologici. Solitamente raggiungono la loro stabilità quando si verifica un equilibrio tra le forze motrici osmotiche, che favoriscono l'ingresso di acqua e/o di fluidi biologici nella matrice dell'idrogel, e le forze coesive esercitate dalle catene polimeriche all'interno della struttura; l'entità di queste forze dipende in particolar modo dalla densità delle reticolazioni dell'idrogel. Quindi, in generale, quanto più idrofilico è il polimero che forma l'idrogel, tanto più alta è la quantità totale di acqua assorbita dalla sua struttura; allo stesso modo, quanto più alta è la densità di reticolazione di un idrogel, minore è la percentuale di rigonfiamento.

Uno degli equivoci più comuni nello studio dei polimeri è quello di confondere il concetto di 'gel' con quello di 'idrogel'. I gel sono materiali semi-solidi, formati da polimeri idrofilici che comprendono piccole frazioni solide, disperse in quantità relativamente elevate di liquido; tuttavia, appaiono più simili ad un solido che ad un liquido. Anche gli idrogel sono costituiti da catene polimeriche idrofiliche, ma sono reticolati e questo permette loro di rigonfiarsi, mantenendo così la loro struttura tridimensionale, senza dissolversi. Quindi la caratteristica principale degli idrogel, rispetto ai gel, è quella di presentare una struttura ben reticolata [4].

Si possono dividere le diverse tipologie di idrogel secondo molteplici criteri, che fanno riferimento alle proprietà fisiche, alla natura del meccanismo di rigonfiamento, al metodo di preparazione, all'origine dei polimeri utilizzati per la sintesi e alle cariche ioniche presenti lungo le catene polimeriche (Figura 2.1).

Negli idrogel fisici la reticolazione è di natura fisica, cioè viene ottenuta attraverso processi fisici come associazione idrofobica, aggregazione delle catene, cristallizzazione o tramite legami ad idrogeno; dall'altra parte la struttura degli idrogel di natura chimica si ottiene tramite legami crociati di origine covalente. Una grande differenza tra le due tipologie è il fatto che gli idrogel fisici, grazie a cambiamenti conformazionali, hanno una struttura reversibile, mentre quelli di natura chimica hanno una struttura permanente e irreversibile.

Un'altra categoria è quella data dalla combinazione di idrogel reticolati chimicamente e fisicamente, derivante da interazioni elettrostatiche tra i due tipi diversi di idrogel, che venne

impiegata per superare gli svantaggi dell'utilizzo di soli idrogel fisici o chimici. I vantaggi portati da questa categoria furono un'elevata capacità di assorbimento di liquidi, in un'ampia gamma di pH e una maggiore sensibilità alle variazioni di pH rispetto agli idrogel di natura chimica [5].

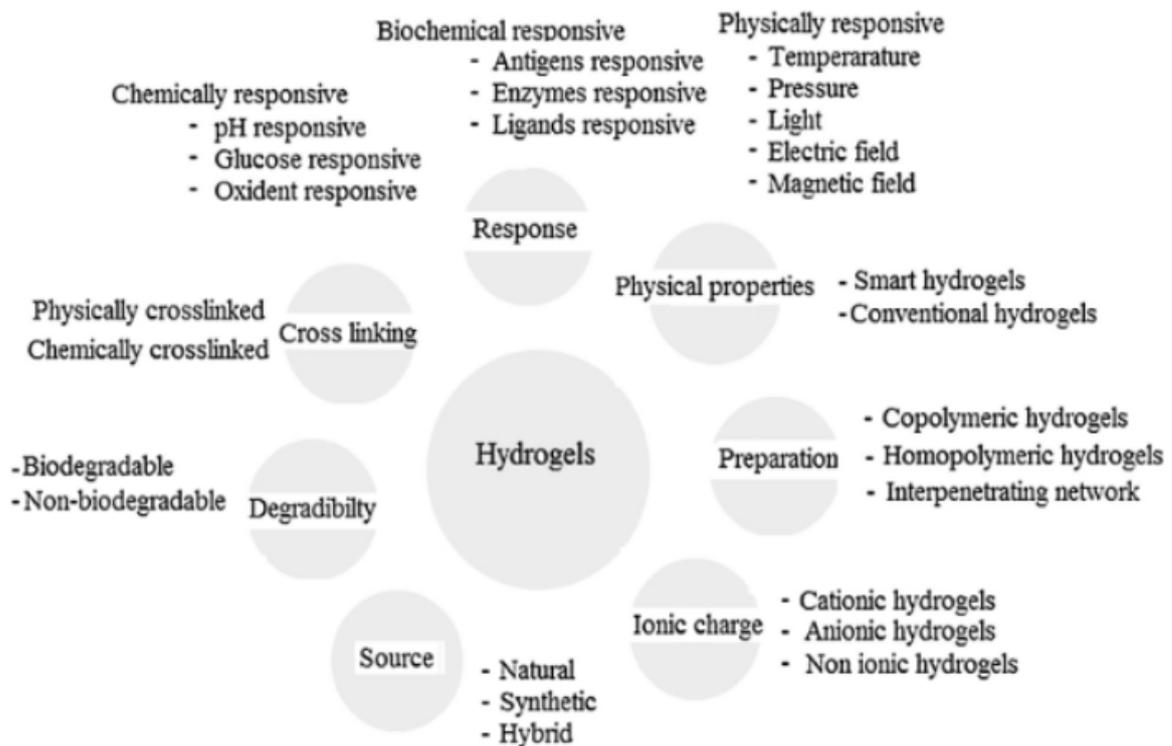


Figura 2.1: Classificazione degli idrogel in base alle proprietà fisiche, alla natura del meccanismo di rigonfiamento, al metodo di preparazione, all'origine dei polimeri utilizzati per la sintesi e alle cariche ioniche presenti lungo le catene polimeriche.

## 2.1 Tipi di idrogel

Negli ultimi 20 anni è stata utilizzata una grande quantità di materiali, sia sintetici che naturali, per la produzione di idrogel per quanto riguarda applicazioni TERM. Gli idrogel che utilizzano polimeri naturali come elementi costitutivi sono stati ampiamente impiegati in quanto dotati di eccellente biocompatibilità, bassa tossicità e suscettibilità alla degradazione enzimatica. Al contrario, gli idrogel sintetici a volte richiedono modifiche perché non sono in grado di rispondere a determinati stimoli biologici.

### 2.1.1 Idrogel naturali

Le due classi principali di materiali naturali utilizzati nella preparazione di idrogel sono i polisaccaridi e le proteine fibrose. Questi due tipi di polimeri sono componenti della matrice extracellulare, la quale fornisce segnali chimici, fisici e biologici per il supporto delle risposte

cellulari, tra cui adesione, differenziazione cellulare e proliferazione. Per applicazioni biomediche e di ingegneria tissutale, i materiali naturali più utilizzati sono chitosano, alginato, acido ialuronico e collagene.

#### *2.1.1.1 Chitosano*

Si tratta di un polisaccaride lineare, la cui unità monomerica è formata da D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina, derivato dalla chitina naturale attraverso deacetilazione parziale; è un polimero non tossico, stabile, biodegradabile e che può essere sterilizzato. Queste proprietà lo rendono un materiale molto versatile che però, a pH neutro, a causa dei forti legami ad idrogeno intermolecolari, risulta insolubile e quindi difficile da utilizzare come idrogel iniettabile. Si possono preparare derivati del chitosano solubili in acqua, in seguito alla formazione di sali carbossilati come formiato, acetato, lattato, citrato, piruvato e glicolato; questi derivati sono stati utilizzati in applicazioni per il rilascio di farmaci e come vettori per il trasporto di cellule, attraverso reticolazione con glutaraldeide, irradiazione UV e variazioni termiche [6].

#### *2.1.1.2 Alginato*

L'alginato è un polisaccaride idrofilico non ramificato, composto da acido  $\beta$ -D-mannuronico e acido  $\alpha$ -L-glucuronico in composizione variabile, legati tramite legami covalenti (1-4) e derivante principalmente da alghe brune e batteri. La sua gelificazione può essere eseguita attraverso legami che si instaurano tra blocchi ricchi di acido glucuronico e cationi bi o tri valenti come  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ , con la conseguente formazione di ponti ionici; il metodo di preparazione rende questi materiali molto adatti per incapsulare cellule e per il rilascio controllato di peptidi e proteine [6].

#### *2.1.1.3 Acido ialuronico*

Si tratta di un glicosamminoglicano (GAG) composto da unità disaccaridiche ripetute di acido D-glucuronico e N-acetil-glucosamina; può essere modificato per la formazione di un idrogel attraverso polimerizzazione catalizzata da enzimi, in modo da ottenere reticolazione. Gli idrogel di acido ialuronico sono di grande interesse per la medicina rigenerativa e l'ingegneria tissutale e ciò è dovuto alla loro elevata biocompatibilità [6].

#### *2.1.1.4 Collagene*

Si tratta della proteina più abbondante nel corpo umano, la sua struttura di base è data da tre catene polipeptidiche avvolte l'una intorno all'altra a formare un'elica. La gelatina è formata

dall'idrolisi parziale del collagene, in seguito alla rottura della tripla elica in molecole a singolo filamento. Collagene e gelatina sono stati studiati ampiamente come biomateriali perché dotati di proprietà vantaggiose che includono elevata resistenza alla trazione, elevata biocompatibilità e biodegradabilità. Gli idrogel di collagene e gelatina vengono reticolati usando principalmente glutaraldeide, genipina o carboimmidi solubili in acqua, oppure possono essere ottenuti in maniera non covalente [6].

### *2.1.2 Idrogel sintetici*

Rispetto ai polimeri naturali, i materiali sintetici hanno il vantaggio di avere proprietà chimiche e fisiche più controllabili e riproducibili, permettendo così di preparare materiali con proprietà più specifiche. Tuttavia, l'interazione cellula-materiale e la conseguente biocompatibilità vanno tenute in considerazione in tutte le fasi della progettazione di questo tipo di idrogel. Un approccio possibile per migliorare le interazioni cellula-materiale degli idrogel sintetici è dato dalla funzionalizzazione degli stessi con peptidi o polisaccaridi che si legano in maniera specifica alle cellule mediante interazioni ligando-recettore. I materiali sintetici più utilizzati nella preparazione di idrogel sono il glicole polietilenico (PEG), alcol polivinilico (PVA), poli-propilene fumarato (PPF) e poli-idrossietilmetacrilato (PHEMA) [6].

#### *2.1.2.1 PEG*

È uno dei sistemi più studiati, infatti sono stati utilizzati diversi approcci di copolimerizzazione e modifica per lo sviluppo di idrogel di PEG. Per esempio, sono stati sintetizzati idrogel di PEG foto-reticolato, ottenuti modificando ciascuna estremità del polimero con acrilati o metacrilati; un altro esempio è dato da idrogel di PEG biodegradabili e sensibili alle variazioni di temperatura, ottenuti attraverso polimerizzazione di polimeri degradabili come l'acido polilattico (PLA) e l'acido poli-lattico-co-glicolico (PLGA). Inoltre, sono stati sviluppati idrogel di PEG reticolati mediante enzimi, preparati innestando nel polimero molecole sensibili agli enzimi, come la tiramina. Questi idrogel sono caratterizzati da un'eccellente biocompatibilità, dall'assenza di tossicità e dalla facilità di elaborazione [6].

#### *2.1.2.2 PVA*

Simile al PEG, il PVA è un polimero sintetico idrofilico che viene ampiamente utilizzato per lo sviluppo di idrogel, i quali possono essere formati mediante reticolazione chimica attraverso raggi  $\gamma$ , irradiazione o glutaraldeide, oppure mediante reticolazione fisica ottenuta grazie a cicli di congelamento-scongelo, oppure per autoassemblaggio [6].

### *2.1.2.3 PPF*

Si tratta di un poliestere lineare degradabile, basato su acido fumarico, che è un prodotto naturale del metabolismo dei mammiferi. Può formare idrogel quando sintetizzato come copolimero a blocchi con il PEG e reticolato sia chimicamente che per esposizione ai raggi UV. L'iniettabilità e la biodegradazione dei polimeri a base di fumarato, unita alla facilità con cui i macromeri possono essere modificati, rendono questi idrogel degli ottimi prodotti nel settore dell'ingegneria tissutale per la medicina rigenerativa [6].

### *2.1.2.4 PHEMA*

Il poli-idrossietil-metacrilato, che è stato utilizzato sin dagli anni '50 per produrre lenti a contatto, è uno dei biomateriali più conosciuti e utilizzati per la produzione di idrogel. Negli ultimi anni è stato preparato anche come idrogel fotoreticolato, utilizzando il 2-idrossietil metacrilato (HEMA) come monomero, il poli-etilenglicole dimetacrilato (PEGDM) come agente reticolante e il benzoico isobutil etere come iniziatore nella polimerizzazione [6].

## **2.2 Classificazione in base al tipo di reticolazione**

Gli idrogel, essendo costituiti da catene polimeriche reticolate tra loro, possono essere classificati in due categorie dipendenti dal tipo di reticolazione presente nella loro struttura:

- idrogel reticolati fisicamente;
- idrogel reticolati chimicamente.

### *2.2.1 Idrogel reticolati fisicamente*

Questa è una categoria di idrogel di rilevante importanza, in quanto non necessitano di agenti reticolanti in fase di sintesi, evitando così che questi composti vadano ad intaccare l'integrità delle possibili sostanze (cellule, proteine, farmaci) presenti all'interno della struttura dell'idrogel. I diversi metodi per ottenere questo tipo di idrogel permettono di classificarli ancora più nel dettaglio e saranno analizzati uno per uno [7].

#### *2.2.1.1 Cristallizzazione*

La reticolazione fisica di un polimero nella formazione di un idrogel può essere ottenuta tramite cristallizzazione che avviene per cicli di congelamento-scongelo in un sistema omopolimerico o per formazione di stereo-complessi. La cristallizzazione e il grado di cristallinità determinano le proprietà finali dei polimeri risultanti; la cristallizzazione polimerica

può avvenire da soluzioni diluite o a partire dallo stato fuso dei polimeri costituenti. Nel primo caso, la cristallizzazione avviene per evaporazione del solvente, ottenendo così dei singoli cristalli basati su un modello a catena ripiegata, con le catene allineate; questo processo comprende due fasi: nucleazione del cristallo e crescita dello stesso. Nella prima fase si ha la formazione di piccoli cristalli (anche chiamati nuclei) e ciò richiede un certo grado di saturazione dei legami. I fattori che influenzano la nucleazione sono la temperatura, il volume, la forza ionica e il rapporto tra le diverse specie ioniche. Per quanto riguarda la crescita del cristallo, essa è caratterizzata dalla crescita dei nuclei, dovuta a sua volta all'allineamento dei segmenti di catena con conseguente diminuzione del volume iniziale; ciò porta alla formazione di strati di catena ripiegati chiamati lamelle che possono essere raggruppate a formare strutture sferiche chiamate sferuliti. Generalmente il diametro delle sferuliti dipende dal sito di nucleazione, dalla struttura molecolare del polimero e dalla velocità di raffreddamento del fuso. Il processo di cristallizzazione che avviene tramite congelamento e scongelamento implica la formazione di micro-cristalli all'interno della struttura polimerica; esempi di questo tipo di reticolazione sono presenti negli idrogel di PVA la cui resistenza è attribuita alla formazione di cristalliti di PVA che agiscono come siti di reticolazione all'interno della rete polimerica. È stato inoltre notato che aggiungendo dell'alginato alla soluzione di PVA, prima di sottoporla al processo di congelamento-scongelamento, si potevano modificare le proprietà del sistema. Un'altra forma di cristallizzazione è data dalla formazione di stereocomplessi i quali derivano da interazioni stereoselettive (forze di Van der Waals) che si instaurano tra polimeri con strutture stereoregolari complementari; per esempio, fu notata la capacità dell'acido polilattico di formare stereocomplessi. In questo caso furono ottenute microparticelle miscelando D-PLA e L-PLA con leuprolide, osservando poi che il rilascio del farmaco stesso dipendeva dal metodo di formazione del complesso e dal peso molecolare del PLA [8]. Il vantaggio principale di ottenere la cristallizzazione tramite formazione di stereocomplessi è dato dalla facilità di formazione che avviene sciogliendo ogni prodotto in acqua e mescolando la soluzione; limitazione significativa, invece, è la ristretta gamma di composizioni polimeriche che possono essere utilizzate all'interno della soluzione [7].

### *2.2.1.2 Interazioni ioniche*

Le reticolazioni possono essere ottenute in situ grazie a variazioni di pH che causano ionizzazione o protonazione dei gruppi funzionali ionici, portando alla gelificazione. Le interazioni tra cariche possono verificarsi tra un polimero e una piccola molecola oppure tra due polimeri con carica opposta; quando un polielettrolita si combina con uno ione multivalente

e di carica opposta, viene prodotto un gel fisico noto come idrogel ionotropico. Se due polielettroliti con cariche opposte vengono mescolati, possono gelificare o precipitare a seconda della loro concentrazione, forza ionica e pH della soluzione [8]. L'alginato è un esempio di polimero che può essere reticolato attraverso interazioni ioniche; si tratta di un polisaccaride con residui di acido mannuronico e glucuronico, reticolato attraverso ioni calcio [5].

### *2.2.1.3 Legami ad idrogeno*

Anche legami ad idrogeno tra le catene polimeriche possono prendere parte alla formazione di un idrogel; un legame di questo tipo si instaura tra molecole nelle quali un atomo di idrogeno è legato covalentemente ad un altro atomo più elettronegativo. Gli idrogel ottenuti con questa tecnica sono influenzati da diversi fattori come la concentrazione dei polimeri, il rapporto molare di ciascun polimero, il tipo di solvente, la temperatura della soluzione e il grado di associazione tra gruppi funzionali del polimero [4].

### *2.2.1.4 Interazioni idrofobiche*

Un ulteriore metodo per reticolare fisicamente un idrogel è dato dall'utilizzo di interazioni idrofobiche. Polimeri e copolimeri, a blocchi o ad innesto, di solito permettono la formazione di strutture separate da piccoli domini idrofobici, i quali agiscono come punti di legame nell'intera struttura polimerica, circondati da regioni idrofiliche che assorbono acqua. Questo approccio è stato utilizzato per sviluppare un tipo di idrogel formato da copolimeri ad innesto, aventi come catena principale idrofilica il poli-idrossietil metacrilato (PHEMA) e come catene laterali idrofobiche, piccole quantità di poli-metilmacrilato (PMMA). In generale, le proprietà meccaniche di questi polimeri sono scarse a causa della bassa adesione all'interfaccia; tuttavia, un vantaggio in questo metodo di preparazione degli idrogel è dato dal basso costo [4]. I polimeri con domini idrofobici possono reticolare in ambienti acquosi attraverso la gelificazione termica inversa, anche conosciuta come transizione soluzione-gel. La gelificazione si verifica quando un segmento idrofobico si attacca ad un polimero idrofilico, formando un polimero anfifilico che generalmente risulta solubile in acqua a basse temperature; come la temperatura aumenta, i domini idrofobici si accrescono per minimizzare l'area di superficie idrofobica, riducendo la quantità di acqua nella struttura circostante. La temperatura di gelificazione dipende dalla concentrazione del polimero, dalla grandezza del blocco idrofobico e dalla struttura chimica del polimero [8].

### *2.2.2 Idrogel reticolati chimicamente*

Negli idrogel reticolati chimicamente vi sono legami covalenti tra le diverse catene polimeriche che costituiscono la struttura del materiale; pertanto, sono stabili e non possono essere sciolti in nessun solvente, a meno che non vengano scissi i punti dove vi sono le reticolazioni. Questo tipo di reticolazione dà luogo ad una rete con elevata resistenza meccanica e, a seconda del tipo di legame chimico, con tempi di degradazione relativamente lunghi [7]. La reticolazione chimica di polimeri idrofobici è uno dei metodi principali per la formazione di idrogel; in questo caso un agente reticolante bifunzionale viene aggiunto ad una soluzione diluita in cui è presente un polimero idrofilico con funzionalità adatte a reagire con il reticolante. Ad esempio, sono stati sviluppati idrogel a base di albumina e gelatina, utilizzando la dialdeide o la formaldeide come agenti reticolanti; inoltre, sono stati sviluppati idrogel ad alto contenuto di acqua basati sulla reticolazione del glicole polietilenico funzionalizzato con un polipeptide contenente lisina [4]. In generale, la capacità di assorbire acqua da parte di questo tipo di idrogel dipende dalla concentrazione dei monomeri/polimeri e quindi dell'agente reticolante utilizzati per la sua formazione [9].

I vari metodi riportati in letteratura per ottenere idrogel reticolati chimicamente sono precisati nei paragrafi seguenti.

#### *2.2.2.1 Fotopolimerizzazione*

La tecnica principale per reticolare chimicamente un idrogel è la fotopolimerizzazione. Si tratta di un processo che consente la formazione in situ di idrogel reticolati a pH e temperatura fisiologici. Ha inizio a partire da radicali liberi, prodotti dalla decomposizione di un fotoiniziatore in seguito all'esposizione ai raggi UV. I radicali reagiscono con l'idrogel il quale presenta gruppi funzionali polimerizzabili, come il gruppo acrilato o metacrilato, i quali permettono la reticolazione. La natura rapida e specifica delle reazioni che avvengono lungo le catene polimeriche permette un miglior controllo spazio-temporale della reticolazione, che può essere regolato variando posizione e durata dell'irraggiamento. Il calore generato durante la polimerizzazione viene facilmente controllato facendo variare l'intensità del raggio luminoso: la temperatura non deve infatti superare i limiti oltre i quali le biomolecole e le cellule potrebbero subire danni irreversibili. La scelta del fotoiniziatore può inoltre influenzare le proprietà finali del materiale reticolato [10].

#### *2.2.2.2 Formazione di gruppi funzionali reattivi*

Vi sono delle reazioni che portano alla formazione di legami covalenti tra gruppi funzionali dei polimeri (principalmente -OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>). I legami covalenti tra le catene polimeriche si formano attraverso reazioni che avvengono tra gruppi funzionali aventi reattività complementare che sono tipicamente reazioni di Schiff, reazioni di addizione di tipo Micheal e reazioni click (Figura 2.2).

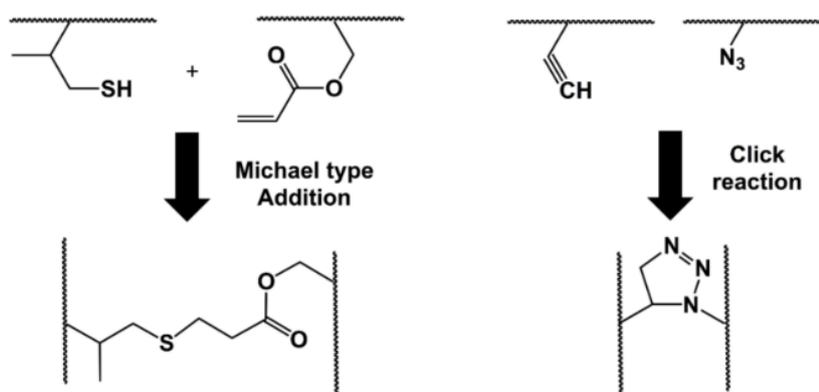


Figura 2.2: Rappresentazione dell'addizione di tipo Micheal e della reazione click per la formazione di strutture reticolate.

I polimeri contenenti gruppi idrossilici e gruppi amminici possono essere reticolati mediante molecole che contengono nella loro struttura gruppi funzionali aldeidici; infatti, la formazione di una base di Schiff tra un'aldeide e un gruppo amminico è la tecnica più diffusa per questo tipo di reticolazione. Una delle molecole più utilizzate in queste reazioni è la glutaraldeide che è in grado di reagire con i gruppi amminici; tuttavia, lo svantaggio di questa molecola è dato dal fatto che risulta essere tossica, anche in bassa concentrazione. Il processo di reticolazione può anche essere eseguito tramite reazioni di addizione con l'aggiunta di un agente reticolante, arrivando ad avere le catene polimeriche risultanti con la stessa composizione chimica del gel. Esempi per questo tipo di idrogel sono dati da polisaccaridi reticolati con 1,6-esametilene diisocianato, divinilsulfone o 1,6-esano dibromuro; generalmente queste reazioni di addizione avvengono in solventi organici, per impedire all'acqua di reagire con gli agenti reticolanti e infatti, per questa ragione, i farmaci o le proteine da veicolare vanno caricate in seguito alla reazione. Un'altra reticolazione che avviene in seguito alla reazione tra gruppi funzionali è causata da reazioni di condensazione tra gruppi amminici o idrossilici con gruppi carbossilici, che sono utilizzati frequentemente nella sintesi di polimeri per ottenere rispettivamente poliesteri e poliammidi. Uno dei reagenti più utilizzati per la reticolazione di polimeri idrosolubili attraverso legami ammidici è l'*N*-(3-dimetilamminopropil)-*N'*-etilcarbodiimmide,

con conseguente aggiunta di N-idrossisuccinimide per ridurre le possibili reazioni collaterali e avere un miglior controllo sulla densità di reticolazione dell'idrogel [8].

### 2.2.2.3 Metodo enzimatico

Il principale vantaggio del metodo enzimatico è dato dal fatto che la reticolazione dell'idrogel avviene senza necessità di utilizzo di composti a basso peso molecolare, di irradiazione o di funzionalizzazione del polimero di partenza (Figura 2.3). Gli enzimi spesso mostrano un alto grado di specificità al substrato, evitando così potenziali reazioni collaterali durante la reticolazione; questo vantaggio rende possibile controllare e prevedere la cinetica di reticolazione, rendendo possibile la gelificazione in situ.

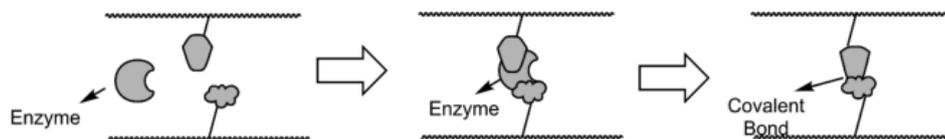


Figura 2.3: Schema che mostra l'unione enzima substrato e la conseguente formazione del legame covalente nella struttura reticolata.

Un esempio di questa tecnica è dato dalla reticolazione di gelatina e chitosano in presenza di transglutaminasi e tirosinasi; è stato dimostrato che la transglutaminasi catalizza la formazione di idrogel di gelatina resistenti e termicamente irreversibili, anche senza chitosano, il quale però rende la reazione più veloce e rende gli idrogel più resistenti. È stata anche studiata la tirosinasi come catalizzatore nella reazione chitosano-gelatina, con la differenza che in questo caso la presenza del chitosano è necessaria per la formazione dell'idrogel. Questi idrogel possono cambiare consistenza in funzione della temperatura, quando vengono raffreddati diventano più resistenti mentre quando vengono riscaldati fino alla temperatura di fusione della gelatina si indeboliscono. La loro resistenza può essere modulata modificando la composizione della gelatina o del chitosano [8].

In Tabella 2.1 sono riportati i polimeri che si possono ottenere con i diversi metodi di reticolazione (sia chimica che fisica) e le corrispondenti applicazioni.

Cross link		Polymers	Applications	
Physically cross-linked or self-assembled hydrogel	Freeze-thawing	Poly(vinyl alcohol) (PVA) PVA/chitosan, PVA/starch, PVA/gelatin	Therapeutic applications Tissue engineering	
	Stereocomplex formation	Dextran, poly(lactic acid) Poly(ethylene glycol)	Drug delivery Biomedical and pharmaceutical	
	Ionic interaction	Cellulose microfibrils Chitosan	Drug delivery Antigen delivery	
	H-bonding	Hyaluronic acid Cyclodextrin, poly pseudorotaxane	Drug delivery biomedical	
	Maturation (heat-induced aggregation)	Alginate capsules Hyaluronic acid	Cartilage tissue Soft tissue engineering, cell scaffold, regenerative medicine and cartilage repair	
Chemically cross-linked hydrogel	Chemical cross-linking	Whey protein Poly(ethylene glycol)	- Biomedical	
	Grafting	Chemical grafting	Chitosan-cellulose Poly( $\epsilon$ -caprolactone), poly(ethylene glycol)	Agriculture and horticultural Tissue engineering
		Radiation grafting	Carboxymethyl cellulose, styrene sulfonate	Water purification
	Radical polymerization		N-Vinylcaprolactam, Chitosan Kolliphor	Drug delivery Antibacterial
			Poly(ethylene glycol)methyl ether methacrylate	Antifouling
	Condensation reaction	B-Cyclodextrin Cellulose nanofiber	Controlled delivery Advanced	
	Enzymatic reaction	Poly(ethylene glycol) methacrylate Chitosan	Bio catalysis and tissue engineering Wound dressing and packaging	
	High-energy radiation		Poly(oligo(propylene glycol) methacrylate)	biomedical
			Poly(vinyl methyl ether)	Biological

Tabella 2.1: Diverse tipologie di idrogel fisici e chimici.

## 2.3 Classificazione in base allo stato fisico

Recentemente, lo sviluppo di idrogel con proprietà fisiche specifiche, come ad esempio la capacità di gonfiarsi e assorbire acqua permettendo così la diffusione di sostanze attraverso la loro struttura reticolata, ha suscitato un grande interesse in campo biomedico. Gli idrogel polimerici hanno proprietà elastiche simili a quelle dei tessuti molli, sono biodegradabili e quindi sono stati ampiamente utilizzati per la somministrazione di farmaci, come sensori, scaffold e in ingegneria tissutale. Ciò che influenza maggiormente le proprietà degli idrogel è la loro composizione, grazie a questa è infatti possibile classificarli in tre diverse categorie per quanto riguarda le applicazioni biomediche, come viene di seguito precisato.

### 2.3.1 Idrogel allo stato solido

Sono una tipologia di idrogel in grado di imitare le proprietà fisiche, chimiche, elettriche e biologiche dei tessuti biologici di interesse biomedico, ricostruendo la struttura della matrice extracellulare e garantendo la presenza di un microambiente adeguato. Presentano una struttura che viene reticolata tramite reticolanti ionici o covalenti, sono solidi a temperatura ambiente ma possono rigonfiarsi in ambiente acquoso ed essere rinforzati tramite l'incorporazione di nanoparticelle polimeriche, ceramiche, metalliche o a base di carbonio. Questo tipo di approccio ha permesso di ottenere nanocomposti con proprietà superiori al solo idrogel non rinforzato e con funzionalità personalizzate; ne sono un esempio gli idrogel rinforzati con ossido di grafene, i quali presentano proprietà meccaniche superiori e densità di reticolazioni maggiore rispetto agli idrogel non rinforzati. Un altro esempio di questo tipo di composti rinforzati è dato dagli idrogel ai quali vengono aggiunti dei nanotubi di carbonio (CNT), i quali

possono essere utilizzati come sostituti di tessuti elettricamente conduttivi (muscolari, nervosi, cardiaco). Anche l'ingegneria tissutale prende in considerazione l'utilizzo di idrogel rinforzati per quanto riguarda possibili applicazioni nel miocardio. Infatti, è stata progettata una matrice idrogel basata su collagene e gelatina, alla quale vengono aggiunte nanoparticelle di vetro bioattive, in modo da imitare il microambiente biochimico e biomeccanico, con il fine di fornire un supporto per il rilascio di cellule nel miocardio [7].

### *2.3.2 Idrogel semisolidi*

Questo tipo di idrogel presenta buone proprietà bio-adesive, caratteristica molto utile per il rilascio controllato e prolungato di farmaci e proteine. Vengono preparati con due tipi di materiali, di cui almeno uno di natura biologica, e aventi elevato peso molecolare, in modo da massimizzare le proprietà adesive. Grazie a queste proprietà possono essere intesi come idrogel bio-adesivi o muco-adesivi. Negli ultimi decenni sono stati fatti importanti passi avanti per quanto riguarda lo sviluppo di questo tipo di idrogel, basati sull'autoassemblaggio di diversi peptidi con polimeri muco-adesivi naturali, con particolare riguardo alla rigenerazione dei tessuti. Ne è un esempio l'idrogel sintetizzato a partire da un polisaccaride naturale, la gomma sterculia, assieme ad un polimero naturale chiamato poli-vinilpirrolidone, i quali conferiscono proprietà muco-adesive biocompatibili con i tessuti, al fine di avere un'efficace somministrazione di farmaci [7].

### *2.3.3 Idrogel liquidi*

A temperatura ambiente sono allo stato liquido ma, a temperature superiori, presentano fase elastica simile a quella di un tessuto morbido. Sono di grande interesse per la loro elevata biocompatibilità, funzionalità e facilità di sintesi, nonché per la possibilità di autoregolare la dimensione della loro struttura reticolata in base alle condizioni ambientali. I vantaggi principali che derivano dall'utilizzo di questo tipo di idrogel sono dovute al fatto che possono incorporare facilmente farmaci, proteine e cellule e alla possibilità di iniettarli nei sistemi viventi evitando qualsiasi tipo di procedura chirurgica [7].

## **2.4 Classificazione in base alla composizione**

In base al metodo di preparazione, gli idrogel possono essere classificati come omo-polimeri, copolimeri, reti semi-interpenetranti e reti interpenetranti.

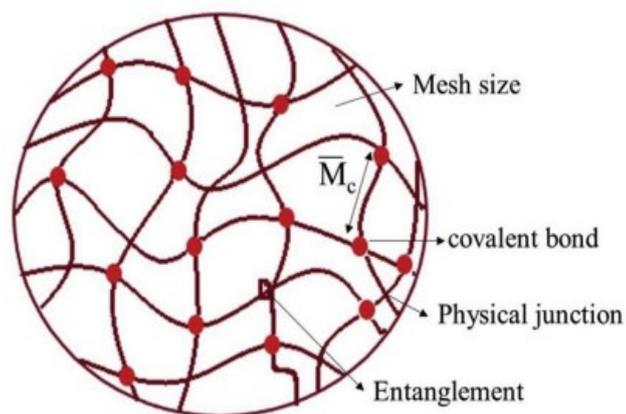


Figura 2.4: struttura di un idrogel a livello molecolare.

#### 2.4.1 Idrogel omo-polimerici

Fanno riferimento a reti di polimeri che derivano da un solo monomero. Possono presentare struttura reticolata (figura 2.4), a seconda della natura del monomero e della tecnica di polimerizzazione utilizzata. Ne sono un esempio gli idrogel a base di polietilenglicole (PEG): si tratta di composti reattivi nei confronti di stimoli esterni e ampiamente utilizzati come sistemi di rilascio controllato di farmaci, proteine e fattori di crescita; inoltre, possono essere utilizzati per la produzione di tessuti funzionalizzati [5].

#### 2.4.2 Idrogel co-polimerici

Sono composti da due tipi diversi di monomero, di cui almeno uno di natura idrofilica. Un esempio importante è dato dal copolimero biodegradabile a tre blocchi costituito da poli(etilenglicole) - poli( $\epsilon$ -caprolattone) - poli(etilenglicole), utilizzato nello sviluppo di sistemi per il rilascio controllato di farmaci. Il meccanismo coinvolto nella sintesi è la copolimerizzazione con apertura ad anello dell' $\epsilon$ -caprolattone, nella quale viene utilizzato come iniziatore il PEG mentre come catalizzatori l'ottoato stannoso e l'esametilene diisocianato [5].

#### 2.4.3 Reti interpenetranti (IPN)

Questa categoria di idrogel deriva dalla combinazione di due tipi diversi di polimeri, almeno uno dei quali sintetizzato o reticolato in precedenza, con un processo a sé stante. Ciò avviene tipicamente per immersione del polimero preformato in una soluzione contenente monomeri dell'altro polimero e un iniziatore. I principali vantaggi di questa struttura provengono dalla possibilità di ottenere matrici di idrogel dense, con proprietà meccaniche superiori, proprietà fisiche controllabili e un'incorporazione di farmaci più efficiente se comparata con quella degli idrogel convenzionali. La dimensione dei pori (figura 2.4) e la chimica di superficie dell'IPN

possono essere controllate per regolare la cinetica di rilascio del farmaco e l'interazione tra idrogel e tessuti circostanti [5].

#### *2.4.4 Reti semi-interpenetranti (semi-IPN)*

Se un polimero è lineare e penetra in una rete già reticolata, senza che vi siano altri legami chimici tra polimero e rete, si sta parlando di rete semi-interpenetrante. Questo tipo di strutture permette di preservare al meglio la velocità della risposta cinetica di rigonfiamento della rete al pH e alla temperatura. Un esempio è l'intrappolamento di cloruro di poliallilammonio cationico lineare in un idrogel co-polimerico di acido acrilico/acrilamide, il quale fornisce sia una maggior resistenza meccanica che una completa commutazione del pH per quanto riguarda il rilascio di teofillina. La rete dell'idrogel contiene sia legami covalenti, i quali mantengono la struttura tridimensionale, che ionici che invece conferiscono maggior resistenza meccanica [5].

### **2.5 Idrogel sensibili agli stimoli o smart idrogel**

Si tratta di una tipologia di idrogel in grado di rispondere agli stimoli ambientali; infatti, manifestano cambiamenti a livello di crescita, variazioni strutturali, miglioramenti dal punto di vista della permeabilità e delle proprietà meccaniche e per questi motivi vengono chiamati idrogel intelligenti. Gli stimoli di natura fisica includono luce, pressione, temperatura, campi elettrici e magnetici e sollecitazioni meccaniche che vanno a modificare le interazioni molecolari nella struttura dell'idrogel. Gli stimoli di natura chimica invece includono pH, fattori ionici, agenti chimici che vanno ad agire sulle interazioni tra le catene polimeriche e i solventi e tra le catene polimeriche, a livello molecolare. Una sottoclasse di questa categoria è quella degli idrogel dual responsive, risultanti da una combinazione di due meccanismi di risposta agli stimoli in un unico sistema di idrogel; ne è un esempio l'acido poliacrilico con l'acido copolivinilsolfonico. Per quanto riguarda invece gli stimoli di tipo biochimico, essi includono le risposte a ligando, enzima, antigene e altri agenti biochimici [5].

#### *2.5.1 Idrogel pH responsivi*

Sono stati riportati esempi di idrogel polimerici con gruppi ionici in grado di accettare o donare protoni, in risposta a variazioni del pH ambientale. In questo tipo di idrogel, a pH specifico, il grado di ionizzazione, conosciuto come  $pK_a$  o  $pK_b$ , varia in maniera molto ampia; questo rapido cambiamento nella carica netta dei gruppi ionizzati provoca un'improvvisa transizione di volume, generando forze repulsive elettrostatiche tra essi e provocando una forza di rigonfiamento osmotico molto grande. Esistono due tipi di idrogel sensibili al pH: anionici e

cationici. I primi hanno gruppi funzionali come l'acido carbossilico o solfonico, nei quali avviene la deprotonazione quando il pH ambientale è superiore al  $pK_a$ ; ciò porta alla ionizzazione dei gruppi funzionali che a loro volta causano il rigonfiamento dell'idrogel. Gli idrogel anionici invece presentano gruppi funzionali, come i gruppi amminici, dove la ionizzazione ha luogo al di sotto del  $pK_b$  e provoca il rigonfiamento dell'idrogel, dovuto alle repulsioni elettrostatiche che aumentano [5].

#### *2.5.1.1 Proprietà degli idrogel pH responsivi*

Il grado di rigonfiamento ionico dell'idrogel è controllato da fattori importanti come la concentrazione dei polimeri, la densità di reticolazione, la carica ionica, il  $pK_a$  e il  $pK_b$  dei gruppi ionizzabili, l'idrofobicità e l'idrofilicità e il grado di ionizzazione. Un secondo fattore che influenza il grado di rigonfiamento dell'idrogel include le proprietà del mezzo di rigonfiamento, come pH e forza ionica [5].

#### *2.5.2 Idrogel sensibili alla temperatura*

Sono probabilmente la classe più studiata tra i vari sistemi polimerici sensibili agli stimoli, esibiscono proprietà di transizione di fase in risposta a variazioni di temperatura; la caratteristica comune a tutti questi idrogel è la presenza di gruppi idrofobici nella struttura (il gruppo etile, metile e propile) (Figura 2.5). La maggior parte dei polimeri vede aumentare la propria solubilità in acqua man mano che la temperatura aumenta, mentre, polimeri con temperatura critica inferiore della soluzione (LCST), vedono diminuire la loro solubilità in acqua con l'aumentare della temperatura. La struttura di idrogel con queste caratteristiche si restringe quando la temperatura aumenta al di sopra della LCST e questo comportamento viene definito come dipendenza inversa dalla temperatura. Questo tipo di comportamento si manifesta in idrogel che sono costituiti da catene polimeriche che presentano gruppi moderatamente idrofobici (se troppo idrofobici le catene del polimero non si dissolvono del tutto in acqua) o un insieme di segmenti idrofobici e idrofilici. A temperature più basse, i legami ad idrogeno tra segmenti idrofilici della catena polimerica e le molecole d'acqua sono dominanti e portano ad una maggiore dissoluzione in acqua del sistema; come la temperatura aumenta, le interazioni idrofobiche tra segmenti idrofobici della catena si rafforzano mentre i legami ad idrogeno diventano più deboli. In generale, più sono i costituenti idrofobici nella catena polimerica, più sarà bassa la temperatura critica inferiore della soluzione; la LCST può essere modificata aggiustando la quantità di segmenti idrofobici e idrofilici delle catene polimeriche, per esempio costruendo un copolimero di monomeri di entrambe le nature [11].

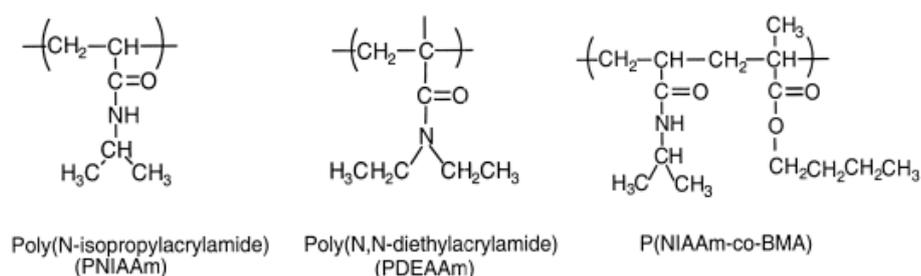


Figura 2.5: formula di struttura di alcuni polimeri termo-sensibili.

### 2.5.2.1 Idrogel termo-reversibili

Questo tipo di idrogel ha la stessa struttura di quelli citati in precedenza ma le catene polimeriche non sono reticolate covalentemente; ciò provoca una transizione soluzione-gel invece che una transizione rigonfiamento-restringimento. Interazioni molecolari come associazioni idrofobiche e legami ad idrogeno giocano un ruolo importante nel repentino cambiamento di volume di questi idrogel alla temperatura critica della soluzione (CTS); in condizioni di rigonfiamento, le molecole di acqua formano legami ad idrogeno con i gruppi polari della catena principale. I legami polimero-acqua diventano sfavorevoli rispetto alle interazioni polimero-polimero o acqua-acqua e provocano una rapida disidratazione del sistema, il quale rilascia acqua e guadagna entropia, con conseguente restringimento della struttura polimerica. I polimeri con domini idrofobici possono essere reticolati in un mezzo acquoso mediante gelificazione termica inversa, nella quale, il segmento idrofobico è accoppiato al segmento idrofilico tramite innesto o copolimerizzazione. Se la temperatura aumenta, l'entropia del solvente aumenta e i domini idrofobici si aggregano per minimizzare la loro superficie [5].

### 2.5.3 Idrogel glucosio-sensibili

Uno dei problemi più grandi a livello di somministrazione controllata di farmaci è lo sviluppo di sistemi di somministrazione autoregolati. La somministrazione di insulina è un processo differente rispetto a quello di qualsiasi altro farmaco perché va fatta in maniera precisa, sia dal punto di vista della quantità sia per quanto riguarda le tempistiche; i sistemi di somministrazione controllata di insulina richiedono la capacità di rilevamento del glucosio e un meccanismo di spegnimento automatico. Sono stati sviluppati molti sistemi per modulare la somministrazione di insulina e tutti quanti hanno un sensore di glucosio presente al loro interno [11].

#### *2.5.3.1 Idrogel a base di glucosio ossidasi*

Il glucosio ossidasi è uno degli enzimi più utilizzati per il rilevamento di glucosio; si tratta di un enzima che ossida il glucosio ad acido gluconico, provocando una variazione di pH nell'ambiente circostante. Questo fa sì che possano essere utilizzati idrogel sensibili alle variazioni di pH per modulare il rilascio di insulina. Le membrane di idrogel fatte di policationi, in seguito all'abbassamento di pH, si gonfiano e tendono a rilasciare più farmaco, in questo caso insulina; se le membrane sono fatte di polianioni entrano in gioco meccanismi diversi per garantire il rilascio controllato di insulina. Può essere progettato un regolatore di flusso idraulico sensibile al glucosio, utilizzando un sistema a membrana porosa costituito da un filtro poroso in cui vengono innestati polianioni e il glucosio ossidasi. Le catene di polianioni innestate si espandono a pH 7 a causa della repulsione elettrostatica tra le cariche sulle catene polimeriche; quando la glucosio-ossidasi converte il glucosio in acido gluconico, le catene collassano a causa della protonazione dei gruppi carbossilici del polimero, permettendo ai pori della membrana di aprirsi per il rilascio di insulina [11].

#### *2.5.3.2 Sistemi immobilizzati con concanavalina A*

La concanavalina A (Con A) è stata utilizzata frequentemente per modulare il rilascio di insulina: si tratta di una proteina che lega il glucosio. In questo tipo di sistema, le molecole di insulina sono attaccate ad un supporto o vettore attraverso interazioni specifiche che possono essere interrotte dal glucosio stesso; ciò generalmente richiede l'introduzione di gruppi funzionali sulle molecole di insulina. In un approccio, l'insulina è stata modificata chimicamente per introdurvi glucosio che si lega specialmente al Con A, formando un sistema insulina-Con A glicosilato. Le molecole libere di glucosio competono con i coniugati glucosio-insulina legati alla Con A e quindi l'insulina glicosilata viene rilasciata nei tessuti circostanti [11].

#### *2.5.4 Idrogel a base di proteine*

Si tratta di sistemi progettati specificamente con sequenze, composizioni, stereochemica e pesi molecolari predefiniti, utilizzando la tecnologia del DNA ricombinante per la somministrazione di farmaci e in applicazioni di ingegneria tissutale. Negli idrogel polimerici a base proteica, i copolimeri a tre blocchi presentano domini a spirale alle estremità e domini di polipeptidi idrosolubili al centro; inoltre, i residui amminoacidici idrofobici dell'elica proteica sono utilizzati come reticolanti fisici. Di conseguenza, la reattività alla temperatura e al pH può essere ottenuta manipolando le sequenze amminoacidiche dei domini a spirale e le interazioni cellulari

possono essere migliorate conoscendo la sequenza polipeptidica idrofila. Inoltre, per preparare la struttura 3D dell'idrogel, vengono utilizzati come reticolanti i domini proteici a spirale di un polimero sintetico lineare idrosolubile [11].

### 2.5.5 Idrogel antigene-responsivi

Vengono progettati innestando antigeni sulle catene polimeriche idrofiliche principali per poter fornire biomolecole in siti specifici e in modo mirato e possono essere miscelati con strutture polimeriche idrofiliche e reticolate nelle quali sono innestati anticorpi (Figura 2.6). In assenza di un antigene libero, la struttura dell'idrogel si restringe a causa del legame intracatena antigene-anticorpo nella rete polimerica; progettare un dispositivo in grado di rilevare un antigene li rende biomateriali utili per il trasporto di biomolecole, proteine o farmaci. Viene infatti riportato un esempio di idrogel che risponde all'antigene, il quale può essere preparato innestando l'antigene e l'anticorpo corrispondente nella rete polimerica, in modo che il legame tra i due introduca legami crociati nella struttura. Il legame dell'antigene libero innesca un cambiamento nel volume dell'idrogel, a causa della rottura dei legami crociati non covalenti; inoltre, è stato riportato un comportamento di memoria di forma e di permeabilità pulsatile alle proteine attraverso la rete, dovuto ad un graduale cambiamento nella concentrazione dell'antigene [11].

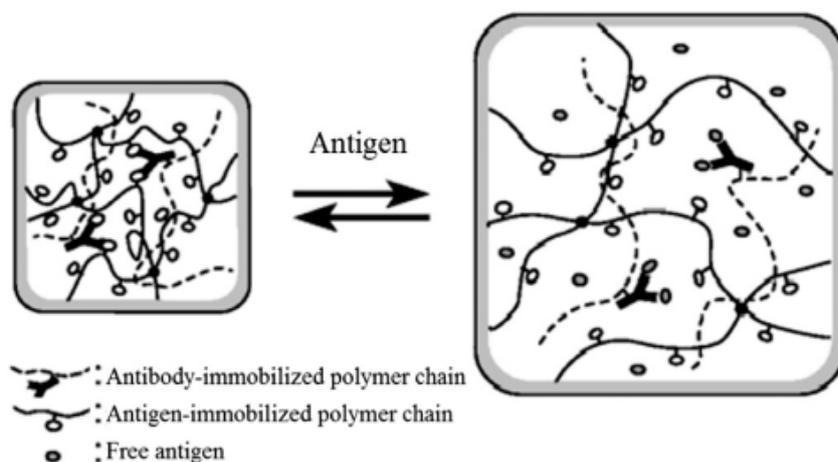


Figura 2.6: Rigonfiamento di un idrogel semi-IPN antigene-anticorpo in risposta ad un antigene libero.

### **3. Applicazioni degli Idrogel in TERM**

Gli idrogel nel corso degli ultimi vent'anni sono diventati uno strumento importante sia in ingegneria tissutale che in medicina rigenerativa. Infatti, sono state sviluppate diverse applicazioni che prevedono il loro utilizzo come scaffold in grado di imitare la struttura della matrice extracellulare dei tessuti, garantendo l'integrità strutturale e il volume per l'organizzazione cellulare agendo come barriere, vettori o come sistemi per il rilascio controllato di farmaci. In questo capitolo si intende dare una panoramica sul loro funzionamento a seconda del tipo di applicazione e in base alle specifiche tecniche della loro struttura.

#### **3.1 Idrogel come vettori per il trapianto di cellule**

Quando parti di tessuti o organi vengono irrimediabilmente danneggiati ci sono diverse opzioni di trattamento, tra cui riparazione, sostituzione o rigenerazione. L'ingegneria tissutale è stata descritta come un campo interdisciplinare che applica i principi dell'ingegneria allo sviluppo di sostituti biologici che ripristinano, mantengono o migliorano le funzioni dei tessuti. Questo campo di ricerca sta avanzando rapidamente, combinando progressi in biologia e in diversi settori tecnologici, suscitando molte speranze nei molteplici ambiti di ricerca. Infatti, l'ingegneria dei tessuti ha un forte potenziale come applicazione in medicina rigenerativa per lo sviluppo di tessuti e organi sostitutivi e nella ricerca biologica che cerca di riprodurre i microambienti fisiologici in vitro. La formazione di organi e tessuti in vitro si basa sulla coordinazione nel tempo e nello spazio della differenziazione cellulare, dalla divisione delle cellule fino alla loro morte. Questa coordinazione si basa a sua volta sull'integrazione cellulare di segnali provenienti dal microambiente cellulare che include matrice extracellulare e la relativa comunicazione tra le cellule. La principale sfida dell'ingegneria dei tessuti è di cercare di ricreare un ambiente che induca la differenziazione delle cellule e la loro organizzazione in un tessuto. La composizione chimica dell'ECM e le proprietà meccaniche risultanti sono entrambi aspetti importanti poiché la trasduzione di segnali chimici e fisici, tramite molecole di adesione cellulare, influisce sulla forma, sulla migrazione e sulla differenziazione delle cellule [2].

In questo contesto gli idrogel hanno un grande potenziale per la coltura delle cellule e il conseguente trapianto delle stesse a livello di tessuti o organi danneggiati o non funzionanti. Le strutture di idrogel agiscono come vettori per le cellule da trapiantare e sono fondamentali in quanto la loro struttura garantisce sia immunoisolamento che diffusione di ossigeno, nutrienti e prodotti metabolici. Ad esempio, per lo sviluppo di un pancreas bio-artificiale sono stati

fabbricati idrogel a base di PEG diacrilato (PEGDA), utili per il trapianto delle isole di Langerhans. In questo studio [12] le cellule delle isole di Langerhans venivano sospese in una soluzione contenente un polimero fotopolimerizzabile. In un secondo momento, la soluzione veniva utilizzata per ottenere delle microsfeere di PEG contenenti le cellule da trapiantare, garantendo così da una parte un adeguato immunoisolamento, dall'altra una limitata capacità di diffusione delle sostanze nutritive, mancanza poi superata attraverso la riduzione dello spessore delle microsfeere. Circa il 90% delle cellule veniva completamente incapsulato con efficienza non dipendente dalla concentrazione e dal peso molecolare del PEGDA nella soluzione. La vitalità delle cellule dopo l'incapsulamento e la coltura è stata utilizzata come misura dell'influenza del processo sul comportamento delle cellule. Si è osservata una piccola, ma statisticamente rilevante, diminuzione della vitalità delle isole nella prima settimana dopo l'incapsulamento, rispetto alle isole non incapsulate. Solo le isole incapsulate in una soluzione contenente il 10% di PEGDA non presentavano differenze nella vitalità. Alla terza settimana di coltura si è arrivati a notare che non vi era nessun tipo di differenza nella vitalità delle isole all'interno delle diverse strutture di PEGDA aventi concentrazioni e pesi molecolari diversi [4].

### **3.2 Idrogel come barriere**

Gli idrogel possono essere utilizzati anche per migliorare la risposta di guarigione in seguito a lesioni del tessuto e possono essere usati come barriere per evitare restenosi (una potenziale complicanza dell'angioplastica, la procedura che rimuove un'ostruzione arteriosa) o trombosi post-operatorie. È stato dimostrato come la formazione di un sottile film di idrogel nei vasi sanguigni, attraverso fotopolimerizzazione interfacciale, inibisce la restenosi e la trombosi, riducendo così l'ispessimento intinale [13]. La riduzione dell'ispessimento intinale è dovuta all'azione del film sottile di idrogel che agisce da barriera, impedendo alle piastrine, alle proteine del plasma e ai fattori di coagulazione di entrare in contatto diretto con le pareti vascolari. Il contatto diretto delle pareti con questi fattori favorirebbe la proliferazione, la migrazione delle cellule muscolari lisce e la sintesi della matrice extracellulare del tessuto, causando così complicazioni post-operatorie. Ad esempio, idrogel a base di poli (etilene-glicole-co-acido lattico) diacrilato sono stati sviluppati attraverso fotopolimerizzazione su superfici intraperitoneali, dove sono stati in grado di prevenire la deposizione di fibrina e l'adesione dei fibroblasti alla superficie del tessuto [4].

### **3.3 Idrogel come sistemi per il rilascio controllato di farmaci**

Un'ulteriore applicazione degli idrogel è data dal loro utilizzo come sistemi per il rilascio controllato e localizzato di farmaci. Ciò è possibile grazie alla loro natura idrofilica, alla loro biocompatibilità e alla capacità di controllare e innescare il rilascio di farmaci in risposta a stimoli biomolecolari. La cinetica di rilascio del farmaco di interesse può essere gestita controllando il grado di rigonfiamento, l'estensione della reticolazione e il tasso di biodegradazione dell'idrogel. In quest'ambito, gli idrogel fotopolimerizzabili sono di particolare interesse per la loro capacità di aderire e conformarsi al tessuto bersaglio, quando formati in situ. Infatti, questa caratteristica combinata con la loro capacità di agire come barriere permette di somministrare localmente un farmaco e allo stesso tempo permette di inibire la formazione di qualsiasi tipo di aderenze post-operatorie [4].

### **3.4 Idrogel utilizzati come scaffold**

La matrice extracellulare (ECM) è la componente extracellulare che conferisce supporto strutturale alle cellule e di conseguenza risulta molto importante il suo studio quando si parla di scaffold per ingegneria tissutale. Si tratta di una struttura 3D idrofilica costituita da fibre di collagene e da filamenti di proteoglicani: le fibre di collagene si presentano sotto forma di fasci e garantiscono resistenza alla trazione e la durabilità del tessuto circostante mentre i filamenti di proteoglicani sono strutture a spirale costituite da proteine e acido ialuronico e conferiscono ai tessuti caratteristiche di viscoelasticità. Assieme al fluido interstiziale, che è simile al plasma con concentrazione proteica più bassa, l'ECM mostra caratteristiche meccaniche e struttura simili a quelle di un gel. Gli idrogel devono soddisfare una serie di criteri di progettazione per imitare correttamente l'ECM e, di conseguenza, per funzionare in modo appropriato garantendo la formazione di nuovo tessuto.

#### *3.4.1 Biodegradazione*

Un requisito fondamentale di uno scaffold è quello di riuscire a mantenere la proliferazione e la distribuzione cellulare desiderata per tutta la durata di vita prevista dello scaffold, in molti casi fino alla sua degradazione completa. Per biodegradazione si intende un fenomeno molto complesso che consiste essenzialmente nell'alterazione chimica e fisica che un materiale subisce in ambiente biologico: pertanto la velocità e l'entità della biodegradazione sono fondamentali per gli idrogel [14]. L'importanza della degradazione dello scaffold in coltura tissutale è stata valutata esaminando la vita cellulare in scaffold non degradabili. Per esempio, il PEG e il PEG dimetacrilato sono stati fotopolimerizzati per produrre scaffold di idrogel che

incapsulano condrociti bovini e ovini per la rigenerazione della cartilagine. Dopo il processo di polimerizzazione le cellule all'interno dell'impalcatura dell'idrogel sono state in grado di mantenere la loro vitalità e si sono disperse in modo uniforme. A causa della non biodegradabilità dello scaffold a base di PEG, il numero di cellule è diminuito significativamente nel tempo. In un altro caso, è stata sviluppata una struttura di idrogel biodegradabile attraverso la fotopolimerizzazione del poli(propilene fumarato-co-glicole-etilenico), utilizzato per l'incapsulamento di cellule endoteliali necessarie alla crescita di cellule vascolari. Nonostante l'importanza della biodegradazione come fattore chiave per gli scaffold di idrogel, alcune applicazioni di ingegneria tissutale potrebbero non richiedere la completa degradazione dello scaffold, come nel caso della sostituzione della cornea o della cartilagine articolare. Infatti, per questi tessuti gli scaffold semipermanenti o permanenti possono risultare la scelta migliore per sostituire le funzioni di base del tessuto perso o danneggiato. In generale, gli scaffold biodegradabili vengono sviluppati incorporando legami crociati e/o trasversali sulla catena principale del polimero e la loro degradazione avviene principalmente a causa di processi biologici come la digestione enzimatica. Le matrici idrogel biodegradabili possono anche essere realizzate incorporando componenti della ECM naturalmente biodegradabili come acido ialuronico, laminina, fibronectina e collagene [15].

### *3.4.2 Biocompatibilità*

Per biocompatibilità si intende la capacità di non evocare reazioni avverse nel sistema vivente, in seguito all'impianto di un biomateriale all'interno dell'ambiente biologico [14]. Si tratta di un fattore chiave nella progettazione degli scaffold in quanto non devono essere evocate risposte immunologiche, tossiche o dannose per il corpo umano. Questa definizione è particolarmente rilevante nell'ingegneria dei tessuti perché la natura dei costrutti tissutali che devono interagire con il corpo durante il processo di guarigione e rigenerazione cellulare, nonché durante la degradazione dello scaffold. Una delle principali sfide, per quanto riguarda la biocompatibilità degli idrogel, è rappresentata dalle sostanze chimiche e potenzialmente tossiche che possono essere utilizzate durante il processo di polimerizzazione di idrogel sintetici o nella reticolazione di polimeri naturali. Infatti, componenti come monomeri non reagiti, stabilizzatori, iniziatori, solventi organici o emulsionanti utilizzati durante la preparazione dell'idrogel, possono risultare dannosi se diffusi nell'ambiente biologico di interesse. Pertanto, le strutture degli idrogel andrebbero purificate dalle sostanze chimiche potenzialmente dannose. La purificazione può essere ottenuta, per esempio, tramite dialisi o tramite lavaggio con solventi; in alcuni casi ciò diventa più difficile, o addirittura impossibile, come nel caso di

idrogel che vengono preparati attraverso gelificazione in situ. Il motivo è che i reagenti necessari per sintetizzare l'idrogel vengono introdotti nel corpo mentre si trovano ancora in una soluzione contenente un pre-polimero. Pertanto, quando ci si serve di questi metodi di produzione, si deve prestare attenzione affinché tutti i reagenti risultino non tossici [15].

#### *3.4.3 Dimensione dei pori*

Le strutture degli idrogel progettati per l'ingegneria tissutale devono essere altamente porose, con una geometria aperta e interconnessa, in modo da garantire una grande superficie in rapporto al volume dello scaffold stesso. Questa caratteristica è importante perché favorisce la crescita e la distribuzione uniforme delle cellule e la vascolarizzazione della matrice. Non solo la quantità di pori risulta fondamentale, ma anche altri fattori come la dimensione, il volume, la loro distribuzione, la forma e la rugosità delle pareti dei pori. Per esempio, se i pori fossero troppo piccoli verrebbero bloccati dalle cellule, inibendo così la penetrazione cellulare, la produzione di ECM e la vascolarizzazione delle aree interne alla struttura dell'idrogel [4].

#### *3.4.4 Caratteristiche meccaniche*

L'aspetto meccanico è fattore che ha un effetto significativo nella progettazione di scaffold a base di idrogel in quanto tra cellule dei diversi tessuti vi è un certo livello di tensione che varia a seconda del tipo di tessuto e che può essere alterata in caso di patologie. Per questo, le strutture degli idrogel devono essere progettate con caratteristiche meccaniche specifiche per ogni singolo tessuto. Uno dei principali parametri che controllano la flessibilità meccanica degli scaffold è la densità di reticolazione, che può essere utilizzata per influenzare la crescita e la morfologia delle cellule incapsulate nella struttura reticolata dell'idrogel [4].

#### *3.4.5 Caratteristiche della superficie*

La superficie dello scaffold è il sito primario di interazione con le cellule e i tessuti circostanti. Le caratteristiche fisico-chimiche della superficie sono parametri fondamentali nel controllo dell'adesione e della proliferazione cellulare. Le strutture degli idrogel devono essere progettate in modo da agevolare l'ancoraggio delle cellule alla superficie e per questo motivo superfici ampie e accessibili sono vantaggiose al fine di garantire la presenza delle cellule necessarie a sostituire o ripristinare le funzioni dei tessuti. Le caratteristiche superficiali possono essere migliorate in maniera selettiva mediante diversi approcci, tra cui la deposizione di film sottili e l'immobilizzazione di componenti bioadesivi (p. es., peptidi RGD, fattori di crescita, insulina, fibronectina e collagene). Queste modifiche sono in grado di migliorare la biocompatibilità con

le superfici degli scaffold e, di conseguenza, permettono alle cellule di riconoscere in maniera specifica i siti di ancoraggio sulle superfici [4].

#### *3.4.6 Vascolarizzazione*

Si tratta di un fattore essenziale per garantire la presenza di un mezzo per l'apporto di nutrienti e per permettere l'eliminazione dei prodotti di scarto. La formazione di nuovi vasi sanguigni (neovascolarizzazione) è quindi fondamentale nella progettazione della maggior parte delle applicazioni di ingegneria tissutale. Tuttavia, progettare strutture adeguate che permettano e favoriscano la crescita di nuovi vasi sanguigni rappresenta una grande sfida; infatti, gli scaffold devono avere un'elevata porosità, dimensioni dei pori adeguate e consentire il rimodellamento vascolare durante la crescita dei tessuti. In generale, ci sono due approcci principali per garantire questo tipo di caratteristiche, come illustrato nella (Figura 3.1). In un primo approccio, i fattori di crescita vengono incorporati nello scaffold per stimolare il sistema vascolare dei tessuti circostanti a crescere nell'impalcatura, mentre il secondo prevede che lo scaffold venga seminato con cellule endoteliali progenitrici (EPC). Ad esempio, idrogel a base di gelatina, alginato, PEG o acido ialuronico caricati con fattori di crescita, hanno mostrato la capacità di indurre con successo la crescita di microvasi in seguito all'innesto in vivo. Facendo affidamento sulle EPC e sul sistema vascolare circostante ci sarà bisogno di molto tempo affinché si formino nuovi vasi sanguigni e serviranno quantità elevate di cellule. Dato che le cellule non possono sopravvivere a più di poche centinaia di micrometri dai vasi sanguigni, se altri tipi di cellule venissero incorporate nello scaffold di idrogel, i tessuti potrebbero andare incontro a necrosi mentre si attende la crescita vascolare. Inoltre, sebbene le EPC rappresentino una fonte illimitata di cellule per la prevascolarizzazione in vitro, la loro differenziazione nei diversi stadi deve essere controllata. In un recente studio [16] è stato scoperto che gli idrogel a base di acido ialuronico potevano mantenere le cellule staminali embrionali (ESC) nel loro stato indifferenziato fino a quando non veniva raggiunta la differenziazione.

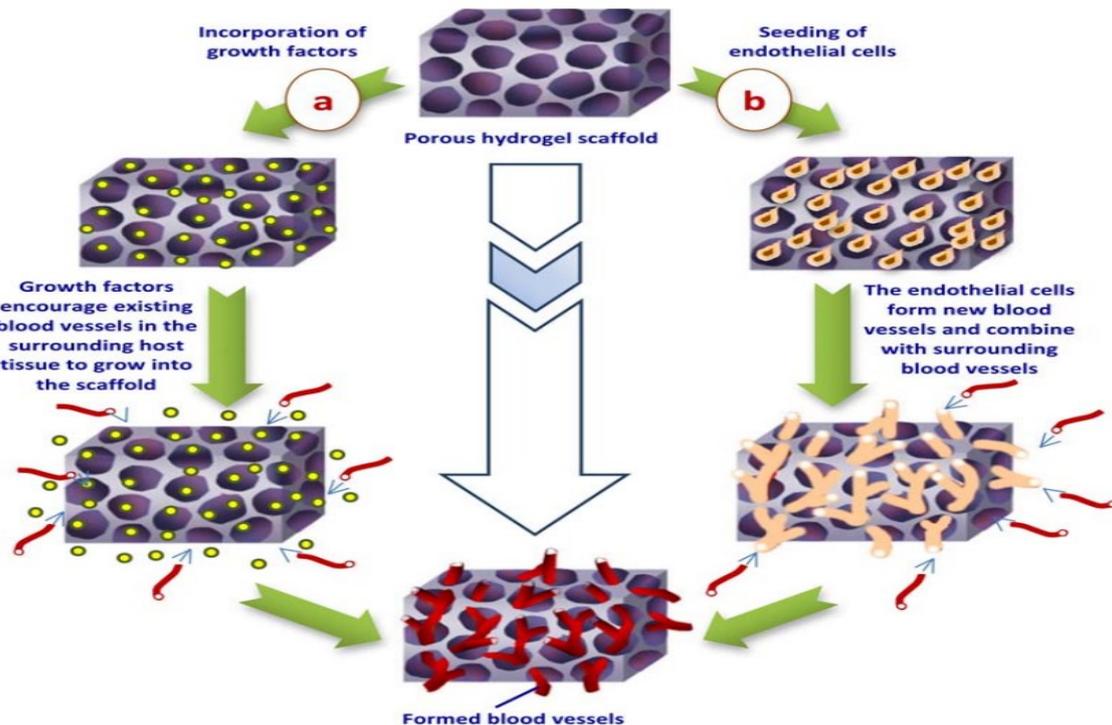


Figura 3.1 Illustrazione schematica della formazione di vasi sanguigni ottenuta: (a) incorporando fattori di crescita regolatori; (b) seminando cellule endoteliali nello scaffold poroso di idrogel.

### 3.5 Idrogel come strumento di rigenerazione dei tessuti

La versatilità di questi materiali applicati per lo sviluppo di tessuti ingegnerizzati è evidente in tessuti come quello cardiaco, cartilagineo, osseo, nervoso e nei dischi intervertebrali.

#### 3.5.1 Tessuto cardiaco

Il tessuto cardiovascolare può ostruirsi o danneggiarsi a causa di malattie o lesioni, portando ad una graduale degenerazione delle funzioni cardiache. L'ingegneria tissutale è particolarmente utile per riparare e rigenerare i danni che si verificano a seguito di un'ischemia miocardica. La complessa chimica degli idrogel su misura, adattati alla fisiologia di un tessuto specifico, è stata dimostrata nel caso del miocardio ischemico da Garbner. In uno studio, Garbner e i suoi collaboratori hanno progettato un idrogel di poli (N-isopropilacrilammide-co-propilacrilico-co-acrilato di butile) per il quale lo stimolo di gelificazione era il pH fisiologico associato al tessuto ischemico [17]. Il ruolo di questo idrogel era quello di fungere da mezzo per il rilascio controllato del bFGF (un fattore di crescita dei fibroblasti) al fine di favorire la rivascolarizzazione del tessuto ischemico. Iniettando nel tessuto cardiaco l'idrogel o una soluzione salina contenenti il fattore di crescita, è stato dimostrato come l'idrogel fosse più efficiente, rimanendo nel sito di iniezione per sette giorni al contrario della soluzione salina nella quale il bFGF non era più recuperabile [6]. Nonostante i miglioramenti ottenuti nelle

funzioni cardiache mediante l'iniezione di idrogel polimerici sintetici e naturali nelle aree ischemiche, sembra possibile ottenere ulteriori miglioramenti intrappolando cellule staminali. Attualmente, gli idrogel a base di polimeri naturali iniettabili e i tessuti decellularizzati che immobilizzano le cellule embrionali umane o quelle del midollo osseo sono oggetto di studio per la rigenerazione del tessuto contrattile e per la sostituzione delle funzioni cardiache. Un altro aspetto tipico della rigenerazione cardiovascolare è quello di permettere la rivascularizzazione e l'angiogenesi, con la formazione di nuovi vasi sanguigni nell'area danneggiata. Per queste applicazioni, sono stati proposti idrogel di origine naturale che trasportano le cellule endoteliali da sole o in coltura con cellule staminali [18].

### *3.5.2 Tessuto cartilagineo*

Negli ultimi decenni il trapianto diretto di condrociti autologhi è risultato essere un approccio clinico promettente per la riparazione della cartilagine. Tuttavia, la necessità di interventi chirurgici invasivi, la dispersione delle cellule dopo l'iniezione e l'elevata mortalità delle cellule iniettate hanno limitato le applicazioni cliniche di tali terapie. Materiali naturali come collagene, fibrina, acido ialuronico, chitosano, alginato e gelatina sono i materiali di cui ci si è serviti per immobilizzare condrociti per la riparazione della cartilagine. Questo perché possono garantire una matrice protettiva durante la veicolazione delle cellule, ma anche perché rappresentano un modello biomimetico che facilita la differenziazione delle cellule staminali, anche grazie all'utilizzo di fattori di crescita come il TGF- $\beta$ 3. I polimeri naturali sono spesso stati utilizzati in combinazione con polimeri sintetici in modo da migliorare le proprietà meccaniche della cartilagine danneggiata. Inoltre, sono stati sviluppati sistemi per lo sviluppo di idrogel termosensibili a partire dalla combinazione di polimeri naturali con copolimeri a base di etilene-ossido e polipropilene-ossido (Pluronic®). Questo tipo di idrogel, contenenti molecole bioattive o cellule, vengono iniettati in forma liquida e gelificano in situ a temperatura fisiologica, fornendo una migliore conformazione al sito anatomico e una migliore omogeneità di distribuzione degli agenti terapeutici. Un'altra strategia recentemente sviluppata prevede la funzionalizzazione di polimeri naturali con oligopeptidi contenenti la sequenza RGD che si sono dimostrati in grado di migliorare l'adesione cellulare in tutto l'idrogel e che quindi hanno permesso di accelerare la guarigione della cartilagine [18].

### *3.5.3 Tessuto osseo*

Anche se le caratteristiche fisiche e meccaniche dell'osso non sembrano rendere favorevole la sua ricostruzione e rigenerazione, la sua elasticità (e conseguente resistenza alla trazione) molto

simile a quella di tessuti morbidi ha portato allo sviluppo di tecniche per la crescita ossea mediata dall'uso di idrogel. Materiali ceramici a base di fosfato di calcio e loro derivati sono probabilmente le molecole più sfruttate nell'ingegneria del tessuto osseo, pertanto il loro utilizzo in combinazione con gli idrogel potrebbe rappresentare una soluzione per lo sviluppo di tecniche di ricostruzione. Un approccio promettente nel caso di difetti causati da traumi contusivi o malattie è rappresentato dall'immobilizzazione all'interno di un idrogel di osteoblasti o di cellule osteoprogenitrici. Sono state sviluppate strategie che utilizzano materiali ceramici auto-indurenti o gel morbidi come vettori per la veicolazione di queste cellule. I materiali ceramici a base di fosfato di calcio hanno una composizione chimica strettamente correlata a quella della fase minerale dell'osso, conferiscono migliori proprietà meccaniche e sono in grado di immobilizzare le cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo (hBMSCs) o dal cordone ombelicale umano (hUC-MSCs). I gel morbidi sono invece utilizzati quando c'è necessità di avere un rilascio rapido delle cellule intrappolate e per la loro fabbricazione i materiali più utilizzati sono il chitosano e l'alginato. Un altro materiale che recentemente ha suscitato interesse come potenziale candidato per la riparazione ossea è la pectina. Che si parli del singolo polimero naturale o dello stesso polimero con opportune modifiche chimiche, si tratta di una molecola che promuove la formazione di gel e si degrada più rapidamente dell'alginato e del chitosano [18].

#### *3.5.4 Tessuto nervoso*

L'ingegneria dei tessuti e gli approcci basati sulla terapia cellulare per la riparazione del sistema nervoso sono un campo di ricerca estremamente prolifico. I danni, sia acuti (lesioni traumatiche, ictus) che cronici (Parkinson o sclerosi multipla), ai tessuti del sistema nervoso centrale possono avere gravi conseguenze in un tessuto dotato di una capacità di riparazione endogena molto limitata. Come per gli altri tessuti, gli idrogel sono dei candidati ideali per la rigenerazione neurale e ciò è dovuto alla loro capacità di essere fabbricati con proprietà reologiche simili al tessuto nervoso e con criteri di assemblaggio che permettono una loro localizzazione precisa e controllata. È stato dimostrato come l'utilizzo di gel a base di alginato, avente proprietà meccaniche simili a quelle del tessuto cerebrale nativo, stimoli l'espressione genica neuronale a partire dalle cellule staminali neurali. Questo studio [19] ha preso in considerazione gel di alginato con moduli elastici diversi: 183 Pa, 1028 Pa, 1735 Pa e 19700 Pa, generati facendo variare il rapporto tra alginato e cloruro di calcio nella miscela di gelificazione. Gli autori hanno riportato che i gel con modulo 183 Pa favorivano una maggiore proliferazione cellulare e l'espressione genica neuronale, come previsto per gel con modulo inferiore. Un ulteriore studio

[20] ha utilizzato gel miscelati di agarosio/chitosano/metilcellulosa/destrano e ha variato la composizione polimerica in diversi materiali, dimostrando che piccoli cambiamenti nelle proprietà fisiche derivanti dalla modifica della composizione del gel sono in grado di modificare l'interazione delle cellule neurali con il materiale. Ciò è stato valutato misurando l'adesione dei neuroni corticali ai materiali e si è osservato che più la superficie del materiale diventava carica positivamente, più era favorevole all'adesione cellulare [6].

### *3.5.5 Dischi intervertebrali*

L'ingegnerizzazione dei dischi intervertebrali (IVD) rappresenta un ulteriore campo di ricerca in cui le proprietà fisiche degli idrogel li rendono materiali ideali per applicazioni di sostituzione e rigenerazione del tessuto danneggiato. Uno dei problemi più comuni per il quale si è cercata una soluzione tramite strategie di rigenerazione del disco è rappresentato dalla degenerazione intrinseca dei dischi intervertebrali con l'invecchiamento. Si tratta di una problematica che può compromettere gravemente la qualità della vita a causa di una compromessa biomeccanica dei dischi, dovuta a modifiche del nucleo polposo (la parte centrale del disco intervertebrale). Sebbene gli interventi chirurgici forniscano buoni risultati clinici, in alcuni casi possono causare ulteriore degenerazione delle vertebre circostanti. È stato quindi esplorato l'utilizzo degli idrogel per la sostituzione o il potenziamento del tessuto del nucleo polposo. Oltre alle loro proprietà meccaniche facilmente regolabili per imitare i tessuti molli, la possibilità di gonfiarsi in situ per riempire uno spazio vuoto li rende delle protesi ideali per l'IVD. Possono essere impiantati in uno stato asciutto e con volume ridotto, ma possono anche gonfiarsi in modo da riempire qualsiasi spazio vuoto nel nucleo polposo degenerato. Possono essere utilizzate sia strategie in vivo che in vitro e tra queste vi è l'utilizzo della poli-N-acetil glucosammina. Questo materiale ha dimostrato in vitro di possedere proprietà meccaniche simili al tessuto umano del nucleo polposo, mantenendo il fenotipo delle cellule primarie del disco umano. Un altro tipo di idrogel utilizzabili nell'IVD sono quelli a base di chitosano in quanto dotati della capacità di sostenere la crescita di tipi cellulari appropriati e perché possiedono caratteristiche biomeccaniche simili a quella del disco intervertebrale [6], [18].

#### **4. Conclusioni e prospettive future di ricerca**

La ricerca scientifica sullo sviluppo, la caratterizzazione e la valutazione delle diverse classi di idrogel come potenziali materiali da utilizzare in ingegneria tissutale ha compiuto molti progressi nel corso degli anni. L'interesse nell'utilizzo degli idrogel come materiali per la riparazione e la rigenerazione di organi e tessuti danneggiati è principalmente dovuto alla loro elevata biocompatibilità, al loro elevato contenuto di acqua (simile a quello dei tessuti umani), alla capacità di agire come veicoli per cellule e farmaci e alla loro capacità di imitare (almeno in parte) la struttura e alcune funzioni della matrice extracellulare dei tessuti. Inoltre, si tratta di materiali potenzialmente personalizzabili, dotati di una vasta selezione di costituenti naturali o sintetici disponibili e di diverse tecniche di fabbricazione. Caratteristica molto importante in prospettiva futura è la possibilità di far ricorso ad approcci che mirino a creare costrutti ingegnerizzati personalizzati per ogni singolo paziente, a seconda del tipo di tessuto o organo danneggiato, tramite l'utilizzo di idrogel. Negli ultimi decenni, sono stati intrapresi sforzi straordinari e si sono raggiunti significativi progressi scientifici, che vanno dall'utilizzo di colture di cellule staminali impiantate su matrici in idrogel allo sviluppo di tecnologie avanzate di sintesi e lavorazione dei biomateriali. Tuttavia, la stragrande maggioranza delle strategie sviluppate fin ora è stata concepita utilizzando approcci eterologhi, cioè non specifici per il singolo paziente. La biofabbricazione è un campo di ricerca emergente e in rapida crescita in cui la stampa 3D si è unita all'ingegneria dei tessuti per generare costrutti ingegnerizzati personalizzati, simili ai tessuti e agli organi umani. Questo tipo di approccio consente la deposizione controllata di strati di 'inchiostrati' polimerici uno sopra l'altro per formare una matrice 3D con una forma esterna e una topografia definite, nonché una porosità interna. Le applicazioni di questa tecnica rappresentano un importante sistema in vitro per generare con precisione il microambiente cellulare tridimensionale su scala nanometrica, in cui è possibile riprodurre e studiare il comportamento cellulare. Gli idrogel si prestano bene alla stampa 3D grazie alla loro capacità di essere depositati come liquido, senza l'uso di solventi citotossici e senza che siano necessarie temperature elevate, che potrebbero non garantire la vitalità di cellule, fattori di crescita ed enzimi. Idrogel utilizzati per la produzione di costrutti di questo tipo caricati con cellule sono per esempio l'alginato, l'atolocollagene oppure le matrici extracellulari decellularizzate, tutte strutture che hanno riportato una vitalità del 95% dopo la deposizione di cellule staminali umane. Tuttavia, lo sviluppo di biomateriali utilizzabili nella stampa 3D, che combinano la stampa ad elevata risoluzione con la citocompatibilità, è uno dei principali ostacoli nello sviluppo di questo tipo di approcci. Pertanto, sono necessari nuovi tipi

di biomateriali polimerici che possano superare queste limitazioni. Una potenziale soluzione è la combinazione di una rete di idrogel termo-responsivi, che garantisca stabilità strutturale durante la stampa 3D, con una rete fotoreticolabile che consenta alla struttura stampata di essere stabilizzata tramite reticolazione covalente. È anche stato proposto l'utilizzo di una nuova generazione di biomateriali contenenti batteri modificati geneticamente, in grado di modulare dinamicamente il microambiente in cui vengono utilizzati. A tale scopo, i batteri vengono geneticamente modificati per produrre proteine di interesse, che vengono poi stimolate dall'esterno. Inoltre, la combinazione di progressi tecnologici come la biofabbricazione e l'utilizzo di biomateriali caricati con batteri potrebbe portare ad una nuova generazione di biomateriali realizzabili su richiesta per il singolo paziente. Tuttavia, l'applicazione effettiva di questi approcci deve ancora superare problematiche legate alla sicurezza dei batteri da caricare sul biomateriale [6], [21].

## 5. Bibliografia

- [1] Van Bemmelen, Das hydrogel und das krystallinische hydrat des kupferoxyds, 1894
- [2] Chirani N, Yahia LH, Gritsch L, History and Applications of Hydrogels. Journal of Biomedical Science, 2016
- [3] Buwalda SJ, Boere KW, Dijkstra PJ, Feijen J, Vermonden T, Hennink WE. Hydrogels in a historical perspective: from simple networks to smart materials. Journal of Controlled Release, 2014,190:254-73
- [4] El-Sherbiny IM, Yacoub MH. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. Global Cardiology Science and Practice, 2013, 316-42.
- [5] Ullah F, Bisyrul Hafi Othman M, Javed F, Ahmad Z, Akil H, Classification, processing and application of hydrogels: A review, Materials Science and Engineering, Volume 57, 2015, 414-433
- [6] Hunt JA, Chen R, Van Veen T, Bryan N, Hydrogel for tissue engineering and regenerative medicine, Journals of Materials Chemistry B, 2014
- [7] Varaprasad K, Raghavendra G, Jayaramudu T, Yallapu MM, Sadiku R, Materials Science and Engineering (2017) 958–971
- [8] Bustamante-Torres M, Romero-Fierro D, Arcentales-Vera B, Palomino K, Magaña HB, Hydrogels Classification According to the Physical or Chemical Interactions and as Stimuli-Sensitive Materials, 2021, 7(4):182
- [9] Aswathy SH, Narendrakumar U, Manjubala I, Commercial hydrogels for biomedical applications, Heliyon. 2020
- [10] Dimatteo R, Darling NJ, Segura T, In situ forming injectable hydrogels for drug delivery and wound repair, Advanced Drug Delivery Reviews 127 (2018) 167–184
- [11] Qiu Y, Park K, Environment-sensitive hydrogels for drug delivery, Advanced Drug Delivery Reviews, 2001, 321 –339
- [12] Cruise GM, Hegre OD, Lamberti FV, Hager SR, Hill R, Scharp DS, Hubbell JA. In vitro and in vivo performance of porcine islets encapsulated in interfacially photopolymerized poly (ethylene glycol) diacrylate membranes. Cell Transplant. 1999
- [13] Hill-West JL, Chowdhury SM, Slepian MJ, Hubbell JA. Inhibition of thrombosis and intimal thickening by in situ photopolymerization of thin hydrogel barriers, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1994, 91(13):5967–5971
- [14] Di Bello C, Bagno A. Biomateriali: dalla scienza dei materiali alle applicazioni cliniche, capitolo 6

- [15] Slaughter BV, Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas NA, Hydrogels in regenerative medicine, *Advanced Materials*, 2009, 21(32-33):3307-29
- [16] Gerecht S, Burdick JA, Ferreira LS, Townsend SA, Langer R, Vunjak-Novakovic G, Hyaluronic acid hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2007
- [17] Garbern JC, Minami E, Stayton PS and Murry CE, *Biomaterials*, 2011, 32, 2407
- [18] Munarin F, Petrini P, Bozzini S, Tanzi MC, New perspectives in cell delivery systems for tissue regeneration: natural-derived injectable hydrogels, *Journal of Applied Biomaterials Functional Materials*, 2012, 10(2):67-81
- [19] Banerjee A, Arha M, Choudhary S, Ashton RS, Bhatia SR, Schaffer DV and Kane RS, *Biomaterials*, 2009
- [20] Zuidema JM, Pap MM, Jaroch DB, Morrison FA and Gilbert RJ, Fabrication and characterization of tunable polysaccharide hydrogel blends for neural repair, *Acta Biomaterialia*, 2011
- [21] Gomez-Florit M, Pardo A, Domingues RMA, Graça AL, Babo PS, Reis RL, Gomes ME, Natural-Based Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Molecules*, 2020, 25(24):5858